

**[NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*:
Funktionen der am Metalleinbau beteiligten Proteine**

Melanie Blokesch



München 2004

*"It must be admitted from the beginning
that we do not know how life began."*

Stanley L. Miller, 1974

**[NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*:
Funktionen der am Metalleinbau beteiligten Proteine**

DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

vorgelegt von

Melanie Blokesch

München, den 22. Juli 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Böck

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Schartau

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2004

Publikationen:

Originalarbeiten:

Blokesch M., Magalon A., Böck A. (2001) Interplay between the specific chaperone-like proteins HybG und HypC in maturation of hydrogenases 1, 2, und 3 from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**:2817-2822

Magalon A., Blokesch M., Zehelein E., Böck A. (2001) Fidelity of metal insertion into hydrogenases. FEBS Lett. **499**:73-76

Blokesch M., Böck A. (2002) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. J. Mol. Biol. **324**:287-296

Hube M., Blokesch M., Böck A. (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA und HybF. J. Bacteriol. **184**:3879-3885

Blokesch M., Rohrmoser M., Rode S., Böck A. (2004) HybF, a Zinc Containing Protein Involved in NiFe Hydrogenase Maturation. J. Bacteriol. **186**:2603-2611

Blokesch M., Paschos A., Bauer A., Reissmann S., Drapal N., Böck A. (2004) Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalysed by the hydrogenase maturation proteins HypF und HypE. Eur. J. Biochem. **271**: 3428-3436

Blokesch M., Albracht S.P.J., Matzanke B.F., Drapal N.M., Jacobi A., Böck A. (2004) The Complex between Hydrogenase-Maturation Proteins HypC and HypD is an Intermediate in the Supply of Cyanide to the Active Site Iron of [NiFe]-Hydrogenases. J. Mol. Biol. **344**:155-167.

Übersichtsartikel:

Blokesch M., Paschos A., Theodoratou E., Bauer A., Hube M., Huth S., Böck A. (2002) Metal insertion into NiFe-hydrogenases. Biochem. Soc. Trans. **30**:674-680

Blokesch M., Böck A. (2002) Mechanismen der Metallzentrums-Synthese: Die Reifung Nickel-abhängiger Enzyme. BIOSpektrum **6/02**:699-703

Sawers R.G., Blokesch M., Böck A. (September 2004, posting date) Chapter 3.5.4., Anaerobic Formate und Hydrogen Metabolism. In R. Curtiss III (Editor in Chief) *EcoSal - Escherichia coli und Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. [Online.] <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
1. Der Ursprung des Lebens.....	1
2. Wächtershäuser's Theorie – Die Eisen-Schwefel-Welt.....	1
3. Eisen-Schwefel Proteine- die ältesten Biokatalysatoren.....	3
3.1. Überblick über Eisen-Schwefel Proteine	3
3.2. Die Reifung der Eisen-Schwefel Proteine.....	4
3.3. Das FNR Protein	7
3.4. Proteine mit modifizierten Eisen-Schwefel-Clustern.....	9
3.4.1. Das P-Cluster und der FeMo-Kofaktor der Nitrogenase.....	9
3.4.2. Das C-Cluster der CO-Dehydrogenase und das A-Cluster der Acetyl-CoA Synthase	11
4. Hydrogenasen.....	12
4.1. [Fe]-Hydrogenasen.....	12
4.2. [NiFe]-Hydrogenasen.....	14
5. Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen.....	15
6. Ziel dieser Arbeit	18
 MATERIAL UND METHODEN	 19
1. Materialien	19
1.1. Stämme und Plasmide	19
1.2. Medien und Supplemente.....	24
1.3. Oligonukleotide	25
1.4. Puffer und Lösungen	29
1.5. Chemikalien.....	30
1.6. Radioaktive Verbindungen.....	30
2. Methoden	31
2.1. Mikrobiologische Methoden	31
2.1.1. Aerobe and anaerobe Anzuchten von Bakterien	31
2.1.2. Bestimmung der Zelldichte und Zellmasse.....	31
2.1.3. Test auf Gasproduktion	31

2.2.	Genetische Methoden	31
2.2.1.	Konstruktion von Plasmiden	31
2.2.2.	Transformation	32
2.2.3.	Homologe Rekombination	32
2.2.4.	Integration des λ DE3 Phagens in das <i>E. coli</i> Chromosom	32
2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.3.1.	Isolierung chromosomaler DNA	32
2.3.2.	Isolierung von Plasmid-DNA	33
2.3.3.	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	33
2.3.4.	Bestimmung der DNA-Konzentration	33
2.3.5.	Enzymatische Modifikationen von DNA.....	33
2.3.6.	Polymerase Kettenreaktion	33
2.3.7.	Gerichtete Mutagenese durch inverse und direkte PCR.....	34
2.3.8.	Zwei-Schritt überlappende PCR.....	34
2.3.9.	Sequenzierung von DNA	35
2.4.	Elektrophorese und nachfolgende Analysen	35
2.4.1.	Auftrennung von DNA	35
2.4.2.	Präparation von Zell-Lysaten	35
2.4.3.	Auftrennung von Proteinen	35
2.4.4.	Proteinfärbung.....	36
2.4.5.	Westernblotanalyse (Immunoblot).....	36
2.4.6.	Aktivitätsfärbungen.....	37
2.4.7.	Autoradiographie.....	37
2.5.	Proteinreinigungen	37
2.5.1.	Herstellung von zellfreien Extrakten.....	38
2.5.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	38
2.5.3.	Ammoniumsulfat-Fällung, Aufkonzentrierung und Dialyse	38
2.5.4.	Affinitätschromatographie (<i>Strep-Tactin</i> [®]).....	39
2.5.5.	Eichlauf der Gelfiltration	39
2.5.6.	Reinigungsprotokoll für HypC-Strep	39
2.5.7.	Reinigungsprotokoll für Strep-HypD.....	40
2.5.8.	Reinigungsprotokoll für HybF-Strep	41
2.5.9.	Reinigungsprotokoll für HypE	41

2.5.10. Reinigungsprotokoll für HypF	41
2.5.11. Anreicherungsprotokoll für Proteinkomplexe.....	42
2.6. Biochemische Methoden	42
2.6.1. <i>In vitro</i> Prozessierung und Aktivierung von Hydrogenasen	42
2.6.2. Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität von ganzen Zellen	42
2.6.3. Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität in Rohextrakten	43
2.6.4. Transcarbamoylierung und Dehydratisierung.....	43
2.6.5. Transfer des Cyanids von HypE auf HypC × HypD	43
2.6.6. Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität.....	43
2.7. Proteininteraktionen	44
2.7.1. Bakteriellcs Zwei-Hybrid System	44
2.7.2. Koelution.....	44
2.7.3. <i>In vitro</i> Komplexbildung.....	44
2.7.4. Quervernetzungsversuche („crosslinking“)......	44
2.8. Arbeitsmethoden mit radioaktiven Substanzen.....	45
2.8.1. <i>In vivo</i> Markierung mit ⁶³ Nickel	45
2.8.2. <i>In vitro</i> Bindung von ⁶³ Nickel.....	45
2.8.3. <i>In vivo</i> Markierung mit [¹⁴ C]-CitruUin.....	45
2.8.4. <i>In vitro</i> Markierung mit [¹⁴ C]-Carbamoylphosphat oder [¹⁴ C]-CitruUin.....	46
2.8.5. Test auf ATP Hydrolyse mit α-markiertem ³² P-ATP	46
2.8.6. Test auf ATP Hydrolyse mit γ-markiertem ³² P-ATP	46
2.8.7. Test auf GTP Hydrolyse mit γ-markiertem ³² P	47
2.9. Bioinformatische Methoden	47
2.9.1. Bild- und Textverarbeitung	47
2.9.2. Verwendete Datenbanken	47
2.10. Sonstige Methoden	47
2.10.1. Bestimmung des UV-VIS Spektrums	47
2.10.2. Quantifizierung von säurelabilein Schwefel	48
2.10.3. Bestimmung von nicht-Häm Eisen	48
2.10.4. Eisen-Bestimmung mittels ICP-OES	48
2.10.5. EPR und Mössbauer Spektroskopie	48
2.10.6. Fluoreszenzmarkierung und Massenspektrometrie	49

ERGEBNISSE	50
1. Funktion des HypA- / HybF-Proteins beim Einbau von Nickel	50
1.1. Analyse von Varianten des HybF-Strep-Proteins	50
1.2. <i>In vitro</i> Reifung der Hydrogenasen in Abhängigkeit von HypA bzw. HybF.....	51
1.3. Reinigung des HybF-Strep- und HybF-Strep[H2Q]-Proteins	53
1.4. Metallgehalt von und Nickelbindung durch HybF-Strep	53
2. Das HypD Protein	56
2.1. Die Sequenz von HypD	56
2.2. Überproduktion und Löslichkeit	57
2.3. Reinigung von Strep-HypD	58
2.4. Bestimmung von Eisen und säurelabilem Schwefel	59
2.5. UV-VIS Spektrum von Strep-HypD	60
2.6. Anzuchten mit ⁵⁷ Fe für Mössbauermessungen	61
2.7. Mössbauer und EPR Spektroskopie	62
2.8. Aminosäureaustausche in HypD	63
2.9. Charakterisierung von Strep-HypD Varianten	65
3. Einfluß des Carbamoylphosphat-Mangels auf die Hydrogenase-Reifung	66
3.1. Citrullin Zufütterungsversuche	66
3.2. Effekt der Überproduktion der Ornithin Transcarbamoylase	68
3.3. Deletion des Argininosuccinat Synthetase-Gens	69
3.4. Anhäufung des HypC × HypD Komplexes im ΔCarAB Stamm	70
4. Der HypC × HypD Komplex	71
4.1. Auflösung des HypC × HypD Komplex durch Citrullin-Zufütterung	71
4.2. Konstruktion von Δ <i>carAB</i> Δ <i>hyp</i> Doppelmutanten	72
4.3. Abhängigkeit der Komplexbildung von HypE und HypF	74
4.4. Die Rolle des N-terminalen Cysteins von HypC	75
4.5. Auswirkungen weiterer Aminosäureaustausche in HypC auf die Funktion	76
4.6. Auswirkung von Aminosäureaustauschen in HypD auf die Komplexbildung	78
4.7. Koelution von HypC-Strep und HypD in der Affinitätschromatographie	79
4.8. Interaktionsstudien mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems	81
4.9. Bestimmung der Stöchiometrie von HypC und HypD im Komplex	82
4.10. <i>In vitro</i> Komplexbildung	85
4.11. Quervernetzungsversuche	86

5.	Untersuchungen zur Synthese und dem Transfer des Cyanid-Liganden	88
5.1.	Optimierung der ¹⁴ C-Markierung und der Produktdifferenzierung	88
5.2.	Kinetik der Transcarbamoylierung.....	89
5.3.	HypE und HypF Interaktion	90
5.4.	HypE-Monomer als Akzeptor der Carbamoylgruppe	91
5.5.	ATPase-Aktivität von HypE	92
5.6.	Analyse von HypE-Varianten	95
5.7.	HypE-Markierung durch [¹⁴ C]-Citrullin	97
5.8.	Transfer des Cyanids auf den HypC × HypD Komplex.....	98
5.9.	Der HypC × HypD × HypE Komplex	101
5.10.	Funktionalität des HypC × HypD × HypE Komplexes.....	103
5.11.	HypC × HypD Komplex mit mutantem HypE.....	104
5.12.	Inhibition des Cyanid-Transfers.....	105
	DISKUSSION	108
1.	Das HypD Protein	109
2.	Ein Gerüstkomplex zur Ligandensynthese.....	113
3.	Der Cyanidtransfer	114
4.	Die Übertragung des Eisenzentrums durch HypC	118
5.	Der Nickeleinbau	119
6.	Überlegungen zur Synthese von CO	121
	ZUSAMMENFASSUNG	125
	LITERATURVERZEICHNIS	127
	ANHANG	156

Abkürzungsverzeichnis

A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
AHT	Anhydrotetracyclin
AMP/ATP	Adenosin-5'-mono-/tri-phosphate
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Benzylviologen
Cm	Chloramphenicol
CP	Carbamoylphosphat
cpm	counts pro minute
DEAE	Diethylaminoethyl
DTNB	5, 5'-Dithiobis- (2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
FeS-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
× g	×-fache Erdbeschleunigung
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kDa	Kilo Dalton
Km	Kanamycin
K _m	Michaelis-Menten Konstante
2-ME	2-Mercaptoethanol
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ONPG	2-Nitrophenyl-β-O-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	pounds/inch ²
x ^R	Resistenz gegen Antibiotikum x
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris (Hydroxymethyl) - Aminomethan
UV-Vis	Ultraviolett visible
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

EINLEITUNG

1. Der Ursprung des Lebens

Vor über 4,5 Milliarden Jahren kam es zur Bildung der Uratmosphäre durch Entgasung der noch flüssigen Erde. Die vorherrschenden Gase waren Wasserstoff, Wasserdampf, Methan, Schwefelwasserstoff und Ammoniak (Neumüller, 1985), und es gab so gut wie keinen freien Sauerstoff. Doch wie entstand das erste Leben? Die frühe, von dem russischen Wissenschaftler Aleksandr Oparin vertretene Vorstellung, das Leben wäre aus einer „Ursuppe“ entstanden, wurde durch Experimente von Stanley Miller erhärtet und in der Ausgabe von Science am 15. Mai 1953 unter dem Titel "A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions" veröffentlicht (Miller, 1953). Dies zeigte zwar, dass lebenswichtige organische Stoffe aus anorganischen entstehen können, nachfolgend wurden jedoch Zweifel an den Versuchsbedingungen gehegt.

Mittlerweile existieren drei Theorien zur Entstehung von Leben: die Lipid-Welt-Theorie, die RNA-Welt-Theorie und die Eisen-Schwefel-Welt-Theorie.

Die Lipid-Welt-Theorie basiert auf der Annahme, dass Aggregate aus fettartigen Molekülen die ersten Informations- und Fortpflanzungseinheiten darstellten (Segre *et al.*, 2001). Die genetische Information und mögliche Stoffwechselfvorgänge folgten erst später.

Die RNA-Welt-Theorie beruht auf der Fähigkeit von RNA Informationen zu speichern, Reaktionen zu katalysieren und sich ohne Proteine vervielfältigen zu können. War somit die RNA das erste biologisch aktive Molekül?

Dem entgegen steht eine dritte Theorie, die der Eisen-Schwefel-Welt. Sie wurde 1988 von Günter Wächtershäuser vorgestellt. Sie verlangt nur das Vorhandensein von einfachen anorganischen Molekülen wie Wasser, Eisen, Kohlendioxid und Schwefelwasserstoff.

2. Wächtershäuser's Theorie – Die Eisen-Schwefel-Welt

Die Theorie von Wächtershäuser zeigt im Detail, wie sich organische Moleküle entwickelt haben. Demnach entstand die Urform des Lebens gebunden auf der Oberfläche von Pyritkristallen (FeS₂), einem weitverbreitetem Eisenerz (Neumüller, 1985), das man unter anderem auch an „Schwarzen Rauchern“ in der Tiefsee findet. Die Energiequelle war hierbei die Reduktionskraft von FeS / H₂S (Gleichung 1; Wächtershäuser, 1988b; Blochl *et al.*, 1992).



Die Zwischenprodukte mit anionischen Gruppen (COO^- , S^- , COS^-) wurden an der Oberfläche des positiv geladenen Pyrits gebunden und stellten die ersten organisierten Lebenseinheiten dar (Wächtershäuser, 1994). Dies wurde als „Theorie des Oberflächenmetabolismus“ publiziert (Wächtershäuser, 1988a). Später wurde auch eine Theorie für den ersten autokatalytisch ablaufenden Reproduktionszyklus vorgeschlagen (Wächtershäuser, 1990). Der Ur-Metabolismus, als „archaic citric acid cycle“ bezeichnet, war laut Wächtershäuser ein Vorläufer des reduktiven Zitronensäurezyklus und des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs. Zusammen mit C. Huber von der TU München gelang es Wächtershäuser, einige seiner Thesen experimentell zu unterstützen. Als primärer Schritt wurde die Bildung einer C-C Bindung in Form von aktivierter Essigsäure angesehen. Dies gelang durch Erhitzen (100°C) von Methylmercaptan (CH_3SH), einem häufigen Bestandteil von hydrothermalen und vulkanischen Ausdünstungen, und Kohlenmonoxid zusammen mit Eisensulfid und Nickelsulfid unter hohem Druck, wobei Essigsäure entstand (Gleichung 2; Huber und Wächtershäuser, 1997).



Gleichung 2
(Huber und Wächtershäuser, 1997)

Auch die Bildung von Peptiden aus Aminosäuren konnte unter diesen ursprünglichen Bedingungen nachgewiesen werden (Huber und Wächtershäuser, 1998; Wächtershäuser, 2000). Es folgte die Erkenntnis, dass die synthetisierten Peptide auch wieder in Aminosäuren zerlegt werden können (Huber *et al.*, 2003). Durch diesen Zyklus („primordial peptide cycle“; Huber *et al.*, 2003) zwischen Aufbau und Abbau wird das Material funktionsloser Peptide wiederverwendet.

Was spricht unabhängig von seinen eigenen Arbeiten für Wächtershäuser's Theorie?

- Es gibt auch heute noch Organismen, die auf CH_3SH als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können (Huber und Wächtershäuser, 1997). Hierzu zählen einige methanogene Archaea sowie thermophile Sulfatreduzierer (Tanimoto und Bak, 1994).
- Die Versuche von Huber *et al.* (2003) zum Peptidzyklus zeigten, dass harnstoffhaltige Derivate mit Hilfe des $(\text{Fe,Ni})\text{S}$ hydrolysiert werden. Dies könnte einen Vorläufer des Ni-enthaltenden Enzyms Urease darstellen.
- Die oben beschriebene Bildung von aktivierter Essigsäure mit Hilfe von Eisen- und Nickelsulfid erinnert an die Bildung von Acetyl-CoA mit Hilfe des Enzyms CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase: auch hier sind Eisen, Schwefel und Nickel in Form ungewöhnlicher Nickel-Eisen-Schwefel-Cluster notwendig.

- Nach der Vorstellung Wächtershäuser's waren eisen- und schwefelhaltige Mineralien für die ersten Reaktionen verantwortlich. Noch heute bilden komplexe Eisen-Schwefel-Cluster aktive Zentren von Enzymen. Sie setzen die Komponenten der ursprünglichen Erde wie Stickstoff, Kohlenmonoxid und Wasserstoff um (Rees und Howard, 2003).

3. Eisen-Schwefel Proteine- die ältesten Biokatalysatoren

3.1. Überblick über Eisen-Schwefel Proteine

Allgemein gehören die Eisen-Schwefel- (FeS-) Zentren zu der verbreitetsten und, sowohl strukturell als auch funktionell, mannigfaltigsten Klasse von prosthetischen Gruppen in Proteinen (Beinert und Palmer, 1965; Cammack, 1992b; Beinert *et al.*, 1997; Johnson, 1998). Sie stellen die ältesten und somit ersten Kofaktoren in der Enzymkatalyse dar (Rees und Howard, 2003). Bereits im Jahre 1969 waren achtzehn verschiedene Eisen-Schwefel Proteine aus Pflanzen und Bakterien bekannt (Hall und Evans, 1969), 1992 schon über hundert (Cammack, 1992b), und die Anzahl steigt noch immer stetig an. Anfangs dachte man, dass sie nur eine Funktion beim Elektronen-Transport ([2Fe-2S]-, [4Fe-4S]- und HiPIP-Ferredoxine) besitzen (Yoch und Carithers, 1979). Mittlerweile sind jedoch zahlreiche andere Funktionen von Eisen-Schwefel Proteinen entdeckt worden: Sie dienen der Koordination von Proteinen (wie in der Endonuclease III), besitzen sensorische und regulatorische Funktionen (Übersichtsartikel: Beinert und Kiley, 1999; Kiley und Beinert, 2003; zum Beispiel das FNR Protein, siehe 3.3.) und vermitteln Disulfid Reduktionen und reduktive Spaltung von S-Adenosylmethionin (Johnson, 1998); auch katalytisch aktive FeS-Cluster wie die Aconitase wurden beschrieben.

Eisen-Schwefel Proteine sind gekennzeichnet durch ein oder mehrere (nicht-Häm) Eisenatome, die an anorganischem Schwefel (auch säurelabiler Schwefel genannt) und/oder dem Schwefel von Cysteinen gebunden sind (Sticht und Rösch, 1998). Obwohl Rubredoxine keinen säurelabilen Schwefel besitzen, werden sie trotzdem den Eisen-Schwefel-Proteinen zugerechnet. Auch die Rieske Proteine unterscheiden sich von anderen Eisen-Schwefel-Clustern, da sie durch zwei Cysteine und zwei Histidine mit dem Protein verbunden sind. Von der Struktur her können vier Clustertypen unterschieden werden (Abb. 1): Rubredoxin-artige, [2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S]-Cluster. Die [3Fe-4S]-Cluster kommen seltener vor und entstehen durch Oxidation aus [4Fe-4S]-Zentren. Hierbei ist das Zentrum nur durch drei Cysteinliganden an das Protein geheftet (Beinert, 2000).

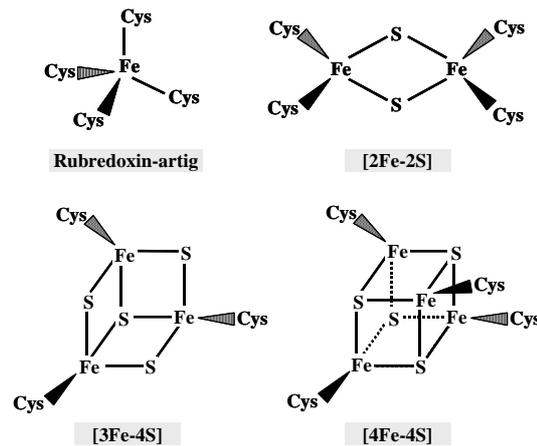


Abbildung 1: Die Koordination von Eisen und Schwefel in den vier einfachsten Eisen-Schwefel Clustern (basierend auf Kiley und Beinert, 2003).

Die Eisen-Schwefel-Cluster können in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen. Hierbei gilt, dass die Anzahl der möglichen Oxidationsstufen mit der Anzahl der beteiligten Eisenatome ansteigt (Rees, 2002), da jedes Eisen als Ferro- oder Ferri-Eisen vorliegen kann. Somit hat jedes FeS-Cluster mit n Eisenatomen $n + 1$ Oxidationszustände (Rees, 2002).

Generell besitzen Eisen-Schwefel-Cluster ein niedriges Reduktionspotential ($E^{\circ} \approx -400$ mV; Beinert, 2000) und sie nehmen oft an Reduktionen von Molekülen teil (Rees, 2002). Eine Ausnahme stellen die Rubredoxine ($E^{\circ} \approx 0$ mV) und die „High-Potential Iron-Sulfur Proteins“ (HiPIP) dar (als Übersicht: Carter Jr., 2001). Sie besitzen ein kubisches, durch 4 Cysteine im Protein verankertes FeS-Cluster (Breiter *et al.*, 1991), das *in vitro* zwischen den Formen $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ und $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ agiert (Carter Jr. *et al.*, 1972). Das HiPIP von *R. globiformis* besitzt ein Redoxpotential von $E^{\circ} \approx +450$ mV (Ambler *et al.*, 1993).

Einige der Eisen-Schwefel-Cluster assemblieren spontan unter reduktiven Bedingungen aus Eisen (II) und Sulfid (Beinert *et al.*, 1997). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass *in vivo* akzessorische Proteine an der Bildung von Eisen-Schwefel-Proteinen beteiligt sind.

3.2. Die Reifung der Eisen-Schwefel Proteine

Die Herstellung oder Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster durch spontane Anordnung der Bestandteile ist *in vitro* möglich (Malkin und Rabinowitz, 1966; Beinert *et al.*, 1997), *in vivo* aber ist sie zu ineffizient und würde eine Anhäufung von Fe^{2+} und S^{2-} in toxischen Mengen voraussetzen (Übersichtsartikel: Beinert, 2000; Frazzon und Dean, 2003; Kiley und Beinert, 2003). Aus diesem Grund besitzt die Zelle ein Konsortium von hoch konservierten Proteinen, die sowohl die Synthese der Eisen-Schwefel-Cluster als auch deren Einbau in die Proteine bewerkstelligen. Der Reifungsmechanismus der Eisen-Schwefel-Proteine scheint in

der Natur weit verbreitet zu sein, da homologe Proteine in allen drei Reichen vorhanden sind (Frazzon *et al.*, 2002). Die meisten veröffentlichten Arbeiten hierzu stammen von der Gruppe um D. Dean, die sich mit der Untersuchung der Nitrogenase im Bakterium *Azotobacter vinelandii* befasst (Jacobson *et al.*, 1989 und als Übersicht: Dean *et al.*, 1993; Frazzon und Dean, 2003). Die Hilfsproteine der Eisen-Schwefel-Cluster Synthese wurden deswegen unter den *nif* (nitrogen fixation) Genen gefunden (Abb. 2; Jacobson *et al.*, 1989) und die Genprodukte als NifS und NifU bezeichnet. Homologe Proteine in stickstoff- und nichtstickstoff-fixierenden Organismen werden durch die *isc* (iron-sulfur cluster) Gene kodiert (Abb. 2; Zheng *et al.*, 1998). Da sie an generellen Zellprozessen beteiligt sind, werden sie den Haushaltsgenen („housekeeping“) zugerechnet.

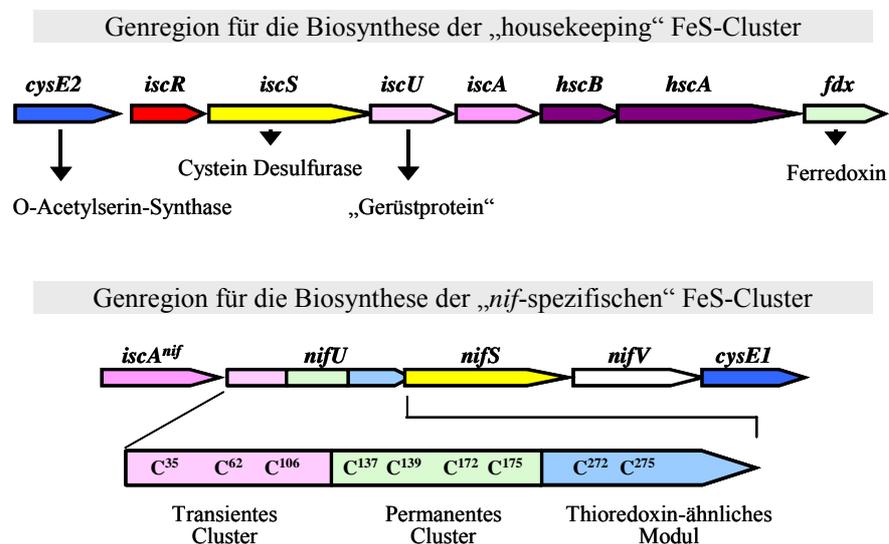
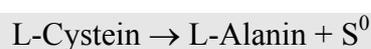


Abbildung 2: Organisation der Stickstoff-Fixierung spezifischen- (*nif*) und „Haushalts“-Gene der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese in *A. vinelandii* (frei nach Frazzon und Dean, 2003; Frazzon *et al.*, 2002). Die Domänenstruktur von NifU ist vergrößert dargestellt.

NifS wurde erstmals aus *A. vinelandii* gereinigt und erscheint als Homodimer in der Gelfiltration. NifS ist ein pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym (Zheng *et al.*, 1993) mit Cystein-Desulfurase-Aktivität und rekrutiert den Schwefel aus Cystein (Gleichung 3; Zheng *et al.*, 1993).



Gleichung 3
(Zheng *et al.*, 1993)

Der Schwefel wird intermediär als Persulfid an einem aktivierten Cysteinrest (Cystein 325) von NifS gebunden (Zheng und Dean, 1994; Zheng *et al.*, 1994). Das homologe Protein IscS (Zheng *et al.*, 1998) besitzt *in vitro* die gleiche Funktion wie NifS und wurde aus *A. vinelandii* (Zheng *et al.*, 1998), heterolog aus *E. coli* (Zheng *et al.*, 1998) und homolog aus *E. coli* (als NifS-ähnliches Protein; Flint, 1996) gereinigt. Die wichtige Rolle von IscS bei der Herstellung von Eisen-Schwefel-Clustern wurde durch *in vivo* Studien in *E. coli* bestätigt (Schwartz *et al.*, 2000): eine *iscS* Mutante besaß reduzierte Aktivitäten von löslichen (Aconitase B, 6-Phosphogluconat-Dehydratase, Glutamat Synthase, Fumarase A und FNR) und membran-gebundenen Proteinen (NADH Dehydrogenase und Succinat Dehydrogenase); sie alle besitzen ein [4Fe-4S]-Zentrum (Schwartz *et al.*, 2000).

NifU dient als Gerüst-Protein für die Synthese der FeS-Cluster (Fu *et al.*, 1994). Das *nifU* Gen wurde heterolog in *E. coli* exprimiert und das Produkt wurde ebenfalls als Homodimer gereinigt (Fu *et al.*, 1994). Es enthält pro Untereinheit ein [2Fe-2S]-Zentrum, welches fest an das Protein gebunden ist und auch durch starke Chelat-Reagenzien nicht entfernt werden kann (Fu *et al.*, 1994). Die NifU-Struktur kann in drei Domänen unterteilt werden (siehe Abb. 2; Agar *et al.*, 2000b; Frazzon *et al.*, 2002): In der N-terminalen Region werden die für den Transfer zu anderen Proteinen bestimmten Eisen-Schwefel-Cluster (= transiente Cluster) assembliert. In der zentralen Region befinden sich vier essentielle Cysteine, welche ein redox-aktives [2Fe-2S]^{2+/1+}-Cluster binden (Agar *et al.*, 2000b). Dieses Eisen-Schwefel-Cluster wird nicht übertragen und somit als permanentes Cluster bezeichnet. Es ist vermutlich bei der Freigabe des transienten Clusters an die Nitrogenase beteiligt (Agar *et al.*, 2000b; Yuvaniyama *et al.*, 2000). Am C-Terminus befindet sich ein CXXC Motiv, das dem Motiv von Thioredoxinen ähnelt. Seine Funktion ist nicht bekannt, jedoch wurde kürzlich vorgeschlagen, dass es ebenfalls als Assemblierungs-Plattform für [2Fe-2S] und [4Fe-4S]-Cluster dient (Dos Santos *et al.*, 2004). Das homologe Protein IscU ist kleiner als NifU und enthält nur die N-terminale Domäne zur Bildung des transienten Clusters (Zheng *et al.*, 1998). Die Rolle des permanenten [2Fe-2S]-Clusters wird hier eventuell durch ein Ferredoxin (*fdx*) übernommen, welches ebenfalls in der Genregion kodiert ist (siehe Abb. 2; Jung *et al.*, 1999; Kakuta *et al.*, 2001).

Bereits 1980 wurde durch Stabilitätsuntersuchungen von Roberts und Bill (1980) die Hypothese erhoben, dass NifS und NifU in *K. pneumoniae* einen Komplex bilden. Tatsächlich wurde dann ein kurzlebiger Komplex zwischen NifS und NifU *in vitro* gezeigt, wobei NifS den Schwefel auf NifU überträgt. Durch den zusätzlichen Erwerb von Eisen wurde ein labiles [2Fe-2S]-Zentrum am NifU Protein gebildet (Yuvaniyama *et al.*, 2000). Auch für das Isc-

System wurde gezeigt, dass IscU und IscS interagieren (Agar *et al.*, 2000c; Urbina *et al.*, 2001). Der Schwefel wird hierbei von IscS auf eine Cysteingruppe von IscU übertragen (Urbina *et al.*, 2001) und zusammen mit dem Eisen in ein transientes [2Fe-2S] oder [4Fe-4S]-Cluster umgewandelt (Agar *et al.*, 2000a; Agar *et al.*, 2000c; Smith *et al.*, 2001; Urbina *et al.*, 2001). Nuth *et al.* postulierten hingegen, dass zuerst das Eisen am IscU gebunden wird, und dass dann die Schwefelübertragung von IscS aus erfolgt (Nuth *et al.*, 2002).

Der Übertragungsmechanismus des FeS-Clusters von NifU zum Eisen-Protein der Nitrogenase (Jacobson *et al.*, 1989) ist bisher nicht geklärt (Frazzon *et al.*, 2002). *In vitro* Studien weisen jedoch auf einen direkten Transfer durch Ligandenaustausch hin (Dos Santos *et al.*, 2004) und nicht auf eine Freisetzung und Reassemblierung von Fe²⁺ und S²⁻.

Auch eines der bekanntesten Eisen-Schwefel-Proteine, FNR, wird durch IscS/IscU synthetisiert (Schwartz *et al.*, 2000); es wird im weiteren kurz beschrieben.

3.3. Das FNR Protein

Neben der Rolle als Elektronenüberträger können Eisen-Schwefel-Proteine auch regulatorisch wirken. Ein Beispiel ist das FNR (Fumarat-Nitrat-Reduktion) Protein (als Übersichtsartikel: Kiley und Beinert, 1998). Lambden und Guest (1976) hatten das *fnr* Gen erstmals bei der Untersuchung von Fumarat- und Nitrat-Reduktase negativen Mutanten aus *E. coli* beschrieben. FNR kontrolliert die Expression von zahlreichen Genen (Sawers *et al.*, 1988; und als Übersicht siehe Tabelle 2 in Unden *et al.*, 1995), unter ihnen auch das *nik* Operon (Wu *et al.*, 1989) und Teile des *hyp* Operons (*hypBCDE*, siehe unten; Lutz *et al.*, 1991; Messenger und Green, 2003).

Der N-Terminus des FNR Proteins enthält ein konserviertes C¹⁶_{x3}C²⁰_{x2}C²³_{x5}C²⁹-Motiv, wovon drei Cysteine essentiell sind (Cys20, 23 und 29; Melville und Gunsalus, 1990; Spiro und Guest, 1990; Sharrocks *et al.*, 1990). FNR wurde zunächst unter aeroben Bedingungen als Monomer gereinigt; es enthielt unterstöchiometrische Menge an Eisen (Green *et al.*, 1991; Green und Guest, 1993a; Green und Guest, 1993b; Lazazzera *et al.*, 1993). Es wurde vermutet, dass es sich um ein Metalloprotein handelt (Spiro und Guest, 1988), und Versuche mit Metall Chelatoren und Fe²⁺-Supplementation verstärkten diese Idee (Spiro *et al.*, 1989; Trageser und Unden, 1989). Später wurde gezeigt, dass FNR ein Eisen-Schwefel-Cluster enthält (Lazazzera *et al.*, 1996). Dieses wurde nach Rekonstitution in Anwesenheit von Fe²⁺, DTT, L-Cystein und NifS bzw. nach anaerober Reinigung als [4Fe-4S]-Cluster identifiziert (Green *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997). Man vermutet, dass

es durch vier Cystein-Reste (Cys20, 23, 29 und 122) gebunden wird (Jordan *et al.*, 1997), obwohl für diese Zuordnung noch strukturelle Beweise fehlen (Bates *et al.*, 2000).

In seiner aktiven Form ist FNR ein Homodimer (Lazazzera *et al.*, 1993; Bates *et al.*, 1995; Ziegelhoffer und Kiley, 1995; Lazazzera *et al.*, 1996) mit jeweils einem [4Fe-4S]-Cluster pro Untereinheit (Khoroshilova *et al.*, 1997; Moore und Kiley, 2001). Durch Mössbauer Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass es sich um ein [4Fe-4S]-Cluster der Oxidationsstufe +2 handelt (Mössbauer Parameter: $\delta = 0.45 \text{ mms}^{-1}$; $\Delta E_Q = 1.22 \text{ mms}^{-1}$; Khoroshilova *et al.*, 1997) und somit „EPR-silent“ ist (Green *et al.*, 1996). *In vitro* zerfällt das [4Fe-4S]²⁺ durch Sauerstoff in ein biologisch inaktives [2Fe-2S]²⁺-Cluster (Khoroshilova *et al.*, 1997). Die Konvertierung vom [4Fe-4S]²⁺ zum [2Fe-2S]²⁺-Cluster findet auch *in vivo* statt, was durch Mössbauer Messungen an ganzen Zellen gezeigt wurde (Popescu *et al.*, 1998). Obwohl das [2Fe-2S]²⁺-Cluster in FNR stabiler gegenüber Sauerstoff ist, wurde es in aeroben Zellen nicht nachgewiesen, da es eventuell labil gegenüber Superoxid ist (Sutton *et al.*, 2004). Eine *in vivo* Oxidation von FNR durch Ferricyanid wurde beschrieben (Unden *et al.*, 1990) und auch *in vitro* gezeigt, wozu ein zwanzigfacher Überschuss an K₃Fe(CN)₆ notwendig war. Das Cluster wurde dabei zerstört und Fe³⁺ freigesetzt (Jordan *et al.*, 1997).

Eine Reduktion des [4Fe-4S]²⁺-Cluster zum [4Fe-4S]¹⁺-Cluster ist *in vitro* nur partiell durch Dithionit möglich (Green *et al.*, 1996; Kiley und Beinert, 1998). Da das Redoxpotential des 1+/2+ Paars von FNR auf <-650 mV geschätzt wurde, erscheint es unwahrscheinlich, dass es *in vivo* als [4Fe-4S]¹⁺-Cluster existiert. Auch physiologische Elektronendonatoren oder -akzeptoren, die auf einen Wechsel des Redoxstatus von FNR *in vivo* hinweisen, sind nicht bekannt (Kiley und Beinert, 1998).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass FNR in zwei Formen vorliegen kann:

- Unter aeroben Bedingungen als Monomer das kein Eisen-Schwefel-Cluster bzw. ein [2Fe-2S]²⁺-Cluster enthält. In dieser Form ist es inaktiv und bindet nicht an DNA.
- Unter anaeroben Bedingungen als Dimer mit einem [4Fe-4S]²⁺-Cluster pro Untereinheit. Diese Form ist aktiv, kann an DNA binden und dabei die Transkription regulieren.

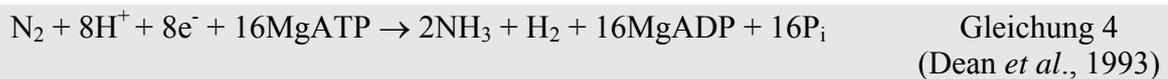
Die Anordnung von Eisen und Schwefel in FNR entspricht den in Abbildung 1 dargestellten Clustertypen. Modifizierte Eisen-Schwefel-Cluster wie zum Beispiel der FeMo-Kofaktor und das P-Cluster der Nitrogenase, das C- und A-Cluster der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthasen und das H-Cluster der [Fe]-Hydrogenasen werden im nächsten Abschnitt vorgestellt.

3.4. Proteine mit modifizierten Eisen-Schwefel-Clustern

Obwohl die Eisen-Schwefel-Metallocluster im aktivem Zentrum der Nitrogenase, CO-Dehydrogenase und der Hydrogenasen der Organisation von einfachen Eisen-Schwefel-Clustern ähneln, gibt es Unterschiede, die ihnen die Bindung von zusätzlichen Liganden ermöglichen und neue katalytische Eigenschaften verschaffen (Rees und Howard, 2003).

3.4.1. Das P-Cluster und der FeMo-Kofaktor der Nitrogenase

Ein besonders interessantes Protein ist in diesem Zusammenhang die Nitrogenase (Übersichtsartikel: Peters *et al.*, 1995; Burgess und Lowe, 1996; Eady, 1996; Muchmore *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 2001). Sie katalysiert die ATP-abhängige Reduktion von Stickstoff zu Ammonium, wobei als Nebenprodukt Wasserstoff freigesetzt wird (Gleichung 4).



Die Nitrogenase ist aus zwei Proteinen aufgebaut: dem Eisen-Protein (γ_2) und dem Molybdän-Eisen-Protein ($\alpha_2\beta_2$) (auch Dinitrogenase-Reduktase bzw. Dinitrogenase).

Das Eisen-Protein ist ein Homodimer mit einem [4Fe-4S]-Cluster und koppelt ATP Hydrolyse mit Protein internem Elektronentransfer (Dean *et al.*, 1993; Einsle *et al.*, 2002). Beide Untereinheiten des Eisen-Proteins besitzen eine MgATP-Bindestelle ähnlich zu anderen Nukleosidphosphat-Bindeproteinen (Walker *et al.*, 1982; Howard und Rees, 1996). Zunächst wurde vermutet, dass das Eisen-Protein ein Elektron an das Molybdän-Eisen-Protein weitergibt und das FeS-Cluster damit zwischen den Oxidationszuständen 2+ und 1+ pendelt. 1994 wurde jedoch von Watt und Reddy berichtet, dass die [4Fe-4S]¹⁺ Form sich weiter zum Ferrozustand aller Eisenatome [4Fe-4S]⁰ reduzieren lässt (Watt und Reddy, 1994). Diese Reduktion war mit Methylviologen, Ti(III)citrat und dem physiologischen Elektronendonator (Flavodoxin) möglich, nicht jedoch mit Dithionit als Reduktionsmittel (Watt und Reddy, 1994; Burgess und Lowe, 1996). Auch andere Gruppen konnten die Existenz des [4Fe-4S]⁰ Zustands nachweisen (Angove *et al.*, 1997; Angove *et al.*, 1998; Strop *et al.*, 2001). Somit werden jeweils zwei Elektronen übertragen und das Cluster wechselt von [4Fe-4S]⁰ nach [4Fe-4S]²⁺ (Angove *et al.*, 1998).

Das Molybdän-Eisen-Protein bindet pro Untereinheit ein [8Fe-7S]-Cluster (P-Cluster) und ein heterometallisches [Mo-7Fe-9S]-Cluster (Abb. 3; Chan *et al.*, 1993). Letzteres wird als FeMo-Kofaktor bezeichnet, da es aus säure-denaturiertem Protein intakt extrahiert werden

kann (Shah und Brill, 1977) und aktives Enzym mit Kofaktor-defizientem-Protein bildet (Howard und Rees, 1996).

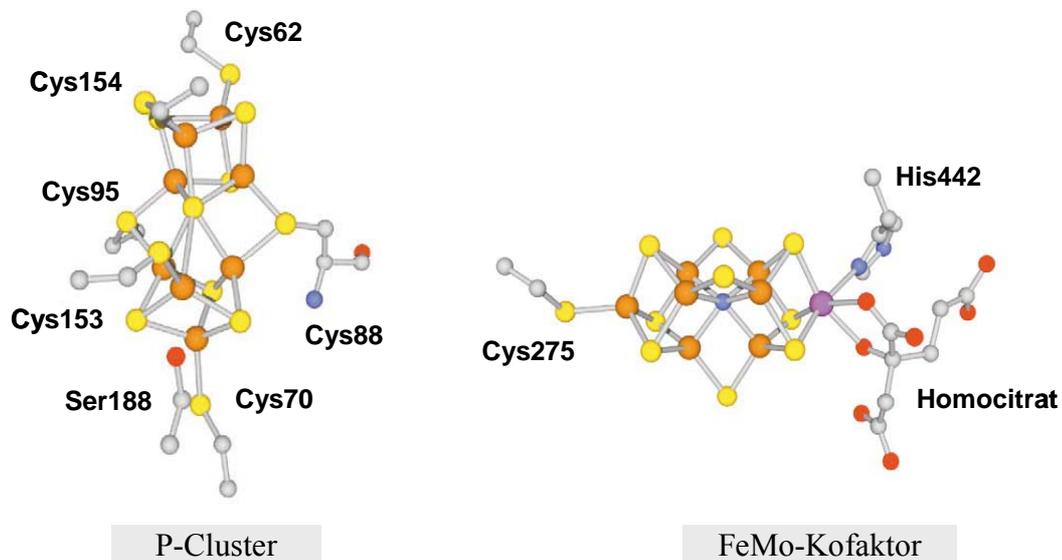


Abbildung 3: Strukturen des P-Clusters und des FeMo-Kofaktors der Nitrogenase (aus Drennan und Peters, 2003). Eisen ist in orange dargestellt, Schwefel in gelb, Sauerstoff in rot, Kohlenstoff in grau, Stickstoff in blau und Molybdän in violett.

Auch das P-Cluster im MoFe-Protein nimmt an der Elektronen-Übertragung teil. Das [8Fe-7S]-Cluster kann als Dimeres von zwei [4Fe-3S]-Cluster angesehen werden, die über ein hexakoordiniertes Schwefelatom verbunden sind. Das komplette Cluster ist über sechs Cysteinyliganden mit dem Protein verknüpft (Peters *et al.*, 1997). Das P-Cluster durchläuft eine redox-abhängige Strukturänderung (Mayer *et al.*, 1999), die mit der Übertragung von Protonen und Elektronen gekoppelt ist (Peters *et al.*, 1997; Drennan und Peters, 2003).

Der MoFe-Kofaktor ist der Ort der Stickstoff-Bindung und Reduktion. Zusätzlich zu den sieben Eisen und neun Schwefel Atomen wurde Homocitrat als Ligand des Molybdän Atoms (Hoover *et al.*, 1987) und ein leichtes, durch sechs Eisen Atome hexakoordiniertes Atom (N, C oder O; Einsle *et al.*, 2002), im Zentrum gefunden. Der MoFe-Kofaktor ist nur durch zwei Reste mit dem Protein verbunden: Cys275 und His 442 (Abb. 3; Kim und Rees, 1992). Für jedes N_2 , das am FeMo-Kofaktor zu zwei Ammonium Molekülen reduziert wird, werden sechs Elektronen benötigt. Diese werden vom Eisen-Protein in das Molybdän-Eisen-Protein gepumpt, wobei typischerweise zwei ATP pro Elektron hydrolysiert werden (Kaim und Schwederski, 1991; Rees, 2002). Da die Nitrogenase auch H_2 bildet, wird zusätzliches ATP benötigt. Obwohl die Struktur des MoFe-Kofaktors gut untersucht ist, ist über den Mechanismus der N_2 -Bindung und -Reduktion wenig bekannt (Drennan und Peters, 2003).

3.4.2. Das C-Cluster der CO-Dehydrogenase und das A-Cluster der Acetyl-CoA Synthase

Wie oben beschrieben stellt die Bildung von aktivierter Essigsäure wahrscheinlich einen der primären Schritte des Ur-Stoffwechsels dar (Huber und Wächtershäuser, 1997). Acetat wird in acetogenen Bakterien durch einen Enzymkomplex aus CO-Dehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthase katalysiert. Die aktiven Zentren (C-Cluster und A-Cluster) enthalten beide sowohl ein ungewöhnliches Eisen-Schwefel-Cluster als auch Nickel. (Abb. 4; als Übersichtsartikel: Ferry, 1995; Lindahl, 2002). Das C-Cluster der CO-Dehydrogenase dient der umkehrbaren Reduktion von CO_2 . Die Kristallstruktur des C-Clusters wurde im Jahr 2001 unabhängig von zwei Gruppen beschrieben, wobei die Enzyme aus *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* (Dobbek *et al.*, 2001) und *Rhodospirillum rubrum* (Drennan *et al.*, 2001) stammten. Es zeigte sich, dass die Struktur anders war als durch spektroskopische Analysen erwartet (Tan *et al.*, 1992; DeRose *et al.*, 1998). Anstatt des vermuteten $[\text{4Fe-4S}]$ -Clusters mit externem, mononuklearem Nickel fand man ein ungewöhnliches $\text{Fe}[\text{Ni-3Fe-4S}]$ -Cluster (Dobbek *et al.*, 2001; Drennan *et al.*, 2001), wobei das freistehende Eisen als FCII bezeichnet wird (Abb. 4). Obwohl beide Strukturen ähnlich sind, wurde keine gemeinsame Substrat-Bindestelle beschrieben (Drennan und Peters, 2003).

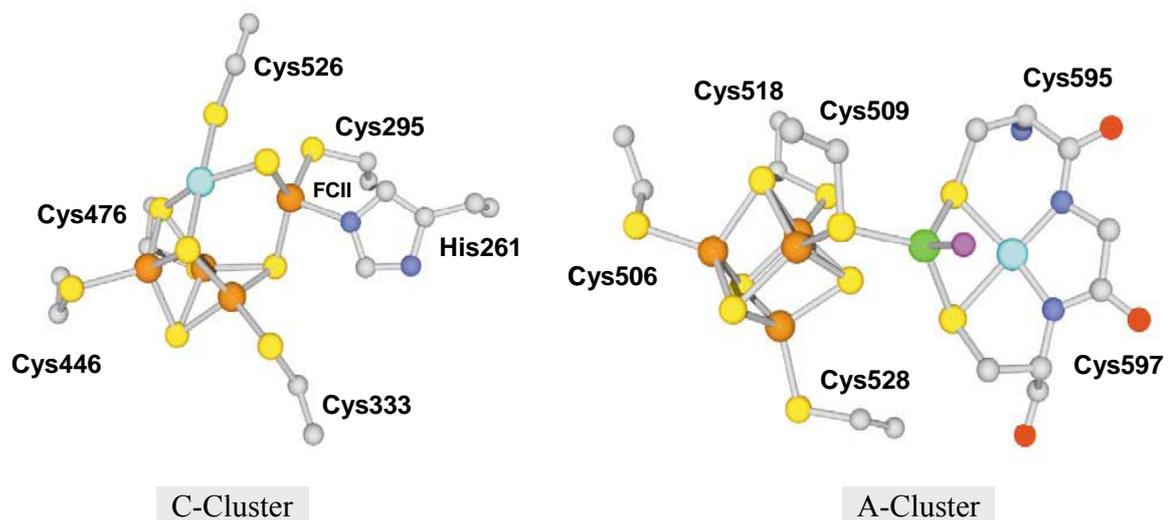


Abbildung 4: Struktur des C-Clusters der CO-Dehydrogenase von *C. hydrogenoformans* und des A-Clusters der Acetyl-CoA Synthase aus *M. thermoacetica* (aus Drennan und Peters, 2003). Eisen ist in orange dargestellt, Nickel in hellblau, Schwefel in gelb, Kohlenstoff in grau, Sauerstoff in rot, Kupfer in grün und Stickstoff in blau. Die Position eines unbekannten Ligandens ist in violett dargestellt.

Das A-Cluster der Acetyl-CoA Synthase besteht aus einem [4Fe-4S]-Cluster, welches mit einem bimetallischen Zentrum verbunden ist (Abb. 4). Das Metallzentrum enthält ein Nickel distal vom FeS-Kubus. Das zweite Metall (proximal zum FeS-Cluster) wurde zunächst als Kupfer interpretiert (Doukov *et al.*, 2002) und später als Zink in der geschlossenen Form und als zweites Nickel in der offenen Form der Acetyl-CoA Synthase beschrieben (Darnault *et al.*, 2003). Es stellte sich heraus, dass das Ni-Ni-[4Fe-4S]-Cluster die aktive Form des Enzyms darstellt (Seravalli *et al.*, 2004; Svetlitchnyi *et al.*, 2004). Das A-Cluster synthetisiert Acetyl-CoA aus Kohlenmonoxid, CoenzymA und einer Methylgruppe. Das CO stammt aus der Reduktion von CO₂ durch das C-Cluster und wandert innerhalb eines Proteintunnels zum A-Cluster (Seravalli und Ragsdale, 2000). Ob die CH₃- und CO-Gruppe beide an das proximale Nickel binden oder ob zunächst die Methylgruppe an das distale Nickel bindet und anschließend auf die CO-Gruppe des proximalen Nickels übertragen wird, ist noch unklar (Grahame, 2003).

Vergleichbar zu anderen Nickel-enthaltenden Enzymen, wie der Urease (Übersichtsartikel: Mobley *et al.*, 1995) und der [NiFe]-Hydrogenase, wurde für die CO-Dehydrogenase gezeigt, dass akzessorische Proteine, kodiert durch die Gene *cooCTJ*, an der Reifung bzw. am Nickel-Einbau beteiligt sind (siehe Diskussion; Kerby *et al.*, 1997; Jeon *et al.*, 2001).

4. Hydrogenasen

Hydrogenasen reagieren mit H₂ oder Protonen als Substrat (als Übersicht siehe Thauer *et al.*, 1996; Cammack *et al.*, 2001; Vignais *et al.*, 2001; Vignais und Colbeau, 2004). Sie besitzen ebenfalls Eisen-Schwefel-Zentren. Eine Ausnahme bilden die H₂-bildenden Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenasen (Hmd) (Zirngibl *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1996), die seit 1995 als „Metallfreie“ Hydrogenasen bezeichnet wurden (Berkessel und Thauer, 1995). Entgegen ihrem Namen wurde kürzlich gezeigt, dass ein Eisen (Lyon *et al.*, 2004) innerhalb eines licht-empfindlichen Kofaktors enthalten ist (Buurman *et al.*, 2000; Shima *et al.*, 2004). Das Eisen in Hmd ist nicht redox-aktiv (Lyon *et al.*, 2004).

4.1. [Fe]-Hydrogenasen

Sowohl die [Fe]- als auch die [NiFe]-Hydrogenasen enthalten ein zweiatomiges aktives Zentrum. Das der [Fe]-Hydrogenasen enthält keine anderen Metalle, weshalb sie im Englischen als „iron-only“-Hydrogenasen bezeichnet werden. Das aktive Zentrum wird als H-Cluster bezeichnet. Kristallstrukturen der [Fe]-Hydrogenasen von *C. pasteurianum* (Adams

und Stiefel, 1998; Peters *et al.*, 1998) und *D. desulfuricans* (Nicolet *et al.*, 1999) haben den Aufbau des H-Clusters der [Fe]-Hydrogenasen entschlüsselt (Abb. 5; Übersichtsartikel: Peters, 1999; Nicolet *et al.*, 2000; Lemon und Peters, 2001; Nicolet *et al.*, 2002).

Der Aufbau des H-Clusters kann folgendermaßen beschrieben werden: Das Di-Eisen-Zentrum („zweiatomiges“ Eisen-Zentrum) ist durch das Thiolat des Cysteins (Cys 503 in Abb. 5) kovalent mit einem [4Fe-4S]-Cluster verbunden. Die zwei Eisen werden in Bezug auf Ihre Lage zum [4Fe-4S]-Cluster als proximales und distales Eisen bezeichnet und sind 2.6 Å voneinander entfernt. Zusätzlich wird das Di-Eisen-Zentrum noch durch Nicht-Protein-Liganden koordiniert. Hierbei handelt es sich um je ein CN und ein CO pro Eisen und zusätzlich ein verbindendes CO. Außerdem werden die zwei Eisen durch ein Dithiolat verbunden, wobei es sich bei der zunächst als 1,3-Propandithiol beschriebenen Verbindung (Nicolet *et al.*, 1999) doch eher um ein Di-(thiomethyl)-Amin handelt (Nicolet *et al.*, 2001; Nicolet *et al.*, 2002). Dass das starke Ligandenfeld von CN und CO um das Eisen es demnach ähnlich zu den Übergangsmetallen Pt, Pd und Ru macht, die den biologischen Systemen unzugänglich sind, wurde von Nicolet *et al.* postuliert (2002). Diese sind als gute Wasserstoff-Katalysatoren bekannt.

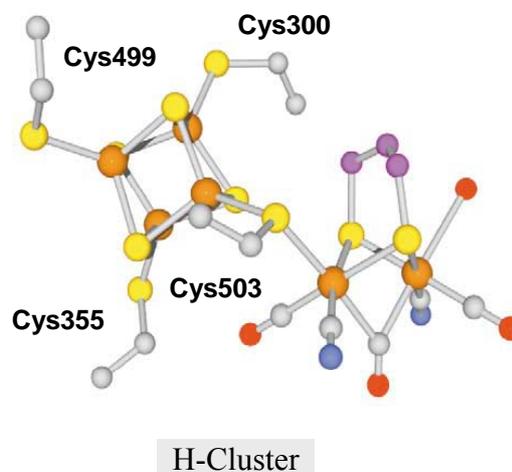


Abbildung 5: Struktur des H-Clusters der [Fe]-Hydrogenase aus *C. pasteurianum* (aus Drennan und Peters, 2003). Der Farbcode ist: Eisen in orange, Schwefel in gelb, Sauerstoff in rot, Kohlenstoff in grau, Stickstoff in blau. Die Dithiolat-Verbindung ist in violett dargestellt.

Die Kristallstrukturen zeigten zusätzlich, dass in den [Fe]-Hydrogenasen fünf FeS-Cluster enthalten sind: neben dem erwähnten H-Cluster noch zusätzlich vier zu den Standard-Eisen-Schwefel-Zentren gehörende Cluster (ein [2Fe-2S] und drei [4Fe-4S]). Sie dienen dem Elektronentransfer innerhalb des Proteins. Den [Fe]-Hydrogenasen von Algen fehlen diese FeS-Cluster (Melis und Happe, 2001; Happe und Kaminski, 2002; Forestier *et al.*, 2003).

Über die Assemblierung des aktiven Zentrums ist im Gegensatz zu den [NiFe]-Hydrogenasen bisher wenig bekannt, obwohl kürzlich über die Entdeckung vermeintlicher Hilfsproteine der [Fe]-Hydrogenase-Reifung berichtet wurde (Posewitz *et al.*, 2004).

4.2. [NiFe]-Hydrogenasen

[NiFe]-Hydrogenasen sind Heterodimere, bestehend aus einer kleinen Untereinheit (von ~ 30 kDa) und einer großen Untereinheit (von ~ 60 kDa) (Fauque *et al.*, 1988; Przybyla *et al.*, 1992; Albracht, 1994; Vignais und Toussaint, 1994; Vignais *et al.*, 2001). Die Kristallstrukturen der [NiFe]-Hydrogenasen von *Desulfovibrio gigas* (Volbeda *et al.*, 1995; Volbeda *et al.*, 1996b), *Desulfovibrio vulgaris* (Higuchi *et al.*, 1997; Higuchi *et al.*, 1999), *Desulfovibrio desulfuricans* (Matias *et al.*, 2001) und der [NiFeSe]-Hydrogenase von *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin *et al.*, 1999) zeigten, dass die kleine und große Untereinheit über eine große Kontaktfläche miteinander interagieren und ein globuläres Heterodimer bilden (Volbeda *et al.*, 1995; Volbeda *et al.*, 1996b).

Die kleine Untereinheit enthält mehrere Eisen-Schwefel-Cluster, die dem Elektronentransfer zum und vom aktiven Zentrum dienen. Diese sind folgendermaßen angeordnet: proximales [4Fe-4S]-Cluster, [3Fe-4S]-Cluster ([4Fe-4S]-Cluster in der [NiFeSe]-Hydrogenase von *D. baculatum*; Garcin *et al.*, 1999) und distales [4Fe-4S]-Cluster (vom aktiven Zentrum nach außen). Die kleinen Untereinheiten der Energie-konservierenden [NiFe]-Hydrogenasen (Vignais *et al.*, 2001; Vignais und Colbeau, 2004), zu denen auch Hydrogenase 3 von *E. coli* gezählt wird, sind bedeutend kleiner und weisen nur das proximale [4Fe-4S]-Cluster auf (Hedderich, 2004).

Das aktive Zentrum befindet sich in der großen Untereinheit an der Kontaktfläche zur kleinen Untereinheit (als Übersicht siehe Fontecilla-Camps *et al.*, 1997; Frey *et al.*, 2001). Es besteht aus einem Nickel- und einem Eisenatom (Abb. 6). Diese sind durch vier konservierte Cysteinliganden mit dem Protein verbunden (N-terminales Motiv: RxC_1GxC_2xxxH ; C-terminales Motiv: DPC_3xxC_4xxH/R ; Przybyla *et al.*, 1992; Voordouw, 1992; Wu und Mandrand, 1993), wobei zwei Thiolate (Cys2 und Cys 4 in Abb. 6) das Eisen- und Nickelatom verbinden (Volbeda *et al.*, 1995).

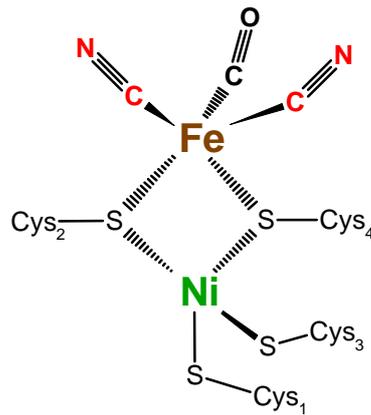


Abbildung 6: Schema des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* (nach Volbeda *et al.*, 1995; Happe *et al.*, 1997).

Durch Infrarot-Spektroskopie (Bagley *et al.*, 1994; Bagley *et al.*, 1995; Van der Spek *et al.*, 1996; Happe *et al.*, 1997) und Röntgenstrukturanalysen (Volbeda *et al.*, 1995; Volbeda *et al.*, 1996b) wurde gezeigt, dass die [NiFe]-Hydrogenasen diatomare Liganden am Eisen besitzen, wobei es sich um ein CO und zwei CN handelt (Happe *et al.*, 1997; Pierik *et al.*, 1999). Eine Ausnahme stellt die NAD-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase aus *R. eutropha* dar: sie besitzt zwei zusätzliche CN-Liganden, wovon eines das Nickelatom koordiniert (Happe *et al.*, 2000). Kristallstrukturen der Hydrogenasen von *E. coli* sind nicht verfügbar, man nimmt jedoch an, dass sie sich in der Struktur nicht von den „klassischen“ [NiFe]-Hydrogenasen unterscheiden.

5. Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen

E. coli besitzt drei [NiFe]-Hydrogenasen (Hyd-1, -2 und -3), kodiert durch das *hya-*, *hyb-* und *hyc-*Operon (Menon *et al.*, 1990; Menon *et al.*, 1991; Sauter *et al.*, 1992; Menon *et al.*, 1994); eine vierte (kodiert durch das *hyf* Operon; Andrews *et al.*, 1997) wurde durch Sequenz-Ähnlichkeiten zu Hydrogenase 3 postuliert (Übersichtsartikel: Sawers, 1994; Sawers *et al.*, 2004). Hydrogenase 1 und 2 befinden sich auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran und sind H₂-verbrauchende Enzyme (Ballantine und Boxer, 1985; Ballantine und Boxer, 1986; Sawers und Boxer, 1986). Hydrogenase 3 hingegen ist Teil des Formiat-Hydrogen-Lyase (FHL) Komplexes (Stephenson und Stickland, 1931; Gest und Peck Jr., 1955; Peck Jr. und Gest, 1957; Sawers *et al.*, 1985) und somit ein Wasserstoff-Produzent.

Fünf Proteine des FHL-Komplexes und von [NiFe]-Hydrogenasen anderer Organismen weisen Sequenzähnlichkeiten zu Komplex I der Atmungskette auf (Böhm *et al.*, 1990; Albracht, 1993; Böck und Sawers, 1996). Man vermutet, dass die Energie-konservierenden [NiFe]-Hydrogenasen von Archaea/Extremophilen (wie die Ech Hydrogenasen; Kunkel *et al.*, 1998; Meuer *et al.*, 1999; Meuer *et al.*, 2002) einen Vorläufer des Komplexes I darstellen oder von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen (Albracht und Hedderich, 2000; Friedrich und Scheide, 2000; Hedderich, 2004; Sawers *et al.*, 2004).

Die Reifung der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenasen läuft nicht spontan ab sondern wird durch Hilfsproteine (akzessorische Proteine) bewerkstelligt. Die hierfür kodierenden Gene (*hyp* Gene) wurden bei der Sequenzierung des *hyc* Operons, das Komponenten des FHL-Komplexes kodiert, entdeckt. Die *hyp* Gene werden entgegengesetzt zu diesem transkribiert (Lutz *et al.*, 1991). Die Deletion der *hyp* Gene bewirkt, dass keine der drei Hydrogenasen aktiv synthetisiert wird (Jacobi *et al.*, 1992). Eine Ausnahme stellen Mutanten mit Deletionen von *hypA* und *hypC* dar; sie besitzen noch Hydrogenase 1 und 2-Aktivität (Jacobi *et al.*, 1992). Der Grund dafür ist, dass *E. coli* homologe Proteine für HypA und HypC synthetisiert (HybF und HybG), die im Operon der Hydrogenase 2 (*hyb* Operon) kodiert werden (Menon *et al.*, 1994). Diese sind für die Reifung der Hydrogenase 1 und 2 zuständig (Blokesch *et al.*, 2001; Hube *et al.*, 2002), wohingegen die Proteine HypA und HypC auf die Reifung der Hydrogenase 3 spezialisiert sind. Ein zusätzliches Hyp-Protein stellt HypF dar. Das *hypF* Gen ist ca. 13 kbp vom *hyp* Operon entfernt, im ursprünglich als *hydA* Locus (Pascal *et al.*, 1975; Sankar *et al.*, 1985) deklarierten Operon zusammen mit *hydN* (Maier *et al.*, 1996). Entgegen der Situation in *E. coli* ist es in anderen Organismen Bestandteil des *hyp* Operons, zumeist in folgender Anordnung *hypABFCDE* (zum Beispiel in *R. leguminosarum*, Rey *et al.*, 1993; *B. japonicum*, Olson und Maier, 1997; *R. eutropha hypA1B1F1CDE* und *hypA2B2F2*, Dervedde *et al.*, 1993; Dervedde *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1998 und *A. vinelandii*, Chen und Mortenson, 1992).

Über die Funktion der Hyp Proteine war zu Beginn dieser Arbeit noch wenig bekannt (Übersicht: Maier und Böck, 1996b). Abbildung 7 zeigt ein Reifungs-Modell der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 (HycE) aus *E. coli* wie es im Jahr 2000 vorlag.

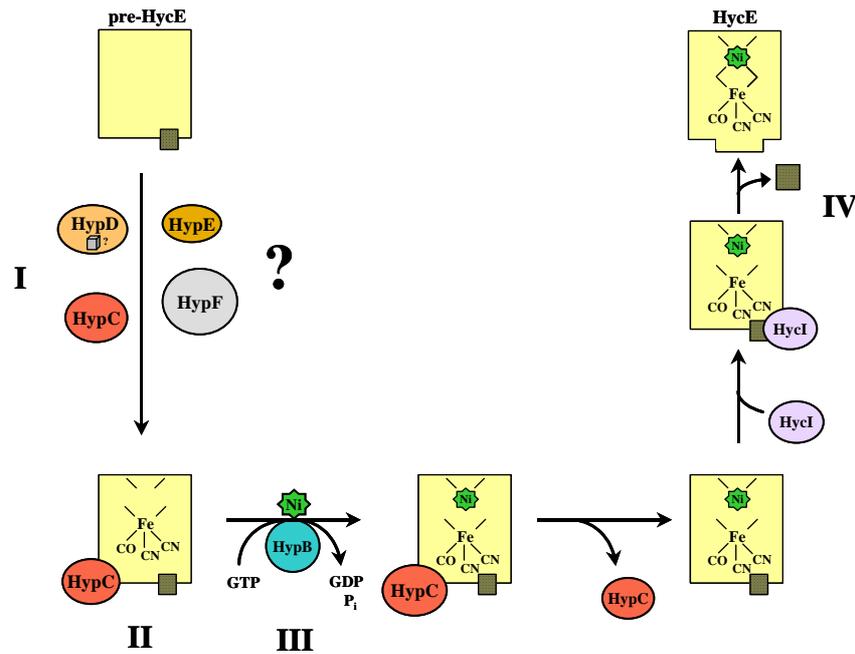


Abbildung 7: Model zur Reifung der Hydrogenase 3 von *E. coli* im Jahr 2000. I) Synthese und Einbau der Liganden CO und CN; II) Komplexbildung mit HypC; III) Nickeleinbau durch HypB; IV) C-terminale Prozessierung durch HycI. Erklärungen siehe Text.

Abbildung 7 zeigt, dass HycE als Vorläufer ohne aktives Zentrum synthetisiert wird. Vermutlich vollziehen die Proteine HypC, HypD, HypE und HypF die ersten Schritte der Reifung (Abb. 7/I). Bekannt war, dass HypC einen Komplex mit der Vorläuferform von HycE (pre-HycE) eingeht (Abb. 7/II; Drapal und Böck, 1998; Magalon und Böck, 2000a).

Es folgt der Einbau von Nickel (Abb. 7/III). Hierfür wird HypB benötigt, das GTPase Aktivität aufweist (Maier *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1995). Entgegen den HypB Proteinen aus anderen Organismen besitzt HypB aus *E. coli* keinen histidinreichen N-Terminus zur Nickel-Speicherung (Rey *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 1995). Aus Studien an *H. pylori* und *E. coli* ging hervor, dass auch das HypA Protein (bzw. das HybF Protein) am Nickeleinbau beteiligt ist (Olson *et al.*, 2001; Hube *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2003).

Nach der Dissoziation von HypC (Magalon und Böck, 2000b) tastet die spezifische Endopeptidase HycI den Hydrogenase-Vorläufer auf das inkorporierte Nickel ab (Theodoratou *et al.*, 2000a; Magalon *et al.*, 2001) und spaltet ein Peptid mit 32 Aminosäuren vom C-Terminus ab (Rossmann *et al.*, 1994). Bei Hydrogenase 1 und 2 werden Peptide mit je 15 Aminosäuren durch die Endopeptidasen HyaD (Menon *et al.*, 1991) und HybD (Menon *et al.*, 1994; Fritsche *et al.*, 1999) abgespalten. Nach einer Konformationsänderung des Proteins interagiert HycE mit der kleinen Untereinheit (HycG) (Magalon und Böck, 2000b).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde von A. Paschos gezeigt, dass Carbamoylphosphat die Ausgangssubstanz der Cyanidliganden darstellt (Paschos *et al.*, 2001; Paschos, 2003). Es wird von HypF erkannt und durch die CP-Phosphatase gespalten (Paschos *et al.*, 2002), wobei der Carbamoylrest auf das C-terminale Cystein von HypE übertragen wird (Reissmann *et al.*, 2003). Dort erfolgt die Dehydratisierung zum Cyanid (Reissmann *et al.*, 2003).

6. Ziel dieser Arbeit

Zunächst sollte an die vorhergehende Diplomarbeit angeknüpft werden (Blokesh, 2000). Ziel war die Rolle der Proteine HybG und HypC in der Hydrogenasereifung genauer zu definieren.

Auch das HypD Protein sollte näher untersucht werden, und die Art des Eisen-Schwefel-Clusters (Jacobi, 1994; Drapal, 1998) bestimmt werden. Dies sollte zum einen durch gerichtete Mutagenese geschehen, zum anderen durch EPR und Mössbauermessungen.

Die Charakterisierung des im Laufe dieser Arbeit entdeckten Proteinkomplex aus HypC und HypD stellte letztendlich das Hauptziel dieser Arbeit dar. Der Grund für dessen spezifische Akkumulation in Carbamoylphosphat defizienten Stämmen sollte herausgefunden werden. Zusätzlich sollte gezeigt werden, ob der HypC × HypD Komplex ein Reifungsintermediat darstellt und welche Funktion ihm in der Reifungskaskade zugeordnet werden kann.

MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1. Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Tabelle 2 listet die verwendeten Plasmide auf.

TABELLE 1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm*	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Studier und Moffatt, 1986
JM109	F ⁺ , [<i>traD36, proA⁺B⁺, lacI^l, Δ(lacZ) M15</i>], <i>gyrA96, relA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
DH5α	F ⁻ , (<i>φ80dlacZΔM15</i>), <i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r_K⁻m_K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
MC4100	F ⁻ , <i>araD139, Δ(argF-lac)U169, ptsF25, deoC1, relA1, flbB5301, rpsL150, λ⁻</i>	Casadaban und Cohen, 1979
SMP101	MC4100, ATG Kodon von <i>hypA</i> in TAA mutiert	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
SMP101Δ <i>car</i>	SMP101, Δ <i>carAB</i>	diese Arbeit
SMP101Δ <i>car</i> 705	SMP101, Δ <i>carAB, ΔhycE</i>	diese Arbeit
DACG	SMP101, Δ <i>carAB, ΔargG</i>	diese Arbeit
DHP-B	MC4100, Δ <i>hypB</i>	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
DHP-BΔ <i>car</i>	MC4100, Δ <i>hypB, ΔcarAB</i>	diese Arbeit
DHP-C	MC4100, Δ <i>hypC</i>	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
DHP-CΔ <i>car</i>	MC4100, Δ <i>hypC, ΔcarAB</i>	Blokesch und Böck, 2002a
DHP-CΔ <i>car</i> 705	MC4100, Δ <i>hypC, ΔcarAB, ΔhycE</i>	diese Arbeit
DHP-CΔ <i>car</i> 705 (DE3)	MC4100, Δ <i>hypC, ΔcarAB, ΔhycE; λDE3</i>	diese Arbeit
DHP-D	MC4100, Δ <i>hypD</i>	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
DHP-DΔ <i>car</i>	MC4100, Δ <i>hypD, ΔcarAB</i>	diese Arbeit
DDCG	MC4100, Δ <i>hypD, ΔcarAB, ΔargG</i>	diese Arbeit
DHP-E	MC4100, Δ <i>hypE</i>	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
DHP-EΔ <i>car</i>	MC4100, Δ <i>hypE, ΔcarAB</i>	diese Arbeit
DHP-EΔ <i>car</i> 705	MC4100, Δ <i>hypE, ΔcarAB, ΔhycE</i>	diese Arbeit

DECG	MC4100, $\Delta hypE$, $\Delta carAB$, $\Delta argG$	diese Arbeit
DHP-E $\Delta hypF$	MC4100, $\Delta hypE$, $\Delta hypF$	Paschos, 2003
DHP-E $\Delta hypF$ (DE3)	MC4100, $\Delta hypE$, $\Delta hypF$; $\lambda DE3$	diese Arbeit
DHP-F	MC4100, $\Delta hypF$ (partiell)	Maier <i>et al.</i> , 1996
DHP-F Δcar	MC4100, $\Delta hypF$, $\Delta carAB$	Paschos, 2003
DHP-F $\Delta car705$	MC4100, $\Delta hypF$, $\Delta carAB$, $\Delta hycE$	diese Arbeit
DFCG	MC4100, $\Delta hypF$, $\Delta carAB$, $\Delta argG$	diese Arbeit
DHP-F2	MC4100, $\Delta hypF$	Paschos <i>et al.</i> , 2002
DHP-F2 (DE3)	MC4100, $\Delta hypF$; $\lambda DE3$	diese Arbeit
DHB-G	MC4100, $\Delta hybG$	Blokesch <i>et al.</i> , 2001
DHB-G Δcar	MC4100, $\Delta hybG$, $\Delta carAB$	Blokesch und Böck, 2002a
DBGCG	MC4100, $\Delta hybG$, $\Delta carAB$, $\Delta argG$	diese Arbeit
Jef-8	<i>thr-31</i> , $\Delta carB8$, <i>relA1</i> , <i>metB1</i>	Mergeay <i>et al.</i> , 1974
$\Delta CarAB$	MC4100, $\Delta carAB$	Paschos <i>et al.</i> , 2001
DARGG	MC4100, $\Delta argG$	diese Arbeit
DCarAG	MC4100, $\Delta carAB$, $\Delta argG$	Blokesch und Böck, 2002a
HD705	MC4100, $\Delta hycE$	Sauter <i>et al.</i> , 1992
DCar705	MC4100, $\Delta carAB$, $\Delta hycE$	Blokesch und Böck, 2002a
DCar705AG	MC4100, $\Delta carAB$, $\Delta hycE$, $\Delta argG$	diese Arbeit
HD709	MC4100, $\Delta hycI$	Binder <i>et al.</i> , 1996
HD709 Δcar	HD709, $\Delta carAB$	diese Arbeit
Hyd723	MC4100, <i>nika::MudI</i>	Wu und Mandrand-Berthelot, 1986
Hyd723 Δcar	MC4100, <i>nika::MudI</i> , $\Delta carAB$	Blokesch und Böck, 2002a
HDK103	MC4100, Δhya (Km ^R), $\Delta hycA-H$	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
HDK203	MC4100, Δhyb (Km ^R), $\Delta hycA-H$	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
HDK200	MC4100, Δhyb (Km ^R)	Sauter, 1992
DHB-F	MC4100, $\Delta hybF$	Hube <i>et al.</i> , 2002
DPABF	SMP101, $\Delta hybF$	Hube <i>et al.</i> , 2002
DPAPB	SMP101, $\Delta hypB$	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
NIM	SMP101, $\Delta hypB$, $\Delta hybF$	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
BTH101	F ⁻ , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str</i> ^R), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Karimova <i>et al.</i> , 2000
DYBJW	MC4100, $\Delta ybjW$	diese Arbeit

* Mit Ausnahme von BL21(DE3) handelt es sich um Derivate von *E. coli* K-12

TABELLE 2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pACYC184	Cm ^R , Tc ^R	Chang und Cohen, 1978; Rose, 1988
pBR322	Ap ^R , Tc ^R	Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Sutcliffe, 1978; Sutcliffe, 1979
pMAK700	Cm ^R	Hamilton <i>et al.</i> , 1989
pT7-7	Ap ^R , T7Φ10	Tabor und Richardson, 1985
pUC19	Ap ^R , <i>lac 'IPOZ'</i>	Messing, 1983; Norrander <i>et al.</i> , 1983; Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pASK-IBA5	Ap ^R , <i>tetR</i>	IBA GmbH
pBHBF-Strep	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> , Ap ^R	Hube <i>et al.</i> , 2002
pBHBF-Strep[H2A]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [H2A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[H2Q]	pBR322, <i>hybF--Strep-tagII</i> [H2Q], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[E3Q]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [E3Q], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[E3L]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [E3L], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[C73A]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C73A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[C76A]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C76A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[C73/76A]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C73/76A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[C89A]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C89A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[C89S]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C89S], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pBHBF-Strep[C92A]	pBR322, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C92A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pT-hybFStrep	pT7-7, <i>hybF-Strep-tagII</i> , Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pT-hybFStrep[H2Q]	pT7-7, <i>hybF-Strep-tagII</i> [H2Q], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pT-hybFStrep[C73A]	pT7-7, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C73A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pT-hybFStrep[C73/76A]	pT7-7, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C73A/76A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pT-hybFStrep[C89A]	pT7-7, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C89A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pT-hybFStrep[C89S]	pT7-7, <i>hybF-Strep-tagII</i> [C89S], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004b
pJA203	pT7-5, <i>hypD</i> , Ap ^R	Lutz <i>et al.</i> , 1991
pT7hypD	pT7-7, <i>hypD</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pJA103	pACYC184, <i>hypD</i> , Cm ^R	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
pJA103[C41A]	pACYC184, <i>hypD</i> [C41A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[H44A]	pACYC184, <i>hypD</i> [H44A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[C69A]	pACYC184, <i>hypD</i> [C69A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[C69S]	pACYC184, <i>hypD</i> [C69S], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[P70A]	pACYC184, <i>hypD</i> [P70A], Cm ^R	diese Arbeit

pJA103[V71A]	pACYC184, <i>hypD</i> [V71A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[C72A]	pACYC184, <i>hypD</i> [C72A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[P75A]	pACYC184, <i>hypD</i> [P75A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[G146A]	pACYC184, <i>hypD</i> [G146A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[F147Y]	pACYC184, <i>hypD</i> [F147Y], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[E148A]	pACYC184, <i>hypD</i> [E148A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[E148Q]	pACYC184, <i>hypD</i> [E148Q], Cm ^R	diese Arbeit
pJA10 [T150V]	pACYC184, <i>hypD</i> [T150V], Cm ^R	diese Arbeit
pKlonierungsvektor	pACYC184, <i>hypD</i> mit <i>SmaI</i> + <i>PstI</i> Schnittstelle, Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[H175A]	pACYC184, <i>hypD</i> [H175A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[H201A]	pACYC184, <i>hypD</i> [H201A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[C323A]	pACYC184, <i>hypD</i> [C323A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[C336A]	pACYC184, <i>hypD</i> [C336A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[C343A]	pACYC184, <i>hypD</i> [C343A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[C360S]	pACYC184, <i>hypD</i> [C360S], Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[S203STOP]	pACYC184, <i>hypD</i> mit Stop nach S203-Kodon, Cm ^R	diese Arbeit
pJA103[D317STOP]	pACYC184, <i>hypD</i> mit Stop nach D317-Kodon, Cm ^R	diese Arbeit
pIBA5-hypD	pASK-IBA5, <i>hypD</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pStrepD[C41A]	pASK-IBA5, <i>hypD</i> [C41A], Ap ^R	diese Arbeit
pStrepD[C69A]	pASK-IBA5, <i>hypD</i> [C69A], Ap ^R	diese Arbeit
pStrepD[C69S]	pASK-IBA5, <i>hypD</i> [C69S], Ap ^R	diese Arbeit
pStrepD[C72A]	pASK-IBA5, <i>hypD</i> [C72A], Ap ^R	diese Arbeit
pStrepD[G146A]	pASK-IBA5, <i>hypD</i> [G146A], Ap ^R	diese Arbeit
pStrepD[C323A]	pASK-IBA5, <i>hypD</i> [C323A], Ap ^R	diese Arbeit
pStrepD[C343A]	pASK-IBA5, <i>hypD</i> [C343A], Ap ^R	diese Arbeit
pIBA-Mj-hypD	pASK-IBA5, <i>hypD</i> aus <i>M. jannaschii</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pAargI	pACYC184, <i>argI</i> , Cm ^R	diese Arbeit
pBargI	pBR322, <i>argI</i> , Ap ^R	Blokesch und Böck, 2002a
pAargG	pACYC184, <i>argG</i> , Cm ^R	Blokesch und Böck, 2002a
pADargG	pACYC184, mit 894-bp Deletion in <i>argG</i> ; Cm ^R	Blokesch und Böck, 2002a
pMDargG	pMAK700, mit 894-bp Deletion in <i>argG</i> ; Cm ^R	Blokesch und Böck, 2002a
pMSD705	pMAK705, mit 1642-bp Deletion in <i>hycE</i> ; Cm ^R	Sauter <i>et al.</i> , 1992
pMΔCarAB	pMAK70,0 mit 3530-bp Deletion in <i>carAB</i> ; Cm ^R	Paschos <i>et al.</i> , 2001
pJA31	pACYC184, <i>hypDE</i> , Cm ^R	Jacobi, 1990
pJA16	pACYC184, <i>hypBCDE</i> , Cm ^R	Lutz <i>et al.</i> , 1991
pJA36	pBR322, <i>hypBCDE</i> , Ap ^R	Jacobi <i>et al.</i> , 1992

pJA1021	pACYC184, <i>hypC</i> , Cm ^R	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
pJA1021[C2A]	pACYC184, <i>hypC</i> [C2A], Cm ^R	Magalon und Böck, 2000a
pJA1021[C2S]	pACYC184, <i>hypC</i> [C2S], Cm ^R	Magalon und Böck, 2000a
pJA1021[C2R]	pACYC184, <i>hypC</i> [C2R], Cm ^R	Magalon und Böck, 2000a
pJA1021[P6A]	pACYC184, <i>hypC</i> [P6A], Cm ^R	Magalon und Böck, 2000a
pJA1021[P6T]	pACYC184, <i>hypC</i> [P6T], Cm ^R	Magalon und Böck, 2000a
pJA1021[H51A]	pACYC184, <i>hypC</i> [H51A], Cm ^R	diese Arbeit
pJA1021[H51F]	pACYC184, <i>hypC</i> [H51F], Cm ^R	diese Arbeit
pJA1021[H51R]	pACYC184, <i>hypC</i> [H51R], Cm ^R	diese Arbeit
pBhypC	pBR322, <i>hypC</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pTC-9	pT7-7, <i>hypC</i> , Ap ^R	Drapal und Böck, 1998
pAhypCStrep	pACYC184, <i>hypC-Strep</i> -tagII, Cm ^R	Blokesch und Böck, 2002a
pBhypCStrep	pBR322, <i>hypC-Strep</i> -tagII, Ap ^R	diese Arbeit
pT-hypCStrep	pT7-7, <i>hypC-Strep</i> -tagII, Ap ^R	diese Arbeit
pUhypCStrep	pUC19, <i>hypC-Strep</i> -tagII mit RBS aus pT7-7, Ap ^R	diese Arbeit
pBHBG-Strep	pBR322, <i>hybG-Strep</i> -tagII, Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2001
pBC2A-Strep	pBR322, <i>hybG-Strep</i> -tagII [C2A], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2001
pBC2S-Strep	pBR322, <i>hybG-Strep</i> -tagII [C2S], Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2001
pBHBG-Strep[D15L]	pBR322, <i>hybG-Strep</i> -tagII [D15L], Ap ^R	diese Arbeit
pBHBG-Strep[D15N]	pBR322, <i>hybG-Strep</i> -tagII [D15N], Ap ^R	diese Arbeit
pBHBG-Strep[H52F]	pBR322, <i>hybG-Strep</i> -tagII [H52F], Ap ^R	diese Arbeit
pBHBG-Strep[H52R]	pBR322, <i>hybG-Strep</i> -tagII [H52R], Ap ^R	diese Arbeit
pKT25	pSU40, kodiert T25 Fragment von CyaA; Kan ^R	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pUT18	pUC19, kodiert T18 Fragment von CyaA; Ap ^R	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pUT18C	pUC19, kodiert T18 Fragment von CyaA; MCS nach gestellt; Ap ^R	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pKT25-zip	pSU40, kodiert T25 Fragment im Leserahmen des Leuzin-Zippers GCN4 der Hefe; Kan ^R	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pUT18C-zip	pUC19, kodiert T18 Fragment im Leserahmen des Leuzin-Zippers GCN4 der Hefe; Ap ^R	Karimova <i>et al.</i> , 2001
pUT18-hypC	pUT18, <i>hypC</i> -T18, Ap ^R	diese Arbeit
pKT25-hypD	pKT25, T25- <i>hypD</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pUT18-hypA	pUT18, T18- <i>hypA</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pKT25-hypB	pKT25, T25- <i>hypB</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pT-hypDC	pT7-7, <i>hypD</i> und <i>hypC</i> , Ap ^R	diese Arbeit
pT-hypDCStrep	pT7-7, <i>hypD</i> und <i>hypC-Strep</i> -tagII, Ap ^R	diese Arbeit
pT-hypDECStrep	pT7-7, <i>hypD</i> , <i>hypE</i> und <i>hypC-Strep</i> -tagII, Ap ^R	diese Arbeit

pTΔDECStrep	pT7-7, <i>hypD</i> Δ <i>BsaBI</i> -Fragment, <i>hypE</i> und <i>hypC</i> - <i>Strep</i> -tagII, Ap ^R	diese Arbeit
pT-hypDE[Mut]CStrep	pT7-7, <i>hypD</i> , <i>hypE</i> [<i>Mut</i>] (kodiert C-Terminus PRLCY) und <i>hypC</i> - <i>Strep</i> -tagII, Ap ^R	diese Arbeit
pT-hypDEFCSStrep	pT7-7, <i>hypD</i> , <i>hypE</i> , <i>hypC</i> - <i>Strep</i> -tagII und <i>hypF</i> Ap ^R	diese Arbeit
pTΔDEFCSStrep	pT7-7, <i>hypD</i> Δ <i>BsaBI</i> -Fragment, <i>hypE</i> , <i>hypC</i> - <i>Strep</i> -tagII und <i>hypF</i> Ap ^R	diese Arbeit
pSA3	pBR322, <i>hypD</i> , <i>hypE</i> , <i>fhlA</i> , Ap ^R	Schlensog und Böck, 1990
pHypE	pBR322, Deletion des 3006 bp <i>HpaI</i> - <i>StyI</i> -Fragmentes aus pSA3, <i>hypE</i> , Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004a
pHypEΔ	pHypE, Kodon für Cys336 deletiert, <i>hypE</i> Δ; Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004a
pTE-C2	pT7-7, <i>KpnI</i> - <i>MluI</i> Fragment aus pSA3, <i>hypE</i> ; Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004a
pTEC-EA	pTE-C2, Kodon für Cys336 deletiert; <i>hypE</i> Δ; Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004a
pT-hypE[D83N]	pTE-C2, kodiert für Aminosäureaustausch D83N in HypE; Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004a
pT-hypE[A76V D83N]	pTE-C2, kodiert für Aminosäureaustausche D83N A76V in HypE; Ap ^R	Blokesch <i>et al.</i> , 2004a
pUCF18	pUC18, <i>hypF</i> , Ap ^R	Paschos <i>et al.</i> , 2002
pAF1	pACYC184, <i>hypF</i> , Cm ^R	Maier <i>et al.</i> , 1996
pMDybjW	pMAK700, Δ <i>ybjW</i> , Cm ^R	diese Arbeit

1.2. Medien und Supplemente

In dieser Arbeit wurden folgende Nährmedien verwendet:

- **LB**-Medium nach Miller (1992)
- **2×YT**-Medium nach Yanisch-Perron *et al.* (1985)
- **SOB**-Medium nach Inoue *et al.* (1990)
- **TGYEP**-Medium (Begg *et al.*, 1977), modifiziert:
1 % Pepton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.8 % Glukose, 0.1 M Kaliumphosphat, pH 6.5
- Werkman Minimalmedium (**WM**) (Fraenkel und Neidhardt, 1961), modifiziert:
50 mM Na₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂
- **M9**-Minimalmedium nach Miller (1992)
- **MOPS**-Medium und Spurenelemente nach Neidhardt *et al.* (1974)

Zur Herstellung von Platten wurde den flüssigen Medien jeweils 1.5 bis 2 % Agar zugesetzt. Fertigagar (zum Beispiel MacConkey) wurde nach Angaben des Herstellers zubereitet.

Eingesetzte Supplemente und Antibiotika sind in Tabelle 3 beschrieben.

TABELLE 3. Supplemente

Supplement	Konzentration	Verwendungszweck
Glukose	0.8 %	Gastests, Ameisensäuregärung
Maltose	1 %	Zwei Hybrid-System
Na-Formiat	15 mM	Ameisensäuregärung
Glyzerin	0.8 %	Fumarat-Atmung
Na-Fumarat	15 mM	Fumarat-Atmung
NiCl ₂	5 µM*	anaerobe Anzuchten
Na ₂ MoO ₄	1 µM	anaerobe Anzuchten
Na ₂ SeO ₃	1 µM	anaerobe Anzuchten
IPTG	0.5 mM	Überproduktion von Proteinen, Zwei-Hybrid-System, Blau-Weiß Selektion
X-Gal	0.004 %	Zwei Hybrid-System, Blau-Weiß Selektion
Citrullin	200 µg/ml*	Anzucht von $\Delta carAB$ Stämmen wenn vermerkt
Arginin	50 µg/ml*	Anzucht von $\Delta carAB$ Stämmen in WM/M9
Uracil	50 µg/ml*	Anzucht von $\Delta carAB$ Stämmen in WM/M9
Antibiotikum	Konzentration	Verwendungszweck
Ampicillin	50 µg/ml	pBR322- und pASK-IBA5-Derivate
	100 µg/ml	pUC19- und pT7-Derivate
Chloramphenicol	30 µg/ml	pACYC184-Derivate
	20 µg/ml	pMAK700- und pMAK705-Derivate
Kanamycin	50 µg/ml	pSU40-Derivate
Tetracyclin	15 µg/ml	pBR322- und pACYC184-Derivate

* falls nicht anders vermerkt

1.3. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Interactiva (Ulm) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Die Abfolge der Nukleotide ist in Tabelle 4 aufgeführt.

TABELLE 4. Oligonukleotide*

Bezeichnung	Sequenz
Sequenzierung:	
pT77 seq.	GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC AAC G
pIBA5-Strepup	GAA TAG TTC GAC AAA AAT CTA GAT AAC GAG GGC
pASK-IBA5down	GAT CCG TGA CGC AGT AGC GGT AAA CGG C
Tet <i>EcoRV</i>	TGG TTA TGC CGG TAC TGC C
hypD468down	CTG CAA CAG GCG AAA GCG CGT GAT GTG C
hypD831down	GCG ACA GCG AAT GGC GCG GCT TAG GCG
pUC19-lacZ	GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
pKT25up	GCA GGG TCG ACT CTA GAG GAT C
HypD-41/44 test up	GAA TAT CGC GCG CCG GAA CAG GTG ATG C
HypD- <i>DraIII</i> test up	CAT CTT CTG TAC CTT TGG CGA CGC C
HypD- <i>BstEII</i> up	GCT GGT GCA GCA GAA AAT AGC GGC C
HypD-down <i>HindIII</i>	GCA AGC TTC CGT CAC GCT TCA CTC TCC TGC TGA CG
<i>BstEII</i> upSeq.	CAC GCC TAA GCC GCG CCA TTC GCT GTC GCC
HybFup	TGC GCA CGA ATG ATC CTT TCG CTG CCA GTC ACG
Überprüfung durch Kolonie-PCR	
MBhycD	AGC CAG AGC ATC CCG CTG GTA CTG
MBhycF	CTG GAC GGC GAA AGG ACG ATT GCA G
pMAK700up	CGA CAG GCC ATG TTT GAC A
pMAK700down	ACG ATG CGT CCG GCG TAG A
pMAK705up	CAA CTG TTG GGA AGG GCG ATC GGT GC
pMAK705down	GCA GTG AGC GCA ACG CAA TTA ATG TGA GTT AGC
<i>NruI</i> up	GCA GGC CAT TAT CGC CGG CAT GGC GG
<i>NruI</i> down	GCA TCC CGA TGC CGC CGG AAG CG
Tet-inv+ <i>EcoRI</i>	CGG AAT TCA AGG CTC TCA AGG GCA TCG G
Konstruktion von Deletionen (ΔargG, ΔyjW):	
delargGup <i>NdeI</i>	GGC CAT ATG TCA CAT GGC ACG ACG AGG GAT C
delargGdown <i>NdeI</i>	ATG TGA CAT ATG GCC GTG GGA ACG ATT ATT CAA TCC
YbjWup <i>BamHI</i>	GCG GAT CCC TTT TAT CCC CGC GTT AAG CGT CTT AAC C
YbjWdown <i>BamHI</i>	GCG GAT CCG CGT AAT GTG ATG AAC CTG CAT CCG CC
Overlap-UP	GAC AGC CAG AAT TCA GCG CCT CGC GCA GGG CAA TCG C
Overlap-DOWN	GAG GCG CTG AAT TCT GGC TGT CAC TCT GGC AGA GAA ACT GG
Konstruktion von <i>Strep-tagII</i>[®] Fusionen:	
HypCStrepII	TCA CTT TTC AAA CTG AGG GTG GCT CCA TTT TTC CTC GCC
HypCup <i>AatII</i>	TAG TTA GCT GAC GTC GCA TAT GTT TGC CGC C
IBA5-hypDup	ATG GTA GGT CTC AGC GCC ATG CGT TTT GTT GAT GAA TAT CG
IBA5-hypDdown	ATG GTA GGT CTC ATA TCA CGC TTC ACT CTC CTG CTG ACG

Konstruktion von HypC und HybG Varianten durch gezielte Mutagenese:

HypCH51R	CAG TGG GTA CTG GTA CGC GTT GGC TTT GC
HypCH51A	CAG TGG GTA CTG GTA GCC GTT GGC TTT GC
HypCH51F	GCC AGT GGG TAC TGG TAT TTG TTG GCT TTG CC
HypCH51inv.	CAG TAC CCA CTG GCC CAC GCG CG
HybGH52R	CAG TGG GTG CTG GTA CGC GTC GGA TTT G
HybGH52F	CCA GTG GGT GCT GGT ATT TGT CGG ATT TGC C
HybG52	TAC CAG CAC CCA CTG GCC CAG TAG ATC G
HybGR15L	CTG GCT GTC GGT GAA CTT ATT CAC CAG CTT GC
HybGR15N	CTG GCT GTC GGT GAA AAT ATT CAC CAG CTT GCG
HybG15	ACC GAC AGC CAG CAC CTG GCC TGG

Konstruktion von HypD Varianten durch gezielte Mutagenese (inverse PCR):

HypDC41A	ATG ACC GCC AGC CAC TTC CAT AAT CCG
HypDH44A	AGC ACC GCC ACA CAC TTC CAT AAT CCG
HypDC41H44inv.	ACC CAC GCT ATC TTC AAA TTC GGC CTC G
HypDP70A	TGC GCG GTG TGC GTA CTG CCG ATG GG
HypDC72A	TGC CCG GTG GCC GTA CTG CCG ATG GG
HypD697072inv.	CCC GGG ACC GTG GAT AAA CTC AAC G
HypDH175A	CAA CGT CGG GAT AAG CGT AAT GGC CTG G
HypDH175Ainv.BglI	AGA TCT TTG CTG GAA CAG CCG GAT AAC GG
HypDH201A	GGT GCA GTC AGT ATG GTT ATC GGC ACC G
HypDH201inv.MluI	CGG CGC GAG GAA CGC GTC GAT ACC
HypDC323A-XhoI	CGC GCT CGA GCA GGT GAG GTA TTA ACG
HypDC323Ainv.	CGG GTC ATC GCA GAC CTG CTG CGG TGC
HypDC343A	TTG AGG ATT TGC GGT GTT ACC AAA CAG CGG
HypDC343Ainv.Bsp120I	ACC GCG TTT GGG GCC CTG ATG GTT TCC
HypDC336A	CAG CGG GGC TTG ATG CGG CTT ACA TTT GC
HypDC336Ainv.PciI	TTT GGT AAC ACA TGT AAT CCT CAA ACC GCG TTT GG

Konstruktion von HypD Varianten durch gezielte Mutagenese (direkte PCR):

dirC69A	GGT CCC GGG GCC CCG GTG TGC GTA CTG CCG
dirC69S	GGT CCC GGG TCC CCG GTG TGC GTA CTG CCG
dirV71A	GGT CCC GGG TGC CCG GCG TGC GTA CTG CCG
dirP75A	GGT CCC GGG TGC CCG GTG TGC GTA CTG GCG
BstEII back	CAG CAG GTT ACC GGC ATC CGG TAC CAC TCG
dirG146A	CTG CTG CAG AGT GAT AGC GGT GGT CGG CAT AGT GGT TTC AAA AGC
dirF147Y	CTG CTG CAG AGT GAT AGC GGT GGT CGG CAT AGT GGT TTC ATA ACC
dirE148A	CTG CTG CAG AGT GAT AGC GGT GGT CGG CAT AGT GGT TGC AAA ACC
dirE148Q	CTG CTG CAG AGT GAT AGC GGT GGT CGG CAT AGT GGT TTG AAA ACC
dirT150V	CTG CTG CAG AGT GAT AGC GGT GGT CGG CAT AAC GGT TTC AAA ACC
SmaIGFETT	GGT CCC GGG TGC CCG GTG TGC GTA CTG CCG
HypDdir.C360A	TCA CGC TTC ACT CTC CTG CTG ACG ATA CTG ATA CCA CGC GGC GGC CGC
HypDdir.C360S	TCA CGC TTC ACT CTC CTG CTG ACG ATA CTG ATA CCA CGC GGC GCT CGC

Konstruktion von HypD Stopmutanten:

S203Stop	TCA ACT GAC GTG ACC CGG CGC GAG G
D317Stop	TCA ATC GCA GAC CTG CTG CGG TGC C

Konstruktion von Plasmiden zur Überproduktion

pT7-hypDStart	GGA TCC ATA TGC GTT TTG TTG ATG AAT ATC GCG CG
HypC-1b	(Drapal und Böck, 1998)
HypC-2	(Drapal und Böck, 1998)
NdeIhybFup	GGA TCC ATA TGC ATG AGT TGT CTC TTT GCC
NdeIhybFH2Qup	GGA TCC ATA TGC AGG AGT TGT CTC TTT GCC
hypEBamHIup	GCC GGA TCC CGT GAA TAA TAT CCA ACT CGC CCA CGG
hypEBamHI down	CGG GGA TCC GAA TTT TAT TAG CAT ATA CGC GG
hypFHindIIIup	GCC AAG CTT GGG TTA CGC AAT TCA TGA TGG
hypFHindIII down	CGG AAG CTT ACG TTT TAT CCG TTC TGG ACT TCA CC

Konstruktion von HybF-Strep Varianten durch gezielte Mutagenese (inverse PCR):

HybFC92A	CAA CCG CTC GCC GTG AGC GAG CGG ACA CTG CGC ATC
HybFC89/92A	CAA CCG CTC GCC GTG AGC GAG CGG AGC CTG CGC ATC
HybFC89/92inv. <i>SalI</i>	CAC GGC GAG CGG TTG CGT GTC GAC ACC GGC GAT TCG
HybFC73/76inv. <i>BstI</i> 1107I	CCA AGC CTG GGC GGG TTT GTA TAC GAT ATG TAA ATC GC
HybFC73A	CCC GCC CAG GCT TGG GCT TGG GAT TGC AGC CAG GTG
HybFC76A	CCC GCC CAG GCT TGG TGC TGG GAT GCT AGC CAG GTG
HybFC73/76A	CCC GCC CAG GCT TGG GCT TGG GAT GCT AGC CAG GTG G

Konstruktion von Strep-HypD von *M. jannaschii*:

IBA5-hypDup- <i>M.j.</i>	ATG GTA GGT CTC AGC GCC ATG ATT AAT ATC AAT GAT AGA GCC
IBA5-hypDdown- <i>M.j.</i>	ATG GTA GGT CTC ATA TTA AAT CCT CCT ATA CTT ATA AAA TAT CC

Konstruktion der B2H-Plasmide:

2hypDdownBamHI	GGA TCC TCA CGC TTC ACT CTC CTG CTG
2hypDup	GGG TAC GTT TTG TTG ATG AAT ATC GCG CGC C
2hypCupRBS	GAA GGA GAT GAT ATC AAT GTG CAT AGG CGT TCC C
2hypCdown	GTT TTT CCT CGC CAT ACA ACA GCG CGC C
2hycEup	GGG TAT CTG AAG AAA AAT TAG GTC AAC ATT ATC TCG CC
2hycEdownBamHI	GGA TCC TTA TTT CAG CGG CGA GTT TTT ACG C
2hypAupRBS	GAA GGA GAT GAT ATC AAT GCA CGA AAT AAC CCT CTG CC
2hypAdown	GCT CCT GGT CTA TTT CTA TCC GCC G
2hypBup	GGG TAA TGT GTA CAA CAT GCG GTT GCG GTG AAG G
2hypBdown	CTA TGC ACA TCG CTG TGT CTC CAG CCA GTT CAG C

Konstruktion von Plasmiden mit den Genen *argI* und *argG*

ArgIupVspI	TAG TTA GCT GAT TAA TTC ATT GAG GCG TTA GCC AC
ArgI downEcoRI	CGA ATT CGC GAT CAG ATT ATT TAC TGA GCG TCG
ArgGupBamHI	TAG TTA GCT AGG ATC CTG CTC TCC CTT AAG CG
ArgGdownHindIII	CGA AGC TTA CTG GCC TTT GTT TTC CAG ATT CTC C

* Oligonukleotide sind in der 5' → 3' Richtung angegeben

1.4. Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

- Auftragspuffer (4x) für Proteinproben* nach Laemmli (1970)
- Auftragspuffer (4x) für DNA-Proben nach Sambrook *et al.* (1989)
- Reservoir Puffer*/ Tris-Glycin-Puffer nach Sambrook *et al.* (1989)
- Blotpuffer* nach Howe und Hershey (1981)
- TBS-(T)-Puffer nach Amersham LIFE Science ECL, Western Blot Protokoll
- TAE nach Sambrook *et al.* (1989)
- Aufbruchspuffer:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 20 µg/ml PMSF, 20 µg/ml DNaseI, ± 1 mM DTT
- *Strep*-Tactin Waschpuffer:
50 bzw. 100 mM Tris/Cl pH8.0, 100 mM NaCl (optional), ± 1 mM DTT
- *Strep*-Tactin Elutionspuffer:
100 mM Tris/Cl pH 8.0, 2.5 mM Desthiobiotin
- *Strep*-Tactin Regenerationspuffer:
100 mM Tris/Cl pH 8.0, 1 mM HABA
- Superdexpuffer:
100 mM Tris/Cl pH 8.0, 100 mM NaCl, ± 1 mM DTT
- Dialysepuffer HypC-*Strep*:
25 mM Tris/Cl pH 8.0, 5 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 50 % Glyzerin
- Dialysepuffer *Strep*-HypD:
25 mM Tris/Cl pH 8.0, 5 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 50 % Glyzerin
- Dialysepuffer HybF-*Strep*:
25 mM Tris/Cl pH 8.0, 5 mM NaCl, 0.1 mM DTT, 50 % Glyzerin
- Puffer HypE-A:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM Mg-Acetat, 100 µM DTT
- Puffer HypE-B:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 1 M NaCl, 10 mM Mg-Acetat, 100 µM DTT
- Dialysepuffer HypE:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM Mg-Acetat, 100 µM DTT, 50 % Glyzerin
- Puffer HypF-A:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

- Puffer HypF-B:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 50 mM KCl, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT
- Dialysepuffer HypF:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 50 % Glycerin
- F-Puffer:
50 mM Tris/Cl pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM Mg-Acetat, 100 µM DTT, ± 50 µg/ml BSA
- Z-Puffer nach Miller (1992)
- Amidoschwarz-Lösung nach Howe und Hershey (1981)
- Coomassie-/Entfärber-Lösung:
40 % Methanol, 10 % Eisessig, ± 0.25 % Serva Blue R-250
- Acrylamid-Lösung:
30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid
- CTAB -Lösung:
10 % CTAB (N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid) in 0.7 M NaCl

* unter nicht-denaturierenden (ND) Bedingungen wurden die von Drapal und Böck (1998) beschriebenen Puffer ohne SDS, DTT, 2-Mercaptoethanol und Methanol verwendet.

1.5. Chemikalien

Chemikalien und Medien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), ICN (USA), Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm) und Bernd Euler (Frankfurt) bezogen.

1.6. Radioaktive Verbindungen

Radiochemikalien wurden von Amersham Biosciences (α -³²P-ATP; Freiburg), NEN Life Science Products (⁶³Ni; ¹⁴C-(Ureido)-Citrullin; ³²P-GTP; Köln), Perkin Elmer (γ -³²P-ATP; Rodgau-Jügesheim) und American Radiolabeled Chemicals Inc. (¹⁴C-Carbamoylphosphat; St. Louis, USA) bezogen.

2. Methoden

2.1. Mikrobiologische Methoden

2.1.1. Aerobe and anaerobe Anzuchten von Bakterien

Aerobe Anzuchten von *E. coli* wurden in Erlenmeyerkolben durchgeführt. Diese wurden zu 10 - 20 % des Nennvolumens mit Medium befüllt. Geschüttelt wurde kontinuierlich bei 180 - 220 upm (B. Braun HAT, Melsungen). Für geringere Kulturvolumina erfolgte die Anzucht in Reagenzgläsern (Rollodrum von New Brunswick Scientific Co., New Jersey). Für anaerobe Anzuchten wurden 50 bis 1000 ml Meplatflaschen verwendet. Die entsprechenden Übernachtkulturen wurden in Erlenmeyerkolben „semianaerob“ bei 40 upm geschüttelt.

2.1.2. Bestimmung der Zelldichte und Zellmasse

Die Zelldichte wurden anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Anaerobe Kulturen wurden bis zu einer OD_{600} von 1.0, aerobe bis zur stationären Phase angezogen. Bei der Reinigung von Proteinen erfolgte zusätzlich die Bestimmung des Zellnassgewichts.

2.1.3. Test auf Gasproduktion

Für erste Hinweise über die Funktionalität des FHL-Komplexes wurde die Gasproduktion getestet. Dies geschah als Standkulturen in mit LB-Medium (incl. 0.4 % Glukose) befüllten Reagenzgläsern; gebildetes Gas wurden in Durham-Röhrchen aufgefangen.

2.2. Genetische Methoden

2.2.1. Konstruktion von Plasmiden

Die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind in Tabelle 2 vermerkt. Es handelt sich hierbei um Derivate der Vektoren pMAK700, pACYC184, pBR322, pUC19, pT7-7, pASK-IBA5, pKT25, pUT18 und pUT18-C (Referenzen siehe Tabelle 2). Die entsprechenden Gene wurden durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR; siehe 2.3.6.) vervielfältigt, das Amplifikat wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, und mit Hilfe der T4 DNA Ligase mit dem Vektor verbunden (2.3.5.). Alternativ hierzu wurden die Gene aus Plasmiden (Midi-präparation) ausgeschnitten und mit den entsprechend geschnittenen Vektoren ligiert. Neue Plasmide entstanden auch durch inverse PCR.

2.2.2. Transformation

Die Transformation von *E. coli* Zellen erfolgte nach den Methoden von Chung *et al.* (1989) und Inoue *et al.* (1990) bzw. mittels Elektroporation (Dower *et al.* 1988; Fiedler *et al.* 1988; Taketo *et al.* 1988). Die Parameter waren: 800 Ohm Widerstand, 25 μ FD Kapazität und 2 kV Spannung. Nach der Transformation erfolgte eine phänotypische Expression für 60 min. Zu Klonierungszwecken bzw. zur Herstellung von Glycerinkulturen von Plasmid-enthaltenden Stämmen wurden stets *recA*-negative Stämme verwendet (DH5 α und JM109).

2.2.3. Homologe Rekombination

Deletionen von Genen im *E. coli* Chromosom wurden durch homologe Rekombination nach Hamilton *et al.* (1989) eingeführt. Als Ausgangsplasmide wurden die in Tabelle 2 angegebenen pMAK700- und pMAK705-Derivate verwendet. Die neuen Stämme wurden sowohl auf Plasmid-Verlust (Cm^S), als auch durch Kolonie-PCR auf Ihre Richtigkeit geprüft.

2.2.4. Integration des λ DE3 Phagens in das *E. coli* Chromosom

Gene auf den pT7 Vektoren bedürfen zur Überexpression der T7-RNA Polymerase (Tabor und Richardson, 1985). Hierzu wurde der Stamm BL21(DE3) verwendet (Studier und Moffatt, 1986), dessen Prophage DE3 das Gen für die Polymerase trägt. Da BL21(DE3) unter anaeroben Bedingungen aktive Hydrogenase 1 und 2 produziert (jedoch keine Hydrogenase3), und dem zufolge auch die *hyp* Gene und das *carAB* Operon exprimiert, konnte der Stamm für bestimmte Versuche nicht verwendet werden. Deshalb wurde der λ DE3 Prophage in die entsprechenden *E. coli* Stämme integriert. Dies geschah mit Hilfe des „ λ DE3 Lysogenization kit“ der Firma Novagen (Madison, WI, USA). Das Prinzip basiert auf einer 3-fach Infektion mit λ DE3, einem Helferphagen (B10) und einem Selektionsphagen (B482). Die so erhaltenen Stämme waren DHP-C Δ car705 (DE3), DHP-F2 (DE3) und DHP-E Δ hypF (DE3).

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolierung chromosomaler DNA

Zur Gewinnung chromosomaler DNA von *E. coli* wurden Bakterien einer Flüssigkultur des Stammes MC4100 lysiert, Proteine mit Hilfe der Proteinase K verdaut und Zellwand-Bruchstücke, Polysaccharide und restliche Proteine selektiv durch CTAB präzipitiert. Die hochmolekulare DNA wurde aus dem Überstand durch Isopropanol-Fällung gewonnen (Ausubel *et al.*, 1997). Chromosomale DNA von *M. jannaschii* stammte von der Arbeitsgruppe von Prof. Müller. Die chromosomale DNA diente als Matrize für PCR-Reaktionen.

2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Alternativ hierzu erfolgte die Aufreinigung der Plasmide durch Kits der Firmen Roche, Penzberg (High Pure Plasmid Isolation kit) oder Macherey & Nagel (NucleoSpin Plasmid). Die Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben der Hersteller mit Hilfe des „Midi-Preparation kits“ (Qiagen, Hilden) oder des „NucleoBond PC 100 kits“ (Macherey & Nagel, Düren).

2.3.3. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Abtrennung von DNA-modifizierenden Enzymen sowie ungewollten DNA-Abschnitten, wurde die DNA in Agarosegelen aufgetrennt, die erwartete Bande ausgeschnitten, und per „Qiaquick Gel Extraction kit“ der Firma Qiagen (Hilden) extrahiert.

2.3.4. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm gemäß der Formel $1 A_{260} \text{ Unit dsDNA} = 50 \mu\text{g/ml}$ bestimmt (*Molecular Biochemicals - Lab FAQ*; Roche GmbH, Mannheim). Die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten A_{260}/A_{280} ermittelt. Zur Abschätzung der DNA-Menge wurde linearisierte DNA im Agarosegel mit Standard-DNA verglichen. Dies geschah nach Anfärbung mit Ethidiumbromid.

2.3.5. Enzymatische Modifikationen von DNA

Modifikationen von DNA wie Phosphorylierung von Oligonukleotiden, Dephosphorylierung, Ligation und Restriktion erfolgten nach Angaben der Hersteller. Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St.Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Roche (Penzberg) und Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

2.3.6. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988) wurde zur Amplifizierung von DNA verwendet. Dies geschah mit Hilfe der Polymerase des „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche, Penzberg). Die Standardbedingungen waren: Denaturierung bei 94°C für 15 s, Anlagerung der Oligonukleotide zwischen 55-65 °C (je nach T_m) für 30 s und Kettenverlängerung bei 72°C (68°C bei inverser PCR) für 45 s pro 1.5 kb Fragmentlänge ($\pm 5 \text{ s} / \pm 20 \text{ s}$ (bei inverser PCR) pro Runde). Als Matrize diente chromosomale oder Plasmid-

DNA. Zur Überprüfung von Klonen wurde die PCR direkt von ganzen Zellen durchgeführt (Kolonie-PCR; erster Denaturierungsschritt für 5 min). Hierbei kam die hausintern gereinigte *Taq*-Polymerase zum Einsatz. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

2.3.7. Gerichtete Mutagenese durch inverse und direkte PCR

Um Aminosäureaustausche in Proteinen zu bewirken, wurde die DNA-Sequenz gezielt verändert. Dies geschah durch inverse PCR (Ochman *et al.*, 1988) mit Oligonukleotiden (siehe Tabelle 4), welche die erwünschten Basenaustausche enthielten. Falls möglich wurden zur Vereinfachung der Selektion stumme Mutationen eingebracht, um neue Restriktionsschnittstellen zu schaffen. Bei einzelnen Mutationen wurde die inverse PCR durch eine direkte PCR ersetzt. Die in Tabelle 4 aufgezählten Oligonukleotide für direkte PCR enthielten am 5'-Ende die passenden Restriktionsschnittstellen. Dabei wurden Restriktionsschnittstellen genutzt, die sich nahe der zu veränderten Basenpaare befanden. Waren keine Restriktionsschnittstellen vorhanden, wurde zunächst ein „Klonierungsvektor“ konstruiert (nur stumme Mutationen).

Alternativ zur „gewöhnlichen“ inversen PCR, wurden auch PCR-Reaktionen mit überlappenden Primern durchgeführt (Ansaldi *et al.*, 1996). Um Klone mit dem PCR-Ausgangsplasmid zu vermeiden, wurde zuvor ein *DpnI*-Abbau durchgeführt.

2.3.8. Zwei-Schritt überlappende PCR

Zur Herstellung des pMDybjW Plasmids wurde eine modifizierte Methode der „Zwei-Schritt überlappenden PCR“ verwendet (Benoit und Maier, 2003). Hierzu wurde jeweils eine PCR mit den Primern YbjWup*Bam*HI ① & Overlap-UP ② bzw. Overlap-DOWN ③ & YbjWdown *Bam*HI ④ und chromosomaler DNA als Vorlage durchgeführt. Die gereinigten, überlappenden PCR-Fragmente wurden in gleicher Menge als Matrize in die dritte PCR eingesetzt, zusammen mit den Primern YbjWup*Bam*HI ① und YbjWdown*Bam*HI ④ (siehe Abb. 8). Das PCR-Produkt 3 und pMAK700 wurden mit *Bam*HI geschnitten und anschließend ligiert.

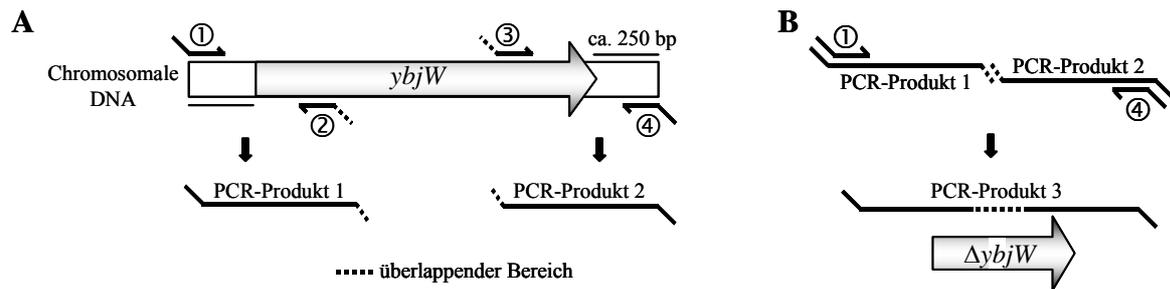


Abbildung 8: Modell der Zwei-Schritt überlappenden PCR. (A) Durchführung der PCR 1 und 2 mit chromosomaler DNA als Matrize. Zum Einsatz kamen die Primer YbjWupBamHI ①, Overlap-UP ②, Overlap-DOWN ③ und YbjWdownBamHI ④. (B) Durchführung der dritten PCR mit den PCR-Fragmenten 1 und 2 als DNA-Vorlage. Darstellung nicht maßstabsgetreu.

2.3.9. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers (AmpliTa[®]-Protokoll der Firma Applied Biosystems GmbH) vorbereitet und mit einem „ABI PRISM 377 DNA Sequenzer“ (Applied Biosystems GmbH) sequenziert.

2.4. Elektrophorese und nachfolgende Analysen

2.4.1. Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 1 %-igen Agarosegelen. Als Puffer diente TAE (Sambrook *et al.*, 1989), als Marker der „GeneRuler DNA Ladder Mix“ von MBI (Litauen).

2.4.2. Präparation von Zell-Lysaten

Zell-Lysate wurden durch Zentrifugation von 1 ml Zellkultur einer OD₆₀₀ von 1.0 und Resuspension des Pellets in 100 µl Probenpuffer hergestellt. Die Proben wurden für 20 min bei 95°C erhitzt. Die Angabe der verwendeten Menge pro Gelspur erfolgt in OD₆₀₀-Einheiten. Alternativ wurden zellfreie Extrakte verwendet (siehe 2.5.2).

2.4.3. Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in vertikalen Gelen (Polyacrylamid-Gelelektrophorese; PAGE). Zur Herstellung von denaturierenden Gelen wurde nach Angaben von Laemmli vorgegangen (Laemmli, 1970). Für nicht-denaturierende (ND) Bedingungen wurde auf SDS, DTT und 2-Mercaptoethanol verzichtet (Drupal und Böck, 1998). Bei nicht-denaturierenden

SDS-Gelen enthielt der Auftragspuffer ebenfalls weder DTT noch 2-Mercaptoethanol, alle Puffer enthielten jedoch 0.1 % SDS. Es handelte sich stets um diskontinuierliche Gele mit einem Acrylamidgehalt von 10 bzw. 15 %.

2.4.4. Proteinfärbung

Die Anfärbung aufgetrennter Proteine erfolgte mit Serva Blue R-250 (Coomassie; Sambrook *et al.*, 1989) oder Silberpartikeln (Sammons *et al.*, 1981; Blum *et al.*, 1987).

2.4.5. Westernblotanalyse (Immunoblot)

Die Detektion geringer Proteinmengen bzw. spezifischer Proteine erfolgte durch Westernblotanalysen. Nach Auftrennung der Proteine in Polyacrylamidgelen (2.4.2.) erfolgte der Transfer nach dem Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (BioTrace NT, Pall Corp., Dreieich bzw. Protran NC Transfer Membrane, Schleicher & Schuell, Dassel). Die Fixierung der Proteine und Überprüfung des Transfers wurde durch Anfärben mit Amidoschwarz-Lösung durchgeführt. Nach Absättigen der Membranen mit Magermilch (5%-ig), erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen polyklonalen Antiserum in TBS-T-Puffer (\pm 0,5 % Magermilch). Die Verdünnung der Seren war: 1:1000 bzw. 1:500 für α -HycE, 1:1000 für α -HycI, 1:500 für α -HycG, 1:2000 für α -HypB, 1:500 für α -HypC, 1:333 für α -HypD, 1:500/1:1000 für α -HypE, 1:1000 für α -HypF und 1:500 bis 1:2000 (abhängig vom erhaltenen Serum der Firma IBA, Göttingen) für α -*Strep*-tagII-Serum. Die Inkubationsdauer betrug eine Stunde oder über Nacht. Als „sekundärer Antikörper“ wurde mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Protein A von Biorad (München) im Verhältnis 1:3000 zu TBS-T verwendet. Die Signale wurde nach Inkubation der Membran in Detektionslösung (Lumi-Light Western Blotting Substrate; Roche), Auflegen eines Röntgenfilms (WicoRex® B+; Typon Medical Systems, Burgdorf) und anschließender Entwicklung (Röntgen-Entwicklerkonzentrat und Röntgen-Fixierkonzentrat der Firma Adefo-Chemie GmbH, Nürnberg) sichtbar.

Die Antiseren wurden vor ihrem Einsatz mit S13-Extrakten des jeweiligen Deletionsstamm für 60 min bei 37°C abgesättigt. Die Qualität der Antiseren gegen HypE und HypF wurde durch dreimalige Ammoniumsulfatfällung verbessert (Piepersberg *et al.*, 1975).

2.4.6. Aktivitätsfärbungen

Die Hydrogenase-Aktivitäten wurden entweder als Gesamtaktivität aller drei Hydrogenasen (siehe 2.6.3.) oder spezifisch für Hydrogenase 1 und 2 in Polyacrylamidgelen nachgewiesen (Ballantine und Boxer, 1985). Hierbei wurde eine Optimierung der Sensitivität (30 µg Proteinmenge statt 120-150 µg) und der Auftrennung der Hydrogenase 1 und 2 (Hinderung der Einwanderung in nicht-denaturierende Gele durch Membran-Bindung bzw. -Integration) durch folgende Variation zu beschriebenen Verfahren (Blokesch *et al.*, 2001) erzielt: Zu allen Lösungen wurde 0.1 % SDS zugegeben (auch als nicht-denaturierende SDS-Gele bezeichnet). Daß die Zugabe von 0.1 % SDS die kompakte, aktive Struktur der Hydrogenasen nicht schädigt, wurde schon für die Hydrogenase von *Azotobacter vinelandii* gezeigt (Seefeldt und Arp, 1987). Die Zuordnung der Aktivitätsbanden als Hydrogenase 1 und 2 gelang durch die Stämme HDK103 (Jacobi *et al.*, 1992), HDK203 (Jacobi *et al.*, 1992) und HDK200 (Sauter, 1992), die jeweils nur zur Bildung von Hydrogenase 1 oder 2 fähig sind (Daten nicht gezeigt).

2.4.7. Autoradiographie

Zur Detektion von radioaktiv markierten Proteinen wurden die Gele (⁶³Ni-Markierung) bzw., nach Transfer der Proteine, die Nitrocellulose-Membranen getrocknet (¹⁴C-Versuche) und in einer „Tritium Storage Phosphor Screen“ Kassette von Amersham Biosciences (Freiburg) exponiert. Die Dauer betrug 2 bis 4 Tage für ¹⁴C und ca. 2-3 Wochen für ⁶³Ni. Das Auslesen erfolgte mit dem Storm 840 PhosphoImager (Amersham Biosciences, Freiburg), die Bildbearbeitung mit der Software ImageQuant 5.2 und Photoshop 5.5.

2.5. Proteinreinigungen

Bei allen Schritten der Proteinreinigung wurden die Proteine gekühlt (auf Eis oder durch Arbeiten im Kühlraum). Die Säulen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers gelagert, äquilibriert und nach Verwendung regeneriert. Verwendet wurden FPLC Anlagen der Firma Pharmacia (Freiburg; LKB FPLC System; bestehend aus 2-LKB Pump P-500, LKB Programmer GP-250 Plus, LKB Recorder 102, LKB Control unit UV-1, LKB Optical Unit UV-1, Fraction Collector Frac-100; im Kühlraum) oder eine ÄKTA™ FPLC der Firma Amersham Biosciences (Freiburg). Die Software hierzu war UNICORN™ Version 4.0.

2.5.1. Herstellung von zellfreien Extrakten

Zur Herstellung von zellfreien Extrakten (Rohextrakten) wurden die Zellen von Kulturen nach Erreichen der entsprechenden OD₆₀₀ durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und bei -20°C gelagert. Der Aufbruch geschah nach Aufnahme in Aufbruchspuffer (ca. 1/200 des Kulturvolumens) und zweimaliger Passage durch die French-Press Zelle bei 16.000 psi. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10 000 × g oder 30 000 × g (S10/P10 bzw. S30/P30 im Sorvall SS-34 Rotor; wobei S den Überstand und P den Niederschlag angibt) bzw. bei 13 000 × g (S13) in einer Heraeus Tischzentrifuge im Kühlraum. Zur Abtrennung von Membranproteinen erfolgte eine zweistündige Ultrazentrifugation bei 100 000 × g (S100/P100).

2.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Rohextrakte wurden nach der optischen Methode von Whitaker & Granum (1980) bestimmt. Die Konzentration von gereinigten Proteinen wurde mittels Extinktionskoeffizient nach Gill & von Hippel (1989) bzw. nach Angaben von Lottspeich und Zorbas (1998) ermittelt. Hierbei wurden die Absorptionskoeffizienten bei 280 nm (ϵ) der Proteine mit ϵ_{280} von 5559 für Tryptophan und 1197 für Tyrosin berechnet. Die verwendeten ϵ_{280} waren 21891 M⁻¹ cm⁻¹ für HypD, 27450 M⁻¹ cm⁻¹ für Strep-HypD, 12315 M⁻¹ cm⁻¹ für HypC-Strep, 6756 M⁻¹ cm⁻¹ für HypC, 14709 M⁻¹ cm⁻¹ für HypE, 15906 M⁻¹ cm⁻¹ für HypB, 97580 M⁻¹ cm⁻¹ für HypF und 23433 M⁻¹ cm⁻¹ für HybF-Strep.

Teilweise erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration zusätzlich mit dem auf der Methode von Bradford basierenden (Bradford, 1976) Protein Assay von Biorad (München) oder nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) mit BSA oder Ovalbumin als Standard.

2.5.3. Ammoniumsulfat-Fällung, Aufkonzentrierung und Dialyse

Die Abtrennung von Proteinen erfolgte durch Ammoniumsulfat-Fällung. Die Proteinlösung wurde auf 10 mg pro ml eingestellt. Die benötigte Menge des fein pulverisierten Ammoniumsulfats wurde aus dem Nomogramm von Di Jeso (1968) bestimmt und unter ständigem Rühren bis zur gewünschten Sättigung zugegeben. Um ein Sättigungsgleichgewicht zwischen Lösung und Niederschlag einzustellen, wurde für weitere 30 min gerührt. Durch Zentrifugation bei 20 000 × g für 30 min sedimentierten die ausgefallenen Proteine.

Die Aufkonzentrierung von Proteinen erfolgte mit Amicon Centricons der Firma Millipore (Schwalbach) oder Microseps der Firma Pall (Dreieich). Für kleine Volumina (bis 500 µl) wurden Nanoseps der gleichen Firma verwendet.

Zur Entsalzung, zum Pufferwechsel oder zum Einengen von Proteinlösungen wurde dialysiert. Hierzu diente eine spezielle, chemisch vorbehandelte Dialysemembran (Spectra/Por 7) der Firma Roth (Karlsruhe). Ein Erhitzen oder Autoklavieren mit EDTA um Schwermetalle zu entfernen war nicht notwendig. Ein weiterer Vorteil lag in der Porengröße: Proteine mit mehr als 3.5 kDa konnten die Membran nicht passieren.

2.5.4. Affinitätschromatographie (*Strep-Tactin*[®])

Zur Anreicherung bzw. Reinigung von HypC-Strep, Strep-HypD, Strep-HypD[C41A], Strep-HypD[C72A], HybF-Strep, HybF-Strep[H2Q] und der Komplexe HypC-Strep × HypD und HypC-Strep × HypD × HypE wurde *Strep-Tactin*[®]-Material der Firma IBA (IBA, Göttingen) verwendet. Die Säulen wurden mit 1 ml Bettvolumen (2 ml 50%-ige *Strep-Tactin*[®] Suspension) gepackt und die entsprechenden S30-Extrakte auf die Säule aufgetragen. Es folgte das Waschen der *Strep-Tactin*[®]-Säule mit 12 Säulenvolumina Waschpuffer, um ungebundene Proteine abzutrennen. Die Elution erfolgte durch Desthiobiotin (Elutionspuffer), die Fraktionen (je 0,5 bis 1 ml) wurden auf Vorhandensein der Proteine überprüft (Anfärbung im SDS-Gel oder Westernblot). Die Regeneration des Säulenmaterials mit HABA (4'-Hydroxy-Azobenzen-2-Carboxylsäure) erfolgte nach Angaben des Herstellers (IBA, Göttingen).

2.5.5. Eichlauf der Gelfiltration

Um eine Aussage über das Laufverhalten bzw. die Größe von Proteinen zu machen, wurde die HiLoad[™] 16/60 Superdex[™] 75 pg (im weiteren Superdex-75 genannt) Gelfiltrationssäule mit folgenden Proteinen äquilibriert: BSA (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Chymotrypsinogen (25 kDa), Lysozym (14.4 kDa) und Cytochrom c (12.4 kDa). Der Lauf erfolgte mit Superdexpuffer und einer Flussrate von 1 ml pro min.

2.5.6. Reinigungsprotokoll für HypC-Strep

Die Reinigung von HypC-Strep erfolgte aus verschiedenen Ausgangsstämmen. Die Anzucht von BL21(DE3)/pT-hypCStrep erfolgte aerob in 2×YT Medium bei 37°C; anaerobe Anuchten (TGYEP Medium mit 0.8 % Glukose, ohne zugesetztes Formiat; 37°C) wurden mit den Transformanten DHP-F2/pUhypCStrep, ΔCarAB/pUhypCStrep, DHP-D/pUhypCStrep und

HD705/pUhypCStrep durchgeführt. Induziert wurde in allen Fällen durch Zugabe von 0.5 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 1.0. Die Zellen wurden 2.5 h nach Induktion geerntet, gewaschen und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Reinigung wurde der S30-Extrakt (siehe 2.5.1.) gewonnen und auf die *Strep-Tactin*[®] Sepharose-Säule geladen (siehe 2.5.4.). Nach Elution wurden die HypC-Strep-enthaltenden Fraktionen vereint und über Nanoseps aufkonzentriert (siehe 2.5.3.). Die weitere Separation erfolgte durch Gelfiltration an einer Superdex-75-Säule mit einer Flussrate von 1 ml pro min. Die HypC-Strep-enthaltenden Fraktionen wurden vereint, gegen „Dialysepuffer HypC-Strep“ über Nacht dialysiert und bei -20°C gelagert.

2.5.7. Reinigungsprotokoll für Strep-HypD

Die Anzucht der Zellen zur Reinigung von Strep-HypD musste aerob erfolgen, da die Induktion der Expression unter anaeroben Bedingungen zu gering ausfiel. Verwendet wurde hierbei der Stamm DH5 α , welcher das Plasmid pIBA5-hypD enthielt. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von 0.2 μ g/ml AHT (Anhydrotetrazyklin; IBA Göttingen) bei einer OD₆₀₀ von 1.0. Die Zellen wurden 2.5 bis 3 h nach Induktion geerntet, gewaschen und bei -20°C gelagert.

Die Reinigung von Strep-HypD erfolgte ebenfalls durch Affinitätschromatographie (*Strep-Tactin*[®]) gefolgt von einem Gelfiltrationslauf (Superdex-75) und Dialyse über Nacht (Dialysepuffer Strep-HypD). Die Wanderung von Strep-HypD konnte in beiden Säulen visuell verfolgt werden, da es sich bei Strep-HypD um ein eisenhaltiges Protein mit gelblicher Farbe handelt. Die anaerobe Anreicherung von Strep-HypD für EPR-Untersuchungen erfolgte nach Herstellung des S30-Extraktes im Anaerobenzelt. Die Temperatur betrug 8°C bis 13 °C. Alle Puffer wurden ent- und begast (100 % Stickstoff) und bis zur Verwendung im Anaerobenzelt (Formiergas: 95 % N₂, 5 % H₂) äquilibriert. Die Anzucht musste aerob erfolgen (1.2 l Kulturvolumen) um eine ausreichende Induktion zu gewährleisten. In der Affinitätschromatographie (*Strep-Tactin*[®]) wurde kein DTT zugesetzt, um Eisen nicht zu „verschleppen“. Ausschließlich gelb gefärbte Fraktionen wurden vereint, über Nanosep aufkonzentriert und über Nacht im Anaerobenzelt gegen 50 mM Tris/Cl pH 8.0, 5 mM NaCl, 50 % Glycerin dialysiert. Die Proteinlösung (ca. 400 μ l) wurde anschließend direkt in ein EPR-Röhrchen transferiert. Dieses wurde aus der Anaerobenkammer ausgeschleust, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Verschicken an B. F. Matzanke bei -70°C gelagert. Die Proteinkonzentration betrug 11.1 mg/ml (270 μ M).

2.5.8. Reinigungsprotokoll für HybF-Strep

Zur Reinigung von HybF-Strep und HybF-Strep[H2Q] wurden die Zellen (BL21(DE3)/p-ThybFStrep bzw. BL21(DE3)/pT-hybFStrep[H2Q]) anaerob in TGYEP Medium angezogen. Obwohl es unter anaeroben Bedingungen zur Ausbildung des hochaffinen Nickel-Transport Systems kommt (Wu und Mandrand-Berthelot, 1986; Eitinger und Mandrand-Berthelot, 2000), wurde zusätzlich 5 μ M Nickel supplementiert. Die Anzucht erfolgte bei 37°C für ca. 3 h ($OD_{600} \sim 0.3$ bis 0.5), gefolgt von einer Anpassungsphase auf 16 bis 22°C (ca. 2 h) und Induktion mit IPTG (0.1 mM). Die Expression wurde über Nacht (10 bis 13 h) oder für 4-5 h durchgeführt und durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bestätigt. Die Löslichkeit des Proteins war trotz optimierter Anzuchtsbedingungen gering. Die Reinigung erfolgte über *Strep-Tactin*[®] Sepharose, Superdex-75, Aufkonzentrierung mittels Microsep bzw. Amicon Centricon und Dialyse gegen „Dialysepuffer HybF-Strep“.

Für aerobe Anzuchten wurden die Zellen in 2×YT-Medium bei 30°C angezogen, auf Raumtemperatur gebracht, mit 0.25 mM IPTG induziert und über Nacht weiter geschüttelt. Zur Reinigung wurde die gleiche Prozedur angewandt.

2.5.9. Reinigungsprotokoll für HypE

Die Reinigung des HypE Proteins erfolgte wie von Blokesch *et al.* (2004a) beschrieben. Zur Überproduktion diente der Stamm BL21(DE3)/pTE-C2. Als kurze Beschreibung: Herstellung des S30-Extraktes, DEAE-Sepharose Ionenaustauscher (35 ml; Pharmacia, Freiburg; 800 ml Gradient von 50-350 mM NaCl mit Puffer HypE-A und Puffer HypE-B), 30%-ige Ammoniumsulfat-Fällung und Gelfiltration an einer Superdex-75-Säule. Das HypE Protein eluierte hauptsächlich als Monomer (nach ca. 60 ml). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint, gegen „Dialysepuffer HypE“ dialysiert und bei -20°C gelagert.

2.5.10. Reinigungsprotokoll für HypF

Die Reinigung des HypF Proteins erfolgte nicht nach der von Paschos *et al.* (2002) beschriebenen Methode. Die Anzucht der JM109/pUCF18 - Zellen erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C, die Induktion mit 0.5 mM IPTG bei einer OD_{600} von 1 und die Expression für drei Stunden. Zur Reinigung des HypF Proteins wurden 8 g Zellen aufgebroschen, der S30-Extrakt erstellt und mit Hilfe des 10 ml Superloops auf eine 21 ml Q-Sepharose Säule geladen. Die Elution geschah durch einen Gradienten von Puffer HypF-A zu 50 % Puffer-HypF-B. HypF eluierte nach kurzer Zeit, wobei Proteine durch ihre Bindung an

die Säule abgetrennt wurden. Nach erfolgter 35%-igen Ammoniumsulfat-Fällung, wurde das resuspendierte Sediment auf eine Superdex-200-Säule geladen. Der Lauf erfolgte mit Puffer HypF-A und einer Flussrate von 1 ml pro min. Die HypF enthaltenden Fraktionen wurden vereint und über Nacht gegen „Dialysepuffer Hyp-F“ dialysiert.

2.5.11. Anreicherungsprotokoll für Proteinkomplexe

Die Anreicherung des HypC-Strep × HypD sowie des HypC-Strep × HypD × HypE Komplexes erfolgte ebenfalls durch Affinitätschromatographie. Hierzu wurden die Zellen BL21(DE3)/pT-hypDCStrep (Isolierung des HypC-Strep × HypD Komplexes), BL21(DE3)/pT-hypDECStrep bzw. BL21(DE3)/pT-hypDEFCSStrep (Isolierung des HypC-Strep × HypD × HypE Komplexes) und BL21(DE3)/pT-hypDE[Mut]CSStrep (zur Isolierung des HypC-Strep × HypD × HypE[Mut] Komplexes) unter den angegebenen Bedingungen (aerob oder anaerob incl. 1 µM FeCl₂) angezogen. Der S30-Extrakt wurde auf die *Strep*-Tactin[®] Sepharose Säule geladen. Die gelblichen Elutionsfraktionen (kennzeichnend für HypD) wurden vereint und die Proteine durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nachgewiesen.

2.6. Biochemische Methoden

2.6.1. *In vitro* Prozessierung und Aktivierung von Hydrogenasen

Die *in vitro* Prozessierung erfolgte in S30-Extrakten wie von Maier und Böck (1996a) beschrieben. Die Prozessierung wurde durch Zugabe von Nickel mit und ohne gereinigter Protease HycI initiiert und durch Westernblotanalysen der große Untereinheit der Hydrogenase 3 (HycE) verfolgt. Die *in vitro* Aktivierung der Hydrogenasen 1 und 2 erfolgte durch Zugabe von Nickel und durch Aktivitätsfärbung in nicht-denaturierenden SDS-Gelen.

2.6.2. Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität von ganzen Zellen

Eine qualitative Untersuchung der Hydrogenase-Aktivitäten erfolgte durch Überschichtungs-tests (in Anlehnung an Mandrand-Berthelot *et al.*, 1978). Hierzu wurden die entsprechenden Stämme auf TGYEP-Platten unter Wasserstoff-Atmosphäre (Anaerobentopf) angezogen. Der Nachweis der Aktivität erfolgte durch Überschichtung mit Benzylviologen (BV)-haltiger Agarose (1 mg/ml). Durch Reduktion von BV erscheinen aktive Kolonien violett.

2.6.3. Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität in Rohextrakten

Der Nachweis der Hydrogenase-Aktivität erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ballantine und Boxer (1985), wobei auf die vorherige Titration mit Natrium Dithionit verzichtet wurde. Die S13-Extrakte stammten aus anaerob angezogenen Zellen und wurden unter Stickstoff-Atmosphäre gebracht. Die Gesamtaktivität von Hydrogenasen 1, 2 und 3 wurde durch Reduktion von Benzylviologen in Wasserstoff-begasten Kuvetten bestimmt. Unter fermentativen Anzuchtbedingungen nehmen Hydrogenase 1 und 2 nur ca. 3-6 % der Gesamtaktivität ein (Jacobi *et al.*, 1992).

2.6.4. Transcarbamoylierung und Dehydratisierung

Dieser Versuch wurde wie von Reissmann *et al.* (2003) und Blokesch *et al.* (2004a) beschrieben durchgeführt. Die Radioaktivität der Nitrocellulosefilter wurde durch Szintillationsmessung bestimmt. Alternativ wurde die Radioaktivität durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Transfer auf Nitrocellulose-Membranen und Exposition eines Tritiumscreens nachgewiesen. Genauere Angaben folgen im Text des Ergebnis-Teils.

2.6.5. Transfer des Cyanids von HypE auf HypC × HypD

Um den ¹⁴C-markierten Cyanidrest von HypE auf den HypC × HypD Komplex zu übertragen, wurde nach Inkubation von HypE, HypF, ATP und [¹⁴C]-Carbamoylphosphat frisch isolierter HypC-Strep × HypD Komplex zugegeben. Die Detektion erfolgte nach Auftrennung der Proteine durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Transfer auf Nitrocellulose-Membranen und Autoradiographie. Inkubationszeiten und Proteinkonzentrationen werden im Ergebnis-Teil angegeben.

2.6.6. Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Die Stämme wurden aerob in LB-Medium incl. 0.5 mM IPTG bei 30°C oder anaerob in TGYEP-Medium incl. 0.5 mM IPTG bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 bis 0.9 angezogen. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde nach Miller (1992) bestimmt. Die sogenannten Miller Units wurden nach folgender Formel berechnet:

$$1000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})/t \times v \times OD_{600}$$

2.7. Proteininteraktionen

2.7.1. Bakteriellies Zwei-Hybrid System

Das von Karimova *et al.* (1998) entwickelte bakterielle zwei-Hybrid System (BTH) beruht auf der Rekonstitution der Adenylatcyclase in *E. coli* durch die Zusammenföhrung der zwei katalytischen Domänen des Enzyms aus *Bordetella pertussis* (Domäne T18 und T25; Ladant und Ullmann, 1999). Der Grad der Interaktion kann durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt werden (siehe 2.6.6.). Die verwendeten *E. coli* Stämme waren BTH101 und DHM1; beide besitzen eine fehlerhafte Adenylate Cyclase (*cya*). Die Ausgangsvektoren waren pUT18, pUT18C und pKT25 (Karimova *et al.*, 2001).

2.7.2. Koelution

Als möglicher Nachweis einer Proteininteraktion wurden die Proteine auf Koelution getestet. Dabei wurde HypC mit dem *Strep*-tagII[®] Peptid fusioniert und jeweils aus Rohextrakten durch Affinitätschromatographie (*Strep*-Tactin[®]) herausgezogen. Interagierende Proteine sollten ebenfalls im Eluat vorhanden sein; unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschschrille mit Nieder- (0.1 mM) und Hochsalz- (0.5 mM NaCl) Puffern entfernt. Anstelle der *Strep*-Tactin[®] Sepharose Säulen wurden für kleinere Volumina *Strep*-Tactin[®]-beschichtete, magnetische Kugeln (Mag*Strep*, IBA GmbH, Göttingen) verwendet.

2.7.3. *In vitro* Komplexbildung

Für die *in vitro* Komplexbildung wurde gereinigtes *Strep*-HypD und HypC (von N. Drapal gereinigt und in 50% Glyzerin bei -20°C gelagert) in Gegenwart von DTT bei Raumtemperatur inkubiert. Der gebildete Komplex wurde durch nicht-denaturierende PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Westernblotanalysen nachgewiesen.

2.7.4. Quervernetzungsversuche („crosslinking“)

Die Quervernetzung von HypC-*Strep* und HypD erfolgte durch Inkubation des eluierten Komplexes mit dem entsprechenden Crosslink-Reagenz. Beim Gebrauch von Crosslinkern für primäre Amine wurde der Komplex zuvor gegen 50 mM Kalium-Phosphat Puffer pH 8.0 dialysiert; die Quervernetzungsreaktion wurde durch Zugaben von Tris/Cl pH 8.0 gestoppt. Die Spaltung von Crosslinkern (DPDPB, DTBP, DTSSP) geschah durch Inkubation mit 50 mM DTT. Quervernetzte Proteine wurden durch nicht-denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt oder durch Westernblotanalyse nachgewiesen. Die verwendeten

Crosslinking-Reagenzien waren: DTBP (Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidat) (Shivdasani und Thomas, 1988), DPDPB (1,4 - bis [3-(2-Pyridyldithio) Propionamido]-Butan) (Chen *et al.*, 1995), p-Phenylendimaleimid (pPDM) und o-Phenylendimaleimid (oPDM) (Walleczek *et al.*, 1989), DTSSP (3,3'-Dithiobis-[sulfosuccinimidyl]propionat]) (Jung und Moroi, 1983) und DMS (Dimethyl Suberimidat) (Wang und Moore, 1977).

2.8. Arbeitsmethoden mit radioaktiven Substanzen

2.8.1. *In vivo* Markierung mit ⁶³Nickel

Die *in vivo* Markierung mit ⁶³Nickel erfolgte in anaeroben Anzuchten (200 ml). Als Medium diente TGYEP incl. 0.8% Glukose und 15 mM Formiat. Es wurden 8 µl der ⁶³NiCl₂ – Stammlösung (NEN Life Science Products, Inc.; Boston, MA, USA; spezifische Aktivität: 697 mCi/mmol) zugesetzt; dies entspricht einer Nickelkonzentration von 1.15 µM. Nach Herstellung des S13-Extraktes wurden die Proteine durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und ⁶³Ni-Signale durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.8.2. *In vitro* Bindung von ⁶³Nickel

Die Untersuchung auf Nickel-Bindung erfolgte ebenfalls mit ⁶³Ni. Hierzu wurde die ⁶³Ni – Lösung mit kaltem NiCl₂ verdünnt, so dass eine Stammlösung von 0.5 mM NiCl₂ entstand (spezifische Aktivität: 121.6 µCi/mmol). Die Proteine wurden mit angegebener Nickelmenge für 10 bis 30 min bei Raumtemperatur in Superdexpuffer ohne DTT inkubiert und anschließend durch Filtration über Nitrocellulosefilter von freiem ⁶³Ni getrennt (je 30 µl in 2 bzw. 3 Parallelen). Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml Puffer wurde die Radioaktivität der Filter im Szintillationsgerät gemessen. Als Standard diente 1 µl der Stammlösung.

2.8.3. *In vivo* Markierung mit [¹⁴C]-Citrullin

In vivo Markierungen wurden in modifiziertem WM-Medium (Fraenkel und Neidhardt, 1961), M9-Medium (Miller, 1992) oder MOPS-Medium (Neidhardt *et al.*, 1974) durchgeführt. Die Anzuchten erfolgten anaerob in 50 oder 100 ml Meplatflaschen. Markiert wurden mit L-[Ureido-¹⁴C]-Citrullin (NEN Life Science Products, Köln) mit einer spezifischen Aktivität von 56.3 mCi/mmol. Zugegeben wurde 1 µg/ml ¹⁴C-Citrullin (zusammen mit 1 µg/ml nicht markiertem Citrullin).

2.8.4. *In vitro* Markierung mit [¹⁴C]-Carbamoylphosphat oder [¹⁴C]-Citrullin

Die *in vitro* Markierung erfolgte mit [¹⁴C]-Carbamoylphosphat (American Radiolabeled Chemicals Inc.; St. Louis, USA, spezifische Aktivität 7 mCi/mmol) oder [¹⁴C]-Citrullin (siehe 2.8.3.). Markiert wurden das Protein HypE (durch Transcarbamoylierung und Dehydratisierung) oder der HypC × HypD Komplex (durch Transfer der ¹⁴CN-Gruppe).

2.8.5. Test auf ATP Hydrolyse mit α -markiertem ³²P-ATP

Um ATP-Hydrolyse qualitativ zu testen, wurde α -markiertes ³²P-ATP verwendet (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Radioaktivität wurde 1:100 mit kalter ATP-Stammlösung (1 mM) verdünnt. Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 100 μ l, die Reaktion fand bei 37°C statt. Als Matrix diente F-Puffer incl. BSA. Die Endkonzentration an ATP betrug 50 μ M, die Proteinkonzentrationen variierten. Nach 0, 15, 30 und 45 min wurden 1 μ l Proben entnommen und auf eine DC-Platte (Polyethyleniminplatten von Merck, Darmstadt) pipettiert. Als Kontrolle der spontan auftretende Hydrolyse diente eine Probe ohne Enzym. Nachdem alle Proben genommen waren, erfolgte die Auftrennung in 0.5 M KH₂PO₄ Puffer pH 3.4 für ca. 25 min. Die DC-Platten wurden für wenige Stunden oder über Nacht in der Expositionskassette (Phosphorscreen) gelagert und mit dem PhosphoImager ausgelesen.

2.8.6. Test auf ATP Hydrolyse mit γ -markiertem ³²P-ATP

Zur quantitativen Messung der ATP Hydrolyse wurde γ -markiertes [³²P]-ATP verwendet (Perkin Elmer; Rodgau-Jügesheim; spezifische Aktivität: 6000 Ci/mmol). Der Reaktionsansatz (Endvolumen: 100 μ l) enthielt F-Puffer incl. BSA und Enzyme in jeweils angegebener Menge. Die Reaktion fand bei 25 °C statt und wurde durch Zugabe von γ -[³²P]-ATP (verdünnt in kaltem ATP) gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 10 μ l Proben entnommen, mit 500 μ l 5%-iger Aktivkohle-Suspension (in 50 mM KH₂PO₄) gevortext (30 s) und auf Eis gelagert. Nachdem alle Proben genommen waren, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min (Tischzentrifuge). Vom Überstand wurden 100 μ l entnommen, zu 2.5 ml Szintillationsflüssigkeit (ULTIMA Gold™, Packard BioScience, Groningen, Niederlande) pipettiert und im ³²P-Kanal des Szintillationsgeräts (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2100TR; Canberra Packard GmbH, Dreieich) für je 5 min gemessen. Als Standard diente 1 μ l der Stammlösung.

2.8.7. Test auf GTP Hydrolyse mit γ -markiertem ^{32}P

Der Test auf GTP Hydrolyse erfolgte mit Hilfe der Freisetzung des ortho-Phosphats aus γ -[^{32}P]-ATP (Perkin Elmer; Rodgau-Jügesheim; spezifische Aktivität: 6000 Ci/mmol) und der Adsorption des nicht-hydrolysierten γ -[^{32}P]-ATP an Aktivkohle. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 500 μl . Pro Probe wurden 50 μl entnommen, mit 750 μl Aktivkohle-Suspension vermischt, zentrifugiert und 200 μl des Überstands wurden im Szintillationsgerät gemessen. Auf den Gebrauch von Glassfaserfiltern (Maier *et al.*, 1993) wurde verzichtet.

2.9. Bioinformatische Methoden

2.9.1. Bild- und Textverarbeitung

Zur Textverarbeitung wurde Microsoft Word 2000 und Microsoft Excel 2000 verwendet. Für Abbildungen kamen Microsoft PowerPoint 2000, Adobe Photoshop 5.5, Adobe Illustrator 8.0 und ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) zum Einsatz. Röntgenfilme von Westernblotanalysen und Coomassie-gefärbte Gele wurden mit einem Astra 4000U Scanner (Umax systems, Willich) eingelesen. DNA Sequenzen und Plasmid Konstruktionen wurden mit dem auf DOS-basierendem Programm CloneManager 4.0 (Scientific & Educational Software, Durham, NC, USA) durchgeführt.

2.9.2. Verwendete Datenbanken

Wichtige verwendete Datenbanken waren:

PubMed – Zitat/Literatur Datenbank (<http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>), Kodon-Datenbank (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), Sequenzvergleiche – BLAST von NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), Colibri – *E. coli* Datenbank (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/index.html>), Expasy, peptide mass – Bestimmung von Peptid Massen und Sequenzen nach Spaltung mit Lys-C oder Asp-N (<http://us.expasy.org/tools/peptide-mass.html>), PIMRider – (http://pim.hybrigenics.com/pimrider/V08/cdsviewer/PimRiderCDS_C.jsp), *H. pylori* Zwei-Hybrid Datenbank.

2.10. Sonstige Methoden

2.10.1. Bestimmung des UV-VIS Spektrums

UV-visible Spektren von gereinigten Proteinen wurden an einem Beckman DU[®]-640 Spectrophotometer gemessen.

2.10.2. Quantifizierung von säurelabilem Schwefel

Die Quantifizierung von säurelabilem Schwefel erfolgte nach der Methylenblaumethode nach Cline (Cline, 1969), die auch von A. Jacobi zum Nachweis von säurelabilem Schwefel in HypD verwendet wurde (Jacobi, 1994). Die Auswertung erfolgte durch Messung der Absorption bei 670 nm und Vergleich mit einer Standardgerade (0-25 nmol Sulfid).

2.10.3. Bestimmung von nicht-Häm Eisen

Die Bestimmung des nicht-Häm Eisens erfolgte kolorimetrisch als Nachweis eines Ferrozink-Komplexes (Absorption bei 562 nm). Der Versuch erfolgte wie im Original Protokoll beschrieben (Fish, 1988) mit kleinen Abweichungen im Reaktionsansatz (siehe hierzu Lyon *et al.*, 2004). Die Eichgerade wurde mit einer Eisen Stammlösung erstellt (1 g/l; Eisen Atom-spektroskopie-Standard-Konzentrat, Fluka, Neu-Ulm).

2.10.4. Eisen-Bestimmung mittels ICP-OES

Die Untersuchung der gereinigten Proteine auf Metalle erfolgte durch H. Hartl im Department Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Proben (jeweils 1 ml) wurden mit Salpetersäure (0.5 ml) und H₂O₂ (2 ml) versetzt, für 15 min in geschlossenen Gefäßen im Mikrowellengerät (350 Watt; max. 135 °C) erhitzt, mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt (1:10 Verdünnung) und anschließend auf vorhandene Metalle in einem Varian Vista ICP-OES (Varian, Inc. Palo Alto, CA, USA) untersucht. Der verwendete Dialysepuffer als Kontrolle sowie eine Eichlösung (ICP-Mehrelementstandardlösung VIII, Merck, Darmstadt; Bestimmung des Wiederfindungswertes) wurden stets mitgemessen.

2.10.5. EPR und Mössbauer Spektroskopie

Die EPR und Mössbauer Messungen wurden von B. F. Matzanke am Isotopenlabor des Instituts für Biochemie der Universität zu Lübeck durchgeführt.

Die Mössbauer-Spektren der ⁵⁷Fe-angereicherten, gefrorenen Proben wurden in der horizontalen Transmissionsgeometrie mit Hilfe eines Spektrometers mit konstanter Beschleunigung aufgenommen, das mit einem 512 Kanal Detektor verbunden war. Die in Rh-Folie eingebettete Strahlenquellen hatte eine Aktivität von 0.93 GBq [⁵⁷Co] (Cyclotron Co Ltd, Obninsk, Russland) und befand sich bei Raumtemperatur. Das Spektrometer wurde gegen eine metallische α -Eisenfolie bei Raumtemperatur kalibriert und ergab eine Standard Linienbreite von 0.24 mm \times s⁻¹. Der Mössbauer Kryostat wurde durch Helium gekühlt

(MD306, Oxford Instruments). Durch einen permanenten Magneten wurde am Ende des Kryostaten ein geringes Feld von 20 mT senkrecht zum γ -Strahl angelegt (B. F. Matzanke; persönliche Mitteilung).

2.10.6. Fluoreszenzmarkierung und Massenspektrometrie

Dieser Versuchsteil wurde in Kooperation mit E. Hochleitner (AG Lottspeich, Proteinanalytik, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Zur Bestimmung der Stöchiometrie des HypC-Strep \times HypD Komplexes wurde dieser aus einem 10%-igen nicht-denaturierenden Gel ausgeschnitten, mit Lys-C (1 μ g Endopeptidase in 50 mM Ammonium Bicarbonat Puffer) bei 37 °C über Nacht gespalten und die Peptide mit 10 μ l Acetonitril, 10 μ l 10%-iger Ameisensäure und erneut mit 10 μ l Acetonitril eluiert. Die Probe wurde anschließend in einer SpeedVac auf ca. 10 μ l aufkonzentriert und die enthaltenen Peptide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Hochleitner *et al.*, 2004). Es folgte die Auftrennung der Peptide bei 30 °C durch HPLC (Hewlett Packard 1100 HPLC system, Wilmington, DL), an welche ein automatischer Probennehmer und ein Fluoreszenzdetektor angeschlossen waren. Als Säule diente eine „MicroCART 150-1 reversed phase C-19 Column“ von Merck (Darmstadt). Zur Elution wurde ein linearer Gradient zwischen zwei Puffern (HPLC-Puffer A: 0.1% TFA (v/v) und HPLC-Puffer B: 0.09% TFA (v/v), 10 % Wasser und 90 % Acetonitril) angelegt; dieser lief über 90 min von 10 bis 70 % HPLC-Puffer B. Dabei wurde ein Fluoreszenz-Chromatogramm (Anregungswellenlänge: 250 nm, Emissionswellenlänge: 395 nm) erstellt. Die gesammelten Fraktionen wurden durch Massenspektrometrie an einem 4700 Proteomics Analyser von Applied Biosystems (Framingham, MA) analysiert und HypC-Strep oder HypD zugeordnet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals der markierten Peptide ist proportional zur Stöchiometrie der beiden Proteine HypC-Strep und HypD im Komplex. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Peptide komplett aus dem Gel eluiert wurden und es nicht zum Verlust während der Aufkonzentrierung kam (E. Hochleitner; persönliche Mitteilung).

ERGEBNISSE

1. Funktion des HypA- / HybF-Proteins beim Einbau von Nickel

Der Metalleinbau in die [NiFe]-Hydrogenasen erfolgt in zwei Schritten: (i) Eisen und seine Nicht-Protein-Liganden CO und CN werden in den Hydrogenase-Vorläufer eingefügt und (ii) die Insertion von Nickel vervollständigt das aktive Zentrum. Es ist bekannt, dass die Proteine HypA und HypB den Nickeleinbau katalysieren (Maier *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 2001; Hube *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2003). Für HypB war gezeigt worden, dass seine Funktion durch hohe Nickelkonzentrationen im Medium (0.6 mM) ersetzt werden kann (Waugh und Boxer, 1986). Eine solche phänotypische Suppression wurde auch für einen $\Delta hypA$ Stamm von *H. pylori* (Olson *et al.*, 2001) und einen HypA/HybF-negativen Stamm von *E. coli* gezeigt (Hube *et al.*, 2002). Auf welche Weise HypA bzw. das homologe HybF-Protein am Nickeleinbau beteiligt sind, sollte nun in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1. Analyse von Varianten des HybF-Strep-Proteins

Die Aminosäuresequenz von HybF weist konservierte Motive auf, die an einer Nickelbindung beteiligt sein könnten. Eines davon liegt am N-Terminus ($M^1H^2E^3$) und ein weiteres Motiv, nämlich $C^{73}X_2C^{76}X_{12-13}C^{89}X_2C^{92}$, im C-terminalen Bereich. In der Diplomarbeit von M. Hube waren bereits einige Aminosäuren ausgetauscht und die entsprechenden Varianten auf ihre *in vivo* Funktion getestet worden (Hube, 2002).

Weitere Aminosäuren wurden nun in dieser Arbeit in HybF durch ortsspezifische Mutagenese ausgetauscht. Dies geschah durch inverse PCR (Ochman *et al.*, 1988; Ansaldi *et al.*, 1996) mit Plasmid pBHBF-Strep als Matrize (Hube *et al.*, 2002). Die überlappenden Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüften Plasmide waren pBHBF-Strep[C73A], pBHBF-Strep[C76A], pBHBF-Strep[C73/76A] und pBHBF-Strep[C92A]. Diese Plasmide wurden in den Stamm DPABF (Hube *et al.*, 2002) eingebracht und die Transformanten anschließend über Gastests, Westernblotanalysen und Aktivitätsfärbungen auf die *in vivo* Funktion der veränderten HybF-Strep-Proteine untersucht (Abb. 8). Da die im Vollmedium vorliegenden Nickelkonzentrationen die Funktion von HypA/HybF ausgleichen können, wurden den anaeroben Kulturen 50 μ M EDTA zugesetzt.

Abbildung 9 zeigt, dass Transformanten mit ausgetauschten Cystein-Resten zwar einen geringeren Gehalt des entsprechenden Proteins besitzen (Abb. 9A), jedoch trotzdem prozessierte und aktive Hydrogenase 2 bilden, wobei die Transformanten mit HybF-Strep[C73A] und HybF-Strep[C73/76A] nur in geringem Maße zur Prozessierung von HybC fähig sind (Abb. 9 B).

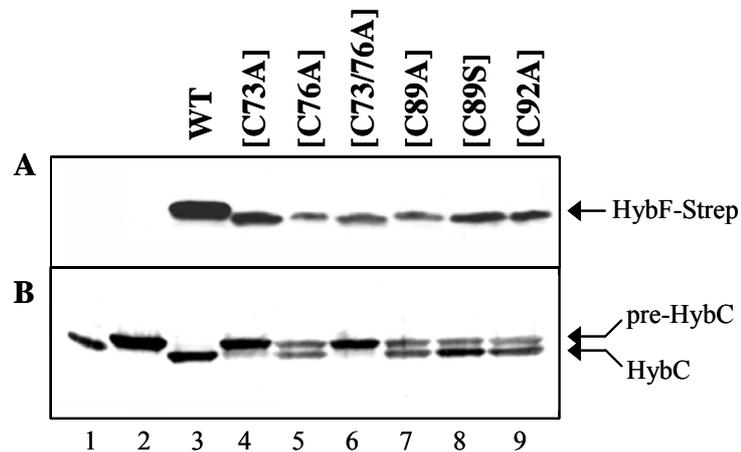


Abbildung 9: Zelluläre Menge und Funktion der HybF-Strep-Varianten. Lysate von ganzen Zellen (0.15 OD₆₀₀-Einheiten) des Stammes DPABF und entsprechenden Transformanten wurde durch Immunoblotanalyse untersucht. (A) Die Menge der Protein-Varianten wurde mittels Antikörper gegen den C-terminalen *Strep*-tagII[®] bestimmt. (B) zeigt die Prozessierung der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 (HybC) mit Hilfe von α -HybC Antiserum. Die Positionen des Vorläufer Proteins (pre-HybC) und der reifen Untereinheit sind durch Pfeile gekennzeichnet. Spur 1: MC4100, Spur 2: DPABF, Spur 3: DPABF/pBHBF-Strep, Spuren 4 bis 9: DPABF/pBHBF-Strep-Varianten (siehe Angaben über der Abbildung).

Die Gasproduktion, die Prozessierung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 (HycE) und die Aktivitätsfärbung der Hydrogenasen 1 und 2 in nicht-denaturierenden SDS-Gelen ergaben identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt; Blokesch *et al.*, 2004b).

1.2. *In vitro* Reifung der Hydrogenasen in Abhängigkeit von HypA bzw. HybF

Ansätze zur Analyse der *in vitro* Reifung der Hydrogenasen von *E. coli* wurden bereits beschrieben (Rossmann *et al.*, 1994; Maier und Böck, 1996a; Magalon *et al.*, 2001). Dabei wurde hauptsächlich die Prozessierung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 (HycE) über Westernblotanalysen untersucht. Geringe Mengen reifer Hydrogenase (ca. < 10% Prozessierung) können damit jedoch nicht detektiert werden. Die Sensitivität wurde durch Verwendung von Aktivitätsfärbungen in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen, besser noch in nicht-denaturierenden SDS-Gelen, erhöht. Ein Nachteil hierbei ist zwar, dass

Hydrogenase 3 nicht detektiert werden kann, da HybF aber hauptsächlich an der Reifung von Hydrogenase 1 und 2 beteiligt ist (Hube *et al.*, 2002), stellte dies kein Problem dar.

Als erstes sollte untersucht werden, ob die meist anhand von Extrakten aus Nickel defizienten Zellen durchgeführte *in vitro* Reifung von den Proteinen HypA/HybF und HypB katalysiert wird oder rein chemisch abläuft. Hierzu erfolgte die Anzucht der Stämme DHP-B ($\Delta hypB$), DPABF (*hypA*, $\Delta hybF$) und NIM (*hypA*, $\Delta hypB$, $\Delta hybF$) unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von 50 μ M EDTA und mit Glycerin/Fumarat als Energiequelle. Die S13-Extrakte wurden bei der angegebenen Nickelkonzentration bei 30°C 2 h lang inkubiert und die Aktivität der Hydrogenasen 1 und 2 durch nicht-denaturierenden SDS-PAGE und Aktivitätsfärbung detektiert (Abb. 10).

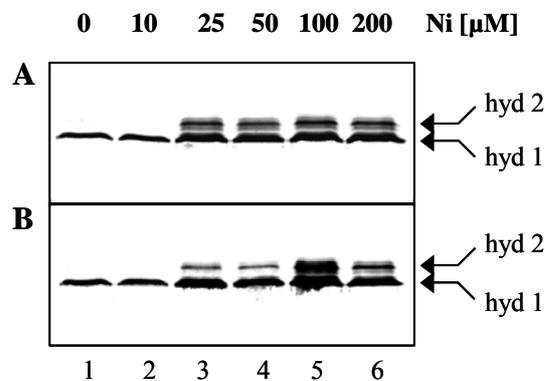


Abbildung 10: Aktivität der Hydrogenase 1 und 2 nach *in vitro* Reifung. Zellextrakte der Stämme DHP-B ($\Delta hypB$) (A) und NIM (*hypA*, $\Delta hypB$, $\Delta hybF$) (B) wurden der *in vitro* Reifung in Anwesenheit der angegebenen Nickelkonzentrationen unterzogen. Die Aktivitäten der Hydrogenasen 1 und 2 wurde durch Aktivitätsfärbung in nicht-denaturierenden SDS-Gelen sichtbar gemacht und durch Pfeile gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 10 zu sehen, ist die *in vitro* Reifbarkeit von Hydrogenase 1 und 2 in Anwesenheit von HypA/HybF (Abb. 10A) und in deren Abwesenheit (Abb. 10B) identisch. Auch Vergleiche der *in vitro* Reifung mit und ohne HypB (von den Stämmen DPABF und NIM) oder mit HypA, HybF plus HypB in Extrakten von Nickeltransport-Mutanten (Hyd723), brachten keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Demnach ist die *in vitro* Reifung unabhängig von HypA/HybF und HypB. Dass ein Vergleich der *in vitro* Nickelkonzentration zu früher durchgeführten Versuchen kaum möglich ist (Maier und Böck, 1996a; Magalon *et al.*, 2001), zeigte sich in Ansätzen mit verschiedenen DTT-Konzentrationen. Es wurde gefunden, dass DTT die vorhandenen Nickelionen komplexiert und sie somit dem Einbau in die Hydrogenasen entzieht (Daten nicht gezeigt; Blokesch *et al.*, 2004b). In den hier beschriebenen Versuchen wurde deshalb kein DTT zugesetzt.

1.3. Reinigung des HybF-Strep- und HybF-Strep[H2Q]-Proteins

Um Nickelbindung *in vitro* nachweisen zu können, wurde HybF-Strep-Protein des Wildtyps und der [H2Q]-Variante gereinigt. Da ein Großteil des überproduzierten HybF-Strep-Proteins in unlöslicher Form vorlag, wurden die anaeroben Anzuchtbedingungen der Transformante BL21(DE3)/pT-hybFStrep optimiert. Die Reinigung erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben. Den Reinigungspuffern wurde kein DTT zugesetzt. Die Ausbeute aus 28 g Zellnassgewicht lag bei 1 mg HybF-Strep-Protein.

Anhand mehrerer Eichläufe an der Superdex-75-Säule konnte das Laufverhalten von HybF-Strep einem Monomer zugeschrieben werden (Daten nicht gezeigt; Blokesch *et al.*, 2004b). Da das HypA-Protein aus *H. pylori* (Mehta *et al.*, 2003) ein Dimer ist, sollte untersucht werden, ob HybF-Strep in Anwesenheit von Nickel dimerisiert. Dazu wurde gereinigtes HybF-Strep-Protein in Gegenwart und Abwesenheit von Nickel (2 mM bzw. 250 μ M) inkubiert und anschließend einer Gelfiltration unterzogen. Für die mit Nickel inkubierten Proben wurde dem Elutionspuffer ebenfalls 100 μ M NiCl₂ zugefügt. Auch hier lag das HybF-Strep-Protein jedoch als Monomer vor (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigung der HybF-Strep[H2Q]-Variante erfolgte unter gleichen Bedingungen wie für das Wildtyp-Protein beschrieben; in der Gelfiltration wurde sie ebenfalls als Monomer eluiert (Daten nicht gezeigt). Die Reinigung der HybF-Strep-Varianten HybF-Strep[C73A], HybF-Strep[C73/76A], HybF-Strep[C89A] und HybF-Strep[C89S] war aufgrund der Unlöslichkeit dieser Proteine nach ihrer Überproduktion nicht möglich.

1.4. Metallgehalt von und Nickelbindung durch HybF-Strep

Die gereinigten HybF-Strep- und HybF-Strep[H2Q]-Proteine (aus anaerober und aerober Anzucht) wurden von H. Hartl am Department Chemie der LMU München auf die Anwesenheit von Metallen untersucht. Dies geschah durch ICP-OES wie im Material und Methoden-Teil beschrieben. Dabei ergaben sich die in Tabelle 5 angegebenen Werte.

Sie zeigen, dass weder HybF-Strep noch die Variante HybF-Strep[H2Q] Nickel enthalten. Hierbei war kein Unterschied zwischen gereinigten HybF-Strep-Proteinen aus anaerob in Gegenwart von 5 μ M NiCl₂ oder aerob angezogenen Kulturen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Es wurde jedoch Zink in stöchiometrischen Mengen gefunden.

TABELLE 5: Metallgehalt von gereinigtem HybF-Strep-Protein des Wildtyps und der [H2Q]-Variante

	Fe*	Zn*	Ni*
HybF-Strep	0.0	1.0 ± 0.1	0.0
HybF-Strep[H2Q]	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.0

* berechnet als Anzahl der Metallionen pro HybF-Strep Monomer. Werte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung dar.

Da die Ergebnisse von Hube *et al.* (2002) und Studien an *H. pylori* (Olson *et al.*, 2001; Mehta *et al.*, 2003) darauf hingewiesen hatten, dass HypA/HybF am Nickeleinbau beteiligt ist, wurde die Nickelbindung der gereinigten Proteine *in vitro* untersucht. Hierzu wurde gereinigtes HybF-Strep bzw. HybF-Strep[H2Q] gegen 10 µM NiCl₂-enthaltenden Puffer (100 mM Tris/Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl) für 6 h dialysiert. Um freies Nickel zu entfernen, erfolgte anschließend eine 24-stündige Dialyse gegen Puffer ohne Nickel, wobei der Puffer fünf mal gewechselt wurde. Als Kontrolle diente ein Teil der gleichen Proteinpräparation ohne vorhergehende Dialyse gegen nickelenthaltenden Puffer. Die so behandelten Proteinlösungen wurden durch ICP-OES untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

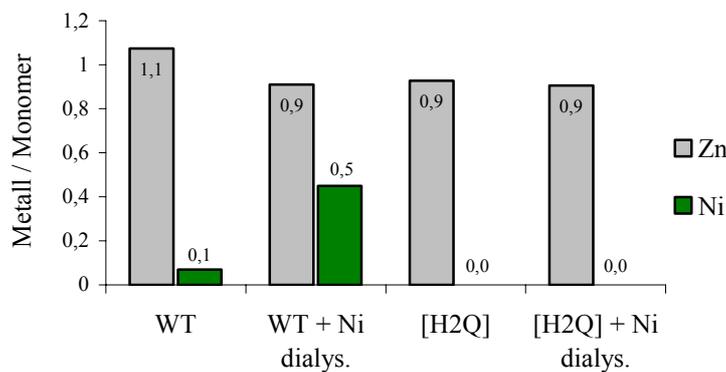


Abbildung 11: Metallgehalt von HybF-Strep und HybF-Strep[H2Q] nach Dialyse gegen Nickel. Die gemessenen Zink- und Nickelkonzentrationen wurden auf die Proteinkonzentration bezogen und sind im Diagramm als Anzahl der gebundenen Metallionen pro Monomer angegeben.

Die Ergebnisse dieses Experimentes deuten darauf hin, dass HybF-Strep, unabhängig vom enthaltenen Zink, auch zur Nickelbindung fähig ist. HybF-Strep[H2Q] hatte Zink gebunden, jedoch kein Nickel.

Da für die ICP-Messungen große Mengen an Proteinlösung notwendig waren, die Ausbeute pro Reinigung jedoch immer sehr gering ausfiel, wurde eine alternative Methode zur Bestimmung der Nickelbindung entwickelt, nämlich Filterbindung mit ^{63}Ni . Hierzu wurden die Proteine mit ^{63}Ni inkubiert, freies Nickel wurde durch Filtration entfernt und die Radioaktivität der auf den Nitrocellulosefilter gebundenen Proteine im Szintillationsgerät gemessen. Um festzustellen, ob eine Substratsättigung möglich ist, wurde das HybF-Strep- bzw. das HybF-Strep[H2Q]-Protein mit steigenden Nickelkonzentrationen inkubiert. In diesem Versuch wurde eine spezifische Bindung von Nickel durch das HybF-Strep-Protein beobachtet (Abb. 12). Die [H2Q]-Variante zeigte geringere Nickelbindung, die in verschiedenen Experimenten stark variierte und auf unspezifische Bindung hindeutet (Abb. 12).

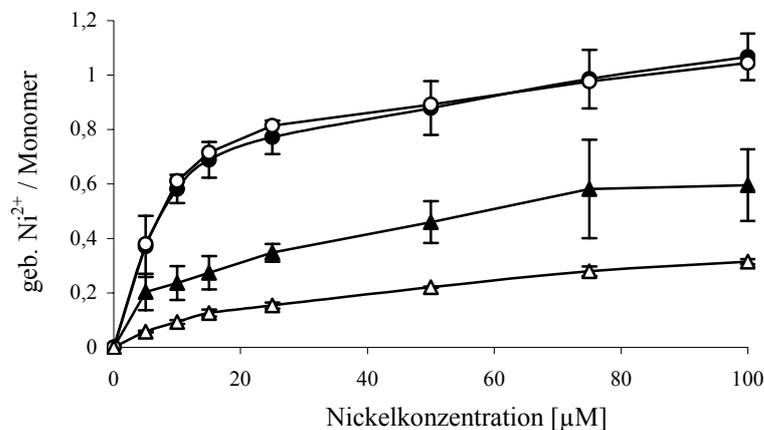


Abbildung 12: Bindung von ^{63}Ni durch HybF-Strep und HybF-Strep[H2Q] in Filterbindungsversuchen. Nickelbindung von HybF-Strep (● und ○) und HybF-Strep[H2Q] (▲ und △). Offene Symbole: 25 μM ZnCl_2 war zusätzlich im Reaktionsansatz vorhanden. Werte stellen den Durchschnitt aus mindestens drei Versuchen \pm Standardabweichung dar.

Die entsprechende Scatchard-Darstellung der Bindeeigenschaften des HybF-Strep-Proteins ergab eine Dissoziationskonstante (K_D) von 1.87 μM und eine maximale Bindung von 0.87 Nickel pro Monomer (Daten nicht gezeigt; Blokesch *et al.*, 2004b). Um zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung unterscheiden zu können, wurde der gleiche Versuch in Anwesenheit von Zink als Kompetitor durchgeführt (Abb. 12). Die Nickelbindung des Wildtyp HybF-Strep-Proteins änderte sich dabei nicht, wohingegen sich die Nickelbindung durch HybF-Strep[H2Q] verringerte, was als Hinweis für unspezifische Bindung gewertet werden kann.

2. Das HypD Protein

Nach der Identifizierung von HypA bzw. HybF (und HypB) als Komponenten des Nickel-Einbausystems, sollte als nächstes der Funktion des Proteins HypD nachgegangen werden. Reinigungsmethoden wurden bisher von A. Jacobi (Jacobi, 1994) und N. Drapal (Drapal, 1998) beschrieben, und es wurde gezeigt, dass ca. vier Eisenatome pro HypD-Monomer gebunden vorliegen. EPR-Messungen in Zusammenarbeit mit S. P. J. Albracht vom Swammerdam Institut für Life Science in Amsterdam hatten ergeben, dass ein in stark unterstöchiometrischem Maße vorkommendes $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster vorhanden ist (Drapal, 1998).

2.1. Die Sequenz von HypD

HypD besteht aus 373 Aminosäuren (41.4 kDa; Wilkins *et al.*, 1997). Die konservierten Motive sind in Abbildung 13 dargestellt.

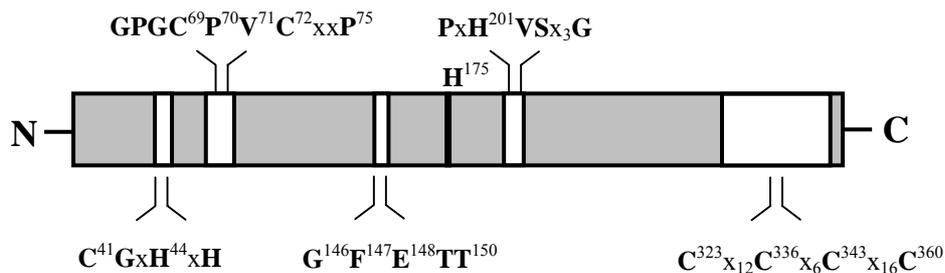


Abbildung 13: Schematische Darstellung des HypD-Proteins. Sequenz des HypD-Proteins mit Hervorhebung der konservierten Aminosäurenreste und Motive. Aminosäuren, die im Lauf dieser Arbeit ausgetauscht wurden, sind durch Zahlen gekennzeichnet.

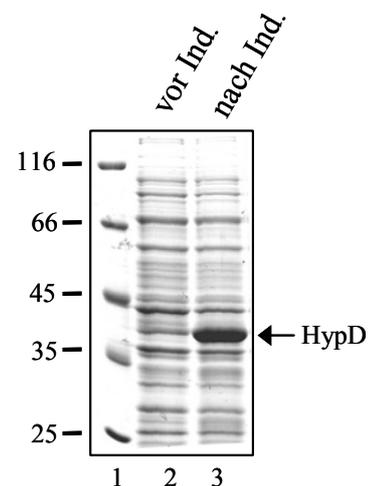
Die HypD Sequenz enthält keines der für andere Eisen-Schwefel-Proteine typischen Motive, wie z.B. das $\text{Cx}_2\text{Cx}_2\text{Cx}_3\text{CP}$ Motiv in bakteriellen Ferredoxinen oder Variationen hiervon (Adman *et al.*, 1973; Gennis und Stewart, 1996; Sticht und Rösch, 1998). Da in gereinigtem HypD-Protein aber sowohl Eisen als auch säure-labiler Schwefel gefunden wurde, ging man davon aus, dass dennoch ein Eisen-Schwefel-Cluster vorliegt (Jacobi, 1994; Drapal, 1998). Aus Sequenzvergleichen mit HypD Proteinen aus anderen Organismen (Bakterien und Archaea; siehe Anhang AI.) stellten sich die Cysteine des $\text{Cx}_{12}\text{Cx}_6\text{Cx}_{16}\text{C}$ Motiv im C-terminalen Teil des Proteins als potentielle Liganden des FeS-Clusters heraus. Dies sollte durch ortsspezifische Mutagenese bestätigt werden. Das im N-terminalen Bereich vorkommende Motiv CGxHxH könnte an einer Metallbindung beteiligt sein. Das GFETT Motiv kommt in ähnlicher Form auch in anderen Proteinen vor, wie dem Cytochrom P450 (GFETx)

oder der β -Untereinheit der Nitrogenase in *W. succinogenes* (als LGFExTMP). Eine spezielle Funktion dieses Motivs ist allerdings nicht bekannt. Das Motiv GPGCPVC kommt in abgewandelter Form im Glutaredoxin 1 (GrxA; xxGCPxC), in einem Protein der Synthese von Thiamin (ThiF; xxGCPVC) und in einer Komponente der Molybdopterin-Synthese (MoeB; xPGCxVC) in *E. coli* vor. Für das MoeB Protein wurde gezeigt, dass es zur Bindung von Zink notwendig ist (Leimkühler *et al.*, 2001).

2.2. Überproduktion und Löslichkeit

Genauere Untersuchungen des Eisen-Schwefel-Clusters von HypD sollten in Zusammenarbeit mit B. F. Matzanke mittels Mössbauermessungen an ganzen Zellen durchgeführt werden. Hierzu musste HypD in großer Menge in den Zellen vorliegen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Überproduktion optimiert. Da die in der Transformante BL21(DE3)/pJA203 (Lutz *et al.*, 1991) durchgeführte Überexpression nur gering ausfiel, wurde ein neues Überexpressionsplasmid konstruiert. Hierzu wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden pT7-hypDStart und Tet-inv+EcoRI und dem Plasmid pJA103 als Matrize durchgeführt. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit *EcoRI* und *NdeI* geschnitten und mit dem ebenfalls mit *EcoRI/NdeI*-geschnittenen pT7-7 Vektor ligiert. Die Richtigkeit des pT7hypD-Plasmids wurde durch Kolonie-PCR und Sequenzierung bestätigt. Nach Transformation des Stammes BL21(DE3) erfolgte die Überexpression aerob in LB-Medium bei 37°C. Die Induktion erfolgte mit 0.5 mM IPTG für zwei Stunden (Abb. 14).

Abbildung 14: Überproduktion des HypD Proteins. Die Überproduktion erfolgte aerob in der Transformante BL21(DE3)/pT7hypD. Die Proteine wurden im 10%-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Spur 1: Markerproteine, Spur 2: Zell-Lysate (0.1 OD₆₀₀-Einheiten) vor Induktion, Spur 3: Zell-Lysate (0.1 OD₆₀₀-Einheiten) nach Induktion mit 0.5 mM IPTG.



Wie in Abbildung 14 gezeigt, kam es zur starken Überproduktion des HypD-Proteins. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Protein fast vollständig in unlöslicher Form vorlag.

Als nächstes wurden deswegen die Überexpressionsbedingungen (Konzentration von IPTG, Induktionsdauer, Wachstumstemperatur, anaerobe und aerobe Wachstumsbedingun-

gen) verändert. Der Anteil an löslichem HypD-Protein lag dabei jedoch stets nur bei etwa 20%. Die Anzucht in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol brachte ebenfalls keine erhöhte Ausbeute an löslichem HypD. Auch die Überlegung, das *isc* Operon (*iscSUAhscBAfdx*; siehe Einleitung) koezuexprimieren, eine bei anderen Eisen-Schwefel-Proteinen erfolgreiche Methode (Nakamura *et al.*, 1999; Frazzon und Dean, 2003), wurde wieder verworfen, da es die Ergebnisse der Mössbauermessungen an ganzen Zellen verfälschen könnte. Da zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt war, dass HypD *in vivo* einen Komplex mit dem HypC-Protein eingeht (siehe unten), war die nächste Idee das *hypC* Gen koezuexprimieren. Hierzu wurde das Plasmid pT-hypDC mit einer Art artifiziellem Operon aus den Genen *hypD* und *hypC* entworfen. Dies geschah durch PCR mit den phosphorylierten Primern pT77 seq. und HypC-2 (Drapal, 1998) und Plasmid pTC-9 als DNA-Vorlage. Das resultierende PCR-Fragment wurde mit dem *SmaI* geschnittenem pT7hypD Vektor ligiert. Die Orientierung des Inserts wurde durch Kolonie-PCR überprüft und die fehlerfreie DNA-Vervielfältigung in der PCR durch Sequenzierung bestätigt. Parallel hierzu wurde das Plasmid pT-hypDCStrep hergestellt (mit den phosphorylierten Primern pT77 seq. & HypCStrepII und pTC-9 als Matrize). Der Test auf Überexpression erfolgte zunächst in der Transformante BL21(DE3)/pT-hypDC unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Die Überproduktion des HypD-Proteins war im Vergleich zur Transformante BL21(DE3)/pT7hypD unverändert, jedoch lag ein Großteil davon in löslicher Form vor. Nach erneuter Optimierung der Wachstumsbedingungen, konnte die Löslichkeit des HypD Proteins auf über 60-70 % gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

2.3. Reinigung von Strep-HypD

Die bisher beschriebenen Reinigungsmethoden von HypD erfolgten durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (30-40%) und Abtrennung verunreinigender Proteine durch drei Säulenschritte (Q Sepharose Säule; Phenyl Superose und Superdex-75; Jacobi, 1994; Drapal, 1998). Da das HypD-Protein ein sauerstoffempfindliches FeS-Cluster enthält, sollte eine schnellere Prozedur entwickelt werden. Hierzu wurde der *Strep-tagII*[®] (IBA GmbH, Göttingen) N-terminal an HypD fusioniert. Das Plasmid pIBA5-hypD wurde dazu folgendermaßen kloniert: (a) PCR des *hypD* Gens von Plasmid pJA103 mit den Primern IBA5-hypDup und IBA5-hypDdown; (b) schneiden des PCR-Fragments mit *BsaI* und (c) Ligation mit dem *BsaI*-geschnittenen Vektor pASK-IBA5 (IBA GmbH). Die Richtigkeit wurde durch Kolonie-PCR (Primer IBA5Strepup und IBA5-hypDdown) und Sequenzierung bestätigt. Das durch pIBA5-hypD kodierte Strep-HypD-Protein war *in vivo* im DHP-D Stamm aktiv, was durch starke Gasproduktion der Hydrogenase 3 gezeigt wurde.

Zur Reinigung von Strep-HypD erfolgte die Überexpression aerob, da die Expression unter anaeroben Bedingungen unzureichend war. Überproduktion und Reinigung sind im Material und Methoden-Teil beschrieben und in Abbildung 15 dargestellt.

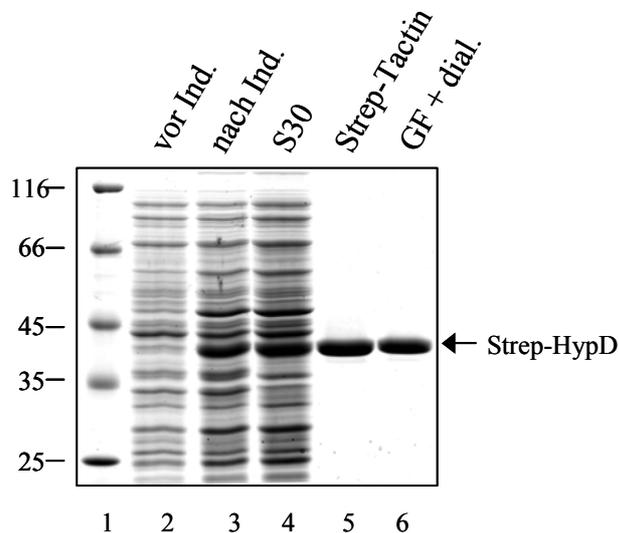


Abbildung 15: Überproduktion und Reinigung des Strep-HypD-Proteins.

Die Überproduktion erfolgte aerob in der Transformante DH5 α /pIBA5-hypD. Spur 1: Markerproteine, Spur 2: Zell-Lysate (0.08 OD₆₀₀-Einheiten) vor Induktion, Spur 3: Zell-Lysate (0.08 OD₆₀₀-Einheiten) nach Induktion mit 0.2 μ g/ml AHT, Spur 4: S30-Extrakt, Spur 5: vereinte Fraktionen nach der *Strep*-Tactin-Säule, Spur 6: Strep-HypD Protein nach der Gelfiltration (GF) und Dialyse. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt.

Wie auch für das FNR Protein beschrieben, war das gereinigte Strep-HypD Protein gelb bis grünlich-gelb (konzentrierte Lösung; Khoroshilova *et al.*, 1997). Nach Lagerung unter aeroben Bedingung verlor es die Farbe und somit vermutlich das Eisen-Schwefel-Cluster.

Gereinigtes Strep-HypD Protein zeigte keine ATP- oder GTP-Hydrolyse (getestet mit α -markiertem [³²P]-ATP und γ -markiertem [³²P]-GTP; Daten nicht gezeigt).

2.4. Bestimmung von Eisen und säurelabilem Schwefel

Eine nahe liegende Methode Eisen-Schwefel-Cluster nachzuweisen besteht in der Bestimmung von Eisen (als nicht-Häm Eisen) und säurelabilen Schwefel. Die dabei erhaltenen Werte sind durch kumulative Mess-Ungenauigkeiten bei der Analyse des Eisens, des Sulfids, der Proteinkonzentration, der Bestimmung der molekularen Masse und möglichen Verunreinigungen der Proteinpräparation jedoch nicht immer verlässlich (Cammack, 1992b). Diese Caveats berücksichtigend wurde der Eisengehalt von Strep-HypD durch ICP-OES und nach der Methode von Fish (1988) bestimmt. Die Ermittlung des säurelabilen Schwefels erfolgte nach der Methode von Cline (1969). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

TABELLE 6: Eisen- und säurelabiler Schwefelgehalt der gereinigten Proteine HypD, Strep-HypD und zweier Strep-HypD-Varianten

	Fe*	Säurelabiler Schwefel
HypD ⁽³⁾	3.8 ⁽¹⁾	3.9
Strep-HypD	4.2 ⁽²⁾	4.4 ± 0.6
Strep-HypD[C41A]	4.3 ⁽²⁾	3.6 ± 0.6
Strep-HypD[C72A]	2.9 ⁽²⁾	2.7 ± 0.9

* gemessen durch (1) AAS und (2) ICP-OES
 (3) Die Daten des WT-HypD Proteins dienen zum Vergleich (Jacobi, 1994)

Das Strep-HypD-Protein scheint somit den gleichen Gehalt an Eisen und säurelabilem Schwefel wie das WT-HypD-Protein aufzuweisen. Auf die in Tabelle 6 ebenfalls enthaltenen Werte der Varianten Strep-HypD[C41A] und Strep-HypD[C72A] wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit eingegangen.

2.5. UV-VIS Spektrum von Strep-HypD

Gereinigtes Strep-HypD-Protein zeigte eine gelbliche Färbung. Das aufgenommene UV-VIS-Spektrum der Strep-HypD-Lösung ist in Abbildung 16 dargestellt.

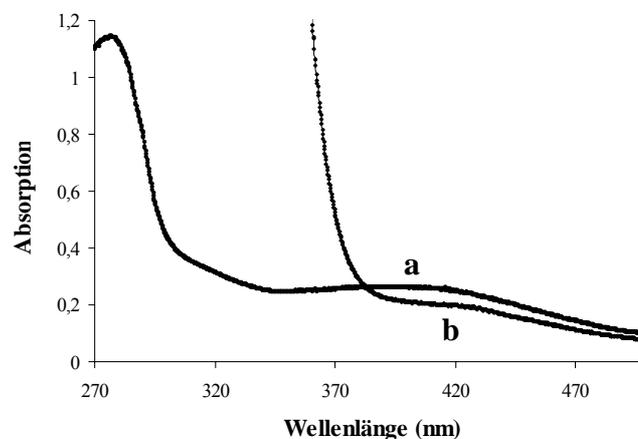


Abbildung 16. UV-VIS Absorptionsspektrum von gereinigtem Strep-HypD. Strep-HypD Proteinlösung (41 µM) vor (a) und nach Behandlung mit 20 mM Dithionit (b).

Das Spektrum zeigt ein flaches, für $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster charakteristisches Absorptionsmaximum nahe 400 nm (Sweeney und Rabinowitz, 1980). Inkubation der Strep-HypD-Proteinlösung mit 500-fachem Dithionit-Überschuss führten zur Verringerung der Absorptionsschulter (Abb. 16), wahrscheinlich aufgrund einer partiellen Reduktion des FeS-Clusters.

2.6. Anzuchten mit ^{57}Fe für Mössbauermessungen

Zur Durchführung von Mössbauermessungen muss ^{57}Fe in das Protein eingebaut werden. Hierzu wurde metallisches ^{57}Fe (45 mg) von Enola Ltd. (Riga, Litauen) in konzentrierter Salzsäure über sieben Tage hinweg gelöst, um eine 0.2 M $^{57}\text{FeCl}_2$ Lösung zu erhalten.

Für Mössbaueruntersuchungen an ganzen Zellen ist es nicht ratsam $^{57}\text{FeCl}_2$ zu verwenden, da sich unter diesen Bedingungen Eisenhydroxid-Präzipitate bilden, die intrazelluläre Eisen-Proteine maskieren. Um dies zu vermeiden wurde die Bindung des $^{57}\text{Eisens}$ an Citrat im molaren Verhältnis ^{57}Fe zu Citrat von 1/20 von B. F. Matzanke vorgeschlagen.

Für die Mössbauer-Spektroskopie von ganzen Zellen wurden die Transformanten BL21(DE3)/pT-hypDCStrep und der Stamm BL21(DE3) (als Kontrolle) aerob in TGYEP Medium ohne Hefeextrakt angezogen, um den Einbau des im Hefeextrakt natürlich vorkommenden Eisens zu vermeiden (B. F. Matzanke; persönliche Mitteilung). Die Anzucht geschah bei 37°C, Verlagerung der Zellen auf 16-22°C, Zugaben von $^{57}\text{Eisencitrat}$ (Endkonzentration des ^{57}Fe : 75 μM) und Induktion mit 0.5 mM IPTG für 12 h. Nach dem Ernten wurden die Zellen zweimal in 50 mM Tris/Cl Puffer pH 7.5 gewaschen, um freies $^{57}\text{Eisencitrat}$ zu entfernen. Das Zellsediment wurde in Mössbauertöpfchen transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Reinigung von ^{57}Fe -enthaltendem Strep-HypD wurden die DH5 α /pIBA5-hypD Zellen aerob in Medium aus 1.6 % Pepton aus Casein, 0.25 % Hefeextrakt und 0.5 % NaCl bei 37 °C angezogen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.9 wurden die Zellen auf 22-25°C verlagert und durch Zugabe von $^{57}\text{FeCl}_2$ (75 μM Endkonzentration) isotopisch angereichert. Aufgrund der stark sauren $^{57}\text{FeCl}_2$ -Lösung wurde zusätzlich 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 zugesetzt. Die Synthese von Strep-HypD wurde durch Zugabe von 0.2 $\mu\text{g/ml}$ AHT gestartet. Die Inkubation erfolgte für weitere 3,5 h, gefolgt vom Ernten der Zellen durch Zentrifugation bei 3000 \times g. Die Reinigung erfolgte wie für Strep-HypD beschrieben (siehe Material und Methoden und 2.3.)

2.7. Mössbauer und EPR Spektroskopie

Die Mössbauer Spektroskopie stellt eine exzellente Methode dar, um den Redoxstatus von Eisen zu bestimmen (Matzanke, 1991).

Das Mössbauer-Spektrum an ganzen HypD überproduzierenden Zellen wurde bei 77 K gemessen und enthielt drei Komponenten: Komponente I (ca. 12.7 % der gesamten Absorptionsfläche) entsprach oxidierten [2Fe-2S] or [3Fe-4S]-Clustern. Komponente II (ca. 49.4 % der gesamten Absorptionsfläche) wurde einem intrazellulärem Eisen (II)-pool zugeschrieben (Matzanke *et al.*, 1991; Böhnke und Matzanke, 1995). Die dritte Komponente wies Bacterioferritinen-ähnliche Mössbauerparameter auf (Matzanke, 1997). Daraus muss gefolgert werden, dass das HypD-Protein nicht in ausreichender Menge vorhanden war, um durch Mössbaueruntersuchungen an ganzen Zellen bestimmt zu werden.

Das Mössbauerspektrum von gereinigtem, ^{57}Fe -angereichertem Strep-HypD-Protein ist in Abbildung 17 gezeigt. Die Messung erfolgte bei 77 K; bei 4.3 K ergaben sich keine wesentlichen neuen Aussagen (B. F. Matzanke; persönliche Mitteilung).

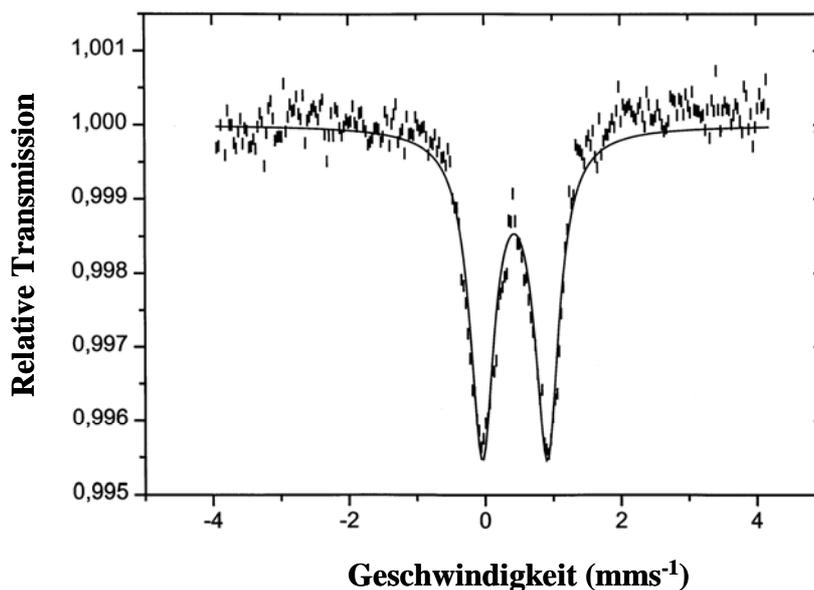


Abbildung 17: Mössbauer-Spektrum von gereinigtem Strep-HypD-Protein. Isoliertes Strep-HypD-Protein wurde in einem Feld von 20 mT senkrecht zum γ -Strahl bei 77 K gemessen. Die Probe stammte aus ^{57}Fe -angereicherten *E. coli*-Zellen. Folgende Mössbauer Parameter wurden ermittelt: $\delta = 0.43 (\pm 0.02) \text{ mms}^{-1}$, $\Delta E_Q = 0.95 (\pm 0.04) \text{ mms}^{-1}$, $\Gamma = 0.43 (\pm 0.04) \text{ mms}^{-1}$. Die Daten korrelieren gut mit einem $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ ($S=0$) System. Das Mössbauer Spektrum der gleichen Probe bei 4.3 K zeigte keine signifikanten Änderungen: $\delta = 0.44 (\pm 0.02) \text{ mms}^{-1}$, $\Delta E_Q = 1.05 (\pm 0.04) \text{ mms}^{-1}$, $\Gamma = 0.38 (\pm 0.04) \text{ mms}^{-1}$.

Die Mössbauer Parameter korrelieren mit Werten, die für [4Fe-4S]-Cluster der Oxidationsstufe +2 beschrieben wurden, d.h. zwei Fe²⁺- und zwei Fe³⁺-Ionen. Die Spins von je zwei Fe-Ionen waren gekoppelt, die Ladung verschmiert, wodurch zwei Spinpaare einer formalen Oxidationsstufe von 2.5+ resultierten. Die zwei Spinsysteme waren antiparallel gekoppelt mit einem Gesamtspin von 0. Somit kann im EPR kein Signal entdeckt werden. Tatsächlich war das EPR Spektrum der Proben „silent“ (Daten nicht gezeigt). Der Versuch das Strep-HypD-Protein der EPR-Probe mit Dithionit im leicht alkalischen pH-Bereich (pH 7.9) zu reduzieren blieb erfolglos (B. F. Matzanke; persönliche Mitteilung).

2.8. Aminosäureaustausche in HypD

Um festzustellen, ob die konservierten Aminosäuren bzw. Sequenzmotive im HypD-Protein (siehe Abb. 13) essentiell für die Reifung der Hydrogenasen sind, sollten diese ausgetauscht und die Funktion der veränderten Proteine getestet werden.

Zur Veränderung der Aminosäuresequenz wurde das *hypD* Gen durch inverse oder direkte PCR unter Verwendung von mutagenen Oligonukleotide (siehe Tabelle 4) ortsspezifisch verändert (pJA103 als Matrize) (Ochman *et al.*, 1988; Ansaldi *et al.*, 1996). Die zusätzlich eingefügten Restriktionsschnittstellen befanden sich an der Stelle der Punktmutation oder als stumme Mutationen in der Nähe hiervon. Zur Konstruktion der Varianten HypD[C69A], [C69S], [V71A] und [P75A] wurde eine direkte PCR durchgeführt, mit den Restriktionsschnittstellen *PstI* und *SmaI* an den 5'-Ende der Oligonukleotide. Als Ausgangsplasmid diente der „Klonierungsvektor“, der ebenfalls mit *PstI/SmaI* geschnitten und mit dem PCR-Fragment ligiert wurde. Auch für die HypD [G146A], [F147Y], [E148A], [E148Q] und [T150V]-Mutagenese wurde die direkte PCR eingesetzt. Die PCR-Fragmente wurden mit *SmaI/BstEII* geschnitten und mit dem *SmaI/BstEII* geschnittenem pJA103[C72A]-Plasmid ligiert, wodurch die kodierende Sequenz für den Austausch [C72A] entfernt wurde. Die mutierten, *hypD* Gene tragenden Plasmide (siehe Tabelle 2) wurden in den Stamm DHP-D gebracht und auf ihre *in vivo* Funktion getestet. Dies geschah durch Untersuchung der Prozessierung von Hydrogenase 2 (Daten nicht gezeigt) und 3 durch Westernblotanalyse, Nachweis der Hydrogenase-Aktivitäten in nicht-denaturierenden SDS-Gelen und durch Überschichtungstests von Kolonien sowie Wasserstoffbildung der Hydrogenase 3 (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde durch Westernblotanalysen die Proteinmenge der HypD-Varianten bestimmt und mit der für den Wildtyp charakteristischen Menge verglichen. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse zusammen.

TABELLE 7: Phänotypische und biochemische Eigenschaften von Transformanten mit mutierten *hypD* Allelen

Variante	Gasproduktion	Hydrogenase 1 und 2 Aktivität	Prozessierung von HycE	Zelluläre HypD-Proteinmenge
HypD	+++	+	++	hoch
HypD[C41A]	-	±/- (Hyd 1)	-	hoch
HypD[H44A]	++	n.g.	+	leicht verringert
HypD[C69A]	-	n.g.	-	leicht verringert
HypD[C69S]	-	n.g.	-	leicht verringert
HypD[P70A]	+++	+	+	hoch
HypD[V71A]	+++	n.g.	+	hoch
HypD[C72A]	-	-	-	hoch
HypD[P75A]	+++	n.g.	+	leicht verringert
HypD[G146A]	±	n.g.	+	leicht verringert
HypD[F147Y]	+	n.g.	+	hoch
HypD[E148A]	+	n.g.	+	leicht verringert
HypD[E148Q]	+	n.g.	++	leicht verringert
HypD[T150V]	+	n.g.	+	hoch
HypD[H175A]	-	-	-	nicht detektierbar
HypD[H201A]	++	+	+	hoch
HypD[C323A]	-	-	-	verringert
HypD[C336A]	-	-	-	verringert
HypD[C343A]	-	n.g.	-	verringert
HypD[C360S]	-	n.g.	-	nicht detektierbar

n.g. nicht getestet

Der Austausch der C-terminalen Cysteine (C323, C336, C343 und C360) führte zu einer geringen Proteinmenge, was wohl auf Instabilität der Proteine zurückzuführen ist. Die Variante HypD[C360S] konnte in Immunoblotanalysen nicht nachgewiesen werden. Dementsprechend konnte der DHP-D Stamm nicht komplementiert werden, und die veränderten Proteine führten weder zur Reifung noch zur Aktivität der Hydrogenasen. Die Mutante HypD[H175] wurde ebenfalls untersucht: auch hier war kein Protein nachweisbar, und somit keine Komplementation von DHP-D möglich. Die Austausche der Cysteine im GPGCPVC Motiv (C69 und C72) resultierte in normalen bzw. leicht reduzierten Proteinmengen, die jedoch nicht funktionsfähig waren. Das konservierte Cystein C41 schien ebenfalls für die Aktivität von HypD notwendig zu sein, wohingegen H44 ersetzbar war. Die meisten der

anderen Aminosäureaustausche, wie im GFETT Motiv oder konservierte Histidin- (H201) und Prolinreste (P70, P75) beeinflussten die Aktivität wenig oder gar nicht.

Um C-terminal verkürzte HypD-Proteine herzustellen, wurden die Plasmide pJA103 [S203STOP] und pJA103 [D317STOP] entworfen, die das HypD-Protein bis zu Aminosäure Serin 203 bzw. Aspartat 317 kodieren. Dies geschah durch PCR mit den Primern S203Stop bzw. D317Stop & HypDC41H44inv. und pJA103 als Matrize. Die PCR-Fragmente wurden mit *DraIII* geschnitten, mit dem *DraIII/NruI*-geschnittenem pJA103-Plasmid ligiert und auf Ihre Richtigkeit getestet (Kolonie-PCR und Sequenzierung). Da die verkürzten HypD-Proteine in Westernblotanalysen nicht nachgewiesen werden konnten (Instabilität der mRNA oder des Proteins), war die Komplementation des DHP-D Stammes nicht möglich.

2.9. Charakterisierung von Strep-HypD Varianten

Um Hinweise auf die Funktion von HypD zu erhalten, wurden einige der Varianten als *Strep*-TagII[®]-Fusion gereinigt. Hierzu wurden entsprechende DNA Abschnitte aus den pJA103[xx]-Plasmiden ausgeschnitten und an die korrespondierende Stelle des Plasmid pIBA5-hypD gebracht. Es resultierten die Plasmide pStrepD[C41A], [C69A], [C69S], [C72A], [G146A], [C323A] und pStrepD[C343A].

Die Reinigung der Strep-HypD-Varianten sollte wie für das Wildtyp-Protein beschrieben durchgeführt werden. Dies war nur für die Varianten [C41A] und [C72A] möglich, da alle anderen hochgradig unlöslich waren. Das UV-VIS Spektrum von Strep-HypD[C41A] unterschied sich nicht von dem des Wildtyp-Proteins (Daten nicht gezeigt). Nach den Ergebnissen der Eisen- und Schwefelanalysen (Tabelle 6) scheinen beide Varianten noch das FeS-Cluster zu enthalten. Die geringeren Werte für Strep-HypD[C72A] können an teilweise ungefaltetem Protein liegen (auch dieses Protein war schlecht löslich).

Um zu untersuchen ob HypD aus *Methanocaldococcus jannaschii* evtl. besser löslich und einfacher zu reinigen ist, wurde das *hypD* Gen durch PCR mit den Primern IBA5-hypDup-*M.j.* und IBA5-hypDdown-*M.j.* und chromosomaler DNA von *M. jannaschii* amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit *BsaI* geschnitten und mit dem *BsaI*-geschnittenen pASK-IBA5 Vektor ligiert (resultierendes Plasmid: pIBA-Mj-hypD). Die Komplementation des Stammes DHP-D gelang durch pIBA-Mj-hypD nicht. Strep-HypD_{*M.j.*} konnte schwach überproduziert und über *Strep*-Tactin[®] Sepharose isoliert werden. Dennoch war die Ausbeute zu gering, um weitere Versuche durchführen zu können (Daten nicht gezeigt). Ein Grund für die geringe Produktion des Strep-HypD_{*M.j.*} Proteins in *E. coli* liegt sicherlich an dem unterschiedlichen Kodon-Gebrauch beider Organismen.

3. Einfluß des Carbamoylphosphat-Mangels auf die Hydrogenase-Reifung

Arbeiten unserer Gruppe (Paschos *et al.*, 2001; Reissmann *et al.*, 2003) hatten gezeigt, dass Carbamoylphosphat das Edukt des diatomaren Liganden CN ist. Hinweise hierfür kamen von Untersuchungen an *E. coli* Mutanten mit defekter Carbamoylphosphat-Synthese (Jef-8, Δ CarAB) in denen die Reifung der Hydrogenasen blockiert war (Paschos *et al.*, 2001). Zuvor war nur bekannt gewesen, dass Carbamoylphosphat in *E. coli* für die Synthese von Arginin und Pyrimidinen benötigt wird (Übersichtsartikel: Cunin *et al.*, 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde der Δ CarAB Stamm ausgiebig untersucht, da erwartet wurde, dass sich unter Mangelbedingungen Reifungsintermediate anhäufen.

Zunächst wurde untersucht, ob im Δ CarAB Stamm Nickeleinbau in die Hydrogenasen erfolgt oder die Blockade der Reifung davor stattfindet. Zu diesem Zweck wurden die Stämme Δ CarAB und der Wildtyp MC4100 einer *in vivo* Markierung mit ^{63}Ni unterzogen. Die Hydrogenasen im Stamm Δ CarAB enthielten kein Nickel (Daten nicht gezeigt).

3.1. Citrullin Zufütterungsversuche

In der Δ CarAB Mutante liegen die großen Untereinheiten der Hydrogenasen 2 und 3 in unprozessierter Form vor. Das Fehlen der Carbamoylphosphat Synthetase kann durch Citrullin-Fütterung partiell kompensiert werden (Paschos *et al.*, 2001). Abbildung 18 zeigt die Kinetik der Reifung nach Zugabe von Citrullin.

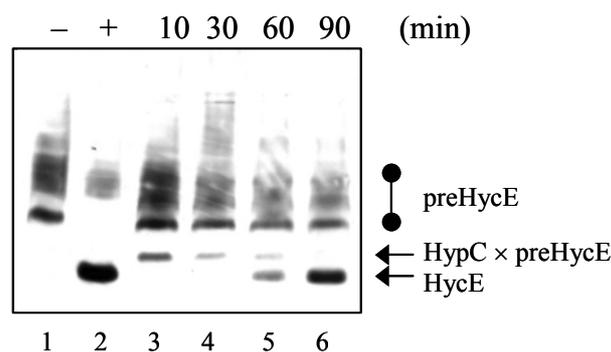


Abbildung 18: Reifung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in Gegenwart von Citrullin. Rohextrakte (40 μg) wurden durch 10 %ige, nicht-denaturierende Gele aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und die Wanderungsformen von HycE durch polyklonales Antiserum sichtbar gemacht. Der Stamm Δ CarAB wurde ohne (Spur 1) und mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Citrullin (Spur 2) in TGYEP-Medium angezogen. In die Kulturen der Extrakte der Spuren 3 bis 6 wurde zum Zeitpunkt 0 Citrullin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und wie angegeben weiter inkubiert.

Die verschiedenen Wanderungsformen von HycE im nicht-denaturierenden Gelsystem sind in Abbildung 18 zu sehen. Man kann HycE-Vorläuferformen (preHycE) als diffus wandernden Pool, den HypC × preHycE-Komplex und prozessiertes HycE unterscheiden. Die Zugabe von Citrullin resultiert zunächst in der Anhäufung des HypC × preHycE Komplexes (Abb. 18, Spur 3), der durch längere Inkubation zu Gunsten von reifem HycE aufgelöst wird (Spuren 5 und 6). Es kann jedoch kein unmittelbarer Übergang vom HypC × preHycE Komplex zum reifen HycE beobachtet werden. HypC wird zunächst vom Komplex gelöst und HycE wieder dem preHycE Pool zufügt. Dass reifes HycE nicht direkt aus dem HypC × preHycE Komplex entsteht, wurde auch durch *in vitro* Ansätze gezeigt (Magalon und Böck, 2000b).

Versuche, bei denen die *de novo* Proteinsynthese durch Chloramphenicol gehemmt wurde, ergaben im Wesentlichen das gleiche Ergebnis (Blokesh und Böck, 2002a).

Aus dem zeitlichen Ablauf der HycE-Prozessierung ist ersichtlich, dass Citrullin eine schlechte Quelle für CP ist. Dies ging auch aus dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von Citrullin auf die Reifung hervor (Abb. 19). Das Ergebnis zeigt, dass mindestens 50 µg/ml Citrullin im Medium notwendig ist, um detektierbare HycE-Prozessierung zu beobachten.

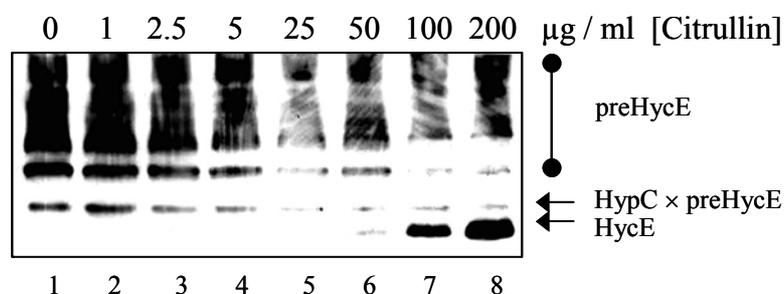


Abbildung 19: Abhängigkeit der HycE-Reifung von der Citrullinkonzentration. Der Δ CarAB Stamm wurde in TGYEP-Medium angezogen. Die Citrullinkonzentrationen der Kulturen sind über der Abbildung angegeben. Die Proteine (40 µg aus S13-Rohextrakten) wurden in 10%-igen nicht-denaturierenden-Gelen aufgetrennt und einer Westernblot Prozedur mit α -HycE Serum unterzogen. Die verschiedenen Wanderungsformen von HycE sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.2. Effekt der Überproduktion der Ornithin Transcarbamoylase

Der Grund für die schlechte Verwertung von Citrullin als alternative CP-Quelle kann einmal an einer unzureichenden Aufnahme von Citrullin liegen oder daran, dass das Gleichgewicht der Ornithin Transcarbamoylase Reaktion ($CP + Ornithin \rightarrow Citrullin + P_i$) auf Seiten des Produkts liegt (Cunin *et al.*, 1986).

Eine Möglichkeit die effektive Citrullinkonzentration zu verringern, bestand somit in der Überproduktion der Ornithin Transcarbamoylase (OTCase; *argI* kodiert). Fast alle anabolischen OTCasen sind fähig, beide Richtungen der Reaktion durchzuführen (Legrain *et al.*, 1977). Hierzu wurde das *argI* Gen mit den Primern ArgIupVspI & ArgI downEcoRI und chromosomaler DNA als Matrize amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit den *EcoRV*-geschnittenen Vektoren pACYC184 und pBR322 ligiert, woraus die Plasmide pAargI und pBargI resultierten. Es wurde erneut die zur Prozessierung von HycE notwendige minimale Citrullinkonzentration ermittelt (Abb. 20).

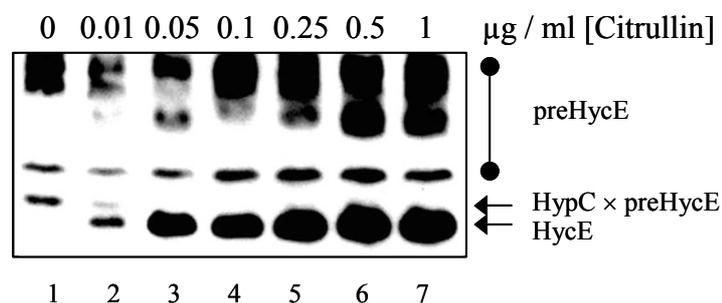


Abbildung 20: Bestimmung der minimalen Citrullinkonzentration zur Kompensation der Carbamoylphosphat-Defizienz. Die Transformante $\Delta CarAB/pBargI$ wurde in WM-Medium mit unterschiedlichen Citrullinkonzentrationen angezogen (siehe Tabelle über der Abbildung). Die Analyse der HycE-Formen erfolgte wie für Abbildung 19 beschrieben.

Wurde die Transformante $\Delta CarAB/pBargI$ in TGYEP-Medium angezogen, lag die große Untereinheit von Hydrogenase 3 (HycE) bereits in prozessierter Form vor (Daten nicht gezeigt). Um die Prozessierung direkt der Citrullinmenge zuordnen zu können, wurden die Versuche in Werkman-Minimalmedium (WM) durchgeführt. Die zur Reifung von HycE notwendige Menge an Citrullin lag durch Überproduktion der Ornithin Transcarbamoylase bei nur 0.01 µg/ml (Abb. 20). Die schlechte Verwertung von Citrullin im $\Delta CarAB$ Stamm ohne *argI* Überexpression lag somit nicht am Transport von Citrullin.

Der Versuch (Abb. 20) zeigt auch, dass nicht Citrullin per se für die Hydrogenase-Reifung notwendig ist, sondern das Produkt der thermodynamisch weniger favorisierten, reversen Reaktion der Ornithin Transcarbamoylase (Cunin *et al.*, 1986), Carbamoylphosphat.

Dass die Reaktionssequenz von Citrullin → CP → Cyanid (Reissmann *et al.*, 2003) und dessen Einbau in die große Untereinheit der Hydrogenasen vor dem Nickeleinbau erfolgt, wurde durch *in vitro* Versuche gezeigt. Hierzu wurde der Stamm DCarAG ($\Delta carAB \Delta argG$; siehe unten) anaerob mit und ohne Citrullin in nickelverarmtem Minimalmedium angezogen. Die Rohextrakte wurden der *in vitro* Prozessierung durch Zugabe von Nickel unterworfen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Insertion des aus dem Citrullin-stammenden Cyanids bereits vor der Nickelinsertion stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt; Blokesch und Böck, 2002a).

3.3. Deletion des Argininosuccinat Synthetase-Gens

Eine Möglichkeit Citrullin besser für die Reifung der Hydrogenasen nutzen zu können, sollte auch durch Deletion des *argG* Gens erreicht werden. *ArgG* kodiert die Argininosuccinat Synthetase, ein Enzym das Citrullin + Aspartat + ATP in Argininosuccinat umwandelt (Cunin *et al.*, 1986). Das *argG* Gen wurde durch PCR mit den Primern ArgGup*Bam*HI & ArgGdown*Hind*III und chromosomaler DNA des Stammes MC4100 als Matrize amplifiziert und das PCR-Fragment mit dem *Eco*RV-geschnittenen Vektor pACYC184 ligiert (= pAargG). Die Deletion des *argG* Gens erfolgte durch inverse PCR mit den Primern delargGup*Nde*I & delargGdown*Nde*I; das PCR-Fragment wurde religiert (= pADargG). Das verkürzte $\Delta argG$ Gen wurde mit *Bam*HI herausgeschnitten und mit dem *Bam*HI-geschnittenen pMAK700 Vektor ligiert (= pMDargG). Der Austausch von $\Delta argG$ von pMDargG gegen das chromosomale *argG* Gen erfolgte nach Hamilton *et al.* (1989). Die resultierenden Stämme waren DCarAG ($\Delta carAB \Delta argG$), DDCG ($\Delta hypD \Delta carAB \Delta argG$), DECG ($\Delta hypE \Delta carAB \Delta argG$), DACG (SMP101 $\Delta carAB \Delta argG$), DCar705AG ($\Delta hycE \Delta carAB \Delta argG$), DARGG ($\Delta argG$), DFCG ($\Delta hypF \Delta carAB \Delta argG$) und DBGCG ($\Delta hybG \Delta carAB \Delta argG$). Die *argG* Deletion in DARGG wirkte sich nicht negativ auf die Hydrogenase-Reifung aus (Daten nicht gezeigt).

Die Stämme sollten nun genutzt werden, um den Einbau von [¹⁴C]-Citrullin *in vivo* zu verfolgen. Die Anzuchten erfolgten hierzu ebenfalls in Minimalmedium (WM, M9 oder MOPS), die Markierungen wurde durch Zugabe von 1 µg/ml [¹⁴C]-Citrullin durchgeführt. Die Deletion des *argG* Gens sollte hierbei die Umwandlung in [¹⁴C]-Arginin vermeiden. Es ergab sich jedoch, dass der Einbau relativ unspezifisch in zahlreiche Makromoleküle erfolgte. Der Ansatz wurde deswegen nicht weiter verfolgt.

3.4. Anhäufung des HypC × HypD Komplexes im ΔCarAB Stamm

Um den Einfluss des Carbamoylphosphat-Mangels auf die Reifungskaskade weiter zu studieren, wurden die akzessorischen Proteine nun ebenfalls genauer untersucht. Hierzu wurden Rohextrakte der Δ*hyp* Stämme, Δ*CarAB* und von Nickeltransport-Mutanten auf das Wanderungsverhalten der Proteine im nicht-denaturierenden Gel durch Westernblotanalysen gegen HypB, HypC, HypD, HypE und HypF durchgeführt. Dabei wurde ein verändertes Wanderungsverhalten von HypC und HypD im Δ*CarAB* Stamm bemerkt (Abb. 21; Blokesch und Böck, 2002a). Die Signale im Westernblot wanderten auf gleicher Höhe und deuteten auf die Existenz eines Proteinkomplexes zwischen HypC und HypD hin. Dieser Komplex sollte nun genauer untersucht werden.

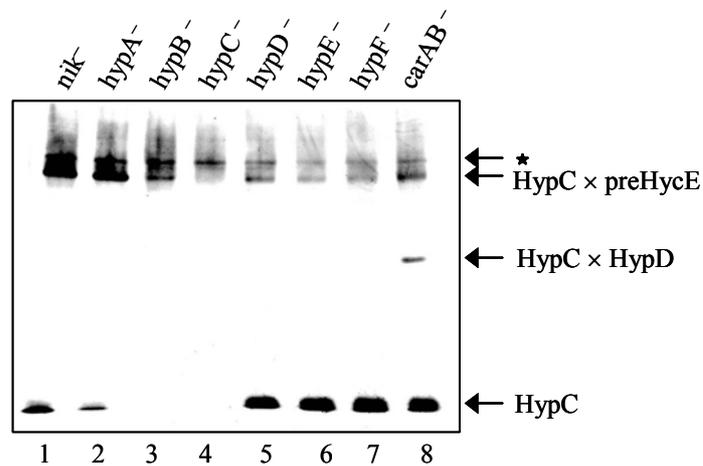


Abbildung 21: Anhäufung eines HypC × HypD Komplexes im Stamm Δ*CarAB*. Die Stämme Hyd723, SMP101, DHP-B, DHP-C, DHP-D, DHP-E, DHP-F und Δ*CarAB* (siehe Genotyp über der Abbildung) wurden anaerob in TGYEP-Medium angezogen. Die Proteine der Rohextrakte (je 40 μg pro Spur) wurden durch ND-PAGE (10%-iges Gel) aufgetrennt und einer Westernblotanalyse mit α-HypC Antiserum unterzogen. Freies HypC, der HypC × HypD und der HypC × preHycE Komplex sind durch Pfeile markiert. * weist auf eine Kreuzreaktion des Antiserums hin.

4. Der HypC × HypD Komplex

Vom HypC-Protein war bereits bekannt, dass es einen Komplex mit der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 (HycE) eingeht (Drapal und Böck, 1998; Magalon und Böck, 2000a). Dieser Komplex wird vor der C-terminalen Prozessierung wieder aufgelöst (Magalon und Böck, 2000b). Seine Menge unterscheidet sich deutlich in den Mutanten: er häuft sich besonders in den Stämmen Hyd723 (*nik⁻*), SMP101 (HypA defizient) und DHP-B ($\Delta hypB$) an, aber nur wenig in den Stämmen DHP-D ($\Delta hypD$), DHP-E ($\Delta hypE$) und DHP-F ($\Delta hypF$) (siehe Abb. 21). Auffällig ist die in Abbildung 21 gezeigte extra Bande von HypC im $\Delta CarAB$ Stamm. Diese konnte dem HypC × HypD Komplex zugeschrieben werden, da auch ein verändertes Laufverhalten von HypD gefunden wurde (Daten nicht gezeigt).

4.1. Auflösung des HypC × HypD Komplex durch Citrullin-Zufütterung

Der HypC × HypD Komplex häufte sich spezifisch im $\Delta CarAB$ Stamm an. Ob er ein Reifungszwischenprodukt darstellt, war unklar. Falls ja, sollte er nach Zugabe von Citrullin als alternativer CP-Quelle wieder aufgelöst werden. Die Existenz des HypC × HypD Komplexes wurde dazu in $\Delta CarAB$ -Zellen bei Zugabe von Citrullin verfolgt (Abb. 22).

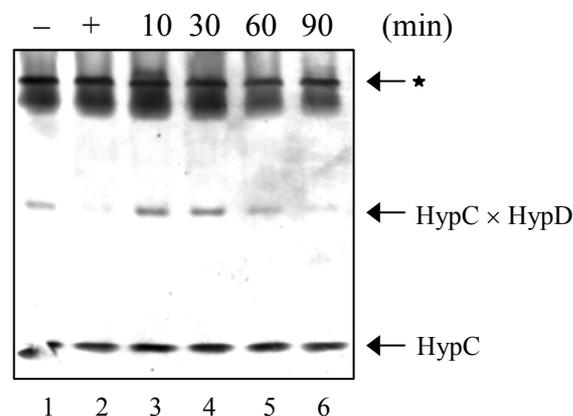
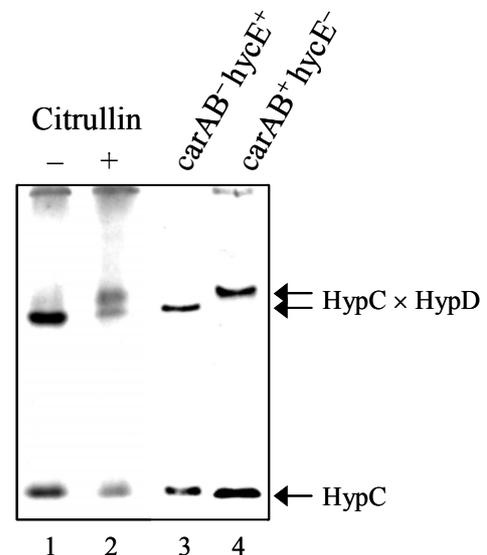


Abbildung 22: Auflösung des HypC × HypD Komplexes *in vivo* nach Zugabe von Citrullin. Proteine (80 µg Rohextrakt) wurden in einem 10%-igen Gel durch ND-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit α -HypC Antiserum behandelt. Der Stamm $\Delta CarAB$ wurden ohne (Spur 1) und mit 200 µg/ml Citrullin (Spur 2) in TGYEP-Medium angezogen. In die Kulturen der Extrakte der Spuren 3 bis 6 wurde Citrullin (200 µg/ml) zugegeben und wie angegeben weiter inkubiert.

Der HypC × HypD Komplex wurde durch Zugabe von Citrullin aufgelöst (Abb. 22). Da dies mit der Prozessierung von HycE einhergeht (Abb. 18), kann der Komplex als Zwischenprodukt der Reifung angesehen werden.

Als Rolle des Komplexes in der Reifung ist eine Transferfunktion des HypC-Proteins ausgehend von HypD zur großen Untereinheit der Hydrogenase (HycE) naheliegend. Dies sollte mit Hilfe des Stammes DCar705 ($\Delta carAB \Delta hycE$) getestet werden, da hier der potentielle Akzeptor des HypC-Proteins, HycE fehlt. Tatsächlich erfolgte in diesem Fall keine Auflösung des HypC × HypD Komplexes nach Citrullinzugabe (Abb. 23). Vielmehr erschien eine zweite Form des Komplexes, die auch im $carAB^+$ Stamm HD705 ($\Delta hycE$) zu sehen ist (Abb. 23, Spur 4).

Abbildung 23: Detektion einer zweiten Wanderungsform des HypC × HypD Komplexes. Die Proteine (80 µg Rohextrakt) wurden durch 10%-ige nicht-denaturierende Gele aufgetrennt. Der Nachweis des HypC-Proteins erfolgte mit α -HypC-Serum nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran. Gezeigt sind Extrakte der Stämme DCar705 ($\Delta carAB \Delta hycE$, Spuren 1 und 2), $\Delta CarAB/ pJA16$ (Spur 3) und HD705/ $pJA16$ ($\Delta hycE$, Spur 4). Das Plasmid pJA16 trägt die Gene *hypB-E*. Der Anzucht der in Spur 2 gezeigten Extrakte wurde zusätzlich Citrullin (200 µg/ml) zugegeben. Die zwei Laufformen des HypC × HypD Komplexes und freies HypC sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Der HypC × HypD Komplex wird also in Abwesenheit von HycE durch Citrullinzugabe nicht aufgelöst, sondern in eine zweite, im nicht-denaturierenden Gel langsamer laufende Form umgewandelt. Der Grund dieser Veränderung war zu diesem Zeitpunkt unklar.

4.2. Konstruktion von $\Delta carAB \Delta hyp$ Doppelmutanten

Ob auch andere Hyp-Proteine an der Bildung dieses Komplexes beteiligt sind, sollte mit Hilfe von $\Delta hyp/\Delta hyb/\Delta hyc \Delta carAB$ -Doppelmutanten festgestellt werden. Die Herstellung erfolgte durch Transformation der Ausgangsstämme mit dem Plasmid pM $\Delta CarAB$ (Paschos *et al.*, 2001) und Austausch von $\Delta carAB$ mit dem chromosomalen *carAB* Operon (Hamilton *et al.*, 1989). Da eine zweite Form des Komplexes in Abwesenheit der großen Untereinheit der

Hydrogenase 3 (HycE) existiert, wurden auch folgenden $\Delta hycE$ Stämme hergestellt: SMP101 $\Delta car705$, DHP-C $\Delta car705$, DHP-E $\Delta car705$, DHP-F $\Delta car705$, DCar705 und DCar705AG (siehe Tabelle 1). Dies geschah durch Austausch des verkürzten $\Delta hycE$ Gens von Plasmid pMSD705 (Sauter *et al.*, 1992) mit dem chromosalen *hycE* Gen. Die resultierenden Stämme wurden auf Vorhandensein des HypC \times HypD Komplexes durch Westernblotanalysen untersucht (siehe Tabelle 8).

TABELLE 8: Detektion des HypC \times HypD Komplex in den $\Delta hyp/\Delta hyc/\Delta hyb \Delta carAB$ Mutanten

Stamm	Genotyp	HypC \times HypD Komplex
SMP101 Δcar	<i>hypA</i> (ATG \rightarrow TAA) $\Delta carAB$	vorhanden
SMP101 $\Delta car705$	<i>hypA</i> (ATG \rightarrow TAA) $\Delta carAB \Delta hycE$	vorhanden
DHP-B Δcar	$\Delta hypB \Delta carAB$	vorhanden
DHP-C Δcar	$\Delta hypC \Delta carAB$	fehlt
DHP-C $\Delta car705$	$\Delta hypC \Delta carAB \Delta hycE$	fehlt
DHP-D Δcar	$\Delta hypD \Delta carAB$	fehlt
DHP-E Δcar	$\Delta hypE \Delta carAB$	fehlt
DHP-E $\Delta car705$	$\Delta hypE \Delta carAB \Delta hycE$	fehlt
DHP-F Δcar (Paschos, 2003)	$\Delta hypF \Delta carAB$	fehlt
DHP-F $\Delta car705$	$\Delta hypF \Delta carAB \Delta hycE$	fehlt
DHB-G Δcar	$\Delta hypG \Delta carAB$	vorhanden (*)
Hyd723 Δcar	Hyd723, $\Delta carAB$	vorhanden
DCar705	$\Delta hycE \Delta carAB$	vorhanden
DCar705AG	$\Delta hycE \Delta carAB \Delta argG$	vorhanden

* starke Akkumulation

Es zeigte sich, dass der HypC \times HypD Komplex unabhängig von der Anwesenheit von Nickel oder der Hyc-Proteine, wie der großen Untereinheit von Hydrogenase 3 (HycE), gebildet wird.

Der Komplex häufte sich besonders im Stamm DHB-G Δ car an, da hier das zu HypC-homologe Protein HybG fehlt. In Wettbewerbsversuchen mit plasmidkodiertem *hybG* (pBHBG-Strep) und somit überstöchiometrisch vorhandenem HybG, wurde der HypC \times HypD Komplex nicht detektiert. Es kam stattdessen zur Bildung eines HybG-Strep \times HypD Komplexes, was durch nicht-denaturierende Gelelektrophoresen und Westernblotanalysen nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt; Blokesch und Böck, 2002). Tabelle 8 zeigt auch, dass der HypC \times HypD Komplex in Extrakten von Zellen ohne HypE und HypF nicht nachgewiesen werden kann.

4.3. Abhängigkeit der Komplexbildung von HypE und HypF

Durch die Arbeiten von Paschos *et al.* (2002) und Reissmann *et al.* (2003) war bekannt, dass HypF den Carbamoylrest aus CP auf HypE überträgt. Somit reagieren HypE und HypF direkt mit Carbamoylphosphat. Unerwartet war demnach, dass der HypC \times HypD Komplex sich spezifisch im Δ CarAB Stamm und nicht auch im DHP-E und DHP-F Stamm ansammelt (Abb. 21). Das Gegenteil war sogar der Fall: In den Mutanten DHP-E Δ car und DHP-F Δ car konnte kein Komplex detektiert werden. Ob dies tatsächlich am Fehlen von HypE und HypF liegt, sollte durch Komplementation der Stämme mit *hypE* bzw. *hypF* tragenden Plasmiden getestet werden (Abb. 24).

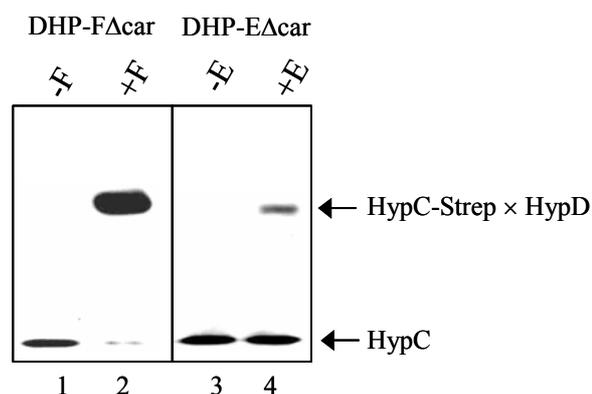


Abbildung 24: Abhängigkeit der Bildung des HypC \times HypD Komplexes von der Anwesenheit von HypE und HypF *in vivo*. Westernblotanalyse mit α -HypC Antiserum zur Detektion von HypC in Rohextrakten. Die Stämme DHP-F Δ car (Spuren 1 und 2) und DHP-E Δ car (Spuren 3 und 4) wurden auf Vorhandensein des HypC \times HypD Komplexes untersucht. Spur 1: DHP-F Δ car/pJA36 (*hypB-E*)/pACYC184, Spur 2: DHP-F Δ car/pJA36 (*hypB-E*)/pAF1 (*hypF*), Spur 3: DHP-E Δ car/pBhypC (*hypC*)/pJA103 (*hypD*) und Spur 4: DHP-E Δ car/pBhypC (*hypC*)/pJA11 (*hypDE*). Freies HypC und der HypC \times HypD Komplex sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Abbildung 24 ist zu entnehmen, dass es in Abwesenheit von HypE und HypF nicht zur Ausbildung des HypC × HypD Komplexes kommt (Spuren 1 und 3). Nach Komplementation der $\Delta hypF$ bzw. $\Delta hypE$ Deletionen mit den Wildtyp-Genen konnte der HypC × HypD Komplex wieder detektiert werden (Abb. 24).

Es besteht somit unter anaeroben Bedingungen *in vivo* eine Abhängigkeit der Komplexbildung von den Proteinen HypE und HypF. Dies erklärt den unterschiedlichen Phänotyp der Stämme $\Delta CarAB$ und DHP-E bzw. DHP-F in Bezug auf die Akkumulierung des HypC × HypD Komplexes.

4.4. Die Rolle des N-terminalen Cysteins von HypC

HypC interagiert mit der großen Untereinheit der Hydrogenase 3, wozu sein N-terminaler Cysteinrest essentiell ist (Magalon und Böck, 2000a). Entsprechend benötigt HybG das N-terminale Cystein zur Interaktion mit der großen Untereinheit der Hydrogenase 1 und 2 (Daten nicht gezeigt; Blokesch, 2000; Blokesch *et al.*, 2001). Ob dieses Cystein auch für die Interaktion mit HypD notwendig ist, sollte im nächsten Versuch getestet werden. Hierzu wurde der DHP-C Δcar Stamm ($\Delta hypC \Delta carAB$) mit Plasmid pJA31 (*hypDE*) transformiert. Ein zweites Plasmid kodierte jeweils für HypC oder dessen Varianten (Abb. 25).

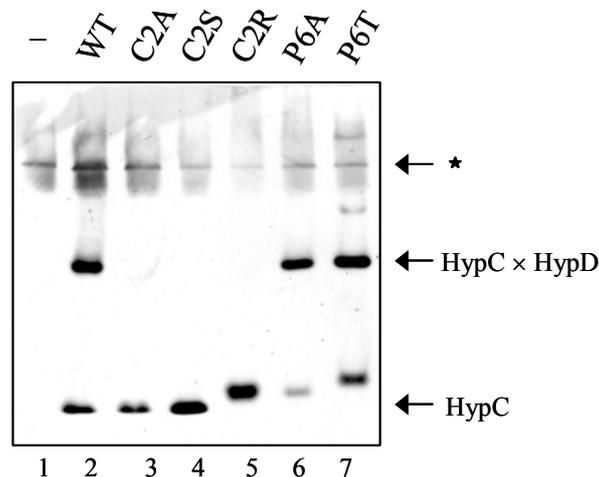


Abbildung 25: Fähigkeit von HypC-Varianten zur Interaktion mit HypD. Rohextrakte (80 μ g) wurden durch nicht-denaturierende PAGE (10%-iges Gel) aufgetrennt, die Proteine auf eine NC-Membran transferiert und das Wanderungsverhalten von HypC durch α -HypC Antiserum sichtbar gemacht. Spur 1: DHP-C Δcar ($\Delta hypC \Delta carAB$), Spuren 2 bis 7: DHP-C Δcar /pJA1021 (*hypDE*)/pJA1021, wobei die Aminosäureaustausche in HypC über der Abbildung angegeben sind. Freies HypC und der HypC × HypD Komplex sind durch Pfeile markiert. *weist auf unspezifische Kreuzreaktionen des Antiserums hin.

Aus den Spuren 3 bis 5 der Abbildung 25 ist ersichtlich, dass die HypC × HypD Komplexbildung ebenfalls von der Anwesenheit des N-terminalen Cysteins abhängt. Austausch des konservierten Prolins an Position 6 verändern zwar das Wanderungsverhalten von freiem HypC, für die Bildung des Komplexes ist es jedoch nicht essentiell (Abb. 25, Spuren 6 und 7).

4.5. Auswirkungen weiterer Aminosäureaustausche in HypC auf die Funktion

Neben dem auffälligen Motiv MC(L/I/V)(G/A)(L/I/V)P am N-Terminus (das Methionin wird posttranslational abgespalten; Magalon und Böck, 2000a) ist auch ein Histidinrest an Position 51 konserviert. Dieser wurde gegen die Aminosäuren Alanin, Phenylalanin und Arginin ausgetauscht. Dies geschah mittels inverser PCR (Primer: HypCH51A bzw. HypCH51F bzw. HypCH51R & HypCH51inv.) und pJA1021 als PCR-Vorlage. Die Plasmide wurden pJA1021[H51A], pJA1021[H51F] und pJA1021[H51R] benannt und auf Ihre Richtigkeit überprüft (Restriktionsanalyse und Sequenzierung). Untersuchungen der Transformanten des Stammes DHP-C durch Gastests, Prozessierung von HycE in Westernblotanalysen und Überschichtungstest ergaben, dass keines der mutanten Proteine Hydrogenase 3-Reifung durchführen kann (Daten nicht gezeigt). Wurden jedoch *hypD* und *hypE* koexprimiert (durch Plasmid pJA31), konnte der DHP-C Stamm durch pJA1021[H51A] und pJA1021[H51F] komplementiert werden; HycE lag dann komplett prozessiert vor (Abb. 26). Das Protein HypC[H51R] erwies sich auch in diesem genetischen Hintergrund als funktionsunfähig.

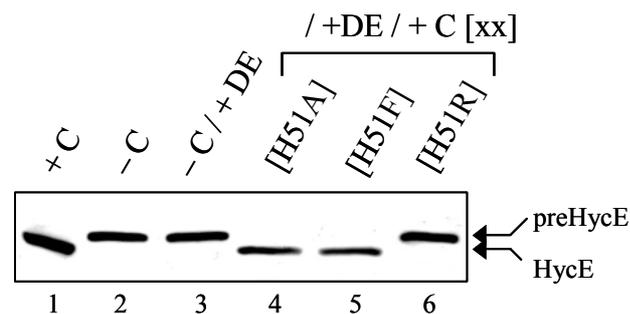


Abbildung 26: Komplementation von DHP-C/pJA31 durch pJA1021[H51A] und pJA1021[H51F]. Proteine aus Zell-Lysaten (0.06 OD₆₀₀-Einheiten) anaerob angezogener Bakterien wurden durch 10%-ige SDS-Gele aufgetrennt, auf eine NC-Membran transferiert und die große Untereinheit der Hydrogenase 3 wurde durch Westernblotanalyse mit α -HycE Antiserum detektiert. Spur 1: MC4100, Spur 2: DHP-C, Spur 3: DHP-C/pJA31 (*hypDE*), Spuren 4 bis 6: DHP-C/pJA31/pJA1021 [XX], wobei XX die über der Abbildung angegebenen Aminosäureaustausche angibt. Die verschiedenen Formen von HycE sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In der Fähigkeit zur Komplexbildung mit HypD und HycE waren sowohl HypC[H51A] als auch HypC[H51F] aktiv, jedoch in verminderter Menge. HypC[H51R] war so gut wie nicht zur Komplexbildung fähig (Daten nicht gezeigt).

Entsprechende Versuche wurden auch mit dem HypC-homologen Protein HybG durchgeführt. Die Proteinsequenz wurde durch Austausch des konservierten Cysteins 2 (Blokesch *et al.*, 2001), Aspartats 15 und Histidins 52 verändert. Auch hier wurden die veränderten HybG-Proteine plasmidkodiert exprimiert durch pBHBG-Strep[C2A], pBHBG-Strep[C2S], pBHBG-Strep[D15L], pBHBG-Strep[D15N], pBHBG-Strep[H52F] und pBHBG-Strep[H52R]. Die Plasmide wurden durch inverse PCR (Primer siehe Tabelle 4) und pBHBG-Strep als Matrize erhalten und auf Ihre Richtigkeit getestet (Restriktion und Sequenzierung). Eine Komplementation des DHB-G Stamms ($\Delta hybG$; Blokesch *et al.*, 2001) war nur bei Veränderung des Aspartats möglich, wie Westernblotanalysen (Daten nicht gezeigt) und Aktivitätsfärbungen (Abb. 27) zeigten. Die Stabilität der Proteine wurde durch Westernblotanalyse mit α -Strep-tagII[®] polyklonalem Antiserum (IBA GmbH, Göttingen) untersucht. Alle Varianten außer HybG-Strep[D15L] waren stabil (Daten nicht gezeigt); trotzdem reichte die verringerte Proteinmenge zur Komplementation aus (Abb. 27).

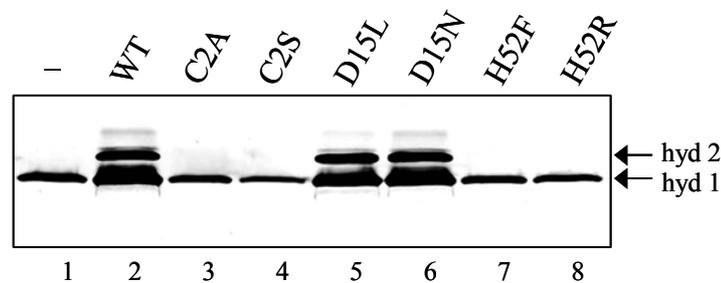


Abbildung 27: Untersuchung von HybG-Varianten durch Detektion der Hydrogenase-Aktivitäten in Gelen. Der Stamm DHB-G ($\Delta hybG$) und dessen Transformanten wurden anaerob in TGYEP Medium mit Glycerin und Fumarat angezogen. Nach Aufbruch der Zellen und Herstellung des Rohextraktes, wurden die Proteine (30 μ g) durch 10%-ige nicht-denaturierende SDS Gele aufgetrennt. Spur 1: DHB-G, Spur 2 bis 8: DHB-G/pBHBG-Strep, wobei die Aminosäureaustausche in HybG über der Abbildung angegebenen sind. Die Aktivitäten der Hydrogenasen 1 und 2 sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die HybG-Varianten wurden auf Ihre Komplexbildung mit der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 (HybC) untersucht (Tabelle 9).

TABELLE 9: Komplexbildung der HybG-Varianten mit der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 (HybC)

HybG-Varianten	WT	[C2A]	[C2S]	[D15L]	[D15N]	[H52F]	[H52R]
Komplex mit HybC	+	-	-	+	+	+	±

Vergleichbar zu HypC sind auch die HybG-Varianten mit ausgetauschtem Cystein inaktiv. Es ist keine Komplexbildung mit der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 möglich (Blokesch *et al.*, 2001). Auch das konservierte Histidin erscheint wichtig für die Funktion von HybG.

4.6. Auswirkung von Aminosäureaustauschen in HypD auf die Komplexbildung

Um die Komplexbildung zwischen HypC und HypD besser verstehen zu können, wurden die unter Punkt 2.8. beschriebenen HypD-Varianten auf Ihre Fähigkeit mit HypC zu interagieren, getestet. Dies geschah durch Westernblotanalysen gegen HypC und HypD nach Auftrennung der Rohextrakte der Transformante DHP-CΔcar/pBhypC/pJA103 [XX] (XX steht für die entsprechenden Aminosäureaustausche) in nicht-denaturierenden Gelen (siehe Tabelle 10). Es wurde gefunden, dass den konservierten Cystein-Resten an den Positionen 41, 69 und 72 und im C-terminalen Quartett eine Rolle in der Interaktion mit HypD zukommt.

TABELLE 10: Komplexbildung der HypD-Varianten mit HypC

HypC × HypD [xx] - Komplex	HypD-Varianten
deutlich detektierbar	[WT], [P70A], [V71A], [P75A], [E148Q], [H201A]
nicht detektierbar	[C41A], [C69A], [C72A]*, [C69S], [H175A], [C323A], [C336A], [C343A],
schwach detektierbar	[E148A]

* Ergebnis nicht eindeutig; eventuell schwache Komplexbildung vorhanden

Ob diese Reste direkt an der Komplexbildung mit HypC beteiligt sind oder aber eine Konformationsänderung des Proteins bewirken, kann durch diese Versuche nicht geklärt werden.

4.7. Koelution von HypC-Strep und HypD in der Affinitätschromatographie

Bisher erfolgte der Nachweis des HypC × HypD Komplexes durch Komigration von HypC und HypD im nicht-denaturierenden Gel. Da dies zwar auf einen Komplex hindeutet, diesen aber nicht beweist, sollte seine Existenz durch zusätzliche Experimente verfestigt werden. Hierzu wurde die *Strep-tagII*[®] Sequenz (WSHPQFEK; IBA GmbH, Göttingen) C-terminal an das HypC-Protein angehängt. Das Fusionsprotein HypC-Strep wurde von den Plasmiden pAhypCStrep und pBhypCStrep kodiert, die nach Ligation eines 498 bp PCR-Fragments (Primer HypCupAatII & HypCStrepII; DNA-Vorlage: pJA36) mit dem *EcoRV*-geschnittenen Vektoren pACYC184 bzw. pBR322 erhalten wurden.

Nach Anzucht der Transformante DHP-CΔcar/pAhypCStrep (*hypC-Strep*)/pJA31 (*hypDE*), Aufbrechen der Zellen und Herstellung des Rohextraktes, wurde eine Affinitätschromatographie an einer *Strep-Tactin*[®] Sepharose Säule durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden nach Auftrennung der Proteine in nicht-denaturierenden Gelen und Westernblotanalyse mit α-HypC bzw. α-HypD spezifischen Antikörpern auf die Anwesenheit von HypC und HypD getestet. Beide Proteine befanden sich in den gleichen Elutionsfraktionen und liefen im Gel auf Höhe des postulierten HypC × HypD Komplexes.

Um größere Mengen des HypC × HypD Komplexes isolieren zu können, sollten beide Gene Seite an Seite überexprimiert werden. Dies geschah mit Hilfe des Plasmids pT-hypDCStrep (siehe 2.2.), das ein artifizielles Operon aus den Genen *hypD* und *hypC-Strep* enthält. Die Überexpression erfolgte unter aeroben Bedingungen in der Transformante BL21(DE3)/pT-hypDCStrep. Nach Aufbruch der Zellen, Herstellung des S30-Extraktes und Affinitätschromatographie (*Strep-Tactin*[®] Sepharose), wurde sowohl HypC-Strep als auch der HypC-Strep × HypD Komplex in großer Menge eluiert (Abb. 28). Die Elutionsfraktion erschien gelblich und wies somit auf die Anwesenheit des [4Fe-4S]-Clusters hin.

Da in diesem Experiment beide Proteine überproduziert wurden, waren HypE und HypF nicht notwendig.

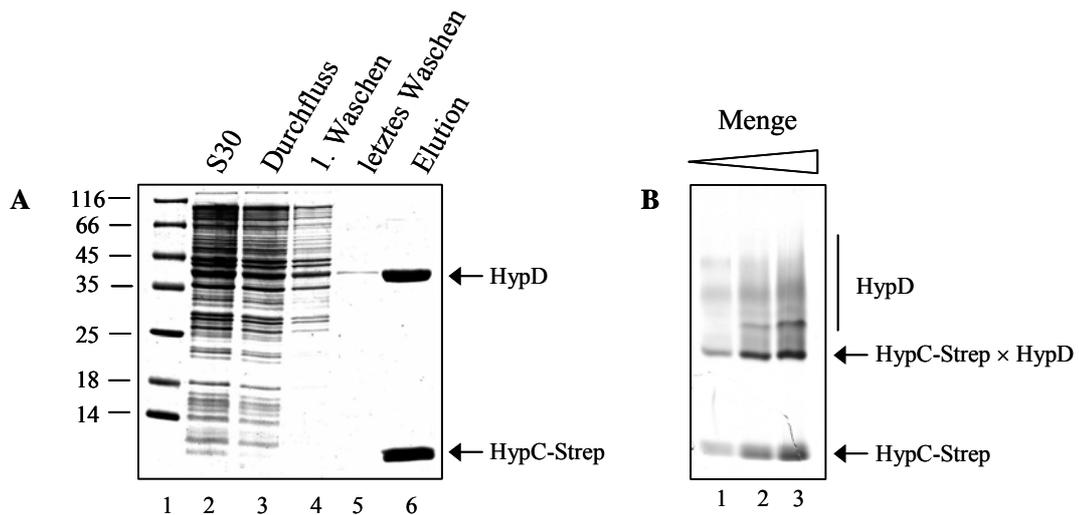


Abbildung 28: Reinigung des HypC × HypD Komplexes aus dem Überexpressionsstamm BL21(DE3)/pT-hypDCStrep. (A) 15% SDS-Gel. Spur 1: Standardproteine, Spur 2: S30-Extrakt, Spur 3: Durchfluss der *Strep*-Tactin Sepharose Säule, Spur 4: erster Waschschrift, Spur 5: letzter Waschschrift (incl. 0.5 M NaCl), Spur 6: vereinte Elutionsfraktionen. (B) Ansteigende Menge der eluierten Proteine. Die Auftrennung erfolgte in 10%-igen Gelen durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese. Die Proteine in beiden Gelen wurden mit Coomassie gefärbt. Die Pfeile markieren HypC-Strep, HypD und den Komplex beider Proteine.

Als Kontrollexperiment wurde der Rohextrakt des Stammes BL21(DE3)/pT-hypDC der Affinitätschromatographie unterzogen; weder HypC noch HypD eluierten von der *Strep*-Tactin[®] Sepharose Säule. HypD konnte also nur durch Komplexbildung mit HypC-Strep an die Säule binden.

Die Überproduktion konnte auch unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden, wobei dem TGYEP Medium meist 1 μ M FeCl₂ (zur Synthese des Eisen-Schwefel-Clusters in HypD) zugesetzt wurde. Um diese Überproduktion auch in Abwesenheit bestimmter Hyp-Proteine unter anaeroben Bedingungen durchführen zu können, wurden die Stämme DHP-F2(DE3), DHP-C Δ car705(DE3) und DHP-E Δ hypF(DE3) durch Integration des Phagen Lambda DE3 konstruiert. Die Überexpression gelang allerdings in keinem dieser Stämme im gleichen Ausmaß wie in BL21(DE3) (Daten nicht gezeigt).

4.8. Interaktionsstudien mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems

Mit Hilfe von Zwei-Hybrid Systemen können Proteininteraktionen *in vivo* detektiert werden. Das von Karimova *et al.* (1998) beschriebene bakterielle Zwei-Hybrid-System (B2H) basiert auf der Rekonstitution des cAMP Signaltransduktionsweges in *E. coli*. Hierbei werden *cya* Stämme von *E. coli* verwendet. Die potentiell interagierenden Proteine werden an zwei Fragmente, T25 und T18, fusioniert, die zusammen die katalytische Domäne der Adenylatcyclase von *B. pertussis* CyaA bilden (Ladant und Ullmann, 1999). Interaktion der Proteine bewirkt den Kontakt der T25 und T18 Domänen und somit die Synthese von cAMP. Dieses aktiviert die Transkription der katabolischen Operone (zum Beispiel für Laktose und Maltose), wodurch Proteininteraktionen *in vivo* erkannt und selektiert werden können. Der Grad der Interaktion kann durch Messung der β -Galaktosidase Aktivität bestimmt werden.

Zur Durchführung des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems wurden das *hypC* und *hypD* Gen durch PCR amplifiziert (Primer siehe Tabelle 4) und die PCR-Fragmente mit den *SmaI*-geschnittenen Vektoren pUT18 und pKT25 (Karimova *et al.*, 2001) ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide pUT-*hypC* und pKT25-*hypD* wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf Ihre Richtigkeit getestet. Sie kodieren für das HypC-Protein mit C-terminal fusioniertem T18-Fragment (HypC-T18) und das HypD-Protein mit N-terminalem T25-Fragment (T25-HypD). Die Expression der Gene *hypC-T18* und *T25-hypD* und Stabilität der Proteine wurde durch Westernblotanalysen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Der DHP-D Stamm konnte durch pKT25-*hypD* komplementiert werden (starke Gasbildung; HycE Prozessierung), der DHP-C Stamm jedoch nur zu sehr geringem Maße durch pUT-*hypC* (leichte Gasbildung, HycE-Prozessierung gerade noch detektierbar).

Der Zwei-Hybrid Stamm BTH101 wurde mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und die Transformanten auf MacConkey Agar ohne Laktose aber mit 1% Maltose ausgestrichen. Die Kolonien der Transformante BTH101/pUT-*hypC*/pKT25-*hypD* erschienen tiefrot, was auf eine starke Interaktion hinweist. Der Kontrollstamm (BTH101 ohne Plasmide) und die Vektorkontrolle (BTH101/pUT18/ pKT25) erschienen weiß bis gelb (Daten nicht gezeigt). Zur Quantifizierung wurde die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Als Positivkontrolle diente der Stamm BTH101/pUTC-*zip*/pKT25-*zip* (Karimova *et al.*, 1998). Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 zu sehen.

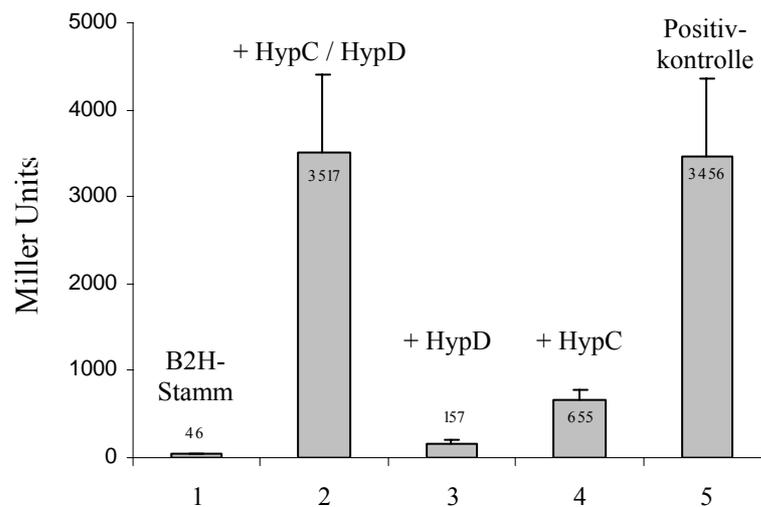


Abbildung 29: Nachweis der Interaktion von HypC und HypD durch ein bakterielles Zwei-Hybrid System. β -Galaktosidase-Werte des Zwei-Hybrid Stammes BTH101 (Spur 1) und dessen Transformanten. Spur 2: BTH101/pUT18-hypC/pKT25-hypD, Spur 3: BTH101/pUT18C-zip/pKT25-hypD, Spur 4: BTH101/pUT18-hypC/pKT25-zip, Spur 2: BTH101/pUT18C-zip/pKT25-zip. Die Werte sind in „Miller Units“ angegeben .

Der Versuch wurde auch mit HypA und HypB durchgeführt. Hierzu wurden die Plasmide pUT18-hypA und pKT25-hypB auf gleiche Weise wie für *hypC* und *hypD* beschrieben, konstruiert. Eine Interaktion dieser Proteine wurde nicht beobachtet. Da es jedoch Probleme mit den Original-Stämmen des Institut Pasteurs gab, konnten diese Versuche nicht reproduziert werden.

4.9. Bestimmung der Stöchiometrie von HypC und HypD im Komplex

Um die Funktion des HypC-Strep \times HypD Komplexes zu verstehen, war die Kenntnis der Stöchiometrie der beiden Proteine im Komplex wichtig. Da dies durch Gelfiltration nicht durchführbar war, wurden die Untersuchungen in Kooperation mit E. Hochleitner der AG Lottspeich (Max-Planck Institut für Biochemie, Abteilung Proteinchemie, Martinsried) durchgeführt. Nach Affinitätschromatographie an einer *Strep*-Tactin[®]-Säule, Auftrennung der Proteine der Elutionsfraktion im nicht-denaturierenden Gel und Anfärben mit wässriger Coomassielösung, wurde die Bande des HypC-Strep \times HypD Komplexes aus dem Gel geschnitten. Die Proteine wurden *in situ* mit der Endoprotease Lys-C gespalten und die Peptide durch HPLC getrennt. Die Markierung erfolgte mit einem Fluoreszenzfarbstoff; die Peptide wurden durch MALDI Massenspektrometrie und Tandem Massenspektrometrie identifiziert (Abb. 30).

Ein molares Verhältnis von 2.2 : 1 für HypC-Strep zu HypD wurde aus den Flächen der Peptidpeaks im Fluoreszenzchromatogramm errechnet. Somit binden zwei HypC-Strep-Proteine an ein HypD-Protein. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Peptide komplett aus dem Gel eluiert wurden, und kein Verlust bei der Ankonzentrierung entstand (E. Hochleitner; persönliche Mitteilung).

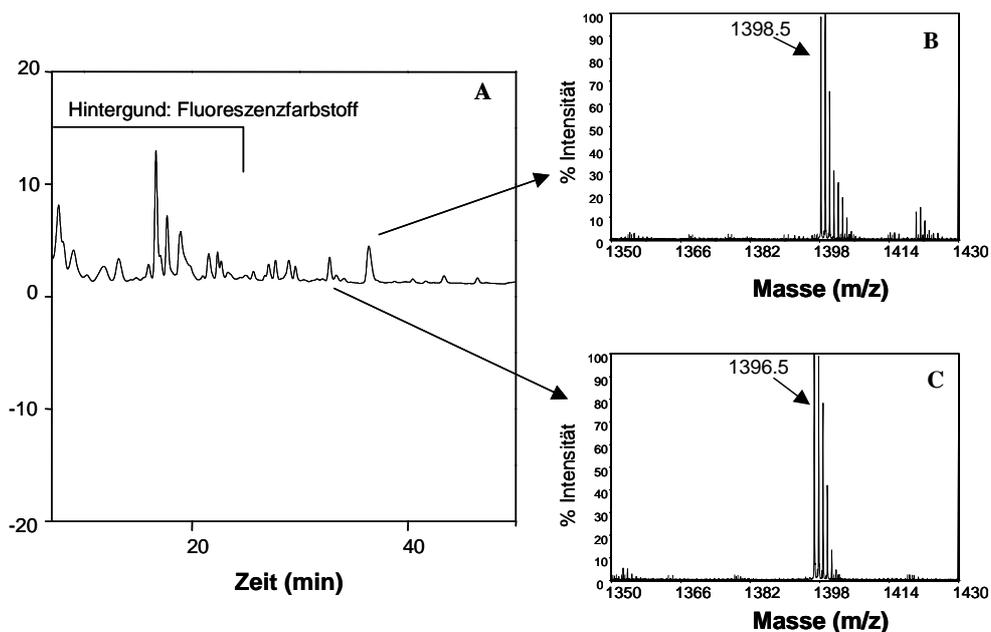


Abbildung 30: Bestimmung der Stöchiometrie im HypC × HypD Komplex. (A) Chromatogramm der Fluoreszenz-Detektion des gespaltenen HypC-Strep × HypD Komplexes. Die Peptide von HypC-Strep und HypD wurden durch Massenspektrometrie identifiziert: (B) zeigt das Massenspektrum von Peptid 90-97 (m/z 1398.5 des fluoreszenz-markierten Peptids) von HypC-Strep, (C) zeigt das Massenspektrum von Peptid 131-139 von HypD (m/z 1396.5 des fluoreszenz-markierten Peptids). Die Identität der Peptide wurden durch Tandem Massenspektrometrie bestätigt. Der verbreitete Peak des HypC-Strep-Peptides 90-97 kann durch partielle Oxidation des N-terminalen Tryptophan erklärt werden (E. Hochleitner; pers. Mitteilung).

Im diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass eine Modifikation am N-terminalen Cystein von HypC stattgefunden hat. Die Spaltung mit der Endoprotease Lys-C (siehe Anhang AIII.) ergab nämlich nicht das erwartete N-terminale Peptid der Masse 1770. Seine Masse unterschied sich um +26, seltener um +12 (oder +42, +54, +72, +126). Die Aminosäuren in den C-terminalen Fragmenten ergaben ein identisches Muster, die b-Ionen wichen jedoch in der Massendifferenz ab, was auf eine Modifikation des N-Terminus hinweist (E. Hochleitner; persönliche Mitteilung). Um einen Aminosäureaustausch ausschließen zu können, wurde auch die N-terminale Sequenz bestimmt. Die erste Aminosäure war Cystein, es hatte also kein Aminosäureaustausch stattgefunden.

Um festzustellen, ob diese Modifikation ein Zwischenprodukt der Hydrogenasereifung darstellt oder unspezifisch in der Zelle oder bei der Reinigung erfolgte, wurde das HypC-Strep Protein aus unterschiedlichen Mutanten gereinigt und die N-terminale Modifikation von E. Hochleitner untersucht. Die Überexpression erfolgte aerob in der Transformante BL21(DE3)/pT-hypCStrep (*hypC-Strep*-Gen durch PCR amplifiziert und mit dem Vektor pT7-7 ligiert) und anaerob in den Transformanten DHP-F2/pUhypCStrep (*hypC-Strep* Gen mit Shine-Dalgarno Sequenz durch PCR amplifiziert und mit dem Vektor pUC19 ligiert), Δ CarAB/pUhypCStrep, DHP-D/pUhypCStrep und HD705/pUhypCStrep. Die Anzucht- und Reinigungsbedingungen sind im Material und Methoden-Teil beschrieben. Alle isolierten HypC-Strep-Proteine zeigten in der Gelfiltration das gleiche Elutionsprofil. Die Ergebnisse der N-terminalen Massen sind in Tabelle 11 gezeigt.

TABELLE 11: Massen des N-terminalen Peptids des HypC-Strep-Proteins

Masse →	1770*	1782 (+12)	1796 (+26)	1812 (+42)	1823 (+54)	1842 (+72)	1896 (+126)
HypC-Strep × HypD	+	±	++	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
↓ HypC-Strep aus Stamm							
BL21(DE3) - aerob	+	±	++	+	-	-	-
DHP-F2 - anaerob	+	±	++	+	+	+	+
Δ CarAB - anaerob	+	±	++	k.A.	±	±	k.A.
DHP-D - anaerob	+	±	++	k.A.	++	++	k.A.
HD705 - anaerob	+	±	++	k.A.	++	++	k.A.

* das Peptid der Masse 1770 wurde als Referenz verwendet

k.A. = keine Angaben

Peptid (-) fehlt; (±) ist weniger als Peptid 1770; (+) ist vorhanden; (++) ist verstärkt vorhanden

Es stellte sich heraus, dass in allen Proben das Peptid der Masse 1770 („normales“ N-terminales Peptid), das der Masse 1782 (in verringerter Menge) und dominant das Peptid 1796 vorhanden war. Die Peptide mit weiteren Massen (1812, 1823, 1842, 1896) wurden bei der Analyse des HypC-Strep × HypD Komplexes nicht beachtet. Es stellte sich heraus, dass es sich hierbei auch um Modifikationen des N-Terminus handelt, da Ihr Fragmentmuster in der y-Ionen Serie mit dem des 1770 Peptids übereinstimmten (E. Hochleitner; persönliche

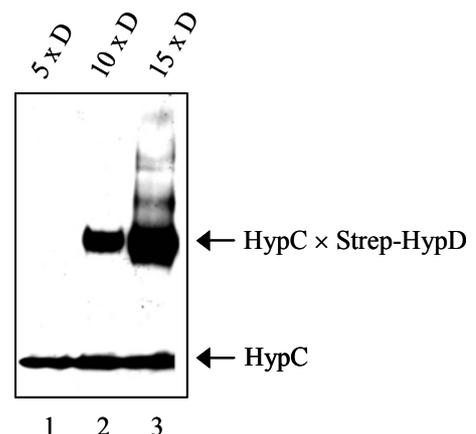
Mitteilung). Besonders auffällig waren die Peptide der Masse 1823 und 1842 in den gereinigten HypC-Strep-Proteinen aus den Stämmen DHP-D und HD705 (siehe Tabelle 11).

Die modifizierten Peptide sind vermutlich aus der Reaktion des N-terminalen Cysteins mit Acetaldehyd (+26) oder Formaldehyd (+12), gefolgt von einem Ringschluss (Thiazolidinring) entstanden. Auch in Cystein-Überproduktionsstämmen wird freies Cystein durch spontane Kondensation mit Pyruvat als 2-Methyl-2,4-thiazolidin-Dicarboxylsäure maskiert (Dassler *et al.*, 2000). Leider konnte im Zuge dieser Arbeit nicht festgestellt werden, ob diese Modifikationen einen Teil des Reifungsprozesses darstellen.

4.10. *In vitro* Komplexbildung

Der HypC × HypD Komplex wurde also *in vivo* nachgewiesen, aus Extrakten anaerob angezogener Zellen eluiert und aus HypC-Strep und HypD-überproduzierenden Zellen aerob isoliert. Als nächstes sollte die *in vitro* Komplexbildung aus den einzelnen Bestandteilen versucht werden. Hierzu wurden gereinigtes Strep-HypD (im Anaerobenzelt gereinigt und in 50% Glycerin unter N₂-Atmosphäre gelagert) und gereinigtes HypC-Protein verwendet. Die Proteine wurden in F-Puffer in verschiedenen Verhältnissen gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Auftrennung in 10%-igen, nicht-denaturierenden Gelen und Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen HypC. Da HypC im nicht-denaturierenden Gel sowohl als Monomer als auch als Dimer und Multimer läuft (Drapal und Böck, 1998) und auch HypD als „Proteinschmier“ detektiert wird, wurde den Ansätzen DTT zugegeben. Der Komplex zwischen HypC und HypD konnte dadurch als scharfe Bande detektiert werden. Eine Steigerung der Strep-HypD Menge ging mit vermehrter HypC × Strep-HypD Komplexbildung einher. Eine Abnahme des Signals von freiem HypC war nicht erkennbar. Die Komplexbildung war unabhängig von der Anwesenheit zusätzlicher Proteine, wurde aber durch HypE und HypF nicht unterbunden (Abb. 31).

Abbildung 31: *In vitro* Komplexbildung aus gereinigten Proteinen. Die Proteine HypC und Strep-HypD wurden im Verhältnis 1:5 (Spur 1), 1:10 (Spur 2) und 1:15 (Spur 3) mit 1 mM DTT, HypE und HypF (ca. in 0,5-fache Menge von HypC) für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte die Auftrennung durch 10%-ige nicht-denaturierende Gele und Westernblotanalyse mit α -HypC Antiserum. Freies HypC und der HypC × Strep-HypD Komplex sind durch Pfeile markiert.



Das HypC Protein wurde durch Zugabe von Strep-HypD „geshifet“ und im HypC × Strep-HypD Komplex wieder gefunden. Die Menge dieses Komplexes nahm zu, je mehr Strep-HypD im Ansatz vorhanden war. Dass Strep-HypD im starken Überschuss notwendig war, liegt vermutlich an der Instabilität oder dem Redoxzustand des Eisen-Schwefel-Clusters.

4.11. Quervernetzungsversuche

Zur weiteren Untersuchung des HypC × HypD Komplexes und zur Identifizierung von interagierenden Aminosäuren sollten Quervernetzungsversuche durchgeführt werden. Die hierzu verwendeten Reagenzien können in zwei Gruppen aufgeteilt werden, nämlich thiol- und primäre amine-spezifische Agentien. Die Quervernetzung mit DTSSP (Dithiobis-sulfosuccinimidyl Propinat), einem homobifunktionalen Crosslinker der primäre Amine vernetzt, ist in Abbildung 32 als Beispiel dargestellt. Durch das Vorhandenein einer Disulfidbrücke in der Verbindung, kann die Quervernetzung anschließend wieder gespalten werden.

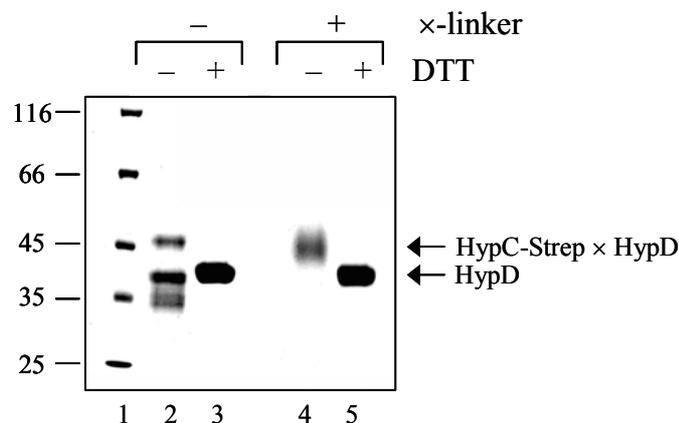


Abbildung 32: Stabilität und Quervernetzung des HypC-Strep × HypD Komplexes. Der eluierte Komplex wurde gegen Kalium-Phosphat Puffer pH 8.0 dialysiert. Der HypC-Strep × HypD Komplex wurde ohne (Spuren 2 und 3) und mit dem „Crosslink“-Reagenz DTSSP (4 mM) (Spuren 4 und 5) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde anschließend durch Zugabe von 4 mM Tris/Cl pH 7.5 für 15 min inaktiviert. Das Gemisch wurde weiter ohne (Spuren 2 und 4) und mit (Spuren 3 und 5) DTT inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im nicht-denaturierenden SDS-Gel bei Raumtemperatur, die Anfärbung mit Coomassie. Spur 1: Proteinstandard, Spur 2: HypC-Strep × HypD Komplex ohne DTT, Spur 3: HypC-Strep × HypD Komplex mit DTT, Spur 4: HypC-Strep × HypD Komplex mit DTSSP ohne DTT, Spur 5: HypC-Strep × HypD Komplex mit DTSSP und DTT. Das HypD Protein und der HypC-Strep × HypD Komplex sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Unbehandelt wandert HypD als Monomer im nicht-denaturierenden SDS-Gel (Abb. 32, Spur 2), wobei ein Teil auch nach der Elektrophorese noch den Komplex mit HypC-Strep eingeht. Dieser wird durch Zugabe von DTT (Spur 3) gespalten, einhergehend mit der Freisetzung von HypD. Die Quervernetzung der Proteine ist in den Spuren 4 und 5 der Abb. 32 zu sehen: Nach Quervernetzung liegt HypD vollständig im Komplex mit HypC-Strep vor (Spur 4; durch Westernblot bestätigt). Durch Spaltung der Disulfidbrücke des Crosslinkers, wird HypD wieder als Monomer detektiert (Spur 5)

In Zusammenarbeit mit E. Hochleitner (AG Lottspeich) sollten die an der Quervernetzung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Hierzu wurde der Komplex durch DTBP vernetzt und mit DTT wieder getrennt. Es folgten die Spaltung der Proteine mit der Endoprotease Lys-C, die chromatographische Auftrennung der erhaltenen Peptide und deren Identifikation durch Massenspektrometrie (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle diente der Komplex ohne Quervernetzung. Die zu erwartenden Peptide sind im Anhang (AIII. und AIV.) beschrieben. Es wurde herausgefunden, dass das N-terminale Peptid des HypC-Strep-Proteins (Masse 1770 /1796) nach Spaltung des quervernetzten Komplexes mit Lys-C fehlte. Da Lys-C an modifizierten Lysinen nicht bzw. schlecht spaltet, wurde dieses Lysin vermutlich mit HypD vernetzt (E. Hochleitner; persönliche Mitteilung). Somit interagiert wahrscheinlich der N-Terminus von HypC mit HypD. Die daran beteiligte Aminosäuren oder Peptide in HypD konnten nicht identifiziert werden.

5. Untersuchungen zur Synthese und dem Transfer des Cyanid-Liganden

Dass die HypC × HypD Komplexbildung *in vivo* von der Anwesenheit der Proteine HypE und HypF abhängt, wurde bereits gezeigt. Der Grund hierfür war unbekannt, obwohl Arbeiten unserer Gruppe die Funktionen von HypE und HypF entschlüsselt hatten. Das HypF Protein spaltet nämlich Carbamoylphosphat unter Freisetzung von P_i , bindet vermutlich den Carbamoylrest als Carbamoyladenylat (Paschos *et al.*, 2002) und überträgt ihn auf das C-terminale Cystein von HypE (Reissmann *et al.*, 2003). Am HypE Protein erfolgt anschließend eine Dehydratisierung der Carboxamidogruppe durch ATP-abhängige Aktivierung des Sauerstoffs und Dephosphorylierung resultierend im HypE-thiocyanat. Um nun die Abhängigkeit der HypC × HypD Komplexbildung von den Proteinen HypE und HypF zu verstehen, wurden zunächst die von Reissmann *et al.* (2003) beschriebenen Reaktionsansätze optimiert.

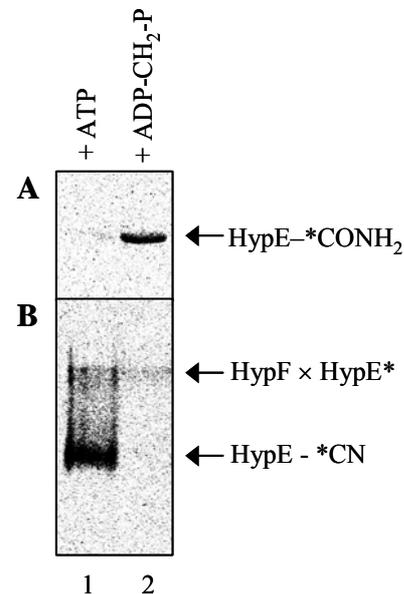
5.1. Optimierung der ^{14}C -Markierung und der Produktdifferenzierung

Bisher war die Unterscheidung von HypE-thiocarboxamid (HypE-CONH₂) und HypE-thiocyanat (HypE-CN) nur mittels Massenspektrometrie möglich (Reissmann *et al.*, 2003). Bei der Entwicklung einer weniger aufwendigen Methode wurde die Beobachtung ausgenutzt, dass die HypE-CN-Form im SDS-Gel in Anwesenheit von DTT schlechter aufgelöst wird als die HypE-CONH₂-Form (Reissmann *et al.*, 2003). Bei der Optimierung wurden nun folgende Veränderungen in der Probenbehandlung und Auftrennung der Proteine im Vergleich zu den Angaben von Reissmann *et al.* (2003) durchgeführt: (1) die Proteine wurden sowohl durch SDS-Gelelektrophorese (in den folgenden Figuren Teil A) als auch durch nicht-denaturierende PAGE (in den folgenden Figuren Teil B) aufgetrennt; (2) der Probenpuffer der SDS-Gelelektrophorese enthielt 100 mM statt 1 mM DTT und (3) die Proben wurden nicht für 15 min bei 40°C sondern für 10 min bei 56°C erhitzt. Da zusätzlich der Elektrophoreselauf im Kühlraum bei maximal 110 Volt stattfand, wurde diese Methode entgegen der „normalen“ SDS-PAGE nach Laemmli (1970) als „mild“-denaturierend beschrieben (Blokesh *et al.*, 2004a).

Abbildung 33 zeigt einen Versuch, in dem [^{14}C]-markiertes Carbamoylphosphat und die gereinigten Proteine HypE und HypF inkubiert wurden. In Anwesenheit von ATP oder ADP-CH₂-P (einem ATP-Analogen) wird die Carbamoylgruppe von HypF auf das C-terminale Cystein von HypE übertragen (Transcarbamoylierung). Die Umwandlung von HypE-CONH₂ zum HypE-CN (Dehydratisierung) benötigt ATP und wird durch ADP-CH₂-P nicht katalysiert (Reissmann *et al.*, 2003).

Die Proteine wurden wie oben beschrieben behandelt und durch „mild“-denaturierende SDS-PAGE (Abb. 33A) bzw. nicht-denaturierende PAGE (Abb. 33B) aufgetrennt.

Abbildung 33: Differenzierung von HypE-thiocarboxamid und HypE-thiocyanat durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie. Protein HypE (2 μM) wurde mit Protein HypF (0.5 μM), [^{14}C]-CP (100 μM) und 100 μM ATP (Spur 1) oder ADP-CH₂-P (Spur 2) für 10 min bei 25 °C inkubiert. Die Proteine wurden durch 10%-ige „mild“-denaturierende SDS- (A) oder nicht-denaturierende- (B) Polyacrylamidgele aufgetrennt. Der Auftragspuffer der SDS-Gele enthielt 100 mM DTT, die Proben wurden für 10 min bei 56 °C erhitzt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen erfolgte die Autoradiographie. HypE-CONH₂ und HypE-CN sind durch Pfeile markiert. Die radioaktive Markierung wird hier und im Folgenden durch ein Sternchen dargestellt.



In den verwendeten Gelsystemen ist die HypE-CN-Form unter nicht-denaturierenden Bedingungen stabil (Abb. 33B, Spur 1), wohingegen die Denaturierung in Anwesenheit von hohen DTT-Konzentrationen die Abspaltung der Cyanidgruppe bewirkt (Abb. 33A, Spur 1). Die HypE-CONH₂-Form dagegen zerfällt unter nicht-denaturierenden Bedingungen (Abb. 33B, Spur 2). Der Zerfall der Carboxamidogruppe ist abhängig von der nativen Faltung des Proteins, da sie unter denaturierenden Bedingungen stabil ist (Abb. 33A, Spur 2). Dass diese Instabilität mit dem alkalischen pH-Wert des Gels in Zusammenhang steht, wurde durch eine pH-Reihe nachgewiesen (Daten nicht gezeigt; Blokesch *et al.*, 2004a). Der zugrunde liegenden chemischen Reaktion wurde jedoch nicht weiter nachgegangen.

5.2. Kinetik der Transcarbamoylierung

In dem von Reissmann *et al.* (2003) publizierten Transcarbamoylierungs-/Dehydratisierungsansatz waren die Mengen an HypE und HypF nahezu gleich. Damit war keine Aussage möglich, ob das HypF-Protein mehrere Zyklen durchlaufen kann, oder nach Übertragung der Carboxamidogruppe inaktiviert vorliegt und nur in der Zelle regeneriert werden kann. Zu diesem Zweck wurde die Markierung des HypE-Proteins durch Übertragung der ^{14}C -Carboxamidogruppe mit stark unterstöchiometrischen HypF-Mengen (1:100 verdünnt) getestet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die ablaufende Reaktion

wurde unterbrochen und die stattgefundene HypE Markierung überprüft (Abb. 34). Falls HypF nicht mehrere Zyklen vollziehen kann, wäre die Reaktion nach kurzer Zeit beendet und das markierte HypE schwach oder nicht detektierbar.

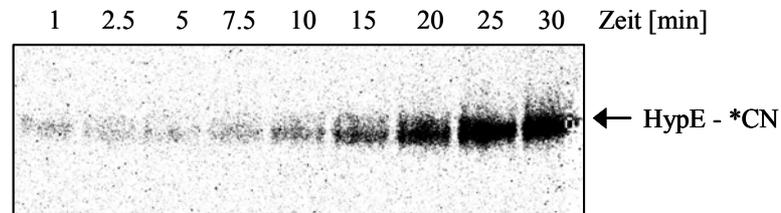


Abbildung 34: Kinetik der Transcarbamoylierungsreaktion von HypF und der ATP-abhängigen Dehydratisierung durch HypE. Das HypE Protein (2 μM) wurde mit ATP (100 μM), [^{14}C]-CP (100 μM) und HypF im Verhältnis 100 : 1 gemischt und bei 25°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Reaktion wurde durch Zugabe von Auftragspuffer und Temperaturänderung auf 4°C gestoppt. Die Proteine aller Proben wurden anschließend in einem 10%-igen Gel durch ND-PAGE aufgetrennt, auf eine NC-Membran transferiert und die ^{14}C -Markierung durch Exposition einer Tritiumscreen-Kassette bestimmt. Das ^{14}C -markierte HypE-Protein wird durch einen Pfeil angezeigt.

Wie Abbildung 34 zu entnehmen ist, nimmt die Markierung von HypE jedoch stetig zu; erst nach etwa 20 min stellt sich eine Sättigung ein.

5.3. HypE und HypF Interaktion

Das radioaktive Material im oberen Teil von Abbildung 33B, wird als HypE \times HypF Komplex bezeichnet, da es vom Laufverhalten im nicht-denaturierenden Gel mit Signalen im Westernblot mit anti-HypE und anti-HypF Antikörpern übereinstimmt (Daten nicht gezeigt). Um diese Annahme zu erhärten, wurde die Transcarbamoylierungs- und Dehydratisierungsreaktion mit verschiedenen Mengenverhältnissen zwischen HypE und HypF durchgeführt (Abb. 35).

Bei annähernd stöchiometrischem Verhältnis zwischen HypE und HypF, wurde die meiste Radioaktivität (des HypE-*CN) auf Höhe des HypE \times HypF Komplexes detektiert (Abb. 35, Spur 1). Bei Verringerung der HypF Menge wurde die Wanderungsposition von HypE weniger „geschifft“, bis hin zur freien Form von HypE-*CN. Diese Form ist dominant, wenn HypE im Überschuss vorliegt (Abb. 35, Spuren 8 und 9).

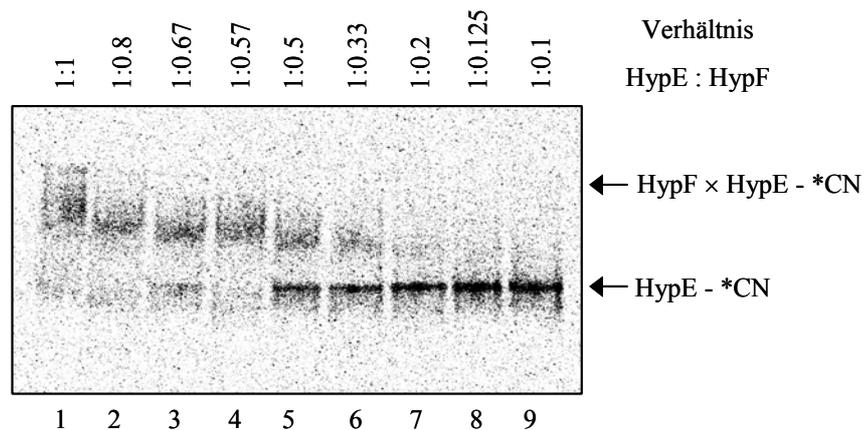


Abbildung 35: Wanderungsverhalten von HypE im nicht-denaturierenden Gel in Abhängigkeit von HypF. Reaktionsansätze mit 2 μ M HypE und HypF von 0.2 bis 2 μ M wurden mit [14 C]-CP und ATP zur Durchführung der Transcarbamoylierung/Dehydratisierung für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Mengenverhältnisse zwischen HypE und HypF sind über jeder Spur angegeben. Die Identität der durch Pfeile markierten Signale als HypE und HypE \times HypF Komplex wurde durch Westernblotanalyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Dieser Versuch zeigt, dass die HypE-Wanderung im nicht-denaturierenden Gel vom HypF Protein beeinflusst wird, und dass sowohl eine funktionelle (Übertragung der Carbamoylgruppe), als auch direkte Interaktion stattfindet.

5.4. HypE-Monomer als Akzeptor der Carbamoylgruppe

Wurde das Elutionsprofil von HypE in der Gelfiltration mit dem von Standardproteinen verglichen, so befand es sich hauptsächlich in der Position eines Monomers (Daten nicht gezeigt). Ein Teil eluierte jedoch stets als Homodimer, ein Befund der auch nach Auftrennung in SDS-Gelen mit geringer DTT-Konzentration gezeigt wurde (Reissmann *et al.*, 2003). Ob die HypE Proteine im Homodimer durch eine Disulfidbrücke verknüpft sind, wurde im nächsten Versuch getestet (Abb. 36). Hierfür wurden die gereinigten Proteine HypE (WT), HypE[D83N] (ohne ATPase-Aktivität; siehe unten) und HypE Δ (HypE Δ Cys336; Reissmann *et al.*, 2003, darin als Cys332 benannt) verwendet. Sie wurden ohne und mit 50 mM DTT inkubiert und anschließend durch nicht-denaturierende SDS-PAGE bei Raumtemperatur aufgetrennt (Abb. 36 A). Zusätzlich wurde mit [14 C]-CP und Filterbindung getestet, ob die HypE-Varianten von HypF carbamoyliert werden können (Abb. 36B).

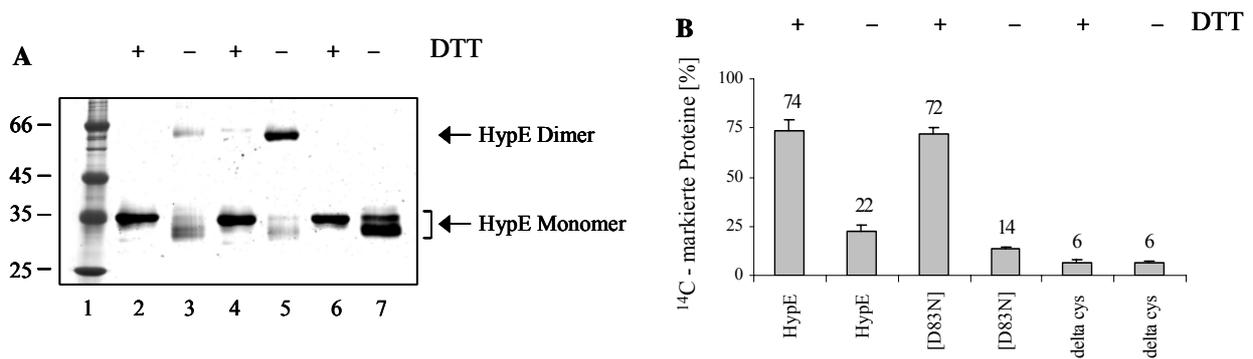


Abbildung 36: HypE-Monomer als Akzeptor der Carbamoylgruppe. (A) Die Proteine (je 12 μ M) HypE (Spuren 2 und 3), HypE[D83N] (Spuren 4 und 5) und HypE Δ cys (Spuren 6 und 7) wurden mit (Spuren 2, 4 und 6) und ohne DTT (Spuren 3, 5, und 7) inkubiert und anschließend auf ihr Laufverhalten im SDS-Gel (A) und die Fähigkeit, die 14 C-Carbamoylgruppe von HypF zu akzeptieren (B) analysiert. (A) Die Proteine wurde durch 10%-ige nicht-denaturierende SDS-Gele aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die monomere und dimere Form von HypE und dessen Varianten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Spur 1: Proteinstandard. (B) Die Proteine wurden nach Vorinkubation mit und ohne DTT zur Durchführung der Transcarbamoylierung und Dehydratisierung mit HypF, ATP und [14 C]-CP versetzt. Die 14 C-Markierung wurde durch Filterbindungstests bestimmt und auf die eingesetzte Proteinmenge umgerechnet. Die Werte zeigen den Durchschnitt aus drei unabhängigen Messung \pm Standardabweichung.

Man sieht, dass das HypE-Dimer durch Inkubation mit DTT gespalten wird (Abb. 36A, Spuren 2 und 4); die HypE Δ cys-Variante liegt auch in Abwesenheit von DTT als Monomer vor (Abb. 36A, Spur 7). Die Fähigkeit von HypE, die [14 C]-Carbamoylgruppe von HypF zu akzeptieren, wurde durch Vorinkubation mit DTT verdreifacht (Abb. 36B); die HypE Δ cys Mutante kann nicht markiert werden (36B und Reissmann *et al.*, 2003).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Dimer aus disulfidisch verknüpften HypE Proteinen besteht, wobei die Disulfidbrücke aus den C-terminalen Cysteinen gebildet wird. Die Übertragung der Carbamoylgruppe erfolgt auf die Thiolgruppe des C-terminalen Cysteins, wozu die monomere Form erforderlich ist.

5.5. ATPase-Aktivität von HypE

Die Sequenz des HypE-Proteins weist Ähnlichkeit zu denjenigen von Thiaminmonophosphat-Kinase (ThiL), zur Selenophosphat-Synthetase (Seld) und zur Aminoimidazol Ribonukleotid-Synthetase (PurM) auf (Li *et al.*, 1999). Für PurM (Schrimsher *et al.*, 1986), Seld (Ehrenreich *et al.*, 1992) und ThiL (Imamura und Nakayama, 1982) war bekannt, dass sie ATP umsetzen (Li *et al.*, 1999), für das HypE Protein wurde dies erstmals in der Diplomarbeit von A. Bauer

gezeigt (Bauer, 2002). Hieraus wurde postuliert, dass HypE eine ATP-abhängige Dehydratisierung der Carboxamidogruppe durchführt, ähnlich der Reaktion des PurM-Proteins. Dass dies wirklich der Fall ist, wurde später gezeigt (Reissmann *et al.*, 2003). Die Ähnlichkeit von HypE zu PurM bezog sich besonders auf einige Positionen bzw. Sequenzabschnitte, die zur ATP- oder Mg^{2+} -Bindung notwendig sind (Li *et al.*, 1999). Die Untersuchungen der ATPase-Aktivität von HypE durch A. Bauer ergaben, dass HypE ATP in ADP und anorganisches Phosphat spaltet (Bauer, 2002). Die Hydrolyse wird nicht durch Carbamoylphosphat beeinflusst (Bauer, 2002 und S. Reissmann; persönliche Mitteilung). Die ATPase-Aktivität wurde im Zuge dieser Arbeit weiter untersucht und die kinetischen Konstanten wurden bestimmt. Dies geschah mit Hilfe von γ -markiertem [^{32}P]-ATP (siehe Material und Methoden). Die Reaktion fand bei 25°C statt, vergleichbar den Transcarbamoylierungs-/Dehydratisierungsreaktionen von HypF und HypE. Aus den erhaltenen Daten wurde ein Lineweaver-Burk Diagramm erstellt (Daten nicht gezeigt). Der K_m -Wert des HypE-Proteins lag bei 25 μM (Durchschnitt aus fünf unabhängigen Messungen). Parallel hierzu wurden auch die kinetischen Konstanten der HypE-Varianten bestimmt (siehe 5.6.). Dabei stellte sich heraus, dass die HypE[D83N]-Variante keine ATPase-Aktivität aufweist (Abb. 37), was auch für das HypE[A76V D83N]-Protein gefunden wurde (Daten nicht gezeigt). Durch Deletion des C-terminalem Cysteins (HypE Δ) reduzierte sich die ATPase-Aktivität (Abb. 37); der erhaltene K_m -Wert lag bei 47 μM .

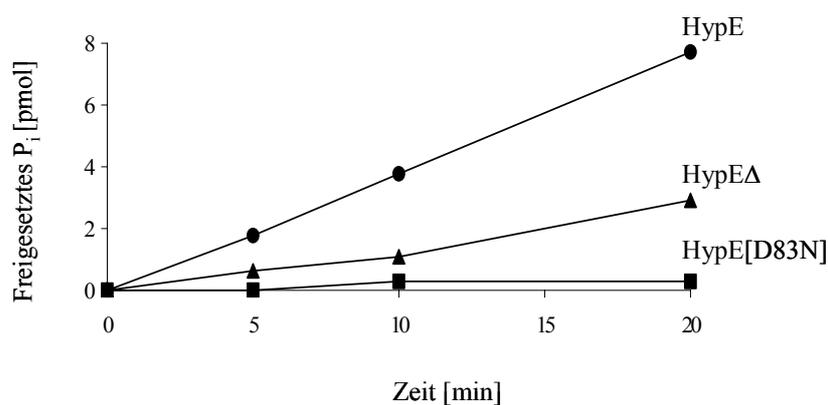


Abbildung 37: Freisetzung von P_i aus ATP durch das HypE Protein und dessen Varianten. 2 μM HypE, HypE Δ oder HypE[D83N] wurden mit ATP (40 μM ; Gemisch aus kaltem und γ -markiertem [^{32}P]-ATP) inkubiert und das freigesetzte P_i wurde bestimmt.
 Legende: ● HypE, ▲HypE Δ , ■ HypE[D83N].

Da die HypE[D83N]-Variante keine ATPase-Aktivität besitzt wird angenommen, dass der Aspartat 83-Rest, vergleichbar zum PurM-Protein (Li *et al.*, 1999), tatsächlich an der Bindung des Mg^{2+} -Ions beteiligt ist.

Versuche mit den ATP-Analoga AMP-CH₂-PP und ADP-CH₂-P (AMP-P-CH₂-P) zeigten, dass in Anwesenheit von ADP-CH₂-P der Transfer der Carbamoylgruppe vom HypF zum HypE Protein noch möglich ist; AMP-CH₂-PP ließ keinen Transfer mehr zu (Reissmann *et al.*, 2003). Da das HypF Protein in Anwesenheit von Carbamoylphosphat ATP in AMP und PP_i spaltet (Paschos *et al.*, 2002), waren diese Ergebnisse erwartungsgemäß. HypE hingegen hydrolysiert ATP in ADP + P_i, kann somit das ATP-Analogon ADP-CH₂-P nicht als Substrat verwenden und keine Dehydratisierung der von HypF-erhaltenen Carboxamidogruppe zur Cyanogruppe durchführen (Reissmann *et al.*, 2003). Die Frage, ob HypE das ATP Analogon AMP-CH₂-PP nutzen kann, sollte nun geklärt werden.

Hierzu wurden die Proteine HypF und HypE zunächst mit ADP-CH₂-P und [¹⁴C]-CP zur Durchführung der Transcarbamoylierung inkubiert und anschließend wurde AMP-CH₂-PP zur Dehydratisierung von -CONH₂ zum -CN zugegeben. Die Proben wurden durch die unter Punkt 5.1. beschriebenen Elektrophoresebedingungen aufgetrennt, um zwischen HypE -CONH₂ und HypE-CN unterscheiden zu können. Die Carbamoylgruppe wurde zwar von HypF auf HypE übertragen (wie schon durch Massenspektrometrie gezeigt; Reissmann *et al.*, 2003), HypE konnte das ATP-Analogon AMP-CH₂-PP jedoch nicht zur Dehydratisierung nutzen (Daten nicht gezeigt).

Dies kann zwei Gründe haben: AMP-CH₂-PP kann entweder nicht gebunden oder nicht hydrolysiert werden. Um zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde die Transcarbamoylierungs-/Dehydratisierungsreaktion als Konkurrenzexperiment zwischen ATP und AMP-CH₂-PP durchgeführt (Abb. 38). Dabei wurde die ATP-Konzentration konstant gehalten (100 μ M), die AMP-CH₂-PP Konzentrationen jedoch variiert (25 bis 2000 μ M).

Es stellte sich heraus, dass die ATP-abhängige Konversion des HypE-thiocarboxamids zum HypE-thiocyanat durch Anwesenheit von AMP-CH₂-PP inhibiert wird; je größer der Überschuss an AMP-CH₂-PP gegenüber ATP war, desto mehr HypE enthielt die Carboxamidoform und desto weniger HypE-*CN konnte detektiert werden (Abb. 38).

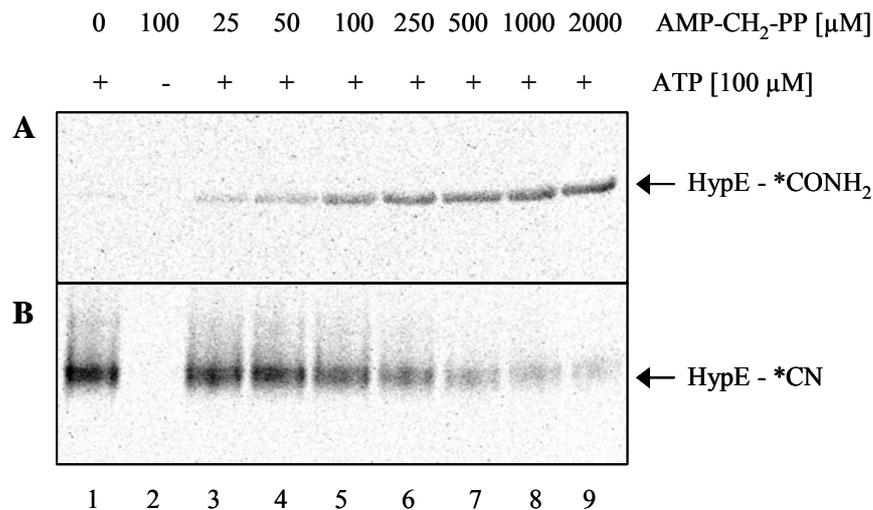


Abbildung 38: Hemmung der ATP-abhängigen Dehydratisierung durch HypE in Anwesenheit von AMP-CH₂-PP. HypE (2 μ M) und HypF (0.2 μ M) wurden mit [¹⁴C]-CP (100 μ M) und ATP (100 μ M; nicht in Spur 2) inkubiert. AMP-CH₂-PP war in den Proben der Spuren 2 bis 9 in der angegebenen Konzentration vorhanden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte wie in Abb. 33 beschrieben durch „mild“-denaturierende SDS- (A) bzw. nicht-denaturierende PAGE (B). Die Signale von HypE-CONH₂ und HypE-CN sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Daten sprechen dafür, dass AMP-CH₂-PP von HypE gebunden wird und mit der ATP-Bindung kompetitiert, eine mit der Dehydratisierung einhergehende Hydrolyse von AMP-CH₂-PP jedoch nicht möglich ist. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass AMP-CH₂-PP unspezifisch an HypE bindet und dadurch die ATP-Bindung oder Hydrolyse stört.

5.6. Analyse von HypE-Varianten

Ein Sequenzvergleich zwischen HypE Proteinen verschiedener Organismen zeigte, dass das C-terminale PRIC-Motiv konserviert ist (Reissmann *et al.*, 2003). Da mittlerweile bekannt ist, dass die Cyanidliganden am C-terminalem Cystein (Cys 336 in *E. coli*) synthetisiert werden, ist die Notwendigkeit des Cysteins einleuchtend. Trotzdem wurde die von S. Reissmann gereinigte HypEA-Variante, die kein C-terminales Cystein mehr besitzt, in den weiteren Untersuchungen mitgeführt. Die ebenfalls untersuchten HypE-Varianten waren HypE[D83N] und HypE[A76V D83N]. Sowohl die Konstruktion der Überexpressionsplasmide als auch die Überproduktion und Reinigung wurden von A. Paschos und E. Zehelein durchgeführt.

Die vorhergehenden Ergebnisse zusammenfassend ist bisher über das HypE Δ -Protein bekannt, dass es keine Homodimere bildet, im Vergleich zum WT-HypE-Protein verringerte ATPase-Aktivität besitzt und durch [^{14}C]-CP in der Transcarbamoylierungs-/Dehydratisierungsreaktion keine ^{14}C -Markierung erhält. Die HypE[D83N]-Variante weist dagegen keine ATPase-Aktivität auf, bildet vergleichbar dem WT-HypE-Protein Homodimere durch disulfidische Verknüpfung der C-terminalen Cysteine und kann C-terminal carbamoyliert werden. Ob HypE[D83N] trotz fehlender ATPase-Aktivität die Dehydratisierung der Carboxamido- zur Cyanogruppe durchführen kann, sollte herausgefunden werden. Parallel hierzu wurde die ebenfalls ATPase negative HypE[A76V D83N]-Variante getestet (Abb. 39). Hierzu wurde HypE oder seine Varianten mit HypF, [^{14}C]-CP und ATP oder dem ATP-Analogon ADP-CH₂-P inkubiert und durch SDS- bzw. ND-PAGE auf das Vorhandensein von HypE-thiocarboxamid und HypE-thiocyanat untersucht (Abb. 39).

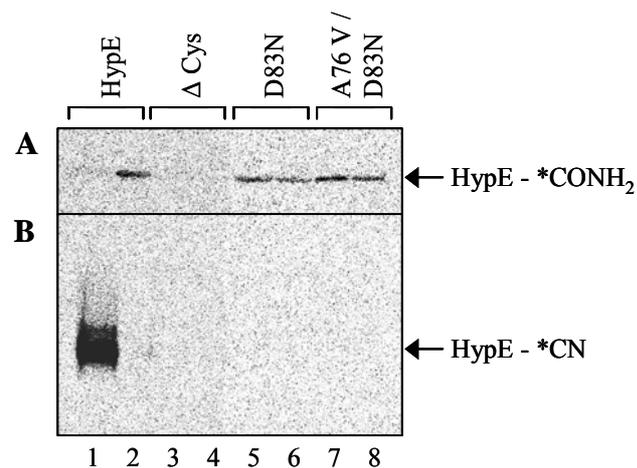


Abbildung 39: Aktivität von HypE und dessen Varianten in der Transcarbamoylierungs- und Dehydratisierungsreaktion. Jeweils 4 μM gereinigtes HypE (Spuren 1 und 2), HypE Δ (Spuren 3 und 4), HypE[D83N] (Spuren 5 und 6) und HypE[A76V D83N] (Spuren 7 und 8) wurden mit 0.5 μM HypF, [^{14}C]-CP (100 μM) und ATP (100 μM , Spuren 1, 3, 5, 7) oder ADP-CH₂-P (100 μM , Spuren 2, 4, 6, 8) für 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden wie in Abb. 33 angegeben durch SDS- (A) oder ND-PAGE (B) aufgetrennt und autoradiographiert. HypE-CONH₂ bzw. HypE-CN sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In Übereinstimmung mit den zuvor geschilderten Ergebnissen, sind die HypE-Varianten [D83N] und [A76V D83N] nicht in der Lage, den Carboxamidorest zu dehydratisieren; es kann keine Cyanogruppe gebildet werden.

5.7. HypE-Markierung durch [¹⁴C]-Citrullin

Da nun eine gute Detektion von HypE-*CN durch ND-PAGE und Autoradiographie möglich war, wurde die *in vivo* Markierungen mit [¹⁴C]-Citrullin nochmals überdacht. Durch eine Kombination aus *in vitro* und *in vivo* Versuch sollte überprüft werden, ob [¹⁴C]-Citrullin zur ¹⁴C-Markierung brauchbar ist (Abb. 40). Hierzu wurden Zellen des Stammes ΔCarAB mit und ohne Plasmid pBargI in Minimalmedium oder TGYEP (T) angezogen. Die gewonnenen Rohextrakte wurden mit [¹⁴C]-Citrullin für 10 min bei 37°C inkubiert, da in Anwesenheit der Ornithin Transcarbamoylase [¹⁴C]-CP aus [¹⁴C]-Citrullin entstehen sollte. Nach Zugabe von gereinigtem HypE, HypF und ATP wurden die Ansätze erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Proteine durch ND-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert wurden.

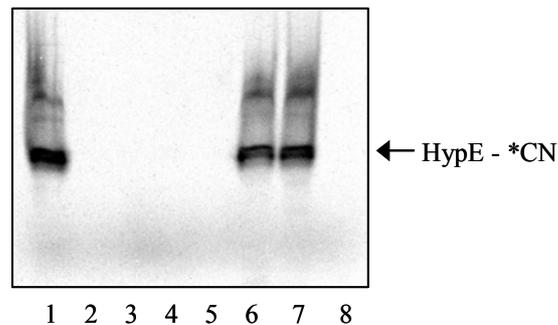


Abbildung 40: *In vitro* Markierung von HypE durch [¹⁴C]-Citrullin. Rohextrakte (100 µg) von Zellen mit oder ohne überproduzierter Ornithin Transcarbamoylase wurden mit 200 µM [¹⁴C]-Citrullin für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Proteine HypE bzw. HypEΔ (6 µM) und HypF (2 µM) sowie ATP (200 µM) wurden zugegeben und für 20 min bei 22°C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte durch ND-PAGE, die Detektion durch Autoradiographie. Spur 1: ΔCarAB/pBargI + HypE + HypF, Spur 2: ΔCarAB/pBargI + HypEΔ + HypF, Spur 3: ΔCarAB/pBargI + HypE, Spur 4: HypE + HypF, Spur 5: ΔCarAB + HypE + HypF, Spur 6: ΔCarAB/pBargI (T) + HypE + HypF, Spur 7: DHP-FΔcar/pBargI (T) + HypE + HypF, Spur 8: DHP-FΔcar/pBargI (T) + HypE. (T) weist auf Anzucht der Transformanten in TGYEP hin.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt, dass [¹⁴C]-Citrullin durch die Ornithin Transcarbamoylase *in vitro* umgesetzt und das entstandene [¹⁴C]-CP genutzt wird. Eine direkte Markierung mit [¹⁴C]-Citrullin war nicht möglich. Ein Zusammenhang der *in vivo* Versuche durch Citrullin-Zufütterung (siehe 3.1.), der Überproduktion der Ornithin Transcarbamoylase (siehe 3.2.) und der hier gezeigten *in vitro* Markierung von HypE ist ersichtlich. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bedarf es der reversen Reaktion der Ornithin Transcarbamoylase um CP aus Citrullin herzustellen, das anschließend von HypF erkannt und übertragen wird.

Doch welche Rolle spielt nun der HypC × HypD Komplex hierbei, der sich in CP defizienten Stämmen anhäuft?

5.8. Transfer des Cyanids auf den HypC × HypD Komplex

Über den HypC × HypD Komplex war bisher bekannt, dass er sich in einer $\Delta carAB$ Mutante ansammelt (siehe 3.5.) und durch Zugabe von Citrullin als alternativer Quelle für CP, einhergehend mit der Reifung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 (siehe 3.1.), wieder aufgelöst wird (siehe 4.1.). In Abwesenheit von HycE entsteht eine modifizierte Form des HypC × HypD Komplexes (siehe 4.1.). Ist dies ein Hinweis, dass das am HypE-Protein aus CP synthetisierte Cyanid auf den HypC × HypD Komplex und von dort weiter zur großen Untereinheit übertragen wird?

Um dieser Vermutung nachzugehen wurde der HypC-Strep × HypD Komplex wie unter 4.7. beschrieben durch Affinitätschromatographie (*Strep-Tactin*[®]) isoliert. Nach Vorinkubation der Proteine HypE und HypF in Gegenwart von [¹⁴C]-CP und ATP, zur Herstellung von HypE-*CN, wurde der HypC-Strep × HypD Komplex dem Ansatz zugegeben. Durch Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel, Transfer auf eine NC-Membran und Autoradiographie konnte festgestellt werden, dass HypE nicht mehr markiert vorliegt. Stattdessen konnte eine zusätzliche Bande detektiert werden (Abb. 41A), die über einen Westernblot dem HypC-Strep × HypD Komplex zugeordnet werden konnte (Abb. 41B).

Somit konnte gezeigt werden, dass *in vitro* eine Übertragung der ¹⁴C-Markierung von HypE auf den HypC × HypD Komplex möglich ist.

Folgende Voraussetzungen waren dazu nötig:

- Der HypC × HypD Komplex musste anaerob überproduziert werden; bei aerober Überproduktion war keine eindeutige Übertragung möglich.
- Der HypC × HypD Komplexes musste „frisch“ isoliert werden; die Lagerung in Glycerin unter Luft- oder N₂-Atmosphäre inaktivierte den Komplex.

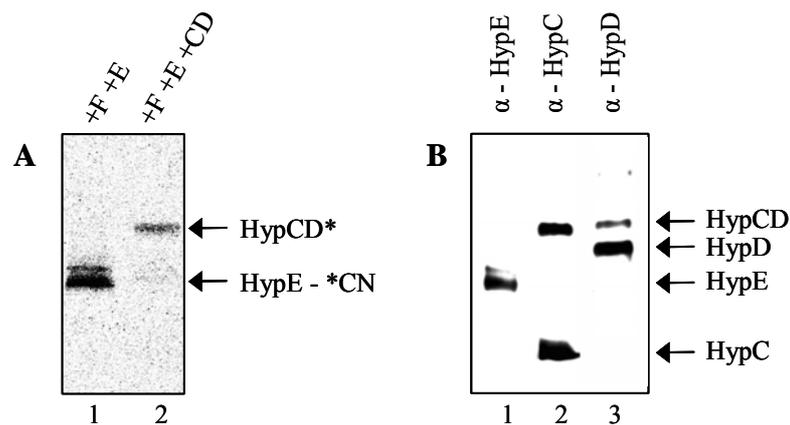
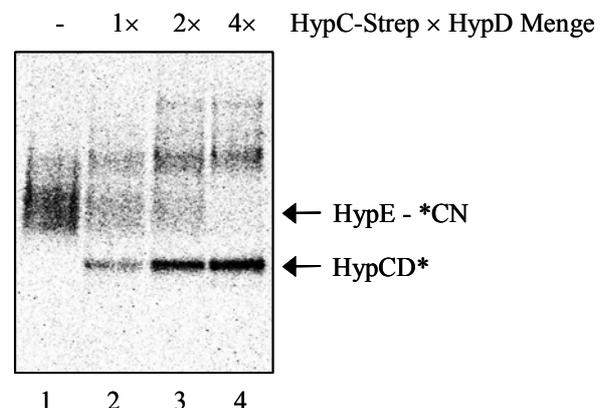


Abbildung 41: ^{14}C -Markierung des HypC-Strep \times HypD Komplexes *in vitro*. Die gereinigten Proteine HypE und HypF wurden mit $[^{14}\text{C}]$ -CP und ATP bei 25 °C inkubiert, was in markiertem HypE-*CN resultierte (Autoradiographie in A, Spur 1). Es folgte die Zugabe des HypC-Strep \times HypD Komplexes (A, Spur 2). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 10%-igen Gelen durch nicht-denaturierende SDS-PAGE. Dem Auftragspuffer wurde weder DTT noch 2-ME zugesetzt und die Proben wurden nicht erhitzt. Der Elektrophorese erfolgte im Kühlraum. Die im Ansatz von Spur 2 (A) enthaltenen Proteine wurden durch Westernblotanalyse (B) auf Ihr Wanderungsverhalten im 10%-igen nicht-denaturierende SDS-Gel untersucht. Die verwendeten Antiseren waren α -HypE (Spur 1), α -HypC (Spur 2) und α -HypD (Spur 3). Die Proteine HypC, HypD, HypE, sowie der HypC-Strep \times HypD Komplex (HypCD) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Markierung des HypC-Strep \times HypD Komplexes war auch nach nicht-denaturierender PAGE in der Autoradiographie detektierbar (Abb. 42). Die radioaktive Markierung von HypE wurde durch Zugabe einer zunehmenden Menge des HypC-Strep \times HypD Komplexes vollkommen auf den Komplex übertragen (Abb. 42).

Ein Kinetikexperiment zeigte, dass dieser Transfer bereits nach wenigen Minuten (<5 min) vollständig abgelaufen war (Daten nicht gezeigt).

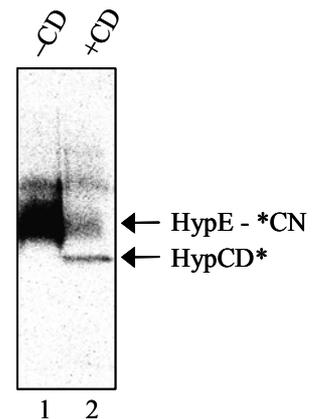
Abbildung 42: Verlagerung der ^{14}C -Markierung von HypE auf den HypC-Strep \times HypD Komplex. Autoradiographie der Markierung von HypE durch HypF, $[^{14}\text{C}]$ -CP und ATP (Spur 1). Nach Zugabe steigender Mengen des HypC-Strep \times HypD Komplexes (Spuren 2 bis 4), verschwand die Radioaktivität von HypE und konnte am HypC-Strep \times HypD Komplex detektiert werden. HypE-CN und der markierte HypC-Strep \times HypD Komplex (HypCD) sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Dass es sich um eine Übertragung der CN-Gruppe von HypE zum Komplex handelt und nicht um eine Neusynthese, wurde durch folgendes Experiment bestätigt: Die Transcarbamoylierungs- und Dehydratisierungsreaktion wurde durch HypF und HypE mit [¹⁴C]-CP und ATP durchgeführt. Anschließend folgte die Zugabe eines 100-fachen Überschusses an nicht radioaktivem CP zusammen mit dem HypC-Strep × HypD Komplex. Auch hier fand eine Übertragung der ¹⁴C-Markierung von HypE zum HypC-Strep × HypD Komplex statt (Daten nicht gezeigt). Eine Neusynthese kann somit ausgeschlossen werden.

Dass die Übertragung auch unabhängig von ATP stattfindet, wurde durch das in Abbildung 43 dargestellte Experiment gezeigt: Zunächst wurde erneut HypE-*CN *in vitro* synthetisiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend durch Filtration (Nanosep; Ausschlussgröße 10 kDa) von den Substraten ATP und [¹⁴C]-CP getrennt. Eine Hälfte der makromolekularen Fraktion wurde mit dem HypC-Strep × HypD Komplex, die andere Hälfte als Kontrolle mit Puffer inkubiert (Abb. 43).

Abbildung 43: Transfer des ¹⁴C-Cyanids ohne Neusynthese und unabhängig von ATP. HypE-*CN wurde durch Transcarbamoylierung mittels HypF und ATP-abhängiger Dehydratisierung durch HypE hergestellt und die Substrate ATP und [¹⁴C]-CP wurden durch Filtration entfernt. Die noch vorhandene Proteine HypF und HypE-*CN wurden weiter mit Puffer (Spur 1) oder mit dem HypC-Strep × HypD Komplex (Spur 2) inkubiert und anschließend durch ND-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie. HypE-CN und der markierte HypC-Strep × HypD Komplex (HypCD) sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Obleich ein Verlust an Radioaktivität stattgefunden hat, konnte eindeutig auch ein Transfer festgestellt werden (Abb. 43, Spur 2). Somit steht fest, dass eine direkte Übertragung der ¹⁴C-Markierung von HypE-¹⁴CN zum HypC-Strep × HypD Komplex stattfindet und kein weiteres Substrat dazu notwendig ist.

Nachdem geklärt war, dass eine Übertragung der Cyanidgruppe von HypE zum HypC-Strep × HypD Komplex *in vitro* stattfindet, stellte sich die Frage ob auch die Carboxamidogruppe übertragen werden kann. Da die großen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenasen zwei Cyanid- und einen CO-Liganden enthalten, wäre in diesem Fall die Synthese von CO aus der Carboxamidogruppe am HypC × HypD Komplex denkbar. Um dies zu testen wurde HypE-CONH₂ über zwei Wege hergestellt: durch Inkubation in Gegenwart von ADP-CH₂-P (siehe Abb. 33) und durch Inkubation mit der HypE[D83N]-Variante (siehe Abb. 39). Anschließend

wurde der HypC-Strep × HypD Komplex zugegeben, und die potentielle Übertragung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getestet (Abb. 44).

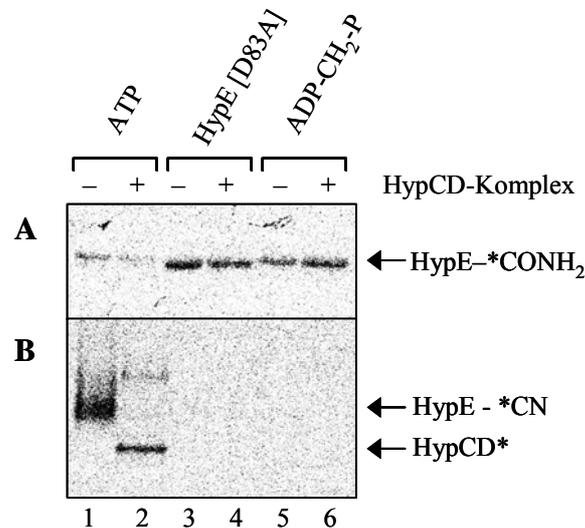


Abbildung 44: Ausschluss einer Übertragung der ¹⁴Carboxamidogruppe von HypE auf den HypC-Strep × HypD Komplex. Autoradiographie der Proteine nach *in vitro* Markierung und Auftrennung durch ein 10%-iges SDS-Gel (A) oder 10%-iges nicht-denaturierendes-Gel (B; vgl. Abb. 33) und Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran. Spur 1: HypE (4 μM) wurde mit HypF (1 μM) und 100 μM [¹⁴C]-CP und ATP inkubiert; Spur 2: zu dem Gemisch aus Spur 1 wurde zusätzlich der HypC-Strep × HypD Komplex zugegeben; Spur 3: HypE[D83N] (4 μM), HypF (1 μM), [¹⁴C]-CP (100 μM) und ATP (100 μM) wurden gemischt; Spur 4: wie Spur 3 plus HypC-Strep × HypD Komplex.; Spur 5: Inkubation von HypE (4 μM), HypF (1 μM), [¹⁴C]-CP (100 μM) and ADP-CH₂-P (100 μM); Spur 6: wie Spur 5 plus HypC-Strep × HypD Komplex.

Wie in Abbildung 44 zu sehen ist, findet keine Übertragung der Carboxamidogruppe statt. Die Radioaktivität befindet sich weiterhin am HypE-Protein.

5.9. Der HypC × HypD × HypE Komplex

Aus den bisherigen Ergebnissen ging ein Zusammenwirken zwischen HypE und dem HypC × HypD Komplex hervor: *In vivo* unter anaeroben, nicht-überproduzierenden Bedingungen war HypE zur Ausbildung des Komplexes notwendig; *in vitro* wurde der Cyanidrest vom C-terminalen Cystein auf den HypC × HypD Komplex übertragen, was eine Interaktion voraussetzt. Ob diese drei Proteine auch einen ternären Komplex ausbilden, wurde als nächstes untersucht.

Dazu musste ein Plasmid hergestellt werden, das die Proteine HypC-Strep, HypD, HypE und HypF kodiert und deren Überproduktion ermöglicht. Hierzu wurde das *hypE* Gen durch

PCR mit den phosphorylierten Primern *hypEBamHI*up & *hypEBamHI*down und pTE-C2 als Vorlage amplifiziert. Dieses wurde mit dem *Eco47III*-geschnittenem Plasmid pT-*hypDCStrep* ligiert (= Plasmid pT-*hypDECStrep*). Durch eine fehlerhafte PCR-Reaktion entstand auch das Plasmid pT-*hypDE[Mut]CStrep*, wobei das *hypE[Mut]* Gen für eine HypE-Variante mit verändertem C-Terminus kodiert (PRLCY statt PRIC). Das Plasmid pT-*hypDECStrep* wurde anschließend mit *HindIII*-geschnitten und mit einem das *hypF* Gen enthaltendem, *HindIII*-geschnittenem PCR Fragment ligiert. Die entsprechende PCR wurde mit den Oligonukleotiden *hypFHindIII*up & *hypFHindIII*down und pUCF18 als Matrize durchgeführt. Das erhaltene Plasmid pT-*hypDEFCS*Strep enthielt somit ein artifizielles Operon mit den Genen *hypD*, *hypE*, *hypC-Strep* und *hypF*.

Der Stamm BL21(DE3) wurde mit den Plasmiden pT-*hypDECStrep* bzw. pT-*hypDEFCS*Strep transformiert, die Transformanten wurden anaerob angezogen und die Gene mit IPTG induziert. Nach Aufbruch der Zellen und Herstellung des S30-Extraktes wurde das HypC-Strep-Protein durch Affinitätschromatographie an einer *Strep-Tactin*[®] Sepharose Säule herausgezogen. Die koeluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 45).

Es zeigte sich, dass nicht nur das HypD Protein zusammen mit HypC-Strep von der *Strep-Tactin*[®] Sepharose Säule eluiert wurde, sondern auch HypE (Abb. 45). Somit besteht ein Komplex aus den Proteinen HypC-Strep, HypD und HypE, allerdings mit einem geringen Anteil an HypE.

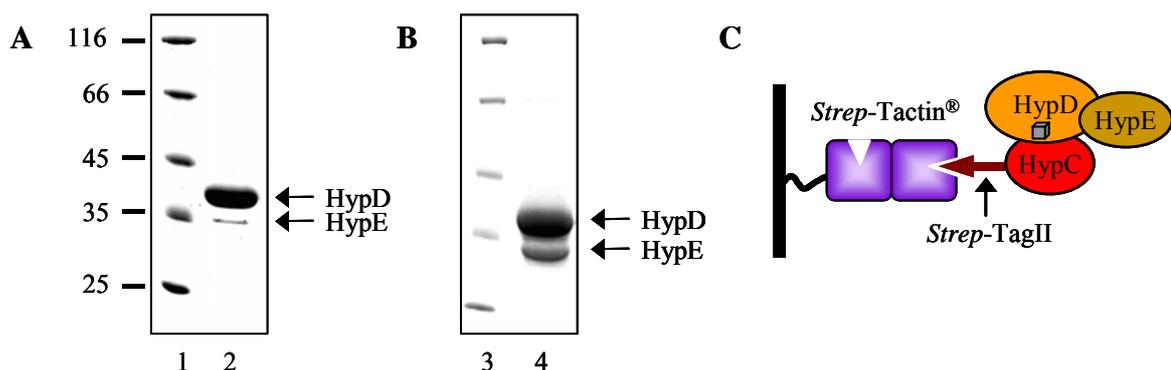


Abbildung 45: Koelution des Heterotrimeres aus HypC-Strep, HypD und HypE. Rohextrakte der Stämme BL21(DE3)/pT-*hypDECStrep* (A) und BL21(DE3)/pT-*hypDEFCS*Strep (B) wurden einer Affinitätschromatographie unterzogen. Die Elution von der *Strep-Tactin* Sepharose Säule erfolgte durch Desthiobiotin. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (10%-ige Gele) aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Spuren 1 und 3: Proteinstandard, Spuren 2 und 4: Elutionsfraktionen nach der *Strep-Tactin* Sepharose Säule. Die Proteine HypD und HypE sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das HypC Protein kann in 10%-igen SDS-Gelen nicht detektiert werden (~10 kDa). (C) Schematische Darstellung der Koelution. Die genaue Stöchiometrie ist unbekannt.

Vergleicht man die Elutionsfraktionen aus Abb. 45A (Ausgangsstamm: BL21(DE3)/pT-hypDECStrep) und Abb. 45B (Ausgangsstamm: BL21(DE3)/pT-hypDEFCSStrep), so fällt auf, dass größere Mengen an HypE koeluiert werden, wenn *hypF* von dem Plasmid koexprimiert wird. Ob dies am Vorhandensein des HypF Proteins an sich liegt oder ob durch Addition des *hypF* Gens eine Stabilisierung der mRNA erfolgte ist unklar.

Allgemein war die Überexpression von *hypE* von den Plasmiden pT-hypDECStrep und pT-hypDEFCSStrep schlecht, da das *hypE* Gen mit einem GTG Kodon beginnt und die HypE-eigene Shine-Dalgarno-Sequenz nicht auf dem Plasmid enthalten ist.

Das HypF Protein scheint nicht am HypC-Strep × HypD × HypE Komplex beteiligt zu sein, da keine Koelution von HypF erfolgte. Dies wurde in Abbildung 45B, Spur 4 und zusätzlich durch Westernblotanalysen gezeigt.

Ob auch eine Koelution von HypC-Strep und HypE in Abwesenheit des HypD-Proteins stattfindet, wurde als nächstes untersucht. Hierzu wurde aus dem *hypD* Gen der Plasmide pT-hypDECStrep und pT-hypDEFCSStrep ein *Bsa*BI-Fragment herausgeschnitten und das restliche Plasmidfragment religiert. Das Δ *hypD*-Gen der Plasmide pT Δ DEC-Strep und pT Δ DEFCSStrep kodiert für ein stark verkürztes HypD-Protein (ca. 18 kDa), dem sämtliche wichtigen Motive (CGxHxH, GPGCPVC, GFETT) fehlen. Die Durchführung der Affinitätschromatographie mit Rohextrakten der Transformanten BL21(DE3)/pT Δ DEC-Strep und BL21(DE3)/pT Δ DEFCSStrep ergab, dass HypE nicht mit HypC-Strep koeluiert. Somit ist das HypD Protein notwendig, um eine Koelution von HypC-Strep und HypE zu erzielen (Daten nicht gezeigt).

5.10. Funktionalität des HypC × HypD × HypE Komplexes

Obwohl eine Interaktion zwischen HypE und dem HypC × HypD Komplex durch Koelution in der Affinitätschromatographie gezeigt wurde, konnte dieser trimere Komplex in ND-Gelen nicht mit Sicherheit aufgelöst werden. Es sollte deswegen durch ¹⁴C-Markierung getestet werden, ob der HypC × HypD × HypE Komplex funktionsfähig ist. Hierzu wurde gereinigtes HypF Protein mit eluierten HypC-Strep × HypD × HypE Komplex in Anwesenheit von ATP und [¹⁴C]-CP bei 25°C inkubiert und die Produkte wurden durch ND-PAGE und Autoradiographie bestimmt. Abbildung 46 zeigt, dass die Markierung auf den HypC-Strep × HypD Komplex übertragen wird.

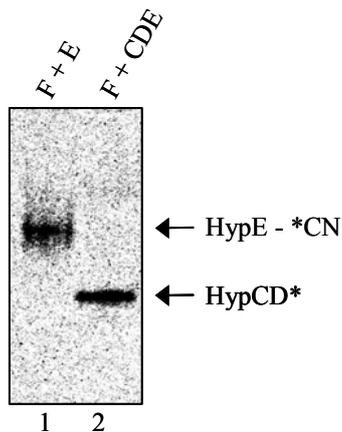


Abbildung 46: Funktionalität von HypE im HypC × HypD × HypE-Komplex. Das HypF Protein wurde zusammen mit dem eluierten HypC × HypD × HypE-Komplex, [¹⁴C]-CP und ATP inkubiert (Spur 2). Die Transcarbamoylierung, Dehydratisierung und die Übertragung auf den HypC-Strep × HypD Teil des HypC-Strep × HypD × HypE-Komplexes wurde durch Auftrennung der Proteine im 10%-igen nicht-denaturierenden Gel und Autoradiographie gezeigt. Als Kontrolle diente der Standardansatz von HypF und HypE (Spur 1). Die Signale von HypE-CN und des HypC-Strep × HypD-Komplexes (HypCD*) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

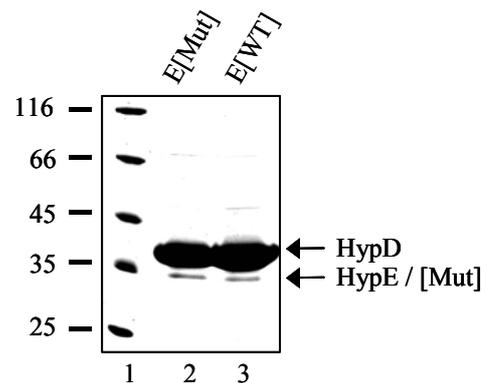
Da eine Markierung des HypC-Strep × HypD-Komplexes durch HypF in Abwesenheit von HypE nicht möglich war (Daten nicht gezeigt), muss aktives HypE Protein im trimeren Komplex vorliegen (Abb. 46).

5.11. HypC × HypD Komplex mit mutantem HypE

Wie unter 5.9. beschrieben, wurde bei der Klonierung des pT-hypDECStrep Plasmids ein *hypE* Allel erzeugt (pT-hypDE[Mut]Cstrep), dessen kodierte HypE-Variante (im weiteren als HypE[Mut] genannt) C-terminal mit den Aminosäuren PRLCY statt PRIC endet. Da der C-Terminus in HypE-Proteinen einiger Organismen als PRVC (in Archaea; zum Beispiel in *Methanocaldococcus jannaschii* oder *Methanosarcina mazei* Gö1) oder PRLC (zum Beispiel *Bacillus anthracis* oder *B. cereus*) vorliegt, sollte der Austausch [I335L] der HypE[Mut]-Variante keinen Funktionsverlust bewirken. Das zusätzlich kodierte Tyrosin (Y337) nimmt dem Cystein allerdings seine C-terminale Position. Sollte diese Variante noch aktiv sein, ist die Carboxygruppe des Cysteins für dessen Akzeptorfunktion und die Dehydratisierung unnötig.

Auch sollte mit Hilfe dieser Mutante untersucht werden, ob der Besitz des C-terminalen Cysteins zur Komplexbildung von HypE mit HypC × HypD notwendig ist (Abb. 47).

Abbildung 47: Koelution von HypE bzw. HypE[Mut] mit HypC-Strep und HypD. Die Transformanten BL21(DE3)/pT-hypDE[Mut]Cstrep (Spur 2) und BL21(DE3)/pT-hypDECStrep (Spur 3) wurden unter aeroben Bedingungen angezogen und die entsprechenden Rohextrakte einer Affinitätschromatographie unterworfen. Zusammen mit dem HypC-Strep-Protein konnten HypD und die HypE [Mut]-Variante (Spur 2) bzw. das HypE-WT Protein (Spur 3) koeluiert werden. Die eluierten Proteine wurden in einem 10%-igen Gel durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Proteine HypD und HypE bzw. HypE[Mut] sind durch Pfeile angezeigt.



Die Überproduktion der HypE[Mut]-Variante im Stamm BL21(DE3)/pT-hypDE[Mut]CStrep war vergleichbar mit der Überproduktion des Wildtyp-HypE-Proteins in der Transformante BL21(DE3)/ pT-hypDECStrep. Das Protein HypE[Mut] war stabil und konnte zusammen mit HypC-Strep und HypD von der *Strep*-Tactin[®] Sepharose Säule eluiert werden (Abb. 47).

Versuche zur Transcarbamoylierung, Dehydratisierung und zum Cyanid-Transfer im trimeren Komplex HypC-Strep \times HypD \times HypE[Mut] zeigten dagegen keine ¹⁴C-Markierung (Daten nicht gezeigt). Wurde diesem Ansatz (HypF, ATP, [¹⁴C]-CP und HypC-Strep \times HypD \times HypE[Mut]) zusätzlich Wildtyp-HypE zugegeben, erfolgte dessen Markierung und der Transfer auf den vorhandenen HypC \times HypD Komplex (Daten nicht gezeigt).

Es muss gefolgert werden, dass das HypE[Mut]-Protein die ¹⁴C-Carbamoylgruppe von HypF nicht akzeptieren oder sie nicht zu CN dehydratisieren kann.

5.12. Inhibition des Cyanid-Transfers

Wie bereits beschrieben, bedarf es zweier wichtiger Voraussetzungen, damit der ¹⁴C-Cyanidrest von HypE auf den HypC \times HypD Komplex übertragen werden kann: Der HypC \times HypD Komplex sollte erstens aus anaerob angezogenen Zellen stammen und zweitens frisch isoliert sein. Diese Bedingungen deuteten darauf hin, dass der Redoxzustand des Eisen-Schwefel-Clusters für die Übertragung von Bedeutung ist. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde das Cluster durch Zugabe von Ferricyanid (Kaliumhexacyanoferrat (III); K₃[Fe(CN)₆]) oxidiert (Abb. 48). Ferricyanid ist ein gängiges Oxidationsmittel für Eisen-Schwefel-Cluster (Sridhar *et al.*, 1998).

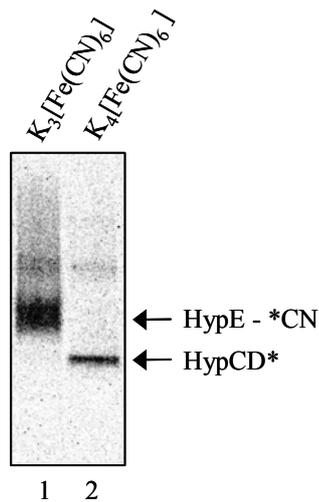


Abbildung 48: Hemmung der ^{14}C -Übertragung von HypE zum HypC \times HypD Komplex durch Kaliumhexacyanoferrat (III). Autoradiographie der Proteine nach *in vitro* Markierung und Auftrennung durch nicht-denaturierende PAGE. HypE, HypF, ATP und ^{14}C -CP wurden inkubiert um HypE- ^{14}C zu erhalten. Parallel wurde der HypC \times HypD \times HypE Komplex mit Kaliumhexacyanoferrat (III) (Spur 1) oder als Kontrolle mit Kaliumhexacyanoferrat (II) (Spur 2) inkubiert und anschließend mit HypE- ^{14}C vereint. Die markierten Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das Ergebnis zeigt, dass der ^{14}C -Cyanidrest nicht von HypE auf den HypC \times HypD Komplex übertragen werden kann, wenn dieser zuvor mit Kaliumhexacyanoferrat (III) behandelt wurde (Abb. 48). Als Kontrolle sieht man in Spur 2, dass im Gegensatz hierzu, Kaliumhexacyanoferrat (II) keine Hemmung der Übertragung verursacht.

Eine Umkehrung des Ferricyanid-Effekts durch Titration mit Ferrocyanid war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Ob das Eisen-Schwefel-Cluster in HypD durch Ferricyanid oxidiert, zum $[\text{3Fe-4S}]$ -Cluster umgewandelt oder komplett zerstört wurde, ist noch offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine Hemmung der Übertragung der ^{14}C -CN-Gruppe wurde auch durch sulfhydryl-modifizierende Reagenzien, zum Beispiel DTNB, Iodacetamid und Iodessigsäure bewirkt. Die meisten Versuche wurden mit DTNB durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Bedingungen getestet: Zunächst wurde die Transcarbamoylierung und Dehydratisierung durch HypF und HypE mit ATP und ^{14}C -CP durchgeführt. War zu diesem Zeitpunkt bereits DTNB im Ansatz enthalten, kam es zu keiner ^{14}C -Markierung, da in diesem Fall das C-terminale Cystein von HypE blockiert wird. Wurde der HypC \times HypD Komplex parallel mit DTNB inkubiert und anschließend mit dem HypF/HypE- ^{14}C -Ansatz gemischt, wurde die ^{14}C -Gruppe nicht übertragen (Abb. 49A).

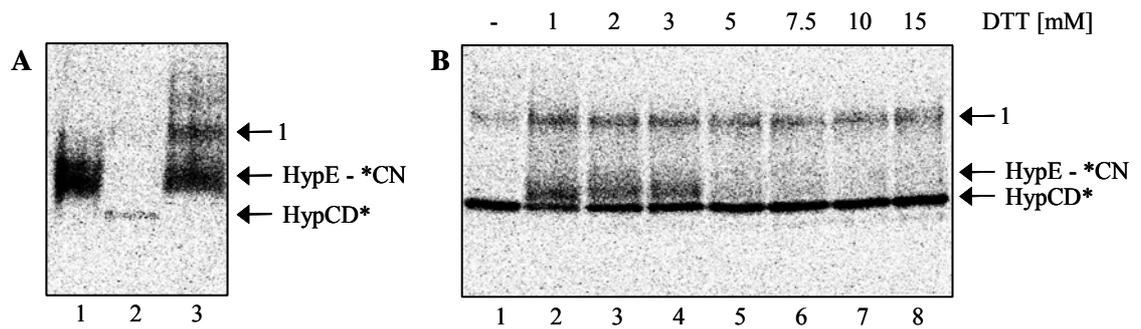


Abbildung 49: Hemmung des ^{14}C -Cyanid-Transfers durch DTNB. Autoradiographie der Proteine nach *in vitro* Markierung und Auftrennung durch nicht-denaturierende PAGE in 10%-igen Gelen. HypE- ^{14}C N wurde zunächst durch Inkubation der gereinigten HypF und HypE Proteine plus ATP und [^{14}C]-CP hergestellt (A, Spur 1). Es folgte die Zugabe des eluierten HypC-Strep \times HypD (A, Spur 2) bzw. HypC-Strep \times HypD \times HypE Komplexes (B, Spur 1). In den restlichen Spuren wurde der Komplex mit 10 mM DTNB vorinkubiert und anschließend mit dem HypF/HypE- ^{14}C N Ansatz vereint (A, Spur 3; und B, Spuren 2 bis 8). (B) In den Ansätzen der Spuren 2 bis 8 war zusätzlich DTT in angegebener Konzentration enthalten. Die Proteine HypE-CN und der HypC-Strep \times HypD Komplex sind durch Pfeile markiert. Das mit ^{14}C markierte ^{14}C -Signal könnte auf einen HypCDE-CN Komplex hindeuten (siehe Diskussion).

Wurde der HypC \times HypD Komplex zuerst mit HypF/HypE- ^{14}C N vereint und anschließend mit DTNB behandelt, hatte dies keinen Einfluss auf die Markierung der HypC \times HypD-Bande (Daten nicht gezeigt).

Um festzustellen, ob die DTNB Markierung der Cysteine reversibel ist, wurde den Übertragungsansätzen DTT zugegeben (Abb. 49B). DTT sollte mit gebundenem und freiem DTNB interagieren und die Proteine regenerieren. Wie man Abb. 49B entnehmen kann, konnte tatsächlich die Übertragung der ^{14}C -Gruppe auf den HypC \times HypD Komplex wieder stattfinden (Spur 2 bis 8). Ob und wenn ja welche notwendigen Cysteinen DTNB in HypD oder HypC blockiert konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden.

DISKUSSION

Die Untersuchung der Synthese von Metall enthaltenden Enzymen hat in den letzten Jahren viele überraschende Ergebnisse gebracht. Von den „einfacheren“ Metallkofaktoren, den Eisen-Schwefel-Clustern, bis hin zu komplizierten Metalloenzymen wie der Nitrogenase, der CO-Dehydrogenase, Acetyl-CoA Synthase oder der Urease benötigen sie alle zur korrekten Assemblierung in der Zelle Hilfs- oder Gerüstproteine. Es ist also nicht verwunderlich, dass auch die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen einen komplizierten Prozess durchläuft. Die beteiligten Hilfs- oder akzessorischen Proteine werden durch die *hyp* Gene kodiert (*hypA-E* und *hypF*; Lutz *et al.*, 1991; Maier *et al.*, 1996). Zusätzlich werden die Genprodukte des *nik* Operons benötigt (Wu und Mandrand-Berthelot, 1986; Wu *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1993), um die hochaffine Nickelaufnahme zu gewährleisten (Übersichtsartikel: Eitinger und Mandrand-Berthelot, 2000; Mulrooney und Hausinger, 2003). Die Expression des *nik* Operons wird vom FNR Protein gesteuert (Wu und Mandrand-Berthelot, 1986) und ist deshalb auf anaerobe Wachstumsbedingungen angewiesen. Liegt Nickel in hoher Konzentration im Medium vor, wird die Expression des *nik* Operons unterdrückt (Wu und Mandrand-Berthelot, 1986; Wu *et al.*, 1989) und die Nickelaufnahme erfolgt unspezifisch über CorA, ein Magnesiumaufnahmesystem (Park *et al.*, 1976; Smith und Maguire, 1998). Neben dem *hyp* und *nik* Operon bedarf es auch der Produkte des *carAB* Operons, das die Carbamoylphosphat Synthetase (CPSase) kodiert (Barrett *et al.*, 1984; Paschos *et al.*, 2001). Über Carbamoylphosphat war zuvor bekannt, dass es nur für die Synthese von Arginin und Pyrimidinen notwendig ist. Die Regulation der Transkription und die allosterische Kontrolle der CPSase (durch Ornithin, UMP, IMP) stellt einen komplexen Prozess dar. Es wurde kürzlich gezeigt, dass sogar Purine eine Repression der Expression des *carAB* Operons bewirken, um ein Gleichgewicht an Pyrimidinen und Purinen in der Zelle zu gewährleisten (Devroede *et al.*, 2004).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern Informationen über die Funktion einiger Hyp Proteine. Abbildung 50 zeigt ein gegenüber dem in Abb. 7 dargestellten aktualisiertes Reifungsschema, das die Daten dieser Arbeit beinhaltet. Anhand dieser Skizze sollen die untersuchten Punkte beschrieben und diskutiert werden.

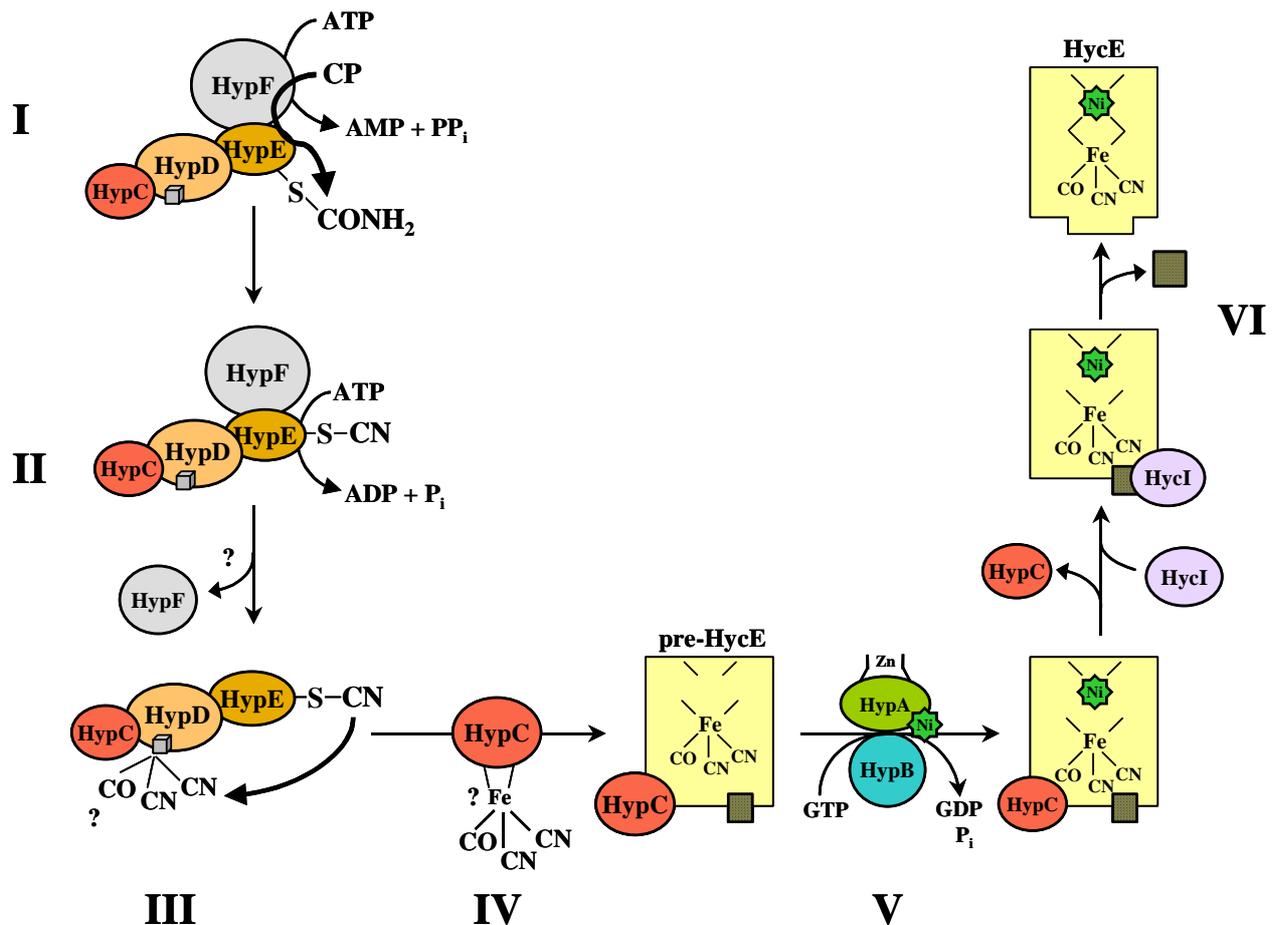


Abbildung 50: Reifungsmodell der Hydrogenase 3 von *E. coli* im Jahr 2004. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in die Abbildung integriert. Folgende Teilreaktionen finden statt: I) Transcarbamoylierung, II) Dehydratisierung, III) Cyanid-Übertragung, IV) postulierte Übertragung des Eisen-Zentrums V) Nickeleinbau, VI) C-terminale Prozessierung. Erläuterungen siehe Text. Der graue Kubus stellt das Eisen-Schwefel-Zentrum von HypD dar.

1. Das HypD Protein

Wie in Abbildung 50 dargestellt, besitzt das HypD Protein ein Eisen-Schwefel-Cluster, was schon früher postuliert wurde, da gereinigtes HypD Protein bräunlich erschien (Drapal, 1998), und 3.8 (Jacobi, 1994) bzw. 3.3 (Drapal, 1998) Eisen pro HypD nachgewiesen wurden. Von N. Drapal in Kooperation mit S. P. J. Albracht (Swammerdam Institut für Life Science in Amsterdam) durchgeführte EPR Messungen an aerob gereinigtem HypD Protein ergaben wenig Information (Drapal, 1998). Man fand nur Signale eines weit unterstöchiometrisch vorhandenen [3Fe-4S]-Clusters (ca. 1% der Proteinmenge). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Art des Eisen-Schwefel-Clusters mit Hilfe von Mössbauer-Spektroskopie bestimmt. Die erhaltenen Parameter des Spektrums waren typisch für [4Fe-4S]-Cluster. Da

sich das Zentrum im Zustand 2+ befand und die zwei Spinsysteme antiparallel gekoppelt waren, resultierte ein Gesamtspin von 0. Somit ist das Eisen-Schwefel-Cluster „EPR-silent“. Dies erklärte, warum keine Signale in den von B.F. Matzanke ebenfalls durchgeführten EPR-Messungen an gereinigtem Strep-HypD entdeckt wurden und weshalb nur ein unterstöchiometrisch vorhandenes [3Fe-4S]-Cluster von N. Drapal und S. P. J. Albracht gefunden wurde.

Auch im UV-VIS Spektrum von gereinigtem Strep-HypD deutet eine Absorptionsschulter um 400 nm auf ein [4Fe-4S]²⁺-Cluster hin (Sweeney und Rabinowitz, 1980). Diese Schulter ließ sich durch einen 500-fachen Überschuss an Dithionit verringern, was auch von A. Jacobi beschrieben (Jacobi, 1994), von N. Drapal jedoch nicht gezeigt werden konnte (Drapal, 1998).

Der Versuch, das [4Fe-4S]²⁺-Cluster zu reduzieren, blieb auch in den EPR Proben von B. F. Matzanke (persönliche Mitteilung) und N. Drapal erfolglos (Drapal, 1998).

Ähnlich wie der Kofaktor in HypD erwies sich auch das Eisen-Schwefel-Cluster der Endonuclease III als schwer reduzierbar. Hier war keine Reduktion mit Dithionit möglich; durch Photoreduktion jedoch wurde das [4Fe-4S]²⁺- zu einem [4Fe-4S]¹⁺-Cluster reduziert (Cunningham *et al.*, 1989). Man postulierte, dass diese Reduktion *in vivo* keine Rolle spielt, da ein Reduktionspotential von weniger als – 600 mV für das [4Fe-4S]^{2+/1+} Redoxpaar bestimmt wurde. Dem FeS-Cluster der Endonuclease III wurde demgemäß eine rein strukturgebende Funktion zugeschrieben (Fu *et al.*, 1992).

Auch das Verhalten des Eisen-Schwefel-Clusters des FNR Proteins ähnelt demjenigen des HypD-Proteins: Nach der Rekonstitution des Proteins unter anaeroben Bedingungen wurden zwei [4Fe-4S]-Cluster pro Dimer nachgewiesen. Das Eisen-Schwefel-Cluster befand sich ebenfalls im Zustand 2+ und war somit „EPR-silent“. Vergleichbar zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten trotz der Verringerung der Eisen-Schwefel-Schulter im UV-VIS durch 100-fachen Dithionit-Überschusses, keine Signale im EPR detektiert werden. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Reduktion in ein paramagnetisches [4Fe-4S]⁺-Cluster wurde ein tiefes Reduktionspotential postuliert, das *in vivo* unwahrscheinlich ist (Green *et al.*, 1996).

Sehr ähnlich zum HypD Protein verhielt sich weiterhin das Ni-Ni-[4Fe-4S]-Cluster (A-Cluster) der Acetyl-CoA Synthase von *C. hydrogeniformans* (Svetlitchnyi *et al.*, 2004). So wies das UV-VIS Spektrum eine Absorptionsschulter zwischen 350 und 550 nm auf, woraus auf ein [4Fe-4S]²⁺-Cluster geschlossen wurde. Die Behandlung mit einem 400-fachen Überschuss an Dithionit ließ diese Eisen-Schwefel Schulter, vergleichbar zu den HypD-Spektren, abnehmen (Svetlitchnyi *et al.*, 2004). Auch die EPR Spektren waren ähnlich: sie

zeigten Signale bei $g = 4.3$ und $g = 2.03, 2.02$ und 1.99 . Diese Signale wurden Fe^{3+} und einem oxidierten $[\text{3Fe-4S}]$ -Cluster als Zerfallsprodukt des $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster zugeschrieben (Svetlitchnyi *et al.*, 2004). Auch nach Reduktion mit Dithionit war die Acetyl-CoA Synthase zwischen 10 und 130 K „EPR-silent“; daraus wurde von der Gruppe um O. Meyer geschlossen, dass eine mögliche Spininteraktion zwischen dem reduzierten, paramagnetischen $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster und Ni^{1+} besteht (Svetlitchnyi *et al.*, 2004). Die für HypD gemessenen EPR-Signale waren $g = 4.3$ und $g = 2.02$, wobei das zweite Signal durch Anheben der Temperatur genauer untersucht wurde und in g -Werten von 1.982, 1.998 und 2.026 resultierte. Die Signale wurden ebenfalls unspezifisch gebundenem Fe(III) und einem zu 1% vorliegendem $[\text{3Fe-4S}]$ -Cluster zugeordnet (Drapal, 1998 in Kooperation mit S. P. J. Albracht). Das isolierte Strep-HypD Protein zeigte die gleichen EPR-Komponenten bei $g = 2$ und bei $g = 4.3$ (ubiquitäres "rhombisches" Eisen; B. F. Matzanke, persönliche Mitteilung). Nach Reduktion des EPR-stillen $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters mit Dithionit war ebenfalls kein EPR-Signal detektierbar. Ist HypD somit eine Art Acetyl-CoA Synthase, die für die CO-Synthese notwendig ist?

Durch Aminosäureaustausch der konservierten Reste in HypD wurde festgestellt, dass die Cysteine im C-terminalen Motiv $\text{Cx}_{12}\text{Cx}_6\text{Cx}_{16}\text{C}$ wichtig für die Stabilität des Proteins sind. Sowohl die komplette Deletion des C-Terminus als auch der Austausch von je einem dieser Cysteine bewirkten eine beträchtliche Instabilität des HypD Proteins. Diese Resultate unterstützen die Hypothese, dass Cys323, Cys336, Cys343 und Cys360 die Liganden des FeS-Clusters darstellen. Die HypD-Varianten mit Aminosäureaustauschen im GFETT Motiv waren alle aktiv, wenn auch in reduziertem Maße (besonders Gly 146). Somit kann die Beteiligung dieser Reste an einem katalytisch ablaufenden Prozess ausgeschlossen werden. Nahezu so aktiv wie das Wildtyp-HypD Protein waren die Prolin-Varianten P70A und P75A, sowie das Protein mit der Substitution V71A im GPGCPVC Motiv.

Zum potentiellen Metallbindemotiv CGxHxH ist zu sagen, dass das Histidin (His 44) kaum notwendig war, auch wenn dessen Austausch die Proteinmenge leicht reduzierte. Cystein 41 hingegen erschien essentiell, da ein Austausch das Protein inaktiv und die Interaktion mit HypC unmöglich machte. Strep-HypD[C41A] enthielt jedoch noch das Eisen-Schwefel-Zentrum, was durch die Farbe des Proteins, Eisen- und Schwefelbestimmungen und ein zum Wildtyp-HypD identischem UV-VIS-Spektrum gezeigt wurde. Es stellt somit einen Kandidaten für die Interaktion mit HypC dar. Auch eine Beteiligung am Cyanid-Transfer von HypE ist denkbar.

Das letzte und eventuell wichtigste Motiv in HypD stellt das „Glutaredoxin“-Motiv GPGCPVC dar. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde gezeigt, dass beide Cysteine essenziell sind. Selbst der Austausch von Cystein 69 zu Serin hinterließ keine Restaktivität. Die Strep-HypD-Varianten [C69A/S] und [C72A] waren aufgrund der geringen Überproduktion und hohen Unlöslichkeit schwierig zu reinigen. Dennoch wurde Eisen in der [C72A]-Variante nachgewiesen. Obwohl nur 2.9 Eisen pro Strep-HypD[C72A] gefunden wurden, weist das Verhältnis zu säurelabilen Schwefel ($2.7 \pm 0,9$) auch hier auf ein [4Fe-4S]-Cluster hin. Bei Westernblotanalysen zur Detektion des HypC \times HypD Komplexes verhielt sich die HypD [C72A]-Variante ungewöhnlich: Zwar konnte eine Interaktion mit HypC nicht eindeutig bejaht werden, das Laufverhalten von HypC im nicht-denaturierenden Gel erschien jedoch verändert. Die zusätzliche HypC Bande lief auf Höhe des HypC \times HycE Komplexes und wurde deswegen nicht näher beachtet (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise wurde nach der Reinigung von Strep-HypD[C72A] durch Affinitätschromatographie und Gelfiltration ein zusätzliches Protein eluiert (ca. 70-80 kDa). In Westernblotanalysen reagierte es mit α -HypD Antiserum, weshalb es sich vermutlich um einen HypD \times „ProteinX“ Komplex handelte (Daten nicht gezeigt). Besonders stabil war dieser Komplex im SDS-Gel in Abwesenheit von DTT und 2-ME. Dass ein Aminosäureaustausch, der das „Dithiol“- (GPGCPVC) in ein „Monothiol“- Motiv umwandelt (wie C72A) zu einem inaktiven Protein führt, das noch ein Disulfid mit seinem Reaktionspartner eingehen aber nicht mehr auflösen kann, ist vielfach für Proteine die mit Thioredoxin oder Glutaredoxin reagieren gezeigt worden (Übersichtsartikel: Carmel-Harel und Storz, 2000). Leider war bisher keine Untersuchung des Proteinpartners möglich. Durch Westernblotanalysen konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich um disulfidisch-verknüpftes HypC, HypE oder HypF handelt.

Somit wäre für HypD auch eine zweifache Funktion denkbar: Elektronenübertragung durch das Eisen-Schwefel-Cluster und Reduktion von Disulfidbrücken eines potentiellen Reaktionspartners durch Bildung einer internen Disulfidbrücke aus Cystein 69 und 72. Diese Kombination wurde auch für die Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase (FTR) in Chloroplasten von *Synechocystis* sp. PCC6803 beschrieben (Dai *et al.*, 2000). Sie katalysiert die Reduktion des Disulfids der Thioredoxine durch zwei Elektronen, die von Ferredoxin geliefert werden. Daran beteiligt ist ein [4Fe-4S]-Cluster und ein benachbartes aktives Zentrum aus zwei Cysteinen (Dai *et al.*, 2000). Durch ortsspezifische Mutagenese dieser Cysteine wurde gezeigt, dass FTR gleichzeitig Kontakt zu Ferredoxin und Thioredoxin eingeht (Glauser *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann über das HypD Protein gesagt werden, dass es ein schwer reduzierbares [4Fe-4S]-Cluster im Zustand 2+ besitzt. Die Funktion dieses Cluster ist unklar. Hierzu wären weitere Untersuchungen notwendig: Ist das Cluster durch Ti-(III)-Citrat oder Photoreduktion reduzierbar? Zerfällt es durch Oxidation oder wird es in ein [3Fe-4S]-Cluster umgewandelt? Wird es, wie postuliert, durch vier Cysteine ligandiert, oder ist eine Ecke des Kubus „frei“ (vgl. Aconitase; Beinert *et al.*, 1996)? Gehen die konservierten Cysteine 69 und 72 Disulfidbrücken mit anderen Proteinen ein oder ligandieren sie eventuell weitere Metalle wie das Di-Nickel-Zentrum der Acetyl-CoA Synthase? Die meisten dieser Fragen können nur durch EPR, FTIR, Mössbauer-Spektroskopie oder Kristallisation des HypD Proteins beantwortet werden, was derzeit von Noemi Fukuhara aus der Gruppe von J.-C. Fontecilla-Camps in Grenoble versucht wird. Dass das Eisen-Schwefel-Cluster jedoch nicht nur strukturgebende Funktion besitzt, kann aus den Versuchen zum Cyanid-Transfer geschlossen werden (siehe unten).

2. Ein Gerüstkomplex zur Ligandensynthese

Im vorgeschlagenen Reifungsablauf der [NiFe]-Hydrogenasen (Abb. 50) werden zunächst die Liganden des aktiven Zentrums, CO und CN, synthetisiert. Dies geschieht unabhängig von der Vorläuferform der großen Hydrogenase-Untereinheit (pre-HycE) und wird vermutlich durch die Proteine HypC, HypD, HypE und HypF katalysiert. Für die Synthese des Cyanids (Schritt I und II in Abb 50) wurde dies bereits durch Reissmann *et al.* gezeigt (2003), für die Synthese von CO ist es rein spekulativ. Dass HypC, HypD, HypE und HypF eine Art Synthesekomplex bilden, ist nicht bewiesen, jedoch schlagen es Ergebnisse dieser Arbeit vor. So wurde gezeigt, dass HypE und HypF für die *in vivo* Komplexbildung zwischen HypC und HypD unter anaeroben Bedingungen notwendig sind. Zusätzlich wurde nicht nur die Existenz des HypC × HypD Komplexes bewiesen, sondern auch ein Komplex zwischen HypC, HypD und HypE isoliert. Die HypC × HypD × HypE Komplexbildung wurde durch Koüberexpression des *hypF* Gens verstärkt. Ob dieser Effekt das HypF Protein *per se* betrifft ist bisher unklar; das HypF Protein selbst konnte durch Affinitätschromatographie nicht koeluiert werden. Dass trotzdem eine Interaktion stattfinden muss, konnte durch Transcarbamoylierung und Dehydratisierung von HypE im HypC × HypD × HypE Komplex gezeigt werden. Das mit HypC und HypD koeluierte HypE Protein besaß noch die Carbamoylgruppen-Akzeptorfunktion und dehydratisierte die CONH₂-Gruppe zur Cyanidgruppe. In Koelutionsexperimenten von Strep-HypF und HypE aus Rohextrakten überproduzierender Zellen konnte

S. Reissmann zeigen, dass beide Proteine schwach interagieren. *In vivo* konnte kein HypE × HypF Komplex nachgewiesen werden, obwohl diese Interaktion in *H. pylori* durch ein Zwei-Hybrid-System postuliert wurde (Rain *et al.*, 2001). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die HypE × HypF Komplexbildung mit gereinigten Proteinen weiter untersucht. Dies geschah überwiegend durch Westernblotanalysen nach nicht-denaturierender Gelelektrophorese (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte zwar eine Verschiebung der HypE-Wanderung durch HypF gezeigt werden, da die Proteine allerdings meist als „Proteinschmier“ und nicht als scharfe Banden liefen, war dies kein absoluter Beweis. Aus diesem Grund wurde das Zusammenspiel von HypE und HypF durch ¹⁴C-Markierung gezeigt (Abb. 35): Liegen HypE und HypF annähernd im Verhältnis 1:1 vor, wird markiertes HypE-CN deutlich im Gel „geshiftet“. Ist HypF unterstöchiometrisch vorhanden, läuft HypE-CN als freies Protein. Somit kann eine Interaktion von HypF + HypE und folglich auch mit dem HypC × HypD × HypE Komplex als sicher angenommen werden.

Stellt somit der HypC × HypD × HypE (× HypF) Komplex tatsächlich eine Art Gerüstkomplex für die Synthese des Eisenzentrums (Fe mit zwei CN und einem CO Liganden) dar? Ein Vergleich mit anderen Systemen zeigt, dass dies durchaus vorstellbar ist. So wird zum Beispiel der Eisen-Molybdän-Kofaktor der Nitrogenase an einem Proteinkomplex aus NifE und NifN synthetisiert, bevor er in das Molybdän-Eisen Protein (NifDK) eingebaut wird (Brigle *et al.*, 1987; Dean *et al.*, 1993). Die Übertragung des Kofaktors von NifE zu NifDK wird vermutlich von NifY durchgeführt (Schmid *et al.*, 2001; siehe unten). Ein weiteres Beispiel stellt die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern dar, wie schon in der Einleitung beschrieben. Hier dient NifU/IscU als Gerüstprotein, an dem das Cluster vorsynthetisiert wird. Dieses „transiente“ Cluster wird dann auf den Akzeptor, im Fall von NifU das Eisen-Protein der Nitrogenase, übertragen. Die genaue Übertragung ist bisher unbekannt.

3. Der Cyanidtransfer

Die Übertragung der Cyanidgruppe vom HypE Protein auf den HypC × HypD Anteil des trimeren Komplexes aus HypC, HypD und HypE ist im Schritt III der Abbildung 50 dargestellt. Doch was spricht dafür, dass dieser Schritt tatsächlich stattfindet und dass nicht ein direkter Transfer des Cyanids vom HypE Protein auf den Vorläufer der großen Hydrogenaseuntereinheit (pre-HycE) erfolgt?

Hierzu bedarf es zunächst der Analyse des HypC × HypD Komplexes. Die Verknüpfung

zwischen HypC und HypD konnte nicht eindeutig geklärt werden. Obwohl gezeigt wurde, dass das N-terminale Cystein von HypC für die Komplexbildung notwendig ist und auch Austausch von Cysteinen im HypD Protein die Komplexbildung verhindern (zum Beispiel Cys41, Cys69 und eventuell Cys72), handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen disulfidisch verknüpften Komplex. Die Gründe für diese Annahme sind:

- Der HypC × HypD Komplex konnte durch Cystein-spezifische „Crosslinker“ vernetzt werden.
- Die *in vitro* Komplexbildung konnte in Anwesenheit von DTT durchgeführt werden.
- Bei der Analyse des HypC × HypD Komplexes wurde von E. Hochleitner festgestellt, dass der N-Terminus von HypC modifiziert vorliegt.

Dennoch wird angenommen, dass der N-Terminus von HypC (wenn auch nicht disulfidisch) mit HypD interagiert, da nach der Quervernetzung von HypC und HypD kein N-terminales HypC-Fragment nach Lys-C Behandlung detektiert werden konnte. Dies lässt sich nur dadurch erklären, dass das N-terminale Lysin (Lys 17) von HypC mit dem HypD Protein verknüpft und durch Lys-C nicht mehr gespalten wurde. Ein Gegenstück im HypD Protein konnte nicht identifiziert werden, da die Peptide nach Lys-C Spaltung zu groß waren.

Dass der HypC × HypD Komplex über das Eisen-Schwefel-Cluster verbunden ist, kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Die Gründe hierfür sind, dass das Eisen-Schwefel-Cluster auch ohne HypC in Strep-HypD nachweisbar war. Möglich ist jedoch, dass ein zusätzliches Eisen zwischen HypC und HypD gebunden wird. Dieses Eisen könnte von Cystein- und Histidin-Resten beider Proteine koordiniert werden. Eine Beteiligung des Histidins 51 von HypC wäre hierbei denkbar. Es gibt somit also bisher keinen Beweis über die genaue Verknüpfung von HypC und HypD. Der Befund, dass zwei HypC-Moleküle mit einem HypD interagieren, erschwert es zusätzlich einen Vorschlag für die Art der Verknüpfung vorzulegen.

Der HypC × HypD Komplex reichert sich speziell in Carbamoylphosphat defizienten Zellen an. Da HypF Carbamoylphosphat bindet und die Carbamoylgruppe auf HypE überträgt, wurde vermutet, dass es in den Stämmen DHP-E ($\Delta hypE$) und DHP-F ($\Delta hypF$) ebenfalls zur Anhäufung des HypC × HypD Komplexes kommt. Dies war jedoch nicht der Fall; im Gegenteil, in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HypE und HypF für die HypC × HypD Komplexbildung *in vivo* notwendig sind. Dass der HypC × HypD Komplex trotzdem

ein Zwischenprodukt der CP-abhängigen Hydrogenasereifung ist, wurde durch dessen Auflösung nach Citrullin-Zugabe als alternative CP-Quelle gezeigt.

In *in vitro* Studien konnte in Abwesenheit von HypE der angereicherte HypC × HypD Komplex nicht mit [¹⁴C]-CP mit oder ohne HypF markiert werden (Daten nicht gezeigt). Hieraus wurde gefolgert, dass zunächst HypF und HypE mit CP reagieren und dass deren Produkt auf den HypC × HypD Komplex übertragen wird. Diese Behauptung wurde durch *in vivo* Versuche unterstützt: erfolgte die Zufütterung von Citrullin als CP-Lieferant in Abwesenheit der großen Hydrogenase-Untereinheit HycE, wurde der HypC × HypD Komplex nicht aufgelöst; es entstand eine zweite, vermutlich durch das CP-Produkt (heute als CN bekannt; Reissmann *et al.*, 2003) modifizierte Form. In einem *carAB*⁺ *hycE*⁻ Stamm (HD705) wurde ausschließlich diese Form des HypC × HypD Komplexes detektiert. Übernimmt somit der HypC × HypD Komplex tatsächlich die Cyanidgruppe vom HypE Protein?

Die Antwort hierauf ist ja, wie in dieser Arbeit durch *in vitro* Experimente mit [¹⁴C]-CP gezeigt wurde: Nach der Transcarbamoylierung und Dehydratisierung konnte die am HypE-Protein detektierte und dort als HypE-¹⁴CN vorliegende ¹⁴C-Markierung auf den HypC × HypD Komplex übertragen werden. Der Transfer war allerdings von der Präparation des Komplexes abhängig: Die Überproduktion musste unter anaeroben Bedingungen erfolgt sein und der Komplex durfte nicht gelagert werden. Obwohl der HypC × HypD Komplex aus aerob angezogenen Zellen ebenfalls das Eisen-Schwefel-Cluster enthielt (was anhand der gelben Farbe der Proteinlösung und durch Mössbauerspektren von aerobem Strep-HypD gezeigt wurde) war kein Transfer möglich. Zusammen mit Ergebnissen aus Westernblotanalysen (Daten nicht gezeigt) wurde das in Abbildung 51 dargestellte Arbeitsmodell erstellt.

Wie in der Abbildung dargestellt, wird die obere ¹⁴C-Bande (II) in den Autoradiogrammen vermutlich durch eine Verschiebung von HypE-*CN (I) durch Interaktion mit dem HypC × HypD Komplex bewirkt. Dafür spricht, dass diese Bande auch detektiert werden kann, wenn der HypC × HypD Komplex aus aeroben Zellen isoliert wurde, wobei keine Übertragung auf HypC × HypD stattfindet (Daten nicht gezeigt). Genauso verhält es sich bei Zugabe von DTNB-vorinkubiertem HypC × HypD Komplex: Das HypE-*CN wird teilweise „geshiftet“, jedoch kann die ¹⁴Cyanidgruppe nicht übertragen werden (Abb. 49). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Signal durch Zugabe von geringem HypE-Protein zunimmt, was in Abwesenheit des HypC × HypD Komplex nicht möglich war. Erst im

nächsten Schritt erfolgt der komplexinterne Transfer der Cyanidgruppe auf den HypC × HypD Part (Abb. 50/51 III).

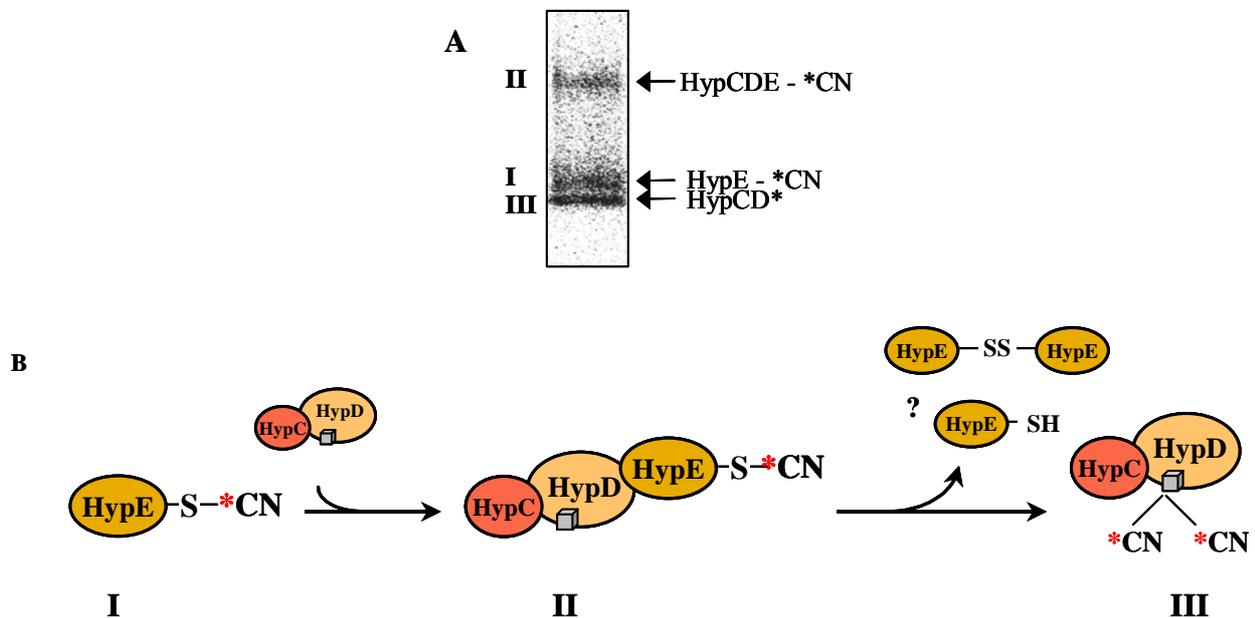


Abbildung 51: Autoradiographie und Model des HypCDE-¹⁴C-CN Komplexes. (A) Ausschnitt aus Abb. 49. und Bezeichnung der Signale als I) HypE-¹⁴C-CN, II) HypCDE-¹⁴C-CN und III) HypCD* zur Erklärung von B. (B) Model der Reaktion. ¹⁴C-markiertes HypE-¹⁴C-CN (I) reagiert mit dem HypC × HypD Komplex, was einen „shift“ des ¹⁴C-Signals bewirkt (II). Es wird angenommen, dass in dieser Form das ¹⁴C-CN noch am C-terminalen Cystein von HypE hängt. Nach interner Übertragung von ¹⁴C-CN auf HypCD, dissoziiert HypE mit freiem Cystein oder als disulfidisch-verknüpftes Dimer ab und hinterlässt den markierten HypC × HypD Komplex (III). Dass die übertragenen Cyanidreste am Eisen-Schwefel-Cluster von HypD im Komplex binden (III), ist rein spekulativ.

Es wurde gezeigt, dass die Cyanidgruppe nicht mehr übertragen wird, wenn der HypC × HypD Komplex mit Ferricyanid (Hexacyanoferrat (III); $E_0' \text{ II/III} = +360\text{mV}$; Unden *et al.*, 1990) vorinkubiert wurde. Bei der Oxidation des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters der Endonuclease III durch Ferricyanid wurde der Verlust eines Eisen Atoms zum $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster bewirkt (Cunningham *et al.*, 1989), genau wie bei der Oxidation des Ferredoxin I von *A. vinelandii* (Sridhar *et al.*, 1998). Dagegen bewirkte die Oxidation von FNR mit Ferricyanid einen kompletten Zerfall des Clusters, bei dem Fe (III) freigesetzt wurde (Jordan *et al.*, 1997). In dem hier durchgeführten Experiment konnte nicht unterschieden werden, ob durch Zugabe von Ferricyanid die Umwandlung zum $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster oder ein kompletter Zerfall des Eisen-Schwefel Zentrums erfolgte. Dennoch zeigt der Versuch, dass die Anwesenheit des reduzierten $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters für die Übertragung notwendig ist.

Der Transfer der ^{14}CN -Gruppe auf die einzelnen Bestandteile des Komplexes, sprich auf die gereinigten Proteine HypC oder Strep-HypD war nicht möglich. Auch das spricht dafür, dass die Übertragung auf den HypC \times HypD Komplex katalytisch und nicht rein chemisch abläuft. Jedoch, an welche Gruppe des HypC \times HypD Komplexes wird das Cyanid gebunden? Kann das detektierte ^{14}C -Signal nach der Übertragung noch ^{14}C -Cyanid zugewiesen werden, oder wurde es zu ^{14}CO umgewandelt?

Diese Fragen können noch nicht beantwortet werden und lassen somit Freiraum für Spekulationen. Nach Übertragung des ^{14}C -Cyanids auf den HypC \times HypD Komplex wird das ^{14}C -Signal im Gel stets nur auf Höhe der Komplexform detektiert, und nie auf Höhe der freien Proteine HypC und HypD, die unter anderem durch Zerfall des Komplexes entstehen. Nach Auftrennung in denaturierenden SDS-Gelen nach Laemmli (1970) war keine ^{14}C -Markierung mehr vorhanden. Diese Stabilitätsdaten des markierten Komplexes weisen darauf hin, dass keine Protein-Thiocyanat Bindung am HypC \times HypD Komplex vorliegt, wie es beim HypE Protein der Fall ist. Die Vorstellung, dass der Komplex somit das Gerüst für die Synthese des $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Zentrums darstellt und das Cyanid von HypE direkt auf das Eisen im HypC \times HypD Komplex übertragen wird (Eisen des FeS-Clusters oder zusätzlich enthaltenes Fe), ist somit naheliegend. Dieser Teil des aktiven Zentrums wird anschließend zur großen Untereinheit der Hydrogenase übergeben (Abb. 50 IV).

4. Die Übertragung des Eisenzentrums durch HypC

Wie in Abbildung 50 Schritt IV gezeigt, wird eine Übertragung des ligandierten Eisens durch HypC postuliert. Welche Tatsachen weisen darauf hin? Dass das HypC Protein mit dem Vorläufer der großen Untereinheit der Hydrogenase interagiert, ist schon seit längerem bekannt (Drapal und Böck, 1998; Magalon und Böck, 2000a). Dass HypC auch mit dem HypD Protein interagiert, wurde im Laufe dieser Arbeit herausgefunden (Blokesh und Böck, 2002a). Wurde Citrullin als alternative Quelle für CP *in vivo* zugegeben, verschwand der HypC \times HypD Komplex. In einem *nik*, *carAB* defizienten Stamm akkumulierte sich der HypC \times HypD Komplex ebenfalls, wobei HypC nach Citrullin-Zugabe im HypC \times preHycE Komplex wiedergefunden wurde (Blokesh und Böck, 2002a). Somit ist eine Transferfunktion von HypC naheliegend. Ähnliches wurde für das NifY/NafY Protein in der Nitrogenase-Reifung beschrieben. NifY (ca. 20 kDa) von *Klebsiella pneumoniae* wurde zusammen mit der Apodinitrogenase (NifDK) gereinigt (White *et al.*, 1992). Bei *in vitro* Reifung der

Aponitrogenase durch Zugabe des FeMo-Kofaktors dissoziierte NifY (Homer *et al.*, 1993), in Übereinstimmung mit dem Befund, dass NifY kein Bestandteil der reifen Nitrogenase darstellt (White *et al.*, 1992). Man nahm an, dass NifY die Aponitrogenase in einer Konformation hält, die den Einbau des FeMo-Kofaktors erlaubt (Homer *et al.*, 1993). Die Charakterisierung des homologen Proteins von *A. vinelandii*, NafY oder γ Protein (Homer *et al.*, 1995) ergab, dass es drei Formen dieses Proteins gibt, die durch nicht-denaturierende (native) Gelelektrophorese und Westernblotanalysen identifiziert wurden: Eine mit der Aponitrogenase assoziierte Form, die durch Zugabe des FeMo-Kofaktors dissoziiert (vgl. NifY von *K. pneumoniae*), eine „freie“, dimere Form des γ Proteins und eine dritte Form, die den FeMo-Kofaktor bindet (Homer *et al.*, 1995). Das γ Protein wurde dadurch als Chaperon-Insertase beschrieben, die die Insertion des FeMo-Kofaktors in die Aponitrogenase vereinfacht und anschließend abdissoziiert. Dieser Schluß wurde auch von Rubio *et al.* gezogen, nachdem das γ Protein (hier als NafY bezeichnet) gereinigt wurde (2004). Es wurde gezeigt, dass NafY den FeMo-Kofaktor mit sehr hoher Affinität bindet ($K_d \approx 60$ nM) und dass von den konservierten Histidin- und Cysteinresten nur Histidin 121 an der Bindung des Kofaktors beteiligt ist (Rubio *et al.*, 2004). Eine ähnliche Funktion wäre für HypC denkbar: zunächst bindet es an HypD bzw. HypD und HypE und übernimmt dort das Eisen mit den diatomaren Liganden $[\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}]$, das es zum Vorläufer der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 (pre-HycE) transportiert. Dort dient es als chaperonartiges Protein indem es pre-HycE in einer Konformation hält, die den Nickel-Einbau erlaubt (Drapal und Böck, 1998; Magalon und Böck, 2000a) und dissoziiert ab bevor die Endoprotease den C-Terminus prozessiert.

5. Der Nickeleinbau

Der Vorläufer der Hydrogenase 3 ist in allen *hyp* Stämmen frei von Nickel (Jacobi *et al.*, 1992; Maier *et al.*, 1993; Jacobi, 1994; Hube *et al.*, 2002). Durch *in vitro* Reifungsstudien konnte gezeigt werden, dass der Nickeleinbau (Abb. 50 V) erst nach dem Eiseneinbau erfolgt (Rossmann *et al.*, 1994; Maier und Böck, 1996a). Als direkt beteiligtes Protein für den Nickeleinbau wurde das HypB Protein vorgeschlagen (Maier *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1995). Dafür spricht auch, dass die Hydrogenasen im DHP-B ($\Delta hypB$) Stamm mit hohen externen Nickelkonzentrationen teilweise gereift werden (Waugh und Boxer, 1986). Zusätzlich wurde eine direkte Nickelbindung durch das HypB Protein von *B. japonicum* und *R. leguminosarum* gezeigt (Rey *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 1995; Olson und Maier, 2000). Dagegen fand keine Nickelbindung der HypB Proteine von *H. pylori* und *E. coli* statt (Maier, 1997; Mehta *et al.*,

2003). Neueste Erkenntnisse gehen davon aus, dass nicht HypB Nickel bindet, sondern HypA bzw. das homologe Protein in der *E. coli* Hydrogenase 1 und 2-Reifung, HybF (Hube *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2003). Um dies zu beweisen, wurden auch im Laufe dieser Arbeit Versuche mit HybF durchgeführt. So war eine partielle Kompensation mit externem Nickel nicht nur im DPABF (HypA⁻ Δ hybF) Stamm möglich (Hube *et al.*, 2002), sondern auch in der „Nickel-Insertions-Mutante“ (NIM; HypA⁻ Δ hybF Δ hypB; Blokesch *et al.*, 2004b). Durch *in vitro* Versuche wurde demonstriert, dass der Nickeleinbau auch ohne HypA/HybF und HypB stattfinden kann. Es wird angenommen, dass diese Proteine *in vivo* den Nickeleinbau vereinfachen und die Zelle vor den toxischen Effekten des Nickels schützen. Diese Funktionen übernehmen auch die sogenannten Metallochaperone. Die wohl am besten untersuchten sind hierbei die Kupfer-Chaperone (O'Halloran und Culotta, 2000). Deren Notwendigkeit wurde an Hefe gezeigt, wo die Menge an freiem Kupfer im Cytoplasma bestimmt wurde und 10^{-18} M betrug (Rae *et al.*, 1999). Das entsprach weniger als einem Kupferatom pro Zelle, wodurch eine spontane Einverleibung von Kupfer durch die Superoxid Dismutase ausgeschlossen wurde (Rae *et al.*, 1999). Geht man auch in anderen Organismen von diesem „no free metal“ Prinzip aus, müssen auch für den Nickeleinbau Metallochaperone gefordert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Nickelbindung durch HybF aus *E. coli* gezeigt werden. Hierfür ist primär das Histidin an Position 2 der Aminosäurekette notwendig, wohingegen die konservierten Cysteine das Zink binden. Dieses Zink scheint strukturell von Bedeutung zu sein. Das stimmt mit der Aussage von Vallee und Auld überein: demnach ist Zink, das von vier Liganden koordiniert wird, eher strukturell, wohingegen Zink in katalytischen Zentren nur von drei Proteinliganden gebunden wird (Vallee und Auld, 1992). Die HybF-Strep[H2Q]-Variante zeigte entgegen der HypA[H2A]-Mutante aus *H. pylori* noch eine Restaffinität zu Nickel, was zu den chemischen Eigenschaften der Aminosäure-Seitenketten passt. So wurde auch beim Austausch des konservierten Histidins 90 zu Glutamin der Protease HycI, die inkorporiertes Nickel in der großen Hydrogenase-Untereinheit erkennt, noch eine Restaktivität beobachtet (Theodoratou *et al.*, 2000a).

Es konnte gezeigt werden, dass HybF und somit auch das homologe Protein HypA Nickel binden. Das aufgestellte Modell in Abbildung 50 zeigt im Schritt V, dass HypA und HypB am Nickeleinbau beteiligt sind. Entgegen den Quervernetzungsversuchen von Mehta *et al.* (2003) konnte im Laufe dieser Arbeit keine direkte Interaktion zwischen HypA/HybF und HypB gezeigt werden. Dies wurde durch Quervernetzungsversuche mit gereinigten Proteinen,

mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems, durch Koelutionsversuche und nicht-denaturierende PAGE untersucht (Daten nicht gezeigt). Es muss jedoch zumindest von einer funktionellen Interaktion ausgegangen werden.

HypA und HypB übernehmen in *H. pylori* eine Doppelrolle: sie sind sowohl für die Reifung der Hydrogenase als auch der Urease notwendig (Olson *et al.*, 2001). Auch bei der Reifung von anderen Nickelenzymen sind mindestens zwei Proteine am Nickeleinbau beteiligt: UreE & UreG bei der Urease (Lee *et al.*, 1993; Mobley *et al.*, 1995; Moncrief und Hausinger, 1997) und CooJ & CooC bei der CO-Dehydrogenase (Kerby *et al.*, 1997; Jeon *et al.*, 2001). Auch für die Reifung der Acetyl-CoA Synthase aus *Clostridium thermoaceticum* wurde ein CooC-homologes Protein gefunden, AcsF, das als Nickel-Insertase bezeichnet wurde (Loke und Lindahl, 2003). Das UreG Protein aus *K. aerogenes* wies 25 % Identität zu dem HypB Protein aus *E. coli* auf (Wu, 1992), und vergleichbar der DHP-B Kompensation durch Nickel *in vivo* war dies auch im *P. mirabilis ureE* Deletionsstamm möglich (Sriwanthana *et al.*, 1994). Zusätzlich wurden chaperonartige Proteine beschrieben, die den Vorläufer in einer offenen Konformation halten, vergleichbar der postulierten Rolle von HypC in der Hydrogenase-Reifung (Drapal und Böck, 1998; Magalon und Böck, 2000a): UreD für die Urease (Park *et al.*, 1994) und CooT für die CO-Dehydrogenase (Kerby *et al.*, 1997).

Nach dem Nickeleinbau in den Vorläufer der großen Untereinheit von Hydrogenase 3 dissoziiert HypC ab (Magalon und Böck, 2000b), bevor die Protease HycI bindet und die C-terminalen 32 Aminosäure abspaltet (Abb. 50 VI). Das löst vermutlich eine Konformationsänderung des Proteins aus, wodurch das aktive Zentrum geschlossen wird und in das Innere des Proteins gelangt. Die reife große Untereinheit interagiert anschließend mit der kleinen Untereinheit HycG und bildet einen Teil des Formiat-Hydrogen-Lyase Komplexes aus (Böck und Sawers, 1996; Sawers *et al.*, 2004).

6. Überlegungen zur Synthese von CO

Wie wird CO in *E. coli* und auch in anderen Bakterien synthetisiert? Bei dieser Frage stößt man unweigerlich auf die CO-Dehydrogenase (CO-DH) und Acetyl-CoA Synthase. Doch besitzt *E. coli* eine CO-DH?

Sucht man nach ähnlichen Proteinen wie der CO-DH von *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* in einer *E. coli* Datenbank, so erhält man an erster Stelle das Genprodukt des *ybjW* Gens (Colibri; <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/index.html>). Ein Sequenzvergleich

des YbjW-Proteins mit der CO-DH von *Rhodospirillum rubrum* (CooS) zeigte ein gewisse Ähnlichkeit (23%), vor allem in der C-terminalen Region. In diesem Bereich befinden sich die koordinierenden Reste des C-Clusters der CO-Dehydrogenase, H265, C338, C451, C481 und C531 (Drennan *et al.*, 2001). Drei dieser Aminosäuren (C451, C481, C531) sind auch im YbjW Protein enthalten. Der Vergleich der YbjW-Sequenz mit der CO-DH von *C. hydrogeniformans* zeigte ebenfalls eine Ähnlichkeit von 21%. Hier sind im YbjW-Protein vier der fünf Liganden des C-Clusters vorhanden (C333, C446, C476 und das Nickelkoordinierende C526; Dobbek *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde eine Deletion des *ybjW* Gens durchgeführt. Dies geschah durch Amplifikation von Teilen des *ybjW* Gens durch „zwei-Schritt-überlappende“ PCR (siehe Abb. 8), *Bam*HI-Restriktion und Ligation mit dem *Bam*HI-geschnittenem Vektor pMAK700 (= pMDybjW). Durch chromosomalen Austausch nach der Methode von Hamilton *et al.* (1989) wurde der Stamm DYBJW erhalten (Daten nicht gezeigt). Der Stamm wurde auf Hydrogenase-Aktivität durch Wasserstoffproduktion, Überschichtungstest, Hydrogenase-Aktivitätsmessung des Rohextraktes in anaeroben Kuvetten und Analyse der HycE Prozessierung mittels Westernblot untersucht. In keinem Fall konnte ein Unterschied zum Wildtyp MC4100 beobachtet werden. Auch Wachstumskurven von gärenden (Glukose/Formiat) und anaerob-atmenden (Glyzerin/Fumarat) DYBJW- und MC4100-Zellen waren nahezu gleich. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das *ybjW* Gen für die Hydrogenasereifung von Bedeutung ist.

Im Nachhinein betrachtet ist das nicht verwunderlich: mittlerweile ist bekannt, dass das *ybjW* Gen das Hybrid-Cluster-Protein (HCP; früher als „Prismane“ bezeichnet) kodiert (van den Berg *et al.*, 2000). Als physiologische Rolle des HCP von *E. coli* wurde postuliert, dass es giftige Beiprodukte im Nitrat Metabolismus entsorgt (Wolfe *et al.*, 2002). Dies wurde dadurch begründet, dass das HCP besonders unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Nitrat oder Nitrit vorhanden ist und Hydroxylamin-Reduktase Aktivität aufweist (Wolfe *et al.*, 2002). Hier kann wieder der Kreis zur CO-DH geschlossen werden: ein Austausch von Histidin 265 der CO-DH von *R. rubrum* zu Valin wandelte die CO-DH in eine Hydroxylamin Reduktase um (Heo *et al.*, 2002). Ersetzen des Nickels der CO-DH durch Eisen hatte denselben Effekt: die Substrat-Spezifität änderte sich und erhöhte Hydroxylamin-Reduktase Aktivität konnte gemessen werden (Heo *et al.*, 2002). Auch in diesen Veröffentlichungen (Heo *et al.*, 2002; Wolfe *et al.*, 2002) wurde auf die Ähnlichkeit des Hybrid-Cluster-Proteins zur CO-Dehydrogenase hingewiesen (besonders bzgl. der Liganden des aktiven FeNiS-Zentrums).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das *ybjW* Gen von *E. coli* keine CO-DH kodiert, sondern das Hybrid-Cluster-Protein und somit nicht der Syntheseort des COs ist.

Doch wie wird CO synthetisiert? Die Idee (Paschos *et al.*, 2001), dass Carbamoylphosphat direkt auf Eisen übertragen wird und dort CN und CO entsteht, kann durch die Ergebnisse von Reissmann *et al.* (2003) als hinfällig angesehen werden, da CN am HypE synthetisiert wird. In dieser Arbeit konnte durch ATP-Analoga und die HypE-Variante[D83N] gezeigt werden, dass die Carboxamidogruppe von HypE nicht direkt auf den HypC × HypD Komplex übertragen wird, sondern dies nur nach erfolgter Dehydratisierung möglich ist. Es wäre jedoch möglich, dass HypE drei Cyanidgruppen an den HypC × HypD Komplex liefert, wovon eine zum CO konvertiert. Ein Reaktionsmechanismus ähnlich dem von Thiocyanat Hydrolasen wäre denkbar (Abb. 52), die Thiocyanat in Carbonylsulfid umwandeln (Katayama *et al.*, 1992). In diesem Fall wäre die Cyanidgruppe für die Konvertierung noch am C-terminalen Cystein von HypE gebunden oder auf ein Cystein von HypC (N-terminales!?) oder HypD übertragen. Nach zweifacher Addition von Wasser würde eine Hydrolyse der –C(OH)₂NH₂ Gruppe erfolgen, und nach erneuter Wasseranlagerung die Abspaltung von NH₃ und OH⁻. Das Resultat wäre eine Cystein-gebundene CO-Gruppe, die auf das Eisen übertragen werden könnte.

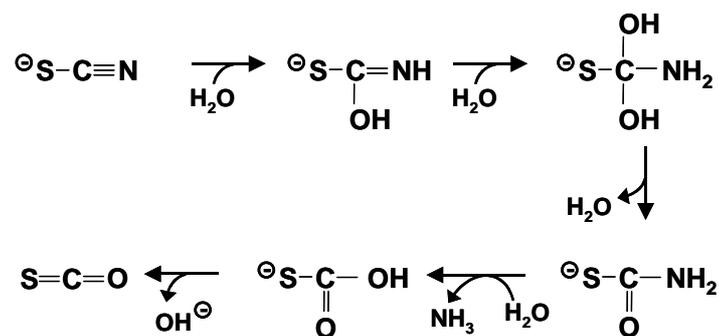


Abbildung 52: Vorgeschlagene Reaktion der Thiocyanat Hydrolase von *Thiobacillus thioparus* (Katayama *et al.*, 1992). Es wird postuliert, dass die Konvertierung von Thiocyanat zu Carbonylsulfid aus fünf Schritten aufgebaut ist und durch sequenzielle Addition und Hydrolyse von Wasser abläuft. Der Nettobedarf liegt bei zwei Wassermolekülen. Zwischenprodukte konnten nicht nachgewiesen werden, was vermutlich an deren Kurzlebigkeit liegt.

Nach der Klonierung und Sequenzierung der Gene der drei Thiocyanat Hydrolase Untereinheiten, stellten Katayama *et al.* durch computerunterstützte Analysen fest, dass eine hohe Ähnlichkeit zu bakteriellen Nitril Hydratasen besteht (Katayama *et al.*, 1998). Diese katalysierten die Hydratation von verschiedenen Nitrilen zum Amid, das durch Amidasen in Säure und Ammonium hydrolysiert wird. Auch der Vergleich der postulierten Reaktionen wies Ähnlichkeiten auf (Katayama *et al.*, 1998).

Nitril Hydratasen können den Metalloproteinen zugerechnet werden, da sie entweder Eisen oder Cobalt als Kofaktor enthalten. Durch EXAFS, EPR und Kristallstrukturen wurde gezeigt, dass das redox-aktive Eisen(III) durch drei konservierte Cysteinreste, zwei Stickstoffe des Proteinrückgrats und ein Hydroxid (aktive Form) oder NO (inaktive Form) ligandiert wird (Shearer *et al.*, 2002). Zwei der beteiligten Cysteine liegen posttranslational modifiziert, und zwar als Sulfin- (SO₂H) und Sulfensäure (SOH) vor (Stevens *et al.*, 2003).

Es wäre somit möglich, dass eine ähnliche Situation am HypC × HypD × HypE Komplex stattfindet: Zunächst wird ein Cystein-gebundenes Cyanid zum CO konvertiert und anschließend zusammen mit zwei zusätzlichen CN-Liganden auf ein von HypC und HypD komplexiertes Eisen übertragen. Die erforderlichen Elektronen würde das [4Fe-4S]²⁺-Cluster von HypD liefern.

Doch die Daten von Pierik *et al.* (1999) widersprechen der Hypothese, dass alle Liganden dem selben Vorläufer (hier: Carbamoylphosphat) entspringen. In Infrarot Spektren der [NiFe] Hydrogenase von *Allochromatium vinosum* wurde nämlich gezeigt, dass die zwei CN-Banden durch Anzucht mit ¹³C-Bicarbonat komplett verschoben werden, während die CO-Bande zu 22 % noch als ¹²CO detektiert wurde. Daraus wurde geschlossen, dass CO ausschließlich oder zusätzlich aus einer anderen Ausgangssubstanz als CN synthetisiert wird.

ZUSAMMENFASSUNG

[NiFe]-Hydrogenasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum neben den namengebenden Metallen Nickel und Eisen die Nicht-Protein-Liganden CO und CN. Die Synthese und der Einbau dieses NiFe(CN)₂CO Zentrums ist ein komplexer Prozess mit neuartigen bioanorganischen Fragestellungen, an dem eine Reihe von Hilfsproteinen beteiligt sind. Diese akzessorischen Proteine werden durch die *hyp* Gene kodiert. Zusätzlich bedarf es einer spezifischen Endopeptidase sowie ATP, GTP und Carbamoylphosphat als niedermolekulare Substrate.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Ablauf der Hydrogenasereifung und der Charakterisierung der am Metalleinbau beteiligten, akzessorischen Proteinen. Im Einzelnen wurden folgende Resultate erzielt:

- 1) Die Cyanidgruppen des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenasen werden in *E. coli* durch HypF und HypE synthetisiert (Reissmann *et al.*, 2003). Um die Teilreaktionen Transcarbamoylierung und Dehydratisierung zu klären, wurde eine Methode entwickelt die eine Unterscheidung der ¹⁴C-markierten Carbamoylform von HypE und der Cyanoform erlaubt. Eine Abhängigkeit der Dehydratisierung von der ATPase Aktivität des HypE Proteins wurde durch HypE-Varianten gezeigt. Die kinetischen Konstanten der ATP-Spaltung von HypE, HypE[D83N] und HypEΔ_{cys} wurden bestimmt.
- 2) Ein Komplex aus den Proteinen HypC und HypD wurde als Reifungsintermediat entdeckt und durch verschiedene Methoden bestätigt. Das N-terminale Cystein von HypC sowie einige konservierte Aminosäuren in HypD erwiesen sich hierbei als essentiell. *In vivo* Versuche deuteten auf eine Modifikation des HypC × HypD Komplexes durch Carbamoylphosphat bzw. Cyanid hin, was durch Entwicklung eines *in vitro* Systems bewiesen werden konnte. Der Transfer der Cyanidgruppe von HypE auf den Komplex ist vom Redoxstatus des Eisen-Schwefel-Clusters in HypD abhängig. Der Vorläufer der Cyanidgruppe, das Carboxamid kann nicht von HypE weitergegeben werden. Der Nachweis eines ternären Komplexes aus HypC, HypD und HypE zeigte, dass diese Proteine auch *in vivo* interagieren. Da zusätzlich eine Interaktion von HypE und HypF durch „Gelshift“-Experimente gezeigt wurde, wird ein Gerüstkomplex zur Ligandensynthese postuliert.

- 3) Die Charakterisierung des HypD Proteins ergab, dass es ein EPR-stilles $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster enthält, welches ihm die gelbliche Farbe und das typische UV-VIS Spektrum verleiht. Die Bestimmung der Eisen- und Schwefelmenge im Wildtyp-Protein und in HypD-Varianten verstärkten diesen Befund. Aminosäureaustausche in den konservierten Motiven von HypD ergaben, dass ein C-terminales Cysteinmotiv zur Stabilität des Proteins beiträgt, weshalb die Cysteinreste als Liganden des FeS-Clusters vorgeschlagen wurden. Dass die Ligandierung von Eisen am HypD Protein oder am HypC \times HypD Komplex stattfindet, wurde angedacht, bedarf jedoch weiterer Beweise.
- 4) Die Nickelinsertion in den Vorläufer der großen Hydrogenaseuntereinheit wird durch die Proteine HypA (bzw. des homologen Proteins HybF) und HypB katalysiert. Es wurde ein Reifungsverfahren entwickelt um zu zeigen, dass der Einbau von Nickel *in vitro* rein chemisch abläuft. Die Funktion von HypA/HybF *in vivo* wurde als die eines Metallo-chaperons bestimmt, was einhergeht mit der Forderung nach Nickelbindung. Diese konnte experimentell nachgewiesen werden, wobei die Bindung abhängig vom Histidin an Position 2 der Proteinkette ist. Die Anwesenheit von Zink beeinflusste die Nickelbindung des Wildtyp Proteins nicht, wies jedoch auf eine unspezifische Bindung durch die [H2Q]-Variante von HybF hin. Das Auffinden von stöchiometrischen Mengen an Zink sowie ein konserviertes Cysteinmotiv deuten auf einen Zinkfinger hin, der von struktureller Bedeutung für das HybF-Protein ist. Zusammen mit den Daten von M. Hube (2002) wurde ein Reifungsnetzwerk zwischen Hydrogenase 1, 2 und 3 erstellt (Hube *et al.*, 2002; Blokesch und Böck, 2002b), welches eine Regulation epistatisch zur Expression der Gene darstellt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M.W. und Stiefel, E.I.** (1998) Biological hydrogen production: not so elementary. *Science*, **282**, 1842-1843.
- Adman, E.T., Sieker, L.C. und Jensen, L.H.** (1973) Structure of a bacterial ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3987-3996.
- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R. und Johnson, M.K.** (2000a) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] und [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry*, **39**, 7856-7862.
- Agar, J.N., Yuwaniyama, P., Jack, R.F., Cash, V.L., Smith, A.D., Dean, D., R. und Johnson, M.K.** (2000b) Modular organization und identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 167-177.
- Agar, J.N., Zheng, L., Cash, V.L., Dean, D.R. und Johnson, M.K.** (2000c) Role of the IscU Protein in Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis: IscS-mediated Assembly of a [Fe₂S₂] Cluster in IscU. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2136-2137.
- Albracht, S.P.J.** (1993) Intimate relationships of the large und the small subunits of all nickel hydrogenases with two nuclear-encoded subunits of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1144**, 221-224.
- Albracht, S.P.J.** (1994) Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochem. Biophys. Acta*, **1188**, 167-204.
- Albracht, S.P.J. und Hedderich, R.** (2000) Learning from hydrogenases: location of a proton pump und of a second FMN in bovine NADH--ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *FEBS Lett.*, **485**, 1-6.
- Ambler, R.P., Meyer, T.E. und Kamen, M.D.** (1993) Amino acid sequence of a high redox potential ferredoxin (HiPIP) from the purple phototrophic bacterium *Rhodospira globiformis*, which has the highest known redox potential of its class. *Arch. Biochem. Biophys.*, **306**, 215-222.
- Andrews, S.C., Berks, B.C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M.A., Golby, P. und Guest, J.R.** (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology*, **143**, 3633-3647.
- Angove, H.C., Yoo, S.J., Burgess, B.K. und Münck, E.** (1997) Mössbauer und EPR Evidence for an All-Ferrous Fe₄S₄ Cluster with $S = 4$ in the Fe Protein of Nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8730-8731.

- Angove, H.C., Yoo, S.J., Münck, E. und Burgess, B.K.** (1998) An all-ferrous state of the Fe protein of nitrogenase. Interaction with nucleotides und electron transfer to the MoFe protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26330-26337.
- Ansaldi, M., Lepelletier, M. und Mejean, V.** (1996) Site-specific mutagenesis by using an accurate recombinant polymerase chain reaction method. *Anal. Biochem.*, **234**, 110-111.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** (eds.) (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Bagley, K.A., Duin, E.C., Roseboom, W., Albracht, S.P.J. und Woodruff, W.H.** (1995) Infrared-detectable groups sense changes in charge density on the nickel center in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, **34**, 5527-5535.
- Bagley, K.A., Van Garderen, C.J., Chen, M., Duin, E.C., Albracht, S.P.J. und Woodruff, W.H.** (1994) Infrared studies on the interaction of carbon monoxide with divalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, **33**, 9229-9236.
- Ballantine, S.P. und Boxer, D.H.** (1985) Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **163**, 454-459.
- Ballantine, S.P. und Boxer, D.H.** (1986) Isolation und characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **156**, 277-284.
- Barrett, E.L., Kwan, H.S. und Macy, J.** (1984) Anaerobiosis, formate, nitrate, und *pyrA* are involved in the regulation of formate hydrogenlyase in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **158**, 972-977.
- Bates, D.M., Lazazzera, B.A. und Kiley, P.J.** (1995) Characterization of FNR* mutant proteins indicates two distinct mechanisms for altering oxygen regulation of the *Escherichia coli* transcription factor FNR. *J. Bacteriol.*, **14**, 3972-3978.
- Bates, D.M., Popescu, C.V., Khoroshilova, N., Vogt, K., Beinert, H., Münck, E. und Kiley, P.J.** (2000) Substitution of leucine 28 with histidine in the *Escherichia coli* transcription factor FNR results in increased stability of the [4Fe-4S](2+) cluster to oxygen. *J. Biol. Chem.*, **275**, J Biol Chem. 2000 Mar 3;275(9):6234-40.
- Bauer, A.** (2002) Diplomarbeit: Reinigung und biochemische Charakterisierung des HypE Proteins aus *Escherichia coli*.

- Begg, Y.A., Whyte, J.N. und Haddock, B.A.** (1977) The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase und nitrate reductase activities using dye indicator plates. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2**, 47-50.
- Beinert, H.** (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 2-15.
- Beinert, H., Holm, R.H. und Münck, E.** (1997) Iron-Sulfur Clusters : Nature's modular, multipurpose structures. *Science*, **277**, 653-659.
- Beinert, H., Kennedy, M.C. und Stout, C.D.** (1996) Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, und Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.*, **96**, 2335-2374.
- Beinert, H. und Kiley, P.J.** (1999) Fe-S proteins in sensing und regulatory functions. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 152-157.
- Beinert, H. und Palmer, G.** (1965) Contributions of EPR spectroscopy to our knowledge of oxidative enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **27**, 105-198.
- Benoit, S. und Maier, R.J.** (2003) Dependence of *Helicobacter pylori* urease activity on the nickel-sequestering ability of the UreE accessory protein. *J. Bacteriol.*, **185**, 4787-95.
- Berkessel, A. und Thauer, R.K.** (1995) On the mechanism of catalysis by a metal-free hydrogenase from methanogenic Archaea: enzymatic transformation of H₂ without a metal und its analogy to the chemistry of alkanes in superacidic solution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 2247-2250.
- Binder, U., Maier, T. und Böck, A.** (1996) Nickel incorporation into hydrogenase 3 from *Escherichia coli* requires the precursor form of the large subunit. *Arch. Microbiol.*, **165**, 69-72.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Blochl, E., Keller, M., Wächtershäuser, G. und Stetter, K.O.** (1992) Reactions depending on iron sulfide und linking geochemistry with biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8117-8120.
- Blokesch, M.** (2000) Diplomarbeit: Die Rolle des chaperonartigen Proteins HybG bei der Reifung der [NiFe] Hydrogenasen von *Escherichia coli*.
- Blokesch, M. und Böck, A.** (2002a) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J. Mol. Biol.*, **324**, 287-296.
- Blokesch, M. und Böck, A.** (2002b) Mechanismen der Metallzentrums-Synthese: Die Reifung Nickel-abhängiger Enzyme. *BIOspektrum*, **6/02**, 699-703.

- Blokesch, M., Magalon, A. und Böck, A.** (2001) Interplay between the specific chaperone-like proteins HybG und HypC in maturation of hydrogenases 1, 2, und 3 from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **183**, 2817-22.
- Blokesch, M., Paschos, A., Bauer, A., Reissmann, S., Drapal, N. und Böck, A.** (2004a) Analysis of the Transcarbamoylation-Dehydration Reaction Catalysed by the Hydrogenase Maturation Proteins HypF und HypE. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3428-3436.
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S. und Böck, A.** (2002) Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 674-680.
- Blokesch, M., Rohrmoser, M., Rode, S. und Böck, A.** (2004b) HybF, a Zinc Containing Protein Involved in NiFe Hydrogenase Maturation. *J. Bacteriol.*, **186**, 2603-2611.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA und DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Böck, A. und Sawers, G.** (1996) Fermentation. In Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. und Umberger, H.E. (eds.), *Escherichia coli und Salmonella*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., Vol. 1, pp. 262-282.
- Böhm, R., Sauter, M. und Böck, A.** (1990) Nucleotide sequence und expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol. Microbiol.*, **4**, 231-243.
- Böhnke, R. und Matzanke, B.F.** (1995) The mobile ferrous iron pool in *Escherichia coli* is bound to a phosphorylated sugar derivative. *Biometals*, **8**, 223-230.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J. und Falkow, S.** (1977) Construction und characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95-113.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid und sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54.
- Breiter, D.R., Meyer, T.E., Rayment, I. und Holden, H.M.** (1991) The molecular structure of the high potential iron-sulfur protein isolated from *Ectothiorhodospira halophila* determined at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **266**, 18660-18667.
- Brigle, K.E., Weiss, M.C., Newton, W.E. und Dean, D.R.** (1987) Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* und *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* und *nifK*. *J. Bacteriol.*, **169**, 1547-1553.

- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S.M. und Venter, J.C.** (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058-73.
- Burgess, B.K. und Lowe, D.J.** (1996) Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chem. Rev.*, **96**, 2983-3012.
- Buurman, G., Shima, S. und Thauer, R.K.** (2000) The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett.*, **485**, 200-204.
- Cammack, R.** (1992a) Biological electron transfer. Plug in a molecular diode [news; comment]. *Nature*, **356**, 288-289.
- Cammack, R.** (1992b) Iron-sulfur clusters in enzymes: themes und variations. *Adv. Inorg. Chem.*, **38**, 281-322.
- Cammack, R., Frey, M. und Robson, R.** (2001) *Hydrogen as a Fuel. Learning from nature.* Taylor & Francis, London und New York.
- Carmel-Harel, O. und Storz, G.** (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 439-461.
- Carter Jr., C.W.** (2001) High potential iron sulfur proteins. In Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. und Wieghardt, K. (eds.), *Handbook of Metalloproteins.* John Wiley & Sons, LTD; Chichester, UK, Vol. 1, pp. 602-609.
- Carter Jr., C.W., Kraut, J., Freer, S.T., Alden, R.A., Sieker, L.C., Adman, E. und Jensen, L.H.** (1972) A comparison of Fe₄ S₄ clusters in high-potential iron protein und in ferredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3526-3529.
- Casadaban, M.J. und Cohen, S.N.** (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4530-4533.
- Chan, M.K., Kim, J. und Rees, D.C.** (1993) The nitrogenase FeMo-cofactor und P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science*, **260**, 792-794.
- Chang, A.C. und Cohen, S.N.** (1978) Construction und characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.*, **134**, 1141-1156.

- Chen, J.C. und Mortenson, L.E.** (1992) Identification of six open reading frames from a region of the *Azotobacter vinelandii* genome likely involved in dihydrogen metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1131**, 199-202.
- Chen, L.L., Frankel, A.D., Harder, J.L., Fawell, S., Barsoum, J. und Pepinsky, B.** (1995) Increased cellular uptake of the human immunodeficiency virus-1 Tat protein after modification with biotin. *Anal. Biochem.*, **227**, 168-175.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H.** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation und storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 2172-2175.
- Cline, J.D.** (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, **14**, 454-458.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A. und Stalon, V.** (1986) Biosynthesis und metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **50**, 314-352.
- Cunningham, R., P., Asahara, H., Bank, J.F., Scholes, C.P., Salerno, J.C., Surerus, K., Münck, E., McCracken, J., Peisach, J. und Emptage, M.H.** (1989) Endonuclease III is an iron-sulfur protein. *Biochemistry*, **28**, 4450-4455.
- Dai, S., Schwendtmayer, C., Schürmann, P., Ramaswamy, S. und Eklund, H.** (2000) Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science*, **287**, 655-658.
- Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E.J., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P.A. und Fontecilla-Camps, J.C.** (2003) Ni-Zn-[Fe4-S4] und Ni-Ni-[Fe4-S4] clusters in closed und open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 271-279.
- Dassler, T., Maier, T., Winterhalter, C. und Böck, A.** (2000) Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol. Microbiol.*, **36**, 1101-1112.
- Dean, D.R., Bolin, J.T. und Zheng, L.** (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, und synthesis. *J. Bacteriol.*, **175**, 6737-6744.
- Dernedde, J., Eitinger, M. und Friedrich, B.** (1993) Analysis of a pleiotropic gene region involved in formation of catalytically active hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch Microbiol*, **159**, 545-553.

- Dernedde, J., Eitinger, T., Patenge, N. und Friedrich, B.** (1996) *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase- maturation system. *Eur J Biochem*, **235**, 351-8.
- DeRose, V.J., Telser, J., Anderson, M.E., Lindahl, P.A. und Hoffman, B.M.** (1998) A Multinuclear ENDOR Study of the C-Cluster in CO Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: Evidence for H₂O und Histidine Coordination to the [Fe₄S₄] Center. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8767-8776.
- Devroede, N., Thia-Toong, T.L., Gigot, D., Maes, D. und Charlier, D.** (2004) Purine und pyrimidine-specific repression of the *Escherichia coli carAB* operon are functionally und structurally coupled. *J. Mol. Biol.*, **336**, 25-42.
- Di Jeso, F.** (1968) Ammonium sulfate concentration conversion nomograph for 0 degrees. *J. Biol. Chem.*, **243**, 2022-2023.
- Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R. und Meyer, O.** (2001) Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science*, **293**, 1281-1285.
- Dos Santos, P.C., Smith, A.D., Frazzon, J., Cash, V.L., Johnson, M.K. und Dean, D.R.** (2004) Iron-Sulfur Cluster Assembly: NifU-DIRECTED ACTIVATION OF THE NITROGENASE Fe PROTEIN. *J. Biol. Chem.*, **279**, 19705-19711.
- Doukov, T.I., Iverson, T.M., Seravalli, J., Ragsdale, S.W. und Drennan, C.L.** (2002) A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science*, **298**, 567-572.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-45.
- Drapal, N. und Böck, A.** (1998) Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry*, **37**, 2941-2948.
- Drapal, N.M.** (1998) Dissertation: HypC, ein systemspezifisches Chaperon der Biosynthese der [NiFe]-Hydrogenase 3 in *Escherichia coli*.
- Drennan, C.L., Heo, J., Sintchak, M.D., Schreiter, E. und Ludden, P.W.** (2001) Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11973-11978.
- Drennan, C.L. und Peters, J.W.** (2003) Surprising cofactors in metalloenzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 220-226.

- Eady, R.R.** (1996) Struktur -Function Relationships of Alternative Nitrogenases. *Chem. Rev.*, **96**, 3013-3030.
- Ehrenreich, A., Forchhammer, K., Tormay, P., Veprek, B. und Böck, A.** (1992) Selenoprotein synthesis in *E. coli*. Purification und characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 767-773.
- Einsle, O., Tezcan, F.A., Andrade, S.L., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J.B. und Rees, D.C.** (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science*, **297**, 1696-1700.
- Eitinger, T. und Mandrand-Berthelot, M.A.** (2000) Nickel transport systems in microorganisms. *Arch. Microbiol.*, **173**, 1-9.
- Fauque, G., Peck Jr., H.D., Moura, J.J., Huynh, B.H., Berlier, Y., DerVartanian, D.V., Teixeira, M., Przybyla, A.E., Lespinat, P.A., Moura, I. und Le Gall, J.** (1988) The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol Rev.*, **4**, 299-344.
- Ferry, J.G.** (1995) CO dehydrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 305-333.
- Fiedler, S. und Wirth, R.** (1988) Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.*, **170**, 38-44.
- Fish, W.W.** (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Meth. Enzymol.*, **158**, 357-364.
- Flint, D.H.** (1996) *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function und N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* und that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16068-16074.
- Fontecilla-Camps, J.C., Frey, M., Garcin, E., Hatchikian, C., Montet, Y., Piras, C., Vernede, X. und Volbeda, A.** (1997) Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *Biochimie*, **79**, 661-666.
- Forestier, M., King, P., Zhang, L., Posewitz, M., Schwarzer, S., Happe, T., Ghirardi, M.L. und Seibert, M.** (2003) Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2750-2758.
- Fraenkel, D.G. und Neidhardt, F.C.** (1961) Use of chloramphenicol to study control of RNA synthesis in bacteria. *Biochem. Biophys. Acta*, **53**, 96-110.
- Frazzon, J. und Dean, D.R.** (2003) Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**, 166-173.

- Frazzon, J., Fick, J.R. und Dean, D.R.** (2002) Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex und highly conserved process. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 680-685.
- Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. und Volbeda, A.** (2001) Nickel-iron hydrogenases. In Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. und Wieghardt, K. (eds.), *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, LTD; Chichester, UK, Vol. 2, pp. 880-896.
- Friedrich, T. und Scheide, D.** (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea und eukarya und its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.*, **479**, 1-5.
- Fritsche, E., Paschos, A., Beisel, H.G., Böck, A. und Huber, R.** (1999) Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HybD from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **288**, 989-998.
- Fu, C., Olson, J.W. und Maier, R.J.** (1995) HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**, 2333-2337.
- Fu, W., Jack, R.F., Morgan, T.V., Dean, D.R. und Johnson, M.K.** (1994) nifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical. *Biochemistry*, **33**, 13455-13463.
- Fu, W., O'Handley, S., Cunningham, R.P. und Johnson, M.K.** (1992) The role of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* endonuclease III. A resonance Raman study. *J. Biol. Chem.*, **267**, 16135-17137.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Volbeda, A., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J.C.** (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure Fold. Des.*, **7**, 557-566.
- Gennis, R.B. und Stewart, V.** (1996) Respiration. In Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. und Umberger, H.E. (eds.), *Escherichia coli und Salmonella*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., Vol. 1, pp. 217-261.
- Gest, H. und Peck Jr., H.D.** (1955) A study of the hydrogenlyase reaction with systems derived from normal und anaerogenic coli-aerogenes bacteria. *J. Bacteriol.*, **70**, 326-334.
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-26.

- Glauser, D.A., Bourquin, F., Manieri, W. und Schürmann, P.** (2004) Characterization of ferredoxin:thioredoxin reductase modified by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 16662-16669.
- Grahame, D.A.** (2003) Acetate C-C bond formation und decomposition in the anaerobic world: the structure of a central enzyme und its key active-site metal cluster. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 221-224.
- Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E.T., Thomson, A.J. und Guest, J.R.** (1996) Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR und demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. *Biochem. J.*, **316**, 887-892.
- Green, J. und Guest, J.R.** (1993a) Activation of FNR-dependent transcription by iron: an *in vitro* switch for FNR. *FEMS Microbiol. Lett.*, **113**, 219-222.
- Green, J. und Guest, J.R.** (1993b) A role for iron in transcriptional activation by FNR. *FEBS Lett.*, **329**, 55-58.
- Green, J., Trageser, M., Six, S., Unden, G. und Guest, J.R.** (1991) Characterization of the FNR protein of *Escherichia coli*, an iron-binding transcriptional regulator. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **244**, 137-44.
- Hall, D.O. und Evans, M.C.** (1969) Iron-sulphur proteins. *Nature*, **223**, 1342-1348.
- Hamilton, C.M., Aldea, M., Washburn, B.K., Babitzke, P. und Kushner, S.R.** (1989) New method for generating deletions und gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **171**, 4617-4622.
- Happe, R.P., Roseboom, W., Egert, G., Friedrich, C.G., Massanz, C., Friedrich, B. und Albracht, S.P.J.** (2000) Unusual FTIR und EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett.*, **466**, 259-263.
- Happe, R.P., Roseboom, W., Pierik, A.J., Albracht, S.P.J. und Bagley, K.A.** (1997) Biological activation of hydrogen. *Nature*, **385**, 126.
- Happe, T. und Kaminski, A.** (2002) Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1022-1032.
- Hartmann, G.C., Klein, A.R., Linder, M. und Thauer, R.K.** (1996) Purification, properties und primary structure of H₂-forming N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Arch. Microbiol.*, **165**, 187-193.

- Hedderich, R.** (2004) Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea und extremophiles: ancestors of complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **36**, 65-75.
- Heo, J., Wolfe, M.T., Staples, C.R. und Ludden, P.W.** (2002) Converting the NiFeS carbon monoxide dehydrogenase to a hydrogenase und a hydroxylamine reductase. *J. Bacteriol.*, **184**, 5894-5897.
- Higuchi, Y., Ogata, H., Miki, K., Yasuoka, N. und Yagi, T.** (1999) Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure Fold. Des*, **7**, 549-556.
- Higuchi, Y., Yagi, T. und Yasuoka, N.** (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center und an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, **5**, 1671-80.
- Hochleitner, E.O., Sondermann, P. und Lottspeich, F.** (2004) Determination of the stoichiometry of protein complexes using liquid chromatography with fluorescence und mass spectrometric detection of fluorescently labeled proteolytic peptides. *Proteomics*, **4**, 669-676.
- Homer, M.J., Dean, D.R. und Roberts, G.P.** (1995) Characterization of the gamma protein und its involvement in the metallocluster assembly und maturation of dinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 24745-52.
- Homer, M.J., Paustian, T.D., Shah, V.K. und Roberts, G.P.** (1993) The nifY product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase und dissociates upon activation with the iron- molybdenum cofactor. *J. Bacteriol.*, **175**, 4907-10.
- Hoover, T.R., Robertson, A.D., Cerny, R.L., Hayes, R.N., Imperial, J., Shah, V.K. und Ludden, P.W.** (1987) Identification of the V factor needed for synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase as homocitrate. *Nature*, **329**, 855-857.
- Howard, J.B. und Rees, D.C.** (1996) Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem. Rev.*, **96**, 2965-2982.
- Howe, J.G. und Hershey, J.W.** (1981) A sensitive immunoblotting method for measuring protein synthesis initiation factor levels in lysates of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12836-9.
- Hube, M.** (2002) Diplomarbeit: Die Rolle des Proteins HybF in der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*.
- Hube, M., Blokesch, M. und Böck, A.** (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA und HybF. *J. Bacteriol.*, **184**, 3879-85.

- Huber, C., Eisenreich, W., Hecht, S. und Wächtershäuser, G.** (2003) A possible primordial peptide cycle. *Science*, **301**, 938-940.
- Huber, C. und Wächtershäuser, G.** (1997) Activated acetic acid by carbon fixation on (Fe,Ni)S under primordial conditions. *Science*, **276**, 245-247.
- Huber, C. und Wächtershäuser, G.** (1998) Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of life. *Science*, **281**, 670-672.
- Imamura, N. und Nakayama, H.** (1982) *thiK* und *thiL* loci of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **151**, 708-717.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Jacobi, A.** (1990) Diplomarbeit; Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Jacobi, A.** (1994) Dissertation: Untersuchungen zur Reifung und Aktivierung der Hydrogenasen von *Escherichia coli*; Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Jacobi, A., Rossmann, R. und Böck, A.** (1992) The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, **158**, 444-451.
- Jacobson, M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E. und Dean, D.R.** (1989) Biochemical und genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 49-57.
- Jeon, W.B., Cheng, J. und Ludden, P.W.** (2001) Purification und characterization of membrane-associated CooC protein und its functional role in the insertion of nickel into carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38602-9.
- Johnson, M.K.** (1998) Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 173-181.
- Jordan, P.A., Thomson, A.J., Ralph, E.T., Guest, J.R. und Green, J.** (1997) FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve. *FEBS Lett.*, **416**, 349-352.
- Jung, S.M. und Moroi, M.** (1983) Crosslinking of platelet glycoprotein Ib by N-succinimidyl(4-azidophenyldithio)propionate und 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate). *Biochim. Biophys. Acta*, **761**, 152-162.

- Jung, Y.S., Gao-Sheridan, H.S., Christiansen, J., Dean, D.R. und Burgess, B.K.** (1999) Purification und biophysical characterization of a new [2Fe-2S] ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a putative [Fe-S] cluster assembly/repair protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32402-32410.
- Kaim, W. und Schwederski, B.** (1991) *Bioanorganische Chemie*.
- Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y. und Fukuyama, K.** (2001) Crystal structure of *Escherichia coli* Fdx, an adrenodoxin-type ferredoxin involved in the assembly of iron-sulfur clusters. *Biochemistry*, **40**, 11007-11012.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. und Ladant, D.** (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5752-5756.
- Karimova, G., Ullmann, A. und Ladant, D.** (2000) A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **328**, 59-73.
- Karimova, G., Ullmann, A. und Ladant, D.** (2001) Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 73-82.
- Katayama, Y., Matsushita, Y., Kaneko, M., Kondo, M., Mizuno, T. und Nyunoya, H.** (1998) Cloning of genes coding for the three subunits of thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus* THI 115 and their evolutionary relationships to nitrile hydratase. *J. Bacteriol.*, **180**, 2583-2589.
- Katayama, Y., Narahara, Y., Inoue, Y., Amano, F., Kanagawa, T. und Kuraishi, H.** (1992) A thiocyanate hydrolase of *Thiobacillus thioparus*. A novel enzyme catalyzing the formation of carbonyl sulfide from thiocyanate. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9170-9175.
- Kerby, R.L., Ludden, P.W. und Roberts, G.P.** (1997) *In vivo* nickel insertion into the carbon monoxide dehydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*: molecular und physiological characterization of cooCTJ. *J. Bacteriol.*, **179**, 2259-2266.
- Khoroshilova, N., Beinert, H. und Kiley, P.J.** (1995) Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2499-2503.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H. und Kiley, P.J.** (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂ : [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 6087-6092.

- Kiley, P.J. und Beinert, H.** (1998) Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**, 341-352.
- Kiley, P.J. und Beinert, H.** (2003) The role of Fe-S proteins in sensing und regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 181-185.
- Kim, J. und Rees, D.C.** (1992) Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum- iron protein. *Science*, **257**, 1677-1682.
- Kunkel, A., Vorholt, J.A., Thauer, R.K. und Hedderich, R.** (1998) An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.*, **252**, 467-476.
- Ladant, D. und Ullmann, A.** (1999) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.*, **7**, 172-176.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambden, P.R. und Guest, J.R.** (1976) Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J. Gen. Microbiol.*, **97**, 145-160.
- Lazazzera, B.A., Bates, D.M. und Kiley, P.J.** (1993) The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. *Genes Dev.*, **7**, 1993-2005.
- Lazazzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C. und Kiley, P.J.** (1996) DNA binding und dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2762-8.
- Lee, M.H., Pankratz, H.S., Wang, S., Scott, R.A., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., Ippolito, J.A., Christianson, D.W. und Hausinger, R.P.** (1993) Purification und characterization of *Klebsiella aerogenes* UreE protein: a nickel-binding protein that functions in urease metallocenter assembly. *Protein Sci.*, **2**, 1042-52.
- Legrain, C., Stalon, V., Noullez, J.P., Mercenier, A., Simon, J.P., Broman, K. und Wiame, J.M.** (1977) Structure und function of ornithine carbamoyltransferases. *Eur. J. Biochem.*, **80**, 401-409.
- Leimkühler, S., Wuebbens, M.M. und Rajagopalan, K.V.** (2001) Characterization of *Escherichia coli* MoeB und its involvement in the activation of molybdopterin synthase for the biosynthesis of the molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34695-34701.

- Lemon, B.J. und Peters, J.W.** (2001) Iron-only hydrogenases. In Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. und Wieghardt, K. (eds.), *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, LTD; Chichester, UK, Vol. 2, pp. 738-751.
- Li, C., Kappock, T.J., Stubbe, J., Weaver, T.M. und Ealick, S.E.** (1999) X-ray crystal structure of aminoimidazole ribonucleotide synthetase (PurM), from the *Escherichia coli* purine biosynthetic pathway at 2.5 Å resolution. *Structure*, **7**, 1155-1166.
- Lindahl, P.A.** (2002) The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? *Biochemistry*, **41**, 2097-2105.
- Loke, H.K. und Lindahl, P.A.** (2003) Identification und preliminary characterization of AcsF, a putative Ni-insertase used in the biosynthesis of acetyl-CoA synthase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Inorg. Biochem.*, **93**, 33-40.
- Lottspeich, F. und Zorbach, H.** (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J.** (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lutz, S., Jacobi, A., Schlensog, V., Böhm, R., Sawers, G. und Böck, A.** (1991) Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 123-135.
- Lyon, E.J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K. und Thauer, R.K.** (2004) UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 195-204.
- Magalon, A., Blokesch, M., Zehelein, E. und Böck, A.** (2001) Fidelity of metal insertion into hydrogenases. *FEBS Lett.*, **499**, 73-6.
- Magalon, A. und Böck, A.** (2000a) Analysis of the HypC-HycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *J. Biol. Chem.*, **275**, 21114-21220.
- Magalon, A. und Böck, A.** (2000b) Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. *FEBS Lett.*, **473**, 254-258.
- Maier, T.** (1997) Dissertation: Katalysierter Metall-Einbau in Proteine: Biosynthese von [NiFe]-Hydrogenasen in *Escherichia coli*.

- Maier, T., Binder, U. und Bock, A.** (1996) Analysis of the *hydA* locus of *Escherichia coli*: two genes (*hydN* und *hypF*) involved in formate und hydrogen metabolism. *Arch.Microbiol.*, **165**, 333-41.
- Maier, T. und Böck, A.** (1996a) Generation of active [NiFe] hydrogenase *in vitro* from a nickel-free precursor form. *Biochemistry*, **35**, 10089-93.
- Maier, T. und Böck, A.** (1996b) Nickel incorporation into hydrogenases. In Hausinger, R.P., Eichhorn, G.L. und Marzilli, L.G. (eds.), *Mechanisms of metallocenter assembly*. VCH, New York, pp. 173-192.
- Maier, T., Jacobi, A., Sauter, M. und Böck, A.** (1993) The product of the *hypB* gene, which is required for nickel incorporation into hydrogenases, is a novel guanine nucleotide-binding protein. *J. Bacteriol.*, **175**, 630-635.
- Maier, T., Lottspeich, F. und Böck, A.** (1995) GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 133-138.
- Malkin, R. und Rabinowitz, J.C.** (1966) The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 822-827.
- Mandrand-Berthelot, M.-A., Wee, M.Y.K. und Haddock, B.A.** (1978) An improved method for the identification und characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, **4**, 37-40.
- Matias, P.M., Soares, C.M., Saraiva, L.M., Coelho, R., Morais, J., Le Gall, J. und Carrondo, M.A.** (2001) [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination und refinement at 1.8 Å und modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6**, 63-81.
- Matzanke, B.F.** (1991) Structures, coordination chemistry und functions of microbial iron chelates. In Winkelmann, G. (ed.) *CRC handbook of microbial iron chelates*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, pp. 15-64.
- Matzanke, B.F.** (1997) Iron Storage in Microorganisms. In Winkelmann, G. und Carrano, C.J. (eds.), *Transition Metals in Microbial Metabolism*. Harwood Academic Publishers, London, pp. 117-157.
- Matzanke, B.F., Berner, I., Bill, E., Trautwein, A.X. und Winkelmann, G.** (1991) Transport und utilization of ferrioxamine-E-bound iron in *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*). *BioMetals*, **4**, 181-185.

- Mayer, S.M., Lawson, D.M., Gormal, C.A., Roe, S.M. und Smith, B.E.** (1999) New insights into structure-function relationships in nitrogenase: A 1.6 Å resolution X-ray crystallographic study of *Klebsiella pneumoniae* MoFe-protein. *J. Mol. Biol.*, **292**, 871-891.
- Mehta, N., Olson, J.W. und Maier, R.J.** (2003) Characterization of *Helicobacter pylori* nickel metabolism accessory proteins needed for maturation of both urease and hydrogenase. *J. Bacteriol.*, **185**, 726-734.
- Melis, A. und Happe, T.** (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant. Physiol.*, **127**, 740-748.
- Melville, S.B. und Gunsalus, R.P.** (1990) Mutations in *fnr* that alter anaerobic regulation of electron transport-associated genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18733-18736.
- Menon, N.K., Chatelus, C.Y., Dervartanian, M., Wendt, J.C., Shanmugam, K.T., Peck Jr., H.D. und Przybyla, A.E.** (1994) Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *J. Bacteriol.*, **176**, 4416-4423.
- Menon, N.K., Robbins, J., Peck Jr., H.D., Chatelus, C.Y., Choi, E.S. und Przybyla, A.E.** (1990) Cloning and sequencing of a putative *Escherichia coli* [NiFe] hydrogenase-1 operon containing six open reading frames. *J. Bacteriol.*, **172**, 1969-1977.
- Menon, N.K., Robbins, J., Wendt, J.C., Shanmugam, K.T. und Przybyla, A.E.** (1991) Mutational analysis and characterization of the *Escherichia coli* *hya* operon, which encodes [NiFe] hydrogenase 1. *J. Bacteriol.*, **173**, 4851-4861.
- Mergeay, M., Gigot, D., Beckmann, J., Glansdorff, N. und Pierard, A.** (1974) Physiology and genetics of carbamoylphosphate synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, **133**, 299-316.
- Messenger, S.L. und Green, J.** (2003) FNR-mediated regulation of *hyp* expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **228**, 81-86.
- Messing, J.** (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.*, **101**, 20-78.
- Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Kunkel, A. und Hedderich, R.** (1999) Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 325-335.
- Meuer, J., Kuettner, H.C., Zhang, J.K., Hedderich, R. und Metcalf, W.W.** (2002) Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase und ferredoxin in methanogenesis und carbon fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5632-5637.

- Miller, J.H.** (1972) *Experiments in Molecular Genetics. Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York, pp. 431-432.
- Miller, J.H.** (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics. A Short Course in Bacterial Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, New York.
- Miller, S.L.** (1953) A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, **117**, 528-529.
- Mobley, H.L., Island, M.D. und Hausinger, R.P.** (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.*, **59**, 451-80.
- Moncrief, M.B. und Hausinger, R.P.** (1997) Characterization of UreG, identification of a UreD-UreF-UreG complex, and evidence suggesting that a nucleotide-binding site in UreG is required for in vivo metallocenter assembly of *Klebsiella aerogenes* urease. *J. Bacteriol.*, **179**, 4081-6.
- Moore, L.J. und Kiley, P.J.** (2001) Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45744-45750.
- Muchmore, S.W., Jack, R.F. und Dean, D.R.** (1996) Developments in the Analysis of Nitrogenase FeMo-Cofactor Biosynthesis. In Hausinger, R.P., Eichhorn, G.L. und Marzilli, L.G. (eds.), *Mechanisms of metallocenter assembly.* VCH, New York, pp. 111-133.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263-73.
- Mulrooney, S.B. und Hausinger, R.P.** (2003) Nickel uptake und utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 239-261.
- Nakamura, M., Saeki, K. und Takahashi, Y.** (1999) Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hs cA-fdx-ORF3 gene cluster. *J. Biochem. (Tokyo)*, **126**, 10-18.
- Navarro, C., Wu, L.F. und Mandrand-Berthelot, M.A.** (1993) The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol. Microbiol.*, **9**, 1181-91.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L. und Smith, D.F.** (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.*, **119**, 736-47.
- Neumüller, O.-A.** (1985) *Römpps Chemie-Lexikon.* Frankh'sche Verlagshandlung, W.Keller & Co, Stuttgart.

- Nicolet, Y., Cavazza, C. und Fontecilla-Camps, J.C.** (2002) Fe-only hydrogenases: structure, function und evolution. *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 1-8.
- Nicolet, Y., de Lacey, A.L., Vernede, X., Fernandez, V.M., Hatchikian, E.C. und Fontecilla-Camps, J.C.** (2001) Crystallographic und FTIR spectroscopic evidence of changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1596-1601.
- Nicolet, Y., Lemon, B.J., Fontecilla-Camps, J.C. und Peters, J.W.** (2000) A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 138-143.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C.E. und Fontecilla-Camps, J.C.** (1999) *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure Fold. Des.*, **7**, 13-23.
- Norlander, J., Kempe, T. und Messing, J.** (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, **26**, 101-6.
- Nuth, M., Yoon, T. und Cowan, J.A.** (2002) Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of iron nucleation sites for assembly of the [2Fe-2S]²⁺ cluster core in IscU proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8774-8775.
- Ochman, H., Gerber, A.S. und Hartl, D.L.** (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, **120**, 621-623.
- O'Halloran, T.V. und Culotta, V.C.** (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25057-60.
- Olson, J.W. und Maier, R.J.** (1997) The sequences of *hypF*, *hypC* und *hypD* complete the hyp gene cluster required for hydrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Gene*, **199**, 93-99.
- Olson, J.W. und Maier, R.J.** (2000) Dual roles of *Bradyrhizobium japonicum* nickelin protein in nickel storage und GTP-dependent Ni mobilization. *J. Bacteriol.*, **182**, 1702-1705.
- Olson, J.W., Mehta, N.S. und Maier, R.J.** (2001) Requirement of nickel metabolism proteins HypA und HypB for full activity of both hydrogenase und urease in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.*, **39**, 176-182.
- Park, I.S., Carr, M.B. und Hausinger, R.P.** (1994) In vitro activation of urease apoprotein und role of UreD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3233-7.

- Park, M.H., Wong, B.B. und Lusk, J.E.** (1976) Mutants in three genes affecting transport of magnesium in *Escherichia coli*: genetics und physiology. *J. Bacteriol.*, **126**, 1096-1103.
- Pascal, M.C., Casse, F., Chippaux, M. und Lepelletier, M.** (1975) Genetic analysis of mutants of *Escherichia coli* K12 und *Salmonella typhimurium* LT2 deficient in hydrogenase activity. *Mol. Gen. Genet.*, **141**, 173-179.
- Paschos, A.** (2003) Dissertation: Biosynthese des Metallzentrums von [NiFe]-Hydrogenasen aus *E. coli*: Analyse zweier Reifungsenzyme.
- Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E. und Böck, A.** (2002) HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 49945-49951.
- Paschos, A., Glass, R.S. und Böck, A.** (2001) Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett.*, **488**, 9-12.
- Peck Jr., H.D. und Gest, H.** (1957) Formic dehydrogenase and the hydrogenlyase enzyme complex in coli-aerogenes bacteria. *J. Bacteriol.*, **73**, 706-721.
- Peters, J.W.** (1999) Structure und mechanism of iron-only hydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 670-676.
- Peters, J.W., Fisher, K. und Dean, D.R.** (1995) Nitrogenase structure und function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 335-366.
- Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J. und Seefeldt, L.C.** (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, **282**, 1853-1858.
- Peters, J.W., Stowell, M.H., Soltis, S.M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K. und Rees, D.C.** (1997) Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry*, **36**, 1181-1187.
- Piepersberg, A., Hennecke, H., Engelhard, M., Nass, G. und Böck, A.** (1975) Cross-reactivity of phenylalanyl-transfer ribonucleic acid ligases from different microorganisms. *J. Bacteriol.*, **124**, 1482-1488.
- Pierik, A.J., Roseboom, W., Happe, R.P., Bagley, K.A. und Albracht, S.P.J.** (1999) Carbon monoxide und cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3331-3337.
- Popescu, C.V., Bates, D.M., Beinert, H., Munck, E. und Kiley, P.J.** (1998) Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13431-13435.

- Posewitz, M.C., King, P.W., Smolinski, S.L., Zhang, L., Seibert, M. und Ghirardi, M.L.** (2004) Discovery of two novel radical SAM proteins required for the assembly of an active [Fe]-hydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 25711-25720.
- Przybyla, A.E., Robbins, J., Menon, N. und Peck Jr., H.D.** (1992) Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **8**, 109-135.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C. und O'Halloran, T.V.** (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, **284**, 805-808.
- Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A. und Legrain, P.** (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*, **409**, 211-5.
- Rees, D.C.** (2002) Great metalloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 221-46.
- Rees, D.C. und Howard, J.B.** (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 559-566.
- Rees, D.C. und Howard, J.B.** (2003) The interface between the biological und inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters. *Science*, **300**, 929-931.
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R.S. und Böck, A.** (2003) Taming of a Poison: Biosynthesis of the NiFe-Hydrogenase Cyanide Ligands. *Science*, **299**, 1067-1070.
- Rey, L., Imperial, J., Palacios, J.M. und Ruiz-Argüeso, T.** (1994) Purification of *Rhizobium leguminosarum* HypB, a nickel-binding protein required for hydrogenase synthesis. *J. Bacteriol.*, **176**, 6066-73.
- Rey, L., Murillo, J., Hernando, Y., Hidalgo, E., Cabrera, E., Imperial, J. und Ruiz-Argüeso, T.** (1993) Molecular analysis of a microaerobically induced operon required for hydrogenase synthesis in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Mol. Microbiol.*, **8**, 471-81.
- Roberts, G.P. und Brill, W.J.** (1980) Gene-product relationships of the nif regulon of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **144**, 210-216.
- Rose, R.E.** (1988) The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 355.
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. und Böck, A.** (1994) Maturation of the large subunit (HycE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur. J. Biochem.*, **220**, 377-384.

- Rubio, L.M., Singer, S.W. und Ludden, P.W.** (2004) Purification und characterization of NafY (apodinitrogenase gamma subunit) from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 19739-19746.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) In Ford, N., Nolan, C. und Ferguson, M. (eds.), *Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol. 1.
- Sammons, D.W., Adams, L.D. und Nishizawa, E.E.** (1981) Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **2**, 135-141.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **74**, 5463-5467.
- Sankar, P., Lee, J.H. und Shanmugam, K.T.** (1985) Cloning of hydrogenase genes und fine structure analysis of an operon essential for H₂ metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **162**, 353-360.
- Sauter, M.** (1992) Dissertation: Der Formiat-Hydrogenlyase-Komplex von *Escherichia coli*.
- Sauter, M., Bohm, R. und Böck, A.** (1992) Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 1523-1532.
- Sawers, G.** (1994) The hydrogenases und formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **66**, 57-88.
- Sawers, R.G., Ballantine, S.P. und Boxer, D.H.** (1985) Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: Evidence for a third isoenzyme. *J. Bacteriol.*, **164**, 1324-1331.
- Sawers, R.G., Blokesch, M. und Böck, A.** (September 2004, posting date) Chapter 3.5.4., Anaerobic Formate und Hydrogen Metabolism. In R. Curtiss III (Editor in Chief) *EcoSal - Escherichia coli und Salmonella: Cellular und Molecular Biology*. [Online.] <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C.
- Sawers, R.G. und Boxer, D.H.** (1986) Purification und properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.*, **156**, 265-275.

- Sawers, R.G., Zehelein, E. und Böck, A.** (1988) Two-dimensional gel electrophoretic analysis of *Escherichia coli* proteins: influence of various anaerobic growth conditions and the *fnr* gene product on cellular protein composition. *Arch. Microbiol.*, **149**, 240-244.
- Schlenzog, V. und Böck, A.** (1990) Identification und sequence analysis of the gene encoding the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1319-1327.
- Schmid, B., Chiu, H.J., Ramakrishnan, V., Howard, J.B. und Rees, D.C.** (2001) Nitrogenase. In Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. und Wieghardt, K. (eds.), *Handbook of Metalloproteins*. John Wiley & Sons, LTD; Chichester, UK, Vol. 2, pp. 1025-1036.
- Schrimsher, J.L., Schendel, F.J., Stubbe, J. und Smith, J.M.** (1986) Purification und characterization of aminoimidazole ribonucleotide synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **25**, 4366-4371.
- Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A. und Kiley, P.J.** (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in *in vivo* Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9009-9014.
- Seefeldt, L.C. und Arp, D.J.** (1987) Redox-dependent Subunit Dissociation of *Azotobacter vinelandii* Hydrogenase in the Presence of Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16816-16821.
- Segre, D., Ben-Eli, D., Deamer, D.W. und Lancet, D.** (2001) The lipid world. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **31**, 119-145.
- Seravalli, J. und Ragsdale, S.W.** (2000) Channeling of carbon monoxide during anaerobic carbon dioxide fixation. *Biochemistry*, **39**, 1274-1277.
- Seravalli, J., Xiao, Y., Gu, W., Cramer, S.P., Antholine, W.E., Krymov, V., Gerfen, G.J. und Ragsdale, S.W.** (2004) Evidence that NiNi acetyl-CoA synthase is active und that the CuNi enzyme is not. *Biochemistry*, **43**, 3944-3955.
- Shah, V.K. und Brill, W.J.** (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3249-3253.
- Sharrocks, A.D., Green, J. und Guest, J.R.** (1990) *In vivo* und *in vitro* mutants of FNR the anaerobic transcriptional regulator of *E. coli*. *FEBS Lett.*, **270**, 119-122.
- Shearer, J., Jackson, H.L., Schweitzer, D., Rittenberg, D.K., Leavy, T.M., Kaminsky, W., Scharrow, R.C. und Kovacs, J.A.** (2002) The first example of a nitrile hydratase model complex that reversibly binds nitriles. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11417-11428.

- Shima, S., Lyon, E.J., Sordel-Klippert, M., Kauss, M., Kahnt, J., Thauer, R.K., Steinbach, K., Xie, X., Verdier, L. und Griesinger, C.** (2004) The cofactor of the iron-sulfur cluster free hydrogenase hmd: structure of the light-inactivation product. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 2547-2551.
- Shivdasani, R.A. und Thomas, D.W.** (1988) Molecular associations of IA antigens after T-B cell interactions. I. Identification of new molecular associations. *J. Immunol.*, **141**, 1252-1260.
- Smith, A.D., Agar, J.N., Johnson, K.A., Frazzon, J., Amster, I.J., Dean, D.R. und Johnson, M.K.** (2001) Sulfur transfer from IscS to IscU: the first step in iron-sulfur cluster biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11103-11104.
- Smith, R.L. und Maguire, M.E.** (1998) Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol. Microbiol.*, **28**, 217-226.
- Spiro, S. und Guest, J.R.** (1988) Inactivation of the FNR protein of *Escherichia coli* by targeted mutagenesis in the N-terminal region. *Mol. Microbiol.*, **2**, 701-707.
- Spiro, S. und Guest, J.R.** (1990) FNR und its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **6**, 399-428.
- Spiro, S., Roberts, R.E. und Guest, J.R.** (1989) FNR-dependent repression of the *ndh* gene of *Escherichia coli* und metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. *Mol. Microbiol.*, **3**, 601-608.
- Sridhar, V., Prasad, G.S., Burgess, B.K. und Stout, C.D.** (1998) Crystal structures of ferricyanide-oxidized [Fe-S] clusters in *Azotobacter vinelandii* ferredoxin I. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **3**, 140-149.
- Sriwanthana, B., Island, M.D., Maneval, D. und Mobley, H.L.** (1994) Single-step purification of *Proteus mirabilis* urease accessory protein UreE, a protein with a naturally occurring histidine tail, by nickel chelate affinity chromatography. *J. Bacteriol.*, **176**, 6836-6841.
- Stephenson, M. und Stickland, L.** (1931) Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. the properties of the enzyme. *Biochem. J.*, **25**, 205-214.
- Stevens, J.M., Belghazi, M., Jaouen, M., Bonnet, D., Schmitter, J.M., Mansuy, D., Sari, M.A. und Artaud, I.** (2003) Post-translational modification of *Rhodococcus* R312 und *Comamonas* NI1 nitrile hydratases. *J. Mass. Spectrom.*, **38**, 955-961.
- Sticht, H. und Rösch, P.** (1998) The structure of iron-sulfur proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **70**, 95-136.

- Strop, P., Takahara, P.M., Chiu, H., Angove, H.C., Burgess, B.K. und Rees, D.C.** (2001) Crystal structure of the all-ferrous [4Fe-4S]₀ form of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, **40**, 651-656.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Sutcliffe, J.G.** (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **75**, 3737-41.
- Sutcliffe, J.G.** (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 77-90.
- Sutton, V.R., Stubna, A., Patschkowski, T., Munck, E., Beinert, H. und Kiley, P.J.** (2004) Superoxide destroys the [2Fe-2S]₂₊ cluster of FNR from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **43**, 791-798.
- Svetlitchnyi, V., Dobbek, H., Meyer-Klaucke, W., Meins, T., Thiele, B., Romer, P., Huber, R. und Meyer, O.** (2004) A functional Ni-Ni-[4Fe-4S] cluster in the monomeric acetyl-CoA synthase from *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 446-451.
- Sweeney, W.V. und Rabinowitz, J.C.** (1980) Proteins containing 4Fe-4S clusters: an overview. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 139-161.
- Tabor, S. und Richardson, C.C.** (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **82**, 1074-8.
- Taketo, A.** (1988) DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta*, **949**, 318-24.
- Tan, G.O., Ensign, S.A., Ciurli, S., Scott, M.J., Hedman, B., Holm, R.H., Ludden, P.W., Korszun, Z.R., Stephens, P.J. und Hodgson, K.O.** (1992) On the structure of the nickel/iron/sulfur center of the carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*: an x-ray absorption spectroscopy study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4427-4431.
- Tanimoto, Y. und Bak, F.** (1994) Anaerobic degradation of methylmercaptan und dimethyl sulfide by newly isolated thermophilic sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2450-2455.

- Thauer, R.K., Klein, A.R. und Hartmann, G.C.** (1996) Reactions with Molecular Hydrogen in Microorganisms: Evidence for a Purely Organic Hydrogenation Catalyst. *Chem. Rev.*, **96**, 3031-3042.
- Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R. und Böck, A.** (2000a) Nickel serves as substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1995-1999.
- Theodoratou, E., Paschos, A., Mintz-Weber, S. und Böck, A.** (2000b) Analysis of the cleavage site specificity of the endopeptidase involved in the maturation of the large subunit of hydrogenase 3 from *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, **173**, 110-116.
- Trageser, M. und Uden, G.** (1989) Role of cysteine residues und of metal ions in the regulatory functioning of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **3**, 593-599.
- Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J. und Six, S.** (1995) O₂-sensing und O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.*, **164**, 81-90.
- Uden, G., Trageser, M. und Duchene, A.** (1990) Effect of positive redox potentials (greater than +400 mV) on the expression of anaerobic respiratory enzymes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **4**, 315-319.
- Urbina, H.D., Silberg, J.J., Hoff, K.G. und Vickery, L.E.** (2001) Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44521-44526.
- Vallee, B.L. und Auld, D.S.** (1992) Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes. *Matrix Suppl.*, **1**, 5-19.
- van den Berg, W.A., Hagen, W.R. und van Dongen, W.M.** (2000) The hybrid-cluster protein ('prismane protein') from *Escherichia coli*. Characterization of the hybrid-cluster protein, redox properties of the [2Fe-2S] und [4Fe-2S-2O] clusters und identification of an associated NADH oxidoreductase containing FAD und [2Fe-2S]. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 666-676.
- Van der Spek, T.M., Arendsen, A.F., Happe, R.P., Yun, S., Bagley, K.A., Stufkens, D.J., Hagen, W.R. und Albracht, S.P.J.** (1996) Similarities in the architecture of the active sites of Ni-hydrogenases und Fe-hydrogenases detected by means of infrared spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 629-634.

- Vignais, P.M., Billoud, B. und Meyer, J.** (2001) Classification und phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 455-501.
- Vignais, P.M. und Colbeau, A.** (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **6**, 159-188.
- Vignais, P.M. und Toussaint, B.** (1994) Molecular biology of membrane-bound H₂ uptake hydrogenases. *Arch. Microbiol.*, **161**, 1-10.
- Volbeda, A., Charon, M.H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J.C.** (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, **373**, 580-587.
- Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J.C. und Frey, M.** (1996a) Novel metal sites in protein structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 804-12.
- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., de Lacey, A.L., Fernandez, V.M., Hatchikian, E.C., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J.C.** (1996b) Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 12989-12996.
- Voordouw, G.** (1992) Evolution of hydrogenase genes. *Adv. Inorg. Chem.*, **38**, 397 — 422.
- Wächtershäuser, G.** (1988a) Before enzymes und templates: theory of surface metabolism. *Microbiol. Rev.*, **52**, 452-484.
- Wächtershäuser, G.** (1988b) Pyrite formation, the first energy source for life: a hypothesis. *System. Appl. Mol. Biol.*, **10**, 207-210.
- Wächtershäuser, G.** (1990) Evolution of the first metabolic cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 200-204.
- Wächtershäuser, G.** (1994) **Life in a ligand sphere.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4283-4287.
- Wächtershäuser, G.** (2000) Origin of life. Life as we don't know it. *Science*, **289**, 1307-1308.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J.** (1982) Distantly related sequences in the alpha- und beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases und other ATP-requiring enzymes und a common nucleotide binding fold. *EMBO*, **1**, 945-951.
- Walleczek, J., Martin, T., Redl, B., Stoffler-Meilicke, M. und Stoffler, G.** (1989) Comparative cross-linking study on the 50S ribosomal subunit from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **28**, 4099-4105.
- Wang, D. und Moore, S.** (1977) Polyspermine-ribonuclease prepared by cross-linkage with dimethyl suberimidate. *Biochemistry*, **16**, 2937-2942.

- Watt, G.D. und Reddy, K.R.N.** (1994) Formation of an all ferrous Fe₄S₄ cluster in the iron protein component of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *J. Inorg. Biochem.*, **53**, 281-294.
- Waugh, R. und Boxer, D.H.** (1986) Pleiotropic hydrogenase mutants of *Escherichia coli* K12: growth in the presence of nickel can restore hydrogenase activity. *Biochimie*, **68**, 157-66.
- Whitaker, J.R. und Granum, P.E.** (1980) An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 und 280 nm. *Anal.Biochem.*, **109**, 156-159.
- White, T.C., Harris, G.S. und Orme-Johnson, W.H.** (1992) Electrophoretic studies on the assembly of the nitrogenase molybdenum-iron protein from the *Klebsiella pneumoniae* *nifD* und *nifK* gene products. *J.Biol.Chem.*, **267**, 24007-24016.
- Wilkins, M.R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D.F. und Appel, R.D.** (1997) Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool. *Electrophoresis*, **18**, 403-408.
- Wolf, I., Buhrke, T., Dervedde, J., Pohlmann, A. und Friedrich, B.** (1998) Duplication of *hyp* genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch. Microbiol.*, **170**, 451-459.
- Wolfe, M.T., Heo, J., Garavelli, J.S. und Ludden, P.W.** (2002) Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **184**, 5898-5902.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid und phage recombinants. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3469-3478.
- Wu, L.F.** (1992) Putative nickel-binding sites of microbial proteins. *Res Microbiol*, **143**, 347-51.
- Wu, L.F. und Mandrand, M.A.** (1993) Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures und phylogeny. *FEMS Microbiol. Rev.*, **10**, 243-69.
- Wu, L.F. und Mandrand-Berthelot, M.A.** (1986) Genetic und physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie*, **68**, 167-79.
- Wu, L.F., Mandrand-Berthelot, M.A., Waugh, R., Edmonds, C.J., Holt, S.E. und Boxer, D.H.** (1989) Nickel deficiency gives rise to the defective hydrogenase phenotype of *hydC* und *fnr* mutants in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.*, **3**, 1709-1718.

- Wu, L.F., Navarro, C. und Mandrand-Berthelot, M.A.** (1991) The hydC region contains a multi-cistronic operon (*nik*) involved in nickel transport in *Escherichia coli*. *Gene*, **107**, 37-42.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors und host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 und pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Yoch, D.C. und Carithers, R.P.** (1979) Bacterial iron-sulfur proteins. *Microbiol. Rev.*, **43**, 384-421.
- Yuvaniyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K. und Dean, D.R.** (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 599-604.
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. und Dean, D.R.** (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13264-13272.
- Zheng, L. und Dean, D.R.** (1994) Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18723-18726.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L. und Dean, D.R.** (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry*, **33**, 4714-4720.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F. und Dean, D.R.** (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2754-2758.
- Ziegelhoffer, E.C. und Kiley, P.J.** (1995) In vitro analysis of a constitutively active mutant form of the *Escherichia coli* global transcription factor FNR. *J. Mol. Biol.*, **245**, 351-361.
- Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schwörer, B., Von Büнау, R., Richter, M., Klein, A. und Thauer, R.K.** (1992) H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.*, **208**, 511-520.

ANHANG

AI. Vergleich der Aminosäuresequenzen von HypD aus *E. coli* mit HypD aus den Organismen *B. japonicum*, *R. eutropha*, *C. jejuni*, *A. fulgidus* und *P. abyssi*.

	M	K	F	I	D	E	F	R	D	-	-	-	-	-	K	E	L	A	Q	K	L	A	X	H	L	R	A	E	A	S	Mehrheit		
1	M	R	F	V	D	E	Y	R	A	-	-	-	-	-	P	E	Q	V	M	Q	L	I	E	H	L	R	E	R	A	S	<i>E. coli</i>		
1	M	K	Y	S	S	E	F	R	D	-	-	-	-	-	K	T	I	A	Q	G	L	A	R	A	I	D	A	E	E	V	S	<i>B. japonicum</i>	
1	M	K	Y	I	E	E	F	R	D	-	-	-	-	-	G	E	L	A	Q	R	I	A	A	H	V	R	A	E	A	R	<i>R. eutropha</i>		
1	M	N	F	I	D	E	F	R	D	-	G	S	-	-	K	E	S	I	L	A	L	K	K	L	I	E	Q	E	L	K	<i>C. jejuni</i>		
1	M	-	-	R	R	R	Q	K	R	L	G	S	C	W	R	E	L	Q	M	K	P	V	I	R	L	S	E	K	I	R	<i>A. fulgidus</i>		
1	M	-	-	L	E	K	F	R	D	-	-	-	-	-	K	E	I	A	Q	K	-	-	I	V	R	-	-	-	-	H	<i>P. abyssi</i>		
	-	-	-	-	X	F	R	P	L	R	I	M	E	V	C	G	G	H	T	H	A	I	S	K	Y	G	L	R	S		Mehrheit		
										40																							
26	H	L	S	Y	T	A	E	R	P	L	R	I	M	E	V	C	G	G	H	T	H	A	I	S	R	Y	G	L	D	Q	<i>E. coli</i>		
26	-	-	-	-	-	S	Q	Q	A	Y	R	R	F	V	E	F	C	C	G	G	H	T	H	A	I	S	R	Y	G	L	E	D	<i>B. japonicum</i>
26	-	-	-	-	-	P	G	Q	R	Y	N	F	M	E	E	F	C	C	G	G	H	T	H	A	I	S	R	Y	G	L	E	D	<i>R. eutropha</i>
26	N	-	-	-	-	-	-	-	P	I	N	F	M	E	E	F	C	C	G	G	H	T	H	S	I	M	K	Y	A	L	P	S	<i>C. jejuni</i>
29	E	L	S	-	K	E	F	E	S	V	K	I	M	H	L	C	C	C	G	T	H	E	D	T	I	T	K	Y	A	L	P	S	<i>A. fulgidus</i>
20	K	E	A	-	K	G	F	D	E	L	R	F	M	H	V	C	G	T	H	E	D	T	V	T	R	A	G	I	R	S	<i>P. abyssi</i>		
	L	L	P	E	N	V	R	F	I	H	G	P	G	C	P	V	C	V	L	P	X	G	R	I	D	T	A	I	E	L	Mehrheit		
										70																							
56	L	L	P	E	N	V	E	F	I	H	G	P	G	C	P	V	C	V	L	P	M	G	R	I	D	T	C	V	E	I	<i>E. coli</i>		
51	L	L	P	A	N	V	R	M	I	H	G	P	G	C	P	V	C	V	L	P	A	S	R	I	D	M	A	I	R	L	<i>B. japonicum</i>		
51	L	L	P	E	N	V	R	M	I	H	G	P	G	C	P	V	C	V	L	P	A	S	R	I	D	L	A	L	H	L	<i>R. eutropha</i>		
49	I	L	P	K	E	I	N	F	I	H	G	P	G	C	P	V	C	V	L	P	R	V	R	I	D	T	A	I	K	L	<i>C. jejuni</i>		
58	L	L	P	E	N	V	K	I	M	S	G	P	G	C	P	V	C	V	L	P	D	E	D	I	Q	M	V	M	H	L	<i>A. fulgidus</i>		
49	L	L	P	E	N	V	K	I	M	S	G	P	G	C	P	V	C	V	L	P	V	E	D	I	V	R	M	M	E	I	<i>P. abyssi</i>		
	A	S	K	P	-	-	-	-	-	D	V	I	L	C	T	F	G	D	L	M	R	V	P	G	S	G	G	-	S	L	Mehrheit		
										100																							
86	A	S	H	P	-	-	-	-	-	E	V	I	F	C	T	F	G	D	A	M	R	V	P	G	K	Q	G	-	S	L	<i>E. coli</i>		
81	A	E	R	P	-	-	-	-	-	E	V	I	L	C	V	Y	G	D	L	M	R	A	P	G	S	Q	G	-	S	L	<i>B. japonicum</i>		
81	A	L	E	R	-	-	-	-	-	D	A	I	F	C	T	L	G	D	L	M	R	V	P	A	S	-	-	-	S	L	<i>R. eutropha</i>		
79	A	S	M	K	-	-	-	-	-	D	T	I	F	C	T	L	G	D	L	M	R	V	P	G	S	E	-	-	S	L	<i>C. jejuni</i>		
88	L	E	K	-	-	-	-	-	-	E	N	I	T	L	A	T	F	G	D	M	A	R	V	P	F	Q	G	K	-	S	L	<i>A. fulgidus</i>	
79	M	R	K	A	K	E	E	G	E	D	I	I	L	T	T	F	G	D	M	Y	R	I	P	T	P	M	G	-	S	F	<i>P. abyssi</i>		
	L	D	A	K	A	E	G	A	D	V	R	I	V	Y	S	I	L	D	A	L	K	L	A	Q	E	N	P	D	R	E	Mehrheit		
										130																							
110	L	Q	A	K	A	R	G	A	D	V	R	I	V	Y	S	P	M	D	A	L	K	L	A	Q	E	N	P	T	R	K	<i>E. coli</i>		
106	L	L	A	K	A	L	G	A	H	I	R	R	M	V	Y	S	T	L	D	A	I	R	L	A	E	Q	T	P	G	R	E	<i>B. japonicum</i>	
106	I	R	A	K	A	L	H	G	A	D	V	R	A	L	Y	S	A	A	D	A	L	K	I	A	Q	R	H	P	Q	R	E	<i>R. eutropha</i>	
103	L	D	L	R	A	K	G	A	D	V	R	A	L	Y	S	P	L	E	V	L	L	E	I	A	K	Q	N	L	N	K	N	<i>C. jejuni</i>	
112	F	T	L	R	A	E	G	Y	D	I	R	I	V	Y	S	I	F	D	S	L	K	L	A	-	E	S	S	D	R	P	<i>A. fulgidus</i>		
108	A	D	L	K	S	E	G	F	D	V	R	V	V	Y	S	I	Y	D	S	Y	K	I	A	Q	E	N	R	D	K	L	<i>P. abyssi</i>		
	V	V	F	F	A	I	G	F	E	T	T	T	P	P	T	A	L	-	L	L	Q	E	A	I	A	E	X	V	D	N	Mehrheit		
										160																							
140	V	V	F	F	G	L	G	F	E	T	T	M	P	T	T	A	I	-	T	L	Q	Q	A	K	A	R	D	V	Q	N	<i>E. coli</i>		
136	V	V	F	F	A	I	G	F	E	T	T	T	P	P	T	A	V	-	M	I	R	I	A	E	H	K	R	L	E	G	<i>B. japonicum</i>		
136	V	V	F	F	A	I	G	F	E	T	T	T	P	P	T	A	L	-	I	I	R	E	A	K	A	R	Q	V	D	N	<i>R. eutropha</i>		
133	I	I	F	F	A	I	G	F	E	T	T	T	P	P	M	S	A	L	-	L	L	Q	K	V	I	E	E	K	I	N	N	<i>C. jejuni</i>	
141	V	V	H	F	A	I	G	F	E	T	T	M	P	S	T	A	I	-	A	L	L	D	E	K	-	-	-	-	E	N	<i>A. fulgidus</i>		
138	V	V	H	F	S	P	G	F	E	T	T	T	A	P	T	A	-	G	M	L	E	T	V	I	N	E	G	L	D	N	<i>P. abyssi</i>		
	F	S	V	F	C	N	H	V	L	T	P	P	A	V	E	A	L	L	E	N	P	T	V	-	-	-	-	-	-	-	Mehrheit		
										190																							
169	F	Y	F	F	C	Q	H	I	T	L	I	P	T	L	R	S	L	L	E	Q	P	D	N	-	-	-	-	-	-	G	<i>E. coli</i>		
165	L	S	V	F	C	N	H	V	L	T	P	S	A	M	H	R	I	L	E	S	P	K	I	R	N	T	G	G	V	P	<i>B. japonicum</i>		
165	F	S	V	L	C	C	H	V	L	T	P	S	A	I	T	H	I	L	E	S	P	E	V	-	-	-	-	-	-	P	<i>R. eutropha</i>		
162	V	F	F	H	I	N	H	I	T	V	P	A	P	V	E	A	I	M	N	D	E	N	V	K	-	-	-	-	-	-	<i>C. jejuni</i>		
166	F	Y	V	F	S	A	H	R	F	F	I	P	A	V	H	A	L	C	E	N	T	V	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>A. fulgidus</i>		
167	F	K	I	Y	S	V	H	R	L	T	P	P	A	V	E	A	L	L	K	A	G	T	V	-	-	-	-	-	-	-	<i>P. abyssi</i>		

	I D G F I G P G H V S T I I G T R P Y E P L A E K F G I P I	Mehrheit
	220 230 240	
193	I D A F L A P G H V S M V I V G T D A Y N F I A S D F H R P I	<i>E. coli</i>
195	I D G F I G P P A H V S T I V I G T Q P Y E P M A E Q F E K P I	<i>B. japonicum</i>
195	I D G F F V G P P A S H V S S I V I G T R P Y E H F S R E Y G K P I	<i>R. eutropha</i>
186	I N A F F L G P P A S H V S S I V I G T Y G I Y E P L A A K F K T P I	<i>C. jejuni</i>
189	- D A F I N P P G H V S S T I I G V K P Y R E I L K K Y G I P Q	<i>A. fulgidus</i>
190	F H G L I D P G H V S T I I G V R G W A Y L T E K Y N I P Q	<i>P. abyssii</i>
	V V A G F E P L D V L Q A V L M L V R Q V N E G R A E V E N	Mehrheit
	250 260 270	
223	V V A G F E P L D L L Q G V V M L V Q Q K I A A H S K V E N	<i>E. coli</i>
225	V V A G F E P L D D V L Q A V L M L V R Q Q V N Q N R H E V E N	<i>B. japonicum</i>
225	V I A G F E P L D D V M Q A I L M L V R Q V N S G R A E V E N	<i>R. eutropha</i>
216	A V S A G F E P V D I L E S V L N I I K Q S N E G T F A K V Y N	<i>C. jejuni</i>
218	V I A G F E P E D D V M L A I Y L L L E A M S D G R R E V I N	<i>A. fulgidus</i>
220	V V A G F E P V D V L L G I L I L I R M V K E G E A K I I N	<i>P. abyssii</i>
	E Y S R A V T R E G N V K A Q E A V S K V F E V R - D F E W	Mehrheit
	280 290 300	
253	Q Y R R V V P D A G N L L A Q Q A I A D V F C V N G D S E W	<i>E. coli</i>
255	Q Y S R A V T T R E G N R S A K E E V S Q V F E E L R E Q F E W	<i>B. japonicum</i>
255	E F V R A V T R D G N E S A Q A M V S E V F E L R P S F E W	<i>R. eutropha</i>
246	Q Y K R A V S K E E G N V K A Q N L V K K Y F R V - C D F E F	<i>C. jejuni</i>
248	E Y S R A V K E E G N V R A Q E A M D R V F R K E - D W S W	<i>A. fulgidus</i>
250	E Y S R V V K W E G N V R A Q E L I N K F F E V K - D A K W	<i>P. abyssii</i>
	R G L G V V P X S G L E L K X E F A R F D A E T R F D P A V	Mehrheit
	310 320 330	
283	R G L G V I E S S G V H L T P D Y Q R F D A E E A H F R P A P	<i>E. coli</i>
285	R G L G L E V P N S S G L L K L K A Q S Y A R F F D A E E T R F F A I H D	<i>B. japonicum</i>
285	R G L G L E V P Y S A L L R I R A Q Q F A R F D A E E T R F F D L R Y	<i>R. eutropha</i>
275	R G L G L I K D G G L E L K E E F S A Y D A S K K V F D C T V	<i>C. jejuni</i>
277	R G L G V I K G S S G L E L A K R E F E Q F D A R K V F E D A F	<i>A. fulgidus</i>
279	R A L G I I P Q S S G L E L K R E W K D L E I R T L Y N P D V	<i>P. abyssii</i>
	Q X V P D - - - - - N K A C E C G A I L R G L A K P X D C K	Mehrheit
	340 350 360	
313	Q Q V C D - - - - - D P R A R C C G E V L T G K C K P H Q C P	<i>E. coli</i>
315	L R V A D D - - - - - N P A C C E C C A I L R G A K R P I D C C K	<i>B. japonicum</i>
315	R P V P D - - - - - N K A C C E C C G A I L R G V K K P T D D C C K	<i>R. eutropha</i>
305	Q S K N E - - - - - S K A C C I C G Q I L R G L A K P Y D C C K	<i>C. jejuni</i>
307	A D F Q P V E D K S K R L C R C G D V L L K I A T P K D C C P	<i>A. fulgidus</i>
309	P K L P D L E - - - - - K G C L C G A I L R G L A L P P Q C C P	<i>P. abyssii</i>
	L F G K A C T P R T P I G A C M V S S E G A C A A Y Y T Y G	Mehrheit
	370 380 390	
338	L F G N T C C N P Q T A F I G A L M V S S S E G A C C A A W Y Q Y R	<i>E. coli</i>
340	L F G N T C C T P E T P I G A L M V S S S E G A C C A A Y W T Y R	<i>B. japonicum</i>
340	L F A T V C C T P E N P I M G S C C M V S S E G A C C A A H Y S Y S	<i>R. eutropha</i>
330	V F G K A C C T P R R S P I G S C C M V S S E G A C C A A Y Y K Y S	<i>C. jejuni</i>
337	L F M K A C C N P R R N P V G A C C M V S S V E E G T C C N I W A T S G	<i>A. fulgidus</i>
335	H F G K T C T P R H P I G P C M V S Y E G T C S I F Y K Y G	<i>P. abyssii</i>
	R V R D E - - - - - A	Mehrheit
	400	
368	Q Q E S E - - - - - A	<i>E. coli</i>
370	R V R D E - Q A R Q T S	<i>B. japonicum</i>
370	R F K D I P L V - A A	<i>R. eutropha</i>
360	K V N - - - - - A	<i>C. jejuni</i>
367	T S R T Q	<i>A. fulgidus</i>
365	A L F	<i>P. abyssii</i>

Konservierte Aminosäuren bzw. Motive wurden umrandet.

II. Vergleich der Aminosäuresequenz der HypD Proteine aus *Escherichia coli* und *Methanocaldococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996).

Die Proteine weisen eine Identität von 42 % und eine Ähnlichkeit von 59 % auf. Die Konsensussequenz ist zwischen den beiden Proteinsequenzen dargestellt. Für diese Arbeit wichtigen Motive oder Aminosäuren sind fett gedruckt.

```

E. c. : 35  LRIMEVCGGHTHAIFKFGLDQLLPENVEFIHGPGCPVCVVLPMGRIDTCVEIASHPEVIFC 94
      L+IM VCG H H I K+G+ +LPEN+ + GPGCPVCV IDT + +A + VI
M. j. : 27  LKIMHVCGSHEHTICKYGIRDVLPENITVVPGGCPVCVTTQKEIDTAIYLADNGYVI-T 85

E. c. : 95  TFGDAMRVPGKQGSLLQAKARGADVRIYVSPMDALKLAQENPTRKVVFFGLGFETTMPTT 154
      T GD RVPG + SL++ ++ G DVRIVYS +A+K+A++ +K VF +GFETT PTT
M. j. : 86  TLGDMYRVPGSEKSLMEKQSEGCDVRIYVSISEAVKMAKKERDKKFVFAIGFETTAPTT 145

E. c. : 155 AITLQQAARDVQNFYFFCQHITLIPTLRSLLEQPDNGIDAFLAPGHVSMVIGTDAYNFI 214
      L K +DV NF+ H P + LL + +DAF+ PGHVS + G Y +
M. j. : 146 GAELISLKNKDVNNFFILNCHRQTPPVMEFLLNEGVY-LDAFICPGHVSTITGLKPYYGL 204

E. c. : 215 ASDFHRPLVVAGFEPLDLLQGVVMLVQQKIAAHSKVENQYRRVVPDAGNLLAQQAIDVF 274
      + P+VVAGFEP+D+L ++M+++Q I+ +KVEN+Y R V GN+LAQ+ I +VF
M. j. : 205 CEKYKAPMVVAGFEPIDVLMAIIMILKQVISGEAKVENEYIRAVKPEGNVLAQKIINEVF 264

E. c. : 275 CVNGDSEWRGLGVISSGVHLTPDYQRFDAEAHFRPAPQQVCD DPR-ARCGEVLTKGCKP 333
      + D WRG V+++ G L Y++FD H P+ P+ C ++L G+ P
M. j. : 265 -ESIDVPWRGFPVVKNGGFGLREKYKKFDIYEH-EDIPEIKEKIPKGCICDKILRGEKLP 322

E. c. : 334 HQCPLFGNTCNPQTAFGALMVSSEGACAAWYQYRQ 368
      CPLFG C P G+ MVS EG C +Y+YR+
M. j. : 323 TDCPLFGTVCTPLNPVGSCMVSDEGTCRIFYKYRR 357

```

AIII. Aminosäuresequenz von HypC-Strep und Größe und Sequenz der Peptide nach Lys-C-Spaltung. Die Peptide wurde mit dem Programm PeptideMass (Wilkins *et al.*, 1997) errechnet.

HypC-Strep (98 bzw. 97 AS)

(M)CIGVPGQIRTIDGNQAKVDVCGIQRDVDLTLVGSCDENGQPRVGQWVLVHVGFA
MSVINEAEARDTLDALQNMFDVEPDVGALLYGEEK **WSHPQFEK**
Strep-TagII

Peptide nach Lys-C-Spaltung:

Masse	Position	Aminosäuresequenz
7844.7978	18-89	VDVCGIQRDVDLTLVGSCDENGQPRVGQWVLVHVGFA MSVINEAEARDTLDALQNMFDVEPDVGALLYGEEK
1769.9326	1-17	CIGVPGQIRTIDGNQAK
1058.5054	90-97	WSHPQFEK

AIV. Aminosäuresequenz von HypD und Größe und Sequenz der Peptide nach Lys-C-Spaltung. Die Peptide wurde mit dem Programm PeptideMass (Wilkins *et al.*, 1997) errechnet.

HypD (373 AS)

MRFVDEYRAPEQVMQLIEHLRERASHLSYTAERPLRIMEVCGGHTHAIFKFGLDQLL
PENVEFIHGPGCPVCVLPMPGRIDTCVEIASHPEVIFCTFGDAMRVPGKQGSLLQAKAR
GADVRIYSPMDALKLAQENPTRKVVFGLGFETTMPTTAITLQQAKARDVQNFYFF
CQHITLIPTLRSLLEQPDNGIDAFLAPGHVSMVIGTDAYNFIASDFHRPLVVAGFEPLD
LLQGVVMLVQQKIAAHSKVENQYRRVVPDAGNLLAQQAIADVFCVNGDSEWRGLG
VIESSGVHLTPDYQRFDAEAHFRPAPQQVCDDPRARCGEVLTGKCKPHQCPLFGNTC
NPQTAFGALMVSSEGACAAWYQYRQQESEA

Peptide nach Lys-C-Spaltung:

Masse	Position	Aminosäuresequenz
9055.6567	163-243	ARDVQNFYFFCQHITLIPTLRSLLEQPDNGIDAFLAPGHVSMV IGTDAYNFIASDFHRPLVVAGFEPLDLLQGVVMLVQQ K
8936.3654	250-330	VENQYRRVVPDAGNLLAQQAIADVFCVNGDSEWRGLGVIES SGVHLTPDYQRFDAEAHFRPAPQQVCDDPRARCGEVLTGK
5953.9068	51-105	FGLDQLLPENVEFIHGPGCPVCVLPMPGRIDTCVEIASHPE VIFCTFGDAMRVPGK
5950.9988	1-50	MRFVDEYRAPEQVMQLIEHLRERASHLSYTAERPLRIMEVCG GHTHAIFK
4490.9685	333-373	PHQCPLFGNTCNPQTAFGALMVSSEGACAAWYQYRQQESEA
2500.3156	140-162	VVFGLGFETTMPTTAITLQQAK
1861.9952	114-130	ARGADVRIYSPMDALK
1056.5796	131-139	LAQENPTRK
844.4887	106-113	QGSLLQAK
626.3620	244-249	IAAHSK

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. August Böck, da er mir als Doktoranden-Nachzüglerin noch die Chance gegeben hat, einen Einblick in die Welt der Hydrogenase-Forschung zu erhaschen. Für seine wissenschaftliche Förderung und sein immer offenes Ohr bzgl. Problemen und materiellen Engpässen, neuen Ideen oder Hirngespinnsten, Westernblot-Auswertungs-Phantasien und molekularen Halluzinationen bin ich ihm sehr dankbar. Auch das mir entgegengebrachte Vertrauen sowohl in meine Arbeit im Labor als auch bei Vorträgen auf nationalen und internationalen Tagungen habe ich stets sehr zu schätzen gewusst. Herr Böck hat es geschafft, meine Begeisterung für die Forschung zu erwecken, mich mit seinem Wissen zu beeindrucken („...schauen sie doch mal in den Bacteriological Reviews; 1976 war da ein Übersichtsartikel über Cyanid“) und trotzdem auch Spaß zu verstehen.

Deshalb wird meine Doktorandenzeit für mich immer unvergesslich bleiben.

Danken möchte ich auch H. Hartl für die ICP-OES Messungen sowie B. F. Matzanke für die Mössbauerstudien an HypD. Elisabeth Hochleiter und F. Lottspeich danke ich für die erfolgreiche Kooperation.

Auch bei Frau Silvestre möchte ich mich herzlichst für Ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Danke auch an meine beiden Diplomandinnen Michaela und Sabine für die tolle Zusammenarbeit und die schöne Zeit. Es hat Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten.

Natürlich möchte ich auch allen Leuten des Hamsterlabors danken, insbesondere Axel, Katerina (Frau Tatou), Sakis, Nina, Steffi (alias Gerti) sowie Martin (als schnorrender Gast), Verena und Anastassia aus dem Frauenlabor für Ihre Zusammenarbeit, wissenschaftliche Diskussionen, Gelplattenkämpfe, Eis und Kuchen, Fahrradtouren, Schweinshaxen, den Pradobesuch, das Affenlied, den griechischen Einfluss, Souk / Sirtaki-tanzen, Steffi's Kochkünste, unsere legendären (Papersekt-) Feiern und ihre Freundschaft.

Gedankt sein auch allen meinen Freunden, insbesondere Marianne und Nicole.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mama, meinem Dad und meiner Schwester Sabine für ihre Unterstützung bedanken, die nicht selten Vorträge über Hycs, Hycs und Hydrogenasen (dargestellt durch Tomaten, Radieschen, Gurken und sonstige Utensilien) beim Abendessen über sich ergehen lassen mussten („...und für was ist das alles gut?“). Sabine gebührt ein besonderer Dank dafür, dass sie mir bei der „Erforschung der Makrobiologie“ unter Wasser (Hammerhaie, Mantas & Co.) zur Seite stand. Meine Familie hat sich stets mit mir über meine Erfolge gefreut („...und wo kann ich die Zeitschrift mit deiner Veröffentlichung kaufen?“) und mich in schlechten Phasen aufgemuntert. Tausend Dank!

Deshalb werde ich Euch in USA unendlich vermissen!!

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Melanie Blokesch
Geburtstag: 30. Juni 1976
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Eltern: Verena Blokesch (Hausfrau)
Wendelin Blokesch (Rentner)

Ausbildung:

1982 – 1986 Grundschule Haimhausen
1986 – 1995 Carl-Orff-Gymnasium Unterschleißheim
Abschluss: Abitur
1995 – 2000 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Titel der Diplomarbeit: „Die Rolle des chaperonartigen Proteins HybG bei der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*.“
Institut für Genetik und Mikrobiologie, Prof. Dr. A. Böck;
Abschluss: Diplom
2000 – 2004 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Department Biologie I, Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Prof. Dr. August Böck