



**Die Reifungsproteasen der Hydrogenasen:  
Untersuchungen zur Substratbindung und zum Katalysemechanismus**

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

vorgelegt von  
Ekaterini Theodoratou  
München

---

Januar 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Averhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 01.04.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>A. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>I. Proteolytische Enzyme</b>	<b>1</b>
1. Nomenklatur und Terminologie	1
2. Katalysemechanismen	2
a) Serinpeptidasen	2
b) Cysteinpeptidasen	5
c) Aspartatpeptidasen	6
d) Metallopeptidasen	8
3. Nicht-klassifizierte Peptidasen	10
<b>II. Hydrogenasen</b>	<b>10</b>
1. Einteilung, Vorkommen und Struktur	10
a) [Fe]-Hydrogenasen	10
b) [NiFe]-Hydrogenasen	12
2. Genetik und Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen am Beispiel von <i>E. coli</i>	15
a) Genetik	15
b) Reifung	18
<b>III. HybD, die spezifische Protease der Hydrogenase 2</b>	<b>21</b>
<b>B. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>I. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide</b>	<b>23</b>
<b>II. Medien und Lösungen</b>	<b>34</b>
1. Medien	34

2. Lösungen	35
<b>III. Anzuchten</b>	<b>36</b>
<b>IV. Physiologische Methoden</b>	<b>37</b>
1. Test auf Gasbildung	37
2. Überschichtungstests	37
a) Test auf Formiatdehydrogenase H-Aktivität	37
b) Test auf Hydrogenaseaktivität	38
<b>V. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>38</b>
1. Verwendete Oligonukleotide	38
2. Plasmidpräparationen	42
3. Amplifikation und Mutagenese von Genen mittels PCR	43
a) Einfache Vervielfältigung von Genen	43
b) Gerichtete Mutagenese	43
c) Unspezifische Mutagenese	44
4. 5'-Phosphorylierung, 5'-Dephosphorylierung, Restriktion und Ligation	45
5. Auftrennung von DNA in Agarosegelen	46
6. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	46
7. DNA-Sequenzierung	47
<b>VI. Genetische Methoden</b>	<b>47</b>
1. Transformationen	47
2. Einführen von Deletionen bzw. Mutationen in das Chromosom	48
3. Unspezifische Mutagenese mittels EMS	48
<b>VII. Biochemische Methoden</b>	<b>48</b>
1. Herstellung von Zellysaten	48
2. Anfertigung von Rohextrakten (S13-Extrakten)	48

3. Präparation von S100- und P100-Fraktionen	49
4. Bestimmung der Proteinkonzentration	49
5. Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	49
6. Enzymtests	50
a) Bestimmung der Formiatdehydrogenase H-Aktivität	50
b) Bestimmung der Aktivität der Hydrogenasen 1, 2 und 3	51
<b>VIII. Immunologische Methoden</b>	<b>51</b>
1. Immunoblotanalysen	51
2. Absättigung von Antikörpern	51
<b>IX. Radioaktive Markierung von Proteinen</b>	<b>53</b>
1. <i>in-vivo</i> Inkorporation von $^{63}\text{Ni}$	53
2. <i>in-vivo</i> Inkorporation von $^{75}\text{Se}$	53
<b>X. Datenverarbeitung</b>	<b>53</b>
<b>C. ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>I. Untersuchung der Funktion der Metallbindestelle der Reifungsproteasen</b>	<b>55</b>
1. Konstruktion von HycI-Varianten mit Aminosäureaustauschen in der Metallbindestelle	56
2. Charakterisierung der HycI-Varianten	56
a) Test auf Gasbildung	56
b) Aktivitäten der Hydrogenasen 1, 2 und 3 und der Formiatdehydrogenase H	57
c) Prozessierung der großen Untereinheit von Hydrogenase 3	60
d) Untersuchung einer Komplexbildung zwischen prä-HycE und den HycI-Varianten	61

<b>II. Untersuchungen zur Substratbindung und zum Katalysemechanismus der Reifungsprotease HycI</b>	<b>66</b>
1. Charakterisierung der HycI-Varianten auf Substratbindung und Katalyse	69
a) Gasbildung und enzymatische Aktivitäten der Hydrogenasen 1, 2 und 3	69
b) Prozessierung von prä-HycE	71
2. Wanderungsverhalten der HycI-Varianten im nicht-denaturierenden Gelsystem	73
<b>III. Mutationsanalyse der C-terminalen Spaltung von prä-HycE</b>	<b>75</b>
1. Einführen von Mutationen in die Schnittstellenregion von HycE	77
2. Gasbildung, Hydrogenaseaktivität und Prozessierbarkeit der konstruierten HycE-Varianten	79
3. <sup>63</sup> Ni-Markierungen der Varianten M538D und M538E	85
4. <sup>63</sup> Ni-Markierungen der Varianten R537D, R537L, R537K und R537H	87
5. Untersuchung der Funktion der C-terminalen Verlängerung der großen Untereinheit	89
<b>IV. Suche nach Suppressormutanten</b>	<b>91</b>
<b>V. Austausch von Cystein-531 gegen Selenocystein</b>	<b>94</b>
1. Gasbildung und Prozessierbarkeit der Selenocysteinvarianten von HycE	98
2. Expression der potentiellen Selenocysteinvarianten von HycE und <sup>75</sup> Se-Markierung	99
<b>VI. Komplexe der großen Untereinheit mit HycH und HycG</b>	<b>101</b>
1. Komplexe mit HycG	105
2. Komplexe mit HycH	105
3. Untersuchungen zur potentiellen Funktion von HycH	108

<b>D. DISKUSSION</b>	<b>110</b>
<b>I. Potentieller Katalysemechanismus der Reifungsproteasen von Hydrogenasen</b>	<b>110</b>
1. Die Reifungsproteasen von Hydrogenasen sind Aspartatpeptidasen mit einem Histidin als Nickelbinderest im aktiven Zentrum	111
2. Das Nickelatom der großen Untereinheit ist an deren C-terminalen Prozessierung beteiligt	114
<b>II. Funktion des C-Terminus und der Schnittstellenreste der großen Untereinheit</b>	<b>118</b>
1. Der N-terminal gelegene basische Rest der Schnittstellenregion ist an der Erkennung und Bindung des Substrats durch die Protease nicht beteiligt, spielt aber eine entscheidende Rolle für die Aktivität des Hydrogenaseenzym.	118 119
2. Der C-terminal gelegene Rest scheint eine Rolle bei der Ausbildung der richtigen Konformation des Proteins zu spielen.	
<b>III. Rolle des Hych-Proteins in der Reifung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3</b>	<b>122</b>
<b>E. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>124</b>
<b>F. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>126</b>

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
bp	Basenpaare
cat	Chloramphenicol-Transacetylase
CP	Carbamoylphosphat
C-	Carboxy-
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
Fdh <sub>H</sub>	Formiatdehydrogenase H
FHL	Formiat-Hydrogen-Lyase
x g	-fache Erdbeschleunigung
H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>	bidestilliertes Wasser
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
N-	Amino
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P100	Sediment einer Zentrifugation bei 100000 x g
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
prä-HycE	Vorläuferform von HycE
S13	Überstand einer Zentrifugation bei 13000 x g
S100	Überstand einer Zentrifugation bei 100000 x g
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris/Cl	N, N ,N -Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U/min

wt

Umdrehungen/Minute

Wildtyp

## A. EINLEITUNG

Die Proteine einer Zelle können anhand ihrer wesentlichen Funktion in zwei Klassen, nämlich Strukturproteine und Enzymproteine unterschieden werden. Im Gegensatz zu Strukturproteinen, deren Aufgabe hauptsächlich im Aufbau biologischer Substanz und in der Speicherung von Aminosäuren besteht, katalysieren Enzymproteine die unterschiedlichsten Reaktionen, wobei ihre hervorstechende Eigenschaft die Spezifität sowohl zu ihrem Substrat als auch bezüglich der durch sie katalysierten Reaktion ist. Eine umfangreiche Enzymklasse stellen dabei die proteolytischen Enzyme dar. Sie katalysieren die enzymatische Spaltung von Proteinen und Peptiden durch Hydrolyse einer Peptidbindung in exergonischer Reaktion und spielen eine signifikante Rolle in zahlreichen zellulären und extrazellulären Prozessen. Die verschiedenen Wege, auf denen sie diese Funktion erfüllen, ihr Vorkommen in allen Lebensformen, ihre unterschiedliche Lokalisation innerhalb, außerhalb und an der Oberfläche von Zellen und ihre funktionelle Diversität sowie die Tatsache, dass etwa 2 % aller Genprodukte Peptidasen sind (Barrett et al., 1998), machen sie zu einer der vielfältigsten und größten Enzymgruppen.

### I. Proteolytische Enzyme

#### 1. Nomenklatur und Terminologie

Die Terminologie proteolytischer Enzyme ist komplex und uneinheitlich. Gemäß E.C.-Liste (Enzyme Commission List 1992) werden proteolytische Enzyme allgemein, der Tatsache Rechnung tragend, dass sie eine Peptidbindung, meist eine  $\alpha$ -Peptidbindung, hydrolysieren, als Peptidasen bezeichnet. Je nach Angriffsort in der Polypeptidkette unterteilt man sie in zwei Gruppen: **Exopeptidasen** und **Endopeptidasen**. Exopeptidasen spalten nur Aminosäurereste vom N- oder C-terminalen Ende einer Polypeptidkette ab, Endopeptidasen hydrolysieren die innerhalb einer Peptidkette gelegenen Bindungen.

**Exopeptidasen** können vom einen oder anderen meist unsubstituierten Terminus eine einzige Aminosäure, ein Dipeptid oder ein Tripeptid entfernen. Eine Ausnahme stellen die sogenannten **Omega-Peptidasen** dar, welche bestimmte modifizierte terminale Reste freisetzen können. Diese Modifikationen können Substitutionen oder Zyklisierungen der terminalen Reste aber auch Isopeptidbindungen zwischen den endständigen Aminosäuren darstellen. Ihre Zahl ist jedoch gering. Ansonsten werden Exopeptidasen, die nur eine einzige

Aminosäure vom freien N-terminalen Ende abspalten, als **Aminopeptidasen**, jene, die ein Dipeptid oder Tripeptid freisetzen, als **Dipeptidyl-Peptidasen** bzw. **Tripeptidyl-Peptidasen** bezeichnet. Ist der Angriffsort der freie C-Terminus so spricht man im Falle der Abspaltung eines einzigen Restes von **Carboxypeptidasen**, im Falle der Freisetzung eines Dipeptids von **Peptidyl-Dipeptidasen**. Eine weitere recht kleine Gruppe von Exopeptidasen ist spezifisch für Dipeptide, d.h. es können keine Peptide hydrolysiert werden, die mehr als zwei Reste enthalten. Diese Enzyme werden deshalb **Dipeptidasen** genannt (Sterchi & Stöcker, 1999; Barrett et al., 1998).

**Endopeptidasen** werden dagegen auf der Basis ihres Katalysemechanismus in **Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloendopeptidasen** unterteilt. Die gleichen katalytischen Mechanismen wirken natürlich auch bei den Exopeptidasen, so dass auch diese unter Verwendung derselben Kriterien weiter unterschieden werden können. So stellt ein Großteil der charakterisierten Aminopeptidasen Metallenzyme dar, während z.B. unter den Dipeptidyl-Peptidasen und Tripeptidyl-Peptidasen Serinpeptidasen vorherrschen.

Im folgenden sollen die verschiedenen Reaktionsmechanismen etwas genauer betrachtet werden.

## 2. Katalysemechanismen

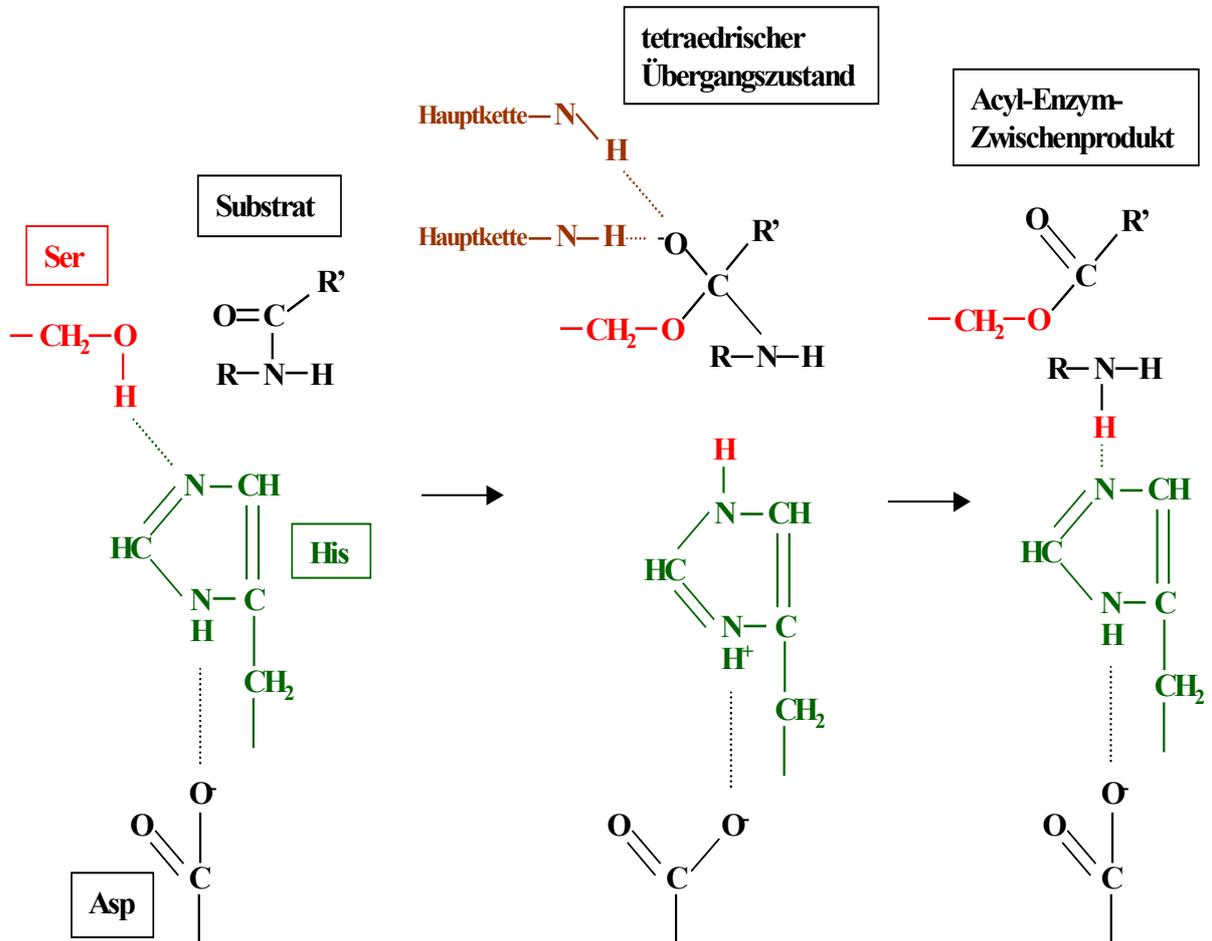
### a) Serinpeptidasen

Der Katalysemechanismus von Serinpeptidasen wurde anhand des Enzyms Chymotrypsin aufgeklärt. Die katalytische Aktivität von Serinpeptidasen beruht auf der ungewöhnlichen Reaktivität eines Serinrestes im Enzym, welche durch die Nachbarschaft eines Histidins und eines Aspartats bedingt wird. In dieser sogenannten katalytischen Triade sind Histidin und Serin direkt an der Spaltung der Peptidbindung des Substrats beteiligt. Die Hydrolyse beginnt mit einem Angriff des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe des Serins auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung, wobei das O-Atom eine negative Nettoladung bekommt (Abbildung 1). Die vier in dieser Phase mit dem Carbonylkohlenstoff verknüpften Atome liegen in tetraedrischer Anordnung vor, was durch Wasserstoffbrücken zwischen dem negativ geladenen Carbonylsauerstoff und zwei NH-Gruppen der Hauptkette ermöglicht wird (Oxyaniontasche). Gleichzeitig wird das Proton des Serins auf das Histidin der katalytischen Triade übertragen. Das Aspartat bringt dabei den Imidazolring des Histidins in die exakt

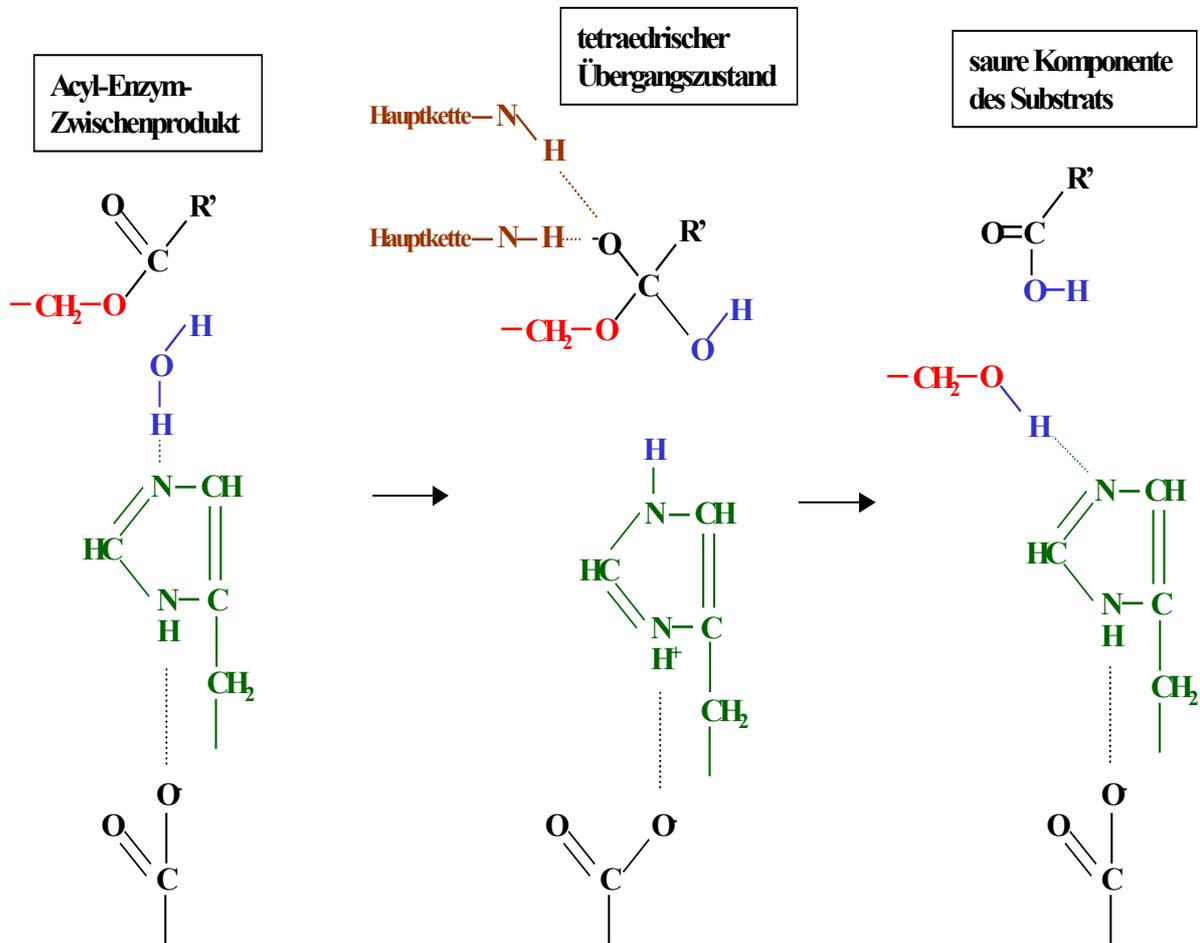
richtige Position und neutralisiert partiell dessen im Übergangszustand erhaltene positive Ladung. Die Funktion des Aspartats besteht also darin, durch seine  $-\text{COO}^-$ -Gruppe die positiv geladene Form des Histidins im Übergangszustand zu stabilisieren sowie sicherzustellen, dass es sich zur Aufnahme des Protons vom Serin in der geeigneten tautomeren Form befindet. Von der protonierten Form des Histidins wird das Proton dann auf das N-Atom der Peptidbindung übertragen, was deren Spaltung bewirkt. In diesem Stadium ist die Aminkomponente über eine Wasserstoffbrücke an das Histidin angelagert und der saure Teil des Substrats mit dem Serin verestert. Es wird also ein kovalentes Acyl-Enzym-Zwischenprodukt ausgebildet, weshalb dieser erste Schritt der hydrolytischen Reaktion auch als Acylierung bezeichnet wird. Die Aminkomponente diffundiert dann ab und es folgt der zweite Schritt in der Hydrolyse des Peptids, die Deacylierung. Im Prinzip ist die Deacylierung die Umkehr der Acylierung, nur ist die Aminkomponente hier durch  $\text{H}_2\text{O}$  ersetzt. Sie beginnt damit, dass ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül den Platz einnimmt, den zuvor die Aminkomponente des Substrats innehatte. Dabei wird dem  $\text{H}_2\text{O}$  durch das Histidin ein Proton entzogen. Das verbleibende  $\text{OH}^-$ -Ion greift sofort das Carbonylkohlenstoffatom der an Serin gebundenen Acylgruppe an. Wie bei der Acylierung entsteht so vorübergehend ein tetraedrisches Zwischenprodukt. Das Histidin gibt dann ein Proton an das O-Atom von Serin ab, das nun seinerseits die saure Gruppe des Substrats entlässt. Das Enzym ist nun für eine neue Katalyserunde bereit (Bender, 1962; Henderson, 1970; Blow, 1976; Fastrez & Fersht, 1973; Kossiakoff & Spencer, 1981; Rühlmann et al., 1973).

In einigen wenigen Fällen ist das reaktive Serin durch ein Threonin ersetzt. Da der Mechanismus und die angreifende chemische Gruppe jedoch die gleichen sind, werden diese Threonin-abhängigen Peptidasen ebenfalls in die Gruppe der Serinpeptidasen eingeordnet. Weitere kleinere Abweichungen von der üblichen Zusammensetzung der katalytischen Triade bestehen in einigen Familiengruppen im Austausch des stabilisierenden Aspartats gegen ein Histidin oder des protonenübertragenden Histidins gegen einen Lysinrest. Letzteren fehlt dabei sogar der dritte katalytische Rest so, wie auch Serinpeptidasen existieren, die nur eine aus Serin und Histidin bestehende katalytische Dyade besitzen (Barrett et al., 1998).

# 1. Acylierung



## 2. Deacylierung



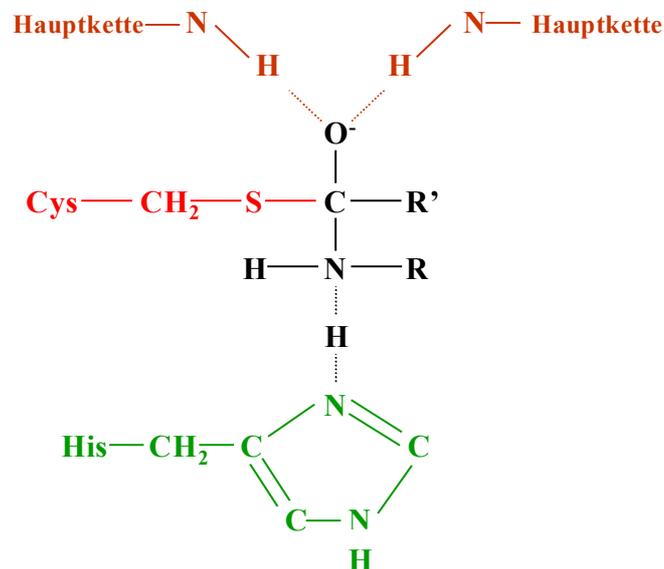
**Abbildung 1: Reaktionsmechanismus von Serinpeptidasen**

Durchgehende Linien symbolisieren kovalente Bindungen, gestrichelte Wasserstoffbrücken. (nach Blow, 1976; Erläuterungen siehe Text)

### b) Cysteinpeptidasen

Cysteinpeptidasen wirken im Grunde genauso wie Serinpeptidasen, nur dass an Stelle des Serins im aktiven Zentrum ein Cystein vorliegt, dessen SH-Gruppe die Funktion der OH-Gruppe des Serins übernimmt. Die Katalyse erfolgt damit über einen intermediären Thioester und wird auch hier durch ein benachbartes Histidin erleichtert. Anders als im Falle der Serinpeptidasen benötigen die meisten Cysteinpeptidasen jedoch keinen dritten Rest, um den Imidazolring des Histidins auszurichten und den entsprechenden Übergangszustand bei

Bindung des Substrats zu stabilisieren (s. Abbildung 2). Die erste klar definierte Cysteinpeptidase war Papain (Kimmel & Smith, 1954; Kimmel & Smith, 1957; Storer & Ménard, 1994; Drenth et al., 1968).

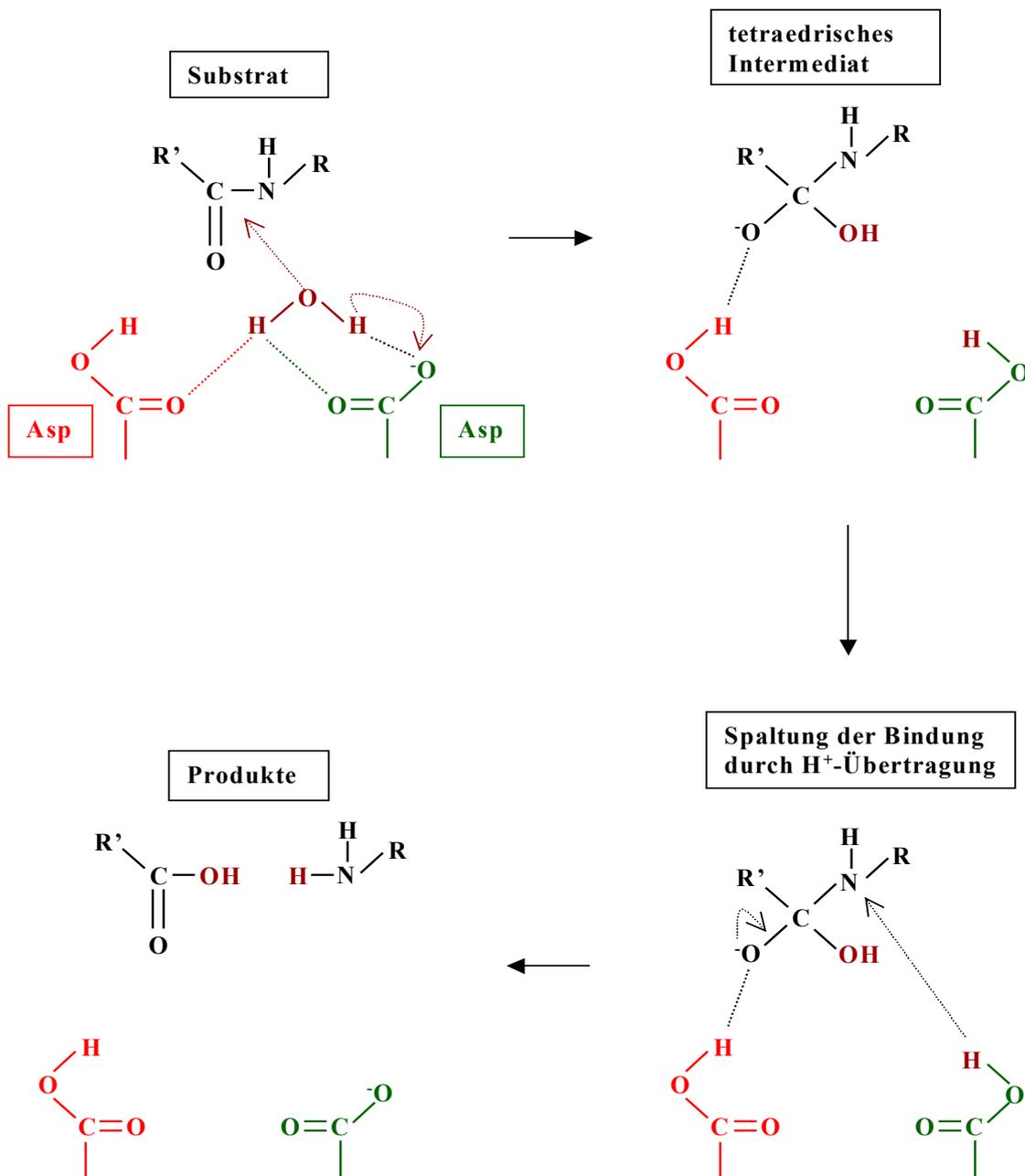


**Abbildung 2: Übergangszustand bei der Katalyse durch Cysteinpeptidasen**  
(nach Storer & Ménard, 1994)

### c) Aspartatpeptidasen

Aspartatpeptidasen, auch saure Peptidasen genannt, da viele von ihnen nur im sauren Milieu aktiv sind, unterscheiden sich grundlegend von den Serin- und Cysteinpeptidasen, indem das die zu spaltende Peptidbindung angreifende Nukleophil im katalytischen Zentrum ein aktiviertes  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül und nicht die nukleophile Seitenkette einer Aminosäure ist. Das aktivierte  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül wird dabei von zwei Aspartatresten ligandiert. Damit das Enzym aktiv ist, muss einer davon ionisiert, der andere nichtionisiert vorliegen, woraus sich ein pH-Optimum zwischen 2 und 3 ergibt. Bei Bindung eines Substrats wird das Carbonylkohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung vom aktivierten  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül angegriffen und die  $\text{C}=\text{O}$ -Bindung durch Übertragung eines  $\text{OH}$ -Moleküls auf das C-Atom zu einer  $\text{C}-\text{O}$ -Einfachbindung mit negativ geladenem O-Atom. Auch in diesem Fall wird ein tetraedrischer Übergangszustand ausgebildet, der durch das zweite Aspartat über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Proton seiner  $\text{COOH}$ -Gruppe und dem negativ geladenen Carbonylsauerstoff stabilisiert wird. Gleichzeitig wird das verbliebene Proton des  $\text{H}_2\text{O}$  von

der  $\text{COO}^-$ -Gruppe des ionisierten Aspartats übernommen. Dieser Rest überträgt dann dieses Proton auf das N-Atom der Peptidbindung, was schließlich zu deren Spaltung führt (s. Abbildung 3). In einigen Ausnahmefällen kann ein Aspartatrest durch ein Glutamat, ein Asparagin oder Glutamin ersetzt sein. Die erste charakterisierte Aspartatpeptidase war das Pepsin (Fruton, 1976; Davies, 1990). Alle bisher beschriebenen Aspartatpeptidasen sind Endopeptidasen.



**Abbildung 3: Reaktionsmechanismus von Aspartatpeptidasen**

Gestrichelte Pfeile sollen die Elektronenumlagerungen verdeutlichen.

(nach Davies, 1990; Erklärungen siehe Text)

### d) Metallopeptidasen

Der nukleophile Angriff einer Peptidbindung durch Metallopeptidasen erfolgt, wie im Falle der Aspartatpeptidasen, durch ein aktiviertes H<sub>2</sub>O-Molekül. Das H<sub>2</sub>O-Molekül wird jedoch hier durch ein divalentes Metall-Kation gebunden und aktiviert. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Zn<sup>2+</sup>, aber auch Co<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> sind beschrieben worden. Je nach Anzahl der für die Katalyse notwendigen Metall-Ionen werden die Metallopeptidasen in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich

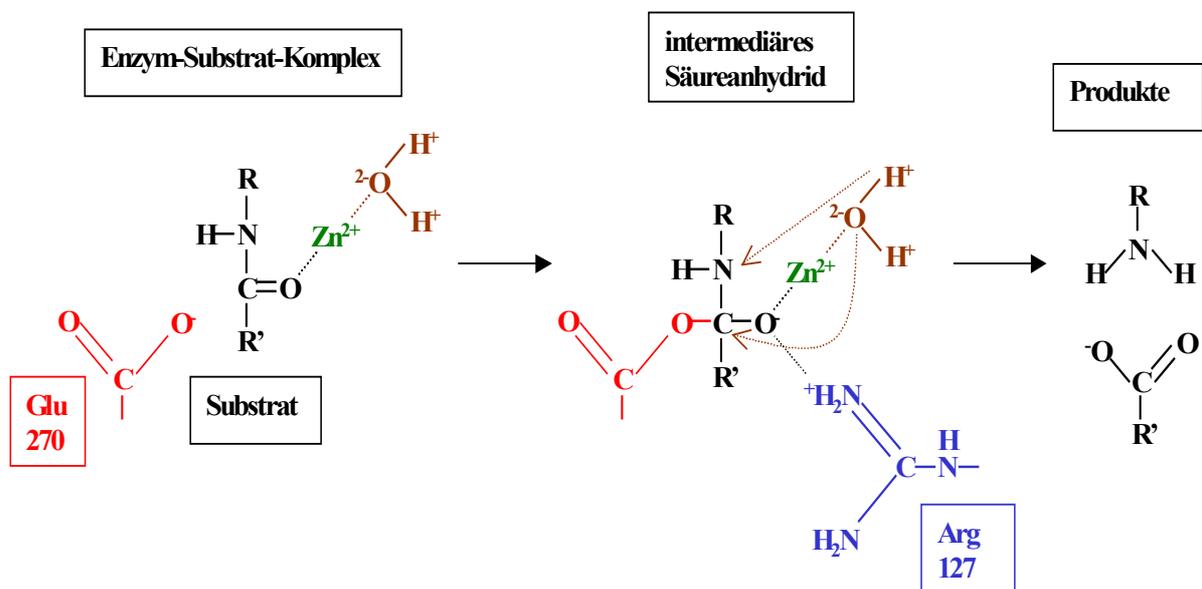
1. jene, die nur ein Metall-Ion besitzen; dies ist in allen bisher beschriebenen Peptidasen dieser Art immer ein Zn<sup>2+</sup> und
2. jene, in denen zwei Metall-Ionen kokatalytisch wirken; dazu gehören alle Co<sup>2+</sup>- oder Mn<sup>2+</sup>-tragenden, aber auch einige Zn<sup>2+</sup>-abhängige Peptidasen.

Die Metall-Ionen werden dabei von Aminosäureliganden in der richtigen Position gehalten. Im Falle der ersten Gruppe sind dafür drei Reste nötig, die beiden Metall-Ionen der zweiten weitaus kleineren Gruppe werden von fünf Aminosäuren ligandiert, da ein Rest beide Ionen überbrückt. Die bisher bekannten Metalliganden sind Histidin, Glutamat, Aspartat oder Lysin. Neben diesen wird wenigstens ein weiterer Rest für die Katalyse, ein Glutamat, benötigt. Die Funktion dieses Glutamats ist noch nicht völlig geklärt, es wird jedoch angenommen, dass es die Rolle eines Elektrophils übernimmt (Mock & Stanford, 1996). Alle bisher beschriebenen Metallopeptidasen mit kokatalytischen Metall-Ionen sind Exopeptidasen, während jene mit nur einem Kation sowohl Exo- als auch Endopeptidasen stellen.

Der potentielle Reaktionsablauf bei der katalytischen Spaltung einer Peptidbindung durch Metallopeptidasen soll im folgenden am Beispiel der Carboxypeptidase A, der ersten identifizierten Metallopeptidase, dargestellt werden, für welche aufgrund von Röntgenstudien und chemischen Untersuchungen folgender Mechanismus postuliert wird.

Drei Gruppen des Enzyms sind dabei für die Katalyse entscheidend: das Zinkion, die Guanidinogruppe von Arginin-127 und die Carboxylatgruppe von Glutamat-270. Das Carbonylkohlenstoffatom der zu spaltenden Bindung wird von der COO<sup>-</sup>-Gruppe des Glutamats angegriffen. Dabei entsteht auch hier ein tetraedrisches Zwischenprodukt, nämlich ein intermediäres Anhydrid aus zwei Carboxylgruppen, das die zu spaltende Bindung für den nukleophilen Angriff des an Zn<sup>2+</sup> gebundenen H<sub>2</sub>O-Moleküls empfänglich macht. Die negative Ladung des O-Atoms im tetraedrischen Zwischenprodukt wird dabei durch eine elektrostatische Wechselwirkung mit der positiv geladenen Seitenkette des Arginins stabilisiert, das sich nach Bindung des Substrats durch Konformationsänderung des Enzyms

in eine günstige nahe Lage bewegt hat. Das stark polarisierte  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül überträgt dann ein  $\text{H}^+$  auf die NH-Gruppe und das verbleibende  $\text{OH}^-$  auf das Säureanhydrid, so dass die Peptidbindung gespalten wird. Alternativ könnte das aktivierte  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül auch direkt das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung angreifen. Entscheidend bei diesem Mechanismus ist, dass die Carbonylgruppe der zu spaltenden Bindung durch das Zinkion polarisiert wird, was den Angriff des Glutamats oder des aktivierten  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls auf das C-Atom erleichtert. Die Katalyse wird also dadurch beschleunigt, dass im Substrat eine Elektronenverschiebung hervorgerufen wird und es so anfälliger für die Hydrolyse wird. Im Falle der Carboxypeptidase A wird das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion von zwei Histidin- und einer Glutamatseitenkette ligandiert, was zusammen mit dem  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül in einer tetraedrischen Anordnung resultiert (Lipscomb, 1973; Vallee & Neurath, 1954; Quioco & Lipscomb, 1971; Nau & Riordan, 1975; Sander & Witzel, 1985; Christianson & Lipscomb, 1987; Christianson & Lipscomb, 1989; Rees et al., 1983; Makinen et al., 1984; Galdes et al., 1986; Philips et al., 1990). Abbildung 4 verdeutlicht noch einmal den beschriebenen Mechanismus.



**Abbildung 4: Vorgeschlagener Katalysemechanismus von Metallopeptidasen am Beispiel der Carboxypeptidase A (nach Makinen et al., 1984)**

### 3. Nicht-klassifizierte Peptidasen

Neben den bisher aufgeführten Peptidasen gibt es eine ganze Reihe von Enzymen, die nach keinem der oben beschriebenen Reaktionsmuster katalytisch aktiv sind und deshalb keiner der genannten Peptidaseklassen zugeordnet werden können. Derzeit fallen 20 Familien darunter, die, aufgrund von mangelnden Gemeinsamkeiten oder Informationen, in den meisten Fällen keine Möglichkeit bieten, weiter unterteilt oder geordnet zu werden. Die Nummerierung der Familien ist darüber hinaus vollkommen willkürlich. Eine solche Familie, U42 (U für Unclassified), beinhaltet eine Reihe von Endopeptidasen, die eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung einer in den letzten Jahrzehnten immer bedeutsamer werdenden Enzymklasse, den Hydrogenasen, spielt; die **Reifungsproteasen von Hydrogenasen** (Barrett et al., 1998).

## II. Hydrogenasen

### 1. Einteilung, Vorkommen und Struktur

Hydrogenasen sind Enzyme, die die Spaltung oder Bildung von  $H_2$  katalysieren. Man unterscheidet  **$H_2$ -produzierende** und  **$H_2$ -oxidierende** Hydrogenasen. Eine Ausnahme stellen die sogenannten **bidirektionalen** oder „reversiblen“ Hydrogenasen dar, die auch *in vivo* zur Katalyse beider Reaktionen befähigt sind. Darüber hinaus werden Hydrogenasen oft auch anhand ihrer zellulären Lokalisation oder den von ihnen nutzbaren Elektronendonoren oder –akzeptoren eingeteilt; in den meisten Fällen jedoch erfolgt ihre Differenzierung nach ihrem Metallgehalt, da die Anwendung dieses Kriteriums die größte Aussagekraft über Struktur und Mechanismus besitzt. Danach werden Hydrogenasen in zwei Hauptklassen eingeteilt: **[Fe]-Hydrogenasen** und **[NiFe]-Hydrogenasen**, mit den **[NiFeSe]-Hydrogenasen** als Untergruppe. Die nur punktuell vorkommenden **metallfreien Hydrogenasen** sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit nicht besprochen werden.

#### a) [Fe]-Hydrogenasen

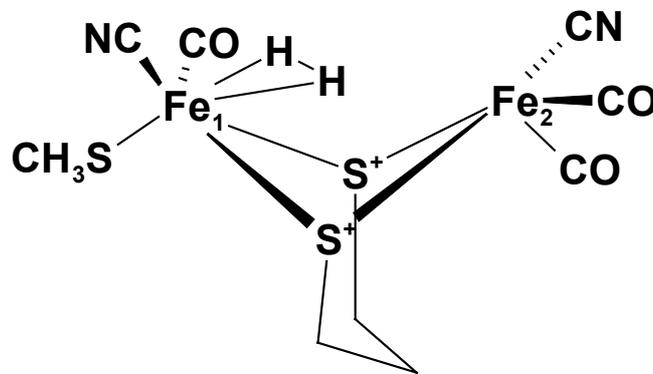
[Fe]-Hydrogenasen kommen hauptsächlich in Bakterien und niederen Eukaryonten vor. Sie enthalten Fe in Form von FeS-Zentren, wobei die meisten charakterisierten Enzyme dabei so strukturiert sind, dass sie ein bis mehrere [4Fe4S]-Cluster (F-Cluster) sowie ein ungewöhnliches, als H-Cluster bezeichnetes FeS-Zentrum enthalten (Adams, 1990; Peters et

al., 1998; Nicolet et al., 1999; Nicolet et al., 2000). Das H-Cluster ist in einer 350 Aminosäuren großen Domäne untergebracht und katalysiert die Oxidation bzw. Produktion von  $H_2$ , stellt also das aktive Zentrum dar. Es besteht aus zwei Fe-Atomen, die beide CO und CN als niedermolekulare Liganden binden und über ein kleines, fünfatomiges Molekül miteinander verknüpft sind. Jedes Fe-Atom (Fe1, Fe2) bindet dabei ein CO und ein CN (Van der Spek, 1996), wobei im teilweise oxidierten Zustand des Enzyms ein weiteres CO als Brückenligand zwischen den beiden Fe-Atomen fungiert (Peters et al., 1998). Nach Reduktion des Enzyms wird aus diesem Brückenligand ein einfacher Ligand von Fe2, das dann mit zwei CO verbunden ist (Fan & Hall, 2001; Nicolet et al., 2000; Nicolet et al., 2001). Die Natur des die beiden Fe-Atome verbindenden fünfatomigen Moleküls ist noch nicht eindeutig geklärt, aufgrund von mechanistischen Betrachtungen wird jedoch angenommen, dass es sich dabei um ein Dithiomethylamin handelt, das das Fe-Paar über seine beiden S-Atome miteinander verknüpft. Ein sekundäres Amin nahe der vermeintlichen Wasserstoffbindestelle Fe2 würde nämlich als Protonenakzeptor eine entscheidende Rolle bei der heterolytischen Spaltung von Wasserstoff spielen. Röntgenkristallographische Untersuchungen geben jedoch selbst bei höheren Auflösungen leider keinen Aufschluß darüber, ob es sich nun wirklich um ein Amin handelt, da wegen des geringen Unterschieds in der Elektronenanzahl nicht zwischen C und N unterschieden werden kann (Fan & Hall, 2001; Nicolet et al., 1999; Nicolet et al., 2001; Nicolet et al., 2002).

Die Verknüpfung des H-Clusters mit dem Rest des Enzyms erfolgt über einen einzigen Cysteinligand, Cystein-382 in *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757, mit dem das Fe1 mit dem proximalen [4Fe4S]-Cluster koordiniert ist. Weitere Bindungen des H-Clusters zum Proteingerüst erfolgen über Wasserstoffbrücken zu den CN-Liganden. Fe1 besitzt somit 6 Liganden, die in einer verzerrten oktaedrischen Konformation angeordnet sind, während Fe2 nur 5 Bindungen aufweist und somit eine freie Koordinationsstelle übrig hat. Aus diesem Grund wird Fe2 als Bindestelle für den zu spaltenden  $H_2$  angesehen. Diese Vermutung wird darüber hinaus durch Versuche mit Hydrogenase I von *Clostridium pasteurianum* bestärkt, die zeigen, dass Fe2 exogenes CO bindet, was ein starker kompetitiver Inhibitor des Enzyms ist (Lemon & Peters, 1999; Bennett et al., 2000). Die detaillierte Struktur des aktiven Zentrums ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Spaltung von  $H_2$  erfolgt dabei heterolytisch, indem als Anfangsprodukt ein Hydrid und ein Proton entstehen. Der  $H_2$  diffundiert dabei durch einen hydrophoben Kanal von der molekularen Oberfläche des Proteins zum Fe2 des aktiven Zentrums und umgekehrt. Der Elektronentransport erfolgt dann über die FeS-Zentren an die Oberfläche des Moleküls während die Protonen wiederum über ein konserviertes

Cystein, Cystein-178 in *Clostridium pasteurianum* Hydrogenase I bzw. Cystein-299 in *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757, und einem Lysinrest, der über eine Wasserstoffbrücke mit dem das Fe<sub>2</sub> koordinierenden CN-Liganden verbunden ist, sowie diversen anderen konservierten Resten und Wassermolekülen weitergeleitet werden. Um welche Reste es sich dabei genau handeln könnte ist jedoch noch nicht untersucht worden.

[Fe]-Hydrogenasen können aus ein bis mehreren Untereinheiten bestehen, wobei bisher keine Enzyme mit mehr als vier bekannt sind. Dabei können auch diese Untereinheiten FeS-Zentren beinhalten. Über die Bildung der FeS-Zentren und anderer möglicher Reifungsprozesse dieser Hydrogenasen ist jedoch bisher nichts weiter bekannt.



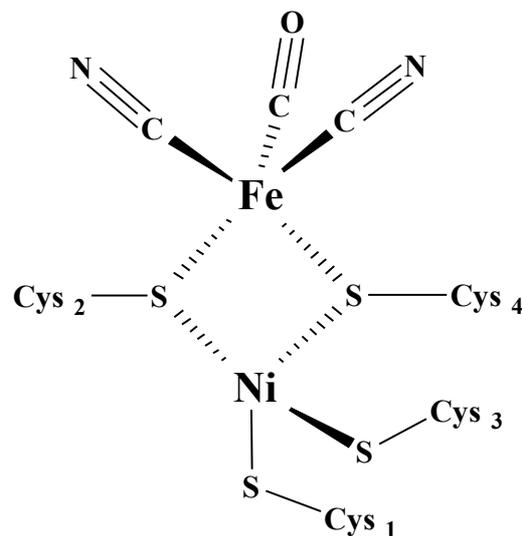
**Abbildung 5: Struktur des H-Clusters von *D. desulfuricans* ATCC 7757 im reduzierten Zustand** (modifiziert nach Nicolet et al., 2000)

Das die beiden Fe-Atome verbindende fünfatomige Molekül ist hier als 1,3-Propandithiolat angegeben.

## b) [NiFe]-Hydrogenasen

Man findet [NiFe]-Hydrogenasen in Eubakterien, in Archaeobakterien und selbst in Eukaryonten. Die meisten Enzyme bestehen aus zwei Untereinheiten, je nach betrachtetem Organismus einer großen mit einer molekularen Masse von 45-72 kDa (Albracht, 1994) und einer kleinen, deren Molekülmasse zwischen 25 und 35 kDa (Maier & Böck, 1996) liegt. Mit der Aufklärung der Proteinstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* 1995 durch Volbeda et al. wurde ein Meilenstein im Verständnis über Aufbau, Mechanismus und Synthese dieser Enzymklasse gelegt. Bereits zuvor waren durch Vergleich von Aminosäuresequenzen von [NiFe]-Hydrogenasen verschiedener Organismen Bereiche

aufgefallen, die stark konserviert waren. So konnten in den großen Untereinheiten zwei hochkonservierte Motive identifiziert werden, eines nahe dem N-Terminus mit der Sequenz RxCgxCxxxH und das zweite im C-terminalen Bereich bestehend aus DPCxxCxxH/R (Przybyla et al., 1992). In den bereits als Untergruppe der [NiFe]-Hydrogenasen erwähnten [NiFeSe]-Hydrogenasen ist das „erste“ Cystein des C-terminalen Motivs dabei durch ein Selenocystein ersetzt (Muth et al., 1987). Anhand der Kristallstruktur konnte nun eindeutig gezeigt werden, dass diese Motive die Koordinierung der Metalle im Enzym vornehmen. Das Nickel wird dabei direkt von den vier Cysteinen der beiden Motive über deren Thiolgruppen ligandiert. Darüber hinaus sind zwei dieser Cysteine, jeweils eines aus jedem Motiv, auch an der Bindung des zweiten Metalls, Fe beteiligt, und bilden somit eine Brücke zwischen beiden Metall-Ionen. Das Fe wiederum wird zusätzlich von drei niedermolekularen Liganden komplexiert, die sich später als zwei Cyanide und ein Kohlenmonoxid entpuppten (Happe et al., 1997; Pierik et al., 1999). Der bereits 1985 von Van der Zwaan et al. durch EPR-Studien an der Hydrogenase von *Chromatium vinosum* erbrachte Nachweis einer Interaktion des H<sub>2</sub> mit dem Nickel lässt dabei vermuten, dass es sich bei dieser bimetallichen Struktur um das aktive Zentrum des Enzyms handelt. Durch Ineinanderverschmelzen zweier  $\alpha$ -Helices des C-terminalen Bereichs der großen Untereinheit ist das aktive Zentrum dabei tief in der großen Untereinheit eingebettet. Abbildung 6 zeigt den Aufbau des Nickel-Metall-Zentrums.



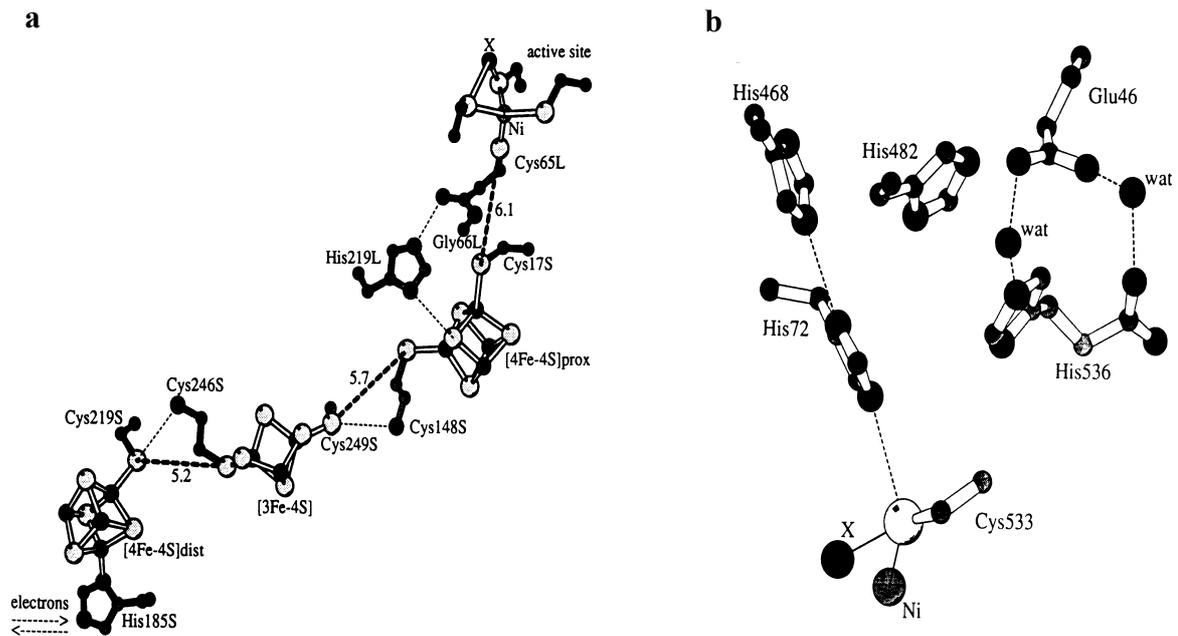
### Abbildung 6: Aufbau des Nickel-Metall-Zentrums

Die Cysteine 1 und 2 stellen die Cysteinreste des N-terminalen Nickelbindemotivs der großen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen dar, die Cysteine 3 und 4 die des C-terminalen (nach Happe et al., 1997).

Die eng mit der großen Untereinheit assoziierte kleine Untereinheit wiederum stellt ein FeS-Protein dar, das im Falle der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* drei FeS-Zentren enthält, ein [3Fe4S] und zwei [4Fe4S] in der Reihenfolge [4Fe4S]-[3Fe4S]-[4Fe4S] (Volbeda et al., 1995). Spektroskopische Untersuchungen kleiner Untereinheiten anderer Organismen, wie der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase von *Ralstonia eutropha*, zeigten jedoch, dass die Anzahl der FeS-Zentren variieren kann (Albracht, 1994).

Der Protonen- bzw. Elektronenfluß von bzw. zum aktiven Zentrum der Hydrogenase wird aufgrund der erhaltenen kristallographischen Daten wie folgt angenommen: Bei der Spaltung von H<sub>2</sub> durch die [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* könnten Protonen vom aktiven Zentrum zum Histidin-72 und über einen Flip-Flop-Mechanismus des Imidazolrings weiter zum Histidin-536 fließen. Von dort aus würden sie über zwei H<sub>2</sub>O-Moleküle und Glutamat-46 an die Oberfläche der Hydrogenase transferiert werden. Histidin-468 und Histidin-482 sind dabei Reste, die ebenfalls am Protonenfluß beteiligt sein könnten. Auf der anderen Seite könnten die Elektronen vom aktiven Zentrum über die Reste Cystein-65 und Histidin-219 der großen Untereinheit auf das proximale [4Fe4S]-Cluster der kleinen Untereinheit und von dort über die anderen FeS-Zentren auf das auf der Oberfläche des Enzyms exponierte Histidin-185 übertragen werden. Alternativ könnte auch zwischen Nickel und dem proximal gelegenen [4Fe4S]-Cluster ein Elektronensprung von Glycin-66 der großen auf Cystein-17 der kleinen Untereinheit stattfinden (Volbeda et al., 1995; siehe Abbildung 7). Dies ist jedoch noch Spekulation.

Obwohl die Gesamtstruktur der Hydrogenasen aus verschiedenen Organismen sich nicht gleichen müssen, kann man doch aufgrund der Konserviertheit der beschriebenen Motive und des scheinbar ubiquitären Vorkommens von CO/CN-Liganden in metallhaltigen Hydrogenasen davon ausgehen, dass die Metallzentren unterschiedlicher [NiFe]-Hydrogenasen ähnlich aufgebaut sind und deshalb auch der Elektronenfluß in diesem Bereich in ähnlicher Art und Weise verläuft. Die Frage, die sich nun stellt, ist wie die Metalle und die niedermolekularen Komponenten des aktiven Zentrums in die Enzyme eingebaut werden und welche Genprodukte daran beteiligt sind. Das in dieser Hinsicht am besten untersuchte System ist jenes von *Escherichia coli*.



**Abbildung 7: Elektronen- (a) und Protonentransfer (b) in der kleinen und großen Untereinheit von *D. gigas*** (Volbeda et al. 1995; Erläuterungen siehe Text)

Die Elektronen- bzw. Protonenweiterleitung zwischen den verschiedenen Resten bzw. Metallzentren ist mittels fein gestrichelter Linien dargestellt. Die Zahlen neben den fettgestrichelten Linien geben den kleinsten Abstand (in Å) zwischen benachbarten Redoxzentren an. S: kleine Untereinheit, L: große Untereinheit, X: Fe, wat: Wasser, prox: proximal, dist: distal.

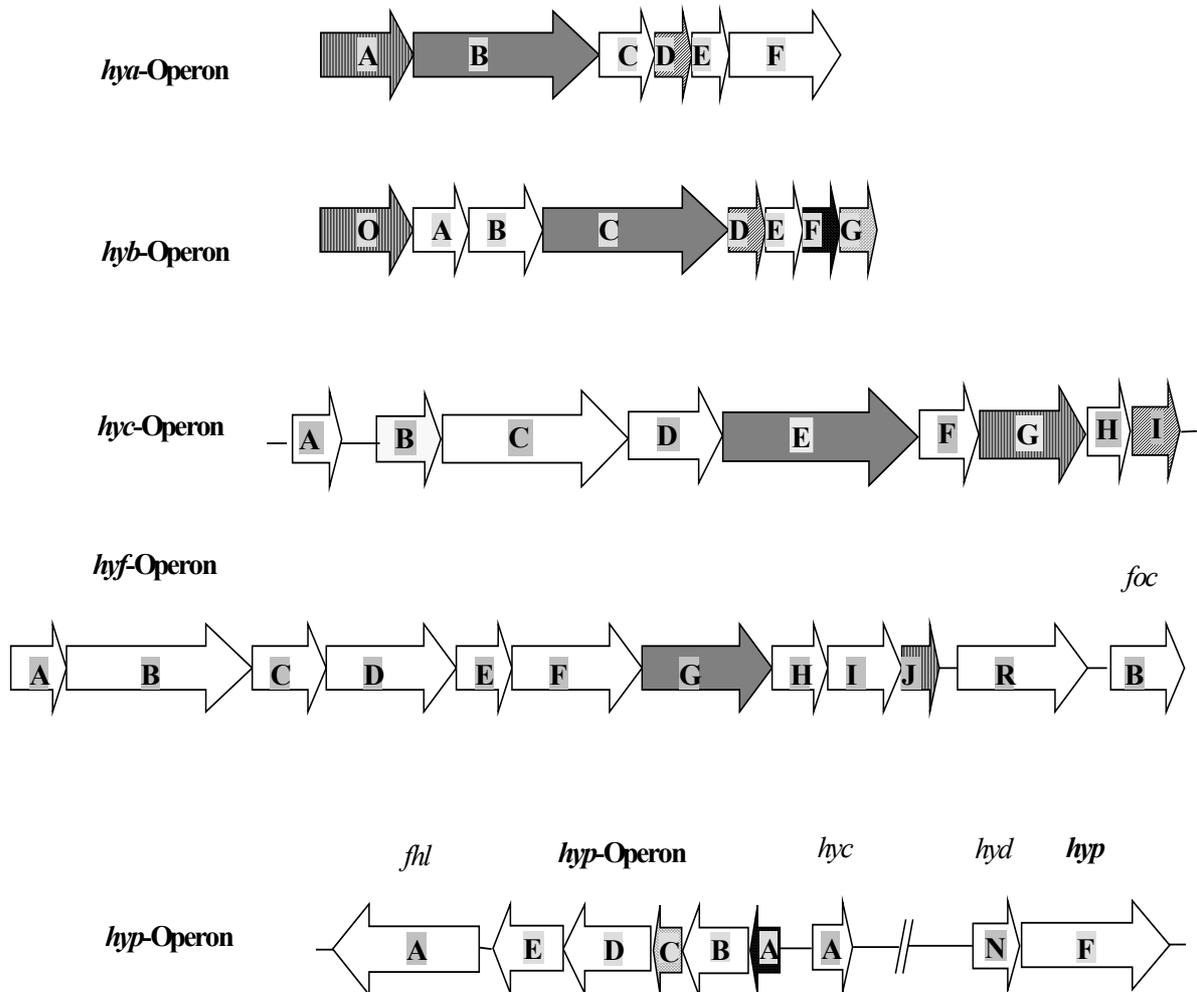
### 3. Genetik und Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen von *E. coli*

#### a) Genetik

*E. coli* besitzt insgesamt vier Hydrogenasen, alle zu den [NiFe]-Hydrogenasen zählend. Zwei davon, nämlich Hydrogenase 1 und 2, sind H<sub>2</sub>-oxidierende Enzyme, während die anderen beiden H<sub>2</sub>-produzierende Funktion besitzen. Ihre Strukturgene werden in vier verschiedenen Operonen kodiert, dem *hya*-, *hyb*-, *hyc*- und *hyf*-Operon, wobei die alphabetische Reihenfolge die numerische Benennung der Enzyme als Hydrogenase 1, 2, 3 und 4 widerspiegelt (Sawers & Böck, 1996; Menon et al., 1991; Menon et al., 1994b; Sargent et al., 1998; Abbildung 8). Neben jenen Genen, die für Strukturkomponenten der jeweiligen Hydrogenase kodieren, beinhalten die Operone auch solche, deren Produkte die Aufgabe der Elektronenweiterleitung

innerhalb der verschiedenen Komplexe übernehmen, von denen die jeweiligen Hydrogenasen Bestandteil sind, bzw. an deren Aufbau beteiligt sind, so z.B. HyaC und HybB, welche homolog zur Cytochrom b-Untereinheit der Hydrogenase von *W. succinogenes* sind, oder HycB und HycF, die FeS-Proteine des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes darstellen sowie HycC und HycD, die im gleichen Komplex als Membrananker zu fungieren scheinen (Dross et al., 1992; Sauter et al., 1992). Darüber hinaus existieren Gene, die für Proteine kodieren, die weder für den Aufbau noch für die katalytische Funktion der Hydrogenasen oder der Multienzymkomplexe von Bedeutung sind, sondern vielmehr eine wichtige Rolle bei der später noch genauer betrachteten Reifung der großen Untereinheiten der Hydrogenasen spielen; so z.B. die Gene der für die jeweilige Hydrogenase spezifischen Reifungsproteasen HyaD, HybD und HycI (Menon et al., 1991; Rossmann et al., 1995; Fritsche et al., 1999). Für Hydrogenase 4 wurde bisher kein homologes Gen gefunden; möglicherweise wird sie ebenfalls durch HycI prozessiert (Andrews et al., 1997). Für die Reifung der Hydrogenasen ist dabei noch ein weiteres Operon vonnöten, das *hyp*-Operon (Lutz et al., 1991; Jacobi et al., 1992). Die Expression seiner Gene führt zur Produktion akzessorischer Proteine, die, bis auf zwei Ausnahmen, an der Bildung der Nickel-Metall-Zentren aller vier Hydrogenasen beteiligt sind. Diese die Hydrogenase-Biosynthese pleiotrop beeinflussenden Gene sind dem *hyc*-Operon vorgeschaltet und divergent angeordnet. Darüber hinaus existiert ein etwa 10-15 kb stromaufwärts von *hypA* und damit außerhalb des *hyp*-Operons gelegenes Gen, *hypF*, das ebenfalls für die Reifung aller Hydrogenasen gleichermaßen notwendig ist. Abbildung 8 zeigt die genetische Organisation der verschiedenen Operone. Gene homologer Proteine sind durch gleiche Musterung gekennzeichnet.

Die Regulation der Expression der Hydrogenase-Operone ist recht komplex und in vielen Fällen noch nicht eindeutig geklärt. Über Hydrogenase 4 ist dabei nichts bekannt (Andrews et al., 1997). Für die anderen drei Enzyme gibt es mehr oder weniger genaue Vorstellungen wie die Regulation erfolgen könnte und welche Regulatoren daran beteiligt sind. So werden die *hya*-Gene unter anaeroben Bedingungen, niedrigem pH und in Anwesenheit von Formiat induziert sowie in Gegenwart von Nitrat stark reprimiert (Bronsted & Atlung, 1994; King & Przybyla, 1999). Sie sind dabei von den Regulatoren ArcA und AppY (Bronsted & Atlung, 1994; Atlung et al., 1997) bzw. NarL und NarP abhängig (Richard et al., 1999); auch für RpoS konnte ein Einfluß nachgewiesen werden und FNR hat möglicherweise einen indirekt positiven Effekt auf die Expression des *hya*-Operons.



**Abbildung 8: Genetische Organisation der Hydrogenase-Operone sowie der akzessorischen Gene der Hydrogenasen von *E. coli*** (nach Maier & Böck, 1996; Menon et al., 1991; Simon et al., 1997; Sargent et al. 1998)

Gene homologer Proteine sind durch gleiche Muster gekennzeichnet.

■ große Untereinheit, ▨ kleine Untereinheit. ▩ Protease, ▧ chaperonartiges Protein.

Das *hyb*-Operon wird ebenfalls unter anaeroben Bedingungen induziert und durch Nitrat reprimiert; darüber hinaus scheint es einer Katabolitrepression zu unterliegen. Im Gegensatz zum *hya*-Operon ist es jedoch im Alkalischen stärker exprimiert (King & Przybyla, 1999). Regulatoren wie die oben beschriebenen ArcA und NarL haben dabei einen negativen Effekt auf die Expression. Entgegen früherer Vermutungen scheint FNR nur indirekt an der Regulation des *hyb*-Operons beteiligt zu sein, genauso wie die durch das cAMP-CRP-System vermittelte Katabolitrepression wahrscheinlich indirekt durch Beeinflussung eines anderen

Transkriptionsregulators durch das CRP-Protein zustande kommt (Derek et al., 1999). Der genaue Regulationsablauf ist in beiden Systemen jedoch nicht näher bekannt.

Ein fundierteres Wissen besteht dagegen über die Regulation des *hyc*-Operons. Seine Expression wird dabei in erster Linie durch das Gärungsprodukt Formiat über einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor mit Hilfe des Transkriptionsaktivators FhlA induziert (Schlensog & Böck, 1990; Sankar et al., 1988). Bei Abfall des pH-Wertes wird das Formiat von der Zelle aufgenommen und stimuliert wahrscheinlich durch direkte Interaktion mit FhlA, das konstitutiv in geringen Mengen gebildet wird, dessen Funktion als Transkriptionsaktivator. FhlA bindet in diesem Zustand an Aktivatorsequenzen, was zur Aktivierung der weiter stromabwärts gelegenen Promotoren und zur Transkription der ihnen nachgeschalteten Gene führt. Außer dem  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor des *hyc*-Operons erfolgt die Bindung von FhlA noch an drei weiteren  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transkriptionseinheiten, dem *fdhF*-Gen, welches für die Formiatdehydrogenase H des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes kodiert, dem *hydA*-Lokus, mit dem für den Nickel-Einbau wichtigen *hypF*-Gen, und dem *hyp*-Operon. FhlA kann darüber hinaus indirekt auch seine eigene Transkription stimulieren, da es mit dem *hyp*-Operon cotranskribiert wird.

Die Regulation des *hyp*-Operons erfolgt zusätzlich über einen zweiten  $\sigma^{70}$ -abhängigen Promotor, der in *hypA* liegt und bei Anaerobiose über den Regulator FNR angeschaltet wird (Lutz et al., 1991). Dies gewährleistet die Transkription der Gene *hypB-E* auch unter nicht-fermentativen Bedingungen, was die Biosynthese von Hydrogenase 1 und 2 sicherstellt. Dies würde auch erklären, warum im *hyb*-Operon ein entsprechendes Homolog zu *hypA*, nämlich *hybF* existiert: Die Hydrogenasen 1 und 2 sind damit unabhängig vom ebenfalls für die Reifung wichtigen *hypA*-Genprodukt.

Ein weiteres regulatorisches Element stellt HycA dar, ein Genprodukt des *hyc*-Operons, das antagonistisch zu FhlA wirkt (Hopper et al., 1994).

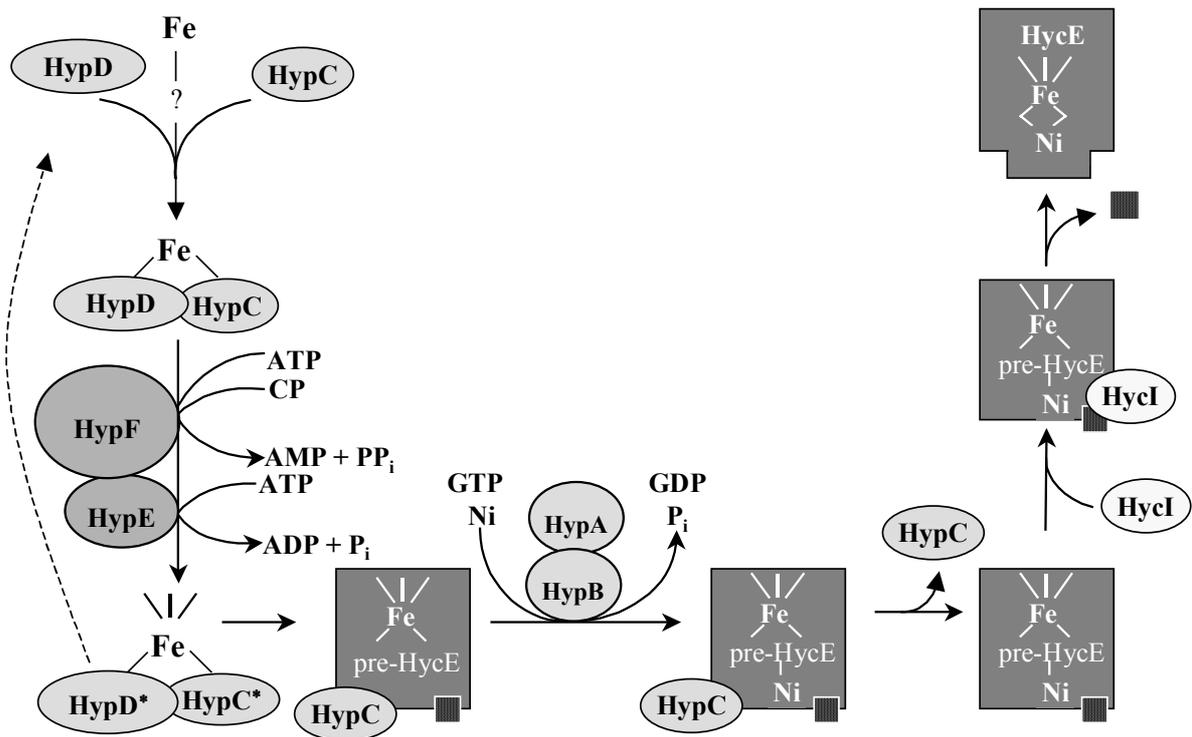
## **b) Reifung**

Der Expression der Strukturgene und akzessorischen Gene folgt eine komplexe Kaskade von Reaktionen, die zum Einbau des Nickel-Eisen-Zentrums in die große Untereinheit führt. Dabei sind pauschal fünf Schritte zu bewältigen:

- Die Bildung der niedermolekularen Liganden CO und CN

- Ihre Komplexierung mit Eisen
- Der Einbau in die große Untereinheit
- Der Einbau von Nickel in die große Untereinheit
- Die Einbettung des fertig assemblierten Metallzentrums ins Innere der großen Untereinheit

Wie und in welcher Reihenfolge diese Schritte im Einzelnen ablaufen ist für die ersten drei Schritte im Detail noch nicht bekannt. Aufgrund intensiver molekularbiologischer, genetischer und biochemischer Untersuchungen wird anhand von gerade in neuester Zeit erhaltenen Ergebnissen jedoch folgendes, in Abbildung 9 wiedergegebenes Modell vorgeschlagen:



**Abbildung 9: Reifungsschema der großen Untereinheiten von [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli***

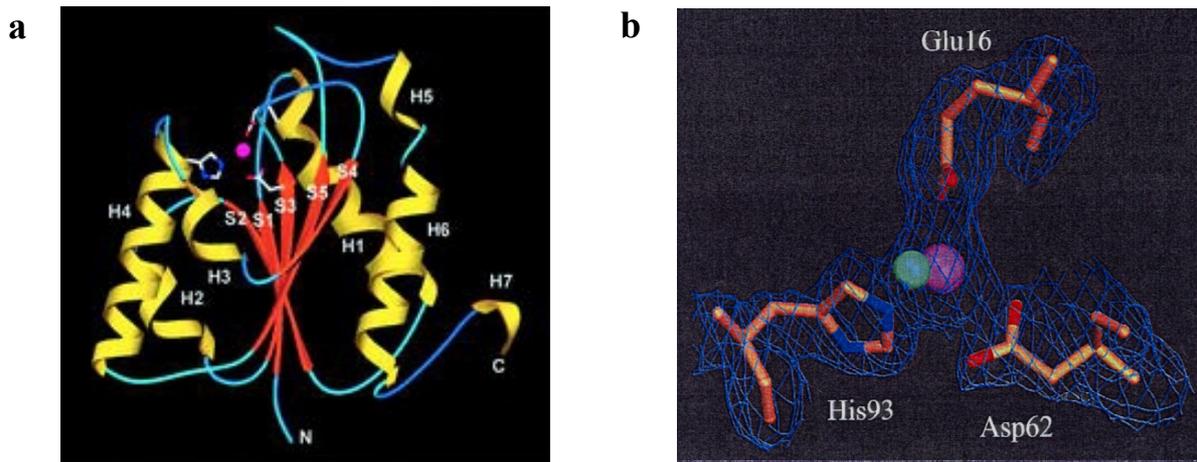
CP: Carbamoylphosphat (nach Blokesch et al., 2002; Erläuterungen siehe Text)

Die große Untereinheit wird dabei als metallfreies Vorläuferprotein synthetisiert, in welches zuerst das Eisen mit seinen drei niedermolekularen Liganden eingebaut wird. Diese Behauptung wird durch die Tatsache untermauert, dass die Hydrogenaseaktivität bestimmter *hyp*-Mutanten ( $\Delta hypB$ ,  $\Delta hybF\Delta hypA$ ) *in vivo* durch hohe Konzentrationen von Nickel im Medium wiederhergestellt werden kann, was darauf hinweist, dass der pleiotrope Effekt von Mutationen in diesen Genen wahrscheinlich durch die unphysiologisch hohen Konzentrationen von Nickel chemisch komplementiert werden kann (Jacobi et al., 1992; Hube et al., 2002). Dies scheint jedoch nur dann plausibel, wenn der Nickeleinbau erst nach dem Eiseneinbau erfolgt. Wie dabei das Eisen in die große Untereinheit inseriert wird und welche Proteine daran beteiligt sind, sowie die Frage, ob die niedermolekularen Liganden bereits vor Einbau des Eisens in die große Untereinheit an dieses gebunden sind, ist noch weitgehend ungeklärt. Nach bisherigen Ergebnissen wird jedoch angenommen, dass das Eisen von den akzessorischen Proteinen HypD und HypC bzw. HybG gebunden wird. An dieses Eisen werden dann die niedermolekularen Liganden CO und CN angehängt, die, für CN mittlerweile mit Sicherheit nachgewiesen, durch die Aktivität des HypF- und HypE-Proteins aus Carbamoylphosphat gebildet werden. Das auf diese Weise mit den niedermolekularen Liganden bestückte Eisen wird dann auf das Vorläuferprotein übertragen, wobei HypC an der großen Untereinheit gebunden bleibt. Der nächste Schritt beinhaltet den Einbau der letzten Komponente des Metallzentrums, des Nickels. Dieser wird über die beiden Proteine HypB und HypA bzw. HybF vermittelt. Welches Protein nun der eigentliche Nickeldonor ist, ist dabei noch nicht geklärt, es ist jedoch bekannt, dass HypB GTPase-Funktion besitzt und es wird deshalb angenommen, dass das Nickel von einem der beiden Proteine an die große Untereinheit gebracht wird und dass die GTP-Hydrolyse des HypB-Proteins schließlich zu einer Konformationsänderung führt, die die Proteine, ähnlich wie im Fall des Elongationsfaktors EF-Tu, abdissoziieren lässt. Der letzte Schritt im Reifungsprozess besteht dann einmal in der Abdissoziation von HypC von der großen Untereinheit und die nachfolgende Abspaltung eines C-terminalen Peptids durch die spezifische Reifungsprotease, was wahrscheinlich eine Konformationsänderung der großen Untereinheit zur Folge hat, durch die das Metallzentrum tief ins Innere des Proteins eingebettet wird. Die so gereifte Hydrogenaseuntereinheit assoziiert mit der kleinen Untereinheit und wandert an die Cytoplasmamembran, an der die Assemblierung mit den anderen Komponenten des FHL-Komplexes erfolgt (Drupal & Böck, 1998; Magalon & Böck, 2000a; Blokesch & Böck, 2002; Maier et al., 1993; Maier et al., 1995; Rossmann et al., 1995; Paschos et al., 2001; Paschos et al., 2002; Hube et al., 2002; und unveröffentlichte Daten) .

Das besondere Augenmerk dieser Arbeit galt nun diesem letzten Schritt der Reifungskaskade, der endoproteolytischen Spaltung der großen Untereinheit nach Fertigstellung des Metallzentrums, die schließlich das reife Protein liefert. Rossmann et al. (1995) entdeckten mit Aufreinigung der prozessierenden Aktivität von Hydrogenase 3 als erste die diese Reaktion katalysierende neuartige Protease HycI. Sie gehört zu den nicht-klassifizierbaren Peptidasen, da Sequenzvergleiche mit anderen proteolytischen Enzymen keine Ähnlichkeiten zu irgendeiner der bekannten Peptidaseklassen ergaben. PMSF, Benzamidin und EDTA beeinträchtigten darüber hinaus die Aktivität des Enzyms nicht (Rossmann et al., 1995). Es scheint sich hier also um einen neuartigen Reaktionsmechanismus zu handeln. Einen großen Fortschritt zum Verständnis dieser Reaktionsweise lieferte die Aufklärung der Struktur von HybD, der spezifischen Protease der Hydrogenase 2 von *E. coli* (Fritsche et al., 1999).

### **III. HybD, die spezifische Protease der Hydrogenase 2 von *E. coli***

HybD ist ein 17,5 kDa großes, monomeres Protein, das ein 15 Aminosäuren langes Peptid vom C-Terminus der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 von *E. coli* entfernt. Seine Struktur konnte mit einer Auflösung von 2.2 Å gelöst werden. Dabei kristallisierte HybD mit einem Cd<sup>2+</sup>-Ion aus dem Kristallisierungspuffer, wobei das Metall durch drei Aminosäuren, namentlich Glutamat-16, Aspartat-62 und Histidin-93, sowie einem H<sub>2</sub>O-Molekül pentakoordiniert wird (Abbildung 10). Diese Reste sind unter allen Mitgliedern der Familie der Hydrogenase-Reifungsendopeptidasen konserviert. HybD ist aus einem gewundenen  $\beta$ -Faltblatt-Bündel aus fünf Strängen aufgebaut, welche auf der einen Seite von vier und der anderen Seite von drei Helices umgeben sind. Die Topologie ähnelt der von Metzincinen, welche zur übergeordneten Familie der Zink-Hydrolasen gehören. Ein Unterschied ist jedoch, dass sich die Metallbindestelle in HybD nahe des C-Terminus des  $\beta$ -Faltblatts befindet, wohingegen das Zn<sup>2+</sup> der Metzincine am Boden einer Spalte eingebettet ist, welche eine obere N-terminale Domäne von einer unteren C-terminalen trennt. Darüber hinaus bilden auf der einen Seite des Faltblatts von HybD drei Helices eine Spalte aus, in der die Metallliganden bereitgestellt werden (Fritsche et al., 1999).



**Abbildung 10: Struktur (a) und Metallbindestelle (b) von HybD ( Fritsche et al., 1999)**

Die rosa Kugel repräsentiert das  $\text{Cd}^{2+}$ -Ion, die grüne ein Wassermolekül.

H steht für Helix, S für Faltblatt.

Wie aber wirkt nun diese Protease? Welche Reste des Enzyms sind am Reaktionsmechanismus beteiligt und wie erfolgt die Substratbindung? Welche Reste des Substrats sind dabei für die spezifische Erkennung durch die Protease entscheidend und durch welche Reste der Peptidase wird diese Erkennung gewährleistet? Ist die Erkennung dabei sequenz- oder konformationsabhängig? Die Klärung dieser Fragen war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit.

## B. MATERIAL UND METHODEN

### I. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten, bereits existierenden oder neu konstruierten, Bakterienstämme und Plasmide sind in den folgenden beiden Tabellen mit ihrem jeweiligen Genotyp und der entsprechenden Referenz aufgeführt. Bei den Stämmen handelt es sich um Abkömmlinge von *E. coli* K12.

**Tabelle 1: Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	$F'$ ( <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i> ) <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), $\lambda^-$	Yanisch-Perron et al. (1985)
DH5 $\alpha$	$F^-$ ( $\Phi$ 80d <i>lacZΔM15</i> ) <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , ( $r_K^- m_K^+$ ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Woodcock et al. (1989)
MC4100	$F^-$ , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U169, <i>ptsF25</i> , <i>deoC1</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>rpsL150</i> , $\lambda^-$	Casadaban und Cohen (1979)
HD700	MC4100, $\Delta$ <i>hycA-I</i>	Sauter et al. (1992)
HD705	MC4100, $\Delta$ <i>hycE</i>	Sauter et al. (1992)
HD707	MC4100, $\Delta$ <i>hycG</i>	Sauter et al. (1992)
HD708	MC4100, $\Delta$ <i>hycH-I</i>	Sauter et al. (1992)

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
HD709	MC4100, $\Delta hycI$	Binder et al. (1996)
HD708-1	MC4100, " $\Delta hycH$ "	K. Eismann (unveröffentlicht)
SMP101	MC4100, <i>hypA</i> (ATG → TAA)	Jacobi et al. (1992)
DHP-B	MC4100, $\Delta hypB$	Jacobi et al. (1992)
DHP-C	MC4100, $\Delta hypC$	Jacobi et al. (1992)
DHP-D	MC4100, $\Delta hypD$	Jacobi et al. (1992)
DHP-E	MC4100, $\Delta hypE$	Jacobi et al. (1992)
DHP-F2	MC4100, $\Delta hypF$	Paschos et al. (2002)
$\Delta hycEI$	HD709, $\Delta hycE$	diese Arbeit
DIEM538E	HD709, <i>hycE</i> mit zwei Punktmutationen (A1627G, T1628A: Met538 → Glu)	diese Arbeit
DIEM538D	HD709, <i>hycE</i> mit drei Punktmutationen (A1627G, T1628A, G1629C: Met538 → Asp)	diese Arbeit

**Tabelle 2 : Plasmide**

<b>Plasmid</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
pUI-2	Ap <sup>R</sup> , 747 bp <i>Bam</i> HI-Fragment ( <i>hycI</i> - <i>ascB</i> aus MC4100) in pUC19	Theodoratou et al. (2000b)
pUIN10D	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (A28G)	diese Arbeit
pUID15N	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G43A)	diese Arbeit
pUID16N	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G46A)	Theodoratou et al. (2000b)
pUIE24Q	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G70C)	diese Arbeit
pUID38N	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G112A)	diese Arbeit
pUIS41A	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit zwei Punktmutationen in <i>hycI</i> (A121G, G122C)	diese Arbeit
pUID62N	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G184A)	Theodoratou et al. (2000b)
pUID62M	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit drei Punktmutationen in <i>hycI</i> (G184A, A185T, C186G)	Theodoratou et al. (2000b)
pUID65N	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G193A)	diese Arbeit

<b>Plasmid</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
pUIE72Q	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G214C)	diese Arbeit
pUIR74E	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit drei Punktmutationen in <i>hycI</i> (C220G, G221A, C222G)	diese Arbeit
pUID79N	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G235A)	diese Arbeit
pUID80N	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G238A)	diese Arbeit
pUIT88V	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit zwei Punktmutationen in <i>hycI</i> (A262G, C263T)	diese Arbeit
pUIH90Q	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (T270A)	Theodoratou et al. (2000b)
pUIN91D	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (A271G)	diese Arbeit
pUIY96F	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (A287T)	diese Arbeit
pUIQ114E	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (C340G)	diese Arbeit
pUIT125V	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit zwei Punktmutationen in <i>hycI</i> (A373G, C374T)	diese Arbeit

<b>Plasmid</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
pUIE133Q	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit einer Punktmutation in <i>hycI</i> (G397C)	diese Arbeit
pUID154-156	Ap <sup>R</sup> , pUI-2 mit 9 bp Deletion vom 3'-Ende von <i>hycI</i> her	diese Arbeit
pSEF2719	Cm <sup>R</sup> , 593 bp <i>Bam</i> HI-Fragment (' <i>hycE-hycF</i> ' aus MC4100) in pSU2719	Binder et al. (1996)
pSER537K	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit drei Punktmutationen in ' <i>hycE</i> (C1624A, G1625A, C1626G)	diese Arbeit
pSER537A	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit zwei Punktmutationen in ' <i>hycE</i> (C1624G, G1625C)	diese Arbeit
pSER537L	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit einer Punktmutation in ' <i>hycE</i> (G1625T)	diese Arbeit
pSER537I	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit zwei Punktmutationen in ' <i>hycE</i> (C1624A, G1625T)	diese Arbeit
pSER537D	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit zwei Punktmutationen in ' <i>hycE</i> (C1624G, G1625A)	diese Arbeit
pSER537E	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit drei Punktmutationen in ' <i>hycE</i> (C1624G, G1625A, C1626G)	diese Arbeit
pSEM538A	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit zwei Punktmutationen in ' <i>hycE</i> (A1627G, T1628C)	diese Arbeit
pSEM538D	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit drei Punktmutationen in ' <i>hycE</i> (A1627G, T1628A, G1629C)	diese Arbeit

<b>Plasmid</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
pSEM538H	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit drei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (A1627C, T1628A, G1629C)	diese Arbeit
pSEM538K	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit einer Punktmutation in <i>'hycE</i> (T1628A)	diese Arbeit
pSEM538R	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit einer Punktmutation in <i>'hycE</i> (T1628G)	diese Arbeit
pSEC531-1	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit zehn Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1608A, A1622T, C1623A, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C)	diese Arbeit
pSEC531-2	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit neun Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1608A, C1623T, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C)	diese Arbeit
pSEC531-3	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit dreizehn Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1608A, C1614A, T1617C, A1622T, C1623A, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C, C1638A)	diese Arbeit
pSEC531-4	Cm <sup>R</sup> , pSEF2719 mit fünfzehn Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1608A, C1614A, T1617C, C1620G, A1622T, C1623A, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C, G1636C, C1638A)	diese Arbeit
pACE-1	Cm <sup>R</sup> , 2506 bp-Fragment ( <i>'hycD</i> , <i>hycE</i> , <i>hycF'</i> ) aus pRBE in pACYC184	Theodoratou et al. (2000a)

<b>Plasmid</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
pR537K	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSER537K mit drei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1624A, G1625A, C1626G) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pR537H	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEF-R mit zwei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (G1625A, C1626T) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	Theodoratou et al. (2000a)
pR537A	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSER537A mit zwei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1624G, G1625C) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pR537L	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSER537L mit einer Punktmutation in <i>'hycE</i> (G1625T) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pR537I	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSER537I mit zwei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1624A, G1625T) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pR537D	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSER537D mit zwei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1624G, G1625A) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pR537E	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSER537E mit drei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1624G, G1625A, C1626G) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pM538A	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEM538A mit zwei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (A1627G, T1628C) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pM538L	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEF-M mit einer Punktmutation in <i>'hycE</i> (A1627T) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	Theodoratou et al. (2000a)
pM538D	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEM538D mit drei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (A1627G, T1628A, G1629C) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pM538E	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEF-M mit zwei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (A1627G, T1628A) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	Theodoratou et al. (2000a)
pM538H	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEM538H mit drei Punktmutationen in <i>'hycE</i> (A1627C, T1628A, G1629C) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pM538K	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEM538K mit einer Punktmutation in <i>'hycE</i> (T1628A) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pM538R	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEM538R mit einer Punktmutation in <i>'hycE</i> (T1628G) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pACED4	Cm <sup>R</sup> , 471 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment (3'- $\Delta^{12}$ <i>'hycE'</i> , <i>hycF'</i> ) aus pSEFD4 in pACE-1	Theodoratou et al. (2000a)
pACED8	Cm <sup>R</sup> , 459 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment (3'- $\Delta^{24}$ <i>'hycE'</i> , <i>hycF'</i> ) aus pSEFD8 in pACE-1	Theodoratou et al. (2000a)
pACED12	Cm <sup>R</sup> , 447 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment (3'- $\Delta^{36}$ <i>'hycE'</i> , <i>hycF'</i> ) aus pSEFD12 in pACE-1	Theodoratou et al. (2000a)

Plasmid	Genotyp	Referenz
pACED16	Cm <sup>R</sup> , 435 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment (3'-Δ <sup>48</sup> <i>hycE'</i> , <i>hycF'</i> ) aus pSEFD16 in pACE-1	Theodoratou et al. (2000a)
pACED20	Cm <sup>R</sup> , 423 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment (3'-Δ <sup>60</sup> <i>hycE'</i> , <i>hycF'</i> ) aus pSEFD20 in pACE-1	Theodoratou et al. (2000a)
pACED26	Cm <sup>R</sup> , 405 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment (3'-Δ <sup>78</sup> <i>hycE'</i> , <i>hycF'</i> ) aus pSEFD26 in pACE-1	Theodoratou et al. (2000a)
pAC531-1	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEC531-1 mit zehn Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1608A, A1622T, C1623A, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pAC531-2	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEC531-2 mit neun Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1608A, C1623T, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pAC531-3	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEC531-3 mit dreizehn Punktmutationen in <i>'hycE</i> (C1608A, C1614A, T1617C, A1622T, C1623A, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C, C1638A) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pAC531-4	Cm <sup>R</sup> , 483 bp <i>EcoRV/BamHI</i> -Fragment ( <i>'hycE-hycF'</i> ) aus pSEC531-4 mit fünfzehn Punktmutationen in <i>'hycE'</i> (C1608A, C1614A, T1617C, C1620G, A1622T, C1623A, C1626A, A1627G, T1628G, G1629T, A1630C, C1631T, G1635C, G1636C, C1638A) in pACE-1 ( <i>EcoRV/BamHI</i> restringiert)	diese Arbeit
pMSD705	Cm <sup>R</sup> , 1,5 kb <i>ClaI/ScaI</i> -Fragment aus pMSD105 mit <i>BamHI</i> -Linkermolekülen in pMAK705, 1642 bp Deletion in <i>hycE</i>	Sauter et al. (1992)
pHR705	Cm <sup>R</sup> , pMSD705, <i>hycE</i> <sup>+</sup> (entstanden durch Rekombination von pMSD705 mit dem <i>E. coli</i> -Chromosom)	Sauter et al. (1992)
pHRM538D	Cm <sup>R</sup> , 576 bp <i>XhoI/Bpu1102I</i> -Fragment ( <i>'hycE'</i> ) aus pM538D mit drei Punktmutationen in <i>'hycE'</i> (A1627G, T1628A, G1629C) in pHR705 ( <i>XhoI/Bpu1102I</i> restringiert)	diese Arbeit
pHRM538E	Cm <sup>R</sup> , 576 bp <i>XhoI/Bpu1102I</i> -Fragment ( <i>'hycE'</i> ) aus pM538E mit zwei Punktmutationen in <i>'hycE'</i> (A1627G, T1628A) in pHR705 ( <i>XhoI/Bpu1102I</i> restringiert)	diese Arbeit
pHRM538D - $\Delta$ <i>EspI</i>	Cm <sup>R</sup> , pHRM538D mit 1526 bp Deletion ( <i>Bpu1102I</i> -Fragment <i>hycD'</i> , <i>'hycE'</i> )	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
pHRM538E - $\Delta$ <i>EspI</i>	Cm <sup>R</sup> , pHRM538E mit 1526 bp Deletion ( <i>Bpu1102I</i> -Fragment <i>hycD'</i> , <i>'hycE</i> )	diese Arbeit
pI	Ap <sup>R</sup> , <i>hycI</i> aus pUI-2 über PCR amplifiziert mit flankierenden <i>Bam</i> HI-Sequenzen in pUI-2 ( <i>Bam</i> HI restringiert)	diese Arbeit
pUH-2	Ap <sup>R</sup> , 780 bp <i>Bam</i> HI-Fragment ( <i>'hycG-hycH-hycI'</i> ) aus pAH-2 in pUC19	K. Eismann (unveröffentlicht)

## II. Medien und Lösungen

Im Folgenden sind verwendete Standardmedien und –lösungen samt Referenzen aufgelistet. Unveröffentlichte Lösungen sowie veränderte Zusammensetzungen bzw. Supplemente werden genauer beschrieben.

### 1. Medien

- LB-Medium (Miller, 1972)
- TGYEP-Medium (Begg et al., 1977): Anders als in der Originalanleitung wurde Glucose in einer Endkonzentration von 0,8 % eingesetzt und das Medium zusätzlich mit 30 mM Na-Formiat, 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> und 10  $\mu$ M Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> versetzt.
- SOC-Medium: 2 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

Als Antibiotika für Anzuchten plasmidtragender Stämme mit entsprechender Resistenz dienten Ampicillin oder Chloramphenicol bzw. beide in jeweils einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml bzw. 30  $\mu$ g/ml. Feste Nährböden enthielten 1,5 % Agar zugegeben.

## 2. Lösungen

HQ-1 (Holmes & Quigley, 1981)

HQ-2 (Holmes & Quigley, 1981)

GS-Lösung: 8 M Guanidiniumhydrochlorid, 0.3 M Na-Acetat, pH 7 (Neuhierl, 1998)

Lösung II (Sambrook et al., 1989)

Lösung III (Sambrook et al., 1989)

TAE (Sambrook et al., 1989)

DNA-Auftragspuffer (Sambrook et al., 1989)

TSS-Lösung (Chung et al., 1989)

TES-Lösung (Vogelstein & Gillespie, 1979)

NaI-Lösung (Vogelstein & Gillespie, 1979)

SDS-Probenpuffer (Tabor & Richardson, 1985)

nicht-denaturierender Auftragspuffer (Drapal & Böck, 1998)

Auftragspuffer für Aktivitätsgele: entspricht SDS-Probenpuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol

Lösungen für Polyacrylamidgele, in denen Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden sollten, wurden nach Angaben von Laemmli (1970) angefertigt, entsprechende Lösungen für die Auftrennung von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden nach Anleitung von Drapal & Böck (1998) hergestellt. Der Transfer so aufgetrennter Proteine auf Nitrocellulosemembranen zum späteren immunologischen Nachweis erfolgte dementsprechend unter denaturierenden Bedingungen unter Verwendung

des Blotpuffers nach Schmid & Böck (1981) oder unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit jenem nach Drapal & Böck (1998).

TBS-T (Amersham LIFE SCIENCE ECL Western blotting protocols)

TBS: wie TBS-T, nur ohne Tween 20

Amidoschwarzlösung: 0.1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure

Coomassie-Lösung: 0,2 % Serva Blue R-250, 10 % Essigsäure, 30 % Methanol

Entfärber: 30 % Methanol, 10 % Essigsäure

Minimal A Puffer (Miller, 1992 ): 10.5 g  $K_2HPO_4$ , 4.5 g  $KH_2PO_4$ , 1 g  $(NH_4)_2SO_4$ ,  
0.5 g Na-Citrat x 2  $H_2O$  pro l

Für enzymatische Umsetzungen von DNA wurden die von den entsprechenden Firmen mitgelieferten Puffer verwendet.

### **III. Anzuchten**

Aerobe Anzuchten, die meist der Vervielfältigung von Plasmiden, als Übernachtskulturen für das Ansetzen von Gastests oder zur Herstellung kompetenter Zellen für Transformationen dienen, erfolgten in LB-Medium und wurden entweder in Reagenzgläser (Übernachtskulturen, Plasmidvermehrung) in einem Rollodrum-Gerät oder in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler (Braun Melsungen) bei 200 U/min bzw. in einem temperierbaren Wasserbad (New Brunswick, Modell G76) bei Stufe 6-7 und einer Temperatur von 37°C oder 30°C, in Spezialfällen von 44°C, geschüttelt.

Anaerobe Anzuchten zur Untersuchung der Hydrogenaseaktivität und –reifung erfolgten bei 37°C in Standflaschen, die bis zum Rand mit TGYEP-Medium befüllt waren. Die Standflaschen wurden dabei mit halbaeroben Übernachtskulturen im Verhältnis 1:100 beimpft. Dabei handelte es sich um 10 ml-Kulturen, die über Nacht in 100 ml-Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 50 U/min und 37°C bewegt worden waren. Dies sollte bei gleichzeitiger guter Durchmischung der Bakteriensuspension zu einer Limitierung

der Sauerstoffversorgung und damit zur raschen Adaptation der Zellen an die nachfolgenden anaeroben Bedingungen führen.

Die Bebrütung von Bakterien auf festen Nährböden erfolgte über Nacht in Brutschränken bei 37°C, 30°C oder 44°C.

#### **IV. Physiologische Methoden**

##### **1. Test auf Gasbildung**

Der unter Anaerobiose bei Formiatgärung durch *E. coli* gebildete Wasserstoff kann mit Hilfe eines in einem mit 10 ml Nährlösung befüllten Reagenzglas befindlichen umgedrehten Durham-Röhrchen aufgefangen werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Funktionalität des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes zu überprüfen. Das bei dieser Gärung ebenfalls gebildete Kohlendioxid liegt größtenteils im Medium gelöst vor und hat damit keinen Einfluß auf die Auswertung. Die verwendete Nährlösung besteht aus LB-Medium, das mit Glucose in einer Endkonzentration von 0,8 % versetzt wurde. So vorbereitete Reagenzgläser wurden mit Übernachtskulturen im Verhältnis 1:100 angeimpft und anschließend als Standkulturen 48 h bei 37°C inkubiert. Bei Verwendung von Transformanten mit *hycI*-bzw. *hycI*-Varianten-tragenden pUC-Derivaten war es zudem notwendig, die Übernachtskulturen mit 0,2% Glucose anzusetzen, um die Expression der in größeren Mengen toxisch wirkenden Protease niedrig zu halten.

##### **2. Überschichtungstests**

###### **a) Test auf Formiatdehydrogenase H-Aktivität**

Wie im Falle des oben beschriebenen Gastests ist es möglich, die Aktivitäten von Hydrogenase und Formiatdehydrogenase H semiquantitativ, aber mit dem Vorteil ihrer Unterscheidung, auf festen Nährböden nachzuweisen. Der Nachweis erfolgt in Anlehnung an einen von Mandrand-Berthelot et al. (1978) beschriebenen Test. Die zu testenden Stämme bzw. Transformanten werden auf TGYEP-Agar ausgestrichen bzw. ausplattiert und über Nacht aerob bei 37°C bebrütet. Anschließend werden die Platten 48 h unter anoxischen Bedingungen in einem Anaerobentopf bei gleicher Temperatur inkubiert. Die aerobe Vorinkubation dient dabei dem besseren Wachstum der Kolonien, da bei sofortiger Anaerobiose, gerade bei ausplattierten Kulturen, die Kolonien nur langsam anwachsen und

dadurch ein potentieller Unterschied in der Aktivität kaum noch erkennbar war. Die anoxischen Verhältnisse werden durch dreimalige Entgasung und Begasung des Topfes mit Stickstoff auf einen Druck von 0,6-0,7 bar geschaffen. Höherer Druck hemmt das Wachstum. Der Aktivitätsnachweis erfolgt nach Inkubation durch Überschichtung der Platten mit Weichagar bestehend aus 0,75 % Agarose, 1 mg/ml Benzylviologen und 17 mg/ml Na-Formiat gelöst in 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 7. Das Benzylviologen wird dabei nach Lösen der Agarose und des Na-Formiats in der Mikrowelle und Abkühlen der so gewonnenen homogenen Lösung auf handwarm hinzugegeben und durch vorsichtiges Schütteln oder Rühren darin gelöst. Die  $\text{H}_2$ -produzierenden Kolonien erscheinen kurz nach der Überschichtung durch Reduktion des Benzylviologens in ihrer sauerstoffärmsten Region, dem Kern, violett, die inaktiven bleiben weiß.

#### **b) Test auf Hydrogenaseaktivität**

Der Nachweis der Hydrogenaseaktivität erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie vorher für die Formiatdehydrogenase H beschrieben; die anaerobe Inkubation findet jedoch unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre statt und der Weichagar für die Überschichtung enthält kein Na-Formiat.

### **V. Molekularbiologische Methoden**

#### **1. Verwendete Oligonukleotide**

Die folgende Tabelle listet alle in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide nach ihrem Verwendungszweck auf. Eingeführte Basenaustausche sind fett gedruckt und die an dieser Stelle in der Originalsequenz vorliegenden Basen sind daneben aufgetragen. Durch die veränderte Basenabfolge neu entstandene Restriktionsschnittstellen sind nur dann angegeben, wenn sie zu Klonierungszwecken verwendet wurden.

**Tabelle 3: Oligonukleotide**

<b>Verwendung/ Name</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Original- sequenz</b>
<u>Einführen von</u>		
<u>Mutationen/</u>		
<u>Deletionen in <i>hycI</i></u>		
hycIM1	ATTATCGCCCATCATGCTATTGCCAA	C
hycIM2	GTTGACAATCAGCAGTCGTGTCTG	C
hycIM3	CATGACAATCAGCAGTCGTGTCTG	GTC
hycIM4	TTGGGTAGTCATCATAAACATCT	A
hycIM10	ATCGCCAACACAGAGTAAAACGT	T
hycIM15	ATTGCCCATCATGCTATTGCCAAC	C
hycIM24	TTGCGCCAGCAGCGGACCTGC	C
hycIM38	GTTAATCACCACCCAGTTACCTT	C
hycIM41	GGCACCGCCGTCAATCACCAC	CT
hycIM65	ATTCGTGGCGTCGACAATCAGCA	C
hycIM72	CTGGCCGGGGTTTAGCCCCAT	C
hycIM74	CTCGATCTCGCCGGGGTTTAGC	GCG
hycIM79	ATTCGGGTCGATGATGCGGATCT	C
hycIM80	ATTATCCGGGTCGATGATGCGGA	C
hycIM88	AACCATCATAAACATCTCGGCGA	GT
hycIM91	GTCATGGGTAGTCATCATAAACATC	T
hycIM96	GAAATTCAACGGCATGTTATGGGTA	T
hycIM114	CTCAATGCCGAGGAAAATCACTTC	G
hycIM125	GACCATCGGGTAGTAAAAGCCGA	GT
hycIM133	TTGTACCGCATCTTTAATCGGCTG	C
hycIG1	GGCGCAGGTCCGCTGCTGGCG	
hycIG2	GCCACGGATATGGGGCTAAACCC	
hycIG3	AACATGCCGTTGAATTACCTTAT	
hycIG10	AGCATGATGGGCGATGATGGC	
hycIG15	GATGGCGCAGGTCCGCTGCTG	

Verwendung/ Name	Sequenz (5'-3')	Original- sequenz
hycIG24	AAGTGCGCCGCCGCGCCGAAA	
hycIG38	GGCGGTAGCGCACCGGAAAAC	
hycIG41	GCACCGGAAAACGACATCGTCG	
hycIG65	ATGGGGCTAAACCCCGGCGAG	
hycIG72	ATCCGCATCATCGACCCGGATGA	
hycIG74	ATCATCGACCCGGATGATATCGC	
hycIG79	GATATCGCCGAGATGTTTATGATGA	
hycIG80	ATCGCCGAGATGTTTATGATGACTA	
hycIG88	ACCCATAACATGCCGTTGAATTA	
hycIG91	ATGCCGTTGAATTACCTTATCGACC	
hycIG96	CTTATCGACCAGTTGAAAGAAGATAT	
hycIG114	CCGGATATCGTCGGCTTTTACTAC	
hycIG125	CAGCCGATTAAAGATGCGGTAGAA	
hycIG133	ACCGTTTATCAACGACTGGAAGGC	
hycID154-156up	CACCGCTAACTGCGCGAAGCC	
hycID154-156down	TAGTTTTTCATTAAGGAATCAGGACAG	

Einführen von  
Mutationen in die  
Schnittstellen-  
sequenz von *hycE*

hycERD	GTCGTCGGTACAGGAGTAGCAAG	CG
hycERL	GAGGTCGGTACAGGAGTAGCAAG	C
hycERK	CTTGTCGGTACAGGAGTAGCAAG	GCG
hycERE	CTCGTCGGTACAGGAGTAGCAAG	GCG
hycERI	GATGTCGGTACAGGAGTAGCAAG	CG
hycERA	GGCGTCGGTACAGGAGTAGCAA	CG
hycEMD	GTCGCGGTTCGGTACAGGAGTAGC	CAT
hycEMK	CTTGCGGTTCGGTACAGGAGTAGC	A
hycEMA	CGCGCGGTTCGGTACAGGAGTA	AT
hycEMR	CCTGCGGTTCGGTACAGGAGTAG	A

<b>Verwendung/ Name</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Original- sequenz</b>
hycEMH	<b>GTGGCGGTCGGTACAGGAGTAG</b>	CAT
hycEGR	ATGACCGTGGTTCGATGTGCGTAA	
hycEGM	ACCGTGGTTCGATGTGCGTAAGAA	
<u>Einbau von</u>		
<u>Selenocystein in</u>		
<u>HycE</u>		
hycE-Sec1a	<b>GGTCTCGTCGTCGATGTGCGTAAGAAG</b>	ATGAC, G
hycE-Sec1b	<b>TCGTACGGTACAGGAGTATCAAGGGTC</b>	G, GT, G
hycE-Sec2	<b>TCGATCGGTACAGGAGTATCAAGGGTC</b>	G, G, G
hycE-Sec3a	<b>CGAGGTCTCGTCGTAGATGTGCGTAAGAAGAAG</b>	CATGAC, G, C
hycE-Sec3b	<b>TACGGTGCATGAGTATCAAGGGTCGAGGCTACC</b>	GT, A, G, G
hycE-Sec4a	<b>CGAGGTCTCGTCCTAGATGTGCGTAAGAAGAAG</b>	CATGAC, GG, C
hycE-Sec4b	<b>TACCGTGCATGAGTATCAAGGGTCGAGGCTACC</b>	GT, G, A, G, G
<u>Amplifikation,</u>		
<u>Umklonierung und</u>		
<u>unspezifische</u>		
<u>Mutagenese von <i>hycI</i></u>		
	<i>Bam</i> HI	
hycIa	<b>CGGGATCCGTGACTGACGTTTTACT</b>	keine (Insertion)
	<i>Bam</i> HI	
hycIb	<b>CGGGATCCTACTCTTCTTCCACCG</b>	keine (Insertion)

<b>Verwendung/ Name</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Original- sequenz</b>
<u>Amplifikation von</u>		
<u><i>hycE</i></u>		
hycE-5'	ATGTCTGAAGAAAAATTAGGTCA	
hycE-3'	CCTTATTTTCAGCGGCGAGTTTTT	
<u>Sequenzierungs- oligonukleotide</u>		
reverse	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA	
uni	GTAAAACGACGGCCAGT	
hycE1	CGCGGATCCTGGATAACCTGCCGGGTG	

## 2. Plasmidpräparationen

Zur Präparation besonders sauberer Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurden Kits wie der High Pure Plasmid Isolation Kit von Roche, der NucleoSpin Plasmid Isolation Kit von Macherey-Nagel oder der Plasmid Isolation Kit von Pharmacia entsprechend den mitgelieferten Anweisungen verwendet, wobei sogenannte Minipräparationen, also Präparationen von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab, für den oben erwähnten Einsatz in Sequenzierungen vollkommen ausreichend waren. Ansonsten erfolgte die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus 1,5 ml Übernachtskulturen entweder nach der Methode von Holmes und Quigley (1981) oder nach einer von Neuhierl (1998) modifizierten Version dieser.

Bei Verwendung von „low-copy“ Plasmiden war es andererseits häufig nötig, größere Anzuchten anzusetzen, um für nachfolgende Reaktionen genügend Material zu besitzen. Aus diesem Grund wurden von den gewünschten Transformanten in 1 l-Erlenmeyerkolben über Nacht 200 ml Kulturen angezogen. Die Isolierung der Plasmide erfolgte dann nach einer von Neuhierl (1998) vorgenommenen Abwandlung der in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse.

### **3. Amplifikation und Mutagenese von Genen mittels PCR**

#### **a) Einfache Vervielfältigung von Genen**

Die ursprüngliche Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur bloßen Amplifikation von DNA diente der spezifischen Vervielfältigung eines Gens zu Umklonierzwecken, wobei 1 ng saubere Plasmid-DNA als Matrize verwendet wurde. In allen anderen Fällen wurde diese Art der PCR zur Untersuchung erfolgreich eingeführter Deletionen oder Insertionen in das Chromosom genutzt. Neben den Plasmidkonstrukten, wurde die hierbei sonst als Matrize dienende chromosomale DNA auch durch direkten Einsatz ganzer Zellen einer Kolonie in den Reaktionsansatz und 5minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 94°C gewonnen. Die Zellen wurden dadurch zerstört und die DNA wurde in den Ansatz freigesetzt. Als amplifizierendes Enzym dienten 3 Units Taq-Polymerase pro Ansatz. Des weiteren enthielten sie 200 µM jedes dNTPs, 200 nM jedes Oligonukleotids und den von den Herstellern für die Taq-Polymerase empfohlenen Puffer. Angefertigt wurden 50 µl- bzw. 25 µl-Ansätze, welche zum Amplifikationsprozess in einem Biometra Personal Cycler oder einem Perkin Elmer Cycler einem Temperaturprogramm unterzogen wurden. Dieses bestand neben den vorher beschriebenen 5 min 94°C im Wesentlichen aus einem 1minütigen Denaturierungsschritt der DNA bei 94°C, 2 min Annealing, wobei die gewählte Annealingtemperatur dem Mittelwert der  $T_m$ -Werte der beiden eingesetzten Oligonukleotide entsprach, und einem Extensionsschritt bei 72°C, wobei die Extensionsdauer 1 min pro 1 kb der zu amplifizierenden DNA betrug. Diese drei Schritte wurden 30-mal wiederholt, wobei die Extensionszeit pro Zyklus um 2 sec verlängert wurde. Bei Verwendung des Perkin Elmer Cyclers war aufgrund eines fehlenden Heizdeckels als Schutz vor Verdunstung bei Durchlaufen des Temperaturprogramms eine vorherige Überschichtung der Proben mit 75 µl Mineralöl vonnöten. Nach Beenden des Programms wurden die Reaktionsansätze auf 4°C abgekühlt und, im Falle der Umklonierung, wurde das amplifizierte Fragment zur Weiterverarbeitung über den Qiagen PCR Purification Kit gereinigt. Die anderen Ansätze wurden zur Überprüfung der chromosomalen Genaustausche direkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### **b) Gerichtete Mutagenese**

Zur gezielten Einführung von Mutationen bzw. Deletionen in ein Gen wurde die von Ochman et al. (1988) etablierte inverse PCR verwendet. Die dabei in entgegengesetzter Richtung

orientierten Primer ermöglichen es durch ihre Hybridisierungsposition im Plasmid, Bereiche von Inserts auszusparen und damit Deletionen einzuführen. Darüber hinaus können durch Basenaustausche in den Oligonukleotiden gezielt Punktmutationen gesetzt werden. Einfache Religation des so veränderten Vektor-Insert-Konstrukts führt dann wieder zu einem Plasmid mit dem entsprechenden Genotyp.

Die Amplifikation der DNA wurde in diesen Fällen in einem Volumen von 100 µl durchgeführt, die Zusammensetzung der Reaktionsansätze stimmte jedoch mit der oben beschriebenen überein, lediglich die Konzentration der Oligonukleotide wurde auf 600 nM erhöht und an Stelle der Taq-Polymerase wurde unter Verwendung des entsprechenden Puffers die Pfu-Polymerase benutzt. In allen Fällen wurde gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt und die Ansätze wurden dem unter 3a beschriebenen Standardprogramm unterzogen; einzige Veränderung war die Erhöhung der Extensionsdauer auf 2 min pro 1 kb der zu amplifizierenden DNA, da die Polymerisation eines neuen DNA-Stranges durch die hier verwendete Pfu-Polymerase wesentlich langsamer vonstatten geht. Die PCR-Produkte wurden dann über den Quiagen PCR Purification Kit von überschüssigen Nukleotiden, Primern, Enzym und anderen Unreinheiten befreit und zur weiteren Aufreinigung in einem Agarosegel aufgetrennt.

### c) Unspezifische Mutagenese

Die unspezifische Mutagenese von Genen mittels PCR erfolgte nach einem auf den Methoden von Leung et al. (1989) und Cadwell und Joyce (1992) basierenden Protokoll von Clontech (1999). Dabei werden PCR-Reaktionen unter Bedingungen angesetzt, unter denen die Genauigkeit des Nukleotideinbaus herabgesetzt ist. Diese Bedingungen werden durch Variation der  $Mn^{2+}$ - bzw. dGTP-Konzentration in verschiedenen Ansätzen erreicht. Je nach eingesetzter Konzentration der beiden Komponenten können unterschiedlich viele Mutationen in ein Gen eingeführt werden. Die Mutationsrate ist also abhängig von den Konzentrationen dieser beiden Komponenten. So kann durch anfängliche Erhöhung der  $Mn^{2+}$ -Konzentration bis auf 650 µM die Mutationsrate statistisch gesehen bis auf 4,6 Mutationen pro 1000 bp erhöht werden; eine weitere Erhöhung der  $Mn^{2+}$ -Konzentration führt jedoch zu keiner weiteren Erhöhung der Mutationsrate, sie kann jetzt aber durch Steigerung der dGTP-Konzentration auf bis zu 200 µM nochmal auf 8 Mutationen/1000 bp angehoben werden. Werden noch höhere Mutationsraten gewünscht, können diese durch Durchführen weiterer solcher PCR-Zyklen mit verdünnten Aliquots der Ansätze des ersten Mutagenisierungsdurchlaufs erreicht werden (Shafikhani et al., 1997). Der Vorteil gegenüber

chemischen Methoden besteht also, außer in der Verwendung nicht-toxischer Substanzen, vor allem in der präzisen Kontrolle der Mutationsrate, da durch den kontrollierten Einsatz einer bestimmten Menge der oben erwähnten Komponenten nur eine bestimmte, statistisch bekannte Anzahl von Mutationen in ein Gen eingeführt werden kann. Außerdem ist die Bandbreite der potentiell eingeführten Mutationen wesentlich größer als bei der chemischen Mutagenese, da, anders als bei Verwendung chemischer Mutagene, keine Spezifität für eine bestimmte Art von Substitution besteht (Fromant et al., 1995). Darüber hinaus konzentrieren sich die unter Verwendung der PCR kreierte Mutationen nicht nur auf einen bestimmten Bereich der gesamten DNA-Sequenz, wie dies oft bei der chemischen Mutagenese der Fall ist (Botstein & Shortle, 1985).

Zur praktischen Durchführung wurden 50 µl-Ansätze angefertigt, deren Zusammensetzungen der unter 3a) beschriebenen entsprachen, jedoch variierte die dGTP-Konzentration im Gegensatz zur konstanten Konzentration der anderen dNTPs, je nach Ansatz und gewünschter Mutationsrate, zwischen 40 µM und 200 µM und das unter Standardbedingungen sonst nicht verwendete  $Mn^{2+}$  wurde in Form von  $MnSO_4$  in Konzentrationen von 0 µM bis 640 µM eingesetzt. Als DNA-Matrize diente saubere Plasmid-DNA. Das verwendete Temperaturprogramm entsprach dem unter 3a) beschriebenen. Die weitere Aufreinigung der so erhaltenen PCR-Fragmente erfolgte, wie unter 3b) angegeben, über den Quiagen PCR Purification Kit und Auftrennung in einem Agarosegel.

#### **4. 5'-Phosphorylierung, 5'-Dephosphorylierung, Restriktion und Ligation**

Primer, die in PCR-Reaktionen eingesetzt wurden, wurden vorher mit Hilfe der Polynukleotidkinase phosphoryliert, um, nach Aufreinigung der entsprechenden Fragmente, diese sofort ligieren zu können. Für die Reaktion wurden die Anweisungen des Enzymherstellers befolgt, wobei die Ansätze am Ende zur Denaturierung der Polynukleotidkinase 15 min auf 75°C erhitzt wurden. Für den Einsatz in die verschiedenen PCR-Reaktionen war keine weitere Aufreinigung nötig.

Zur Vermeidung von Religation linearisierter Vektoren wurden die 5'-Enden durch Einsatz der Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Auch hier wurde nach Angaben des Enzymherstellers vorgegangen. Im Anschluß wurden die Ansätze entweder über den Quiagen PCR Purification Kit gereinigt oder, wenn eine Aufkonzentrierung erwünscht war, einer Phenolextraktion und LiCl/Ethanol-Fällung, wie sie bei Holmes und Quigley (1981) beschrieben ist, unterzogen.

Ligationen und Restriktionen wurden ebenfalls nach Anweisungen der Enzymhersteller durchgeführt, wobei Ligationen meist in einem Volumen von 10 µl oder 20 µl über Nacht inkubiert wurden. Für die folgende Transformation mittels Elektroporation war es zur Entfernung von Salzen nötig die Ligationsansätze einer Butanolfällung zu unterziehen. Die Proben wurden dafür mit 1 ml Butanol versetzt und solange geschüttelt bis eine homogene Emulsion entstanden war. Diese wurde dann 5 min bei 13 000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag mit 600 µl 80 % Ethanol gewaschen. Nach nochmaliger 5-minütiger Zentrifugation und vollständiger Entfernung des Überstandes wurden die Proben getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> aufgenommen.

Kleine Restriktionsansätze (20 µl) wurden nach Inkubation direkt auf ein Agarosegel aufgetragen, größere Ansätze (200 µl-500µl) wurden zuvor ebenfalls einer LiCl/Ethanol-Fällung unterzogen.

## **5. Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Die Auftrennung von DNA zu analytischen oder präparativen Zwecken fand in TAE-gepufferten, zur Sichtbarmachung der DNA unter UV mit 100 µg/ml Ethidiumbromid versetzten Agarosegelen statt. Dabei variierte die verwendete Agarosekonzentration je nach Verwendungszweck und aufzutrennenden Fragmentgrößen zwischen 0,7 und 1,5 %. Zur Auftrennung besonders kleiner Fragmente (< 300 bp) wurde Spezialagarose (Biozym Small DNA) in einer Konzentration von 3-4 % eingesetzt. Als Laufpuffer diente TAE, dem bei Bedarf ebenfalls 100 µg Ethidiumbromid zugesetzt wurden. Die Proben wurden vor Auftrag auf das Gel mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und wenn nötig wurde als Größenvergleich ein geeigneter Längenstandard (Gibco BRL oder MBI) mit aufgetragen. Die für die elektrophoretische Auftrennung verwendete Spannung betrug 90 V.

## **6. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte entweder über Glasmilch nach der Methode von Vogelstein und Gillespie (1979) oder mit Hilfe des Quiagen Gel Extraction Kits unter Befolgung der beigefügten Anleitung.

## 7. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977), jedoch wurden an Stelle von radioaktivem  $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]ATP fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt. 0,7  $\mu$ g sauberer Plasmid-DNA wurde hierfür mit der vom Hersteller empfohlenen Menge sogenannten „Premixes“, welcher dNTPs, ddNTPs, Polymerase und Puffer enthält, und 5 pmol des jeweiligen Sequenzierungsoligonukleotids vermischt und einem ebenfalls vom Hersteller empfohlenen Temperaturprogramm unterzogen. Die Amplifikationsreaktion fand dabei in einem Biometra Personal Cycler oder einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 statt, wobei das Volumen der Reaktionsansätze 20  $\mu$ l betrug. Nach Beendigung des Programms wurden die Ansätze nach einer vom Sequenatorhersteller vorgegebenen Anleitung weiterbehandelt, die eine Reinigung und Fällung der Polymerisationsprodukte beinhaltet. Das Präzipitat wurde später in einer Formamidlösung aufgenommen und 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Die Auftrennung der so erhaltenen DNA-Fragmente und die Datenauswertung erfolgten entweder über einen Sequenator des ABI PRISM 377-Systems oder über einen Kapillarsequenzierer des Typs ABI PRISM 310.

## VI. Genetische Methoden

### 1. Transformationen

Zur Transformation einfacher Plasmide in Zellen wurde nach der Methode von Chung et al. (1989) verfahren. Bei Transformationen von Ligationen wurde jedoch die Methode der Elektroporation nach Fiedler und Wirth (1988) vorgezogen. Die Zellen wurden dabei zuvor, wie unter Sambrook et al. (1989) beschrieben, mit 10 % Glycerin vorbehandelt. Für die Transformation selbst wurden 2,5  $\mu$ l bis 3  $\mu$ l der Ligationsansätze eingesetzt und nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen zur phänotypischen Expression in 1 ml SOC-Medium bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die Inkubationsdauer richtete sich dabei nach dem zu exprimierenden Resistenzgen und betrug bei 37°C im Falle einer Ampicillinresistenz 1 h, im Falle einer Chloramphenicolresistenz 2 h. Bei Verwendung von pMAK700-Derivaten mit temperatursensitivem Replikon erfolgte die phänotypische Expression bei 30°C und die Expressionszeit wurde verdoppelt.

## **2. Einführen von Deletionen bzw. Mutationen in das Chromosom**

Zur Einführung von Deletionen oder Mutationen in chromosomale Gene kam die Methode von Hamilton et al. (1989) zum Tragen.

## **3. Unspezifische Mutagenese mittels EMS**

Für die unspezifische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS) wurden die Anweisungen von Miller (1992) befolgt. EMS ist ein alkylierendes Agens, das an verschiedenen Positionen von Basen eine Ethylgruppe anfügt. Die am häufigsten auftretende Modifikation stellt dabei die Alkylierung der O<sup>6</sup>-Position des Guanins dar, was gezielt zu Fehlpaarungen führt, die in G:C→A:T Transitionen enden. EMS besitzt somit eine gewisse Spezifität für bestimmte Basensubstitutionen. Zur praktischen Durchführung wurden die entsprechenden Stämme mit dem zu mutagenisierenden Plasmid wie im Protokoll angegeben angezogen und mit Minimal A Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl unverdünntem EMS und eine 1-stündige Inkubation bei 37°C unter langsamen Schütteln (50 U/min). Das Mutagen wurde dann ausgewaschen und die so behandelten Zellen zur Segregation und Expression veränderter Phänotypen aerob über Nacht in LB-Medium bei 37°C inkubiert. Verdünnungen der Übernachtskulturen wurden dann auf TGYEP-Platten ausplattiert und mittels des Überschichtungstests auf mutante Phänotypen in der Hydrogenaseaktivität hin durchsucht.

## **VII. Biochemische Methoden**

### **1. Herstellung von Zellysaten**

Für die Herstellung von Zellysaten wurde jeweils 1 ml einer anaerob gewachsenen Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1 abzentrifugiert (5 min 13000 x g) und das Sediment in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zur vollständigen Lyse der Zellen und Denaturierung der Proteine 15 min auf 95°C erhitzt.

### **2. Anfertigung von Rohextrakten (S13-Extrakten)**

Zur Anfertigung von Rohextrakten wurden 150 ml- oder 250 ml-Anzuchten in TGYEP-Medium anaerob bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 angezogen, geerntet und im folgenden wie bei Theodoratou et al. (2000a) beschrieben weiterbehandelt. Der dort aufgeführte Puffer A, in

den die Zellen nach der Ernte gewaschen und vor Aufbruch resuspendiert wurden, wurde wahlweise durch einen Waschpuffer bestehend aus 50 mM Tris/Cl pH 7,5 und einem aus 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 20 µg/ml DNase und 20 µg/ml PMSF bestehenden Aufbruchpuffer ersetzt. Je nach Weiterverwendung folgte entweder eine 2-malige Passage der French-Press-Zelle bei 84 MPa (S100, P100) oder eine einmalige bei 118 MPa (S13 für Enzymtests oder Gelelektrophorese). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

### **3. Präparation von S100- und P100-Fraktionen**

Die Präparation von S100- und P100-Extrakten erfolgte gemäß Theodoratou et al. (2000a). Auch hier wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

### **4. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration von Extrakten wurde nach der Methode von Whitaker und Granum (1980) durch Messung der Absorption bei 235 nm und 280 nm bestimmt.

### **5. Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen**

Die Auftrennung von Proteinen fand in 10 % oder 15 % Polyacrylamidgelen statt. Unter denaturierenden Bedingungen wurde dabei gemäß dem Protokoll von Laemmli (1970) verfahren und in SDS-Polyacrylamidgelen bei Raumtemperatur und einer Spannung von 150 V aufgetrennt, wobei entweder Zellysate (6 –10 µl) oder Extrakte (30-40 µg Protein) verwendet wurden. Bei Verwendung von Extrakten wurden diese zuvor mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte die Auftrennung nach Drapal & Böck (1998) unter Verwendung von SDS- und β-Mercaptoethanol- bzw. DTT-freien Lösungen bei 4°C und 100 V. Aufgetragen wurden je nach Bedarf S13- (30 µg-500 µg Protein) oder S100-Extrakte (30 µg-1,5 mg Protein), die zuvor mit nicht-denaturierendem Auftragspuffer versetzt worden waren; die Proben wurden nicht erhitzt.

## 6. Enzymtests

### a) Bestimmung der Formiatdehydrogenase H-Aktivität

Die quantitative Bestimmung der Formiatdehydrogenase H-Aktivität erfolgte in Anlehnung an die von Sawers et al. (1985) beschriebene Methode der formiatabhängigen Benzylviologenreduktion. Dazu wurden Rohextrakte wie unter VII.2. angegeben angefertigt, wobei der Zentrifugationsschritt nach Aufbruch der Zellen zur Gewinnung des S13-Extraktes auf 10 min verkürzt wurde und der Überstand möglichst großzügig in 10 ml-Serumgläschen überführt wurde. Diese wurden anschließend durch sofortiges mehrfaches Ent- und Begasen mit N<sub>2</sub> anaerob gemacht, wobei unter optimierten Bedingungen die Begasung immer 30 sec erfolgte, während die Entgasung von anfangs 30 sec über 5 min auf 10 min gesteigert wurde. Begonnen wurde dabei zuerst mit einer 30-sekündigen Begasung bei 0,6 – 0,7 bar, die dann von der ersten Entgasung abgelöst wurde usw.; der letzte Schritt bestand wieder in der Begasung der Extrakte, die diese schließlich in einer sauberen N<sub>2</sub>-Atmosphäre hinterließ. Höherer Druck als der hier angegebene war dabei zu vermeiden, da dies die Enzyme schädigte. Die Extrakte wurden während der ganzen Prozedur auf Eis inkubiert und während der Begasung mehrmals vermischt, um das Gas gleichmäßig zu verteilen, bzw. während der Entgasung kräftig geschüttelt, um die Suspension vollständig von Restsauerstoff zu befreien. Bevor mit der Messung begonnen wurde, folgte noch eine jeweils 30-minütige Inkubation auf Eis und bei Raumtemperatur, um den beim Aufbruch der Zellen und der Weiterbehandlung der Extrakte teilweise zerfallenen Enzymkomplex sich wieder assemblieren zu lassen. Die gemessene Gesamtaktivität war dann wesentlich höher, so dass Aktivitätsunterschiede leichter erkennbar und vergleichbar waren. Die Enzymaktivität wurde schließlich in mit 2 ml 100 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,2 und 4 mM Benzylviologen versetzten luftdicht verschließbaren 4 ml-Küvetten bestimmt, die zuvor auf die gleiche Weise wie die Extrakte bei Raumtemperatur unter anaerobe Bedingungen gebracht worden waren. Nach Vorreduktion des Benzylviologens durch tropfenweise Zugabe von 10 mg/ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Einspritzen von 3 µl des zu messenden Extraktes und stabiler Grundextinktion wurde die Reaktion durch Injektion von Na-Formiat in einer Endkonzentration von 24 mM als Substrat gestartet. Gemessen wurde die enzymabhängige Extinktionszunahme bei 600 nm, die infolge der Übertragung von Elektronen vom Donor Formiat auf den Akzeptor Benzylviologen stattfindet. Mit Hilfe der gemessenen Extinktionsänderung/min  $\times$  ml, des Extinktionskoeffizienten von Benzylviologen ( $7400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), des Volumens der Küvette und der Probe sowie der nach Whitaker und Granum (1980) ermittelten Proteinkonzentration des Extraktes war es dann möglich die spezifische Enzymaktivität zu berechnen.

## **b) Bestimmung der Aktivität der Hydrogenasen 1, 2 und 3**

Die Vorgehensweise bei der Vorbereitung und Behandlung der Rohextrakte sowie der Küvetten zur Bestimmung der Gesamtaktivität der Hydrogenasen 1, 2 und 3 war die gleiche wie die für die Bestimmung der Formiatdehydrogenase H beschriebene, jedoch erfolgte die Begasung der Küvetten mit  $H_2$ , der nun als Elektronendonator diente, und die Reaktion wurde ohne Vorreduktion mit Zugabe des Extraktes gestartet.

## **VIII. Immunologische Methoden**

### **1. Immunoblotanalysen**

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte unter denaturierenden wie nicht-denaturierenden Bedingungen prinzipiell auf die gleiche Weise und mit den gleichen Lösungen und Puffern in einer Naßblot-Kammer für 1 h bei 90 V. Der unter nicht-denaturierenden Bedingungen verwendete Blotpuffer enthielt jedoch kein Methanol (Drapal & Böck, 1998; s. II.2.). Die Absättigung der Membranen erfolgte mit 5 % Magermilch in TBS während die folgenden Waschschriffe und die Inkubation mit den jeweiligen primären und dem sekundären Antikörper (Protein A-Horseradish Peroxidase Conjugate, Biorad) in TBS-T durchgeführt wurden. Zur Verringerung unspezifischer Reaktionen der Antikörper wurde diesen noch 0,5 % Magermilch in den Puffer zugesetzt (A. Magalon, persönliche Mitteilung). Zur Detektion der gesuchten Protein-Banden kam das "Lumi-Light Western Blotting Substrate" von Roche zum Einsatz.

### **2. Absättigung von Antikörpern**

Um unspezifische Nebenreaktionen von Antikörpern mit anderen Proteinen in Extrakten weitgehend zu vermeiden, reichte der oben beschriebene Einsatz von 0,5% Magermilch im Puffer alleine oft nicht aus. Deshalb wurden von anaerob angezogenen, die entsprechenden Antigene missenden Deletionsmutanten S13-Extrakte hergestellt, mit denen die entsprechenden Antiseren dann abgesättigt wurden. Je nach Antikörper mussten dabei unterschiedliche Konzentrationen des betreffenden Rohextraktes eingesetzt werden, mit welchem das entsprechende Antiserum letztlich vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Es folgte eine weitere Inkubation bei 4°C über Nacht. Die sich in dieser Zeit gebildeten Präzipitate wurden durch Zentrifugation (20 min 13000 x g) bei 4°C von der jetzt

sauberen Antikörperfraktion abgetrennt. Bei einigen Antikörpern wie  $\alpha$ -HycH und  $\alpha$ -HypA war es darüber hinaus nötig, diese zuvor noch durch drei aufeinanderfolgende Ammoniumsulfatfällungen anzureichern; im Falle von HypE genügten die Fällungen zum Erhalt sauberer Antikörper, eine weitere Absättigung war nicht mehr notwendig (Piepersberg et al., 1975). Für die Weiterverwendung in der Immunoblot-Analyse wurden die verschiedenen Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt (Tabelle 4). Dabei genügte es im Falle von Western Blots unter denaturierenden Bedingungen die Membranen mit den Antikörpern der entsprechenden Verdünnung 1 h zu inkubieren, im Falle von Immunoblots unter nicht-denaturierenden Bedingungen war für den Erhalt guter Signale meist eine Inkubation über Nacht erforderlich.

**Tabelle 4: Verdünnungen und Absättigung verwendeter Antikörper**

Antiserum	Verdünnung	zur Absättigung verwendeter Stamm	Endkonzentration des zur Absättigung eingesetzten Rohextrakts
$\alpha$ -HypA	1:500	SMP101	20 mg/ml
$\alpha$ -HypB	1:2000	DHP-B	20 mg/ml
$\alpha$ -HypC	1:500	DHP-C	30 mg/ml
$\alpha$ -HypD	1:500	DHP-D	30 mg/ml
$\alpha$ -HypE	1:500	-	-
$\alpha$ -HypF	1:1000	-	-
$\alpha$ -HycE	<u>altes Serum:</u>	HD705	17,5 mg/ml
	1:1000 1 h		
	1:2000 ÜN		
	<u>neues Serum:</u>	-	-
	1:400 1 h		
	1:500 ÜN		
$\alpha$ -HycG	1:500	HD707	10 mg/ml
$\alpha$ -HycH	1:600	HD708-1	15 mg/ml
$\alpha$ -HycI	1:1000	HD709	10 mg/ml

## IX. Radioaktive Markierung von Proteinen

### 1. *in-vivo* Inkorporation von $^{63}\text{Ni}$

Die Überprüfung des Nিকেleinbaus in Hydrogenasen erfolgte mittels *in-vivo* Inkorporation von  $^{63}\text{Ni}$  nach Theodoratou et al. (2000). Dazu wurden anaerobe 250 ml-Anzuchten in TGYEP-Medium mit 150 nM  $^{63}\text{Ni}$  (spezifische Aktivität: 190  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) versetzt. Es folgte die Präparation von S100-Extrakten und die Auftrennung der Proteine über eine nicht-denaturierende PAGE. Die Gele wurden getrocknet und 1 Monat lang auf einem Tritium-Screen exponiert. Die Auswertung erfolgte im PhosphoImager.

### 2. *in-vivo* Inkorporation von $^{75}\text{Se}$

Zur Untersuchung eines möglichen Selenocysteineinbaus in mutante Formen von HycE, der großen Untereinheit der Hydrogenase 3, wurden anaerobe 10 ml-Kulturen in TGYEP (Standkulturen in verschließbaren Reagenzgefäßen aus Plastik) angesetzt. Bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 wurden diese mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cystein supplementiert, um den unspezifischen Einbau von Selenocystein über den Cystein-Stoffwechsel zu reduzieren (Müller et al., 1997), und mit 1  $\mu\text{M}$  [ $^{75}\text{Se}$ ]- $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (spezifische Aktivität: 1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) versetzt. Die Kulturen wurden dann bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 1 weiterangezogen. Aus 1 ml jeder Kultur wurden schließlich Zellysate hergestellt, die einer SDS-PAGE unterzogen wurden. Die getrockneten Gele wurden über Nacht auf einem Phospho-Screen exponiert und am folgenden Tag mit Hilfe des PhosphoImagers ausgewertet.

## X. Datenverarbeitung

Autoradiogramme wurden mit dem Programm ImageQuant (Version 1.2, Molecular Dynamics, Krefeld) ausgewertet. Die anschließende Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 2.5. Das selbe Programm wurde auch zur Bearbeitung von Chemoluminogrammen nach Einlesen mit einem Scanner bei einer Auflösung von 600 dpi (UMAX Astra 4000U) verwendet. Die Quantifizierung von Banden in Chemoluminogrammen erfolgte mit einem Densitometer (Molecular Dynamics, Krefeld). Diagramme wurden unter Verwendung des Programms Sigma Plot (Jandel Scientific Version 1.02) angefertigt. Die Suche nach Proteinen mit Ähnlichkeit zur Sequenz von HycH erfolgte mittels BLAST-Suche nach dem Algorithmus von Altschul et al. (1997) über Internet am

National Institute of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm MegAlign (Version 0.97) erstellt und DNA-Analysen mit dem Programm Geneworks 2.5 (IntelliGenetics Inc.) durchgeführt. Zur Konstruktion von SECIS-Elementen kamen die Programme DNASIS und Mulfold zum Einsatz. Zur Darstellung von Metallzentren wurde das Programm ChemSketch (Advanced Chemistry Development Inc., Version 4.02) verwendet. Die Darstellung von Modellen erfolgte mittels der Graphikprogramme Microsoft Power Point 2000 und Canvas (Version 8.0).

## C. ERGEBNISSE

Rossmann et al. hatten 1995 die prozessierende Aktivität der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 von *E. coli* identifiziert. Das Enzym ist das Produkt des promotordistalen Gens (*hycI*) des *hyc*-Operons. HycI ist ein Monomer mit einer molekularen Masse von 17 kDa, dem das N-terminale Methionin fehlt. Seine katalytische Aktivität ist bei pH-Werten zwischen 7.0 und 7.5 optimal und besteht in der Spaltung einer Arginin-Methionin-Bindung in prä-HycE, welche drei Aminosäurereste C-terminal zum zweiten Nickelbindemotiv entfernt ist. Dabei wird ein 32 Aminosäuren großes Peptid entfernt. Die Spaltung findet nur statt, wenn der Vorläufer der großen Untereinheit bereits Nickel beinhaltet.

Die Aufklärung der Struktur von HybD, der Reifungsprotease der Hydrogenase 2, durch Fritsche et al. (1997) offenbarte die Existenz einer Metallbindestelle bestehend aus drei konservierten Resten, einem Glutamat, einem Aspartat und einem Histidin, welche ein  $\text{Cd}^{2+}$ -Ion aus dem Kristallisationspuffer binden. Das Glutamat ist dabei im Falle von HycI durch ein Aspartat ersetzt. Die Tatsache, dass nur die Nickel-enthaltende Vorläuferform der großen Untereinheit proteolytisch gespalten wird, wirft die Frage nach der Erkennung des in diesem Reifungsstadium befindlichen Hydrogenase-Vorläufers durch die spezifische Protease auf. Primäre Frage war, ob die Bindestelle des  $\text{Cd}^{2+}$ -Ions im Kristallprotein identisch ist mit der Bindestelle des in das Vorläuferprotein eingebauten Nickel-Atoms. Wenn ja, findet bei der Koordination von Nickel eine Konformationsänderung des Vorläufers der großen Untereinheit statt, die erst eine Bindung oder Erkennung durch die Protease und damit die Spaltung ermöglicht oder interagiert die Endopeptidase direkt mit dem eingebauten Nickel? Die Untersuchung dieser Fragen war Bestandteil des ersten Teils dieser Arbeit.

### I. Untersuchung der Funktion der Metallbindestelle der Reifungsproteasen

Zur genaueren Untersuchung der Metallbindestelle war es nötig, Mutanten zu konstruieren, in denen die entsprechenden Aminosäurereste ausgetauscht sind. Das hierbei verwendete System war das der Protease HycI der Hydrogenase 3 von *E. coli*, da sie bisher am besten untersucht ist. Zudem sind diese Reste in allen anderen Reifungsproteasen konserviert, so dass allgemein gültige Informationen erwartet werden konnten.

## 1. Konstruktion von HycI-Varianten mit Aminosäureaustauschen in der Metallbindestelle

Die Einführung von Mutationen in *hycI* erfolgte mit Hilfe der inversen PCR unter Verwendung des Plasmids pUI-2, welches das intakte *hycI*-Gen sowie das 3'-Ende von *ascB* trägt, und den Oligonukleotidpaaren hycIM1 mit hycIG1, hycIM2 mit hycIG2, hycIM3 mit hycIG2 und hycIM4 mit hycIG3 (siehe Tabellen 2 und 3). Die sich daraus ergebenden Mutationen bestanden im Austausch der metallbindenden Reste von HycI, nämlich Aspartat-16 und Aspartat-62 gegen Asparagin, Aspartat-62 gegen Methionin und Histidin-90 gegen Glutamin und damit in erster Linie gegen Reste mit ähnlicher Größe, aber unterschiedlicher Ladung. Nach *DpnI*-Behandlung der Matrizen-DNA, Aufreinigung der erhaltenen PCR-Fragmente mittels des Quiagen PCR Purification Kits und Auftrennung in einem Agarosegel, folgte die Isolierung der erwarteten Fragmentgrößen und im Anschluß daran die Ligation der Konstrukte und ihre Transformation in den Stamm JM109. Nach Isolierung der Plasmide aus den erhaltenen Transformanten, wurde die Richtigkeit der eingeführten Mutationen sowie die Intaktheit der Promotorregion des Plasmids über Sequenzierung überprüft. Letzteres war nötig, um mögliche, durch die PCR eingeführte Mutationen in der Shine-Dalgarno-Sequenz und damit potentiell einhergehende Auswirkungen auf die Expression der Gene auszuschließen. Die Plasmide mit den entsprechenden mutanten *hycI*-Genen wurden dann in den  $\Delta hycI$ -Stamm HD709 transformiert, was in der Generierung der Transformanten HD709/pUID16N, HD709/pUID62N, HD709/pUID62M und HD709/pUIH90Q resultierte, die dann einer weiteren biochemischen Charakterisierung unterzogen werden konnten.

## 2. Charakterisierung der HycI-Varianten

### a) Test auf Gasbildung

Für eine erste Abschätzung der Auswirkungen der verschiedenen Mutationen in *hycI* wurde die Fähigkeit der Mutanten auf Gasbildung und damit die Intaktheit des Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplexes getestet. Die Tests wurden aus Gründen der Reproduzierbarkeit dreimal wiederholt, wobei von jeder Mutante je zwei Klone in jeweils drei Parallelansätzen angeimpft wurden. Als Kontrollen wurden der Wildtyp-Stamm MC4100, die *hycI*-Deletionsmutante HD709 sowie die Positivkontrolle für dieses Testsystem, HD709/pUI-2, eingesetzt. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, haben alle eingeführten Mutationen einen gravierenden Effekt auf die

Aktivität des Komplexes. So führen die Austausch der beiden Aspartate zu einem völligen Verlust der Aktivität und der Ersatz des Histidins durch ein Glutamin resultiert in einer Mutante mit einer nur noch sehr geringen Restaktivität im Vergleich zu den beiden Positivkontrollen. Die Negativkontrolle zeigt wie erwartet keine Gasbildung.

**Tabelle 5: Gasbildung der Transformanten mit Austauschen in der Metallbindestelle von HycI**

Stämme /Transformanten	Gasbildung
MC4100	++++
HD709	-
HD709/pUI-2	++++
HD709/pUID16N	-
HD709/pUID62N	-
HD709/pUID62M	-
HD709/pUIH90Q	+

- kein Gas; + wenig Gas; ++++ viel Gas

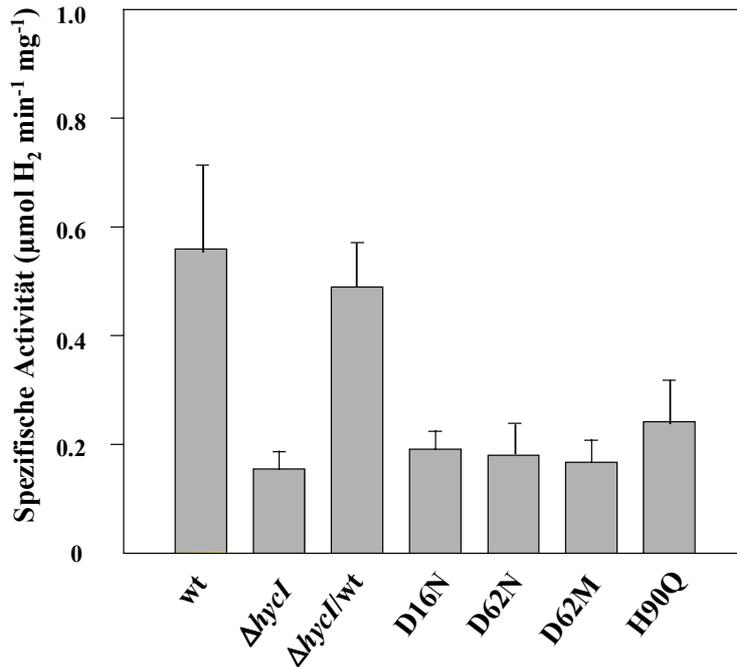
### **b) Aktivitäten der Hydrogenasen 1, 2 und 3 und der Formiatdehydrogenase H**

Zur genauen Quantifizierung wurde die Gesamtaktivität der Hydrogenasen 1, 2 und 3 sowie die Aktivität der Formiatdehydrogenase H *in vitro* bestimmt. Abbildung 11A und B zeigen, dass die Aktivitäten der drei gasnegativen Mutanten auf dem Niveau der Negativkontrolle HD709 liegen, was im Falle der Hydrogenaseaktivität etwa 11 %, im Falle der Formiatdehydrogenase H etwa 49 % der jeweiligen Wildtyp-Aktivität ausmacht. Diese Restaktivitäten rühren dabei im ersten Fall von den vorhandenen Aktivitäten der Hydrogenasen 1 und 2 her und spiegeln im zweiten Fall das sich aus der Unvollständigkeit des Komplexes ergebende niedrigere Elektronenübertragungspotential wider. Das im Test eingesetzte Benzylviologen wird nämlich nicht nur durch die intakte Formiatdehydrogenase H mit Elektronen versorgt sondern greift an jedem Punkt der Elektronentransportkette des FHL-Komplexes an.

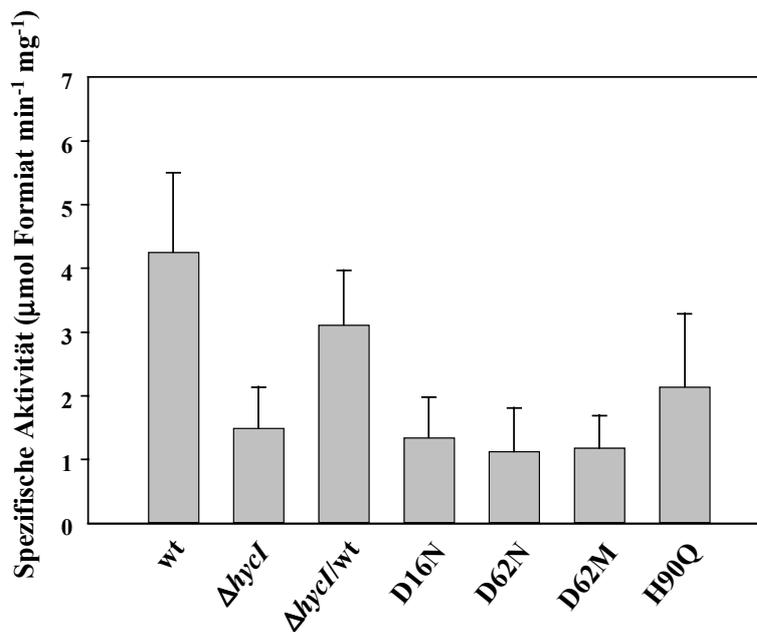
Im Gegensatz dazu weist, wie aus den Ergebnissen der Gastests erwartet, die H90Q-Variante eine erhöhte Restaktivität von etwa 16 % der Wildtyp-Hydrogenaseaktivität bzw. 66 % der Wildtyp-Formiatdehydrogenase H-Aktivität auf. Sie liegt damit um 5 % bzw. 17 % über der des *hycI*-Deletionsstammes.

Diesen Ergebnissen zufolge scheinen die im Gastest inaktiven Mutanten HycI-Varianten zu besitzen, die nicht mehr zur Prozessierung der großen Untereinheit befähigt sind, während die H90Q-Variante diese Aktivität zwar stark eingebüßt, aber nicht vollständig verloren zu haben scheint. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden von Anzuchten der entsprechenden Mutanten und von Kontrollstämmen Zellysate hergestellt und die Proteine in einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Durch Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde unter Verwendung eines spezifisch gegen die große Untereinheit der Hydrogenase 3, HycE, gerichteten Antikörpers die Prozessierung überprüft.

A



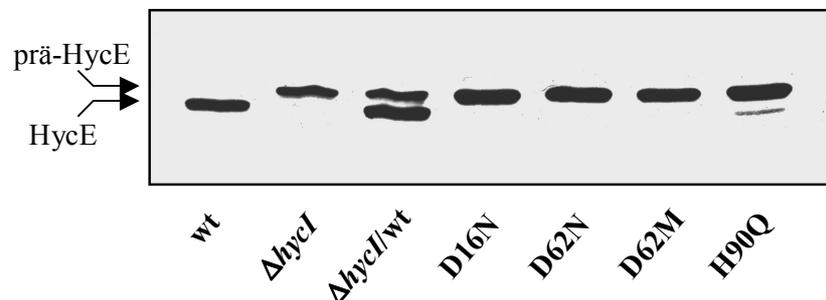
B



**Abbildung 11: (A) Gesamtaktivität der Hydrogenasen 1, 2 und 3 und (B) Formiatdehydrogenase H-Aktivität der die HycI-Varianten D16N, D62N, D62M und H90Q tragenden Transformanten.** Die Säulen stellen die Mittelwerte von sechs unabhängigen Messungen dar, die eingezeichneten Balken geben die Standardabweichung wieder. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ) und die Transformante HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ).

### c) Prozessierung der großen Untereinheit von Hydrogenase 3

Abbildung 12 zeigt, dass der Wildtyp-Extrakt prozessiertes HycE enthält, während in dem des proteasenegativen Stamms nur die unprozessierte Form vorliegt. Die Komplementation der *hycI*-Deletion in HD709 durch Transformation mit dem das *hycI*-Gen tragenden Plasmid pUI-2 führte nur zu einer unvollständigen Prozessierung von etwa 50 %-70 %. Ähnliche Werte ergaben sich auch bei der Bestimmung der Hydrogenase- und Formiatdehydrogenase H-Aktivitäten (Abbildung 11A und B). Hier lagen die gemessenen Enzymaktivitäten bei etwa 82 % bzw. 75 % der entsprechenden Werte des Wildtyps MC4100. Diese unvollständige Komplementierbarkeit könnte auf einem stöchiometrischen Missverhältnis zwischen dem plasmidkodierten *hycI* und den chromosomal kodierten Komponenten der Reifungsmaschinerie beruhen. Es bleibt festzuhalten, dass die Mutanten mit den HycI-Varianten D16N, D62N und D62M die unprozessierte HycE-Form aufweisen, während in der Variante H90Q, korrelierend mit der gemessenen Hydrogenaseaktivität, ein geringer Teil von etwa 5 % des Gesamtproteins prozessiert vorliegt.



**Abbildung 12: Immunologischer Nachweis der Prozessierung von HycE in Mutanten mit den HycI-Varianten D16N, D62N, D62M und H90Q.** Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ) und die Transformante HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ).

Die Aminosäure-Seitenketten, die an der Bindung des Cadmium-Ions aus dem Kristallisationspuffer beteiligt sind, nehmen also essentielle Funktionen in der Katalyse ein. Die teilweise Ersetzbarkeit von Histidin-90 durch Glutamin und der totale Verlust der Aktivität bei Austausch der beiden Aspartyl-Reste weist weiterhin darauf hin, dass diese Seitenketten eine Metallbindefunktion im nativen Protein besitzen könnten. Da der Vorläufer der großen Untereinheit nur prozessiert wird, wenn er Nickel enthält, ist es plausibel anzunehmen, dass es sich um eine Nickel-Bindestelle handelt.

In Zusammenarbeit mit A. Paschos wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob die Protease selbst Nickel enthält, ob sie als Nickel-Donor fungiert und ob sie Nickel als Bindemotiv im Vorläuferprotein benützt. Die Ergebnisse sind in Theodoratou et al. (2000b) publiziert; das Resultat kann wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die Endopeptidase ist ein metallfreies Enzym.
2. Die Protease besitzt keine Nickel-Donor-Funktion.
3. Inhibitoren gegen Serin-, Cystein- und Metalloproteasen haben keine Auswirkungen auf die proteolytische Aktivität des Enzyms; die Reifungsproteasen von Hydrogenasen sind somit keine Serin-, Cystein- oder Metalloproteasen. Metallchelatoren können darüber hinaus nicht an die Metalle des Metallzentrums der großen Untereinheit binden, wenn diese schon fest an den Vorläufer gebunden sind, noch können sie sie aus diesem entfernen.

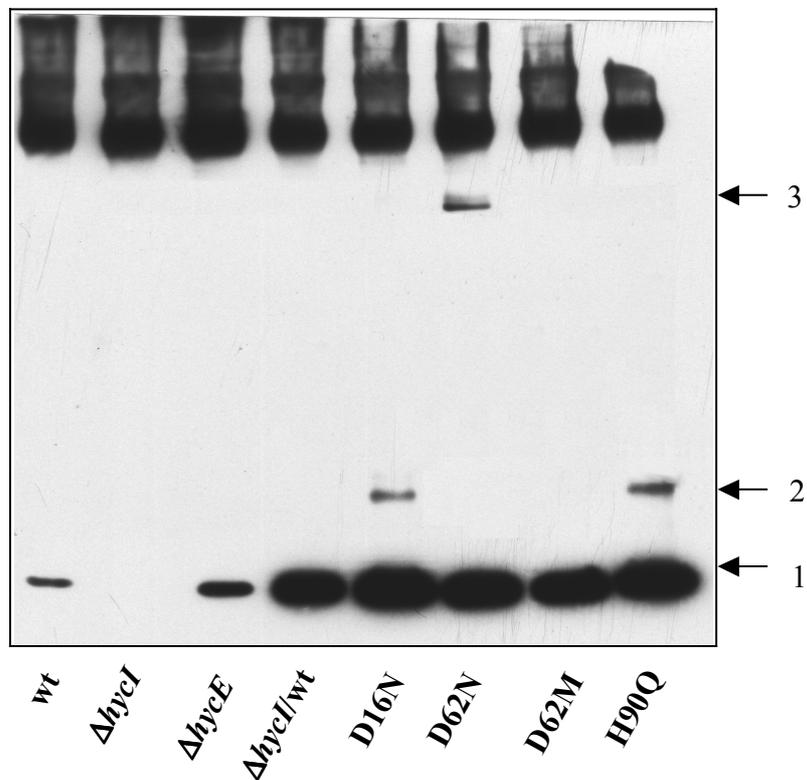
Diese Ergebnisse sowie der Nachweis, dass bei Einbau eines falschen Metalls, wie zum Beispiel Zink, in die große Untereinheit keine Prozessierung des Vorläuferproteins stattfindet (Menon & Robson, 1994; Magalon et al., 2001), beweisen, dass die Metallbindestelle der Reifungsproteasen als Erkennungsstelle für das Nickel im nickeltragenden HycE-Vorläufer dient. Dies signalisiert dem Enzym damit, dass das Nickel-Metallzentrum komplettiert ist und die proteolytische Entfernung des C-terminalen Peptids, erfolgen kann.

Es gibt nun zwei Möglichkeiten einer Erklärung für die Prozessierungsunfähigkeit der konstruierten HycI-Varianten: Entweder die Protease kann nicht mehr an Nickel binden oder die Bindung erfolgt, aber das Enzym kann nicht mehr vom Vorläufer abdissoziieren. In einem solchen Fall müsste sich ein stabiler Enzym-Substrat-Komplex anhäufen. Die Untersuchung eines solchen Komplexes könnte zudem Aufschluß über den Reaktionsmechanismus dieser Proteasefamilie geben. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Mutante mit dem Austausch H90Q, da sie noch eine geringfügige Aktivität aufweist. Zur Untersuchung dieser Aspekte wurden Rohextrakte der verschiedenen Mutanten einer nicht-denaturierenden PAGE unterzogen und immunologisch auf das Vorhandensein von Protease-Substratkomplexen analysiert.

#### **d) Untersuchung einer Komplexbildung zwischen prä-HycE und den HycI-Varianten**

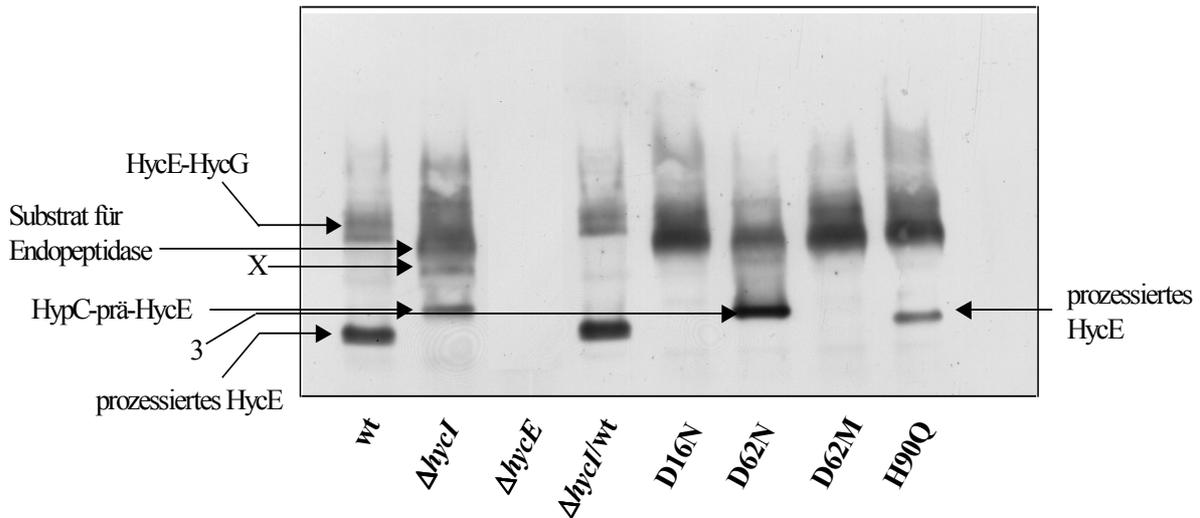
Abbildung 13 zeigt die in der Immunoblotanalyse detektierbaren HycI-Formen. Die Antikörper ergeben trotz Absättigung unspezifische Reaktionen, wie aus Spur 2 ersichtlich ist,

in welcher Rohextrakt des Stammes HD709 ( $\Delta hycI$ ) aufgetragen ist. Diese Reaktionen beschränken sich jedoch auf langsam wanderndes Material und interferieren nicht mit der Interpretation. Deutlich zu erkennen ist ein schneller laufendes Protein (Bande 1) in den Spuren der Extrakte des Wildtyps MC4100 und des  $\Delta hycE$ -Stammes HD705; es stellt freies HycI dar. Das gleiche Signal ist auch in der Spur der Transformanten HD709/pUI-2 zu sehen. Das stärkere Signal ergibt sich aus der Tatsache, dass das *hycI*-Gen auf einem multi-copy-Plasmid kodiert ist und damit überexprimiert vorliegt. Das gleiche Signal zeigt sich auch in den HycI-Varianten, darüber hinaus erscheinen jedoch noch zwei weitere Formen, jeweils eine in der Variante D62N (Bande 3) und eine in den Varianten D16N und H90Q (Bande 2). Hierbei könnte es sich um Komplexe handeln, wahrscheinlich zwischen HycI und prä-HycE.



**Abbildung 13: Wanderungsverhalten der HycI-Varianten D16N, D62N, D62M und H90Q im nicht-denaturierenden Gelsystem.** Der immunologische Nachweis erfolgte mit  $\alpha$ -HycI-Antikörpern. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ), HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie die Transformante HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ).

Eine Immunoblotanalyse der gleichen Proben mit  $\alpha$ -HycE-Antikörpern ergab das in Abbildung 14 dargestellte Auftrennungsmuster.

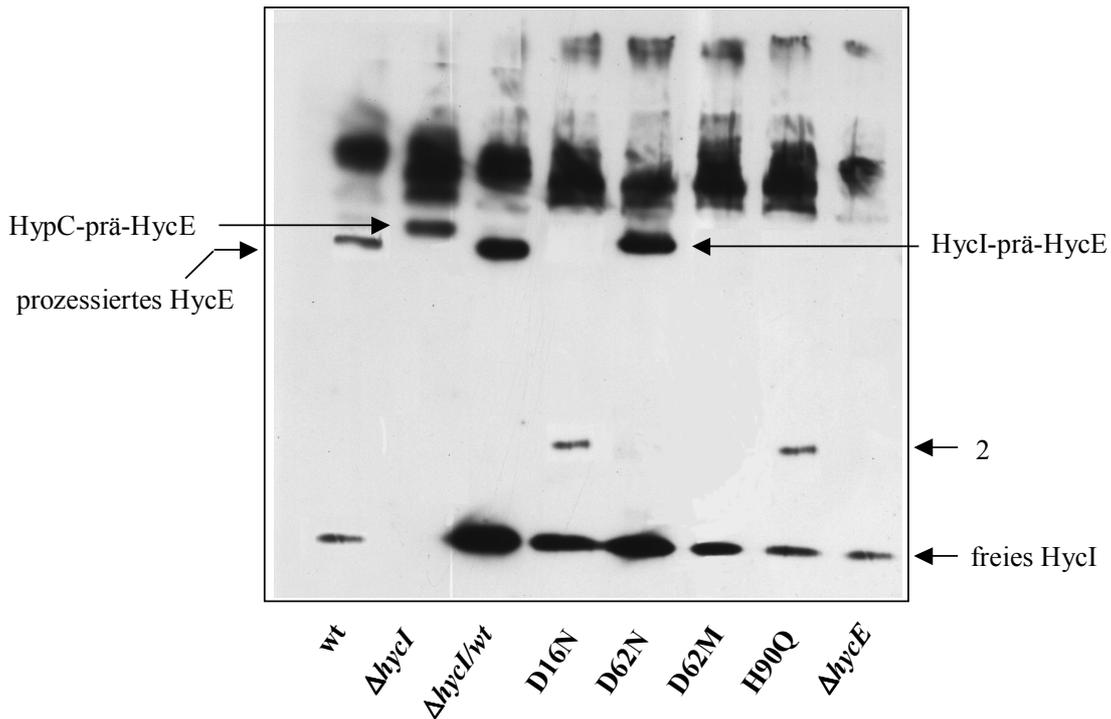


**Abbildung 14: Wanderungsverhalten von HycE in den die HycI-Varianten D16N, D62N, D62M und H90Q tragenden Transformanten im nicht-denaturierenden Gelsystem.** Der immunologische Nachweis erfolgte mit  $\alpha$ -HycE-Antikörpern. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ), HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie die Transformante HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ).

Wie bereits bekannt läuft HycE in unterschiedlichen Konformeren. Die im Stamm MC4100 bzw. in den Transformanten HD709/pUI-2 und HD709/pUIH90Q am schnellsten wandernde Bande ist dabei reifem und freiem HycE zuzuschreiben. Die zwei langsamer wandernden Formen im Wildtyp MC4100 und in der die Wildtypsituation nachahmenden Transformante HD709/pUI-2 stellen Komplexe des reifen HycE-Proteins mit der kleinen Untereinheit HycG dar, wobei aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens nicht ausgeschlossen werden kann, dass zumindest in einem Fall noch eine weitere Komponente des Reifungssystems daran gebunden ist (Magalon & Böck, 2000a). In Extrakten der Transformante mit überexprimierter H90Q-Variante sind eine deutlich geringere Menge an reifem Material und kaum detektierbare Mengen an HycE-HycG-Komplex zu sehen. Dies liegt einerseits an der geringen Menge von vorhandenem reifem HycE, aber auch an der Tatsache, dass im selben Gelbereich ein "Schmier" vorhanden ist, ähnlich wie bei Auftrennung von Extrakten der Mutanten D16N und D62M, der dem Laufverhalten der Extrakten der  $\Delta hycI$ -Mutanten HD709 ähnelt. Er stellt jene prä-HycE-Form dar, die als Substrat für die Endopeptidase dient (Magalon & Böck, 2000a). Im Immunoblot von HD709 sind darüber hinaus noch zwei weitere Banden sichtbar. Die am schnellsten wandernde konnte in verschiedenen Versuchen als HypC-prä-HycE-Komplex identifiziert werden (Magalon & Böck, 2000b). Die andere,

langsamer wandernde ist erst bei einer längeren Expositionszeit detektierbar. Welche Form oder welchen Zustand von HycE sie darstellt ist noch unklar (Bande X). In den Spuren der Mutantextrakte fehlen diese beiden Banden. Der HypC-prä-HycE-Komplex ist also vollständig aufgelöst, die Abdissoziation des chaperonartigen Proteins scheint damit durch die Anwesenheit der Protease stimuliert zu werden, auch wenn diese inaktiv ist. Das gleichzeitige Fehlen der Bande X aus HD709 deutet möglicherweise auf eine Interaktion von HypC-prä-HycE mit einer Komponente hin, die für die Dissoziation des Komplexes verantwortlich ist und die HycI-Protein zur Ausübung dieser Funktion benötigt.

Ein ganz anderes Laufverhalten von prä-HycE ist im Fall der Extrakte der Transformante mit D62N-Variante zu beobachten, die auch die zusätzliche HycI-Bande 3 aufweist (Abbildung 13). Auch sie enthält jene proteolytisch angreifbare prä-HycE-Form, jedoch in geringerer Menge als die anderen Mutanten. Dafür ist eine weitere HycE-Bande vorhanden, die erkennbar schneller wandert als der HypC-prä-HycE-Komplex aus HD709 und die etwa auf der gleichen Höhe liegt wie Bande 3 in Abbildung 13. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen HycI-prä-HycE-Komplex handelt, wurde eine Immunoblotanalyse bei gleichzeitigem Einsatz beider Antikörper durchgeführt (Abbildung 15). Es stellte sich heraus, dass diese Bande tatsächlich einen HycI-prä-HycE-Komplex darstellt. Der Austausch von Aspartat-62 gegen Asparagin resultiert also in einer HycI-Variante, die noch an HycE binden, das Substrat aber nicht mehr spalten kann. In dieser Mutante ist deshalb auch weniger „freies“ prä-HycE vorhanden ist; die anderen Austausche führen dagegen zum völligen Verlust der Bindungsfähigkeit.



**Abbildung 15: Komplexbildung zwischen prä-HycE und HycI in den HycI-Varianten D16N, D62N, D62M und H90Q.** Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem Gemisch aus  $\alpha$ -HycI- und  $\alpha$ -HycE-Antikörpern. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ), HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie die Transformante HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ).

Um festzustellen, ob noch andere Enzyme der Reifungsmaschinerie Teil dieses Komplexes sind und vor allem um die in Extrakten der Transformanten mit D16N- und H90Q-Varianten beobachtete Bande 2 näher zu charakterisieren, wurden weitere Immunoblotanalysen unter Verwendung von Antikörpern gegen alle Hyp-Proteine sowie HycG und HycH durchgeführt. Aus den erhaltenen Chemoluminogrammen ergaben sich jedoch keine Anhaltspunkte für Komplexe von HycI mit akzessorischen Hyp-Proteinen (Daten nicht gezeigt). Mit gegen HycG und HycH gerichteten Antikörpern konnten dagegen unterschiedliche Wanderungsverhalten der entsprechenden Proteine in den verschiedenen Stämmen bzw. Transformanten entdeckt werden. Sie haben aber primär nichts mit den in HycI eingeführten Mutationen zu tun, da sie nicht nur in diesen auftauchen. Sie werden deshalb in einem späteren Kapitel behandelt.

Das in D16N und H90Q vorliegende Protein der "Bande 2" kann damit auch weiterhin nicht zugeordnet werden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden: Die Metallbindestelle der Protease erkennt das Nickel im Vorläuferprotein. Der Austausch des Aspartats-62 gegen Asparagin stabilisiert den HycI-prä-HycE-Komplex, während ein Austausch gegen Methionin keine Bindung mehr ermöglicht, genauso wie die Substitution des Aspartats-16 gegen Asparagin. Der Austausch von Histidin-90 gegen Glutamin resultiert in einer Variante mit einer Restaktivität von ungefähr 5 %, was in erster Linie an einer reduzierten Bindefähigkeit als an einem erniedrigten Spaltungsvermögen liegen dürfte, da sonst auch hier ein HycI-prä-HycE-Komplex zu erwarten wäre. Diese letzten beiden Varianten weisen darüber hinaus noch zwei weitere HycI-Laufformen auf, die jedoch keinem Komplex zugeordnet werden können. Außerdem ist in allen HycI-Varianten der HypC-prä-HycE-Komplex vollkommen dissoziiert und die in HD709 beobachtete Bande X fehlt.

Die Aminosäurereste der Metallbindestelle könnten also als Nickelerkennungsmotiv identifiziert werden, über das eine Bindung an prä-HycE erfolgt. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass dies die einzige Interaktion mit dem Substratmolekül darstellt. Um die beobachtete Spezifität der Proteasen zu gewährleisten, müssen noch andere Domänen des Proteins erkannt werden. Welche Domänen sind es und welche Bereiche der Protease sind an diesem Prozess beteiligt? Schließlich bleibt auch noch die Frage nach ihrem Katalysemechanismus offen. Diesen Fragen sollte im folgenden Kapitel nachgegangen werden.

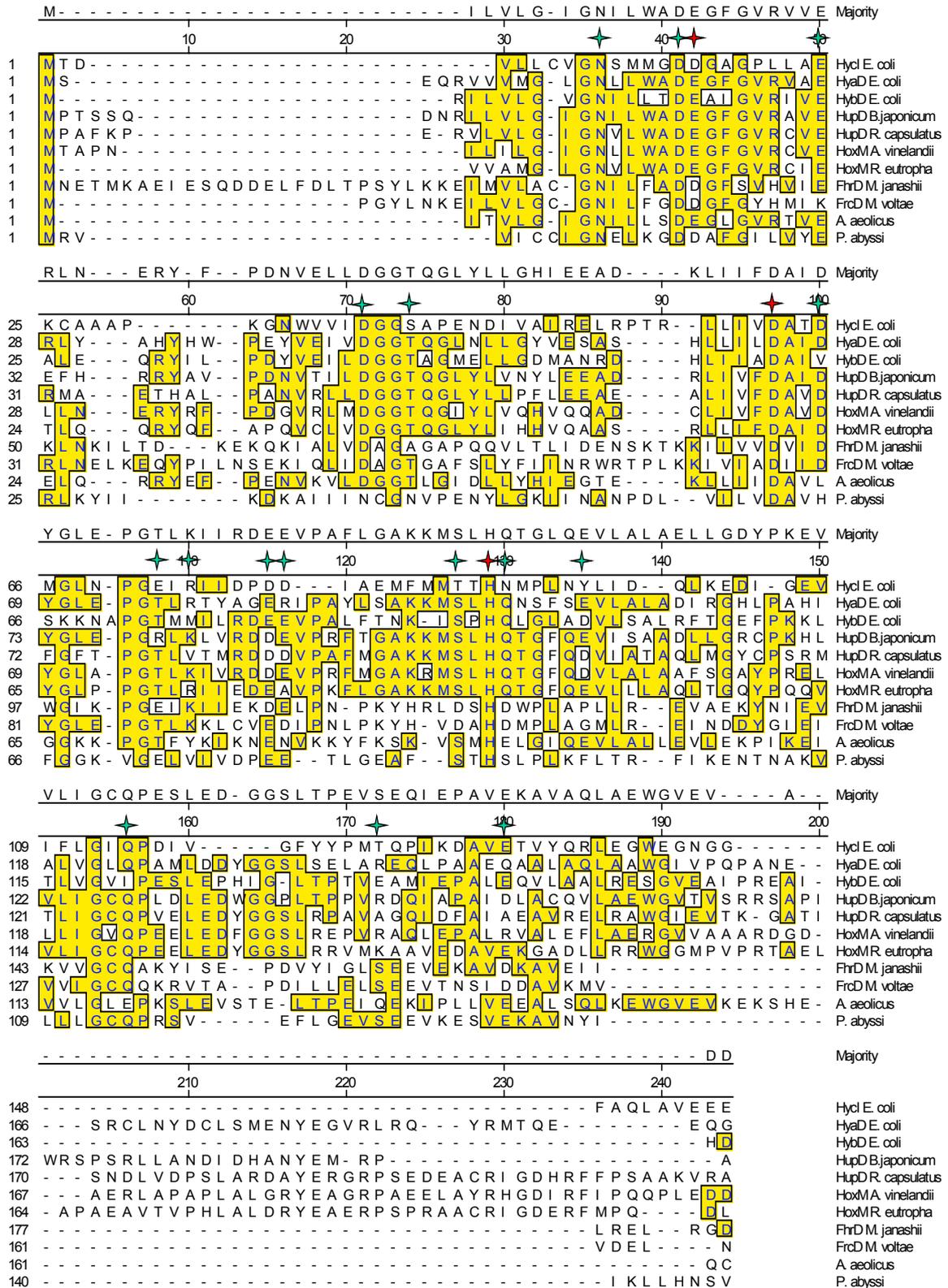
## **II. Untersuchungen zur Substratbindung und zum Katalysemechanismus der Reifungsprotease HycI**

Vergleiche von Aminosäuresequenzen von Hydrogenase-Reifungsproteasen aus unterschiedlichen Organismen zeigen, dass die Proteine untereinander nur eine begrenzte Sequenzähnlichkeit aufweisen (siehe Abbildung 16), die sich hauptsächlich auf den N-terminalen Bereich konzentriert. Die C-terminalen Regionen unterscheiden sich dagegen in ihrer Sequenz und Länge deutlich voneinander. Bereits früher wurde deshalb angenommen, dass der N-terminale Bereich für die Prozessierung verantwortlich ist und der C-terminale die Spezifität der Proteasen bestimmt und damit eine entscheidende Rolle bei der Substraterkennung spielt (Rossmann, 1995). Spezifische Motive in den homologen Regionen waren jedoch nicht zu erkennen. Neben den Aminosäuren der Metallbindestelle können aber

noch weitere konservierte Reste ausgemacht werden. Darüber hinaus fallen einzelne, in ihren Ladungen konservierte Reste auf. Da alle Reifungsproteasen von NiFe-Hydrogenasen die gleiche Reaktion durchführen, war anzunehmen, dass ähnliche Reste am Katalysemechanismus beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde eine umfangreiche Mutationsanalyse durchgeführt, bei der die entsprechenden Reste zumeist gegen andere gleicher Größe, aber entgegengesetzter Ladung ausgetauscht wurden. Die betreffenden Aminosäuren sind in Abbildung 16 gekennzeichnet. Insgesamt wurden folgende Einzelaustausche durchgeführt:

<b>Austausch</b>		<b>Variante</b>
<b>Asparagin-10</b>	→ <b>Aspartat</b>	<b>N10D</b>
<b>Aspartat-15</b>	→ <b>Asparagin</b>	<b>D15N</b>
<b>Glutamat-24</b>	→ <b>Glutamin</b>	<b>E24Q</b>
<b>Aspartat-38</b>	→ <b>Asparagin</b>	<b>D38N</b>
<b>Serin-41</b>	→ <b>Alanin</b>	<b>S41A</b>
<b>Aspartat-65</b>	→ <b>Asparagin</b>	<b>D65N</b>
<b>Glutamat-72</b>	→ <b>Glutamin</b>	<b>E72Q</b>
<b>Arginin-74</b>	→ <b>Glutamat</b>	<b>R74E</b>
<b>Aspartat-79</b>	→ <b>Asparagin</b>	<b>D79N</b>
<b>Aspartat-80</b>	→ <b>Asparagin</b>	<b>D80N</b>
<b>Threonin-88</b>	→ <b>Valin</b>	<b>T88V</b>
<b>Asparagin-91</b>	→ <b>Aspartat</b>	<b>N91D</b>
<b>Tyrosin-96</b>	→ <b>Phenylalanin</b>	<b>Y96F</b>
<b>Glutamin-114</b>	→ <b>Glutamat</b>	<b>Q114E</b>
<b>Threonin-125</b>	→ <b>Valin</b>	<b>T125V</b>
<b>Glutamat-133</b>	→ <b>Glutamin</b>	<b>E133Q</b>

Darüber hinaus wurden noch die letzten drei, am C-terminalen Ende befindlichen Glutamatreste deletiert. Es wurde spekuliert, dass diese möglicherweise an einer Bindung eines sogenannten „basischen Clusters“ im C-terminalen Peptid der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 beteiligt sein könnten und damit zur spezifischen Erkennung des Substrats durch HycI beitragen.



**Abbildung 16: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Reifungsproteasen ausgewählter Organismen.** Rote Sterne kennzeichnen die Reste der Metallbindestelle, grüne Sterne Reste mit gleicher Ladung. Identische Reste sind durch gelbe Kästen markiert.

Die Konstruktion der entsprechenden HycI-Varianten erfolgte wie unter C.I.1. beschrieben.

## **1. Charakterisierung der HycI-Varianten auf Substratbindung und Katalyse**

### **a) Gasbildung und enzymatische Aktivität der Hydrogenasen 1, 2 und 3**

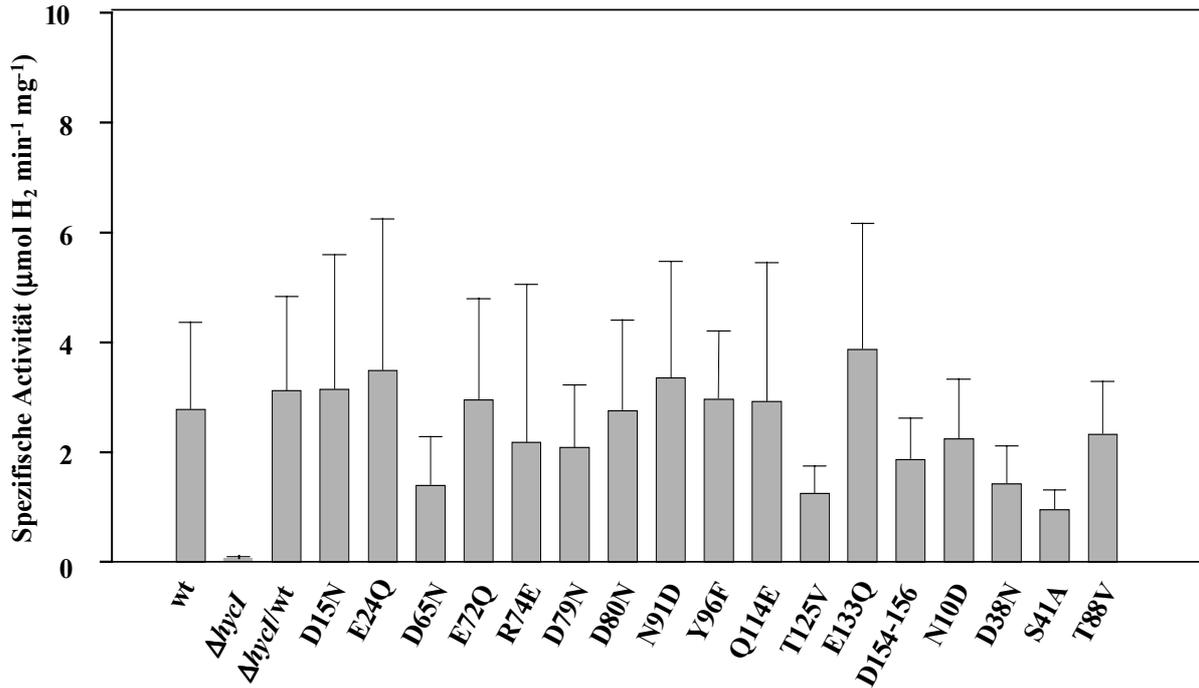
Tabelle 6 fasst die im Test auf die Gasbildungsfähigkeit der entsprechenden HycI-Varianten erhaltenen Ergebnisse zusammen und zeigt, dass erstaunlicherweise keine der eingeführten Mutationen größere Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms hat. In der nachfolgend durchgeführten genaueren Aktivitätsbestimmung waren zwischen den einzelnen Mutanten zwar Unterschiede in der Gesamtaktivität zu bemerken, welche jedoch nicht gravierend waren (Abbildung 17). Lediglich vier Austausche zeigten etwas stärkere Auswirkungen, die Austausche von Aspartat-68 gegen Asparagin, von Serin-41 gegen Alanin, von Aspartat-65 gegen Asparagin und von Threonin-125 gegen Valin. Ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Effekt auf die Aktivität handelt, bleibt noch offen.

Die Messung der Formiatdehydrogenase H-Aktivität ergab zwischen den Mutanten die gleichen Unterschiede wie die Bestimmung der Hydrogenaseaktivität, allein die Messwerte selbst waren aus den unter C.I.2b) genannten Gründen insgesamt höher (Daten nicht gezeigt). Um auch hier die vorhandene Prozessierungsaktivität der HycI-Varianten direkt an der Prozessierung des Substrats nachzuweisen, wurden Immunoblotanalysen mit  $\alpha$ -HycE-Antikörpern durchgeführt.

**Tabelle 6: Gasbildung in den die mutanten Hycl-Formen tragenden Transformanten**

<b>Stämme/Transformanten</b>	<b>Gasbildung</b>
MC4100	++++
HD709	-
HD709/pUI-2	++++
HD709/pUID15N	++++
HD709/pUIE24Q	++++
HD709/pUID65N	++++
HD709/pUIE72Q	++++
HD709/pUIR74E	++++
HD709/pUID79N	++++
HD709/pUID80N	++++
HD709/pUIN91D	++++
HD709/pUIY96F	++++
HD709/pUIQ114E	++++
HD709/pUIT125V	++++
HD709/pUIE133Q	++++
HD709/pUID154-156	++++
HD709/pUIN10D	++++
HD709/pUID38N	++++
HD709/pUIS41A	++++
HD709/pUIT88V	++++

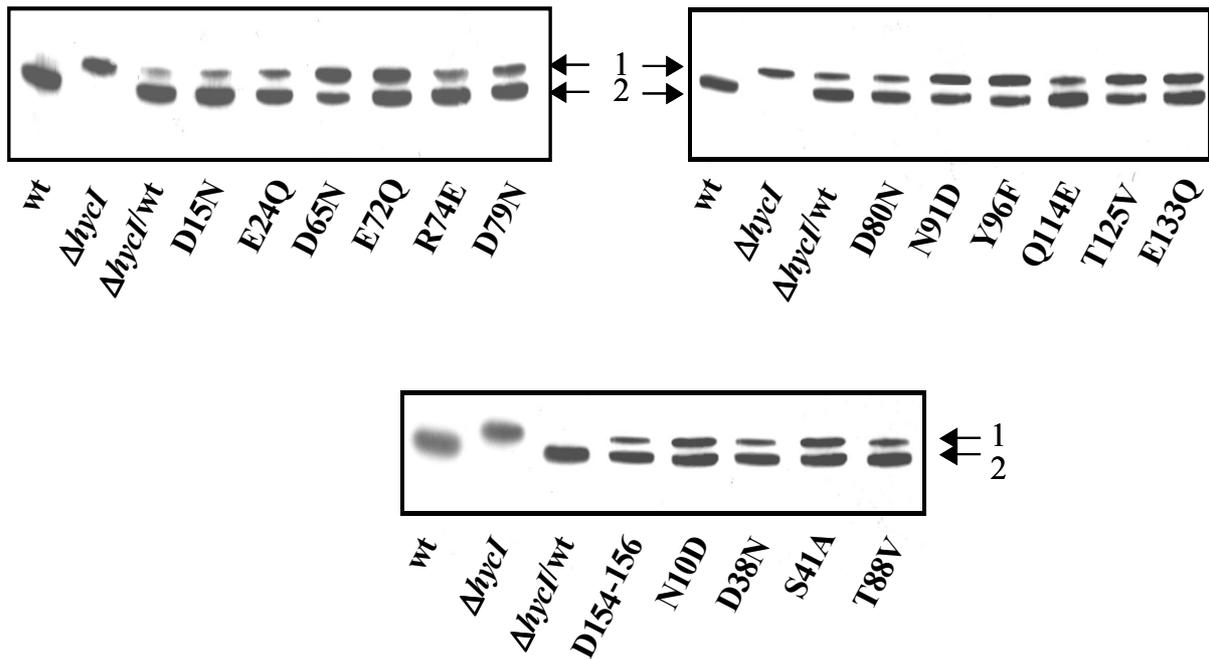
- kein Gas; ++++ viel Gas



**Abbildung 17: Hydrogenaseaktivität der die HycI-Varianten tragenden Transformanten.** Die Säulen stellen die Mittelwerte von sechs unabhängigen Messungen dar, die eingezeichneten Balken geben die Standardabweichung wieder. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt) und HD709 ( $\Delta hycI$ ) sowie die Transformante HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ).

### b) Prozessierung von prä-HycE

Die Ergebnisse der Immunoblotanalysen sind in Abbildung 18 wiedergegeben. Wie aus den Aktivitätsbestimmungen zu erwarten, liegt die große Untereinheit der Hydrogenase 3, unter Berücksichtigung des bereits angesprochenen stöchiometrischen Missverhältnisses, das sich aus der Benutzung eines Plasmidsystems ergibt, in allen Mutanten prozessiert vor.

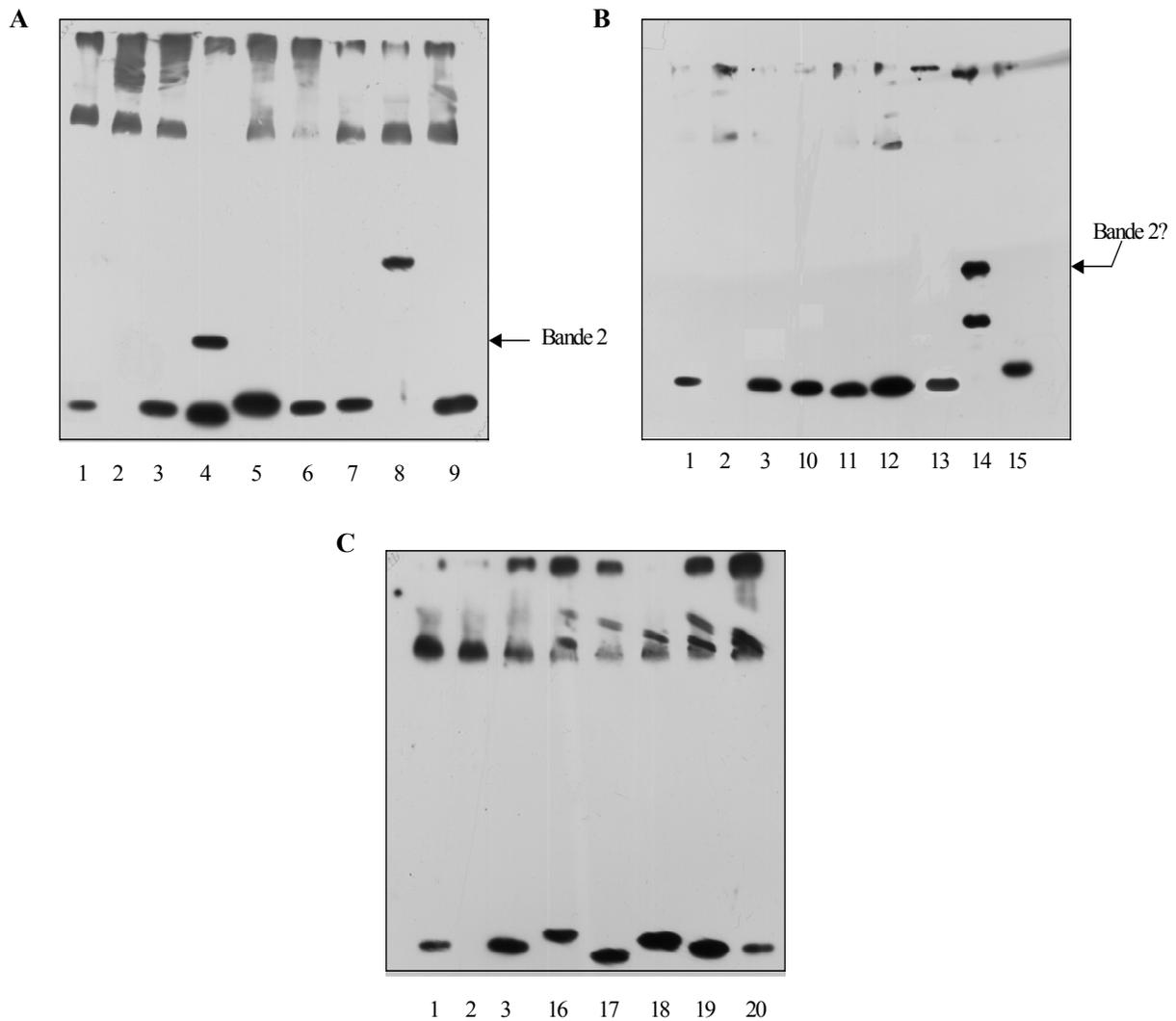


**Abbildung 18: Immunologische Untersuchung der Reifung von HycE in den HycI-Varianten tragenden Transformanten.** Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt) und HD709 ( $\Delta hycI$ ) sowie die Transformante HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ). Die beiden Pfeile kennzeichnen jeweils die unprozessierte (Pfeil 1) bzw. prozessierte (Pfeil 2) Form von HycE.

Eine Beteiligung eines dieser Reste an der Reaktion der Endopeptidase kann damit ausgeschlossen werden, da in einem solchen Fall, der durch Elektronenverschiebungen gekennzeichnet ist, ein stärkerer Effekt des Austausches erwartet werden müsste. Eine mögliche Rolle in der Substratbindung kann jedoch nicht eindeutig von der Hand gewiesen werden, da diese sicherlich von mehr als einem Rest abhängig ist. Die Immunoblotanalysen zeigten keine auffallenden Unterschiede in der Prozessierungsaktivität der verschiedenen HycI-Varianten, wenn auch die Aktivitätsmessungen einige Mutanten als weniger aktiv auswiesen. In den folgenden immunologischen Untersuchungen sollte deshalb das Laufverhalten der verschiedenen HycI-Varianten im nicht-denaturierenden Gelsystem studiert werden. Ein drastisch verändertes Wanderungsverhalten der entsprechend weniger aktiven Proteasevarianten könnte ein Hinweis auf einen strukturellen Defekt liefern.

## 2. Wanderungsverhalten der HycI-Varianten im nicht-denaturierenden Gelsystem

Abbildung 19 zeigt das Laufverhalten der verschiedenen HycI-Varianten nach Auftrennung und Blotten von Rohextrakten der entsprechenden anaerob angezogenen Transformanten unter nicht-denaturierenden Bedingungen und Detektion der HycI-Signale unter Verwendung von HycI-Antikörpern. In den meisten Fällen ist, wenn überhaupt, nur ein leicht verschobenes Laufverhalten zur Wildtypform zu beobachten. Dies wird mit Sicherheit in erster Linie von der durch die eingeführte Mutation bedingten Ladungsverschiebung abhängen und nur zweitrangig die Folge einer möglichen Konformationsänderung darstellen. Wenn bei gleichen Austauschen an unterschiedlichen Stellen manchmal ein etwas voneinander abweichendes Laufverhalten zu verzeichnen ist, muss es wohl strukturellen Unterschieden zugeschrieben werden (Vergleich der Aspartat nach Asparagin-Austausche: D15N, Abb. 18A (4) und D38N, Abb. 18C (18) mit D65N (6) und D79N (9) in Abb. 18A, sowie D80N, Abb. 18B (10); der Asparagin nach Aspartat-Austausche: N91D, Abb. 18B (11) mit N10D, Abb. 18C (17) und der Glutamat nach Glutamin-Austausche untereinander: E24Q (5) und E72Q (7) in Abb. 18A mit E133Q, Abb. 18B (15)). Lediglich in drei Fällen ist ein stark abweichendes Laufmuster bzw. sogar das Auftauchen zweier unterschiedlicher HycI-Formen in ein und derselben Probe zu erkennen. So in der Variante D15N, deren langsamer wandernde HycI-Bande jener in den vorher aufgeführten Varianten D16N und H90Q entspricht. Diese Form ist auch in Wildtypzellen zu beobachten (Magalon et al., 2001) und deshalb möglicherweise ein natürlich vorkommendes Reifungs-Intermediat. Ebenfalls zwei unterschiedliche Konformere sind im Fall der Variante T125V ( Abb. 18B (14)) zu beobachten. Die langsamer wandernde Bande weist dabei zu der schneller wandernden den gleichen Abstand auf wie die Bande 2 der Varianten D15N, D16N und H90Q; das ganze Laufmuster scheint nur etwas nach oben verschoben worden zu sein und wird seine Ursache sicherlich in einer Kombination aus Ladungs- und Konformationsänderung haben. Anders dagegen die Variante R74E ( Abb. 18A (8)), welche nur eine einzige, sehr langsam wandernde HycI-Bande liefert. Die Ladungsänderung ist dabei nicht gravierend, das aberrante Laufverhalten ist in diesem Fall wohl durch eine Konformationsänderung bedingt.



**Abbildung 19: Wanderungsverhalten der HycI-Varianten D15N (4), E24Q (5), D65N (6), E72Q (7), R74E (8), D79N (9), D80N (10), N91D (11), Y96F (12), Q114E (13), T125V (14), E133Q (15), D154-156 (16), N10D (17), D38N (18), S41A (19), T88V (20) im nicht-denaturierenden Gelsystem.** Als Kontrollen dienten MC4100 (1), HD709 (2) und HD709/pUI-2 (3).

Insgesamt konnte keine Korrelation zwischen den Abweichungen im Laufverhalten der mutanten HycI-Formen und den gemessenen Aktivitätsunterschieden erkannt werden. Darüber hinaus waren auch keine Komplexe mit anderen Proteinen zu beobachten (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden muss, dass die eingeführten Mutationen trotz teilweise starker Konformationsänderungen der resultierenden Proteasevarianten zu keiner größeren Beeinflussung der Substratbindung und der Aktivität des Enzyms führten.

Aus Sequenzvergleichen konnte somit leider kein Schluss auf die Beteiligung bestimmter Aminosäurereste an der Spaltungsreaktion gezogen werden. Auch die Frage nach der Substratbindung bleibt weiterhin offen. Auf direktem Wege war das Problem also nicht zu lösen, doch möglicherweise konnte auf indirekte Art über die Suche nach Suppressormutanten dem Ziel nähergekommen werden. Zu diesem Zweck war es jedoch nötig, zuerst inaktive, unprozessierte Substratvarianten zu konstruieren. Aus diesem Grund folgte zuerst eine detaillierte Mutationsanalyse der Schnittstellenregion von HycE.

### **III. Mutationsanalyse der C-terminalen Spaltung von prä-HycE**

Die C-terminale Spaltstelle der großen Untereinheit verschiedener [NiFe]-Hydrogenasen (Abbildung 20) weist eine gewisse Konserviertheit des Ladungsmusters der Aminosäuren auf. Der am reifen Enzym verbleibende Rest ist immer basisch, in den allermeisten Fällen ein Histidin, während der mit dem C-Terminus abgespaltene Rest meistens unpolar ist. Dies könnte auf eine Funktion dieser Reste bei der Erkennung durch die Protease oder sogar auf eine mögliche Beteiligung an der Spaltreaktion selbst hindeuten. Bereits in früheren Mutagenesestudien (Mintz-Weber, 1996) an HycE konnte gezeigt werden, dass der Austausch des C-terminal gelegenen Restes der Schnittstelle, Methionin, gegen ein Glutamat in einer inaktiven Mutante resultierte, während der Austausch Methionin gegen Leucin und der Austausch des N-terminalen Schnittstellenrestes Arginin gegen Histidin keinen Einfluß hatten. Um die Bedeutung der Aminosäurereste der Schnittstelle genauer zu erfassen, sollten deshalb neben der ausführlichen Charakterisierung dieser bereits vorhandenen Mutanten weitere Substitutionen durchgeführt werden.

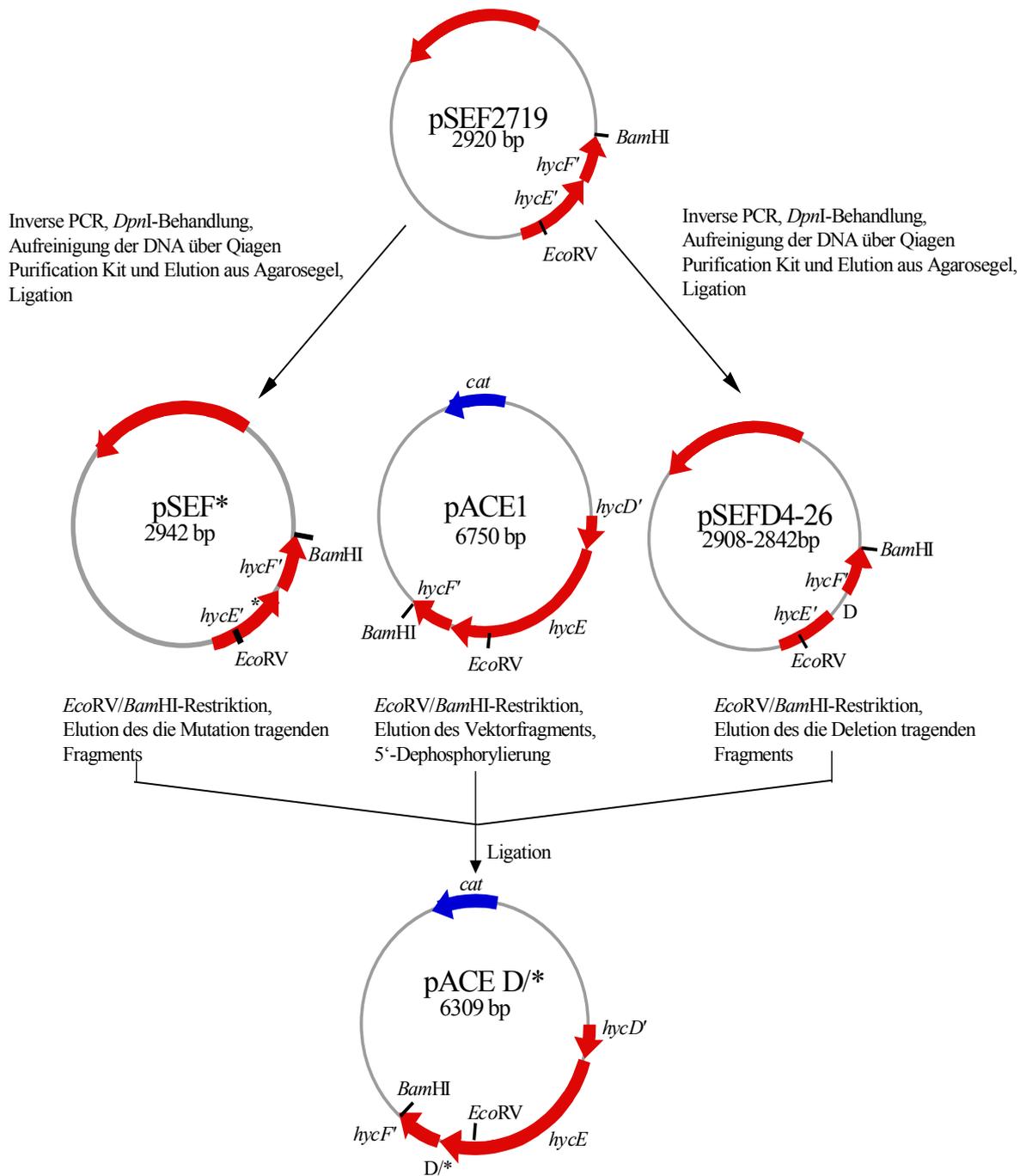
			↓	
EC	HycE	--	LDPCYSCTDR	<b>MTVVDVRKKKSKVVPYKELERYSIERKNSPLK</b>
EC	HyaB	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VLGDDGSELISVQVR</b>
EC	HybC	--	FDP <b>CMACAVH</b>	<b>VVDADGNEVVSVKVL</b>
RE	HoxG	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VMSAEGQELTTVKVR</b>
RE	HoxH	--	YDPCLSCAT <b>H</b>	<b>ALGQMPLVVSVFDAAGRLIDERAR</b>
AC	HoxG	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VMSPDGQELTRVKVR</b>
AV	HoxG	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VMSPDGQELTRVKVR</b>
BJ	HupL	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VMSPDGQELAKVKVR</b>
RL	HupL	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VMSPDGQEMARVQVR</b>
RC	HupL	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VMSAEGAPLTTVKVR</b>
RG	HupL	--	FDPCLACST <b>H</b>	<b>VMSEDGRELTTVKVR</b>
DB	HupL	--	YDPULGCAV <b>H</b>	<b>VLHAETGEEHVVNID</b>
WS	HydB	--	FDP <b>CIACAVH</b>	<b>VMDTKGNELSQYRVDPITVGCNL</b>
MM	VhoA	--	YDP <b>CI</b> SCAV <b>H</b>	<b>TIDLTKGKCAPNTRLRIL</b>
MV	VhcA	--	YDPCLSCAT <b>H</b>	<b>TIGEEPKILSIHVQCQGGKLIKTL</b>
MV	FrcA	--	YDPCVSCAT <b>Q</b>	<b>HDILRL</b>
MF	MvhA	--	YDPCLSCAT <b>H</b>	<b>TVDGKVKLFTLEVLDSEGNVVKRL</b>
PF	HydA	--	YDP <b>CI</b> SCSV <b>H</b>	<b>VVRL</b>

**Abbildung 20: Sequenzvergleich der Schnittstellen einer Auswahl von C-Termini der Vorläufer großer Untereinheiten von [NiFe]- und [NiFeSe]-Hydrogenasen.** Der Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle durch die Protease; die beiden Schnittstellenreste sind fettgedruckt. EC (*Escherichia coli*) (Böhm et al., 1990; Menon et al., 1990b; Menon et al., 1994b), RE (*Ralstonia eutropha*) (Tran-Betcke et al., 1990; Kortlüke et al., 1992), AC (*Azotobacter chroococcum*) (Ford et al., 1990), AV (*Azotobacter vinelandii*) (Menon et al., 1990a), BJ (*Bradyrhizobium japonicum*) (Sayavedra-Soto et al., 1988), RL (*Rhizobium leguminosarum*) (Schneider et al., 1990), RC (*Rhodobacter capsulatus*) (Leclerc et al., 1988), RG (*Rhodocyclus gelatinosus*) (Uffen et al., 1990), DB (*Desulfovibrio baculatus*) (Li et al., 1987), WS (*Wolinella succinogenes*) (Dross et al., 1992), MM (*Methanosarcina mazei*) (Deppenmeier et al., 1995), MV (*Methanococcus voltae*) (Halboth & Klein, 1992), MF (*Methanococcus fervidus*) (Steigerwald et al., 1990), PF (*Pyrococcus furiosus*) (Pedroni et al., 1995).

## 1. Einführen von Mutationen in die Schnittstellenregion von HycE

Die Mutagenisierung der Schnittstellenregion von HycE erfolgte mit Hilfe der inversen PCR unter Verwendung des Plasmids pSEF2719, welches ein 593 bp großes Fragment trägt, das das 3'-Ende von *hycE* und das 5'-Ende von *hycF* beinhaltet. Die gewünschten Mutationen wurden mittels der Primer hycERD, hycERL, hycERK, hycERE, hycERI, hycERA und dem dazugehörigen Gegenprimer hycEGR bzw. der Primer hycEMD, hycEMK, hycEMA, hycEMR, hycEMH und dem Gegenprimer hycEGM eingeführt. Nach entsprechender Weiterbehandlung der PCR-Produkte, Religation und Transfer in den Stamm DH5 $\alpha$  erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA aus den erhaltenen Klonen und die Sequenzüberprüfung des später umzuklonierenden, die entsprechende Mutation tragenden Bereichs von *hycE*. Die korrekten Plasmide wurden alsdann einer *Bam*HI/*Eco*RV-Restriktion unterzogen und die die jeweilige Mutation tragenden Fragmente in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pACE-1 umkloniert. Dieser enthält das gesamte *hycE*-Gen sowie das 3'-Ende von *hycD* und das 5'-Ende von *hycF*, was insgesamt ein Fragment mit einer Größe von 2506 bp ausmacht (siehe Tabelle 2). Die Insert- und Vektorfragmente wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Der Vektor wurde überdies dephosphoryliert. Nach erfolgter Vektor-Insert-Ligation und Transfer in den Stamm DH5 $\alpha$  wurden die Plasmide der erhaltenen Klone noch einmal über *Bam*HI/*Eco*RV-Restriktion sowie Sequenzierung der umklonierten Region auf die Richtigkeit der eingeführten Mutationen hin überprüft. Die nähere Untersuchung der so entstandenen Varianten erfolgte dann, wie im Falle der HycI-Mutanten durch Transfer der entsprechenden Plasmide in den  $\Delta$ *hycE*-Stamm HD705. Die genaue Klonierungsstrategie ist in Abbildung 21 zusammengefasst.

Auf diese Art und Weise wurden die Reste der Schnittstellenregion von HycE, Arginin und Methionin, gegen diverse andere Aminosäuren ausgetauscht. Es entstanden, neben den bereits vorhandenen Austausch, HycE-Varianten, welche an Stelle des Arginins ein Aspartat, Leucin, Lysin, Glutamat, Isoleucin oder Alanin tragen sowie solche, deren Methionin durch ein Aspartat, Lysin, Alanin, Arginin oder Histidin ersetzt ist.



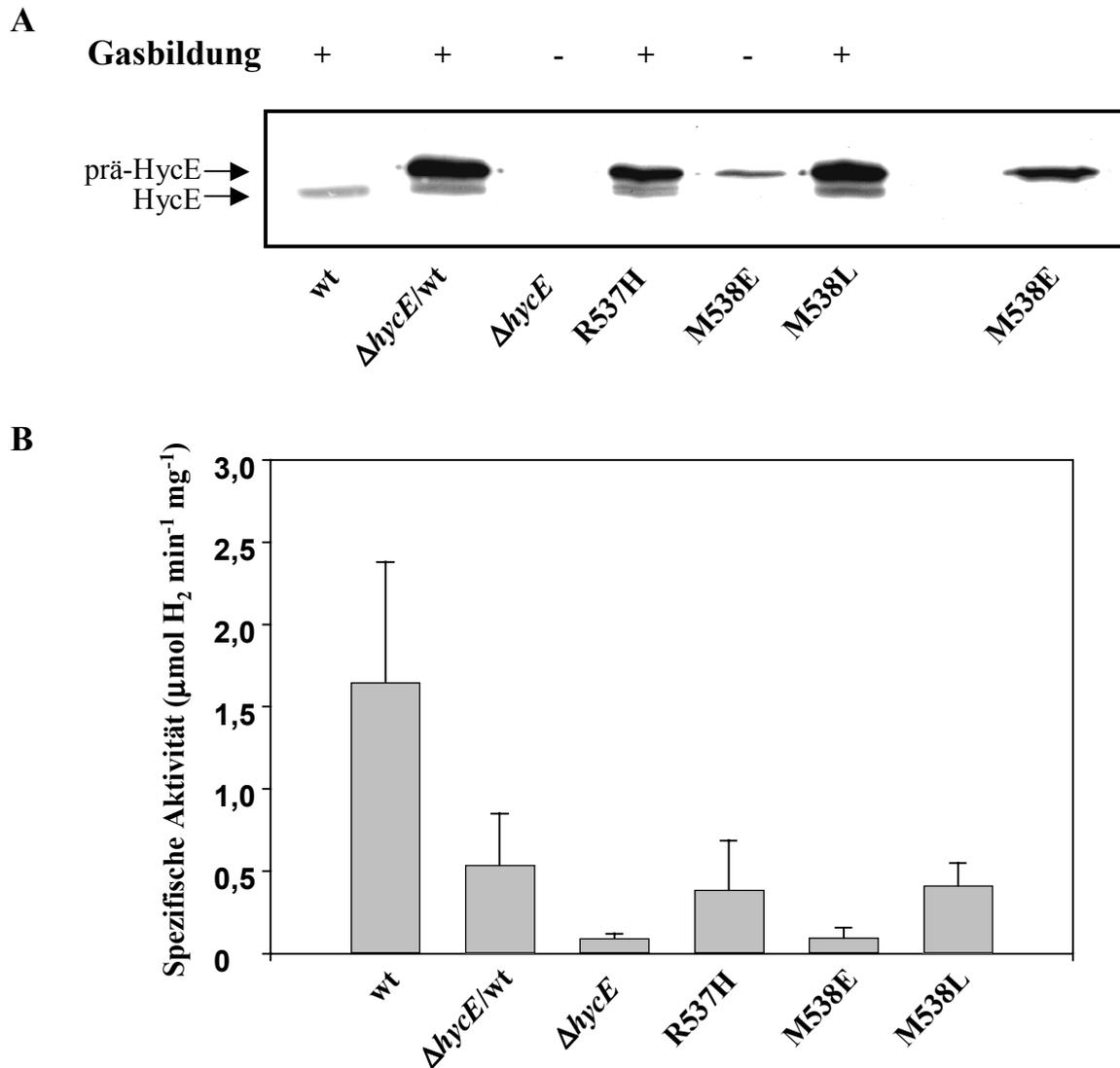
**Abbildung 21: Klonierungsstrategie für die Einführung von Mutationen/Deletionen in *hycE*.** D symbolisiert Deletionen, \* symbolisiert Mutationen.

*cat*: Chloramphenicoltransacetylase.

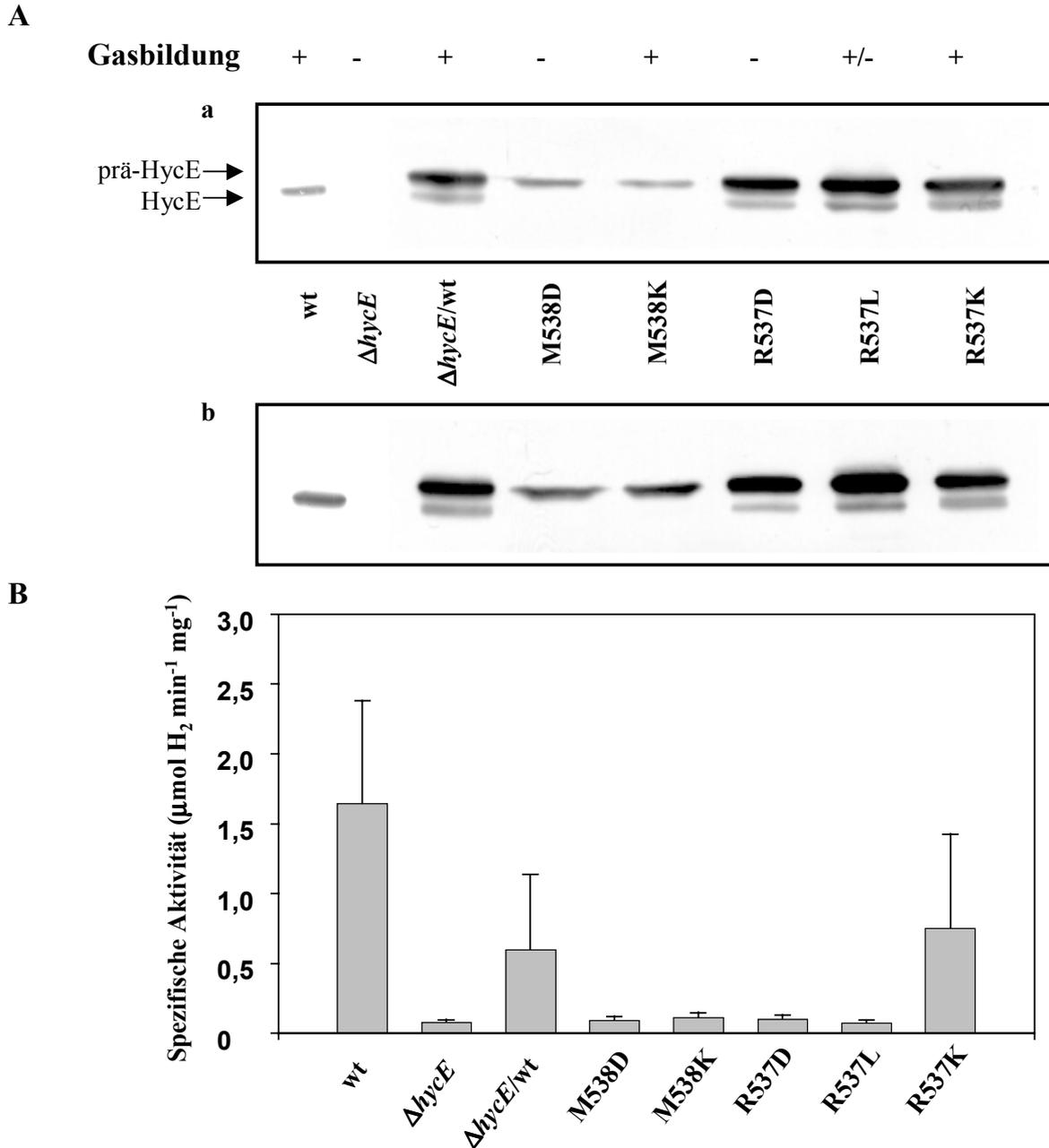
## **2. Gasbildung, Hydrogenaseaktivität und Prozessierbarkeit der konstruierten HycE-Varianten**

Die aus der Mutagenese von HycE entstandenen Transformanten von HD705 und die bereits vorhandenen Mutanten HD705/pR537H, HD705/pM538E und HD705/pM538L wurden zuerst auf ihre Enzym-Aktivität und die prä-HycE-Prozessierbarkeit hin untersucht. Dabei ist zu erwähnen, dass auch in diesem Testsystem die Prozessierung von HycE ebenfalls nur unvollständig erfolgt. Im Vergleich zum Wildtyp MC4100 macht der Anteilprozessierten HycE-Proteins in HD705/pACE-1 nur 20-30 % des Gesamtproteins aus und im Aktivitätstest werden nur etwa 60 % der Wildtypaktivität erreicht.

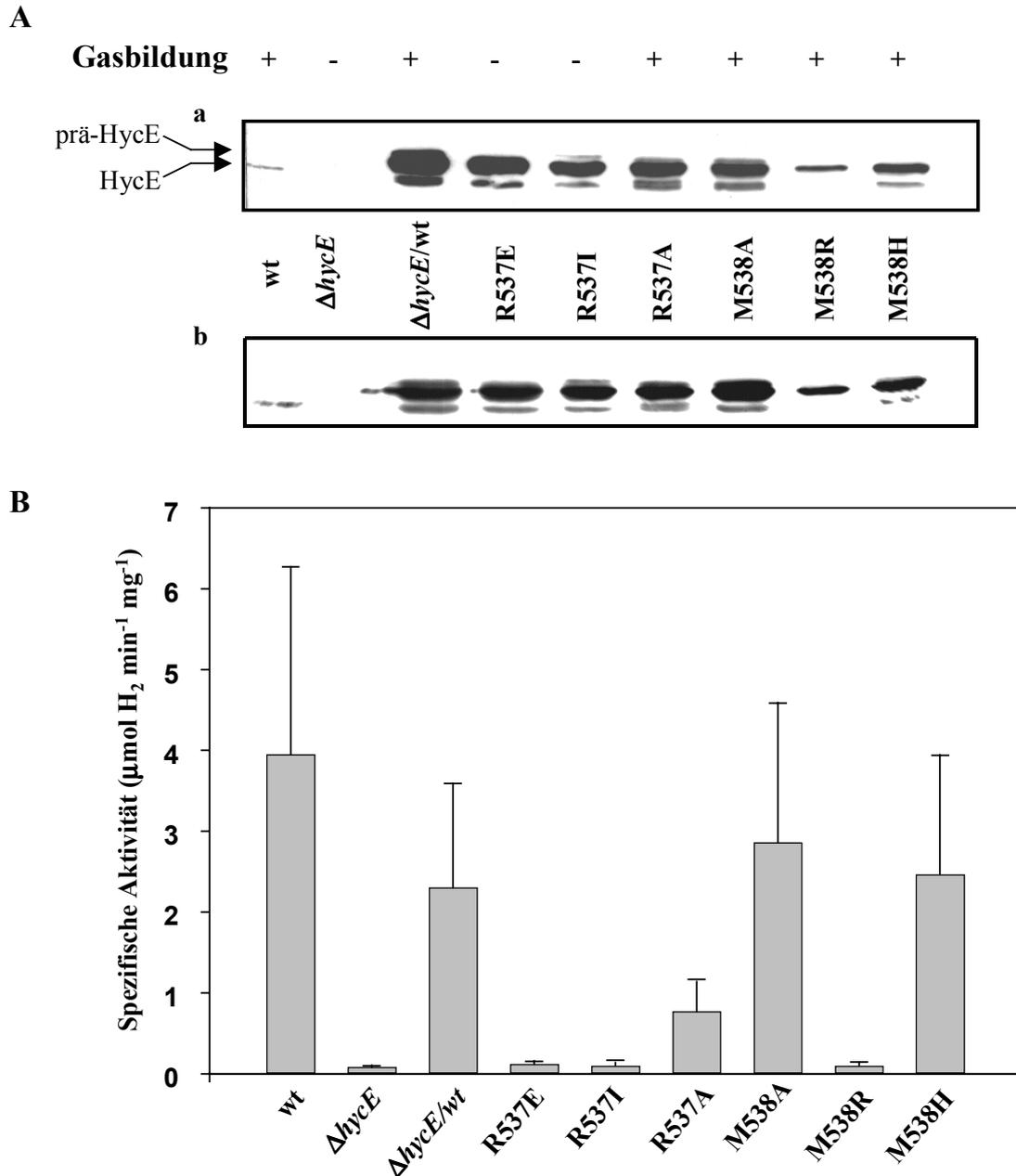
Abbildungen 22, 23 und 24 zeigen die erhaltenen Ergebnisse. Dabei ist als erstes zu bemerken, dass alle Austausche der Schnittstellenreste gegen entsprechend ladungsgleiche Aminosäuren keinen Einfluss auf die Aktivität und Prozessierung der großen Untereinheit haben. So liegen die Aktivitätswerte der Varianten R537K, R537H, M538A und M538L sowie das Ausmaß ihrer Prozessierung im gleichen Bereich wie die des Wildtyps HD705/pACE-1. Ein verschiedenes Ergebnis wird jedoch bei der Einführung chemisch unähnlicher Aminosäuren erhalten. Der Austausch des Arginins der Schnittstelle hat zwar in diesem Fall keine Auswirkungen auf die Prozessierbarkeit der entsprechenden HycE-Varianten, nicht alle reifen Proteine sind jedoch noch aktiv. So resultieren alle sauren Aminosäuresubstitutionen (Varianten R537D und R537E) in vollkommen inaktiven Enzymen, während die Austausche gegen unpolare Aminosäuren kein einheitliches Bild ergeben. Der Ersatz von Arginin durch Isoleucin, zum Beispiel, führt zu einer inaktiven Mutante (R537I), während der Austausch gegen Alanin eine Variante hervorbringt (R537A), die etwa noch 50 % der Aktivität des Wildtyps aufweist. Die Substitution von Arginin gegen Leucin schließlich ergibt zwar eine noch geringfügig gasbildende Mutante (R537L), deren Aktivität jedoch im Enzymtest nicht mehr messbar ist. Im Falle der unpolaren Aminosäuren scheint also die Größe der aliphatischen Seitenkette für die Aktivität des Enzyms eine entscheidende Rolle zu spielen.



**Abbildung 22: Charakterisierung von HycE-Varianten mit Mutationen in der Schnittstellenregion.** (A) Gasbildung und Prozessierung von prä-HycE. (B) Hydrogenaseaktivität. Die Fähigkeit der jeweiligen Mutanten zur Gasbildung ist über dem Immunoblot angegeben. In der letzten Spur des Immunoblots ist die fünffache Menge an Extrakt der Transformante mit der HycE-Varianten M538E aufgetragen. Die Säulen des Diagramms geben die Durchschnittswerte von sechs unabhängigen Messungen wieder, die Balken stellen die Standardabweichungen dar. Als Kontrollen dienen die Stämme MC4100 (wt) und HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie die Transformante HD705/pACE-1 ( $\Delta hycE/wt$ ). + Gas; - kein Gas.



**Abbildung 23: Charakterisierung von HycE-Varianten mit Mutationen in der Schnittstellenregion.** (A) Gasbildung und Prozessierung von prä-HycE. (B) Hydrogenaseaktivität. Die Fähigkeit der jeweiligen Mutanten zur Gasbildung ist über den Immunoblots angegeben. Die beiden Chemoluminogramme sind identisch, lediglich die Menge aufgetragenen Proteins wurde in Blot b im Falle von MC4100 (wt), M538D und M538K verdreifacht. Die Säulen des Diagramms geben die Durchschnittswerte von sechs unabhängigen Messungen wieder, die Balken stellen die Standardabweichungen dar. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt) und HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie die Transformante HD705/pACE-1 ( $\Delta hycE/wt$ ). + Gas; - kein Gas; +/- geringfügige Gasbildung.



**Abbildung 24: Gasbildung, Prozessierbarkeit und Aktivität von HycE-Varianten mit Mutationen in der Schnittstellenregion. (A)** Gasbildung und Prozessierung von prä-HycE. **(B)** Hydrogenaseaktivität. Die Fähigkeit der jeweiligen Mutanten zur Gasbildung ist über den Immunoblots angegeben. Die beiden Chemoluminogramme sind identisch, lediglich die Menge aufgetragenen Proteins wurde in Blot b im Falle von M538R verdreifacht. Die Säulen des Diagramms geben die Durchschnittswerte von sechs unabhängigen Messungen wieder, die Balken stellen die Standardabweichungen dar. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 (wt) und HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie die Transformante HD705/pACE-1 ( $\Delta hycE/wt$ ). + Gas; - kein Gas.

Der Ersatz des C-terminalen Schnittstellenrestes Methionin wiederum zeigt bei Austausch gegen ladungsungleiche Aminosäuren ein völlig anderes Bild. So führt die Substitution gegen saure Reste (Varianten M538D und M538E) ebenfalls zu vollkommen inaktiven Mutanten, deren HycE-Protein jedoch in wesentlich geringerer Menge vorliegt. Aufgrund dieser Tatsache kann zwar aus den Immunoblots selbst bei einer größeren Auftragsmenge nicht eindeutig festgestellt werden, ob eine Prozessierung stattfindet, da eine potentielle Prozessierung jedoch in einem intakten, reifen Wildtyp-HycE resultieren würde, muss aufgrund der fehlenden Aktivität die große Untereinheit unprozessiert vorliegen. Die geringe Proteinmenge in den Zellen ist dabei für die Unfähigkeit zur Gasbildung nicht verantwortlich, da die Varianten M538R sowie M538K, welche an Stelle des Methionins ein Arginin bzw. Lysin tragen und deren HycE-Protein ebenfalls in geringer Menge vorhanden ist, *in vivo* normale Aktivität besitzen; diese HycE-Proteine sollten also, wenn auch aus den Immunoblots nicht ersichtlich, prozessiert vorliegen. Allerdings war in den durchgeführten Enzymtests keine Aktivität messbar.

Um sicherzugehen, dass die beobachtete Gasbildung keine andere Ursache hat, wurden die entsprechenden Plasmide in den proteasenegativen Stamm HD709 transformiert. Sollte die beobachtete Gasbildung ein prozessiertes HycE-Protein zur Voraussetzung haben, so darf in den HD709-Transformanten keine Gasbildung mehr erfolgen. Als Kontrollen dienten neben dem Wildtyp MC4100, HD705/pACE-1 und HD709 die Transformanten HD709/pACE-1, HD709/pM538E, HD709/pM538L und HD709/pM538H. Um einen möglicherweise störenden Effekt des Wildtyp-HycE-Proteins in HD709 auszuschließen, wurden die betreffenden Plasmide darüber hinaus in den Stamm  $\Delta$ hycEI transformiert, dem sowohl HycE als auch die Protease HycI fehlt. Die Konstruktion dieses Stammes erfolgte dabei über Transformation des Plasmids pMSD705 in HD709 und nachfolgender Anwendung der Hamilton-Methode zur Einführung von Deletionen in das Chromosom. Die sich auf der Grundlage der PCR- und Restriktionsanalyse als richtig erwiesenen Klone wurden dann, wie in Hamilton et al. (1989) beschrieben, einer Plasmidkurierung unterzogen und die auf diese Weise erhaltenen plasmidfreien Stämme wurden unter Verwendung der Primer hycE-5' und hycE-3', welche aus den Sequenzen des 5'- bzw. 3'-Endes des *hycE*-Gens bestehen, noch einmal über PCR auf die erfolgreiche Einführung der *hycE*-Deletion in das Chromosom hin untersucht. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Gastests.

**Tabelle 7: Überprüfung der Reifung von HycE in den Varianten M538K und M538R**

Stämme/Transformanten	Gasbildung
MC4100	++++
HD709	-
HD705/pACE-1	++++
HD709/pACE-1	-
HD709/pM538L	-
HD709/pM538E	-
HD709/pM538K	-
HD709/pM538R	-
HD709/pM538H	-
$\Delta$ hycEI/pM538L	-
$\Delta$ hycEI/pM538E	-
$\Delta$ hycEI/pM538K	-
$\Delta$ hycEI/pM538R	-
$\Delta$ hycEI/pM538H	-
$\Delta$ hycEI	-

- kein Gas; ++++ viel Gas

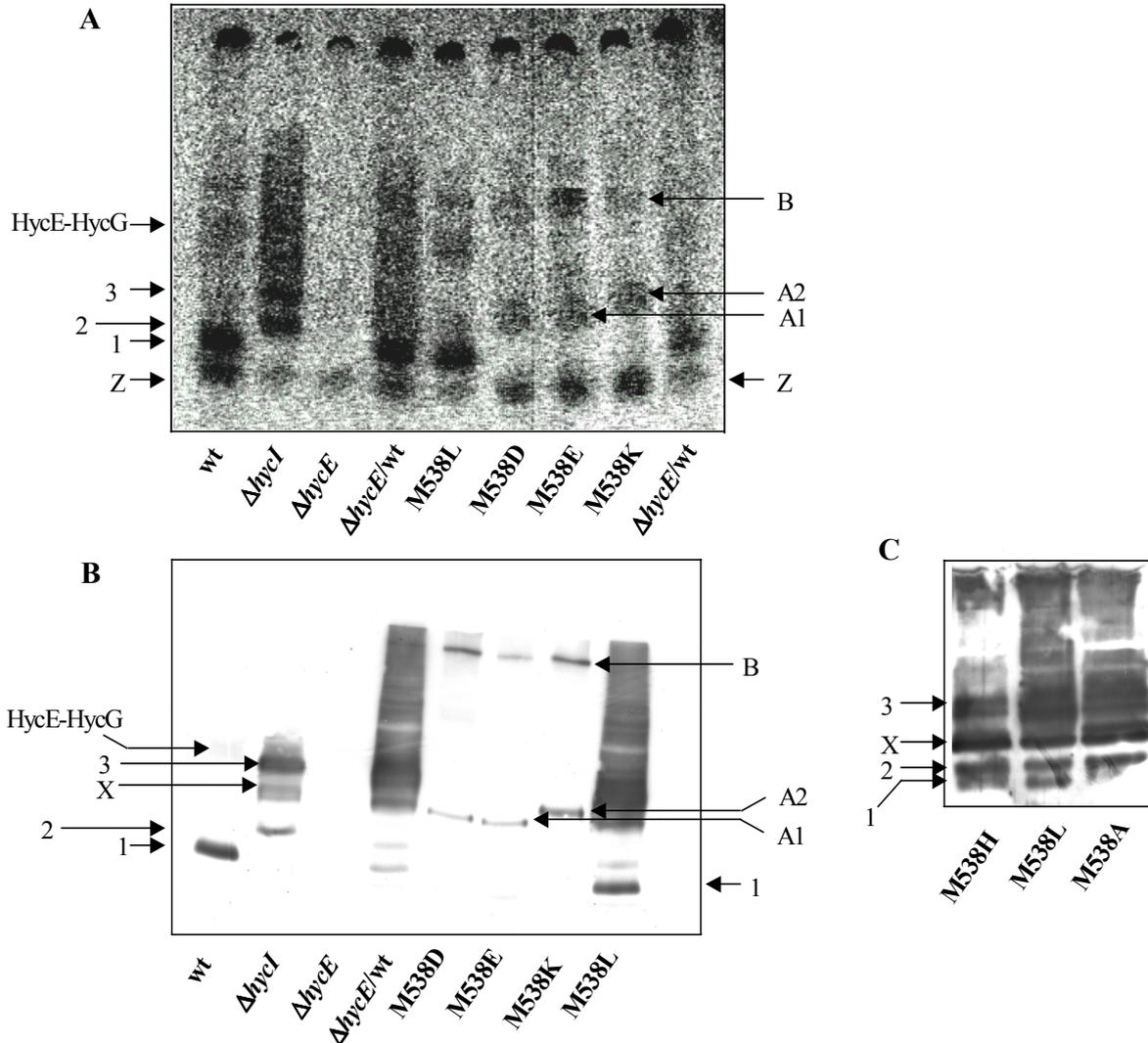
Keine der proteasenegativen Transformanten ist zur Gasbildung befähigt. Die Protease ist also auch in jenen Fällen, in denen das Enzym aktiv ist, aber immunologisch keine prozessierte Bande detektierbar ist, notwendig; eine Prozessierung muss somit stattfinden. Insgesamt scheint der Austausch des Methionins gegen chemisch unähnliche Aminosäuren das Protein zu destabilisieren. Eine Ausnahme stellt die Variante M538H dar.

Die einzigen inaktiven und unprozessierten HycE-Varianten stellen demnach M538D und M538E dar. Doch worauf beruht ihre Unprozessierbarkeit? Ist sie Folge einer Veränderung eines Erkennungsmotivs für die Protease? Der Proteinabbau deutet auf eine strukturelle Änderung des Proteins hin, die in einer Blockierung des Nickeleinbaus resultieren könnte, der ja Voraussetzung für die folgende Prozessierungsreaktion ist. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden deshalb *in vivo*  $^{63}\text{Ni}$ -Markierungen dieser Mutanten durchgeführt.

### 3. <sup>63</sup>Ni-Markierungen der Varianten M538D und M538E

Als Kontrollen wurden Extrakte der Stämme MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ), HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie der Transformanten HD705/pACE-1 ( $\Delta hycE/wt$ ), HD705/pM538L und HD705/pM538K mitgeführt. Das resultierende Autoradiogramm ist in Abbildung 25A wiedergegeben. Zur Identifizierung der beobachteten Nickelsignale wurde von denselben HycE-Varianten ein Immunoblot mit  $\alpha$ -HycE-Antikörpern angefertigt. Dieser ist in Abbildung 25B zu sehen.

Im Autoradiogramm fällt als erstes ein Signal auf (Bande Z), das in allen Spuren, auch in der des HycE-negativen Stamms HD705, auftaucht und deshalb einem anderen nickelhaltigen Enzym zugeschrieben werden muss. Möglicherweise handelt es sich dabei um die große Untereinheit einer der anderen Hydrogenasen. Sie ist die am schnellsten wandernde Bande und stellt bei HD705 die einzige erkennbare Nickelmarkierung dar. Im Extrakt des Wildtyps MC4100 ist im Autoradiogramm eine weitere, etwas langsamer laufende Bande (Bande 1) präsent. Sie stellt reifes HycE-Protein dar, da sie im entsprechenden Immunoblot (Abbildung 25B) auf gleicher Höhe mit der am stärksten mit  $\alpha$ -HycE-Antikörpern reagierenden Bande läuft. Neben der prozessierten HycE-Form ist immunologisch noch eine weitere sehr schwache Bande nachweisbar. Sie stellt den nach der Prozessierung von prä-HycE sich bildenden HycE-HycG-Komplex dar (Magalon und Böck, 2000a). Der Stamm HD709 wiederum weist mindestens zwei, noch langsamer wandernde Formen auf, von denen die eine (Bande 3) als direktes Substrat für die Protease fungiert, die andere (Bande 2) als prä-HycE-HypC-Komplex identifiziert werden konnte (Magalon und Böck, 2000b). Daneben scheint es eine dritte, bereits früher erwähnte, aber bisher nicht näher untersuchte Bande zu geben (Bande X), die eine nickelfreie prä-HycE-Form darstellt, da sie im Autoradiogramm nicht detektiert wird. Das Wildtypsystem HD705/pACE-1 zeigt bei der Nickelmarkierung erwartungsgemäß das gleiche Muster wie der Wildtyp MC4100, genauso wie die in gleicher Art und Weise prozessierte Variante M538L, im Immunoblot weist es jedoch ein anderes Laufmuster als MC4100 auf. Zwar zeigt es auch die prozessierte Form, daneben ist jedoch noch ein starker "Schmier" zu beobachten, der wohl verschiedene Reifungszwischenstufen des HycE-Proteins darstellt, die noch kein Nickel enthalten und sich aufgrund der unvollständigen Prozessierung anhäufen.



**Abbildung 25:**  $^{63}\text{Ni}$ -Markierung der Varianten M538D und M538E. **(A)** Autoradiogramm der Extrakte von  $^{63}\text{Ni}$ -markierten Zellen. In die nicht-denaturierende PAGE wurden, mit Ausnahme der Transformante HD705/pM538K, von den Kontrollextrakten eine Proteinmenge von 150  $\mu\text{g}$ , im Falle der schnell abgebauten HycE-Varianten M538K, M538D und M538E von 300  $\mu\text{g}$  aufgetragen. Als Mengenkontrolle wurde darüber hinaus 300  $\mu\text{g}$  Protein des Extrakts der Transformante HD705/pACE-1 auf eine weitere Spur des Gels aufgetragen. Die Expositionsdauer betrug 2 Monate. **(B)** Nicht-denaturierende PAGE der Extrakte von  $^{63}\text{Ni}$ -markierter Zellen mit folgender Immunoblotanalyse unter Verwendung von  $\alpha$ -HycE-Antikörpern. Die aufgetragene Proteinmenge betrug im Falle der Kontrollextrakte 50  $\mu\text{g}$ , im Fall der schnell abgebauten HycE-Varianten M538K, M538D und M538E 100  $\mu\text{g}$ . **(C)** Immunoblotanalyse von Extrakten anaerob angezogener Zellen der Transformanten mit den HycE-Varianten M538H, M538L und M538L. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 50  $\mu\text{g}$ . Die verschiedenen Banden sind im Text beschrieben.

Die mutanten HycE-Formen M538K, M538D und M538E hingegen zeigen ein ganz anderes Laufverhalten. Hier sind mindestens zwei Banden (Bande A1 bzw. A2 und B) zu beobachten, welche keinem Signal der Kontrollen entsprechen. Von der Wanderungsgeschwindigkeit gleichen sie den im Immunoblot entsprechend beschrifteten Banden. Demnach muss es sich um HycE-Konformere der betreffenden Mutanten handeln. Der Nickeleinbau in M538D und M538E ist somit nicht behindert.

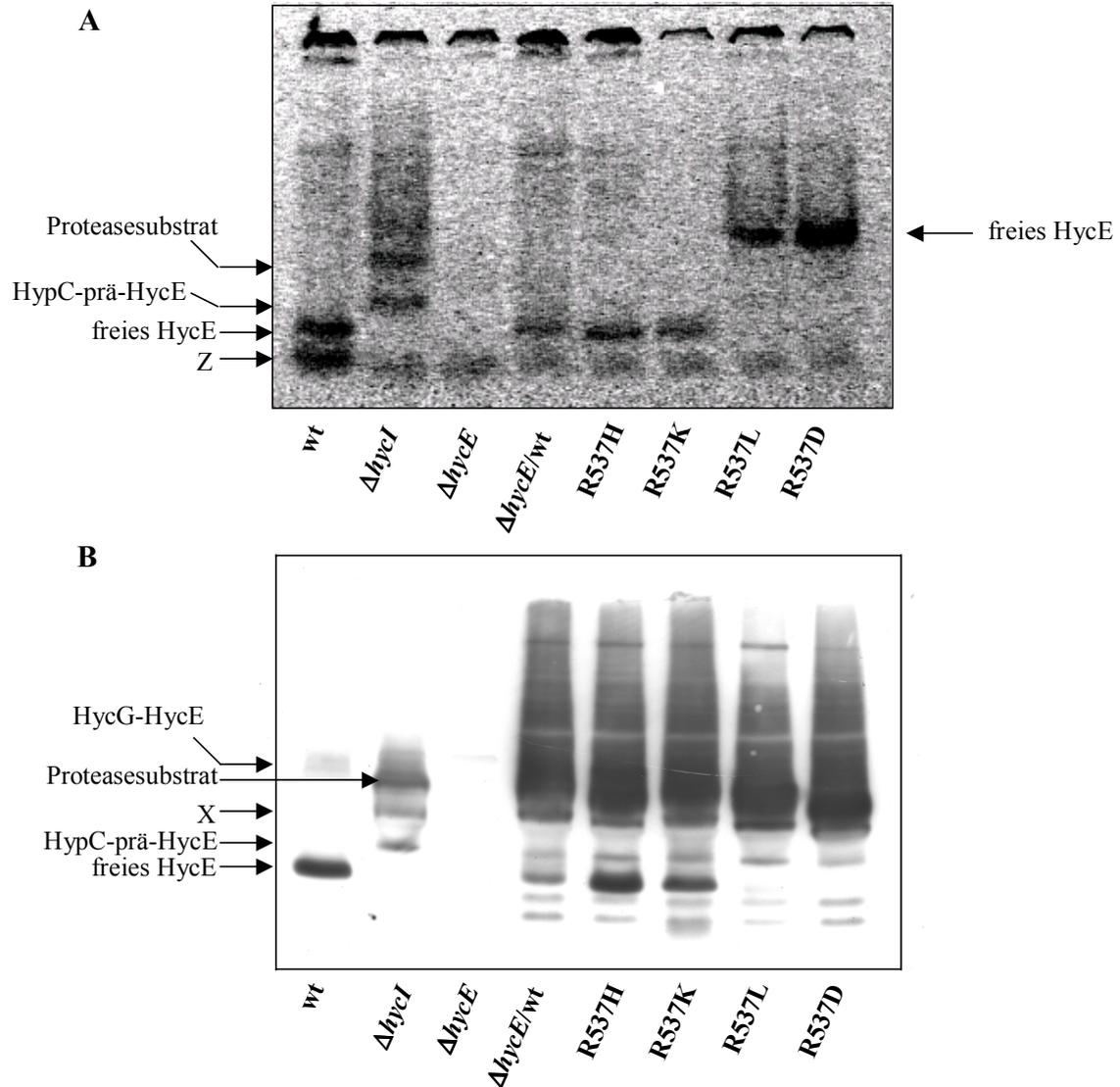
Die fehlende Prozessierbarkeit muss also auf der Veränderung eines Erkennungsmotivs für die Protease beruhen. Dabei scheint es plausibel, dass dieses Erkennungsmotiv mehr struktureller Natur ist, da die Substitution durch basische Aminosäuren nicht in unprozessierbaren Varianten resultiert.

Der Austausch des Methionin gegen Histidin hat keine Auswirkungen auf die Proteinmenge und die Prozessierbarkeit der entsprechenden Varianten und das Protein zeigt das gleiche Wanderungsverhalten wie das des Wildtyps HD705/pACE-1 und der Varianten M538L und M538A (Abb. 25C). Der Austausch des Methionin gegen geladene Aminosäuren resultiert also in den meisten Fällen in einer Konformationsänderung des Proteins, die einen raschen Proteinabbau bedingt. Das Laufmuster dieser Varianten im Immunoblot rührt dabei nicht von der erhöhten Menge aufgetragenen Extraktes her, da die gleiche Menge der Stämme HD705 und HD709 kein entsprechendes Muster zeigten (Daten nicht gezeigt). Die eingesetzten  $\alpha$ -HycE-Antikörper reagieren also spezifisch, wie auch die Spur mit aufgetragenem HD705-Extrakt beweist, und es wird auch keine Überlagerung des Signals durch Überdosierung bewirkt.

#### **4. $^{63}\text{Ni}$ -Markierungen der Varianten R537D, R537L, R537K und R537H**

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse einer identischen Markierung von Varianten mit verändertem Arginin der Schnittstelle. Es ist erkennbar, dass HycE-Varianten mit Austauschen des Arginins gegen ebenfalls basische Aminosäuren sowohl im Autoradiogramm als auch im entsprechenden Chemoluminogramm die gleichen Signale wie der Wildtyp HD705/pACE-1 zeigen. Die Varianten R537D und R537L weisen zwar, wie für eine prozessierbare große Untereinheit erwartet, eingebautes Nickel auf, legen aber aufgrund der anders geladenen Reste an der Position des Arginin ein anderes Laufverhalten an den Tag. Aus diesem Grund kann die entsprechend prozessierte HycE-Form unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Immunoblot nicht nachgewiesen werden; sie läuft im Bereich des bereits vorher erwähnten "Schmiers" und ist damit nicht als einzelne Bande

auszumachen. Das beobachtete abweichende Laufverhalten der Varianten R537D und R537L dürfte Folge einer durch die Ladungsänderung hervorgerufenen strukturellen Umlagerung des Proteins sein.

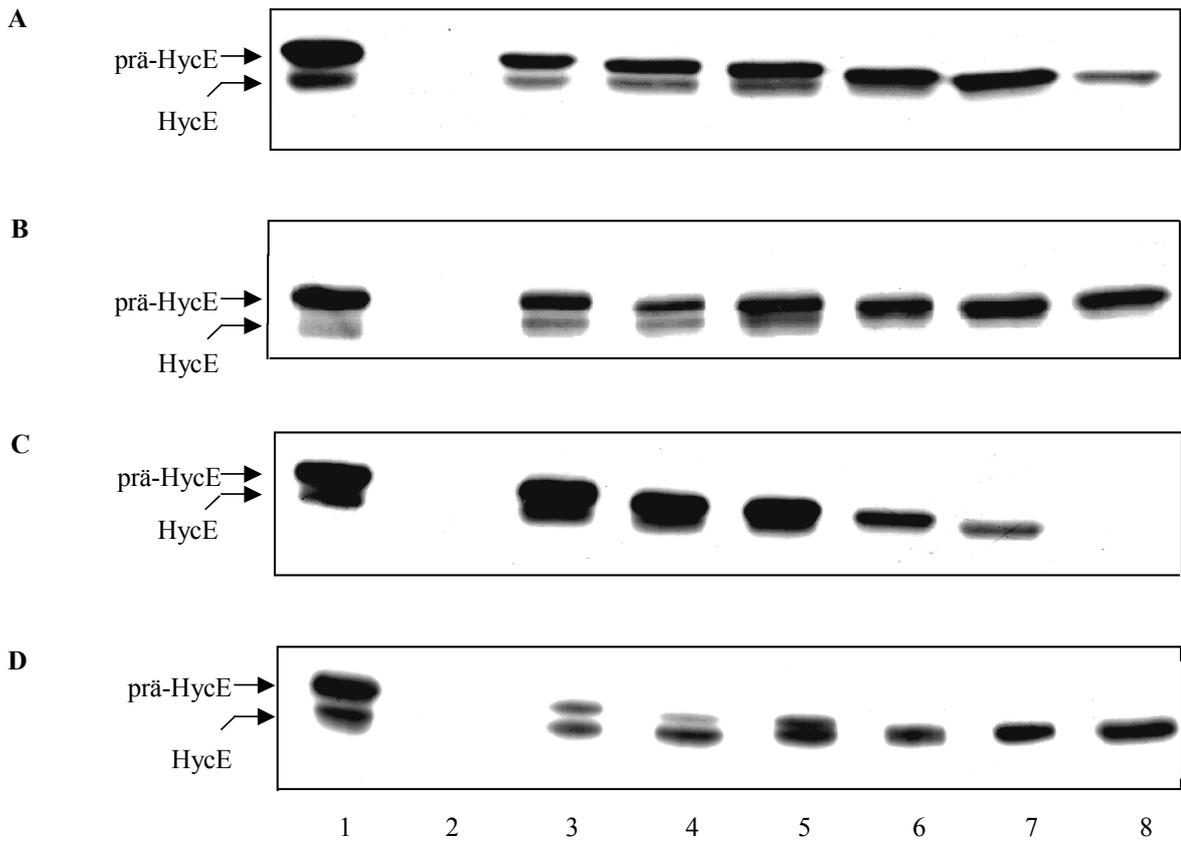


**Abbildung 26:** <sup>63</sup>Ni-Markierung der Varianten R537D, R537L, R537K und R537H. (A) Autoradiogramm von <sup>63</sup>Ni-markierten Zellen. (B) Chemoluminogramm eines mit α-HycE behandelten Immunoblots. Die praktische Durchführung erfolgte wie in den oben beschriebenen Experimenten, jedoch betrug die Expositionszeit der radioaktiv markierten Proben nur 1 Monat. Die aufgetragene Proteinmenge lag beim Radioaktivversuch bei 150 μg und bei der Immunoblotanalyse bei 50 μg.

## 5. Untersuchung der Funktion der C-terminalen Verlängerung der großen Untereinheit

Wenn der C-Terminus, wie postuliert, eine Funktion in der Erkennung des Substrats durch die Protease besitzt, so müsste ein substratspezifisches Motiv existieren, an das die Protease bindet. Bereits in der Diplomarbeit (Theodoratou, 1997) war deshalb versucht worden, ein solches Motiv ausfindig zu machen. Zu diesem Zweck waren Mutanten konstruiert worden, von deren HycE-Proteinen jeweils eine bestimmte Anzahl von Aminosäuren vom C-Terminus her deletiert worden war. Dabei stellte sich heraus, dass die Deletion von 20 der 32 das C-terminale Peptid ausmachenden Aminosäuren immer noch ein aktives Enzym liefert. Erst die Deletion 6 weiterer Reste resultierte in einem inaktiven Produkt. Zur genaueren Charakterisierung der Deletionsmutanten wurden deswegen von diesen SDS-Lysate, S13-, S100- und P100-Extrakte hergestellt und die Prozessierung sowie die Verteilung der großen Untereinheit zwischen der löslichen und der Membranfraktion untersucht. Die entsprechenden Chemoluminogramme sind Abbildung 27 zu entnehmen.

Aus der Immunoblotanalyse der erhaltenen HycE-Derivate ist ersichtlich, dass eine Verkürzung um 12 Aminosäuren in einer prozessierbaren Variante resultiert. Wegen des bei sukzessiver Deletion immer kleiner werdenden Größenunterschieds zwischen Vorläufer- und reifem Protein ist eine eindeutige Unterscheidung beider Formen im Immunoblot erschwert. Aufgrund der bestehenden Hydrogenaseaktivität müssen jedoch die Varianten, denen die letzten 16 bzw. 20 Aminosäuren des C-Terminus fehlen, prozessiert vorliegen. Für die Verkürzung um 26 Aminosäuren ist keine eindeutige Aussage zu treffen. Da eine Prozessierung der großen Untereinheit jedoch reifes Wildtyp-HycE liefern würde, was nicht der Fall ist, muss davon ausgegangen werden, dass keine Prozessierung stattfindet. Des Weiteren fällt auf, dass die Menge des sich in der Zelle befindlichen HycE-Proteins mit zunehmender Verkürzung des C-Terminus abnimmt. So ist bei der kürzesten Form sogar das Sechsfache des S13-Extraktes des Wildtyps HD705/pACE-1 vonnöten, um etwa die gleiche Menge HycE-Protein auf dem Blot detektieren zu können. Die C-terminale Verkürzung scheint also ähnliche Auswirkungen zu haben wie der Austausch des Methionins der Schnittstellenregion.



**Abbildung 27: Immunoblotanalyse C-terminal verkürzter Formen von HycE.** (A) SDS-Lysate. Die in den Spuren 1-7 aufgetragene Menge entspricht dem Proteingehalt von Zellen einer OD<sub>600</sub> von 0.05, die in Spur 8 von 0.1 OD<sub>600</sub>. (B) S13-Extrakte. Spur 1 enthält 20 µg, Spuren 2-7 40µg und Spur 8 120 µg Protein. (C) S100-Extrakte. Spur 1 enthält 25 µg, Spuren 2-5 50 µg, Spuren 6 und 7 100 µg und Spur 8 150 µg Protein. (D) P100-Fraktion. Spuren 1-7 enthalten 50 µg, Spur 8 150 µg Protein. Spur 1: HD705/pACE-1 ( $\Delta hycE/wt$ ); Spur 2: HD705 ( $\Delta hycE$ ); Spur 3: HD705/pACED4; Spur 4: HD705/pACED8; Spur 5: HD705/pACED12; Spur 6: HD705/pACED16; Spur 7: HD705/pACED20; Spur 8: HD705/pACED26.

Betrachtet man die Verteilung der großen Untereinheit in der löslichen bzw. der Membranfraktion, so muss festgestellt werden, dass die kürzeste Variante nur in der Membranfraktion zu finden ist. Die Deletion von 26 Aminosäuren resultiert also in einem unlöslichen oder stärker an die Cytoplasmamembran gebundenen HycE-Protein. Im Falle des Wildtypproteins hingegen sind in beiden Fraktionen sowohl unprozessierte als auch prozessierte Form enthalten. Die Tatsache, dass gereiftes Enzym auch in der löslichen

Fraktion vorkommt, ist ein Hinweis darauf, dass dieses nur lose mit der Cytoplasmamembran assoziiert vorliegt und deshalb beim Aufbruch der Zellen in der French Presse von der Membran losgelöst wird (Sauter et al., 1992). Das Auftauchen von Vorläuferprotein in der Membranfraktion dürfte auf einer Änderung der Löslichkeit beruhen. Es kann deswegen nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Unprozessierbarkeit der um 26 Aminosäuren verkürzten HycE-Variante von der Tatsache herrührt, dass das Protein nicht im Cytoplasma vorhanden ist und damit der Prozessierung nicht zur Verfügung steht.

Die einzigen aus der Mutationsanalyse der C-terminalen Spaltung resultierenden unprozessierbaren, löslichen HycE-Varianten stellen somit die Varianten M538D und M538E dar. Trotz ihres schnellen Abbaus wurden sie für die folgende Suche nach Suppressormutanten verwendet.

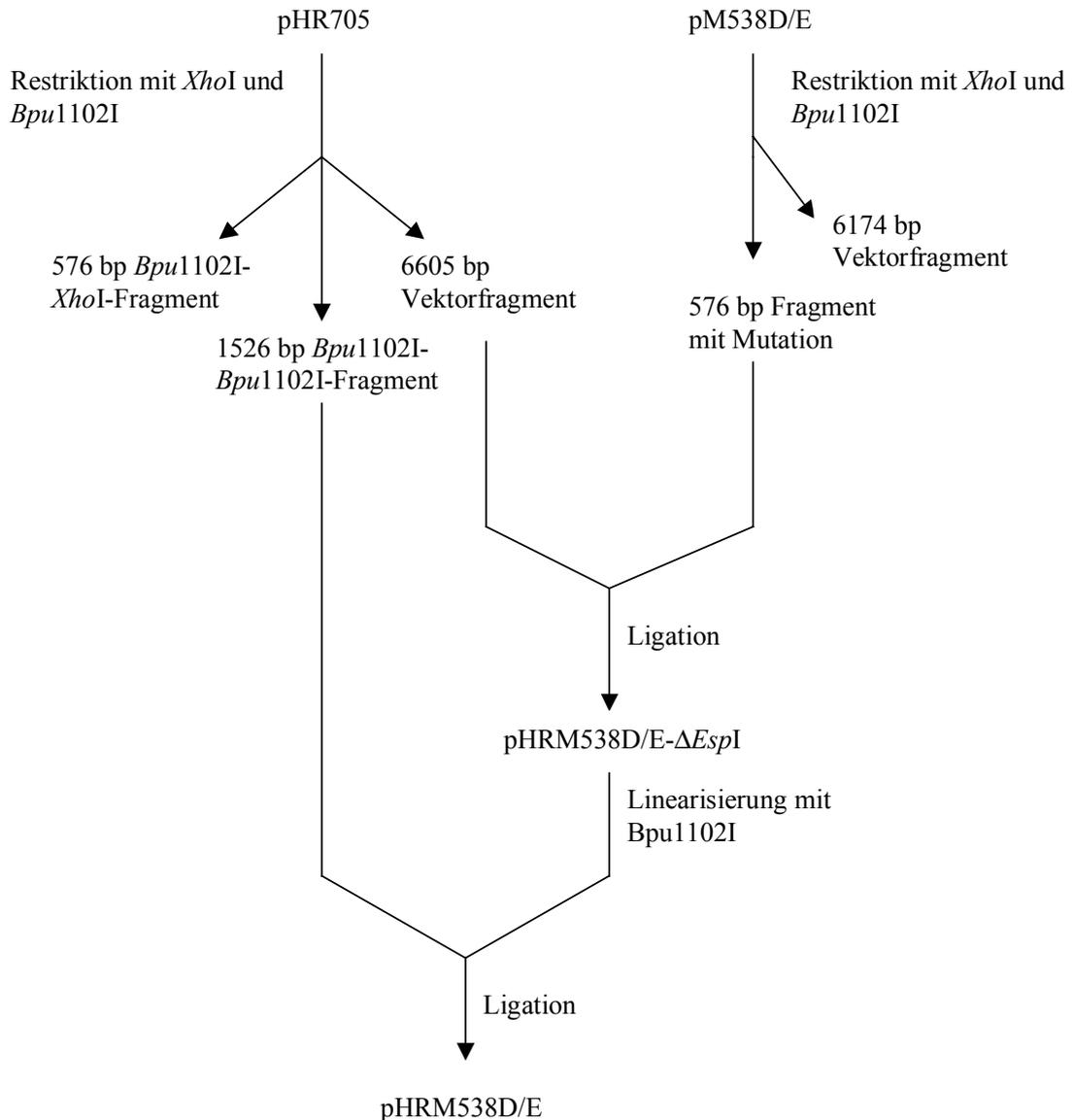
#### **IV. Suche nach Suppressormutanten**

Ziel des Vorhabens war es, durch Verwendung der unprozessierbaren und damit inaktiven HycE-Varianten M538D und M538E und zufälliger Mutagenese des *hycI*-Gens nach HycI-Varianten zu suchen, die wieder in der Lage waren, die mutanten HycE-Formen zu prozessieren. Zu diesem Zweck war es notwendig, die betreffenden plasmidkodierte HycE-Mutationen in das Chromosom eines  $\Delta hycI$ -Stamms zu bringen. Ein Zweiplasmidsystem hatte sich nämlich als für den zur Suche nach Suppressormutanten verwendeten Überschichtungstest als nicht geeignet erwiesen. Das Wachstum der Kolonien war so stark eingeschränkt, dass eine eindeutige Differenzierung zwischen aktiven und inaktiven Mutanten nicht mehr gegeben war.

Zur Einführung der Mutationen ins Chromosom wurden diese zuerst durch Umklonierung der betreffenden Region in das Plasmid pHR705 in ein pMAK-Plasmid eingebracht (Abbildung 28). Die Strategie bestand als erstes in der Restriktion der Plasmide pHR705, pM538D und pM538E mit den Enzymen *XhoI* und *Bpu1102I*. Dies resultierte im Fall der pACE-1-Derivate pM538D und pM538E in einem die jeweilige Mutation tragenden 576 bp-Fragment und einem 6174 bp großen Vektor-Fragment. Im Fall von pHR705 entstanden drei Fragmente. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente wurden die die Mutation enthaltenden 576 bp-Fragmente der Plasmide pM538D und pM538E sowie das 1526 bp- und das 6605 bp-Fragment des Vektors pHR705 aufgereinigt. Im ersten

Ligationsschritt wurden die jeweiligen 576 bp-Inserts mit dem 6605 bp-Fragment ligiert, was durch die beiden unterschiedlichen, überhängende Enden schaffenden Restriktionsenzyme zu einem gerichteten Einbau des jeweiligen Inserts führte. Mit den so entstandenen Konstrukten pHRM538D- $\Delta$ *EspI* und pHRM538E- $\Delta$ *EspI* erfolgte dann, nach Linearisierung mit *Bpu1102I*, der zweite Ligationsschritt, der das fehlende 1526 bp-Fragment dem restlichen Plasmid hinzufügte. Es entstanden die Plasmide pHRM538D und pHRM538E. Die erhaltenen Konstrukte wurden zur Überprüfung sowohl einer Restriktionsanalyse als auch einer Sequenzierung unterzogen. Nach Transfer der Ligationsansätze in den Stamm DH5 $\alpha$  und Isolierung von Plasmid-DNA aus den erhaltenen Transformanten wurde die Anwesenheit der Mutation durch Sequenzierung und Restriktion überprüft. Die sich als korrekt erwiesenen Endkonstrukte pHRM538D und pHRM538E wurden dann zur Konstruktion der die entsprechenden *hycE*-Mutationen beherbergenden Stämme verwendet. Dies erfolgte mit Hilfe der Methode von Hamilton et al. (1989) unter Verwendung des  $\Delta$ *hycE*- $\Delta$ *hycI*-Stammes  $\Delta$ *hycEI* und führte zu den Stämmen DIEM538D und DIEM538E. Die Überprüfung des Genaustausches erfolgte nach Cointegratauflösung mit Hilfe einer PCR-Analyse unter Verwendung der Primer uni und reverse und nachfolgender *Bam*HI-Restriktion der aufgereinigten Plasmid-DNA.

Das weitere Vorgehen auf der Suche nach Suppressormutanten bestand dann in der unspezifischen Mutagenese des *hycI*-Gens, wobei zwei verschiedene Methoden zum Tragen kamen: einmal erfolgte sie nach dem unter B.V.3c) beschriebenen Protokoll der Firma Clontech (1999) über PCR und einmal nach der von Miller (1992) beschriebenen chemischen Mutagenese mittels EMS. Im ersten Fall wurden dabei unter Verwendung des Plasmids pUI-2 und der Primer *hycIa* und *hycIb*, welche von *Bam*HI-Schnittstellen flankierte Sequenzen des 5'- bzw. 3'-Endes von *hycI* darstellen, zehn PCR-Reaktionen durchgeführt, die in zehn Pools unterschiedlich stark mutagenisierten *hycI*-Gens resultierten. Die Mutationsrate lag statistisch gesehen dabei zwischen 0.4 und 8.1 Mutationen pro 1000 bp. Nach Reinigung der PCR-Produkte über den Quiagen PCR Purification Kit, Auftrennung im Agarosegel und Aufreinigung der *hycI*-Fragmente erfolgte ihre Restriktion mit *Bam*HI und Ligierung in den Vektoranteil des Plasmids pUI-2. Auf diese Weise wurde das 747 bp *hycI*-*ascB*-Fragment des Plasmids pUI-2 eliminiert und durch die *hycI*-Fragmente mit den Mutationen ersetzt. Aus dieser Vorgehensweise resultierte auch das Plasmid pI mit dem Wildtyp-*hycI*, das unter Verwendung der gleichen Primer amplifiziert und in denselben Vektor kloniert wurde. Dieses wurde nach Sequenzierung als entsprechende Kontrolle verwendet (siehe Tabelle 2). Genauso



**Abbildung 28: Schematische Darstellung der Konstruktion von pHRM538D und pHRM538E**

wurde die jeweilige Mutationsrate der verschiedenen PCR-Ansätze über Sequenzierung, aber auch über Restriktionsansätze mit den Enzymen *SalI* und *BsmI*, welche jeweils zweimal in *hycI* schneiden, getestet. Zur Vervielfältigung der die verschiedenen Mutationen tragenden *hycI*-Gene wurden die Ligationsansätze in den Stamm DH5 $\alpha$  transferiert und nach Abschwemmen der erhaltenen Kolonien von der Platte und Animpfen in 10 ml LB-Medium je Ansatz über Nacht unter aeroben Bedingungen angezogen. Die Übernachtskulturen wurden dann zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet und die so erhaltenen, unterschiedlich stark mutagenisierten Pools *hycI* tragender Plasmide wurden in den Stamm DIEM538D bzw.

DIEM538E transformiert. Die Hydrogenaseaktivität der resultierenden Klone wurde mittels des unter B.IV.2b) beschriebenen Überschichtungstests untersucht. Potentielle Suppressormutanten wurden noch einmal ausgestrichen und in Überschichtungstests auf Hydrogenase- bzw. Formiatdehydrogenase H-Aktivität überprüft sowie dem physiologischen Test auf Gasbildung unterzogen.

Für die chemische Mutagenese von *hycI* mittels EMS wurden die betreffenden Stämme DIEM538D bzw. DIEM538E mit dem Plasmid pI transferiert und nach Anweisungen von Miller (1992) weiterbehandelt. Die weiteren Tests zur Untersuchung potentieller Revertanten waren identisch.

Bedauerlicherweise blieb der erhebliche Aufwand der Suche nach Suppressormutanten jedoch erfolglos. Ein möglicher Grund könnte in der Instabilität der hierfür verwendeten HycE-Mutanten liegen, die durch die zusätzlich erniedrigte chromosomale Expression des Gens unter Umständen zu einem fast vollkommenen Verlust des Proteins und damit des Proteasesubstrats führt. Störend war auch, dass nach einer gewissen Zeit die Aktivität der Hydrogenasen 1 und 2 ebenfalls zur Reduktion des Benzylviologens und damit zur Violettfärbung der Kolonien führt. Dieses *per se* wichtige Teilvorhaben wurde deswegen eingestellt.

## V. Austausch von Cystein-531 in HycE gegen Selenocystein

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist in einigen [NiFe]-Hydrogenasen das erste Cystein des C-terminalen Nickelbindemotivs durch ein Selenocystein ersetzt. Es wird spekuliert, dass dieses die katalytischen Eigenschaften dieser Hydrogenasen so verändert, dass eine Präferenz zur Wasserstoffbildung besteht, wobei die Bindung des Hydrids zum Nickel destabilisiert wird und die Sensitivität gegenüber bestimmten Inhibitoren, wie CO, NO und Nitrit, erhöht ist (Fauque et al., 1988). Ein experimenteller Beweis steht jedoch noch aus. Die Strukturgene der großen Untereinheiten von [NiFeSe]-Hydrogenasen enthalten dabei anstelle des Cystein-Codons das Stoppcodon TGA an dieser Position (Zinoni et al., 1987). Der Einbau des Selenocysteins erfolgt dann cotranslational mit Hilfe der *selABCD*-Genprodukte (Stadtman, 1996; Böck et al., 1991). *selC* codiert dabei für eine spezifische tRNA (tRNA<sup>Sec</sup>), die ein UCA-Anticodon besitzt, über das sie das Stoppcodon UGA in der mRNA erkennt. tRNA<sup>Sec</sup> wird mittels der Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin beladen (Leinfelder et al., 1988) und Serin wird dann mit Hilfe der Selenocystein-Synthase (SelA) und von Selenophosphat durch

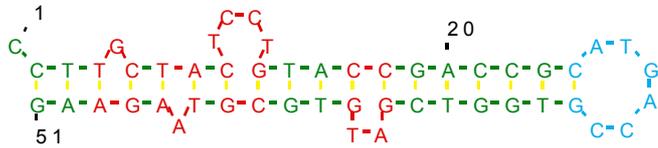
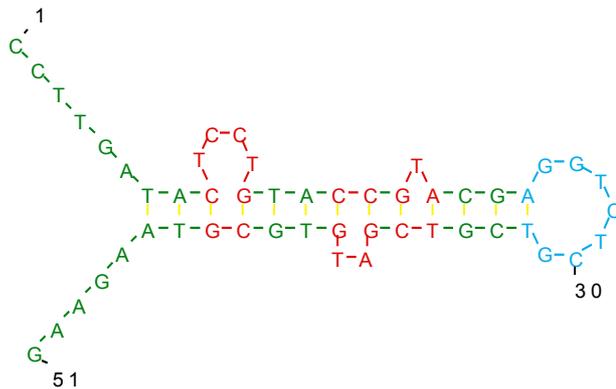
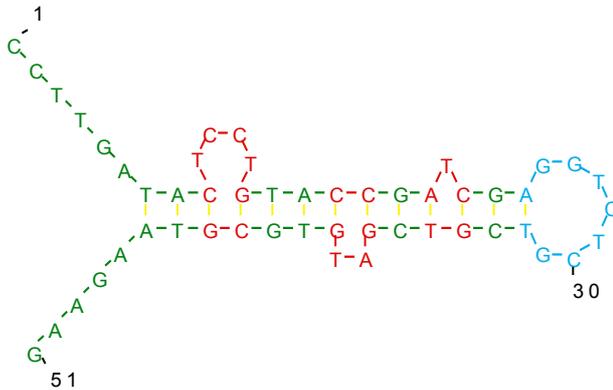
Austausch der OH-Gruppe des Serins gegen –SeH in Selenocystein umgewandelt. Der Einbau des Selenocysteins in die Polypeptidkette wird in Anwesenheit von GTP durch den zu EF-Tu analogen Elongationsfaktor SelB vermittelt, der neben dem GTP sowohl die mit Selenocystein beladene tRNA als auch eine 3'-seitig des UGA-Codons gelegene, spezifische mRNA-Sekundärstruktur, das sogenannte SECIS-Element (für selenocysteine insertion sequence) bindet (Baron et al., 1993). Die Anwesenheit dieses Elements ist somit die Voraussetzung dafür, dass UGA nicht als Stoppcodon gelesen wird. Das SECIS-Element stellt eine Haarnadel-Struktur dar, die für die Erkennung durch SelB bestimmte Eigenschaften besitzen muss. Das basale Element ist eine Minihelix aus 17 Nukleotiden, die aus einer Schleife aus 6 Nukleotiden sowie 5 benachbarten, gepaarten Basen und einem ausgebeulten Uridin (U<sub>17</sub>) besteht. Für die Wechselwirkung mit SelB sind die Nukleotidsequenz in der Schleife und U<sub>17</sub> wichtig. Darüber hinaus muss das abschließende Basenpaar zur Schleife immer ein C-G sein, bereits eine Inversion führt zu einer Erniedrigung der Inkorporationseffizienz von Selenocystein um 30 %.

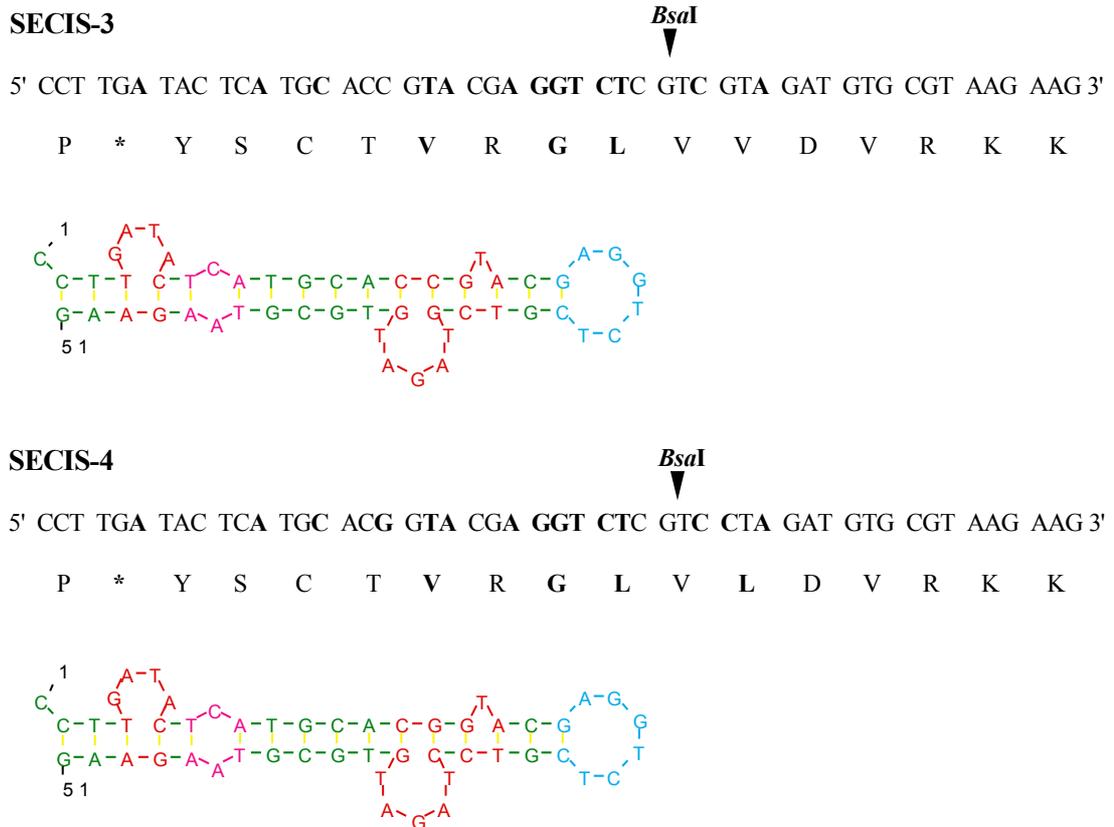
In Zusammenarbeit mit Prof. Backofen vom Institut für Informatik sollten Algorithmen entwickelt werden, mit denen bei gegebener Basenfolge die Anwesenheit und Struktur eines solchen Elements vorausgesagt werden kann. Damit könnten Programme geschaffen werden, mit deren Hilfe mRNA-Sequenzen gezielt nach SECIS-Strukturen durchsucht werden könnten bzw. durch gezielte Basenveränderungen neue solche Elemente in die mRNA eingebaut werden könnten, um, wie z. B. hier im Fall von HycE, die Auswirkungen des Einbaus von Selenocystein untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurde mit den bereits bestehenden Faltungsprogrammen DNASIS und MulFold versucht, auf Basis der mRNA-Sequenz von HycE und unter Berücksichtigung der Eigenschaften von SECIS-Elementen, durch Basenaustausche Strukturen zu konstruieren, um anstelle des ersten Cysteins des C-terminalen Nickelbindemotivs in HycE, Cystein-531, Selenocystein einzubauen und damit aus der ursprünglichen [NiFe]-Hydrogenase eine [NiFeSe]-Hydrogenase zu machen. Dabei wurde versucht, die Aminosäuresequenz von HycE, speziell an der Schnittstelle, so wenig wie möglich zu verändern, da diese nur begrenzt variabel ist. Aus diesen Bemühungen resultierten letztendlich die vier in Abbildung 29 dargestellten potentiellen SECIS-Elemente. Die im Vergleich zur Wildtypsequenz einzuführenden Basenaustausche sind als solche gekennzeichnet; die daraus resultierende Aminosäuresequenz ist darunter angegeben. Aufgrund der Basenänderungen erfolgende Aminosäureaustausche sind ebenfalls markiert.

**HycE-wt**

5' CCT TGC TAC TCC TGT ACC GAC CGC ATG ACC GTG GTC GAT GTG CGT AAG AAG 3'

P C Y S C T D R M T V V D V R K K

**SECIS-1***BsaI*5' CCT TGA TAC TCC TGT ACC GTA CGA **GGT CTC** GTC GTC GAT GTG CGT AAG AAG 3'P \* Y S C T V R **G L** V V D V R K K**SECIS-2***BsaI*5' CCT TGA TAC TCC TGT ACC GAT CGA **GGT CTC** GTC GTC GAT GTG CGT AAG AAG 3'P \* Y S C T D R **G L** V V D V R K K

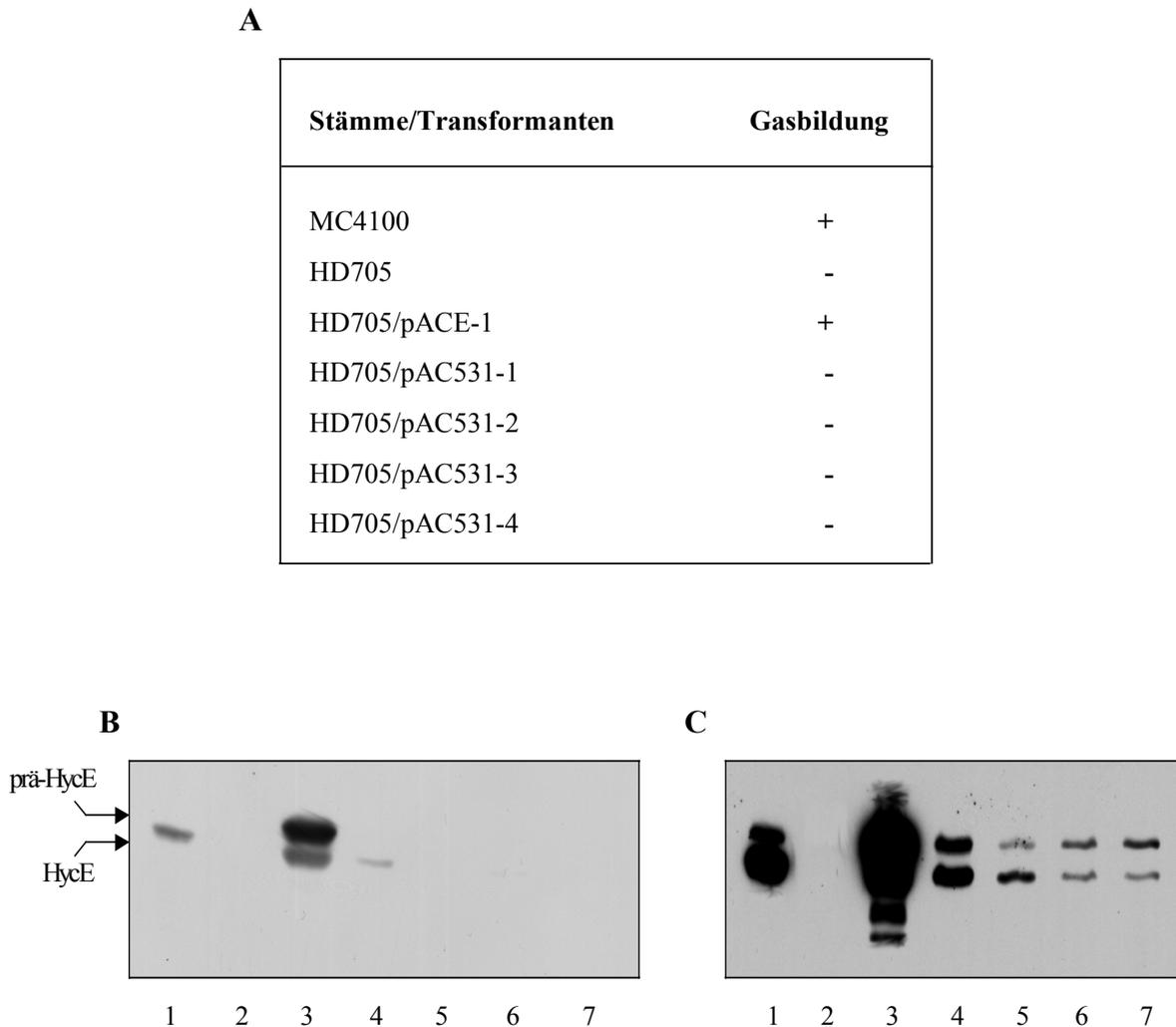


**Abbildung 29: Konstruierte SECIS-Elemente zum Austausch von Cystein-531 in HycE gegen Selenocystein.**

Die Einführung der Basenaustausche erfolgte wie die der anderen Mutationen in *hycE* (Abbildung 21) über inverse PCR und unter Verwendung des Plasmids pSEF2719 sowie der die Basenaustausche tragenden Primerpaare (siehe Tabelle 3) und nachfolgender Umklonierung des *Bam*HI-*Eco*RV-Fragments in den Vektor pACE-1. Neben Sequenzierung und *Bam*HI/*Eco*RV-Restriktion konnte der Erfolg der Mutagenisierung und Umklonierung zusätzlich durch Restriktion mit dem Enzym *Bsa*I überprüft werden, für das in den mutagenisierten *hycE*-Genen eine Schnittstelle entstanden war (siehe Abbildung 29). Die so konstruierten Plasmide pAC531-1, pAC531-2, pAC531-3 und pAC531-4 wurden in den Stamm HD705 transferiert und die erhaltenen Transformanten wurden auf Gasbildung, Prozessierbarkeit von prä-HycE und Selenocysteineinbau charakterisiert.

## 1. Gasbildung und Prozessierbarkeit der Selenocysteinvarianten von HycE

Die Überprüfung der Aktivität der Selenocysteinvarianten von HycE im Gastest ergab, dass keine der Varianten aktiv ist (Abbildung 30A). Die nachfolgende Untersuchung der Prozessierbarkeit zeigte darüber hinaus, dass alle vier mutanten HycE-Formen instabil sind (Abbildung 30B).



**Abbildung 30: Gasbildung und Prozessierbarkeit der Transformanten HD705/pAC531-1, HD705/pAC531-2, HD705/pAC531-3 und HD705/pAC531-3.** (A) Gasbildung. - kein Gas; + Gas. (B) Untersuchung der Prozessierbarkeit von HycE (5 sec exponiert) (C) Untersuchung der Prozessierbarkeit von HycE (1 min exponiert). Spur 1: MC4100 (wt), Spur 2: HD705 ( $\Delta hycE$ ), Spur 3: HD705/pACE-1 ( $\Delta hycE/wt$ ), Spur 4: HD705/pAC531-1 ( $\Delta hycE/SECIS-1$ ), Spur 5: HD705/pAC531-2 ( $\Delta hycE/SECIS-2$ ), Spur 6: HD705/pAC531-3 ( $\Delta hycE/SECIS-3$ ), Spur 6: HD705/pAC531-4 ( $\Delta hycE/SECIS-4$ ).

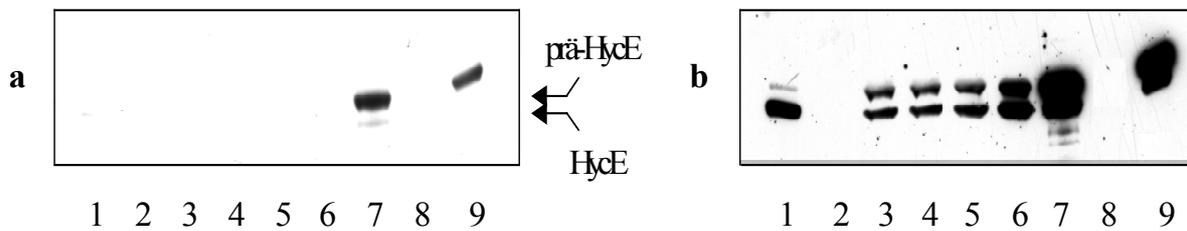
Erst bei einer längeren Exposition des Films werden zwei Banden sichtbar, die auf Höhe von unprozessiertem bzw. prozessiertem HycE laufen (Abbildung 30C). Ein möglicher Grund wäre, dass der Einbau von Selenocystein zu einem inaktiven Enzym führt. Zumindest für das Produkt des Gens von pAC531-2 müsste dies angenommen werden, da die Prozessierung dieser HycE-Variante ansonsten ein reifes, damit stabiles Enzym liefern würde (siehe Abbildung 29). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die beiden Signale bestünde auch darin, dass die eingeführten Mutationen nicht zur Ausbildung von funktionellen SECIS-Elementen führen und damit das UGA-Codon als normales Stoppcodon gelesen wird. Damit würde das kürzere der beiden HycE-Varianten also ein Terminationsprodukt am UGA darstellen, das längere das Produkt der UGA-Suppression unter Einsetzen z. B. von Tryptophan, was zur Nicht-Prozessierbarkeit führt.

Um genaueren Aufschluss über die Natur der beiden auftretenden Banden zu erhalten, wurden deswegen die Plasmide in den  $\Delta$ hycEI-Stamm transferiert sowie die radioaktive Markierung der potentiellen Selenocysteinvarianten von HycE mit  $^{75}\text{Se}$  durchgeführt.

## 2. Expression der potentiellen Selenocysteinvarianten von HycE und $^{75}\text{Se}$ -Markierung

Falls tatsächlich eine Prozessierung der potentiellen Selenocysteinvarianten von HycE stattfindet, die in inaktiven [NiFeSe]-Enzymen resultiert, sollten die entsprechenden Varianten bei Transformation des  $\Delta$ hycEI-Stamms nur noch in unprozessierter Form vorliegen. Aus diesem Grund wurden die Plasmide pAC531-1, pAC531-2, pAC531-3 und pAC531-4 in den Stamm  $\Delta$ hycEI transferiert und Zellysate von anaeroben Anzuchten der Transformanten einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Immunoblotanalyse mit  $\alpha$ -HycE-Antikörpern unterzogen. Als Kontrollen dienten die Stämme MC4100 und  $\Delta$ hycEI sowie die Transformanten  $\Delta$ hycEI/pACE-1/pUI-2,  $\Delta$ hycEI/pACE-1 und  $\Delta$ hycEI/pUI-2. Um einen potentiellen Seleneinbau nachzuweisen, erfolgte des weiteren eine Markierung mit  $^{75}\text{Se}$ . Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 31 und 32 wiedergegeben.

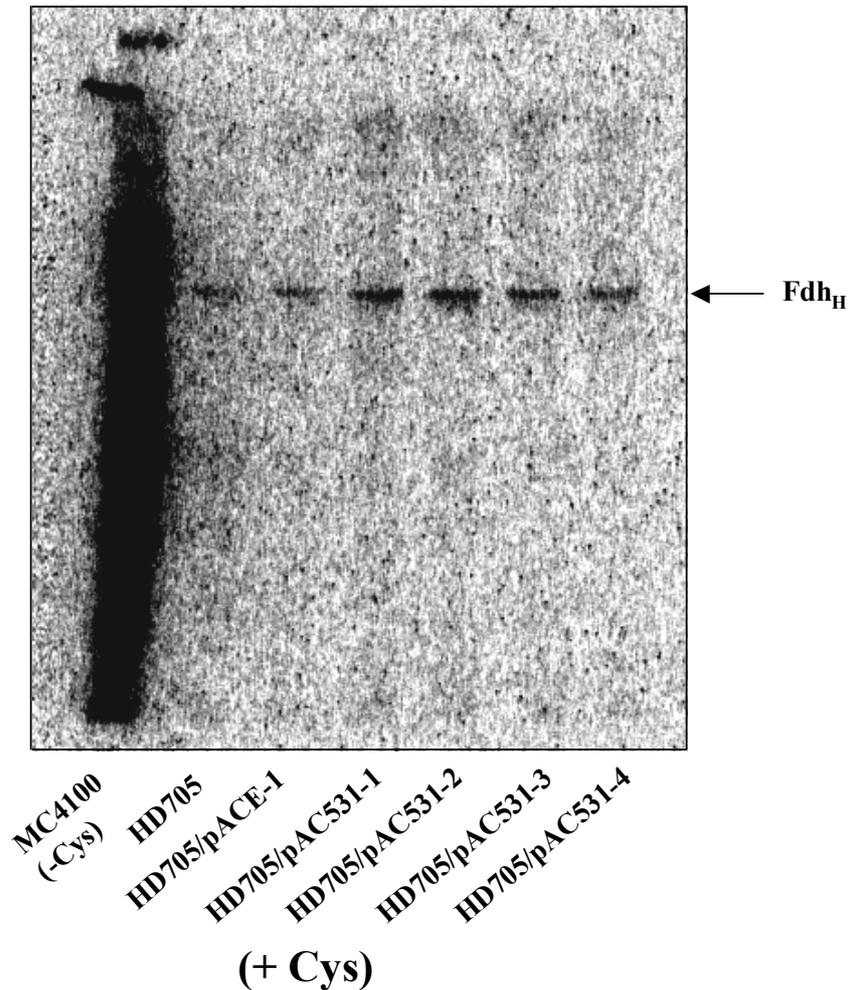
Alle HycE-Varianten enthalten die zwei verschiedenen HycE-Formen. Die beobachtete schneller wandernde Form ist also nicht Produkt einer Prozessierung. Im Autoradiogramm der  $^{75}\text{Se}$ -Markierung ist darüber hinaus in allen Transformanten nur ein radioaktiv markiertes Protein auszumachen, das sowohl im  $\Delta$ hycE-Stamm HD705 als auch in der Wildtypkontrolle HD705/pACE-1 zu finden ist und somit nicht HycE zugeschrieben werden kann. Aufgrund



**Abbildung 31: Immunologische Untersuchung der SECIS-Varianten von HycE nach Transformation in den  $\Delta hycE\Delta hycI$ -Stamm  $\Delta hycEI$ .** (1) MC4100 (wt), (2)  $\Delta hycEI$  ( $\Delta hycE\Delta hycI$ ), (3)  $\Delta hycEI/pAC531-1$  ( $\Delta hycE\Delta hycI/SECIS-1$ ), (4)  $\Delta hycEI/pAC531-2$  ( $\Delta hycE\Delta hycI/SECIS-2$ ), (5)  $\Delta hycEI/pAC531-3$  ( $\Delta hycE\Delta hycI/SECIS-3$ ), (6)  $\Delta hycEI/pAC531-4$  ( $\Delta hycE\Delta hycI/SECIS-4$ ), (7)  $\Delta hycEI/pACE-1/pUI-2$  ( $\Delta hycE\Delta hycI/phycE/phycI$ ), (8)  $\Delta hycEI/pUI-2$  ( $\Delta hycE\Delta hycI/phycI$ ), (9)  $\Delta hycEI/pACE-1$  ( $\Delta hycE\Delta hycI/phycE$ ). **(a)** 5 sec exponiert. **(b)** 10 min exponiert.

seiner Größe handelt es sich wohl um die Formiatdehydrogenase H, die als Teil des FHL-Komplexes unter den Anzuchtbedingungen stark exprimiert wird. Auch der Auftrag von mehr Protein oder längere Expositionszeiten des Films führten zu keinem anderen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Es kommt also zu keinem Einbau von Selen in HycE. (In der ersten Spur im Autoradiogramm wurden Lysate von Anzuchten des Wildtyps MC4100, die nicht mit Cystein supplementiert worden waren, aufgetrennt. Diese Kontrolle zeigt den starken unspezifischen Einbau von Selen, der über den Cysteinstoffwechsel stattfindet (Müller et al., 1997)).

Die eingeführten Basenaustausche führten also in keinem Fall zur Ausbildung eines funktionellen SECIS-Elements und damit zum Einbau von Selenocystein in HycE. Die beiden im Immunoblot zu beobachtenden Banden stellen vielmehr in einem Fall das Terminationsprodukt (schneller wandernde Form), im anderen Fall das Produkt des durchlesenen UGA-Codons (langsamer wandernde Form) dar. Da das Cystein an dieser Position im Wildtyp wichtig für die Bindung von Nickel ist, dürfte auch die HycE-Variante mit supprimiertem UGA-Codon kein Nickel enthalten und damit auch nicht prozessiert werden. Durch die eingeführten Aminosäureaustausche im C-Terminus kommt es darüber hinaus wahrscheinlich zu einer starken strukturellen Veränderung der Proteine, die zu ihrem Abbau führt.



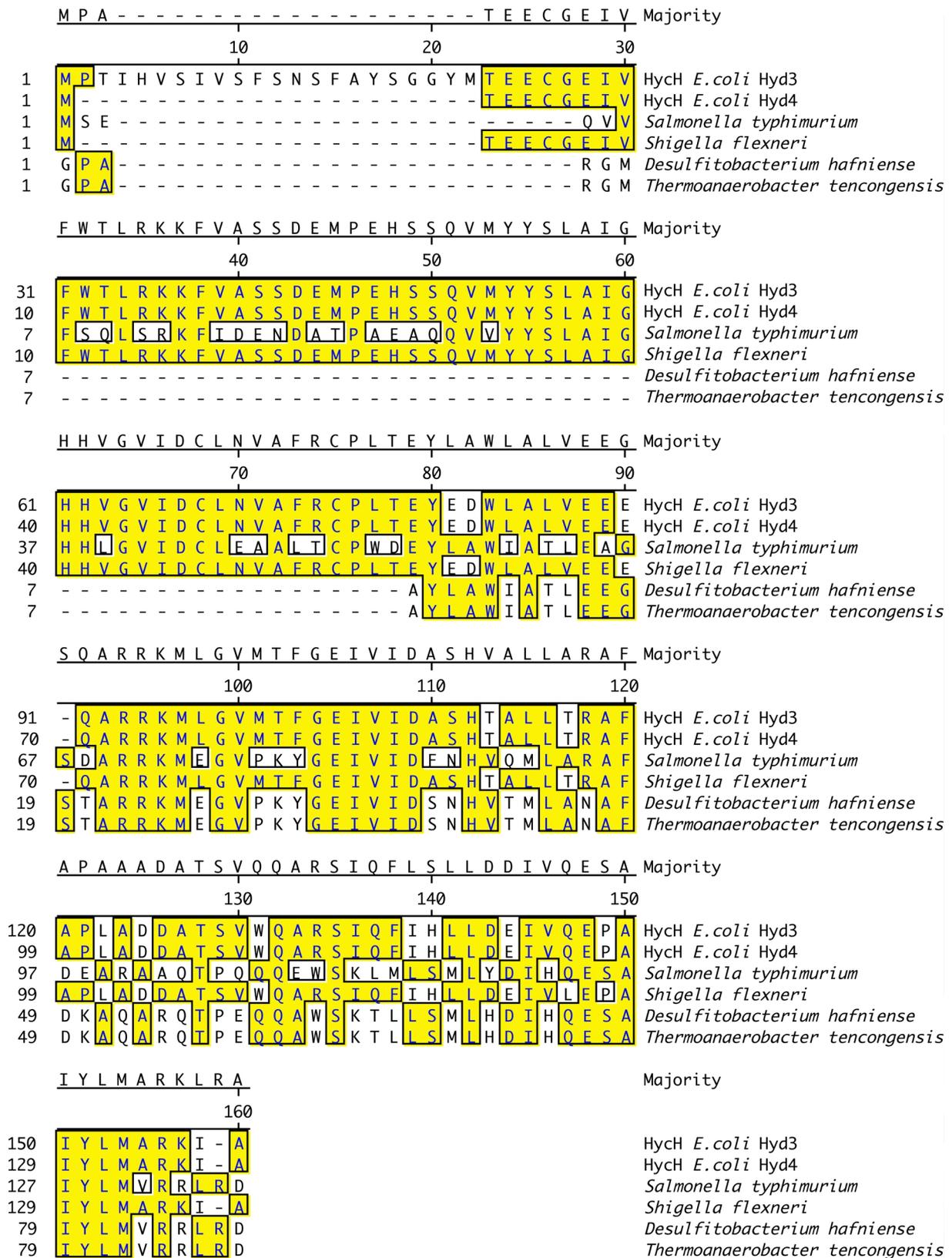
**Abbildung 32:** <sup>75</sup>Se-Markierung der die SECIS-Varianten tragenden Transformanten HD705/pAC531-1 (SECIS-1), HD705/pAC531-2 (SECIS-2), HD705/pAC531-3 (SECIS-3) und HD705/pAC531-3 (SECIS-4). Als Kontrollen wurden die Stämme MC4100 (wt) und HD705 ( $\Delta hycE$ ) sowie die Transformante HD705/pACE-1 ( $\Delta hycE$ /wt) verwendet.

## VI. Komplexe der großen Hydrogenase-Untereinheit mit HycH und HycG

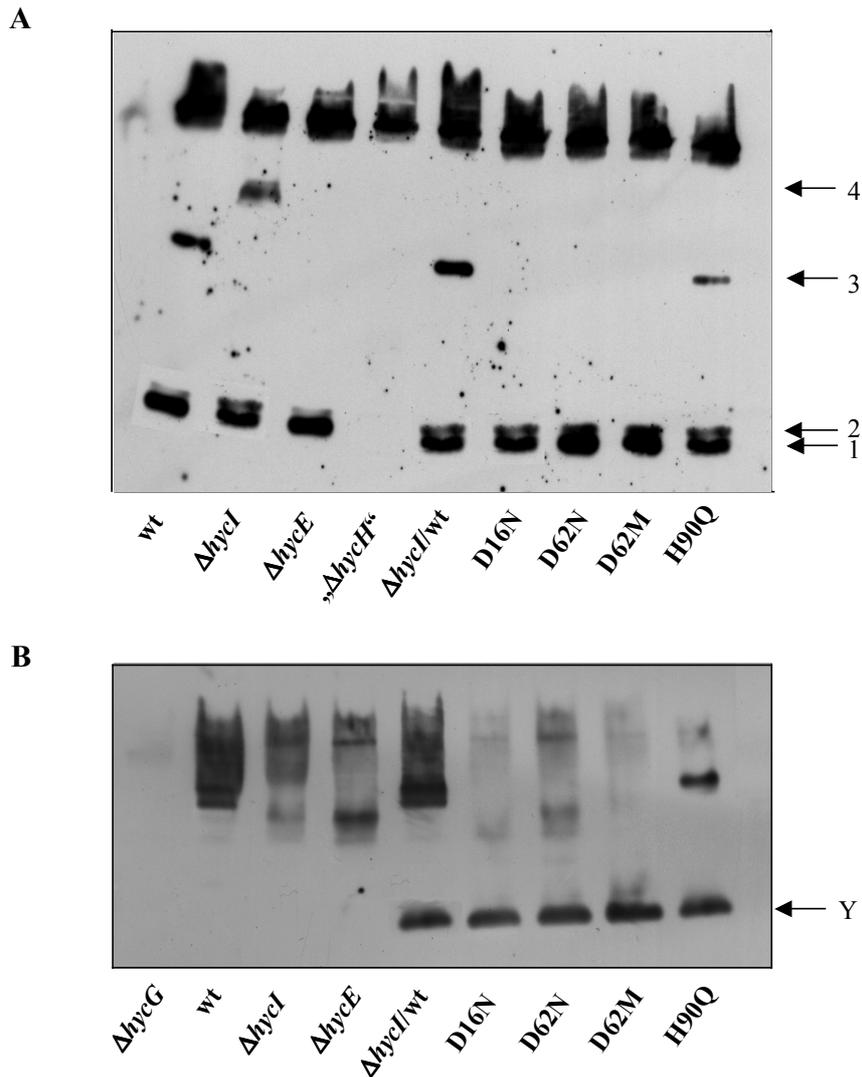
Bei der Analyse der Komplexbildung zwischen prä-HycE und den verschiedenen HycI-Varianten traten in den verwendeten Stämmen bzw. Transformanten verschiedene Laufformen von HycG, der kleinen Untereinheit der Hydrogenase 3, und HycH, einem 14,5 kDa Protein, das vom *hyc*-Operon kodiert wird, auf, die noch nicht beobachtet worden waren und nicht mit den eingeführten Mutationen in HycI in Zusammenhang gebracht werden konnten (siehe C.I.2e)). Die Funktion des HycH-Proteins ist bisher noch unbekannt.

Aminosäuresequenzvergleiche zeigten weder Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen, noch spezifische Motive (siehe Abbildung 33). Sein Vorkommen beschränkt sich darüber hinaus auf FHL-ähnliche Systeme, die hauptsächlich in Enterobakterien zu finden sind. Das Wanderungsverhalten der beiden Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen ist Abbildung 34A und B zu entnehmen. In späteren Experimenten stellte sich heraus, dass der als Kontrolle verwendete  $\Delta hycH$ -Stamm HD708-1 noch weitere Defekte aufweist; er wird deshalb in den jeweiligen Abbildungen als " $\Delta hycH$ " bezeichnet.

HycG zeigt in der Elektrophorese von Extrakten der HycI-Mutanten eine Laufform, die in den Kontrollen MC4100, HD709 und HD705 fehlt, in der Transformante HD709/pUI-2 jedoch ebenfalls auftritt (Bande Y). Auch in allen anderen, hier nicht aufgezeigten HycI-Varianten ist dieses Signal zu sehen. Diese Form scheint also nur dann aufzutreten, wenn HycI überproduziert vorliegt. HycH hingegen wandert in vier unterschiedlichen Banden. Die beiden schnellsten tauchen in allen Spuren auf (Bande 1 und 2) und hängen somit nicht mit irgendwelchen Mutationen zusammen. Die nächstschnellere ist nur in den Extrakten anwesend, in denen auch die prozessierte Form der großen Untereinheit vorhanden ist, also im Wildtyp MC4100 sowie in den Transformanten HD709/pUI-2 und HD709/pUIH90Q (Bande 3). Die langsamste erscheint nur im proteasenegativen Stamm HD709 (Bande 4). Überraschenderweise ist jedoch in den Varianten, in denen prä-HycE nicht mehr prozessiert werden kann, Bande 4 nicht präsent. Dies ist insofern erstaunlich als angenommen wird, dass in den entsprechenden Transformanten die gleiche Reifungssituation vorherrscht wie im Stamm HD709. Der einzige Unterschied besteht darin, dass HycI zwar inaktiv, aber vorhanden ist. Die bloße Anwesenheit des HycI-Proteins, ob nun aktiv oder nicht, scheint also einen Einfluss auf das Vorhandensein dieser HycH-Form zu haben.



**Abbildung 33: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Hych-Proteinen verschiedener Organismen.** Hyd 3 und Hyd 4 stehen für Hydrogenase 3 und 4.



**Abbildung 34: Elektrophorese von HycH und HycG in den HycI-Varianten D16N, D62N, D62M und H90Q unter nicht-denaturierenden Bedingungen. (A)** Immunoblot mit  $\alpha$ -HycH-Antikörpern. **(B)** Immunoblot mit  $\alpha$ -HycG-Antikörpern. Als Kontrollen dienten MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ), HD705 ( $\Delta hycE$ ), HD708-1 (" $\Delta hycH$ ") bzw. HD707 ( $\Delta hycG$ ) und HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI$ /wt).

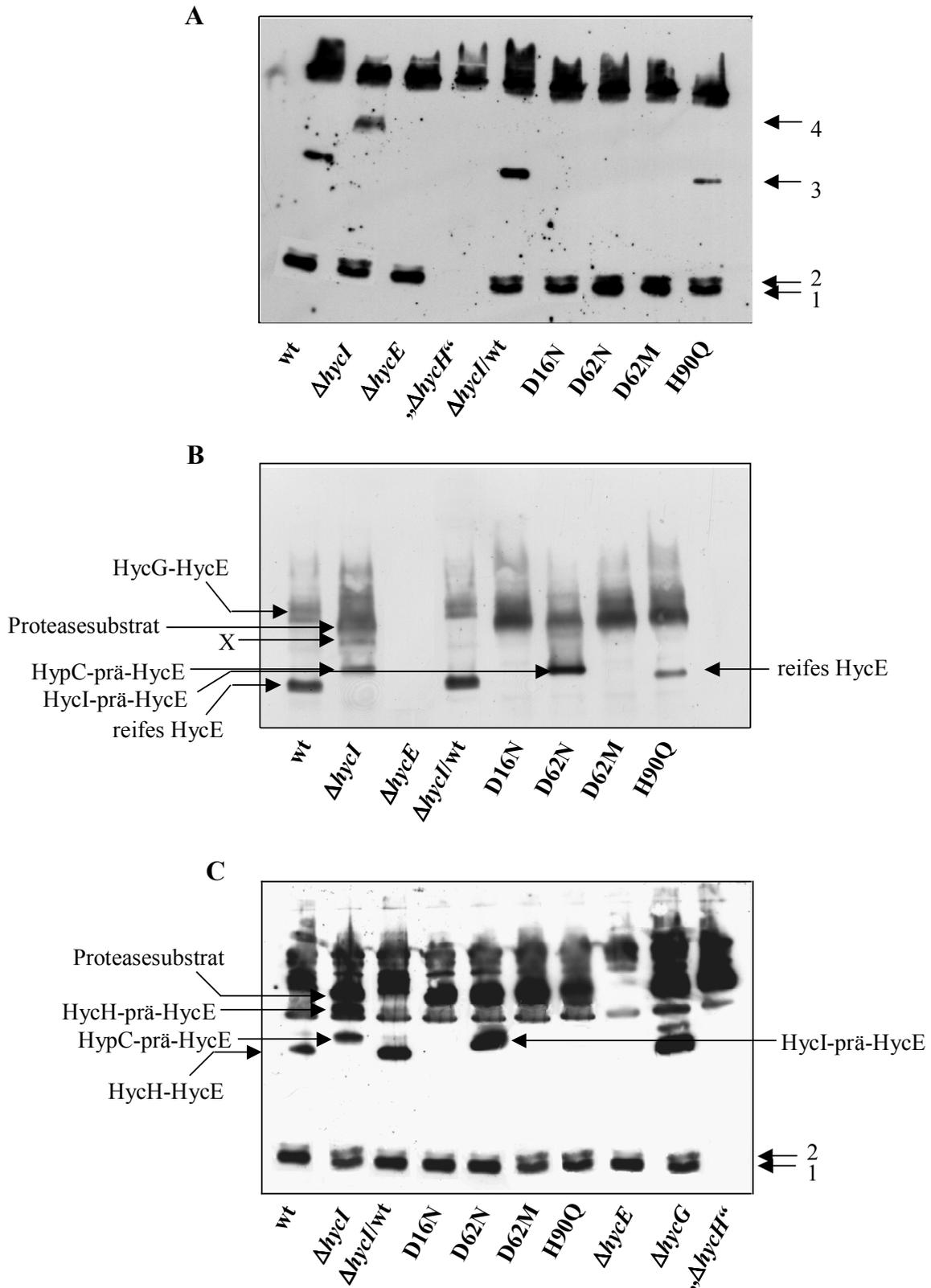
Um zu untersuchen, ob es sich bei den zusätzlich auftretenden Signalen um Komplexe verschiedener Proteine handelt, die am Aufbau bzw. der Reifung beteiligt sind, wurden von den Deletionsmutanten sowie von den hier verwendeten HycI-Varianten Blots angefertigt, die mit  $\alpha$ -HycH- bzw.  $\alpha$ -HycG-Antikörpern sowie mit einem der Hyp-Antikörper oder HycI- oder HycE-Antiserum gleichzeitig behandelt wurden.

## 1. Komplexe mit HycG

Die Immunoblotanalyse der Deletionsmutanten und der HycI-Varianten mit  $\alpha$ -HycG-Antikörpern alleine sowie in Kombination mit Antiseren gegen Hyp-Proteine oder HycI, HycH und HycE ergab keine Reaktionen, die mit den oben beschriebenen korrelieren. Auf die Darstellung der verschiedenen Blots wird deshalb verzichtet. Aufgrund der Tatsache, dass die Laufform nur in Transformanten zu beobachten ist, in denen HycI überproduziert wird, wird angenommen, dass sie ein Artefakt des durch die Überexpression hervorgerufenen Zellstress darstellt. Ob sie nur dann auftritt, wenn *hycI* überexprimiert wird, oder auch bei Überproduktion anderer Proteine der Reifungsmaschinerie, muss offen bleiben.

## 2. Komplexe mit HycH

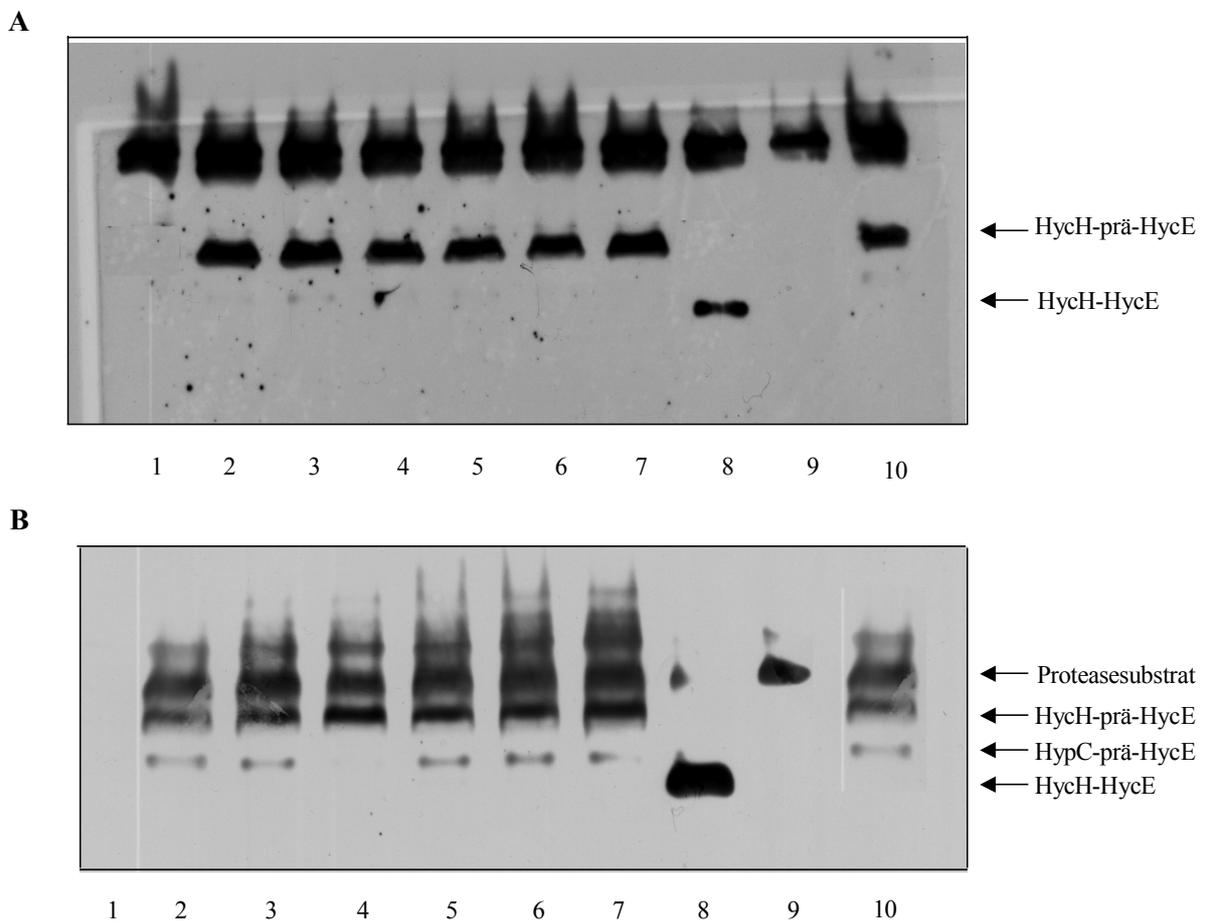
Die Immunoblotanalyse der HycI-Varianten und der Kontrollstämme MC4100, HD709 und HD705 mit  $\alpha$ -HycH und jeweils einem gegen ein anderes Reifungsprotein oder gegen die große Untereinheit gerichteten Antiserum ergab, dass die Banden 3 und 4 Komplexe mit der großen Untereinheit darstellen (siehe Abbildung 35). Durch Vergleich des  $\alpha$ -HycH- und  $\alpha$ -HycE-Blots mit dem mit einem  $\alpha$ -HycH und  $\alpha$ -HycE-Gemisch entwickelten konnte festgestellt werden, dass die Bande 3 einen Komplex zwischen reifem, noch nicht mit HycG assoziiertem HycE-Protein darstellt, und dass Bande 4 ein Komplex zwischen HycH und prä-HycE ist, wobei die der Bande 4 entsprechende  $\alpha$ -HycE-Bande erwartungsgemäß nur in HD709 vorkommt und die bereits beschriebene Bande X darstellt (siehe Abbildung 35 A, B, C). Möglicherweise handelt es sich also um einen Komplex zwischen HycH und prä-HycE, der durch die Anwesenheit von HycI aufgelöst wird. Dass HycH dabei eine Rolle in der Abdissoziation von HypC von prä-HycE einnehmen könnte, kann durch Vergleiche von  $\alpha$ -HycE-Blots mit  $^{63}\text{Ni}$ -Autoradiogrammen von HD709 ausgeschlossen werden, da diese Form nickelfrei ist (siehe hierzu auch Abbildung 25 und 26).



**Abbildung 35: Immunologischer Nachweis von Komplexen zwischen HycH und HycE.** (A)  $\alpha$ -HycH. (B)  $\alpha$ -HycE. (C)  $\alpha$ -HycH und  $\alpha$ -HycE. Als Kontrollen dienten MC4100 (wt), HD709 ( $\Delta hycI$ ), HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/wt$ ), HD708-1 (" $\Delta hycH$ ") und HD707 ( $\Delta hycG$ ).

Die Immunoblotanalyse der *hyp*-Deletionsmutanten zeigte, dass diese Bande auch in allen Deletionsstämmen vorkommt (Abbildung 36 A und B). Die Bindung von HycH an die große Untereinheit muss also einen recht frühen Prozess darstellen.

Die  $\Delta hycG$ -Mutante HD707, in der HycE prozessiert vorliegt, besitzt den HycH-HycE-Komplex. Nur mit einem noch nicht mit der kleinen Untereinheit HycG assoziierten HycE erfolgt also eine Bindung mit HycH. Nach Assoziation von HycE mit HycG liegt HycH nicht mehr an HycE gebunden vor, d.h. HycH muss vor Assemblierung der beiden Untereinheiten abdissoziieren. Das bedeutet aber auch, dass es keine Funktion beim Aufbau oder der Funktion des FHL-Komplexes besitzt, sondern ein Enzym des Reifungsprozesses darstellt.



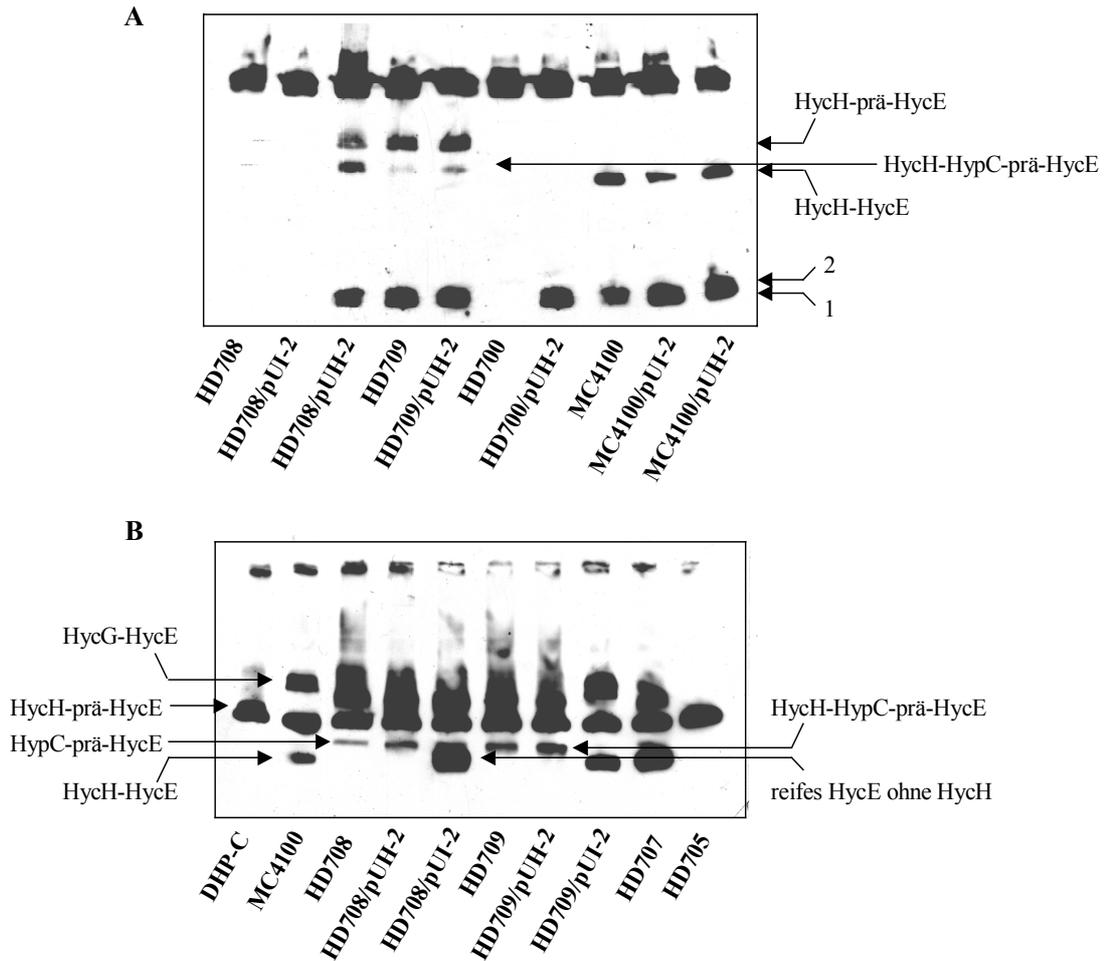
**Abbildung 36: Untersuchung von HycH-HycE-Komplexen in Deletionsmutanten der Reifungsmaschinerie von HycE. (A)  $\alpha$ -HycH. (B)  $\alpha$ -HycE. Spuren: (1) HD705 ( $\Delta hycE$ ), (2) SMP101 (*hypA*-Stoppmutante), (3) DHP-B ( $\Delta hypB$ ), (4) DHP-C ( $\Delta hypC$ ), (5) DHP-D ( $\Delta hypD$ ), (6) DHP-E ( $\Delta hypE$ ), (7) DHP-F2 ( $\Delta hypF$ ), (8) HD707 ( $\Delta hycG$ ), (9) HD708-1 (" $\Delta hycH$ ") und (10) HD709 ( $\Delta hycI$ ).**

### 3. Untersuchungen zur potentiellen Funktion von HycH

Um einer möglichen Funktion von HycH nachzugehen, wurden die Transformanten HD708/pUI-2, HD708/pUH-2, HD700/pUH-2, HD709/pUH-2, MC4100/pUH-2, MC4100/pUI-2 und HD709/pUI-2 einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese mit nachfolgender Immunoblotanalyse unter Verwendung von  $\alpha$ -HycH- bzw.  $\alpha$ -HycE-Antikörpern unterzogen. Als Kontrollen dienten die entsprechenden plasmidfreien Stämme.

Abbildung 37 zeigt, dass die zuvor in HD709 und in den  $\Delta hyp$ -Mutanten als Komplex zwischen HycH und prä-HycE identifizierte Bande 4 auch in der Transformante HD708/pUH-2 ( $\Delta hycH\Delta hycl/phyhH$ ) vorkommt. Allerdings ist sie etwas schwächer ausgeprägt, dafür taucht eine weitere etwas langsamer wandernde HycH-Form auf, die genau der den HypC-prä-HycE-Komplex darstellenden Bande entspricht. Bei längerer Exposition ist diese Laufform auch in HD709 zu sehen. Bei Transformation von HD709 mit dem *hycH*-Gen tragenden Plasmid pUH-2 wird sie deutlicher. Somit existiert also eine weitere HycH-Laufform, nämlich ein HycH-prä-HycE-HypC-Komplex. Dies unterstützt auch die bereits aufgeführte Hypothese, dass HycH von Beginn des Reifungsprozesses an die große Untereinheit der Hydrogenase 3 gebunden vorliegt; nach dieser Annahme sollten auch, je nach Reifungsschritt und damit zusammenhängendem Wanderungsverhalten der entsprechenden prä-HycE-Formen, verschiedene HycH-Banden auftreten.

Der entsprechende  $\alpha$ -HycE-Blot bestätigt die im  $\alpha$ -HycH-Blot erhaltenen Ergebnisse. Demnach ist in HD709, HD709/pUH-2 und HD708/pUH-2 der HycH-prä-HycE-HypC-Komplex vorhanden. In HD708 und HD708/pUI-2 ist zwar eine Bande auf etwa gleicher Höhe zu verzeichnen, sie dürfte jedoch einfachen HypC-prä-HycE-Komplex darstellen, der ein ähnliches Wanderungsverhalten aufweist. Darüber hinaus liefert dieser Immunoblot ein weiteres entscheidendes Ergebnis, nämlich dass HycE in der  $\Delta hycH$ -Transformante HD708/pUI-2 prozessiert wird. Auch hier gleicht das Wanderungsverhalten der prozessierten Form dabei dem des normalerweise entstehenden HycH-HycE-Komplexes. HycH scheint also nicht an der Reifung der großen Untereinheit beteiligt zu sein. Im daraufhin durchgeführten Gastest war jedoch keine Gasbildung zu beobachten. Bedauerlicherweise weisen die hier verwendeten neuen HycE-Antikörper auf Höhe der HycH-prä-HycE-Bande eine starke Kreuzreaktion auf, die selbst nach Absättigung der Antikörper mit Rohextrakt des Stammes HD705 nicht zufriedenstellend entfernt werden konnte. Sie kann in diesem Blot deshalb nicht eindeutig gekennzeichnet werden.



**Abbildung 37: Immunologische Untersuchungen zur Funktion von HycH. (A)  $\alpha$ -HycH. (B)  $\alpha$ -HycE.**

Verwendete Stämme und Transformanten: HD708 ( $\Delta hycH\Delta hycI$ ), HD708/pUI-2 ( $\Delta hycH\Delta hycI/phycI$ ), HD708/pUH-2 ( $\Delta hycH\Delta hycI/phycH$ ), HD709 ( $\Delta hycI$ ), HD709/pUH-2 ( $\Delta hycI/phycH$ ), HD700 ( $\Delta hyc$ ), HD700/pUH-2 ( $\Delta hyc/phycH$ ), MC4100 (wt), MC4100/pUI-2 (wt/*phycI*), MC4100/pUH-2 (wt/*phycH*), DHP-C ( $\Delta hypC$ ), HD709/pUI-2 ( $\Delta hycI/phycI$ ), HD707 ( $\Delta hycG$ ), HD705 ( $\Delta hycE$ ).

Die beiden HycH-Laufformen 1 und 2 sind in allen Spuren außer in denen von Extrakten HycH-freier Stämme und Transformanten vorhanden und stellen vermutlich zwei unterschiedliche Konformere freien HycH-Proteins dar, da sie auch in Extrakten der Transformanten HD700/pUH-2 ( $\Delta hyc/phycH$ ) auftauchen. Die Transformation des Wildtypstamms MC4100 mit pUH-2 hat keinen Einfluss auf die Reifung von prä-HycE; HycH scheint also keine Komponenten der Reifung wegzufangen.

## D. DISKUSSION

Die Reifung von [NiFe]-Hydrogenasen ist ein komplexer Vorgang, an dem nach bisherigen Erkenntnissen die Produkte von mindestens sieben Genen beteiligt sind. Dies sind in erster Linie die Gene des *hyp*-Operons, deren Expression für den Einbau der beiden das aktive Zentrum ausmachenden Metalle Eisen und Nickel sowie der am Eisen hängenden niedermolekularen Liganden CO und CN sorgt. Der letzte Schritt der Reifung nach Fertigstellung des Metallzentrums besteht in der endoproteolytischen Abspaltung eines C-terminalen Peptids vom Vorläuferprotein der großen Untereinheit. Dieser Schritt wird von einer für jede Hydrogenase spezifischen Protease durchgeführt, die im jeweiligen Operon der Strukturgene kodiert wird. Wodurch ihre Spezifität bedingt wird, war bisher genauso unbekannt wie der Katalysemechanismus. Vergleiche mit Aminosäuresequenzen von Proteasen mit bekanntem Reaktionsmechanismus zeigten keine Ähnlichkeiten auf und Versuche, dem Mechanismus über Inhibitoren für Metallo-, Serin- und Cysteinpeptidasen auf die Spur zu kommen, blieben erfolglos. Erst die Kristallisation von HybD, der Protease der Hydrogenase 2, und die damit verbundene Offenbarung einer Metallbindestelle gaben einen ersten Hinweis auf die mögliche Funktionsweise dieser Proteasefamilie. Ziel dieser Arbeit war es auf der Basis dieser Information den Katalysemechanismus dieser Endopeptidase sowie die Art und Weise der Substraterkennung und -bindung und die damit zusammenhängende Spezifität der Protease für ihr Substrat aufzuklären. Als Modellenzym diente dabei HycI, die Reifungsprotease der Hydrogenase 3 von *E. coli*.

### I. Potentieller Katalysemechanismus der Reifungsproteasen von Hydrogenasen

Mit Hilfe der Konstruktion und Charakterisierung verschiedener HycI-Varianten, von <sup>63</sup>Ni-Markierungen, *in vitro*-Prozessierungsansätzen und Atomabsorptionsspektroskopie sowie immunologischen Untersuchungen zur Bildung von Komplexen zwischen diesen Varianten und der großen Untereinheit oder Proteinen der Reifungsmaschinerie war es aufgrund der erhaltenen Ergebnisse möglich folgende Schlussfolgerungen zu ziehen:

- Die **Funktion der Metallbindestelle** der Reifungsproteasen von Hydrogenasen liegt in der **Erkennung des Nickels im Vorläuferprotein** der großen Untereinheit. Da Nickel die letzte Komponente ist, die ins Metallzentrum eingebaut wird, wird damit sichergestellt, dass nur Vorläufer mit fertig assembliertem [NiFe]-Zentrum gespalten werden.

- Außer im Falle der Metallbindestelle führt der Austausch keines anderen Restes der Endopeptidase zu einer gravierenden Einbuße in der Aktivität. Dies bedeutet, dass keine Reste außer die der Metallbindestelle an der Spaltungsreaktion beteiligt sind; die **Metallbindestelle** stellt damit gleichzeitig auch das **aktive Zentrum** des Enzyms dar.

Auf der Grundlage dieser Schlussfolgerungen und unter Berücksichtigung des Aufbaus der Metallbindestelle aus der Kristallstruktur von HybD lassen sich zwei potentielle Mechanismen postulieren.

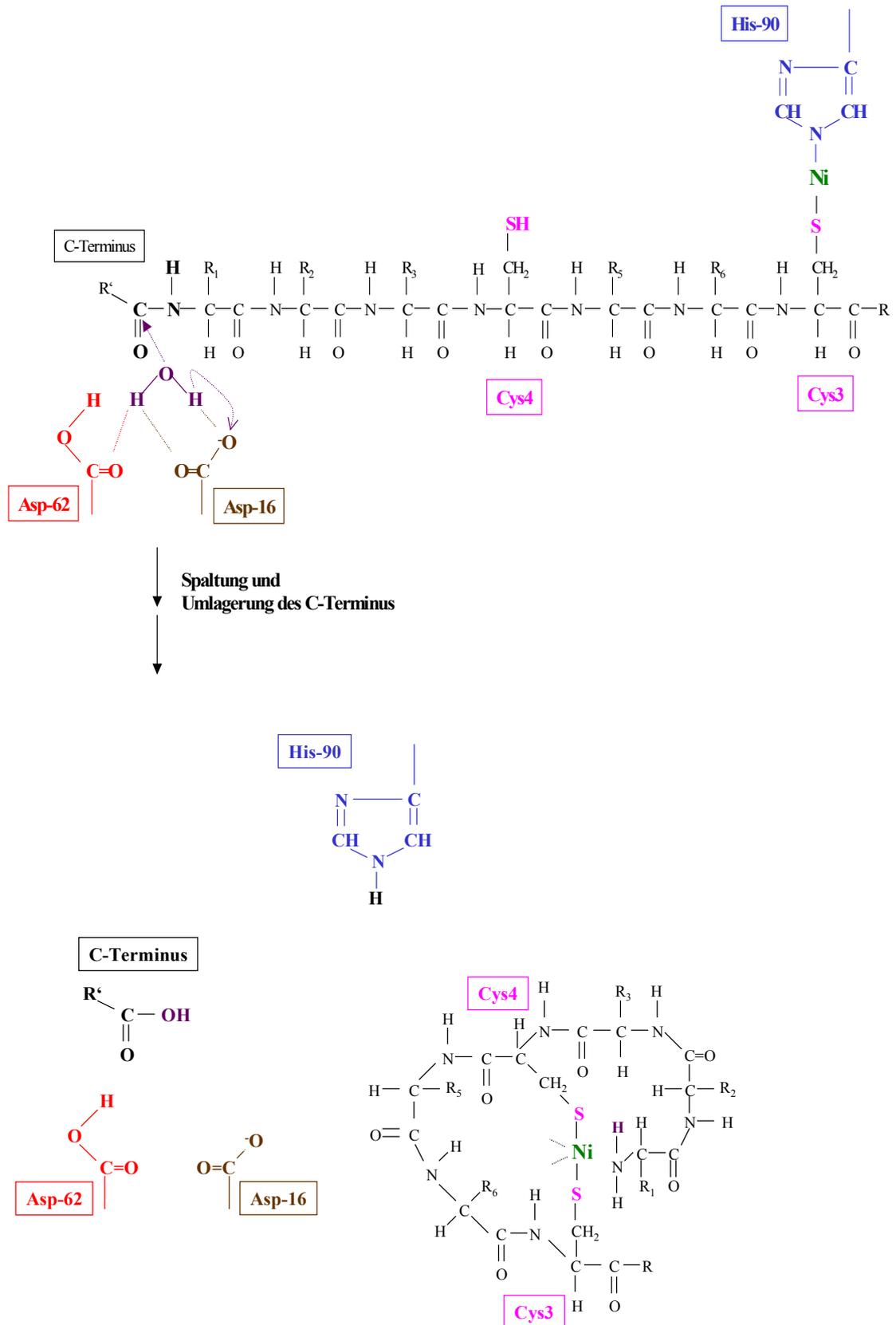
### **1. Die Reifungsproteasen von Hydrogenasen sind Aspartatpeptidasen mit einem Histidin als Nickelbinderest im aktiven Zentrum**

Nach kristallographischen Daten wird das gebundene Metallion von zwei sauren Resten und einem Histidin und einem Wassermolekül koordiniert, wobei das freie Sauerstoffatom des einen sauren Restes (Aspartat-62 in HybD und HycI) über eine Wasserstoffbrücke an das dem Histidin benachbarte Glutamin, namentlich Glutamin-94 in HybD, gebunden ist. Dies mag ein Grund sein, weshalb dieser Rest in den verschiedenen Sequenzen auch meist konserviert vorliegt (siehe Abbildung 16). In HycI ist dieser Rest durch ein Asparagin ersetzt. Im Gegensatz dazu ist ein Wassermolekül über Wasserstoffbrücken an ein Sauerstoffatom des zweiten sauren Restes (Glutamat-16 in HybD, Aspartat-16 in HycI) gebunden (Fritsche et al., 1999). Dieser Aufbau erinnert sehr stark an den von Aspartatpeptidasen (s. Abbildung 3). Demnach würde das Aspartat-62 jenen Rest darstellen, der zur Stabilisierung des sich während der Spaltungsreaktion bildenden tetraedrischen Übergangszustandes beiträgt, während der andere saure Rest für die endgültige Spaltung der Peptidbindung durch Übertragung des vom Wasser stammenden Protons sorgt. Diese Annahme wird zusätzlich durch den Befund gestützt, dass der Austausch des Aspartats-62 in HycI gegen ein Asparagin zur Stabilisierung eines HycI-prä-HycE-Komplexes führt und damit wahrscheinlich zur Fixierung des tetraedrischen Übergangszustandes im Enzym-Substrat-Komplex. Dies würde in völligem Einklang mit den chemischen Eigenschaften der Seitenketten dieser Aminosäuren und der postulierten Rolle des betreffenden Restes in der Spaltungsreaktion stehen. Die Amidgruppe des basischen Restes dürfte unter den gegebenen Bedingungen im protonierten Zustand vorliegen; der pK-Wert von solchen Gruppen liegt nämlich bei 8. Unter diesen Umständen kann zwar der im tetraedrischen Übergangszustand entstehende negativ geladene

Carbonylsauerstoff durch die protonierte Aminogruppe in der richtigen Position gehalten werden, die folgende Spaltungsreaktion kann aber nicht erfolgen, da es wahrscheinlich zur Übertragung eines Protons von der positiv geladenen Aminogruppe auf den negativ geladenen Carbonylsauerstoff kommt, der nun zwei Hydroxylgruppen besitzt. Damit kann aber die für die Spaltung notwendige Elektronenumlagerung bei Übertragung des Protons vom zweiten sauren Rest auf das Stickstoffatom der Peptidbindung nicht erfolgen. Das Substrat bleibt somit am Enzym gebunden. Dementsprechend führt der Austausch des gleichnamigen Restes gegen ein Methionin zu einer Variante, bei der der Übergangszustand nicht mehr ausgebildet werden kann, da die Seitenkette der betreffenden Aminosäure unpolar ist. Dies hat wahrscheinlich zur Folge, dass das Substratprotein, wenn überhaupt, nur kurzfristig an das Enzym bindet, womöglich auch, weil es durch die hydrophobe Seitenkette des Methionins zusätzlich zu sterischen und ladungsbedingten Behinderungen in der Ausrichtung des Substrats am aktiven Zentrum kommt. Auch die vorher beschriebene Wechselwirkung des Aspartats mit besagtem Glutamin könnte keine unerhebliche Rolle spielen, da sie bei Ersatz des sauren Restes durch Methionin wegfällt und dies aufgrund potentieller struktureller Veränderungen des proteolytischen Enzyms, speziell seines aktiven Zentrums, zu einer Erschwerung oder Inhibierung der Bindung führen könnte.

Anders dagegen im Fall des Aspartats-16. Hier führt der Austausch gegen einen basischen Rest zu keinerlei Komplexbildung, was ebenfalls in völligem Einklang mit der für ihn, im Falle einer Aspartatpeptidase, verbleibenden Funktion stünde. Der Austausch dieses Restes gegen eine basische Aminosäure dürfte zum vollkommenen Verlust der Spaltungsfähigkeit des Enzyms führen, da die positiv geladene Aminogruppe nicht nur kein weiteres Proton aufnehmen kann, sondern auch das für die Spaltung wichtige Wassermolekül über sein Sauerstoffatom stärker anzieht als es die positive Partialladung des Carbonylkohlenstoffatoms der zu spaltenden Bindung vermag. Auch in diesem Fall wird es deshalb entweder nur zu einer wirkungslosen Bindung des Substrats an das Enzym kommen, die wieder in einer raschen Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes resultiert, oder es erfolgt aufgrund ungünstiger Ladungsverhältnisse im aktiven Zentrum überhaupt keine Bindung.

Unter diesen Gesichtspunkten dürfte das Histidin der Metallbindestelle dann die Nickelbindung und damit –erkennung, die Voraussetzung für die Spaltung des Vorläufers ist, durchführen. Histidin ist eine Aminosäure, die über ihren Imidazolring häufig an der Bindung von Metallen in Enzymen beteiligt ist. Der pK-Wert des Histidins, bei dem ein Gleichgewicht zwischen positiv geladenen und ungeladenen Molekülen besteht, liegt bei 6.5. Durch das



**Abbildung 38: Modellhafte Darstellung des Katalysemechanismus der Reifungsproteasen als Aspartatpeptidasen.** Cys3 und 4 kennzeichnen die beiden Cysteine des C-terminalen Nickelbindemotivs.

Umschalten des Imidazolrings von einer Ionisationsform in die andere kann das Knüpfen und Lösen von Bindungen katalysiert werden. Demnach könnte es über das Histidin zur Bindung des Nickels im Vorläuferprotein der großen Untereinheit kommen, was im folgenden zur Spaltung der betreffenden Bindung durch die beiden Aspartate führt. Durch Protonierung des Imidazolrings erfolgt dann wieder die Auflösung der Nickelbindung und die Dissoziation der Protease von ihrem Substrat. Diese Hypothese wird durch die Auswirkungen des in dieser Arbeit durchgeführten Austausches des Histidins gegen ein Glutamin mit einem pK von 8 bekräftigt, welcher letztlich eine Proteasevariante hervorbringt, deren Aktivität nur noch etwa 5 % der Aktivität des Wildtyps ausmacht. Unter den gegebenen pH-Bedingungen in der Zelle dürfte die endständige Amidgruppe des Glutamins, wie bereits vorher schon dargelegt wurde, hauptsächlich in der protonierten Form vorliegen. Diese Form ist jedoch nicht mehr zur Bindung mit Nickel befähigt; die Restaktivität resultiert aus den noch vorhandenen Molekülen, deren endständigen Amidgruppen unprotoniert vorliegen.

Abbildung 38 gibt den hier postulierten Reaktionsmechanismus für die Reifungsproteasen der Hydrogenasen wieder.

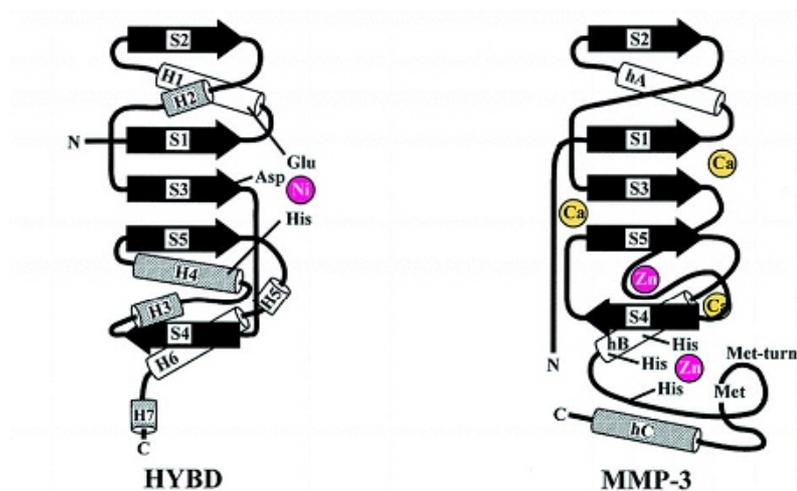
## **2. Das Nickelatom der großen Untereinheit ist an deren C-terminalen**

### **Prozessierung beteiligt**

Eine alternative Hypothese fußt auf dem Befund, dass HybD topologische Ähnlichkeiten zu Metzincinen aufweist, die zur Familie der Zink-Hydrolasen gehören und somit Metalloproteasen darstellen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reifungsproteasen von Hydrogenasen kein Metall enthalten sondern dass die vorhandene Metallbindestelle nur für die Erkennung des im Vorläuferprotein der großen Untereinheit eingebauten Nickels von Bedeutung ist. Die Beobachtung, dass in der  $\Delta hycI$ -Mutante HD709 eine leichte Prozessierung des Vorläufers der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 stattfindet, welche immer einer geringfügig vorhandenen autoproteolytischen Fähigkeit des Enzyms zugeschrieben wurde, macht den im folgenden postulierten Spaltungsmechanismus nicht unmöglich.

Wie bereits dargelegt, wird das  $\text{Cd}^{2+}$ -Ion in der Kristallstruktur von HybD neben den drei Aminosäureresten Glutamat-16, Aspartat-62 und Histidin-93 noch von einem Wassermolekül koordiniert. In Metalloproteasen spielt ein an das Metall gebundenes Wassermolekül dabei eine entscheidende Rolle, indem es das die zu spaltende Bindung angreifende Nukleophil darstellt. Darüber hinaus ist ein saurer Rest an der Ausbildung des für

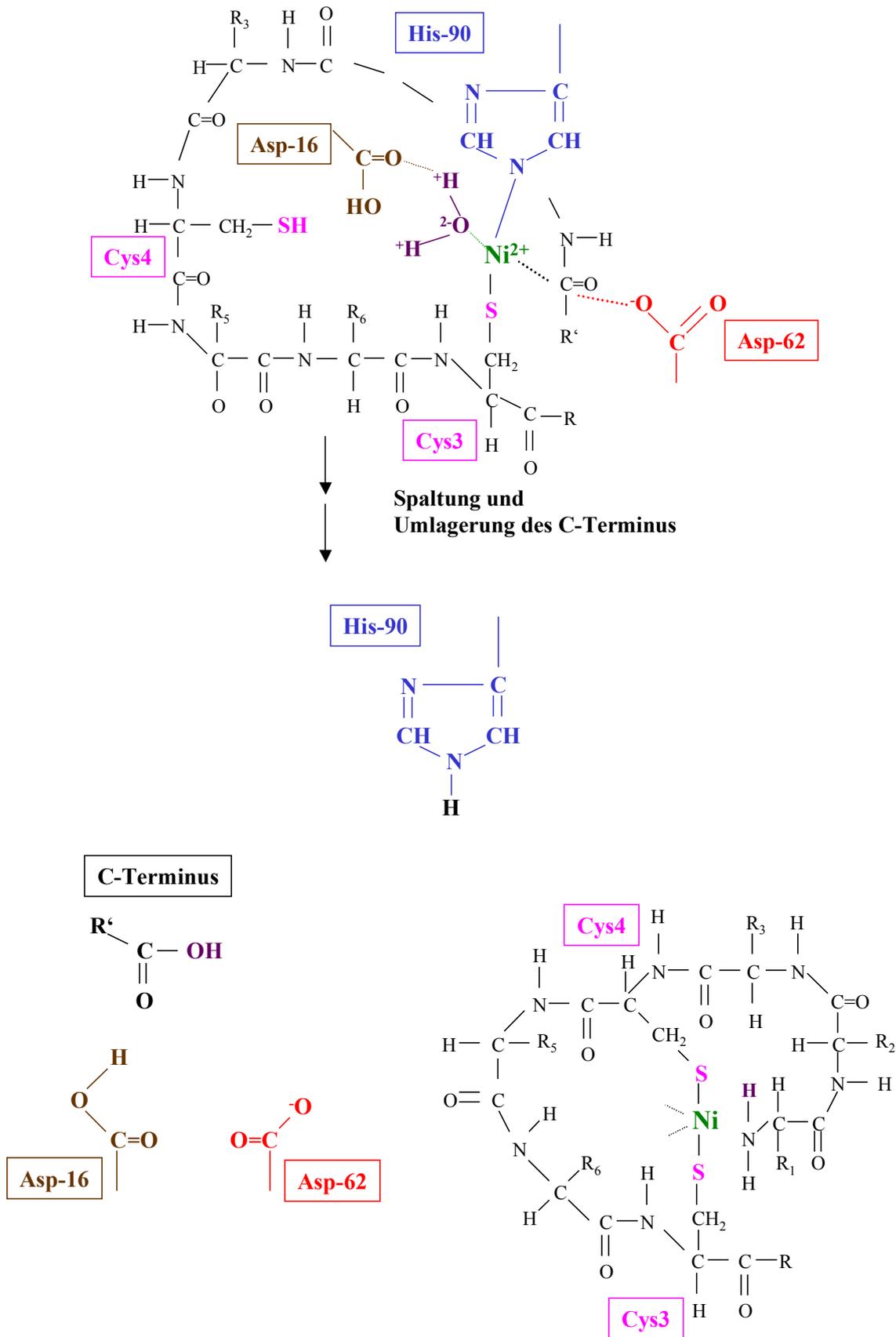
die Spaltung wichtigen intermediären Säureanhydrids beteiligt. Die Funktion der Reifungsprotease könnte somit in der Bereitstellung dieser beiden Komponenten der Spaltungsreaktion liegen. Dabei könnte das über Wasserstoffbrücken an Glutamat-16 (bzw. Aspartat-16) gebundene  $H_2O$  bei Bindung der Protease an die große Untereinheit mit dem Nickel interagieren. Aspartat-62 der Metallbindestelle würde dann den zur Ausbildung des tetraedrigen Zwischenprodukts notwendigen sauren Rest darstellen, so dass das Histidin letztlich auch in diesem Fall jenen Rest ausmachen würde, der für die Bindung und die Erkennung des Nickels im Vorläuferprotein verantwortlich ist. Der für die Stabilisierung des tetraedrigen Zwischenprodukts wichtige basische Rest könnte darüber hinaus durch einen der vielen basischen Reste des C-Terminus erfolgen. Dies würde allerdings eine Art Schleifenbildung des C-terminalen Bereichs des Proteins beinhalten, um die Reste in unmittelbare Nachbarschaft des Metalls zu bringen. Tatsächlich ist in Metzincinen eine solche  $\beta$ -Schleife vorhanden, welche unter dem aktiven Zentrum liegt und ein konserviertes Methionin beinhaltet, das dieser Proteasefamilie ihren Namen gab. HybD fehlt diese Schleife, was einer der gravierendsten Unterschiede zwischen diesem und den Metzincinen darstellt (siehe Abbildung 39). Allerdings ist der C-terminal gelegene Rest der Spaltstelle in prä-HycE ein Methionin, welches in den großen Untereinheiten anderer Hydrogenasen zwar nicht als solches konserviert vorliegt, aber dessen Position so gut wie immer von einem anderen unpolaren Rest eingenommen wird (siehe Abbildung 20). Darüber hinaus konnte, worauf im nächsten Punkt noch genauer eingegangen werden wird, in dieser Arbeit gezeigt werden, dass



**Abbildung 39: Topologischer Vergleich von HybD mit Metzincinen.**

der Austausch dieses Restes gegen polare Aminosäuren sowie die Verkürzung des C-Terminus um mehrere Aminosäuren fast immer in einer Degradation des Proteins resultiert und in einigen Fällen sogar in dessen Unprozessierbarkeit. Ihr liegt wahrscheinlich eine Konformationsänderung des Proteins zugrunde, die zum einen zum Abbau durch unspezifische Proteasen und zum anderen zu einer Verlagerung der zu spaltenden Peptidbindung führt, die die Schnittstelle nicht in die Nähe des aktiven Zentrums kommen läßt. Die Bindung von Protease und Substrat könnte in Anbetracht dieser Tatsachen also zur Ausbildung genau dieses C-terminalen, den Metzincinen eigenen Bereichs führen, der das aktive Zentrum dieser Enzyme formt und umgibt. Dies würde bedeuten, dass die „Reifungsprotease“ allein inaktiv ist und dass erst Protease und fertig assemblierte große Untereinheit eine proteolytische Einheit bilden. Die sporadisch auftauchende Autoproteolyse der großen Untereinheit könnte somit durch Interaktion des Metalls mit freien Wassermolekülen und der zu spaltenden Peptidbindung mit der Seitenkette eines eigenen sauren Restes zur Spaltung der Bindung führen. Abbildung 40 fasst den hier beschriebenen Mechanismus noch einmal zusammen.

Ein entscheidender Punkt, der gegen diese Hypothese spricht, ergibt sich jedoch aus dem Phänotyp der HycI-Variante D62N. Wie bereits dargestellt, führt der Austausch des Aspartats-62 gegen ein Asparagin zur Fixierung des HycI-prä-HycE-Komplexes, wahrscheinlich durch Stabilisierung eines Intermediats in der Katalyse, das nicht mehr weiter reagieren kann. Der Austausch des das tetraedrische Zwischenprodukt ausbildenden sauren Restes in Metalloproteasen oder in auf ähnliche Art und Weise reagierenden proteolytisch aktiven Einheiten, wie die hier beschriebene, gegen ein Asparagin sollte die Ausbildung dieses Zwischenprodukts gar nicht erst zustande kommen lassen, geschweige denn stabilisieren. Die COO<sup>-</sup>-Gruppe des betreffenden Restes ermöglicht nämlich erst durch den nukleophilen Angriff des partiell positiv geladenen Carbonylkohlenstoffs der Peptidbindung die Ausbildung des Intermediats. Der Austausch gegen einen Rest mit, unter diesen Bedingungen, positiv geladener Seitenkette verhindert aus elektrostatischen Gründen eine solche Reaktion. Im Falle des hier beschriebenen Katalysemechanismus würde man also keine Komplexbildung zwischen Protease und großer Untereinheit erwarten. Der unter Punkt 1. beschriebene Katalysemechanismus wird deshalb von uns favorisiert. Frühere Aminosäuresequenzvergleiche und Strukturvergleiche mit anderen Aspartatpeptidasen hatten zwar keine Ähnlichkeiten zu den Reifungsproteasen von Hydrogenasen aufgezeigt, dies mag aber auch an dem etwas veränderten aktiven Zentrum mit einem zusätzlichen Histidin und der



**Abbildung 40: Modellhafte Darstellung des Katalysemechanismus von Reifungsproteasen bei Beteiligung des Nickels der großen Untereinheit an der Spaltung.**

untereinander ebenfalls nur sehr begrenzt bestehenden Ähnlichkeit der Reifungsproteasen in Sequenz und Struktur liegen. Dies kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass die Erkennung der unterschiedlichen Hydrogenaseenzyme und damit die Spezifität der Endopeptidasen für ihre Substrate auf dreidimensionaler Ebene geschehen. Versuche mit für Aspartatpeptidasen spezifischen Inhibitoren würden zur endgültigen Aufklärung des Reaktionsmechanismus der proteolytischen Spaltung durch Reifungsproteasen von Hydrogenasen führen.

## **II. Funktion des C-Terminus und der Schnittstellenreste der großen Untereinheit**

Die extensive Mutationsanalyse der Schnittstellenregion und des C-Terminus der großen Untereinheit der Hydrogenase 3, HycE, brachte folgende Eigenschaften dieser Bereiche des Proteins zu Tage:

### **1. Der N-terminal gelegene basische Rest der Schnittstellenregion ist an der Erkennung und Bindung des Substrats durch die Protease nicht beteiligt, spielt aber eine entscheidende Rolle für die Aktivität des Hydrogenaseenzym.**

Eine solche Rolle wurde bereits von Volbeda et al. (1995) postuliert, der vermutet, dass dieser Rest am Protonenfluss beteiligt ist. Dies würde auch die strenge Konserviertheit dieses Restes erklären, der in den meisten Fällen ein Histidin darstellt, in jedem Fall jedoch basisch sein muss, um als Protonenakzeptor zu fungieren. Die Struktur dieser basischen Aminosäuren scheint dabei keine Rolle zu spielen; eine Prozessierung des Vorläuferproteins findet in jedem Fall statt. Austausch gegen entgegengesetzt geladene Reste dagegen führen zu vollkommen inaktiven Enzymen, während die Aktivität bei Substitutionen durch unpolare Aminosäuren mit der Größe der aliphatischen Seitenkette abnimmt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre eine durch die fehlende basische Seitenkette erschwerte Protonenaufnahme und deren schlechtere Weiterleitung. Bei kurzkettigen Resten könnte diese Funktion zwar nicht vollständig, aber bis zu einem gewissen Grad von der  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäure übernommen werden, was in einem Enzym mit erniedrigter Aktivität resultiert. Bei längerkettigen Resten geht diese Fähigkeit unter Umständen durch die längeren hydrophoben Seitenketten, die eine Abstoßung geladener Teilchen bewirken, verloren. Darüber hinaus mag der Ersatz basischer Aminosäuren durch anders geladene Reste auch zu einer Konformationsänderung führen, die den Protonenfluß zwar beeinträchtigt, aber

möglicherweise nicht so radikal ist, dass sie gleich, wie im Fall der Methioninaustausche, zum Abbau der betreffenden Proteine führt. Schließlich konnte im Autoradiogramm radioaktiv markierter Zellen von Transformanten mit diesen Varianten ein verändertes Laufverhalten der betreffenden HycE-Proteine nachgewiesen werden (siehe Abbildung 26).

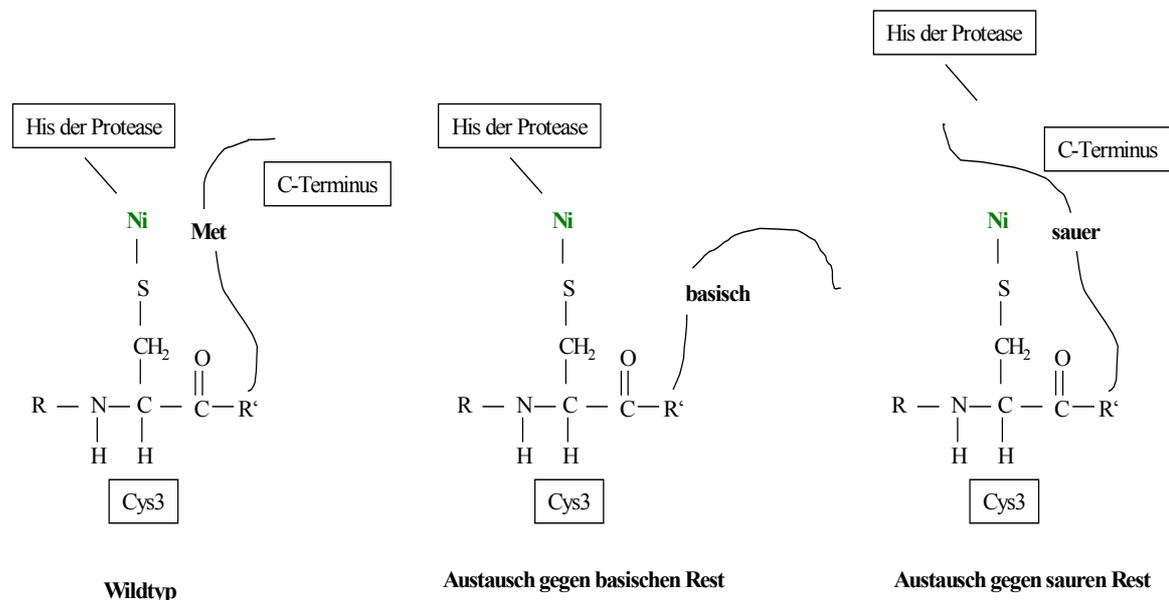
## **2. Der C-terminal gelegene unpolare Rest scheint eine Rolle bei der Ausbildung der richtigen Konformation des Proteins zu spielen.**

Ein Austausch gegen polare Reste führt, mit Ausnahme der Substitution gegen Histidin, zu Proteinvarianten, die rasch abgebaut werden, was ein eindeutiger Hinweis auf eine dramatische Konformationsänderung ist. Die Substitution durch basische Reste resultiert dabei trotzdem in aktiven Enzymvarianten, während jene mit sauren Austauschen zwar ein intaktes Metallzentrum besitzen, aber vollkommen inaktiv sind. Anders als im Fall des N-terminal gelegenen basischen Restes ist die Prozessierungsreaktion hier also von der Ladung des entsprechenden Restes an dieser Position abhängig. Dieses Resultat lässt jedoch die Frage nach der Ursache dieser Tolerierung aufkommen. Eine Möglichkeit bestünde dabei in der C-terminalen Verschiebung der Spaltstelle um eine Aminosäure. Schließlich ist die dem C-terminalen Schnittstellenrest folgende Aminosäure meist ebenfalls unpolar (siehe Abbildung 20). Im Falle von HycE nimmt diese Position zwar eine hydrophile Aminosäure, namentlich Threonin, ein, sie dürfte jedoch unter den gegebenen pH-Bedingungen in der Zelle ungeladen vorliegen. Die Schnittstelle gleicht in diesem Fall also der ursprünglichen, was bei Austauschen gegen saure Reste nicht mehr gegeben ist. Eine Problematik ergibt sich jedoch aus der Tatsache, dass der N-terminale Schnittstellenrest, wie bereits dargelegt worden ist, für die Erkennung durch die Protease keine Rolle spielt. Dass eine alleinige Erkennung des unpolaren Restes ausreicht, ist dabei unwahrscheinlich. Darüber hinaus stellt sich die Frage, wieviel "Bewegungsspielraum" ein Enzym hat, das über sein aktives Zentrum eine Bindung an ein Metall des Substratproteins, das sich in einer bestimmten fixierten Position befindet, eingeht. Eine Umgehung dieses Problems bestünde sicherlich darin, dass das C-terminale Peptid durch die eingeführte Mutation eine derartige Konformationsänderung erfährt, dass sich der betreffende Bereich zum aktiven Zentrum der Protease hin bewegt. Aufgrund der Tatsache, dass es bei den betreffenden Proteinvarianten tatsächlich zu einer Konformationsänderung kommt, ist diese Hypothese deshalb nicht vollkommen von der Hand zu weisen. In diesem Fall wäre eine Erkennung durch die Protease sogar entbehrlich; die

Spaltung würde nur von der Entfernung der jeweiligen Peptidbindung vom aktiven Zentrum abhängen.

Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wäre eine Auftrennung der abgespaltenen C-Termini in einem Schäggergel sicherlich hilfreich.

Die strukturelle Veränderung der Proteine eröffnet jedoch noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Akzeptanz basischer Reste an der Position des C-terminalen Schnittstellenrestes, nämlich dann, wenn dieser dabei eine Art ladungsabhängige Hebelfunktion einnimmt. Unpolare Aminosäuren an dieser Stelle halten das Protein dabei in einer der Wildtypsituation entsprechenden Konformation. Der Austausch gegen saure Reste führt durch elektrostatische Anziehungskräfte zwischen diesen und möglicherweise dem benachbarten basischen Rest der Schnittstelle zu einer derartigen Umlagerung des C-Terminus, dass eine Erkennung durch die Protease nicht mehr möglich ist; der Austausch gegen basische Reste führt dagegen zur gegenteiligen Reaktion, einer Abstoßung der beiden gleich geladenen Reste, die zwar ebenfalls zu einer starken Konformationsänderung des C-Terminus führt, dieser aber in einer für die Protease noch angreifbaren Lage vorliegt. In diesem Fall wäre die Substraterkennung durch die Protease rein konformationsabhängig. Abbildung 41 zeigt schematisch wie dies etwa aussehen könnte.



**Abbildung 41: Schematische Darstellung des potentiellen Einflusses des C-Terminus auf die Konformation der großen Untereinheit und damit auf die Spaltreaktion durch die Protease.**

Der C-terminal gelegene Rest der Spaltstelle hätte dabei zumindest indirekt eine Bedeutung für die Prozessierungsreaktion, indem die Erkennung des Substrats durch die Protease von der Ausrichtung bzw. Lage des C-terminalen Peptids abhängt, die wiederum mit der Ladung des C-terminal gelegenen Schnittstellenrestes zusammenhängt, da Austausch gegen strukturell abweichende unpolare Reste keinerlei Auswirkungen haben. Das abweichende Verhalten der M538H-Varianten, bei der das Methionin in HycE gegen ein Histidin ausgetauscht ist, könnte dadurch erklärt werden, dass sich der Imidazolring des Histidins, unter dem in der Zelle vorherrschenden pH-Wert von 7.5 eher im ungeladenen Zustand befindet und es deshalb zu keiner Konformationsänderung des Proteins und dem damit verbundenen proteolytischen Abbau kommt, während die Seitenketten der anderen basischen Reste mit einem pK von 10 oder 12 in der protonierten Form vorliegen werden.

Aufgrund der starken Sequenzvariabilität und unterschiedliche Länge der C-Termini großer Untereinheiten verschiedener anderer [NiFe]-Hydrogenasen wurde bereits früher postuliert, dass dieser Bereich für die Substraterkennung durch die Protease verantwortlich sein könnte. Eine Veränderung seiner Lage könnte also durchaus die Unfähigkeit der Protease an das Substrat zu binden oder das Substrat zu spalten zur Folge haben. Die Erkennung des Substrats durch die Protease wäre also konformationsabhängig.

Ob die Konformation des C-Terminus dabei allein die Substratbindung durch die Protease bestimmt oder ob es durch Interaktion dieses Teils des Proteins mit anderen Domänen des Proteingerüsts zu einer strukturellen Veränderung des Gesamtproteins kommt, muss derzeit allerdings offen bleiben. Unklarheit darüber herrscht auch im Falle der C-terminalen Verkürzungen. Auch hier kommt es, speziell bei der Deletion der letzten 26 Aminosäuren des C-Terminus, zu einem drastischen Abbau des Proteins, dessen Ursache in einer Konformationsänderung liegen muss. Dabei kann die C-terminale Extension ohne gravierende Folgen für die Prozessierbarkeit des Proteins bis auf 12 Aminosäuren verkürzt werden. Eine weitere Verkürzung um 6 Aminosäuren, welche ein stark basisches Cluster formen, resultiert jedoch in einem unprozessierbaren, aber auch unlöslichen oder vorzeitig an die Cytoplasmamembran gebundenen Protein. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass die Ursache für die fehlende Prozessierung in einem fehlenden Nickeleinbau zu suchen ist, weil das Protein der im Cytoplasma lokalisierten Reifungsmaschinerie entzogen ist. Eine <sup>63</sup>Ni-Markierung wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt.

### III. Rolle des HycH-Proteins in der Reifung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3

Auf der Suche nach Komplexen zwischen der großen Untereinheit und ihrer spezifischen Endopeptidase war man auf Komplexe zwischen der großen Untereinheit und HycH gestoßen, einem Protein mit bisher vollkommen unbekannter Funktion. Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten konnte nun ein erster Hinweis auf die potentielle Funktion dieses Proteins gegeben werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass HycH schon zu Beginn der Reifungskaskade an prä-HycE bindet und damit eine der ersten Interaktionen eines Proteins mit dem Vorläuferprotein darstellt. Dabei bleibt es während des ganzen Reifungsprozesses bis zur proteolytischen Spaltung an prä-HycE gebunden. Sobald diese erfolgt ist, scheint es von der reifen Untereinheit abzu dissoziieren, da es kein Bestandteil des finalen HycE-HycG-Komplexes ist. Allerdings scheint es keine Komponente zu sein, die direkt an der Reifung beteiligt ist, da die Prozessierung der großen Untereinheit auch in Abwesenheit dieses Proteins erfolgen kann und diese wiederum setzt den Einbau des Metallzentrums voraus; das resultierende HycE-Protein ist jedoch inaktiv. Aus diesen Daten wird deshalb gefolgert, dass die Funktion des HycH-Proteins darin besteht, die vorzeitige Bindung von HycG, der kleinen Untereinheit, an die große Untereinheit zu verhindern. Ihre Anlagerung an prä-HycE mag dabei den Einbau des Metallzentrums nicht beeinflussen, wie in einer  $\Delta hycH$ -Transformante gezeigt werden konnte, möglicherweise ist die nach der proteolytischen Abspaltung des C-terminalen Peptids postulierte Konformationsänderung des Proteins, die zur Internalisation des aktiven Zentrums in die große Untereinheit führt, jedoch gestört. Das aktive Zentrum befindet sich damit nicht in der richtigen Position und das Enzym bleibt inaktiv. Immunoblots mit  $\alpha$ -HycG-Antikörpern zeigten bei Überproduktion von HycH die unter C.IV.1. beschriebene, im nicht-denaturierenden Gelsystem von der Wildtypsituation abweichende HycG-Laufform Y (Daten nicht gezeigt), was als ein weiteres Indiz für diese Hypothese angesehen werden kann. Da diese Bande jedoch auch in Extrakten von Transformanten mit dem das *hycI*-Gen überproduzierenden Plasmid pUI-2 auftritt sowie in Extrakten der Transformante HD708/pUH-2, nicht aber in solchen des genetisch äquivalenten Stamms HD709, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich hierbei um eine von der Anwesenheit von HycH abhängige HycG-Laufform handelt, oder ob diese nur ein Artefakt des durch die Überproduktion hervorgerufenen Zellstress darstellt. Zur weiteren Untersuchung der Funktion von HycH ist es deshalb unbedingt notwendig, eine  $\Delta hycH$ -

Mutante zu konstruieren. Abbildung 42 zeigt die um HycH erweiterte modellhafte Darstellung der Reifungskaskade.

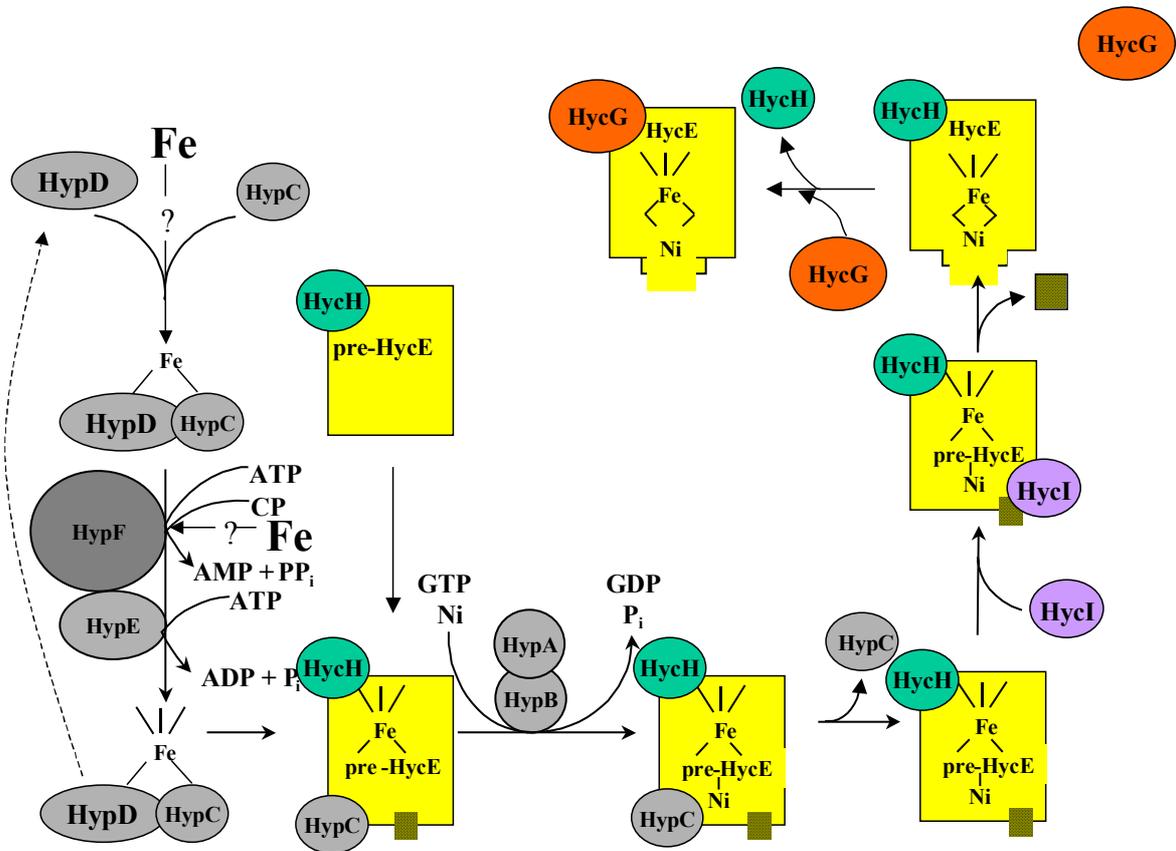


Abbildung 42: Erweitertes Modell der Reifungskaskade.

## E. ZUSAMMENFASSUNG

[NiFe]-Hydrogenasen sind weitverbreitete Enzyme, deren große Untereinheiten ein Metallzentrum enthalten, welches aus einem Nickel- und einem mit drei niedermolekularen Liganden, einem CO und zwei CN, koordinierten Eisenatom besteht. Nach Expression der sie kodierenden Gene durchlaufen die großen Untereinheiten einen komplexen posttranslationalen Reifungsprozess, in dessen Verlauf das [NiFe]-Zentrum schließlich assembliert wird. Der letzte Schritt der Reifungskaskade besteht in der proteolytischen Entfernung eines C-terminalen Peptids durch eine spezifische Reifungsprotease, was das Metallzentrum ins Innere des Proteins bringt. Diese besitzt eine Metallbindestelle, die von drei konservierten Resten ausgebildet wird.

Ziel dieser Arbeit war es den Katalysemechanismus dieser Proteasen aufzuklären und Reste bzw. Motive oder Bereiche im Substratprotein und in der Protease ausfindig zu machen, die an der Substratbindung beteiligt sind. Im Rahmen dieses Unterfangens konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Die Metallbindestelle der spezifischen Reifungsprotease dient zur Erkennung des Nickels im Vorläuferprotein der großen Untereinheit und stellt gleichzeitig auch das aktive Zentrum des Enzyms dar.
2. Der N-terminale Rest der Schnittstellenregion spielt keine Rolle für die Prozessierung durch die Protease; seine Funktion liegt im Protonentransfer von und zum aktiven Zentrum.
3. Der C-terminale Schnittstellenrest wirkt als „Hebel“, der den C-Terminus in der richtigen Position hält und damit die korrekte Faltung des Proteins sicherstellt. Diese ist Voraussetzung für die Substraterkennung durch die Protease, die damit konformationsabhängig ist.
4. Die Deletion der letzten 26 Aminosäuren des C-Terminus von HycE resultiert in einer unlöslichen Variante, die nur noch in der Membranfraktion zu finden ist. Dabei unterliegt diese Variante ebenfalls einem raschen Abbau, der auf eine Konformationsänderung hindeutet.
5. HycH scheint die vorzeitige Bindung von HycG, der kleinen Untereinheit der Hydrogenase

3, an HycE, der großen Untereinheit der Hydrogenase 3, zu verhindern.

Mit Hilfe der erhaltenen Ergebnisse konnten zwei mögliche Katalysemechanismen für die Reifungsproteasen postuliert werden. Desweiteren konnte eine potentielle Rolle des C-Terminus in der Substraterkennung durch die Protease dargestellt werden und schließlich auf eine mögliche Funktion des HycH-Proteins hingewiesen werden.

## F. LITERATURVERZEICHNIS

### A

- Adams, M. W. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 115-145.
- Albracht, S. P. J. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1188, 167-204.
- Altschul, S. F., Gish, Warren, Miller, Webb, Myers, Eugene & Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Andrews, S. C., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. & Guest, J. R. (1997) *Microbiology* 143, 3633-3647.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L. & Brondsted, L. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 2141-2146.

### B

- Baron, C., Heider, J. & Böck, A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(9), 4181-4185.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press.
- Begg, Y. A., Whyte, J. N. & Haddock, B. A. (1977) *FEMS Microbiol. Lett.* 2, 47-50.
- Bender, M. M. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84, 2582-2590.
- Bennett, B., Lemon, B. J. & Peters, J. W. (2000) *Biochemistry* 39(25), 7455-7460.
- Binder, U., Maier, T. & Böck, A. (1995) *Arch. Microbiol.* 165, 69-72.
- Blokesch, M. & Böck, A. (2002) *J. Mol. Biol.* 324(2), 287-296.
- Blow, D. M. (1976) *Acc. Chem. Res.* 9, 145-152.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B. & Zinoni, F. (1991) *Mol. Microbiol.* 5, 515-520.
- Böhm, R., Sauter, M. & Böck, A. (1990) *Mol. Microbiol.* 4, 231-243.
- Botstein, D. & Shortle, D. (1985) *Science* 229, 1193-1201.
- Brondsted, L. & Atlung, T. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 5423-5428.

### C

- Cadwell, R. C. & Joyce, G. F. (1992) *PCR Methods Appl.* 2(1), 28-33.
- Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4530-4533.
- Christianson, D. W. & Lipscomb, W. N. (1987) *J. Amer. Soc.* 108, 4998-5003.
- Christianson, D. W. & Lipscomb, W. N. (1989) *Acct. Chem. Res.* 22, 62-69.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2172-2175.
- Clontech (1999) *Diversify PCR Random Mutagenesis Kit User Manual*.

**D**

- Davies, D. R. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19, 189-215.
- Deppenmeier, U., Blaut, M., Lenters, S., Herzberg, C. & Gottschalk, G. (1995) *Eur. J. Biochem.* 227, 261-269.
- Derek, J. R., Sawers, G., Sargent, F., McWalter, L. & Boxer, H. D. (1999) *Microbiology* 145, 2903-2912.
- Drapal, N. & Böck, A. (1998) *Biochemistry* 37, 2941-2948.
- Drenth, J., Jansonius, J. N., Koekoek, R., Swen, H. M. & Wolthers, B. G. (1968) *Nature* 218, 929-932.
- Dross, F., Geisler, V., Lenger, R., Theis, F., Kraft, T., Fahrenholz, F., Kojro, E., Duchene, A., Tripier, D., Juvenal, K. & Kröger, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206, 93-102.

**F**

- Fan, H. J. & Hall, M. B. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123(16), 3828-3829.
- Fastrez, J. & Fersht, A. R. (1973) *Biochemistry* 12, 2025-2034.
- Fauque, G., Peck, Jr. H. D., Moura, J. J. G, Huynh, B. H., Berlier, Y., DerVartanian, D. V., Teixeira, M., Przybyla, A. E., Lespinat, P. A., Moura, I. & LeGall, J. (1988) *FEMS Microbiol. Rev.* 54, 299-344.
- Fiedler, S. & Wirth, R. (1988) *Analyt. Biochem.* 170, 38-44.
- Ford, C. M., Garg, N., Garg, R. P., Tibelius, K. H., Yates, M. G., Arp, D. J. & Seefeldt, L. C. (1990) *Mol. Microbiol.* 4, 999-1008.
- Fritsche, E., Paschos, A., Beisel, H.-G., Böck, A. & Huber, R. (1999) *J. Mol. Biol.* 288, 989-998.
- Fromant, M., Blanquet, S. & Plateau, P. (1995) *Anal. Biochem.* 224(1), 347-353.
- Fruton, J. S. (1976) *Adv. Enzymol.* 44, 1-36.

**G**

- Galdes, A., Auld, D. S. & Vallee, B. L. (1986) *Biochemistry* 25, 646-651.

**H**

- Halboth, S. & Klein, A. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 233, 217-224.
- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P. & Kushner, S. R. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 4617-4622.

Happe, R. P., Roseboom, W., Bagley, K. A., Pierik, A. J. & Albracht, S. P. J. (1997) *Nature* 385, 126.

Henderson, R. (1970) *J. Mol. Biol.* 54, 341-354.

Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981) *Anal. Biochem.* 114, 193-197.

Hopper, S., Babst, M., Schlenz, V., Fischer, H.-M., Hennecke, H. & Böck, A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19597-19604.

Hube, M., Blokesch, M. & Böck, A. (2002) *J. Bacteriol.* 184(14), 3879-3885.

## I

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1992) *Enzyme Nomenclature*. Academic Press Inc. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo and Toronto.

## J

Jacobi, A., Rossmann, R. & Böck, A. (1992) *Arch. Microbiol.* 158, 444-451.

## K

Kimmel, J. R. & Smith, E. L. (1954) *J. Biol. Chem.* 207, 515-531.

Kimmel, J. R. & Smith, E. L. (1957) *Adv. Enzymol.* 19, 267-334.

King, P. W. & Przybyla, A. E. (1999) *J. Bacteriol.* 181, 5250-5256.

Kortlüke, C., Horstmann, K., Schwartz, E., Rhode, M., Binsack, R. & Friedrich, B. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 6277-6289.

Kossiakoff, A. A. & Spencer, S. A. (1981) *Biochemistry* 20, 6462-6474.

Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P. & Böck, A. (1996) *J. Mol. Biol.* 262, 413-420.

## L

Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.

Leclerc, M., Colbeau, A., Chauvin, B. & Vignais, P. M. (1988) *DNA* 6, 539-551.

Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A. & Böck, A. (1988) *Nature* 331, 723-725.

Lemon, B. J. & Peters, J. W. (1999) *Biochemistry* 38, 12969-12973.

Leung, D. W., Chen, E. & Goeddel, D. V. (1989) *Technique* 1(1), 11-15.

Li, C., Peck, H. D., LeGall, J. & Przybyla, A. E. (1987) *DNA* 6, 539-551.

Lipscomb, W. N. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3797-3801.

Lutz, S., Jacobi, A., Schlenso, V., Böhm, R., Sawers, G. & Böck, A. (1991) *Mol. Microbiol.* 5, 123-135.

## M

Magalon, A. & Böck, A. (2000a) *FEBS Letters* 473, 254-258.

Magalon, A. & Böck, A. (2000b) *J. Biol. Chem.* 275, 21114-21120.

Magalon, A., Blokesch, M., Zehelein, E. & Böck, A. (2001) *FEBS Letters* 499, 73-76.

Maier, T., Jacobi, A., Sauter, M. & Böck, A. (1993) *J. Bacteriol.* 175, 630-635.

Maier, T., Lottspeich, F. & Böck, A. (1995) *Eur. J. Biochem.* 230, 133-138.

Maier, T. & Böck, A. (1996b) in *Adv. Inorg. Biochem.: Mechanisms of Metallocenter Assembly* (Hausinger, R. P., Eichorn, G. L. & Marzilli, L. G., Eds.), 173-192, VCH Publishers Inc., New York.

Makinen, M. W., Wells, G. B. & Kang, S. O. (1984) *Advan. Inorg. Biochem.* 6, 1-69.

Mandrand-Berthelot, M.-A., Wee, M. Y. K. & Haddock, B. A. (1978) *FEMS Microbiol. Lett.* 4, 37-40.

Massanz, C. & Friedrich, B. (1999) *Biochemistry* 38 (43), 14330-14337.

Menon, A. L., Stults, L. W., Robson, R. L. & Mortenson, L. E. (1990a) *Gene* 96, 67-74.

Menon, N. K., Robbins, J., Chatelus, C. Y., Choi, E.-S. & Przybyla, A. E. (1990b) 172, 1969-1977.

Menon, N. K., Robbins, J., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T. & Przybyla, A. E. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 4851-4861.

Menon, A. L. & Robson, R. L. (1994a) *J. Bacteriol.* 176, 291-295.

Menon, N. K., Chatelus, C. Y., DerVartanian, M., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T., Peck, H. D. & Przybyla, A. E. (1994b) *J. Bacteriol.* 176, 4416-4423.

Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.

Miller, J. H. (1992) *A short course in bacterial genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mintz-Weber, S. (1996) *Diplomarbeit*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Mock, W. L. & Stanford, D. J. (1996) *Biochemistry* 35, 7369-7377.

Müller, S., Heider, J. & Böck, A. (1997) *Arch. Microbiol.* 168, 421-427.

Muth, E., Mörschel, E. & Klein, A. (1987) *Eur. J. Biochem.* 169, 571-577.

**N**

- Nau, H. & Riordan, J. F. (1975) *Biochemistry* 14, 5285-5294.
- Neuhierl, B. (1998) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, E. C. & Fontecilla-Camps, J. C. (1999) *Structure Fold Des.* 7, 13-23.
- Nicolet, Y., Lemon, B. J., Fontecilla-Camps, J. C. & Peters, J. W. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25, 138-143.
- Nicolet, Y., de Lacey, A., Vernède, X., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C. & Fontecilla-Camps, J. C. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1596-1601.
- Nicolet, Y., Cavazza, C. & Fontecilla-Camps, J. C. (2002) *J. Inorg. Biochem.* 91, 1-8.

**O**

- Ochman, H., Gerber, A. S. & Hartl, D. L. (1988) *Genetics* 120, 621-623.

**P**

- Paschos, A., Glass, R. S. & Böck, A. (2001) *FEBS Lett.* 488(1-2), 9-12.
- Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E. & Böck, A. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(51), 49945-49951.
- Pedroni, P., Volpe, A. D., Galli, G., Mura, G. M., Pratesi, C. & Grandi, G. (1995) *Microbiology* 141, 449-458.
- Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J. & Seefeldt, L. C. (1998) *Science* 282, 1853-1858.
- Philips, M. A., Fletterick, R. & Rutter, W. J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 20692-20698.
- Piepersberg, A., Hennecke, H., Engelhard, M., Nass, G. & Böck, A. (1975) *J. Bacteriol.* 124, 1482-1488.
- Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A. & Albracht, S. P. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(6), 3331-3337.
- Przybyla, A. E., Robbins, J., Menon, N. & Peck, H. D. (1992) *FEMS Microbiol. Rev.* 88, 109-136.

**Q**

- Quioco, F. A. & Lipscomb, W. N. (1971) *Adv. Protein Chem.* 25, 1-78.

**R**

- Rees, D. C., Lewis, M. & Lipscomb, W. N. (1983) *J. Mol. Biol.* 168, 367-387.
- Richard, D. J., Sawers, G., Sargent, F., McWalter, L. & Boxer, D. H. (1999) *Microbiology* 145, 2903-2912.
- Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartles, K. & Huber, R. (1973) *J. Mol. Biol.* 77, 417-436.
- Rossmann, R., Maier, T., Lottspeich, F. & Böck, A. (1995) *Eur. J. Biochem.* 227, 545-550.
- Rossmann, R. (1995) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

**S**

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sander, M. E. & Witzel, H. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 132, 681-687.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sankar, P., Lee, J. H. & Shanmugam, K. T. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 5440-5445.
- Sargent, F., Ballantine, S. P., Rugman, P. A., Palmer, T. & Boxer, D. H. (1998) *Eur. J. Biochem.* 255, 746-754.
- Sauter, M. (1992) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Sauter, M., Böhm, R. & Böck, A. (1992) *Mol. Microbiol.* 6, 1523-1532.
- Sawers, R. G., Ballantine, S. P. & Boxer, D. H. (1985) *J. Bacteriol.* 164, 1324-1331.
- Sawers, G. & Böck, A. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 2485-2498.
- Sayavedra-Soto, L. A., Powell, G. K., Evans, H. J. & Morris, R. O. (1988) *Proc. Acad. Sci. USA* 85, 8395-8399.
- Schlenzog, V. & Böck, A. (1990) *Mol. Microbiol.* 4, 1319-1327.
- Schmid, G. & Böck, A. (1981) *J. Bacteriol.* 147(2), 282-288.
- Schneider, C. G., Schmitt, H. J., Schild, C., Tichy, H. V. & Lotz, W. (1990) *Nuc. Acids Res.* 18, 5285.
- Shafikhani, S., Siegel, R. A., Ferrari, E. & Schellenberger, V. (1997) *BioTechniques* 23(2), 304-310.
- Simon, C. A., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. & Guest, J. R. (1997) *Microbiology* 143, 3633-3647.
- Stadtman, T. C. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* 65, 83-100.
- Steigerwald, V. J., Beckler, G. S. & Reeve, J. N. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 4715-4718.

Sterchi, E. E. & Stöcker, W. (1999) *Proteolytic Enzymes*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Storer, A. C. & Ménard, R. (1994) *Methods Enzymol.* 244, 486-500.

## T

Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.

Tran-Betcke, A., Warnecke, U., Böcker, C., Zaborosch, C. & Friedrich, B. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 2920-2929.

Theodoratou, E. (1997) *Diplomarbeit*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Theodoratou, E., Paschos, A., Mintz-Weber, S. & Böck, A. (2000a) *Arch. Microbiol.* 173, 110-116.

Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R. & Böck, A. (2000b) *Eur. J. Biochem.* 267, 1995-1999.

## U

Uffen, R. L., Colbeau, A., Richaud, P. & Vignais, P. M. (1990) *Mol. Gen. Genet.* 221, 49-58.

## V

Vallee, B. L. & Neurath, H. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5006.

Van der Spek, T. M., Arendsen, A. F., Happe, R. P., Yun, S., Bagley, K., Stufkens, D. J., Hagen, W. & Albracht, S. P. J. (1996) *Eur. J. Biochem.* 237, 629-634.

Van der Zwaan, J. W., Albracht, S. P. J., Fontijn, R. D. & Slater, E. C. (1985) *FEBS Lett.* 179, 271-277.

Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615-619.

Volbeda, A., Charon, M.-H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (1995) *Nature* 373, 580-587.

## W

Whitaker, J. R. & Granum, P. E. (1980) *Anal. Biochem.* 109, 156-159.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17(9), 3469-3478.

**Y**

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103-119.

**Z**

Zinoni, F., Birkmann, A., Leinfelder, W. & Böck, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3156-3160.

# *Danksagung*

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. A. Böck, der mir mit der Vergabe dieses spannenden und äußerst interessanten Themas nicht nur die Möglichkeit bot, hautnah die Welt der Wissenschaft mitzuerleben, sondern auch aktiv darin mitzuwirken und meinen kleinen Beitrag zur Lösung offener Fragen zu leisten. Dabei lernte ich neben wissenschaftlichem und experimentellem Denken, dass auch Geduld und Durchhaltevermögen zu den in der Forschung essentiellen Dingen zählt.

Ein ganz herzliches Dankeschön meinen Mitstreitern im Hamsterlabor Sakis, Melanie und Eva. Sakis vor allem für seine Fröhlichkeit, Ausgelassenheit und langjährige Freundschaft, die den Alltag im Labor lebendig und lustig hielten, Melanie für ihre Hilfsbereitschaft und ihr offenes Wesen und Eva für die zahlreichen politischen Diskussionen (ist ja in den letzten Jahren viel passiert in der Weltpolitik) und ihr offenes Ohr für das ein oder andere Problem. Darüber hinaus danke ich allen ehemaligen oder unser kleines Labor nur vorübergehend bevölkernden Spezies, Tobias, Martin, Steffi R., Axel, Monika, Gabi, Nina, Anette, Steffi H., Sigi, Michaela und Sabine: Eure Anwesenheit ließ es nie langweilig werden!

Ganz besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei meinen Eltern und Freunden, deren tatkräftige Unterstützung und Geduld (und die mussten sie haben bei meinen Arbeitszeiten) mir immer Stütze waren, wenn mal wieder was schiefgelaufen war.

All jenen, die das hier lesen und alles noch vor sich haben, sei gesagt: Die Forschung ist wie eine Wüste, in der man nach Wasser sucht. Durststrecken gibt es viele und sie können langanhaltend sein und manchmal, wenn man glaubt eine Oase entdeckt zu haben, stellt sie sich als Fata Morgana heraus. Aber: Zu jeder Fata Morgana existiert auch eine Oase! Deshalb: Nicht aufgeben!

# LEBENS LAUF

## Angaben zur Person:

Name: Ekaterini Theodoratou

Geburtsdatum: 27. Juni 1972

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: ledig

Eltern: Panagis Theodoratos, Diplom-Baukaufmann  
Eugenia Theodoratou, Sachbearbeiterin

## Ausbildung:

1978-1982 Grundschole an der Alfonsstrasse in München

1982-1991 Neusprachliches Gymnasium der Englischen Fräulein (Maria-Ward-Gymnasium) in München, Abitur

1991-1997 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Diplom

1998-2003 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der LMU München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck

