

**Biosynthese des Metallzentrums von [NiFe]-  
Hydrogenasen aus *E. coli*:  
Analyse zweier Reifungsenzyme**

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Athanasios Paschos  
München

---

November 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Schartau

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2003

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

	Seite
<b>EINLEITUNG</b>	1
Das aktive Zentrum der Hydrogenasen	1
Physikalische und chemische Eigenschaften von CO und CN	4
CN, ein Stoffwechselprodukt in biologischen Systemen	4
CO bildende Stoffwechselwege in der Biologie	9
Befunde zur CO- und CN-Bildung in der Hydrogenasereifungskaskade	13
<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	17
1. Mikrobiologische Methoden	17
1.1. Bakterienstämme und Plasmide	17
1.2. Nährmedien und Supplemente	19
1.3. Aerobe und anaerobe Anzucht von Bakterien	20
1.4. Bestimmung der Zelldichte	20
2. Genetische Methoden	20
2.1. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.2. Integration von definierten Mutationen in das <i>E. coli</i> -Chromosom	20
3. Physiologische Methoden	21
3.1. H <sub>2</sub> :Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität von ganzen Zellen	21
3.2. Nachweis der Fähigkeit auf H <sub>2</sub> -Bildung	21
3.3. Bestimmung der Aktivitäten der Hydrogenasen von <i>E. coli</i>	21
4. Molekularbiologische Methoden	22
4.1. Liste verwendeter Oligonukleotide	22
4.2. Isolierung von Plasmid-DNA	23
4.3. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	23
4.4. Enzymatische <i>in vitro</i> -Reaktionen an DNA	23
4.5. Sequenzierung von Plasmid-DNA	24
4.6. Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion	24
4.7. Gezielte Mutagenese	24
5. Reinigung von Proteinen	25

5.1. Reinigung von HybD- und HypC-Protein	25
5.2. Reinigung von Strep-tagII-Proteinen	25
5.3. Reinigung von HypF-Protein	25
6. Analytische Standardmethoden	27
6.1. Auftrennung von DNA in Agarosegelen	27
6.2. Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen	27
6.3. Auftrennung von Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen	28
6.4. Färbung der aufgetrennten Proteine	28
6.4.1. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	28
6.4.2. Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	28
6.4.3. Enzymatische Aktivitätsfärbungen von Gelen nach nicht denaturierender Gelelektrophorese	28
6.5. Bestimmung des Proteingehalts	29
6.6. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	29
7. Biochemische Methoden	29
7.1. <i>In vitro</i> Prozessierung von HycE	29
7.2. Bestimmung der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität	30
7.3. Bestimmung der ATP hydrolysierenden Aktivität von HypF	30
7.4. Untersuchung der Pyrophosphat-ATP-Austausch Reaktion durch Adsorption an Aktivkohle	30
8. Immunologische Methoden	31
8.1. Immunoblotanalysen	31
9. Biophysikalische Methoden	31
10. Computer unterstütztes Arbeiten	32
10.1. Datenverarbeitung	32
10.2. Bioinformatische Methoden	32
11. Bezugsquelle von Enzymen und Chemikalien	32
<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
A.1 Bioinformatische Untersuchung der möglichen Funktion der Hyp-Proteine	34
A.2 Analyse der Sequenzen der HypA-, HypB- und HypC-Proteine	38
A.3 Analyse der Sequenzen des HypD-Proteins	39
A.4 Analyse der Sequenzen des HypE-Proteins	40

A.5 Analyse der Sequenz des HypF-Proteins	42
A.6 Analyse der Sequenzen weiterer für die CO/CN-Biosynthese relevanter Proteine	46
A.7 Zielsetzung aufbauend auf der Sequenzanalyse	46
<b>B. Rolle von Carbamoylphosphat in der Reifung der großen</b>	
<b>Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenasen aus <i>E. coli</i></b>	48
B.1 Physiologische Bedeutung und Synthese des Carbamoylphosphats	48
B.2 Untersuchungen zur Bedeutung des Carbamoylphosphats für die Hydrogenasereifung	52
B.3 Konstruktion eines <i>E. coli</i> MC4100-Derivates mit Deletion im <i>carAB</i> -Locus	52
B.4 Phänotypische Charakterisierung der <i>carAB</i> -Deletionsmutanten	53
B.5 Untersuchung der H <sub>2</sub> -Bildung durch den $\Delta$ CarAB-Stamm	57
B.6 Metallorganische Modelreaktionen die zur Bildung von CN und CO aus Carbamoylphosphat führen können	59
B.7 Ist Carbamoylphosphat ein Substrat für das HypF-Protein?	62
<b>C. Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktions-Analyse</b>	
<b>des HypF-Proteins</b>	<b>63</b>
Allgemeines und historischer Rückblick	63
C.1. Reinigung von HypF	64
C.2. Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität des HypF-Proteins	65
C.2.1. Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivitätsfärbung von HypF in nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen	65
C.2.2. Etablierung eines enzymatischen Ansatzes zur Untersuchung der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität von HypF	66
C.2.3. Substratspezifität des HypF-Proteins	68
C.2.4. Bestimmung der kinetischen Parameter der Carbamoylphosphat- Phosphatase-Aktivität von HypF	69
C.2.5. Untersuchungen zur Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität von HypF	71
C.3. Untersuchungen einer Carbamoylphosphat vermittelten ATP-Hydrolyse durch HypF	72

C.3.1. Kinetik der ATP-Hydrolyse	74
C.3.2. Bestimmung der Carbamoylphosphat-Affinität des HypF-Proteins über die ATP hydrolysierende Aktivität	76
C.4. Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion katalysiert durch das HypF-Protein	77
C.5. Struktur-Funktions Analyse von verschiedenen HypF-Varianten	79
C.6.1 Gezielte Mutagenes des <i>hypF</i> -Gens	79
C.6.2 Konstruktion von DHP-F2	81
C.6.3 Mutationsanalyse von HypF	82
C.6.4 Auswirkung der Mutationen auf die Carbamoylphosphat-Phosphatase- Aktivität von HypF	83
C.7 Untersuchung zum Metallgehalt des HypF-Proteins	84
C.8 Der erste und der letzte Schritt in der Reifung der großen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenasen	87
<b>D. Struktur und Funktion der an der Hydrogenase-Reifung beteiligten Endopeptidasen</b>	88
D.1. Kristallzucht und Datensammlung	88
D.2. Kristallstruktur der Protease HybD aus <i>E. coli</i>	89
D.3. Vergleich mit Metzincinen	92
D.4. Wichtige Erkenntnisse aus der kristallographischen Struktur von HybD	93
D.5. Gereinigte Endopeptidasen HybD und HycI enthalten keinen Metallcofaktor	94
D.6. Die Protease HycI bildet keinen stabilen Komplex mit Nickel aus	95
D.7. Analyse zum Einfluss von Inhibitoren und Metallen auf die Prozessierungsreaktion katalysiert durch HycI	96
<b>DISKUSSION</b>	98
Herkunft der niedermolekularen Liganden	98
Beteiligung der Hyp-Proteine an der Synthese der Eisen-Liganden	101
Wie erfolgt die CO und CN- Biosynthese?	103
Wie erfolgt der Transport und die Anlagerung der CO- und CN-Liganden an das Eisen?	107
HybD, eine Reifungsprotease mit Metallbindetasche zur Erkennung des Nickels im Hydrogenase-Apoprotein	107
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	110

**LITERATURVERZEICHNIS**

112

**ANHANG**

132

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Chemische Elemente werden gemäß den Regeln der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) in der Dissertation wiedergegeben. Aminosäuren werden je nach Fall mit dem Ein- oder Drei-Buchstaben-Code abgekürzt. Die Symbole +, -, x, :, <, ~, %, ∞ werden mit ihrer mathematischen Bedeutung wiedergegeben. Physikalische Einheiten werden gemäß dem S.I.-System wiedergegeben. Die Abkürzungen für Genbezeichnungen wurden dem Buch *Escherichia coli and Salmonella Thyphimurium: Cellular and molecular Biology*. (Neidhardt *et al.* 1998) entnommen. Für Gensequenzen wird der Einbuchstaben-Code (A, T, G, C) verwendet

3D	Drei-Dimensional
x g	-fache Erdbeschleunigung
AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
ATP	Adenosintri-phosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
Bp	Basenpaare
C-	Carboxy-
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.C.	Enzyme Commission Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-amino-ethylether)N,N'-tetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Gl.	Reaktionsgleichung
GTP	Guanosintri-phosphat
GTPase	Guanosintri-phosphat-Hydrolase
ICP-AES	Inductively Coupled Plasmonresonanz-Atomemissions-spektroskopie
$k_{cat}$	Katalyserate
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante



N-	Amino-
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PPi	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
S10	Überstand einer Zentrifugation bei 10000 x g
S100	Überstand einer Zentrifugation bei 100000 x g
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tc <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
Tris	N, N, N-Tris(hydroxymethyl)aminomethan

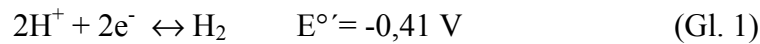
Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten:

1. **Fritsche E.**, Paschos A., Beisel H.G., Böck A. and Huber R., Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HYBD from *Escherichia coli*. (1999) *J. Mol. Biol.* **288**: 989-98
2. **Theodoratou E.**, Paschos A., Mintz-Weber S. and Böck A., Analysis of the cleavage site specificity of the endopeptidase involved in the maturation of the large subunit of hydrogenase 3 from *Escherichia coli*. (2000) *Arch. Microbiol.* **173**: 110-116
3. **Theodoratou E.**, Paschos A., Magalon A., Fritsche E., Huber R. and Böck A., Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**: 1995-1999
4. **Paschos A.**, Glass R.G. and Böck A., Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. (2001) *FEBS Lett* **488**: 9-12
5. **Blokesch M.**, Paschos A., Theodoratou E., Bauer A., Hube M., Huth S. and Böck A., Metal insertion into NiFe-hydrogenases. (2002) *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 674-80.
6. **Paschos A.**, Bauer A., Zimmermann A., Zehelein E. and Böck A., HypF, a carbamoyl phosphate converting enzyme involved in [NiFe]-hydrogenase maturation (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 49945-51.

## EINLEITUNG

### Das aktive Zentrum der Hydrogenasen

Hydrogenasen gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen. Sie katalysieren die Reduktion von Protonen zu molekularem H<sub>2</sub> bzw. die Oxidation von molekularem H<sub>2</sub> zu Protonen und Elektronen:



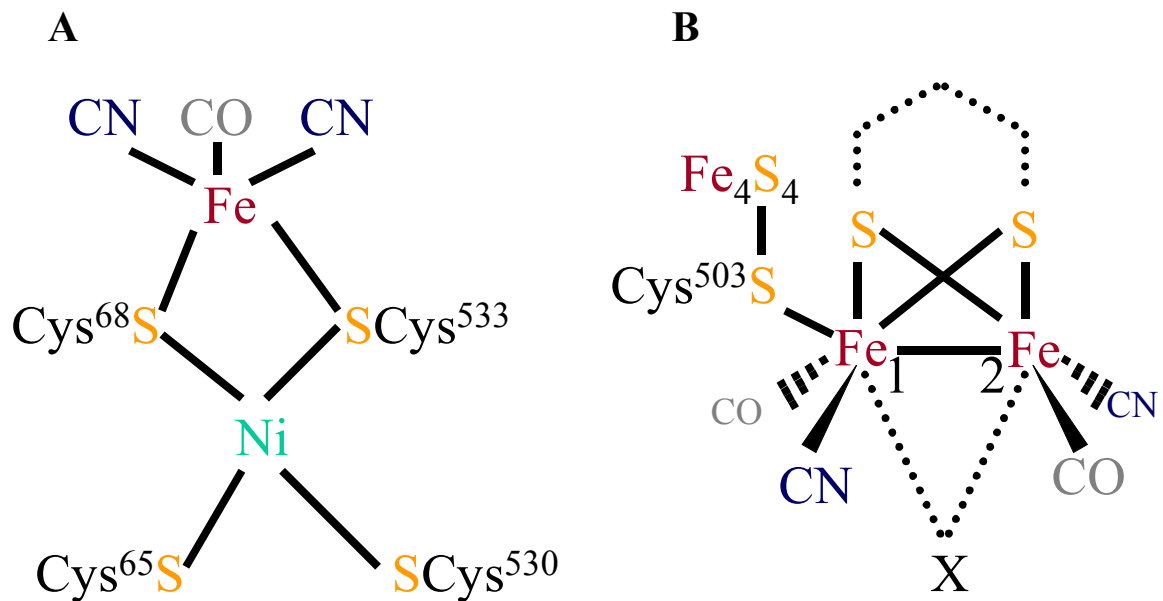
Durch die H<sub>2</sub>-Produktion bietet die Hydrogenase-Reaktion eine Möglichkeit für anaerob stoffwechselbetreibende Organismen, sich der im katabolischen Stoffwechsel anfallenden Reduktionsäquivalente in Form von H<sub>2</sub> zu entledigen. In der Richtung der H<sub>2</sub>-Oxidation dient H<sub>2</sub> dagegen als Quelle für Reduktionsäquivalente, die zur Produktion von Stoffwechselenergie oder bei der reduktiven Biosynthese Verwendung finden (Robson 2001). Neben den Hydrogenasen kann die Produktion von H<sub>2</sub> auch durch die Nitrogenase erfolgen; hierbei handelt es sich um eine obligatorische Nebenreaktion des N<sub>2</sub>-Fixierungsmechanismus (Lowe und Thorneley 1984a, Thorneley und Lowe 1984a, Lowe und Thorneley 1984b, Thorneley und Lowe 1984b).

Die Bindung bzw. Freisetzung des H<sub>2</sub> am aktiven Zentrum der Hydrogenasen und die Polarisierung bzw. Ausbildung seiner Molekülbindung stellen aufgrund seiner Größe, seiner hohen Bindungsenergie und seiner Molekülsymmetrie besondere Anforderungen an das katalytische Zentrum der Hydrogenasen. Diese enzymatischen Ansprüche werden dadurch gelöst, dass abgesehen von zwei Ausnahmen alle Hydrogenasen Metalloproteine sind (Ewart und Smith 1989, Ewart *et al.* 1990, Hartmann *et al.* 1996). Nach ihrem Metallgehalt können dabei zwei Klassen von Hydrogenasen, die [NiFe]- und die [Fe]-Hydrogenasen unterschieden werden. Während [NiFe]-Hydrogenasen aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten bestehen, sind [Fe]-Hydrogenasen monomere Proteine (Vignais *et al.* 2001).

Information über die Architektur der aktiven Zentren der beiden Hydrogenase-Klassen wurde mittels Röntgenstrukturanalyse gewonnen. 1995 erfolgte die erste röntgenkristallographische Bestimmung der Struktur der [NiFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* (Volbeda *et al.* 1995). Die Daten zeigen (Abbildung 1A), dass Nickel tief im Inneren der großen Untereinheit des Proteins von vier Cysteinen ligandiert vorliegt. Eisen, das zweite Metall im Protein, ist ebenfalls mit zwei dieser Cysteine ligandiert und ist nahe zum Ni in einer Entfernung von 2,7 Å positioniert. Das Eisen trägt weiterhin drei niedermolekulare Liganen, die aufgrund von FTIR-Spektren als ein CO und zwei CN

identifiziert wurden (Happe *et al.* 1997). Im oxidierten Zustand können das Nickel und das Eisen zusätzlich  $O^{2-}/OH^-$  oder  $S^{2-}/SH^-$  tragen (Volbeda *et al.* 1996, Higuchi *et al.* 1997, Dole *et al.* 1997). Mittlerweile liegen die Kristallstrukturen weiterer [NiFe]-Hydrogenasen vor, wie die von *D. vulgaris* (Higuchi *et al.* 1997), *D. fructosovorans* (Montet *et al.* 1997), *D. desulfuricans* (Matias *et al.* 2001) und *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin *et al.* 1999). Dabei zeigt sich, dass alle einen übereinstimmenden strukturellen Aufbau des Metallzentrums aufweisen. Lediglich im Fall des Enzyms von *D. vulgaris* wird einer der niedermolekularen Liganden als SO aufgrund der Elektronendichteverteilung und Pyrolyse-Studien modelliert (Higuchi *et al.* 1997, Higuchi und Yagi 1999, Higuchi *et al.* 2000).

Die Auflösung der Struktur der [Fe]-Hydrogenasen von *Clostridium pasteurianum* (Peters *et al.* 1998) und *Desulfovibrio desulfuricans* (Nicolet *et al.* 1999) ergab, dass das aktive Zentrum (H-Cluster) aus einem binuklearen Fe-Fe Zentrum besteht. Dieses Fe-Zentrum ist mit einem [4Fe-4S]-Cluster mittels eines Cystein-Liganden über das  $Fe_1$  verknüpft (Abbildung 1B). Beide Eisen im Zentrum tragen jeweils zwei niedermolekulare Liganden, eine CN und eine CO-Gruppe, wie in infrarotspektroskopischen Analysen gezeigt wurde (van der Spek *et al.* 1996). Ein Dithiol (Propan-1,3-Dithiol oder di-Thiomethyl-Amin) überbrückt die beiden Eisenatome (in der Abbildung 1 B mit der gestrichelten Linie angegeben). In der partiell oxidierten Struktur, verbindet ein weiteres CO-Molekül beide Eisen (in der Abbildung 1B mit X angegeben)(Peters *et al.* 1998). Desweiteren wird  $Fe_2$  von einem Wassermolekül ligandiert.  $Fe_2$  stellt vermutlich das katalytische Zentrum dar, wie in Inhibitionsstudien wahrscheinlich gemacht werden konnte (Lemon und Peters 1999, Benett *et al.* 2000).



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (A) und des H-Clusters der [Fe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* (B).

Die hochgestellten Zahlen geben die Position der Cysteine in der Proteinkette des Apoproteins an.

Obwohl die Anwesenheit eines der Struktur dienenden CO auch für die CO-Dehydrogenase von *Rhodospirillum rubrum* postuliert wird (Heo *et al.* 2000), scheint die Anwesenheit von CO plus CN als Strukturelement ein einzigartiges Kennzeichen der Hydrogenasen zu sein (van der Spek *et al.* 1996, Pierik *et al.* 1998). Die Anwesenheit der diatomaren Liganden in beiden Klassen der Hydrogenasen deutet darüber hinaus auf ein gemeinsames mechanistisches Prinzip der Katalyse hin (Adams und Stiefel 2000).

In Anbetracht der außergewöhnlichen Struktur des aktiven Zentrums und insbesondere des Vorhandenseins der niedermolekularen Liganden CO und CN als strukturelle Komponenten, stellen sich eine Reihe von Fragen, die die Biosynthese der metallenthaltenden Hydrogenasen betreffen. Aus diesen Fragestellungen werden in dieser Arbeit besonders diejenigen hervorgehoben, die sich mit der Herkunft und der biochemischen Synthese von CO und CN beschäftigen. Auch eine Untersuchung der an dieser Synthese beteiligten Enzyme ist Bestandteil dieser Arbeit. Ähnlich verhält es sich mit der Frage des Mechanismus des Transports und der Anlagerung der Liganden an das Eisen. Bevor die Bearbeitung dieser Fragestellungen vorgestellt wird, sollen hier biologische Mechanismen, die zur Bildung von

CN und CO führen, näher erörtert werden. Zuvor wird jedoch kurz auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von CO und CN eingegangen.

### **Physikalische und chemische Eigenschaften von CO und CN**

Das Kohlenmonoxid (CO) und das Cyanid-Anion (CN<sup>-</sup>) sind diatomare Kohlenstoff-Verbindungen, wobei das erste die Sauerstoff- und das zweite die Stickstoff-Verbindung des Kohlenstoffs darstellt. CO ist ein farb- und geruchloses Gas, das sich in Wasser nur geringfügig löst, seine physikalischen Eigenschaften entsprechen weitgehend denjenigen des N<sub>2</sub>. In Anwesenheit von Sauerstoff kann es weiter zu CO<sub>2</sub> oxidiert werden. CN<sup>-</sup> ist das Anion des Cyanwasserstoffs (HCN), das durch Neutralisierung der HCN-Säure entsteht. In wässriger Lösung zeigt es Ähnlichkeiten zu den Halogeniden. Durch ein mildes Oxidationsmittel wird das CN<sup>-</sup> zum Cyanat-Ion (OCN<sup>-</sup>) oxidiert, das in wässrigen Lösungen in CO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub> zerfällt. Sowohl CO als auch CN sind isoelektronisch zu N<sub>2</sub>.

Beide Moleküle haben eine starke Tendenz, sich an Metallionen anzulagern und Komplexe mit diesen zu bilden. So bilden Metalle und Verbindungen von Nebengruppenelementen mit CO sogenannte Metallcarbonyle, mit CN Cyanid-Komplexe. Diese Eigenschaft macht beide Moleküle zu potenten Zellgiften, da sie hochaffin an Metalloproteine in der Zelle binden können. Bereits mikromolare Konzentrationen von CN inhibieren stark die Cytochrom c Oxidase vieler Organismen, da das CN<sup>-</sup> an das Cu<sub>B</sub><sup>2+</sup> bindet (Wilson *et al.* 1994). Viele Metalloenzyme (Katalasen, Peroxidasen, Superoxid-Dismutasen, Nitrat- und Nitrit-Reduktasen sowie Nitrogenasen) werden ebenfalls von CN in ihrer katalytischen Aktivität inhibiert (Niven *et al.* 1975, Solomonson 1981).

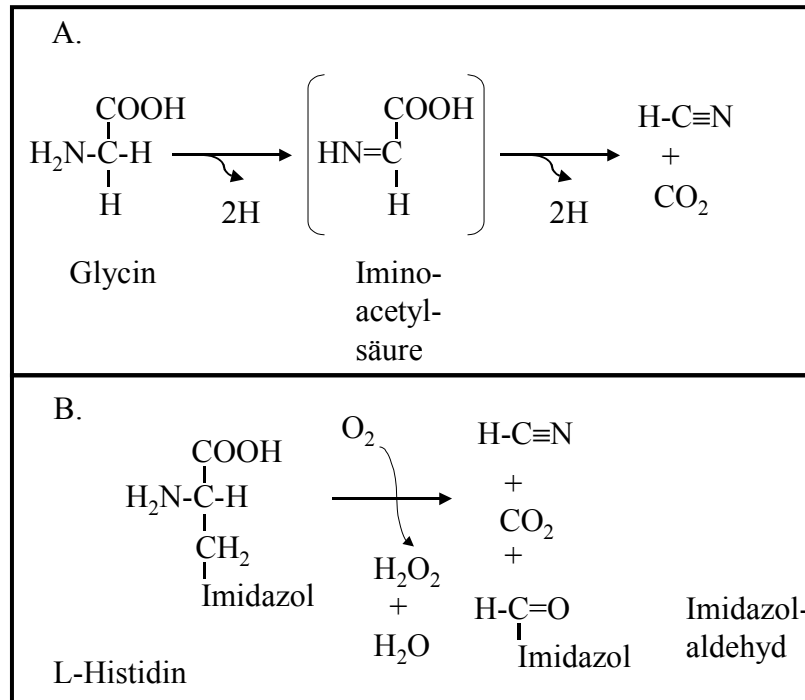
Cyanid und Azid reagieren mit der Ferriform des Häm a<sub>3</sub>; dagegen hemmt CO die Ferroform. Da das Fe der Häm-Gruppe meistens der Ferroform entspricht, beruht die Giftigkeit des CO auf seiner Eigenschaft hochaffin an Häm zu binden.

### **CN, ein Stoffwechselprodukt in biologischen Systemen**

Obwohl CN toxisch auf viele Lebensprozesse wirkt, wird es von einer Vielzahl von Organismen produziert und ausgeschieden. Dieser biologische Prozess wird als Cyanogenese bezeichnet, er ist bei Eubakterien, Pilzen, Farnen, höheren Pflanzen, und Insekten anzutreffen.

Bakterielle Cyanogenese ist für die Proteobakterien *Chromobacterium violaceum* und die fluoreszierenden Pseudomonaden (viele Stämme von *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* und

einige Isolate von *P. aureofaciens* und *P. chloraphis*), sowie für die Cyanobakterien *Anacystis nidulans*, *Nostoc muscorum* und *Plectonema boryanum* beschrieben worden (Castric 1981, Vennesland *et al.* 1981, Knowles und Bunch 1986). Auch einige Stämme von *Rhizobium leguminosarum* betreiben Cyanogenese, jedoch nur wenn sie nicht symbiontisch mit Leguminosen assoziiert sondern freilebend im Boden vorliegen (Antoun *et al.* 1998). *In vivo* Studien haben gezeigt, dass die Aminosäure Glycin die Vorläufersubstanz für die CN-Bildung durch Proteobakterien ist. HCN und CO<sub>2</sub> bilden sich stöchiometrisch in einer wenig verstandenen oxidativen Decarboxylierung des Glycins, die unter mikroaerophilen Bedingungen in der Zelle stattfindet (Abbildung 2A). Das diese Reaktion katalysierende Enzym ist die membrangebundene HCN-Synthase (E.C.: 1.4.99.-) (Michaels *et al.* 1965, Wissing 1974, Castric 1977). Aus dem *P. fluorescens* Stamm CHA0 konnte das Gen-Cluster, welches für die HCN-Synthase kodiert, isoliert und näher untersucht werden (Laville *et al.* 1998). Das Cluster besteht aus den drei Genen *hcnABC*, wobei jedes für eine Untereinheit des Enzyms kodiert. Über Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass diese drei HCN-Synthase-Untereinheiten Ähnlichkeiten zu denen bekannter Dehydrogenasen zeigen. HcnA besitzt Ähnlichkeiten zu einer Formiat-Dehydrogenase aus Clostridien und HcnB und HcnC zeigen Ähnlichkeiten zu Aminosäure-Dehydrogenasen beziehungsweise Aminosäure-Oxidasen. Diese Sequenz-Vergleiche weisen also darauf hin, dass die HCN-Synthase eine Aminosäure-Oxidase-Reaktion katalysiert (Wierenga *et al.* 1986). Frei lebende Rhizobien produzieren HCN vermutlich aus Glycin, wie durch Fütterungsversuche gezeigt werden konnte. Bei Zugabe von Glycin nimmt die HCN-Produktion nämlich zu (Antoun *et al.* 1998).



**Abbildung 2. HCN-Biosynthese in Eubakterien die Cyanogenese betreiben.**

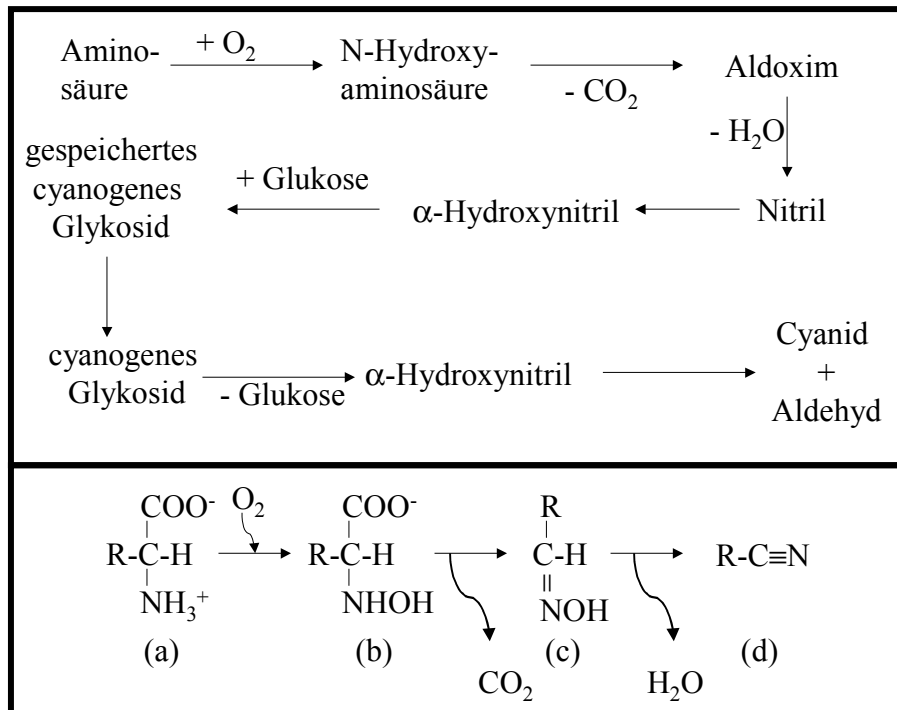
A. Mechanismus der HCN-Synthese aus Glycin durch Pseudomonaden nach Laville *et al.* (1998). B. L-Aminosäure-Oxidase/Peroxidase Reaktion nach Vennessland *et al.* (1981) durch *Anacystis nidulans*.

Cyanobakterien können mittels Aminosäure-Oxidasen, die mit Peroxidasen gekoppelt sind, HCN produzieren (Vennesland *et al.* 1981). So verwendet *Anacystis nidulans* L-Histidin als Vorläufersubstanz für HCN in einer Reaktion, die durch eine L-Aminosäure-Oxidase katalysiert wird. Ohne Peroxidase bildet sich hierbei das Imino-Derivat des Histidins, das weiter zu Imidazolpyruvat hydrolysiert. In Anwesenheit einer Peroxidase, wird ein Teil dieses Iminoderivates in HCN, CO<sub>2</sub> und Imidazolaldehyd umgewandelt (Abbildung 2B). Nach diesem Reaktionsmuster könnten auch weitere Aminosäuren als Ausgangssubstrat für die HCN-Synthese dienen.

In eukaryotischen Organismen ist die Biosynthese von CN aufgrund ihrer höheren Sensitivität und soweit bekannt immer an die Umwandlung von Glykosiden gebunden. Über 2500 Pflanzenarten bilden sogenannte cyanogene Verbindungen, die chemisch betrachtet den glykosidischen Verbindungen zugerechnet werden. Mittlerweile sind weit über 75 cyanogene Glykoside identifiziert worden. Viele von ihnen stellen einfache Glycoside dar, wie das Linamarin, Dhurrin oder Prunasin, aber auch Di- und Trisaccharide wie das Amygdalin, Viciacin und Xeranthin sind bekannt. Die CN-Bildung wird bei der pflanzlichen Cyanogenese über eine durch  $\beta$ -Glucosidase vermittelte Spaltung des cyanogenen Glykosids



initiiert, was zur Bildung von Zucker und Cyanohydrin führt. Das Cyanohydrin wird über eine Hydroxynitril-Lyase in HCN und den korrespondierenden Aldehyd oder das Keton umgesetzt. Die Biosynthese des CN am Glykosid verläuft aus Aminosäuren über den Weg, der in der Abbildung 3 schematisch aufgezeigt ist.



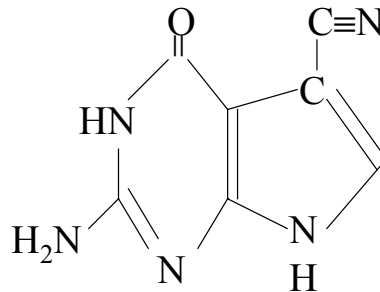
**Abbildung 3. Schematische Darstellung des biochemischen Weges der Biosynthese und des Abbaus eines cyanogenen Glykosids.**

**A.** Die Aminosäuren werden bis zur Stufe des  $\alpha$ -Hydroxynitrils umgewandelt, welches an Glukose gekoppelt wird und als cyanogenes Glykosid in den Vakuolen der Pflanze gespeichert vorliegt. Bei Verletzung oder Absterben des pflanzlichen Gewebes greifen freiwerdende Glykosidasen und eine Hydroxy-Nitrilase das cyanogene Glykosid an, so dass CN freigesetzt wird.

**B.** zeigt den Reaktionsablauf von der Aminosäure (a) bis zum Cyanid, der Vorstufe des  $\alpha$ -Hydroxynitrils. Die einzelnen Reaktionsprodukte sind die N-Hydroxy-Aminosäure (b), das Aldoxim (c) und das Nitril (d). Der Rest R der Aminosäure variiert je nach Pflanzenart.

Eine spezielle Form von biologisch relevantem CN wird in bestimmten tRNA-Spezies angetroffen. An Position 15 des D-Loops der tRNA von Archaea (Sprinzl *et al.* 1996) und Position 34 (erste Position des Anticodons) bei vier tRNAs (solche die Tyr, His, Asp und Asn übertragen) in Bakterien und eukaryotischen Organismen (Harada und Nishimura 1972) befindet sich eine modifizierte RNA-Base, die ein Guanodin-Derivat darstellt und strukturell zur Familie der 7-Deazaguanosine gehört. Eines davon, das 7-Cyano-Deazaguanosin, das

auch als preQ<sub>0</sub>-Base bezeichnet wird, beinhaltet die CN-Gruppe in seiner Struktur (Noguchi *et al.* 1978). Über die Biosynthese ist nichts bekannt (Kuchino *et al.* 1976); es dient jedoch als Vorläufersubstanz für die Bildung weiterer 7-Deazaguanosine (Okada *et al.* 1978).



**Abbildung 4. Struktur der preQ<sub>0</sub> Base.**

preQ<sub>0</sub> ist als modifiziertes Guanosin Bestandteil von tRNA-Spezies.

Die ökologische Rolle der Cyanogenese durch Bakterien ist wenig verstanden. Beobachtungen am Wurzel besiedelnden *P. fluorescens* Stamm CHA0 haben gezeigt, dass solche Pflanzen resistent gegenüber pilzbedingten Wurzelkrankheiten sind (Voisard *et al.* 1994). Auf eine Schutzfunktion für den Wirt deutet auch die Beobachtung hin, dass *P. aeruginosa* mit Defekten in der Cyanogenese Unfähigkeit der Bekämpfung von *Caenorhabditis elegans* erlangt (Gallagher und Manoil 2001). Andersgehende frühere Beobachtungen führen allerdings zum Schluß, dass es sich bei der Cyanid-Bildung möglicherweise um einen Virulenz-Faktor von pflanzenpathogenen Bakterien handelt (Goldfarb und Margraf 1967).

Interessant ist die postulierte Bedeutung der Cyanogenese für die Mobilisierung von Metall-Ionen aus schweren Lehmböden und zwar dadurch, dass CN stabile Komplexe mit biologisch relevanten Metallen ausbildet. So wurde in einem Fe-limitierten Kultur-Medium für *Pseudomonas sp.* die Anwesenheit eines gemischten Fe-Cyano-Komplexes (Dicyano-bis(pyridine-2,6-dicarbothiato)-Ferrate) nachgewiesen, der möglicherweise als reversibles Ferrate(II)/Ferrate(III) Redox-System fungieren kann (Hildebrand *et al.* 1985). Das Redoxpotential ( $E_0' = +0,400$  V) ist vergleichbar dem vieler Cytochrome, aber die physiologische Bedeutung dieses Komplexes bleibt noch unbekannt. In Farnen, höheren Pflanzen und Insekten wird Cyanid vorwiegend als Verteidigungsmittel gegen Fressfeinde eingesetzt. In einigen wenigen Fällen dient es jedoch auch als Vorstufe für die L-Asparaginsäure und somit als wichtige Stickstoffquelle (Lieberei *et al.* 1985). CN wird auch durch Bakterien (*P. fluorescens* NCIMB 11764) als Stickstoffquelle metabolisiert (von

Tigerstrom und Cambell 1996). Unter stickstofflimitierenden Wachstumsbedingungen sezernieren diese Bakterien hohe Mengen an  $\alpha$ -Ketoglutarat in die Umgebung, das nicht enzymatisch mit CN über eine nukleophile Additionsreaktion zu Cyanohydrin weiterreagiert, welches wiederum in den Zellen, vermutlich über eine CN-Oxidase zu  $\alpha$ -Ketoglutarat,  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  abgebaut wird (Kunz *et al.* 1998). Darüberhinaus findet bei einigen *P. fluorescens* Stämmen der CN-Abbau zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  über eine NADH-gekoppelte Cyanid-Oxygenase statt (Knowles 1988). CN kann darüber hinaus enzymatisch an Aminosäuren, Oligopeptide oder modifizierte Aminosäuren (Homocystin, Cystein, *o*-Acetylserin) angelagert werden und in den Stoffwechselweg der Cyanoaminosäuren (z.B.  $\beta$ -Cyanoalanin) eingeschleust werden (Brysk *et al.* 1969, Brysk und Ressler 1970, Rodgers 1982). Dieser Stoffwechselweg mündet anschließend in die Stoffwechselwege des Glutamats, Aspartats und Alanins.

Aufgrund der Toxizität des CN haben sich im Laufe der Evolution bei den Organismen CN-Detoxifikationsmechanismen ausgebildet. Diese Mechanismen beinhalten unter anderem die Ausbildung CN-insensitiver Atmungsketten (z.B. liegt das Eisen im Cytochrom c tief im Protein), enzymatische Degradation oder Konjugierung an Akzeptor-Komponenten wie Cystein-Resten, Thiosulfat oder  $\alpha$ -Ketosäuren (Everd und Harnett 1988, Knowles 1988, Raybuck 1992, Kunz *et al.* 1998). Das bekannteste System der Detoxifikation involviert das Enzym Rhodanese (Thiosulfat:Cyanid-Sulfotransferase, E.C.:2.8.1.1), das ein Schwefel-Atom vom Thiosulfat auf CN überträgt, wobei das schwach toxische Thiocyanat ( $\text{SCN}^-$ ) entsteht (Luo und Horowitz 1994, Nandi *et al.* 2000).

## CO bildende Stoffwechselwege in der Biologie

CO ist ein in der Atmosphäre natürlich, aber nur in Spuren vorkommendes Gas von geologischem Ursprung, dessen Konzentration in vulkanisch aktiven Gegenden erheblich erhöht ist. Inzwischen wird die Atmosphäre auch mit anthropogenem CO versetzt, das bei der „unvollständigen“ Verbrennung von organischem Material wie fossilen Energieträgern oder Holz entsteht. CO-Produktion ist aber auch ein natürlicher biologischer Prozess, der bei Pflanzen, Tieren und einigen Bakterienarten stattfindet. Primär führen hauptsächlich zwei Stoffwechselwege –mit diversen Variationen- zur CO-Bildung, während sekundär CO in einigen speziellen Stoffwechselforgängen als nicht enzymatisches, aber dennoch chemisch spontan gebildetes stoffwechselabhängiges Nebenprodukt anfällt.

Der erste der zwei Stoffwechselwege, der zur Bildung von CO führt, beruht auf folgender Reaktionsgleichung:



Diese Reaktion ist unter anderem ein wichtiger Bestandteil des Acetyl-CoA-Wegs der CO<sub>2</sub>-Fixierung, der in der physiologischen Gruppe der acetogenen Bakterien und anderer CO verwertender autotropher Bakterien (einiger Methanogener und einiger Sulfatreduzierer), bzw. in umgekehrter Richtung bei den acetoklastischen Methanogenen anzutreffen ist (Diekert 1988, Fuchs 1986, Ljungdahl 1986, Ragsdale 1991, Ragsdale *et al.* 1988, Wood und Ljungdahl 1991, Wood *et al.* 1986a, 1986b, 1986c). Diese in der Regel anaerob wasserstoffverwertenden Bakterien verwenden ein Nickel enthaltendes Enzym, die sogenannte CO-Dehydrogenase, um die oben aufgezeigte Reaktion zu katalysieren. Darüber hinaus besitzt es zusätzlich eine Acetyl-CoA-Synthetase-Aktivität.

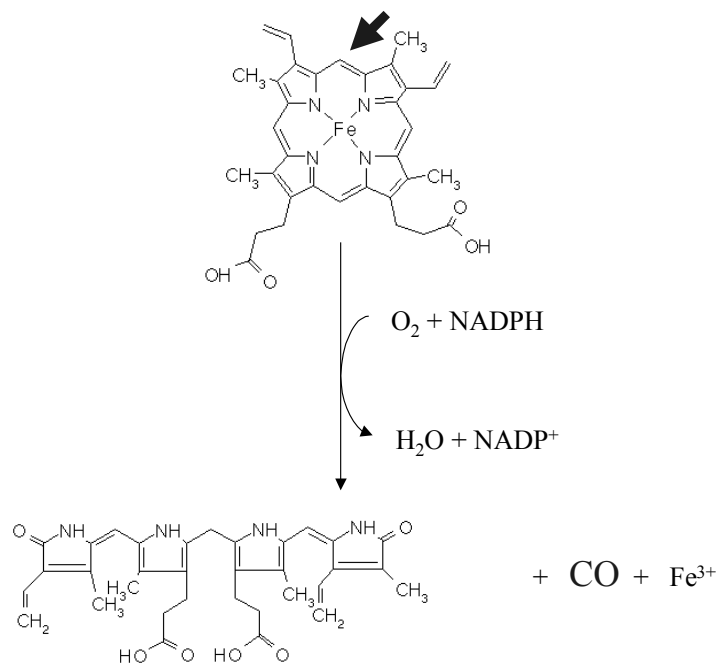
Das damit bifunktionelle Enzym CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase (CO-DH/ACS) spielt eine zentrale Rolle in dem auch als Ljungdahl-Wood bezeichneten Stoffwechselweg. Ein CO<sub>2</sub>-Molekül wird durch das Enzym zu CO reduziert, das die Carbonyl-Gruppe des Acetats liefert. Die Methylgruppe wird aus einem weiteren CO<sub>2</sub>-Molekül gebildet, das gebunden an Tetrahydrofolat bis zur Stufe des Methanols reduziert und anschließend mittels eines Corrinoid-enthaltenden Enzyms übertragen wird. Den letzten Schritt stellt der Transfer des Methyl-Restes auf die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase dar, die CO schon enzymgebunden enthält; die Verknüpfung des Methyl-Restes mit CO führt zu einem enzymgebundenen Acetyl-Rest, der durch einen Angriff von Coenzym A als Acetyl-CoA freigesetzt wird. In den acetoclastischen Methanogenen laufen die gleichen Reaktionen ab, jedoch in umgekehrter Richtung unter Bildung von CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> aus Acetat. Die CO-DH/ACS oxidiert dabei CO zu CO<sub>2</sub>. Die CO<sub>2</sub>-Reduktion findet am NiFe-S-Cluster statt (C-Cluster) (Anderson *et al.* 1993, Kumar *et al.* 1993), während die Acetyl-CoA-Synthese/Degradation am sogenannte A-Cluster abläuft (Kumar *et al.* 1993). Es wird angenommen dass beide Cluster über einen „Tunnel“ verbunden sind, der den CO-Transport vom C zum A-Cluster ermöglicht (Seravalli und Ragsdale 2000). Von Bedeutung ist auch die Tatsache, dass das CO nicht freigesetzt wird, sondern während aller Reaktionsschritte enzymgebunden vorliegt.

Es existiert jedoch auch eine Reihe von CO-DH, deren Funktion nicht an den Acetat-Metabolismus gekoppelt ist. Da die Reaktion von CO zu CO<sub>2</sub> exergon ist, kann eine Vielzahl von Bakterien CO verwerten und daraus Stoffwechselenergie beziehen. Diese meist in vulkanisch aktiven Gegenden anzutreffenden Bakterien gehören zu den Gattungen *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter* und *Azotomonas*. Sie besitzen das Molybdopterin-Eisen-Schwefel-Flavin enthaltende Enzym CO: Akzeptor-Oxidoreduktase

(Meyer und Schlegel 1983). Es katalysiert lediglich die Reaktion  $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ , wobei die gewonnenen Elektronen in eine Atmungskette eingeschleust werden und so zur Bildung von ATP über eine Atmungskettenphosphorylierung beitragen. Die gleiche Funktion übt in *Rhodospirillum rubrum* eine [FeNi]-haltige CO-DH aus, die es diesem Bakterium erlaubt, im Dunkeln mit CO als Energiequelle zu wachsen (Bonam *et al.* 1984, Kerby *et al.* 1995).

Weitere CO-DH-Unterarten sind in *Rubrivirax gelatinosus* (Uffen 1976), *Clostridium pasteurianum* (Drake 1982, Diekert *et al.* 1979), *Desulfovibrio desulfuricans* (Yagi 1958) und *Desulfovibrio vulgaris* (Lupton *et al.* 1984) beschrieben worden, die jedoch keine Kopplung mit dem Energiestoffwechsel oder dem Acetyl-CoA-Weg besitzen.

Der zweite Stoffwechselweg, der zur Bildung von CO führt, ist die oxidative Spaltung der  $\alpha$ -Methinbrücke des Häm-Tetrapyrrolringes. Dabei entsteht Biliverdin, ein lineares Tetrapyrrol. CO das beim Tetrapyrrol-Abbau gebildet wird, wird freigesetzt. Was diesen Abbau bemerkenswert macht, ist die Tatsache, dass die Reaktion durch ein Enzym mit Monooxygenase-Aktivität katalysiert wird, das zusätzlich für die Spaltungsreaktion  $\text{O}_2$  und NADPH benötigt, wobei die obligatorische Abhängigkeit von  $\text{O}_2$  kennzeichnend ist. Die Monooxygenase, die hier katalytisch wirkt, wird als Häm-Oxygenase bezeichnet (E.C.:1.14.99.3). Pro gespaltenem Häm-Molekül wird stöchiometrisch CO gebildet (Abbildung 5).



**Abbildung 5. Abbau von Häm zu Bilirubin.**

Der erste Schritt beim Abbau der Hämgruppe zu Bilirubin besteht in der Spaltung seiner  $\alpha$ -Methinbrücke (Pfeil). Dabei wird Biliverdin gebildet und Kohlenmonoxid freigesetzt.

Für tierische Zellen wurden zwei Formen der Häm-Oxygenase beschrieben (Cruse und Maines 1988, Sun *et al.* 1990). Die Synthese von Häm-Oxygenase-1 ist durch Häm induzierbar, das Enzym ist in hohen Konzentrationen in Milz und Leber anzutreffen. Häm-Oxygenase-2 ist nicht durch Häm induzierbar und in allen tierischen Geweben anzutreffen, mit besonders hohen Konzentrationen im Gehirn. Es konnte gezeigt werden, dass in vielen Bereichen des Gehirns CO gebildet wird und möglicherweise ähnlich wie das NO, das als Neurotransmitter zur Aktivierung von neuronaler Guanylcyclase benötigt wird, dient (Verma *et al.* 1993, Zakhary *et al.* 1997).

Cyanobakterien und Rotalgen produzieren durch die Häm-Oxygenase Reaktion auf die gleiche Art und Weise ebenfalls CO (Troxler und Dokos 1973) und zwar in der Synthese der prosthetischen Gruppen von Phycobiliproteinen (Phycocyanin, Phycoerythrin, Allophycocyanin). Auch an der Produktion des Phytochroms durch Pflanzen wird die Beteiligung der Häm-Oxygenase Reaktion favorisiert. Schließlich können hämolytische Stämme von *Streptococcus mitis* und *Bacillus cereus* aerob CO bilden, wenn Häm-Komponenten oder Hydroxy-Cobalamin dem Medium zugesetzt wird, vermutlich ebenfalls aus der Häm-Oxygenase Reaktion (Engel *et al.* 1972, 1973).

In Pflanzen wurde die Existenz einer Decarboxylase beschrieben, welche Aldehyde (z.B. Oktadecanal) zu Alkanen (Heptadekan) oxidiert mit der begleitenden stöchiometrischen Bildung von CO (Cheebrough und Kolattukudy 1984). Der genaue Mechanismus dieser Reaktion ist nicht verstanden. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Ascorbinsäure und O<sub>2</sub> die Rate der Reaktion zwar erhöht, dass ein Fehlen jedoch keinen Einfluß auf die Reaktion hat (Khan und Kolattukudy 1974).

In den bisher beschriebenen Stoffwechselwegen kommt es zur einer enzymatischen CO-Bildung. Es gibt jedoch auch einige Enzymreaktionen, bei denen CO nicht das eigentliche Produkt der Reaktion darstellt, sondern sekundär spontan und rein chemisch aus den enzymatisch gebildeten Produkten entsteht. Mehrere Stämme von *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* und *Morganella morganii* sind zum Beispiel fähig, aus den aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und aus Histidin unter aeroben Bedingungen CO zu bilden. Diese CO-Bildung wird durch die Anwesenheit von Häm gesteigert. Es wird vermutet, dass Aminosäuren dabei durch bakterielle L-Aminosäuren-Oxidasen (E.C.: 1.4.3.2) zu den korrespondierenden Oxosäuren umgewandelt werden, wobei aus diesen in Anwesenheit von Häm und O<sub>2</sub> spontan (unter anderem) CO freigesetzt wird (Hino und Tauchi 1987). In einer chemisch ähnlich ablaufenden Reaktion konnte eine geringe CO-Bildungsrate durch die Inkubation von Dihydroxyphenylalanin mit einer Tyrosinase aus Säugetierzellen

beobachtet werden (Miyahara und Takahashi 1971). *Klebsiella pneumoniae* und *E. coli* bilden CO aus einer Substanz die als Komponente III ( $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-C(OH)=CH-O}^-$ ) bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um ein Intermediat der Konversion von 5'-Methylthioadenosin zu Methionin. Aus ihr kann durch ein als E-2 bezeichnetes Enzym ein Molekül CO gleichzeitig mit einem Molekül Methylthiopropionsäure und einem Molekül Formiat gebildet werden. Bei der Verwendung des Desthioanalogons der Komponente III (Komponente IIIa) entstehen ebenfalls CO, Formiat und Butyrat. Die Reaktionen laufen nur bei Anwesenheit von Sauerstoff ab, wobei die Anlagerung von  $\text{O}_2$  an die Komponente III intramolekular zum spontanen Zerfall der Substanz in CO und die Säuren führt (Wray und Abeles 1993).

Schließlich wird angenommen, dass beim Lignin-Abbau bei der Ausbildung der intermediären Radikale durch die Mn-abhängige Lignin-Peroxidase ebenfalls CO spontan aus den phenolischen Lignin-Komponenten bei  $\text{O}_2$ -Anwesenheit gebildet werden kann (Madigan, 2001).

### **Befunde zur CO- und CN-Bildung in der Hydrogenasereifungskaskade**

Da [NiFe]- und [Fe]-Hydrogenasen, wie oben schon beschrieben wurde, CO und CN im aktiven Zentrum in konstantem Verhältnis als Liganden tragen, müssen Reaktionsmechanismen existieren, die ihre stöchiometrisch korrekte Bildung aus Vorläufersubstanzen bewerkstelligen. Da über die Biosynthese aktiver [Fe]-Hydrogenasen noch nichts bekannt ist, während das Studium der [NiFe]-Hydrogenasen ein intensives Forschungsfeld darstellt, finden Untersuchungen zur CO-/CN-Biosynthese derzeit nur am Beispiel des [NiFe]-Enzyms statt. Die Verfütterung von  $^{15}\text{N}$ -markiertem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bzw.  $^{13}\text{C}$ -markiertem  $\text{NaHCO}_3$  in Minimalmedium-Kulturen von [NiFe]-Hydrogenase enthaltenden *Chromatium vinosum* führte über FTIR-Analyse zur Erkenntnis, dass 98% des CN-Kohlenstoffs und CN-Stickstoffs aus dem markierten  $\text{NaHCO}_3$  bzw.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  stammt. In den  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Hydrogenase-Protein stammte jedoch lediglich 1/5 (22%) des CO-Kohlenstoffs aus dem markierten  $\text{NaHCO}_3$ . Diese Beobachtung führte zum Schluß, dass der Kohlenstoff des CN vollständig aus Bicarbonat stammen könnte, während dies für CO anscheinend nicht der Fall ist (Pierik *et al.* 1998). Was dabei der eigentliche Vorläufer für die Bildung von CO und CN ist, konnte über diese Versuche nicht bestimmt werden.

Wird nach dem Mechanismus der oben aufgeführten Reaktionen gesucht, so fällt auf, dass lediglich die Reaktion der CO-DH unter  $\text{O}_2$ -limitierenden Bedingungen ablaufen kann,

während alle anderen molekularen Sauerstoff benötigen. Da die Vielzahl der Hydrogenasen sensitiv gegenüber  $O_2$  sind und ihre Biosynthese hauptsächlich im Anaeroben erfolgt, muss möglicherweise für die Bildung von CO und CN in der Hydrogenasereifung nach Reaktionen gefahndet werden, die unter  $O_2$ -freien Bedingungen ablaufen können. Zusätzlich soll der Bildungsmechanismus nicht auf die massive Synthese von CN oder CO abzielen (wie dies z.B. für die Cyanogenese der Fall ist), sondern es ist notwendig, die Liganden stöchiometrisch korrekt zu bilden und spezifisch als strukturelle Komponente einzubauen.

Tatsächlich konnte in *Rhizobium leguminosarum* ein akzessorisches Protein identifiziert werden (HypX), welches möglicherweise Hinweise auf die Herkunft der Liganden liefert (Rey *et al.* 1996). Es weist zwei interessante Domänen auf. Während eine N-terminal liegende Domäne Ähnlichkeiten zu Proteinen aufweist, die  $N^{10}$ -Formyltetrahydrofolat übertragen bzw. als Substrat verwenden, zeigt eine C-terminal liegende Domäne Ähnlichkeiten zu Proteinen der Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase Protein-Familie. Diese Ähnlichkeiten deuten an, dass HypX folgende Funktionen haben könnte: die Bindung des C1-Donors  $N^{10}$ -Formyltetrahydrofolat mit dem Transfer der C1-Einheit auf einen unbekanntem Akzeptor und die Katalyse einer Reaktion, in der die Polarisierung einer C=O-Bindung eines X-CO-SCoA Substrates involviert sein könnte (Rey *et al.* 1996). Da das Vorhandensein dieses zusätzlichen Proteins auf *Rhizobium leguminosarum* (Rey *et al.* 1996), *Ralstonia eutropha* (Burkhe und Friedrich 1998), *Bradyrhizobium japonicum* und *Aquifex aeolicus* beschränkt ist, alle Bakterien, die Hydrogenasen unter Aerobiose synthetisieren, ist es möglicherweise ein Bestandteil einer nur aerob ablaufenden Reifungsreaktion.

Aufgrund der komplexen Struktur des bimetallischen-Zentrums erfordert der Metall-Einbau in [NiFe]-Hydrogenasen eine posttranslationale Reifungsmaschinerie, die durch akzessorische Proteine bewältigt wird. Im Falle von *E. coli* wurden sechs Gene identifiziert, welche aufgrund der pleiotropen Effekte ihrer Genprodukte auf die Ausbildung der Aktivität der drei *E. coli*-Hydrogenasen als *hyp*-Gene bezeichnet wurden (Lutz *et al.* 1991, Maier *et al.* 1996). Sie umfassen fünf Gene in einem Operon (*hypABCDE*), wobei zwei (*hypA* und *hypC*) signifikant homolog zu Genen im *hyb*-Operon (jeweils *hybG* und *hybF*) sind und ein weiteres vom Operon getrenntes, mit *hypF* bezeichnetes Gen. Der Verlust eines der *hyp*-Gene führt zur Anhäufung der großen Untereinheit in einer unfertigen Vorläuferform und damit zum Verlust der Hydrogenase Aktivität (Jacobi *et al.* 1992, Maier *et al.* 1996). Welche Funktionen während der Hydrogenasereifung die *Hyp*-Genprodukte zu erfüllen haben, ist noch



weitgehend unbekannt. Durch Markierungsstudien mit  $^{63}\text{Ni}$  wurde gezeigt, dass das Fehlen einzelner *hyp*-Gene die Nickel-Inkorporation in HycE verhindert; sie müssen deswegen an der ordnungsgemäßen Ausbildung des Metallzentrums beteiligt sein. Für das HypB-Protein konnte gezeigt werden, dass es GTPase Aktivität besitzt (Maier *et al.* 1993). Eine Deletion im *hypB*-Gen kann durch erhöhte Gaben von Nickel im Medium komplementiert werden, deswegen nimmt man an, dass HypB Nickel bindet und an HycE abgibt (Maier *et al.* 1995). Für HypD wurde das Vorhandensein eines [FeS]-Zentrums nachgewiesen (Jacobi 1994, Drapal 1998) und auch dem HypA wurde der Besitz eines [FeS]-Zentrums zugeschrieben (Rossmann 1995). HypC interagiert mit dem noch nicht gereiften Vorläuferprotein HycE (Drapal und Böck 1998) und für HypF (Zimmermann 1996) konnte eine spezifische Beteiligung am Nickeleinbau gezeigt werden (Maier *et al.* 1996). Für HypE liegen noch keine Erkenntnisse vor. In allen Organismen, die [NiFe]-Hydrogenasen besitzen wurden Gene nachgewiesen, die homolog zu denen des *hyp*-Operons von *E. coli* sind und in vielen Fällen sind sie sogar Bestandteil des Hydrogenase-Operons selbst (Maier und Böck 1996b, Vignais *et al.* 2001).

Weitere an der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen beteiligte Gene liegen im *nik*-Operon, das fünf Gene (*nikABCDE*) enthält (Wu *et al.* 1989, Navarro *et al.* 1993). Es kodiert für einen ABC-Transporter, der für Nickel spezifisch ist; damit beeinflussen Mutationen im *nik*-Operon die Hydrogenase-Aktivität. Des weiteren wurde auch die Beteiligung der Chaperone GroES und GroEL an der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen postuliert (Rodrigue *et al.* 1996).

Der exakte posttranslationale Ablauf der Reifungskaskade der [NiFe]-Hydrogenasen war am Beginn der Arbeit noch weitgehend unbekannt. Lediglich der letzte Reaktionsschritt, die C-terminale Prozessierung der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenasen war relativ gut verstanden. Diese C-terminale Prozessierung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 aus *E. coli* wird dabei von der spezifischen Protease HycI katalysiert und sie führt in diesem Fall zu einem um 32 Aminosäuren verkürzten (prozessierten) reifen HycE-Protein. Es wird davon ausgegangen dass dieser Schritt erst nach der Ausbildung des [NiFe]-Metallzentrums im Apoprotein stattfindet und zu der beschriebenen Internalisierung des Zentrums führt (Rossmann *et al.* 1994, Rossmann *et al.* 1995, Maier und Böck 1996a).

Es war das vorrangige Ziel der vorliegenden Dissertation, die Herkunft der CO/CN-Liganden und die an ihrer Synthese beteiligten Mechanismen zu untersuchen. Darüber hinaus

erfolgte aufbauend auf der kristallographischen Analyse der Hydrogenase-spezifischen Protease HybD (Protease der Hydrogenase 2) aus *E. coli* eine biochemische Untersuchung des homologen HycI-Proteins (Protease der Hydrogenase 3). Diese Untersuchung war Teil eines langfristig angelegten Projekts, welches in Zusammenarbeit mit Erich Fritsche aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Huber stattfand. Während Herr Fritsche für den kristallographischen Teil im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried verantwortlich war, fanden die biochemischen Arbeiten als Teil dieser Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie statt.

## MATERIAL UND METHODEN

### 1. Mikrobiologische Methoden

#### 1.1. Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme mit ihrem Genotyp aufgelistet. Mit Ausnahme von BL21(DE3), der ein *E. coli* B Derivat ist, leiten sich die andere Stämme von *E. coli* K12 ab. Tabelle 2 enthält eine Zusammenstellung der Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 1.: Verwendete *E. coli* Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , <i>hsdS</i> , <i>gal</i> , λDE3	Studier und Moffat 1986
DH5α	F <sup>-</sup> <i>supE44</i> λ <sup>-</sup> <i>rfbD1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>spoT1</i> <i>hsdR17</i> <i>thi-1</i> Δ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169</i> φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i>	Woodcock <i>et al.</i> 1989
JM109	F' ( <i>tra</i> Δ36 <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> ZΔ <i>M15</i> ) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>relA1</i> <i>supE44</i> Δ( <i>lac-proAB</i> )	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> D( <i>argF-lac</i> ) <i>U169</i> <i>rpsL</i> 150 ( <i>Str</i> <sup>R</sup> ) <i>relA1</i> <i>flB5301</i> <i>deoC1</i> <i>ptsF25</i> <i>rbsR</i> , λ <sup>-</sup>	Casadaban und Cohen 1979
P4X	Hfr, <i>metB1</i> , <i>relA1</i> , λ <sup>+</sup>	Graham <i>et al.</i> 1980
HD705	MC4100, Δ <i>hycE</i>	Sauter <i>et al.</i> 1992
HD709	MC4100, Δ <i>hycI</i>	Binder <i>et al.</i> 1996
NCI900	MC4100, Δ <i>hycI</i> , <i>nikA::MudI</i>	Maier und Böck 1996a
SM101	MC4100, <i>hypA</i> (ATG->TAA)	Jacobi <i>et al.</i> 1992
DHP-B	MC4100, Δ <i>hypB</i>	Jacobi <i>et al.</i> 1992
DHP-C	MC4100, Δ <i>hypC</i>	Jacobi <i>et al.</i> 1992
DHP-D	MC4100, Δ <i>hypD</i>	Jacobi <i>et al.</i> 1992
DHP-E	MC4100, Δ <i>hypE</i>	Jacobi <i>et al.</i> 1992
DHP-F	MC4100, Δ <i>hypF</i> (bp 289 bis 629 des <i>hypF</i> )	Maier <i>et al.</i> 1996

NPF600	DHP-F, <i>nik ::MudI</i>	Maier und Böck 1996a
JEF8	<i>thr-31, ΔcarB8, relA1, metB1</i>	Mergeay <i>et al.</i> 1974
JEF8 λ <sup>-</sup>	<i>thr-31, ΔcarB8, λ<sup>-</sup>, relA1, spoT1, metB1</i>	Mergeay <i>et al.</i> 1974
ΔCarAB	MC4100, <i>ΔcarAB</i>	diese Arbeit
DHP-F2	MC4100, <i>ΔhypF</i> (bp 59 bis 629 des <i>hypF</i> )	diese Arbeit

**Tabelle 2.: Verwendete Plasmide**

Vektor	Genotyp	Referenz
pBR322	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Balbas <i>et al.</i> 1977
pACYC184	Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Chang und Cohen 1978
pMAK700	Cm <sup>R</sup>	Hamilton <i>et al.</i> 1989
pUC18	Ap <sup>R</sup> , <i>lac 'IPOZ'</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
pUC19	Ap <sup>R</sup> , <i>lac 'IPOZ'</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
pASK-IBA2	Ap <sup>R</sup>	IBA GmbH
pASK-IBA5	Ap <sup>R</sup>	IBA GmbH
pCarAB	pBR322, <i>carAB</i> mit 200 bp Flanken, <i>HindIII/BamHI</i> -Fragment	diese Arbeit
pΔCarAB	pCarAB mit 3530 bp Deletion in <i>carAB</i>	diese Arbeit
pMΔCarAB	pMAK700 mit <i>HindIII/BamHI</i> - Fragment aus pΔCarAB	diese Arbeit
pAF1	Cm <sup>R</sup> , pACYC184, 2,6 kb <i>EcoRI-HindII</i> Fragment ( <i>hypF</i> )	Maier <i>et al.</i> 1996
pUCF18	Ap <sup>R</sup> , pUC18, 2,6 kb <i>EcoRI-HindII</i> Fragment ( <i>hypF</i> )	Zimmermann 1996
pAdelF1	Cm <sup>R</sup> , pAF1 1,7 kb <i>MunI-DraIII</i> Deletion	diese Arbeit
pMΔHypF2	Cm <sup>R</sup> , pMAK700, 0,9 kb <i>BamHI</i> - <i>BamHI</i> Fragment aus pAdelF1	diese Arbeit
pIBA2F-C	pASK-IBA2, <i>hypF</i>	diese Arbeit
pIBA5F-N	pASK-IBA5, <i>hypF</i>	diese Arbeit
pFR23E	pAF1 das für HypF-R23E kodiert	diese Arbeit
pFR23Q	pAF1 das für HypF-R23Q kodiert	diese Arbeit
pFR23K	pAF1 das für HypF-R23K kodiert	diese Arbeit

---

pFR23H	pAF1 das für HypF-R23H kodiert	diese Arbeit
pFR23EV17/21A	pAF1 das für HypF-R23EV17/21A kodiert	diese Arbeit
pFC112A	pAF1 das für HypF-C112A kodiert	diese Arbeit
pFC109/112A	pAF1 das für HypF-C109/112A kodiert	diese Arbeit
pFC162A	pAF1 das für HypF-C162A kodiert	diese Arbeit
pFC159/162A	pAF1 das für HypF-C159/162A kodiert	diese Arbeit
pFH475A	pAF1 das für HypF-H475A kodiert	diese Arbeit
pFH476A	pAF1 das für HypF-H476A kodiert	diese Arbeit
pFH479A	pAF1 das für HypF-H479A kodiert	diese Arbeit
pFH475/476A	pAF1 das für HypF-H475/476A kodiert	diese Arbeit
pFH475/476/ 478/479Y	pAF1 das für HypF-H475/476/ 478/479Y kodiert	diese Arbeit

---

## 1.2. Nährmedien und Supplemente

Für die Anzucht von Bakterien wurden flüssige Medien verwendet. Für feste Nährböden wurde wenn nicht anders angegeben Agar auf 1,2% zugesetzt.

LB-Medium (Miller 1992): 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl

TGYEP-Medium (Begg *et al.* 1977): 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,8% Glukose; 100 mM K-Phosphat pH 6,5

Das TGYEP-Medium wurde mit NiCl<sub>2</sub> auf 5 µM (falls nicht anders vermerkt), Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> auf 1 µM und Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> auf 1 µM supplementiert. Na-Formiat wurde (falls nicht anders vermerkt) in einer Konzentration von 15 mM eingesetzt.

WM-Minimalmedium (Fraenkel und Neidhart 1961) modifiziert:

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 µM NiCl<sub>2</sub>; 1 µM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; 1 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>

Antibiotika wurden zur Selektion von plasmidtragenden *E. coli*-Stämmen eingesetzt. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 150 µg/ml, Chloramphenicol in einer Konzentration von 30 µg/ml für pACYC184-Derivate und 15 µg/ml für pMAK-Derivate.

### 1.3. Aerobe und anaerobe Anzucht von Bakterien

Die aerobe Anzucht von *E. coli* wurde in Erlenmeyer-Kolben (100-2000 ml) durchgeführt, die zu 10-20% ihres angegebenen Volumens mit Medium befüllt waren. Die Kolben wurden in entsprechend temperierten Wasserbadschüttlern oder im Brutraum kräftig geschüttelt.

Die anaerobe Anzucht von *E. coli* wurde in Lebertranflaschen (150-250 ml) oder in Steilbrust-Flaschen (5l, 10l, 20l) durchgeführt. Die Flaschen wurden bis zum Rand mit Medium befüllt und nach Beimpfung als Standkulturen angezogen.

Auf festem Medium ausgestrichene *E. coli*-Zellen wurden aerob in Brutschränken inkubiert. Die Inkubationstemperatur betrug, wenn nicht anders angegeben, 37°C.

### 1.4. Bestimmung der Zelldichte

Das Wachstum der *E. coli*-Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) in einem Spektralphotometer (Beckman DU 640) verfolgt.

## 2. Genetische Methoden

### 2.1. Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation der *E. coli*-Zellen mit Ligationsansätzen für Klonierungen wurden die Zellen entweder nach der Rubidiumchlorid- (Hanahan 1985) oder Calciumchlorid-Methode (Maniatis *et al.* 1989) kompetent gemacht. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation (2000 V, 800 Ω, 25 µF) (Maniatis *et al.* 1989). Sollten isolierte Plasmide in Zellen transferiert werden, kam die TSS-Methode zum Einsatz (Chung *et al.* 1989).

### 2.2. Integration von definierten Mutationen in das *E. coli*-Chromosom

DNA-Fragmente mit definierten Mutationen ( $\Delta carAB$  oder  $\Delta hypF$ ) wurden in das Plasmid pMAK700 kloniert; nach erfolgter Transformation des zu mutierenden Bakterienstammes erfolgte über homologe Rekombination nach der Methode von Hamilton *et al.* (1989) die Integration des mutierten Gens in das Chromosom von *E. coli* durch Selektion auf Chloramphenicol-Resistenz (20 µg/ml) bei 44°C. Die Auflösung der Cointegrate wurde durch drei Passagen in Flüssigmedium bei 30°C erreicht. Danach konnten die Plasmide durch

Restriktion oder PCR auf das Vorliegen des Wildtyp-Allels bzw. des mutierten Alleles getestet werden.

### 3. Physiologische Methoden

#### 3.1. H<sub>2</sub>:Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität von ganzen Zellen

Der Überschichtungstest mit Benzylviologen erfolgte modifiziert nach Mandrand-Berthelot *et al.* (1978). Bakterien wurden auf TGYEP-Platten ausgestrichen und im Anaerobentopf unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre für 24 h bei 37°C angezogen. Die Wasserstoff-Atmosphäre wurde dabei durch dreimalige Entgasung und Begasung des Topfes bis auf einen Druck von 0,6-0,7 bar eingestellt. Der Aktivitätsnachweis erfolgte nach Entnahme der Platten durch Überschichtung mit Weichagar, der aus 0,75% Agarose und 1 mg/ml Benzylviologen gelöst in 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 bestand. Hydrogenase bildende Kolonien erscheinen nach der Überschichtung durch die Reduktion des Benzylviologens violett, die inaktiven blieben farblos.

#### 3.2. Nachweis der Fähigkeit auf H<sub>2</sub>-Bildung

Die Freisetzung von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> unter fermentative Bedingungen wurde durch 48-stündige, anaerobe Anzucht der Zellen bei 37°C als Standkulturen mit Vollmedium (LB, 0,8% Glukose als vergärbarem Substrat) untersucht. Das entstandene Gas wurde in umgedrehten Durham-Röhrchen gesammelt und als Gasblase visualisiert (Drews 1976). Eine Behandlung mit BaCl<sub>2</sub> in basisch eingestelltem Medium erlaubte die Unterscheidung, ob es sich beim freigesetzten Gas um H<sub>2</sub> oder CO<sub>2</sub> handelte.

#### 3.3. Bestimmung der Aktivitäten der Hydrogenasen 1, 2 und 3 in *E. coli*

Von Zellen aus anaeroben Anzuchten wurden mittels Passage durch eine French-Press-Zelle bei 118 Mpa und anschließende Zentrifugation bei 10.000 x g Rohextrakte präpariert. Diese wurden in Serum-Gläschen sofort durch mehrfaches Entgasen und Begasen mit N<sub>2</sub> unter anaerobe Bedingungen gebracht. Die Messung der Gesamtaktivität der Hydrogenasen von *E. coli* als H<sub>2</sub>:Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Ballantine und Boxer (1985) in anaeroben Küvetten, die mit H<sub>2</sub> begast wurden. Aus der gemessenen Extinktionsänderung bei OD<sub>600</sub>, wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für Benzylviologen (7400 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) sowie der nach Whitaker und Granum (1980) ermittelten Proteinkonzentration des Extraktes die spezifische Hydrogenase-Aktivität berechnet.

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1 Liste verwendeter Oligonukleotide

In Tabelle 4 sind die verwendeten Oligonucleotide sowie deren Verwendung aufgeführt.

**Tabelle 4.: Oligonukleotide**

---

#### Konstruktion der Deletion im *carAB*-Locus

<i>carAB</i> /HindIII	5'-ccc cca agc ttg tgc ctt aat gcc tgt aaa aca - 3'
<i>carAB</i> /BamHI	5'-cgc gga tcc ata tta aaa ttg tgg ata tat cga - 3'
tet/pBR	5'-cga ggc cct ttc gtc ttc aag aa-3'

#### Konstruktion der C-terminalen und N-terminalen HypF-Varianten

NtagII-BsaI	5'-atg gta ggt ctc agc gcc atg gca aaa aac aca tct tgc ggt - 3'
NtagII-EcoRV	5'-tcg cag gca aca tta ccc cga ctt cgt taa ggt cag ggg c- 3'
CtagII-XbaI	5'-gct cta gag tgc acc tgc agt ggc gct tcc ggg- 3'
CtagII-BsaI	5'-atg gta ggt ctc agc gct tcc gtt ctg gac ttc acc cgc- 3'

#### Konstruktion der HypF-Varianten durch gezielte Mutagenese

R23E,V17/20A(for)	5'-cag ggc gcg ggt ttt gaa ccg ttt gtc tgg - 3'
R23E,V17/20A(rev)	5'-cgc ttt gcc acg aat acg cag ttg gac - 3'
ACP-for-all (for)	5'-gtc tgg caa ttg gca cag caa tta aat ctt cac ggc - 3'
R23H(rev)	5'-tgc caa ttg cca gac aaa cgg atg aaa acc gac gcc - 3'
R23K(rev)	5'-tgc caa ttg cca gac aaa cgg ttt aaa acc gac gcc - 3'
R23Q(rev)	5'-tgc caa ttg cca gac aaa cgg ttg aaa acc gac gcc - 3'
R23E(rev)	5'-tgc caa ttg cca gac aaa cgg ttc aaa acc gac gcc - 3'
Cys109/112for	5'-gct gcc ctt gcc gaa atg aat acc - 3'
Cys109/112rev	5'-agg cgc agt agc ggc atc ggg aac - 3'
Cys112for	5'-gct act tgc cct gct gcg cta gcc g - 3'
Cys112rev	5'-gca ggg caa gta gcg gca tgc gga ac - 3'
SecCys-for-all (rev)	5'-cgc cgc cat cac ggt aaa cgg ccg gtc gta agg cat ggc - 3'
C159/162A(for)	5'-gtg atg gcg gcg ttt ccg cta gct ccg gcc gct gac aaa gag - 3'
C162A(for)	5'-gtg atg gcg gcg ttt ccg cta tgt ccg gcc gct gac aaa gag - 3'
HHH-for-all (for)	5'-gca gcg gca tgc ctg gca gag cat cag tgg ccg ctg g - 3'
H475A(rev)	5'-gca tgc cgc tgc atg ggc atg atg agc cag tac cgt ttg - 3'



H479A(rev)	5'-gca tgc cgc tgc agc ggc atg atg atg cag tac cgt ttg - 3'
H475,476A(rev)	5'-gca tgc cgc tgc atg ggc atg agc agc cag tac cgt ttg - 3'
H476A(rev)	5'-agc atg cag tac cgt ttg cgt cgg - 3'
H476A(for)	5'-cat gcc cat gca gcg gcg tgt ctg - 3'
4H4Yfor	5'-tat gcc tat gca gcg gcg tgt ctg - 3'
4H4Yrev	ata ata cag tac cgt ttg cgt cgg - 3'

#### 4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden für die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte aus jeweils 1,5 ml aerober Kultur nach der Methode von Holmes und Quigley (1981). Alternativ wurden zur Präparation besonders sauberer Plasmid-DNA für Sequenzierungen Kits wie der High Pure Plasmid Isolation Kit von Roche (Penzberg) oder der NucleoSpin Plasmid Isolation Kit von Macherey-Nagel (Düren) entsprechend den mitgelieferten Anweisungen verwendet.

#### 4.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente für Klonierungen wurden nach ihrer Auftrennung in Agarose-Gelen mit einem Skalpell ausgeschnitten und in gesättigter NaI-Lösung aufgelöst. Die anschließende Elution der DNA aus der Agarose/NaI-Lösung erfolgte über Adsorption an Glasmilch nach der Methode von Vogelstein und Gillespie (1979). Alternativ wurde der Quiagen Gel Extraction Kit (Hilden) entsprechend der mitgelieferten Anweisung verwendet.

#### 4.4 Enzymatische *in vitro*-Reaktionen an DNA

Für Klonierungen wurden die Plasmide und die zu klonierenden Fragmente enzymatischen *in vitro*-Reaktionen unterzogen. DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen restringiert. Die Rezirkularisierung von Vektor-Fragmenten während der Ligation wurde durch die Entfernung der 5'-ständigen Phosphatgruppen mit Hilfe der alkalischen Phosphatase vermieden. Die Phosphorylierung der Enden von PCR-Fragmenten (oder Oligonukleotiden) erfolgte mit Hilfe der Polynukleotid-Kinase. Das Glätten von überhängenden Enden an DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Klenow Fragments der DNA-Polymerase I. 5'-Überhänge wurden durch das Enzym mit Nukleotiden aufgefüllt, 3'-Überhänge in Abwesenheit von Nukleotiden entfernt. Die Ligation von DNA-Fragmenten mit den entsprechenden Vektor-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase.

Diese Reaktionen an DNA erfolgten jeweils nach den Angaben des Enzym-Herstellers.

#### 4.5 Sequenzierung von Plamid-DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte im Prinzip nach der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen enzymatischen Kettenabbruchethode, jedoch wurden an Stelle von radioaktivem  $\alpha$ -[<sup>35</sup>S]ATP fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt. Die Amplifikationsreaktion fand nach dem „Dye Terminator Cycle-Sequenzierung mit Ampli-Taq<sup>®</sup>“-Protokoll der Firma Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt) statt. Die Amplifikationsreaktion fand in einem Biometra Personal Cycler (Göttingen) oder einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 (Norwalk, USA) statt, wobei das Volumen der Reaktionsansätze 20  $\mu$ l betrug. Die Auftrennung der so erhaltenen DNA-Fragmente und die Datenauswertung erfolgte entweder über einen Sequenzautomaten (ABI PRISM<sup>™</sup> 377-DNA Sequenzer) oder über einen Kapillarsequenzierer (ABI PRISM<sup>™</sup> 310) (Foster City, USA).

#### 4.6 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten oder Plasmiden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), erfolgte in Reaktionsansätze, die je 20 pmol Primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 200  $\mu$ M jedes Desoxynukleosidtriphosphats enthielten. Als Matrize dienten chromosomale DNA oder isolierte Plamid-DNA. Sollte die PCR zum Nachweis erfolgreich eingeführter Deletionen in das Chromosom verwendet werden, wurden Zellen einer Kolonie direkt von einer Agarplatte abgenommen und eingesetzt. Als Enzym diente Goldstar Polymerase (Eurogentec, Belgien) oder das High Expand Fidelity PCR System (Roche, Penzberg) unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Puffers. Die Reaktionsansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und in einem DNA Thermal Cycler (Biometra, Göttingen) oder Perkin Elmer Cetus (Norwalk, USA) dem vom Hersteller für die Enzyme empfohlenen Temperaturprogramm unterzogen. Dieses beinhaltete generell 29 Vermehrungszyklen nach folgendem Schema: 94°C für Denaturierung (1 min), 50°C für Annealing (1 min) und 72°C für Extension (1,5 min/amplifizierte kb des DNA-Produktes). Für Produkte von mehr als 2 kb Länge wurde die Extension je Zyklus um 10 s verlängert und die Temperatur des Extensionsschrittes wurde auf 68°C eingestellt.

#### 4.7 Gezielte Mutagenese

Zur gezielten Einführung von Mutationen in ein Gen wurde die Methode der inversen PCR von Ochman *et al.* (1988) verwendet. Die dabei in entgegengesetzten Richtungen orientierten, mutierten Primer ermöglichen es durch Hybridisierung beim Annealing-Schritt, Punktmutationen in das Plamid gezielt einzubringen. Eine anschließende Religation führte

dann wieder zum intakten aber mutierten Plasmid. Alternativ wurde die Methode der überlappenden Primer nach Ansaldi *et al.* (1996) angewandt. Durch die Wahl der überlappenden Primer erfolgt eine Zirkularisierung des DNA-Moleküls durch homologe Rekombination.

## **5. Reinigung von Proteinen**

### **5.1 Reinigung von HybD- und HypC-Protein**

Die Präparation von homogenem HybD- und HypC-Protein für kristallographische Zwecke erfolgte jeweils nach Paschos (1997) bzw. Drapal (1998).

### **5.2 Reinigung von Strep-tagII-Proteinen**

Die Reinigung des mit Strep-tagII anfusionierten HypF-Proteins erfolgte nach den Angaben der Firma „Institut für Bioanalytik“ (IBA) (Göttingen). Dazu wurde die Streptactin-Agarose-Säule erst mit 100 mM Tris/Cl pH 8, 0,1 DTT äquilibriert. Nach Auftragen der Proteinlösung wurde sie mit 5 Volumina 100 mM Tris/Cl pH 8, 0,1 DTT gewaschen. Zusätzlich wurde mit einem Säulenvolumen 100 mM Tris/Cl pH 8, 0,1 DTT, 0,1 M NaCl gewaschen. Die Elution der Strep-tagII-Proteinvarianten erfolgte mit Elutionpuffer (100 mM Tris/Cl pH 8, 0,1 DTT, 3 mM Desthiobiotin).

Für die Reinigung von Strep-tagII-HypF wurden 500 ml Kultur des Stammes DHP-F2/pIBA5F-N angezogen. Die Anzucht erfolgte erst aerob bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0; anschließend wurde die Kultur auf Anaerobiose „umgeschaltet“, und indem sie in eine Kultur-Standflasche umgefüllt und weiter inkubiert wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression des N-Strep-tagII-HypF mit Anhydrotetracyclin induziert. Nach drei Stunden wurden die geernteten Zellen in 50 mM Tris/Cl pH 8,0 gewaschen und anschließend in 20 ml 100 mM Tris/Cl pH 8,0, 10 mM  $MgCl_2$ , 20  $\mu g/ml$  Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF) resuspendiert. Nach dem Zellaufbruch erfolgte die oben beschriebene Reinigung.

### **5.3 Reinigung von HypF-Protein**

Die Reinigung des HypF-Proteins erfolgte aus Zellen des mit dem Überexpressionsplasmid pUCF18 transformierten Stammes JM109. Die Anzucht der JM109/pUCF18 Zellen fand in 2 Liter Erlenmeyer-Kolben statt, die mit 300 ml LB-Medium gefüllt waren, das mit Ampicillin in einer Konzentration von 150  $\mu g/ml$  versetzt war. Nach Animpfung 1:100 aus einer Übernachtskultur wurde die Kultur kräftig bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 1,0 wurde die Produktion des HypF-Proteins durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach 3 h Wachstum erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation für 30 min bei 15000 x g.

Das erhaltenen Zellsediment wurde in 10 mM Tris/Cl pH 7,4 resuspendiert und einer erneuten Zentrifugation für 15 min bei 15000 x g unterzogen.

Das so gewaschene Zellsediment wurde auf 1/100 des Anzucht volumens in 10 mM Tris/Cl pH 7,4, (je nach Verwendung des HypF-Proteins mit oder ohne 1 mM DTT) luftblasenfrei resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µg/ml PMSF und 20 µg/ml DNase I erfolgte der Zellaufbruch durch zweimalige Passage in der French-Press-Zelle bei einem Druck von 118 Mpa. Der so erhaltene Rohextrakt wurde für 30 min bei 10000 x g zentrifugiert (S10). Der Überstand des S10-Extraktes wurde für 2 h bei 100 000 x g zentrifugiert (S100).

Der S100-Überstand wurde unter Kühlung luftblasenfrei einer Volumenbestimmung unterzogen und anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Whitaker und Granum (1980) vorgenommen. Anhand der ermittelten Proteinkonzentration wurde er mit eisgekühlten 10 mM Tris/Cl pH 7,4, (mit oder ohne 1 mM DTT) auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde die Proteinlösung unter langsamer Zugabe von fein gemörsertem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf eine Sättigung von 35% gebracht. Nach der Zugabe des  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wurde die Proteinsuspension noch mindestens 30 min gerührt und das entstandene Präzipitat wurde für 30 min bei 15000 x g abzentrifugiert. Das Proteinsediment wurde luftblasenfrei in einem Minimum des oben genannten Puffers resuspendiert und in einem Dialyseschlauch über Nacht bei 4°C gegen 3 l Puffer dialysiert.

Die chromatographische Proteinreinigung begann mit einer Anionenaustauschchromatographie an der Mono-Q HR 5/5 (1 ml; Pharmacia, Freiburg), die mit 10 mM Tris/Cl pH 7,4, (mit oder ohne 1 mM DTT) äquilibriert war. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde ein linearer Salzgradient von 0 bis 1 M NaCl bei einer Flussrate von 60 ml/h angelegt. Eluiert wurde mit 10 mM Tris/Cl pH 7,4, 1 M NaCl, (mit oder ohne 1 mM DTT); die Fraktionsgröße betrug 1,5 ml. Die Reinigung wurde anhand des Auftretens der Bande des überproduzierten HypF-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel kontrolliert. HypF enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und anschließend auf eine Ammoniumsulfatsättigung von 50% gebracht; das entstandene Präzipitat wurde bei 15000 x g (30 min) abzentrifugiert.

Das Proteinsediment wurde luftblasenfrei in einem Minimum an 10 mM Tris/Cl pH 7,4, 20%-Sättigung  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , (mit oder ohne 1 mM DTT) resuspendiert; es folgte eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie an einer Phenyl-Superose-Säule HR 5/5 (1 ml; Pharmacia, Freiburg), die zuvor mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde ein linearer Gradient von 0-20% Sättigung an  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei

einer Flussrate von 30 ml/h angelegt. Eluiert wurde mit 10 mM Tris/Cl pH 7,4, (mit oder ohne 1 mM DTT), die Fraktionsgröße betrug 1,5 ml. Die Reinigung wurde anhand des Auftretens der Bande des überproduzierten HypF-Proteins im SDS-Polyacrylamidgel kontrolliert. HypF enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und anschließend durch Ultrafiltration in Mikrosep-Mikrokonzentration-System (Pall-Filtron, Dreieich) aufkonzentriert.

Als letzte Säule kam die Superdex 200 XK 26/60 (330 ml; Pharmacia, Freiburg) zum Einsatz. Die Säule wurde mit 25 mM Tris/Cl pH 7,5, 100 mM NaCl, (mit oder ohne 1 mM DTT) äquilibriert und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min entwickelt; 1 ml Fraktionen wurden gesammelt, die über SDS-PAGE getestet wurden.

Reines HypF wurde nach Dialyse gegen 25 mM Tris/Cl pH 7,4, 100 mM NaCl, (mit oder ohne 1 mM DTT) und 50% Glycerin bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alternativ erfolgte auch die Lagerung als HypF-Sediment bei  $4^{\circ}\text{C}$  oder  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 6. Analytische Standardmethoden

### 6.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Trennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen (Sambrook *et al.* 1989) bei einer Spannung von 100 V. Als Laufpuffer diente TAE (40 mM Tris/Cl pH 8,0, 20 mM Essigsäure, EDTA 1 mM). Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurde die Agarose (je nach aufzutrennenden Bereich variierte die Agarosekonzentration zwischen 0,7-2% (w/v)) in Laufpuffer aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa  $60^{\circ}\text{C}$  wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt, um die im Gel aufgetrennte DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar zu machen. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt (50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau). Als Längenstandard diente ein Gemisch geeigneter Restriktionsfragmente von DNA.

### 6.2 Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Proteine wurden nach der Methode von Lämmli (1970) unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, die eine Acrylamidkonzentration von 10% aufwiesen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und einer Spannung von 150 V. Die Herstellung der SDS-Zelllysate erfolgte, indem sedimentierte Zellen aus 1 ml einer Kultur von  $\text{OD}_{600}$  1 in 100  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (Tris/Cl pH 6,8, SDS 2,5%, Glycerin 70%, Bromphenolblau 0,05%, DTT 400 mM oder 1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt wurden. Zellextrakte oder Proteinlösungen wurden mit 1/3 Volumen dreifach konzentrierten Probenpuffer versetzt und anschließend erhitzt.

### 6.3 Auftrennung von Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen

Die Auftrennung von Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Drapal und Böck (1998). Die Elektrophorese erfolgte wie bei der Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen, nur dass die Lösungen kein SDS enthielten und dass auf die Verwendung von  $\beta$ -Mercaptoethanol- bzw. DTT verzichtet wurde. Das Erhitzen der Proben entfiel ebenfalls, dafür erfolgte eine 10 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad.

### 6.4 Färbung der aufgetrennten Proteine

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine in den Gelen angefärbt

#### a) Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Homogenität von Proteinlösungen wurde über die Silberfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Blum *et al.* (1987) visualisiert.

#### b) Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden 30 min in Färbelösung (0,25% g Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg), 30% Methanol, 10% Eisessig, filtriert durch einen Cellulose-Filter) inkubiert. Zur Entfärbung der Gele wurde ein Lösung aus 30 % Methanol, 10% Eisessig verwendet.

#### c) Enzymatische Aktivitätsfärbungen von Gelen nach nicht denaturierender Gelelektrophorese

Der **Acylphosphatphosphatase-Aktivitäts-Nachweis** in Gelen erfolgte nach Mizuno *et al.* (1983). Das Gel wurde dazu in  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  kurz gewaschen und anschließend in 0,1 M Na-Acetat pH 7,1 für 10 min äquillibriert. Das Gel wurde in 20 ml 0,1 M Na-Acetat pH 7,1, 5 mM Acylphosphat für 15 min inkubiert und anschließend 2 mal kurz mit 0,1 M Na-Acetat pH 7,1 gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit 20 ml 0,4%  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  in 0,1 M Na-Acetat pH 7,1 so lange bis weiße  $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$  Banden sichtbar wurden. Dann wurde es fünf mal erst mit 0,1 M Na-Acetat pH 7,1 und anschließend mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  für 30 min gewaschen. Auf eine Fixierung der Banden mit  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  wurde verzichtet.

Die Detektion der **Hydrogenase-Aktivität** im Gel erfolgte über die Fixierung der  $\text{H}_2$ :Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität der Hydrogenasen. Dabei wurde das Polyacrylamidgel, das über nicht denaturierende Elektrophorese entwickelt wurde, in 100 mM

Na-Phosphat-Puffer pH 7.2 inkubiert. Zugabe von 0.5 mM Benzylviologen führte zur Sichtbarmachung und 1 mM Tetrazoliumchlorid erlaubte die Fixierung der Hydrogenaseaktivitäts-Zonen, wenn die Inkubation für 24 bis 48 h unter einer "sauerstofffreien" Atmosphäre erfolgte, die mindestens 4% Wasserstoff enthielt (Ballantine und Boxer 1985).

### **6.5. Bestimmung des Proteingehalts**

Der Proteingehalt von zellfreien Extrakten wurde durch die Messung der Extinktion bei 235 nm und 280 nm nach der optischen Methode von Whitaker und Granum (1980) ermittelt. Während der Proteinreinigung wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) mit Rinderserum-Albumin Fraktion V als Standard bestimmt. Bei der Präparation von gereinigten Proteinen wurde die Absorption der Lösung bei 280 nm bestimmt und die Proteinkonzentration über den molaren Extinktionskoeffizienten ermittelt. Dieser errechnet sich aus der Anzahl der Trp- und Tyr-Reste des Proteins, wobei dem Trp und Tyr jeweils ein Wert von 5600 und 1420 zugrunde gelegt und der molare Extinktionskoeffizient durch die Aufsummierung errechnet wurde. Die Proteinkonzentration der homogenen Proteinlösungen ergab sich anschließend aus dem Lambert-Beersche Gesetz:  $C = E / \epsilon \times d$ .

### **6.6 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt, wobei für eine  $A_{260}$ -Einheit eine DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  zugrunde gelegt wurde.

## **7. Biochemische Methoden**

### **7.1 *In vitro* Prozessierung von HycE**

Für die *in vitro* Versuche zur Prozessierung wurden membranfreie Zellextrakte verwendet. Nach Ernte der anaerob angezogenen Zellen bei einer  $OD_{600}$  von ca. 1 wurden sie in 50 mM Tris/Cl pH 7,4 gewaschen und anschließend in 1/100 Anzuchtvolumen Aufbruchpuffer (50 mM Tris/Cl pH 7,4, 1 mM EDTA) resuspendiert und bei einem Druck von 118 Mpa durch einmalige Passage durch die French-Press-Zelle aufgebrochen. Eine 30-minütige Zentrifugation bei 10 000 x g und eine anschließende zweistündige bei 100 000 x g ergab die membranfreien Rohextrakte.

### **7.2 Bestimmung der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität**

Die Carbamoylphosphat-Phosphatase Aktivität wurde über die Freisetzung von anorganischem Phosphat, welches nach der kolorimetrischen Methode von Heinonen und Lahti (1981) bestimmt wurde, verfolgt. In 1 ml Reaktionsgemisch bestehend aus 25 mM Tris/Cl pH 7,4, 1 mM Magnesium Acetate, 0,1 mM DTT, 50 µg Rinderserum-Albumin pro ml und Carbamoylphosphat in der angegebenen Konzentration wurde die Reaktion bei 30°C durchgeführt. In Intervallen von 5 bzw. 15 min wurden je 200 µl Proben entnommen, mit 40 µl 30 % Trichloressigsäure versetzt und für 2 min bei 12.000 g zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden in die Phosphatbestimmung eingesetzt.

### **7.3 Bestimmung der ATP hydrolysierenden-Aktivität von HypF**

Die Untersuchung der ATP Hydrolyse durch HypF erfolgte in 1 ml Reaktionsansätzen, die aus 50 mM Tris/Cl pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM DTT, 25 nM HypF, 50 µg Rinderserumalbumin pro ml, und  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP (spezifische Aktivität von 16,1 µCi/µmol) und Carbamoylphosphat in der angegebenen Konzentration zusammengesetzt war. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C inkubiert und 100 µl Proben wurden zu den angegebenen Intervallen entnommen. Die Proben wurden in 300 µl HClO<sub>4</sub>-gewaschener Aktivkohle suspendiert, für 1 min gut gemischt und anschließend zentrifugiert. Die Radioaktivität von 200 µl Überstand wurde im Szintilationszähler (Packard Tri-Carb 2100 TR Zähler, Meriden, USA) im <sup>32</sup>P-Kanal gemessen.

Alternativ erfolgte die Bestimmung der ATP hydrolysierenden Aktivität von HypF mittels Auftrennung der Produkte über Dünnschichtchromatographie. Dabei wurden nach Inkubation der Ansätze im zeitlichen Verlauf 2 µl Proben entnommen und auf eine Polyethyleniminfolie-Folie (PEI) (Merck Darmstadt) aufgetragen und in 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 3,4 entwickelt. Nach dem Trocknen der Folie wurde diese in einer Expositionskassette (Storage Phosphor Screen Molecular Dynamics) exponiert. Die Auswertung fand im Phosphor-Imager-Scanner Storm 840 statt (Molecular Dynamics, Sunny Valey, USA).

### **7.4 Untersuchung der Pyrophosphat-ATP-Austausch Reaktion durch Adsorption an Aktivkohle**

Die Untersuchung der Pyrophosphat-ATP-Austausch Reaktion durch HypF erfolgte in 1 ml Reaktionsansätzen die wie folgt zusammengesetzt waren: 50 mM Tris/Cl pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT, 0.1 mM ATP, 50 µg Rinderserum-Albumin pro ml, 0.1



mM [ $^{32}\text{P}$ ]PP<sub>i</sub> (spezifische Radioaktivität 25  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ), Carbamoylphosphat der jeweils angegebenen Konzentration und 62,5 nM HypF-Protein.

Nach einer Inkubationszeit von 2, 4, 8 und 16 min bei 37°C wurden 100  $\mu\text{l}$  des Ansatzes entnommen, zu 25  $\mu\text{l}$  14% HClO<sub>4</sub> gegeben, und mit 30  $\mu\text{l}$  12% Aktivkohle-Suspension (gelöst in 14% HClO<sub>4</sub>) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation erfolgte Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  1% Na-Pyrophosphat gelöst in 14% HClO<sub>4</sub>. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde der Ansatz auf befeuchtete (in 1% Na-Pyrophosphat gelöst in 14% HClO<sub>4</sub>) Glasfaserfilter überführt und mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Die Filter wurden zwei Mal mit je 5 ml eiskalter 1% Na-Pyrophosphat gelöst in 14% HClO<sub>4</sub>, einmal mit 5 ml eiskalter 1% Na-Pyrophosphat gelöst in 1,4% HClO<sub>4</sub> gewaschen und einmal mit 5 ml  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  nachgespült. Sie wurden 1 h bei 80°C im Trockenschrank getrocknet und ihre Radioaktivität wurde anschließend in 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold™ F (Packard, Meriden, USA) im Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 2100 TR Zähler, Meriden, USA) im  $^{32}\text{P}$ -Kanal gemessen.

## 8. Immunologische Methoden

### 8.1 Immunoblotanalysen

Die Proteine wurden durch PAGE aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch in einer Naßblot-Kammer (Bio-Rad, München) bei 90 V für 1 h bei 4°C auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schüll, Dassel) transferiert. Nach Anfärbung mit Amidoschwarz wurde die Transfereffizienz begutachtet; durch eine sich daran anschließende einstündige Behandlung mit 5% Magermilchpulver in TBS Puffer (20 mM Tris/Cl pH 7,6, 137 mM NaCl) wurden unspezifische Bindestellen abgesättigt. Nach einem Waschschrift mit TBS-T Puffer (TBS, 0,1% Tween 20) erfolgte die einstündige Behandlung mit Antikörpern, die in TBS-T Puffer verdünnt wurden. Nach einem erneutem Waschschrift erfolgte die Markierung der Antikörper mit an Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Protein A (1:3000 in TBS-T). Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems von Amersham Buchler (Braunschweig). Die an die Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase setzt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus einem dazugegebenen Reaktionsgemisch frei, welches das im Ansatz enthaltene Luminol oxidiert. Das entstehende Licht führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms.

## 9. Biophysikalische Methoden

Die kristallographische Analyse des HybD-Proteins wurde von E. Fritsche aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Huber im Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.

Der Metallgehalt von gereinigten Proteinen wurde von H. Hartl in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. Klüfers in der Chemischen Fakultät der Universität München über Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) und/oder Inductively Coupled Plasmonresonanz-Atomemissionsspektroskopie (ICP-AES) durchgeführt.

Die Massenspektroskopie von Proteinen oder Peptidfragmenten wurde von Dr. H. Sarioglou in der Arbeitsgruppe Dr. Dr. F. Lottspeich oder Dr. F. Siedler in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Oesterhelt im Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.

## **10. Computer unterstütztes Arbeiten**

### **10.1 Datenverarbeitung**

Die Auswertung von digitalisierten Autoradiogrammen, erfolgte mit dem Programm ImageQuant (Version 1.2, Molecular Dynamics, Krefeld). Gefärbte Polyacrylamid-Gele und Western-Blot-Exponate wurden mit einem Scanner (UMAX UC840) aufgezeichnet. Die anschließende Bildbearbeitung wurde unter Verwendung des Programms Adobe Photoshop 2.5 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) durchgeführt.

### **10.2 Bioinformatische Methoden**

Zur Sequenz-Analyse wurden die NCBI-Datenbank des National Institute for Health (Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und die ERGO-Datenbank von Integrated Genomics, Inc. (Internetadresse: <http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO/>) herangezogen.

DNA-Analysen wurden mit dem Programm GENEWORKS 2.5 (IntelliGenetics Inc.) oder Gene Tool Lite 1.0 (Bio Tools Inc.) durchgeführt. Proteinsequenzalignments wurden entweder mit GENEWORKS 2.5 (IntelliGenetics Inc.) oder mit MEGALIGN (DNASTAR Inc.) errechnet. Alle automatischen Alignments wurden "per Auge" falls notwendig nachkorrigiert.

## **11. Bezugsquelle von Enzymen und Chemikalien**

Enzyme zur Restriktion und Modifikation von DNA stammten von einer der folgenden Firmen: MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Stratagene (Heidelberg), Roche Biochemicals (Penzberg) und Eurogentec (Köln).

Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) oder Interactiva (Ulm) synthetisiert. Feinchemikalien stammten von Sigma (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt),

Serva (Heidelberg) und ICN Biomedical Inc. (USA). Das verwendete Acetylphosphat und die phosphorylierten Substanzen stammte von Sigma (Deisenhofen). Das verwendete Carbamoylphosphat war ein Dilithium-Salz, welches in einer Reinheit von 90-95% vorlag. Es stammte von Sigma (Deisenhofen) oder ICN Biomedical Inc. (Eschwege).  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP,  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP und [ $^{32}\text{P}$ ]-PP<sub>i</sub> wurden von PerkinElmer™ Life Sciences (Boston, USA), bezogen. Das Oligopeptid DPCMACVH wurden von Dr. M. Famulok nach der Festphasen-Methode im Genzentrum München-Planegg synthetisiert.

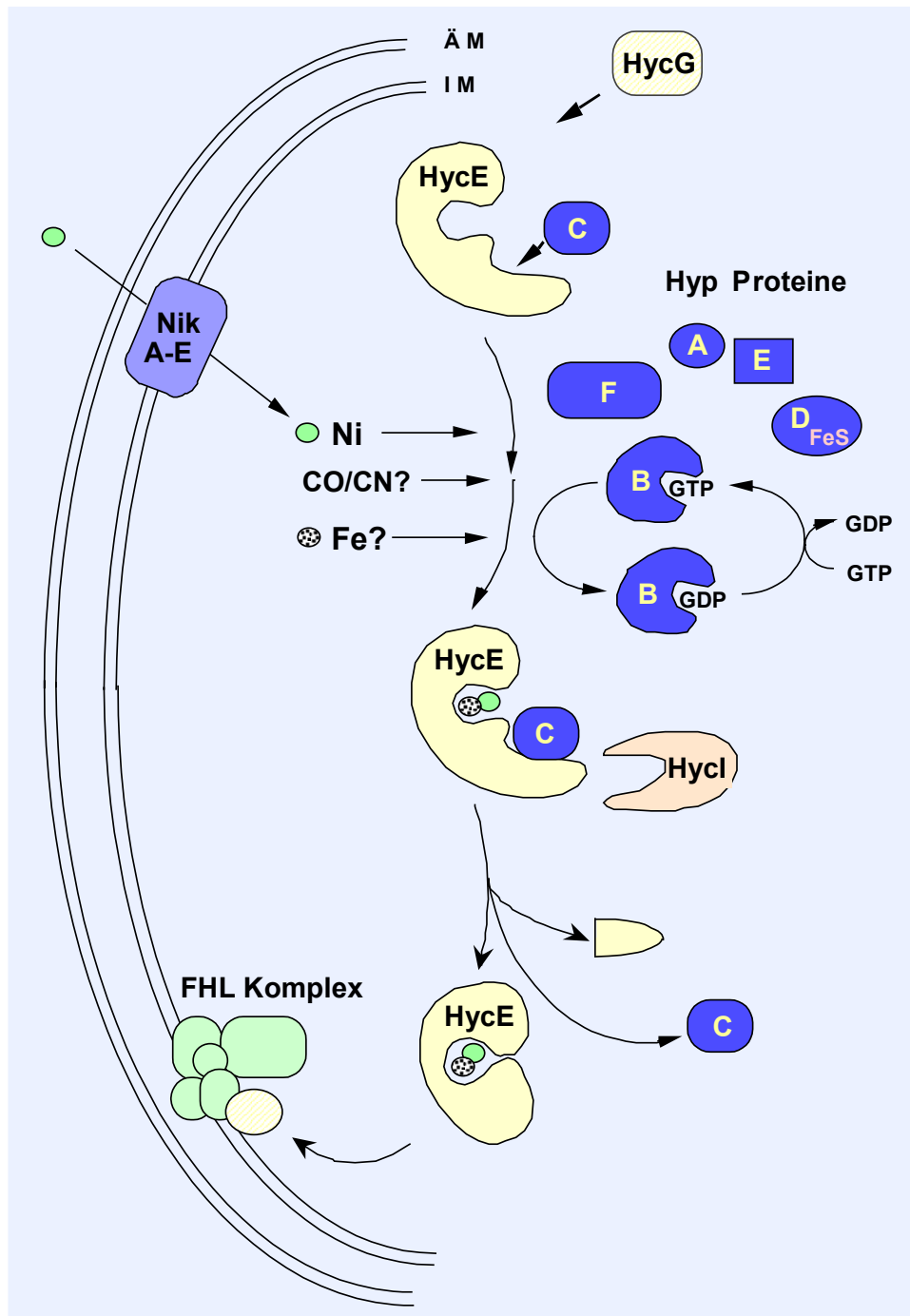
## ERGEBNISSE

### A 1. Bioinformatische Untersuchung der möglichen Funktion der Hyp-Proteine

Der Wissensstand über die Biosynthese von [NiFe]-Hydrogenasen beschränkte sich bis vor kurzem noch auf die Resultate der genetischen Untersuchung der beteiligten akzessorischen Komponenten und die phänotypische Charakterisierung von *hyp*-Deletionmutanten. Die Analyse der Metall-Zentrums-Biosynthese konzentrierte sich insbesondere auf die Untersuchung des Einbaus von Nickel, weil mit dem Einsatz des radioaktiven Nickel-Isotops  $^{63}\text{Ni}$  ein guter experimenteller Zugang vorlag. So konnte gezeigt werden, dass die Hyp-Genprodukte am Einbau des Metallzentrums in die große Untereinheit beteiligt sind (Jacobi *et al.* 1992, Maier *et al.* 1996) und dass die proteolytische Abspaltung des C-terminalen Peptides als spätes Ereignis der Hydrogenase-Reifung, erst nach dem Metall-Einbau, stattfindet (Rossman *et al.* 1994). Abbildung 6 zeigt die Information über den Ablauf der Biosynthese von [NiFe]-Hydrogenasen am Beispiel der Hydrogenase 3 aus *E. coli* anhand eines Reifungsschemas aus dem Jahre 1998.

Mit der Entdeckung von Eisen als zweitem Metall im aktiven Zentrum und seiner niedermolekularen Liganden (Volbeda *et al.* 1995, Van der Spek *et al.* 1996) wurde jedoch erkannt, dass die Metall-Zentrums-Biosynthese komplexer und koordinierter ablaufen muss. Durch die Anwesenheit der CO- und CN-Liganden wurden Fragen aufgeworfen, die die biochemische Natur ihrer Synthese betrafen und damit neue Funktionen für Hyp-Proteine implementierten.

Um die Funktionen der akzessorischen Komponenten in der Reifung zu studieren, wurden Expressionsplasmide konstruiert, mit deren Hilfe nach Überproduktion und Reinigung genügend homogenes Proteinmaterial gewonnen wurde, um eine biochemische Untersuchung zu erlauben. So erfolgte eine biochemische Charakterisierung des HypB- und danach des HypC-Proteins. Das HypB-Protein wurde als GTP-Hydrolase charakterisiert und die Bedeutung der GTP-Hydrolyse für die Metall-Zentrums-Synthese wurde nachgewiesen (Maier *et al.* 1993, Maier *et al.* 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zwischen der HycE Vorläuferform und dem HypC-Protein eine spezifische Interaktion stattfindet (Drapal und Böck 1998).



**Abbildung 6. Modell der Reifung der Hydrogenase 3 aus *E. coli* mit den daran beteiligten akzessorischen Proteinen und postulierten Reaktionswegen (nach Drapal und Böck 1998).** An das neusynthetisierte HycE-Apoprotein bindet HypC, um die Proteinkonformation „offen“ für den Einbau des Metalls zu halten (Drapal und Böck, 1998). Nach dem Nichteinbau erfolgt die Prozessierung durch die Protease HycI (Rossmann *et al.* 1994, Rossmann *et al.* 1995). Von den sechs Hyp-Proteinen liegt lediglich für das HypB-Protein eine biochemische Charakterisierung als GTPase vor (Maier *et al.* 1993, Maier *et al.* 1995).

Um eine Charakterisierung weiterer Hyp-Proteine vorzunehmen, mussten erst Anhaltspunkte für mögliche enzymatische Funktionen gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde die Proteinsequenz der einzelnen Hyp-Proteine einer bioinformatischen Analyse unterzogen. Durch die im Jahre 1997 neuentwickelten Suchprogramme PSI- (position-specific iterated) und Gapped-BLAST (Altschul *et al.* 1997), sowie die Verwendung leistungsstärkerer Rechner standen Hilfsmittel zur Verfügung die erfolgversprechend schienen. Darüber hinaus lagen mit dem Aufkommen der diversen Genom- und Proteom-Projekte eine Vielzahl neuartiger Referenzsequenzen vor, die in den verschiedenen Datenbanken hinterlegt waren. Die zur bioinformatischen Analyse benutzten Proteinsequenzen stammten von den Proteindatenbanken folgender Organisationen:

1. National Library of Medicine (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. Expert Protein Analysis System (Expasy) (<http://www.expasy.ch>)
3. Colibri (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri>)
4. ERGO IntegratedGenomics Inc. (<http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO>).
5. TIGR-Datenbanken (<http://www.tigr.org>)

In die Suche wurden nicht nur die Hyp-Protein-Sequenzen aus *E. coli* eingesetzt, sondern auch von Organismen, für die das Vorhandensein von akzessorischen Proteine beschrieben wurde. Tabelle 4 zählt die Mikroorganismen auf, deren Proteinsequenzen in der Sequenzanalyse Verwendung fanden. Es wurde darauf geachtet, dass durch die Einbeziehung verschiedener Gattungen die Signifikanz der Analyse erhöht wurde.

**Tabelle 4. Herkunft der Sequenzen der Hyp-Proteine, die in die bioinformatische Analyse einbezogen wurden.**

Reich	Gruppe	Ordnung	Gattung	Art	
Archaea	Euryarchaeota	Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus</i>	<i>fulgidus</i>	
		Methanococcales	<i>Methanococcus</i>	<i>jannaschii</i>	
		Thermococcales	<i>Pyrococcus</i>	<i>furiosus</i>	
			<i>Pyrococcus</i>	<i>horikoshii</i>	
Bacteria	Aquificales		<i>Aquifex</i>	<i>aeolicus</i>	
	Cyanobacteria	Chroococcales	<i>Synechocystis</i>	PCC6803	
		Nostocales	<i>Nostoc</i>	<i>punctiformis</i>	
	Firmicutes	<i>Bacillus/Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>	
	Proteobacteria	$\alpha$ -Ast		<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>
				<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>
				<i>Rhodobacter</i>	<i>capsulatus</i>
			<i>Rhodobacter</i>	<i>sphaeroides</i>	
		$\beta$ -Ast		<i>Ralstonia</i>	<i>eutropha</i>
		$\epsilon$ -Ast		<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>
$\gamma$ -Ast			<i>Azotobacter</i>	<i>vinelandii</i>	
		<i>Azotobacter</i>	<i>chroococcum</i>		
		<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		

Es wurden zwei Wege verfolgt. Der erste bestand darin, die gesamte Proteinsequenz auf Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen zu untersuchen, der zweite, die einzelnen akzessorischen Proteine aus verschiedenen Organismen zusammenfassend zu charakterisieren. Dazu wurde in den von verschiedenen Organismen stammenden Proteinen einer Hyp-Protein-Klasse nach konservierten Aminosäuresequenzen gefahndet. Wurden solche identifiziert, erfolgte anschließend eine Suche in der Proteindatenbanken auf bereits charakterisierte Protein-Familien, die diese Sequenzen ebenfalls aufwiesen. Konservierte Aminosäuresequenzen sollten dabei entweder auf ähnliche 3D-Strukturen hindeuten oder auf ähnliche enzymatische Reaktionsmechanismen hinweisen.

Da in der Reifung der Hydrogenasen im Falle von *E. coli* mindestens 6 akzessorische Proteine und eine Protease (Jacobi *et al.* 1992, Maier *et al.* 1996, Rossmann *et al.* 1995) beteiligt sind, wurden vorrangig diese Proteine der bioinformatischen Untersuchung unterzogen. Zusätzlich wurden die Sequenzen von Proteinen der CN- und CO-Biosynthese-Wege untersucht, mit besonderem Augenmerk auf HypX aus *R. leguminosarum* (Rey *et al.* 1996), von dem bereits bekannt war, dass soweit ersichtlich kein Homologes in *E. coli* anzutreffen ist.

## **A 2. Analyse der Sequenzen der HypA-, HypB- und HypC-Proteine**

Das auffälligste sequenzspezifische Kennzeichen der Proteine der HypA-Familie ist der Besitz eines konservierten Motivs mit der Struktur: C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>17-25</sub>-C-X<sub>2</sub>-C. Dieses cysteinhaltige Motiv erinnert an Zink-Finger, die DNA-Bindung oder in einigen Fällen Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln (Berg 1990). Die Sequenz mit dieser speziellen Anordnung vermittelt den HypA-Proteinen eine gewisse Ähnlichkeit zu den DnaJ-Chaperon-Proteinen, in welchen zwei Zn<sup>2+</sup>-bindende, cysteinhaltige Strukturen zur Erkennung von denaturierten Proteinen dienen (Szabo *et al.* 1996). In der Datenbank von Expasy (PDOC00962) wird als konserviertes Motiv der HypA-Familie die erweiterte Sequenz [GS]-x(4)-[LIVM]-x(4)-[LIVMF]-x(2)-[CSAM]-[LMFY]-x(6)-[STC]-x(4,5)-[PAC]-x-[LIVMF]-x-[LIVMF]-x(8)-C-x(2)-C angegeben, die sich N-terminal zum dem Cytein-Motiv befindet. Eine Suche nach HypA-ähnlichen Sequenzen in diversen Proteinen blieb erfolglos.

Die HypB-Protein-Familie wurde aufgrund der Anwesenheit sogenannter G-Domänen (Wittinghofer 1993, Bourne *et al.* 1991) den GTP hydrolysierenden Enzymen zugeordnet (Maier *et al.* 1993). Die Bedeutung der GTP-Hydrolyse für den Nickel-Einbau konnte in *E. coli* nachgewiesen und über Mutagenisierungsstudien genauer charakterisiert werden (Maier *et al.* 1995). Da die Domänenstruktur des HypB-Proteins detailliert untersucht wurde (Maier *et al.* 1993), soll hier lediglich die signifikante Ähnlichkeit zu den vermutlich GTP umsetzenden UreG-Proteinen der Urease-Reifung aufgeführt werden (Soriano *et al.* 2000, Soriano und Hausinger 1999, Moncrief und Hausinger 1997, Hausinger 1994).

Das HypC-Protein kann mit dem Vorläuferprotein der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 einen Komplex bilden, der akkumuliert, wenn die Reifung blockiert ist, wie es unter Nickelmangel oder Deletion des *hycI*-Gens der Fall ist (Drapal und Böck 1998, Magalon und Böck 2000). Die gleiche Funktion konnte für das *E. coli* Homologe HybG nachgewiesen

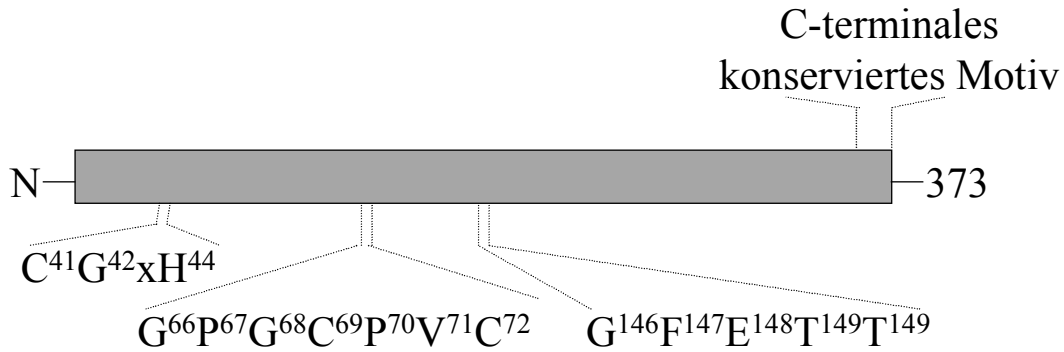


werden (Blokesch *et al.* 2001), das an die Bildung eines Komplexes mit der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 (HybG) beteiligt ist. Obwohl konservierte Reste (Cysteine und Histidine) vorhanden und notwendig für die Funktion sind (Magalon und Böck 2000), ergaben sich bei der Suche nach Homologien zu weiteren Proteinen keine Hinweise.

### A 3. Analyse der Sequenz des HypD-Proteins

Im HypD-Protein konnte das Vorhandensein von konservierten Cystein-Motiven, abgeleitet von der DNA-Sequenz bereits gezeigt werden (Jacobi 1994). Nach der Klonierung des *hypD*-Gens, Überproduktion und nachfolgender Reinigung konnte die Anwesenheit eines [FeS]-Zentrums nachgewiesen werden (Jacobi 1994, Drapal 1998), bei dem jedoch unbekannt ist, ob es sich um ein [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>] oder [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] handelt. Aufgrund seines unüblichen Elektrospinresonanz-Spektrums wird die Existenz eines [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]<sup>+</sup>-Zentrums favorisiert (Drapal 1998).

Die bioinformatische Analyse der HypD-Protein-Familie zeigt drei hochgradig konservierte Motive, von denen zwei nur in der HypD Protein-Familie anzutreffen sind (Abbildung 7). Diese Motive sind die GPGCPVC-Signatur und ein Motiv mit der Aminosäuresequenz CxCGxxLxGxxxPxxCxxFxxxCxPxxPxGxCMVSxEGxC, das einen großen Teil des C-Terminus umfasst. Ein weiteres Motiv mit der Sequenz GFETT ist bei den Gruppen der Cytochrom P450 und arylamintransacetylierenden Enzymen anzutreffen (Mitoma und Udenfriend 1962, Nebert und Geldboin 1968). Beide Enzyme gehören zu den Monooxygenasen (E.C.: 1.14.14.1) und sie katalysieren in eukaryotischen Zellen Detoxifikationsreaktionen, wobei ihre genaue Funktionsweise zur Zeit noch unbekannt ist. Aufgrund des unüblichen [FeS]-Zentrums wäre es vorstellbar, dass HypD an der CN- oder CO-Synthese oder am Einbau der Liganden, entweder mit oder Eisen, beteiligt ist (Drapal 1998).



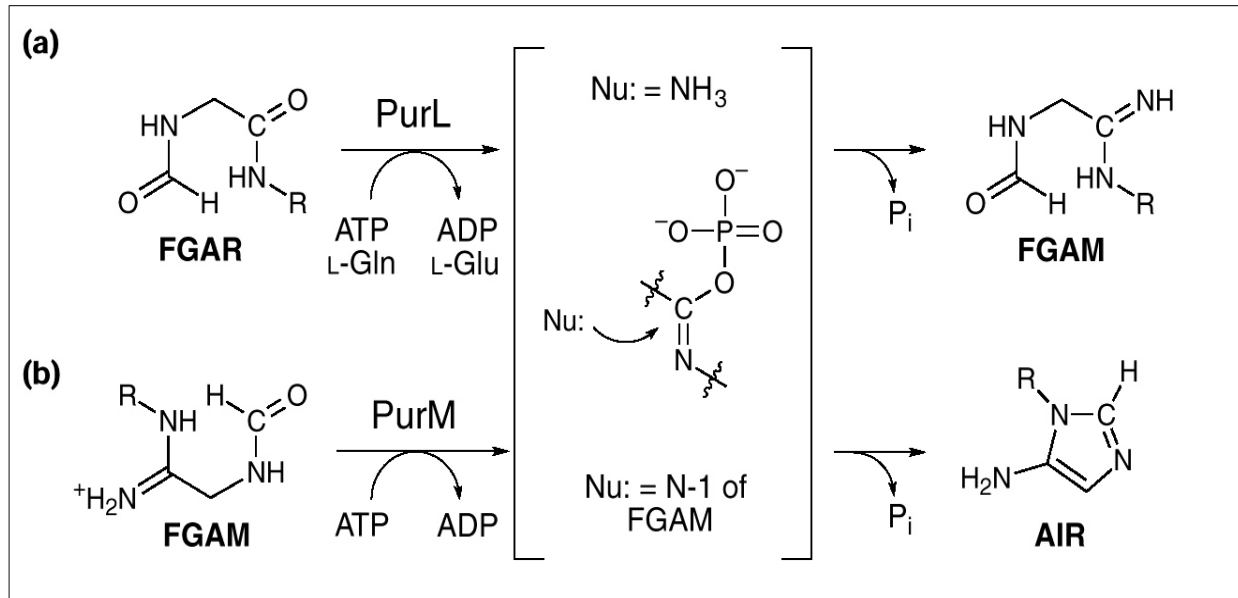
**Abbildung 7. Schematische Darstellung des HypD-Proteins aus *E. coli*.**

Die Aminosäuren geben die konservierten Reste im Protein an, die hochgestellt Zahlen die Positionen der Aminosäuren im Protein.

#### A 4. Analyse der Sequenz des HypE-Proteins

Das HypE-Protein zeigt in der PSI-BLAST-Analyse eine signifikante Ähnlichkeit zu Thiaminmonophosphat-Kinasen (ThiL), sowie zu Enzymen, die den fünften Schritt der Purin Biosynthese katalysieren (PurM). Teilweise wird auch eine geringe Ähnlichkeit zu Selenophosphat-Synthetasen (Seld) angegeben.

ThiL-Proteine (E.C.: 2.7.4.16) katalysieren die Anlagerung eines zweiten Phosphatrestes an Thiaminmonophosphat; dabei verliert ein ATP-Molekül die  $\gamma$ -Phosphatgruppe und es bildet sich ADP (Webb und Downs 1997). Das *purM*-Genprodukt, die Aminoimidazol-Ribonukleotid-Synthetase (E.C.: 6.3.5.3), bildet nach einer Wasserabspaltung und nach Ringschluß des Substrates Formylglycinamidinribonukleotid über eine ATP-hydrolysierende Reaktion Aminoimidazolribonukleotid (Mueller *et al.* 1999, Li *et al.* 1999). Die Reaktion ist in Abbildung 8 aufgeführt und ähnelt im Mechanismus der von PurL katalysierten Reaktion (Schrimsher *et al.* 1986, Schendel *et al.* 1989). Sie verdeutlicht einen Reaktionsmechanismus, bei dem eine Wasserabspaltung mit der Ausbildung einer C=N-Doppelbindung einhergeht. Die Wasserspaltung selbst findet durch Phosphorylierung eines an einem C-Atom sitzenden O-Restes, der nach der Phosphatentfernung als Teil der Phosphatgruppe dem Molekül entzogen wird. Da dieser Reaktionsmechanismus zur Ausbildung einer C=N-Bindung führt, könnte sie als Anhaltspunkt für die Bildung eines CN-Moleküls dienen.



**Abbildung 8. Mechanismus der durch PurL (Formylglycinamidinribonucleotid-Synthetase) (a) und durch PurM (Aminoimidazol-Ribonucleotid-Synthetase) (b) katalysierten Reaktionen.**

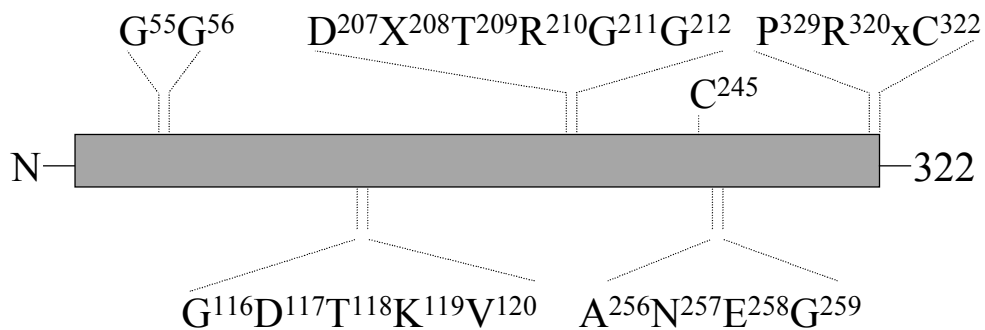
Durch Phosphorylierung eines am C-Atom sitzenden O-Restes und anschließende Phosphatentfernung bildet sich eine C=N-Bindung aus. R: Ribose, FGAR: Formylglycinamidinribonucleotid, FGAM: Formylglycinamidinribonucleotid, AIR: Aminoimidazolribonucleotid (nach Li *et al.* 1999).

Selenophosphat-Synthetase (*selD*) phosphoryliert Selenid; SelD greift dabei das  $\gamma$ -Phosphat von ATP nukleophil an und bildet eine Enzym-Phosphat-Zwischenstufe (Mullins *et al.* 1997), die das Phosphat auf Selenid überträgt. Das verbleibende ADP wird in AMP und Phosphat gespalten und freigesetzt (Ehrenreich *et al.* 1992).

Allen drei hier aufgeführten Protein-Familien ist eine ATP-hydrolysierende Aktivität gemeinsam, so dass auch für das HypE-Protein möglicherweise eine solche enzymatische Eigenschaft postuliert werden könnte. Da die HypE-Proteine glycinreiche Sequenzen aufweisen, könnten diese Aminosäure-Reste die Stabilisierung der Phosphatgruppen des Substrates ATP vermitteln (Saraste *et al.* 1990).

Hervorgehoben werden soll das C-terminale hochkonservierte Motiv PR[I/V]C, mit seinem unüblichen Cystein am C-Terminus des Proteins. Möglicherweise vermittelt dieser Cysteinrest eine Verknüpfung an ein Metall oder einen weiteren Cysteinrest eines anderen Hyp-Proteins. Im Falle der  $\beta$ -Kette der Nitrat-Reduktase ist das gleiche Motiv Bestandteil des dritten

[Fe-S]-Clusters des NarH-Proteins (Blasco *et al.* 2001). Im HypE-Protein findet sich noch ein weiteres konserviertes Cystein (Cys245 in *E. coli*) (in *Pyrococcus abyssi* – die bis jetzt einzige Ausnahme- ist es durch einen Serinrest ersetzt), dessen mögliche Funktion nicht ersichtlich ist. Die Anwesenheit von konservierten Glu- und Asp-Resten könnte für die Stabilisierung eines  $Mg^{2+}$ -Ions verantwortlich sein, das der ATP-Hydrolyse dient, wie es für PurM aus *E. coli* gezeigt wurde (Li *et al.* 1999). In Abbildung 9 sind die in HypE identifizierten Aminosäure-Sequenz-Signaturen aufgezeigt.



**Abbildung 9. Schematische Darstellung des HypE-Proteins.**

Die Aminosäuren geben die konservierten Reste im Protein an, die hochgestellten Zahlen die Positionen der Aminosäuren im Protein. Ein zu TRGG-Sequenz ähnliches Motiv ist bei den ThiL-Proteinen anzutreffen, während das GDTKV einem Motiv im PurM ähnlich ist.

#### A 5. Analyse der Sequenz des HypF-Proteins

Das HypF-Protein ist aufgrund seiner Größe ein besonders interessanter Kandidat für Homologie- und Ähnlichkeits-Studien. In der PSI-BLAST Analyse zeigt sich, dass das HypF-Protein einen domänenartigen Aufbau aufweist. Diese über PSI-BLAST ermittelten Domänen sind in Abbildung 10 aufgezeigt.



**Abbildung 10. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von HypF-Proteinen.**

ACP: Acylphosphatphosphatase, ZF1: Zink-finger Motiv 1, ZF2: Zink-finger Motiv 2, YrdC/Sua5-Domäne, O-CT: O-Carbamoyltransferase, O-Sialo-GP: O-Sialoglykoprotease Domäne.

Als auffälligstes Motiv von HypF erweisen sich zwei aufeinanderfolgende cysteinhaltige Motive mit der Anordnung  $C_{xx}C_{x18}C_{xx}C$  (Yamamoto *et al.* 1990), die voneinander durch 24

Aminosäurereste getrennt sind. In Abbildung 11 sind diese cysteinhaltige Motive von HypF-Proteinen verschiedener Mikroorganismen aufgezeigt.

A.	HypF	E.coli:	104	PDAATCPACLAEMNTPGERRYRYPFINCTHC	CGP	136
	HypF	R.caps:	99	PDAATCPDCLAEIRGEGRRR-GYAFTNCTHC	CGP	130
	HupY	A.chro:	87	PDAAVCPACLEELFDPHRRWRHPFINCTHC	CGP	119
	HypF	A.vine:	87	PDAAVCPACLEELFDPHRRWRHPFINCTHC	CGP	119
	HypF	R.legu:	111	ADAATCDGCRRELTDPASRFFGYPFVNC	CTHC	CGP 143
	HypF	M.jann:	112	ADVAICDDCLKEMLDKNDRRYRYPFIACTN	CGP	144
				<b>CxxCx<sub>18</sub>CxxC</b>		
B.	HypF	E.coli:	154	AAFPLCPACDKEYRDPLDRRFHAQPVACPE	CGP	186
	HypF	R.caps:	148	APFAMCPACRAEYEDPADRRFHAQPIACP	DCPG	180
	HupY	A.chro:	137	AGFALCPDCRHEYEDPADRRFHAQPIACP	ACGP	169
	HypF	A.vine:	137	AGFELCPECRREYEDPADRRFHAQPIACP	ACGP	169
	HypF	R.legu:	161	ASFPMCRTCAADYVDPENRRFHAEPVACP	NCGP	193
	HypF	M.jann:	162	RDFPLCEKCLEEYKNPLDRRFHAQATCCP	ICGP	194
				<b>CxxCx<sub>18</sub>CxxC</b>		

**Abbildung 11. Schematische Darstellung und Vergleich von Proteinsequenz des ersten (A) und zweiten (B) Zinkfinger-Motivs des HypF-Proteins.**

Die konservierten Cystein-Reste sind umrahmt.

Ob sie dem HypF-Protein die Fähigkeit zur DNA-Bindung oder zu Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln, kann aus der Proteinsequenz nicht abgeleitet werden. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Thioredoxin/Glutaredoxin-ähnliche Sequenzen handelt (Holmgren 1976, Arnér und Holmgren 2000), zumal beiden Zinkfinger-Motiven den jeweils am Ende liegenden Cysteinen die Sequenz CGP[R]-folgt (Thioredoxin:CGPC, Glutaredoxin:CPYC). Im zweiten Zinkfinger-Motiv befindet sich das Motiv PxxRRFHAXP, während im Trennbereich der Zinkfinger-Motive die Aminosäureabfolge LPYDRxxT vorliegt. Eine Suche nach Proteinen, die diese Sequenzen beinhalten lieferte keine Anhaltspunkte.

N-terminal zu den Cystein-Motiven gelegen existiert eine Aminosäuresequenz, die 1998 in HypF aus *R. eutropha* beschrieben wurde und die ähnlich zu Sequenzen in Acylphosphatasen ist (Wolf *et al.* 1998). In Tabelle 5 ist dieses charakteristische Motiv [LIV]-x-G-x-V-Q-G-V-x-[FM]-R der HypF-Proteine im Vergleich zum entsprechenden Motiv aus den Acylphosphatasen wiedergegeben. Es existiert lediglich eine einzige HypF-Variante (*R. eutropha*), der die

Acylphosphatphosphatase- und die zwei Zinkfinger-Motive fehlen, jedoch liegt in diesem Organismus eine Duplikation des *hypF*-Gens vor, wobei das zweite *hypF*-Gen (*hypF2*) für eine übliche HypF-Variante kodiert (Dernedde *et al.* 1996, Wolf *et al.* 1998).

**Tabelle 5. Sequenzsignaturen von Acylphosphatasen aus Säugern, Vögeln und Bakterien, im Vergleich zur Aminosäuresequenz von HypF aus *E. coli*.**

Organismus	Sequenz	Zugriffsnummer
<i>E. coli</i> HypF	IRGKVQGVGFR	NP_417192
<i>Bos tauros</i>	IFGKVQGVFFR	2ACY
<i>Gallus gallus</i>	VSGRVGGVFFR	P07032
<i>Mus musculus</i>	IFGKVQGVFFR	XP_126081
<i>Homo sapiens</i>	IFGKVQGVFFR	NP_001098
<i>C. perfringens</i>	VLGRVQGVGFR	NP_562889
<i>V. cholerae</i>	VSGHVQGVGFR	CAC9027

Acylphosphatphosphatasen (E.C.: 3.6.1.7) sind kleine basische Proteine, die die spezifische Hydrolyse der Carboxylphosphat-Bindung von Acylphosphaten katalysieren. Biologisch relevante Acylphosphate, die von ihnen umgesetzt werden können, sind Acetylphosphat, 1,3-Bisphosphoglycerat, Carbamoylphosphat, Succinylphosphat, Formylphosphat, Butyrylphosphat und  $\beta$ -Aspartylphosphat (Stefani *et al.* 1997). Darüber hinaus können sie unter bestimmten Bedingungen auch künstliche Substrate wie Benzyl- oder Naphthylphosphat hydrolysieren (Mizuno *et al.* 1989). Acylphosphatasen sind weder in der Lage Phosphatesterbindung zu spalten, noch können sie anorganisches Pyrophosphat und ebenso wenig phosphorylierte Nukleotide umsetzen. Es sind ubiquitäre Proteine, sie kommen besonders im Gewebe von Säugetieren und Vögeln vor. Über Genomanalyse sind putative Acylphosphatasen auch kürzlich in diversen Mikroorganismen nachgewiesen worden.

Ihre physiologische Funktion ist noch weitgehend unbekannt. Unter anderem wird spekuliert, dass sie in der Glykolyse durch die Umsatzsteigerung des 1,3-Bisphosphoglycerats zur Erhöhung des glykolytischen Flusses führen und somit eine regulatorische Rolle in der Glykolyse

und der Fermentation spielen. Durch das Umsetzen von  $\beta$ -Aspartylphosphat regulieren sie die Plasmamembran-Ionenpumpen und damit den intracellulären Ionenstatus der Zelle (Stefani *et al.* 1981, Nediani *et al.* 1995). Anhand kristallographischer Analysen und von Mutagenese-Studien liegt eine Fülle von Informationen über diese Proteine vor (Taddei *et al.* 1995, Taddei *et al.* 1996, Modesti *et al.* 1996).

Dem Zinkfinger-Motiv vom HypF folgen Aminosäuresequenzen, die in dieser Anordnung in Proteinen der sogenannten Sua5/YrdC/YicC-Familien anzutreffen sind. Obwohl diese Proteine biochemisch noch nicht eingehend charakterisiert sind, ergab eine kristallographische Analyse von YrdC aus *E. coli* die Anwesenheit einer Furche, die mit synthetischen RNA-Molekülen interagiert. Evidenzen für diese Interaktion als physiologische Funktion des YrdC fehlen jedoch weiter (Teplova *et al.* 2000). In *Sacharomyces cerevisiae* wurde das *sua5-1*-Allel als Suppressor eines aberranten ATG, stromaufwärts des *cys1* Locus identifiziert. Es bewirkt eine Steigerung der Iso-1-cytochrome c Menge in der *cyc1-1019*-Mutante von 2% auf 60% (Hampsey *et al.* 1991, Na *et al.* 1992).

Im C-terminalen Drittel der HypF-Proteine verschiedener Organismen befindet sich ein Motiv mit der Aminosäuresequenz VxHH[H/F/L]AH, das ähnlich nur noch bei Enzymen angetroffen wird, die *O*-Carbamoylierungsreaktionen katalysieren. Solche als *O*-Transcarbamoylasen bezeichneten Enzyme sind z.B. in Carbamoylierungen von Antibiotika und Nodulations-Faktoren (Nod) involviert und sie übertragen den Carbamat-Rest nur auf den Sauerstoff von OH-Gruppen (Mao *et al.* 1999, Steffensky *et al.* 2000, Freiberg *et al.* 1997). Tabelle 6. gibt exemplarisch einige Proteine wieder, für die eine Funktion als *O*-Carbamoyltransferase nachgewiesen wurde. In Anhang I ist eine Auflistung weiterer Proteine wiedergegeben, die dieses Motiv beinhalten, ohne dass jedoch eine Funktion als *O*-Carbamoyltransferasen bereits bewiesen wurde. Viele dieser Proteine wurden aufgrund der Genom- und Proteomanalysen identifiziert und unter anderem aufgrund ihrer Gemeinsamkeit im VxHHxAH-Motiv als Carbamoylphosphat umsetzende Enzyme annotiert.

**Tabelle 6. Vorkommen und Funktion von *O*-Carbamoyltransferasen die die Sequenz HHxAH mit den HypF-Protein teilen.**

Organismus	Sequenz	Zugriffsnummer	Funktion
<i>E. coli</i> HypF	VLHHHAH	NP_417192	Hydrogenasereifung
<i>S. lavendulae</i> Mmcs	VNHHLAH	AAD32743	Mitomycin C Biosynthese
<i>S. spheroides</i> NovN	VPHHLAH	AAF67507	Novobiocin Biosynthese
<i>B. sp.</i> WM9 NoIO	MNHHEVH	AAK00162	Nod-Faktor Biosynthese
<i>M. loti</i> NoIO	VSHHQAHA	BAB52503	Nod-Faktor Biosynthese

Dem C-Terminus von HypF wird schließlich in der PSI-BLAST-Analyse eine Ähnlichkeit zu den *O*-Sialoglykoproteasen (PDOC00779) zugewiesen, obwohl er die charakteristische Aminosäuresequenz nicht aufweist (Abdullah *et al.* 1991, Rawlings und Barrett 1995). Proteasen dieser Familie spalten Glykoproteine (Zuckerkomponente muss *O*-verknüpft am Threonin oder Serin-Rest vorliegen) proteolytisch und werden zur Klasse der Metalloproteasen zugeordnet, da sie meist Zink als Kofaktor besitzen.

#### **A 6. Analyse der Sequenzen weiterer für die CO/CN-Biosynthese relevanter Proteine**

Neben den Proteinen der Hydrogenase-Reifung wurden auch Proteine in die Sequenzanalyse einbezogen, die Cyanogenese bei Bakterien oder Pflanzen bewerkstelligen. Weder bei den *hcnABC*-Genprodukten, noch bei den Nitrilasen, den Rhodanesen, den Häm-Oxygenasen und CO-Dehydrogenasen konnten jedoch Ähnlichkeiten mit Hyp-Proteinen beobachtet werden. HypX, ein Protein für das eine Beteiligung an der CO/CN-Biosynthese vorgeschlagen wurde, zeigte Ähnlichkeiten zu den bereits in der Einleitung angeführten Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase Protein-Familie und zu Proteinen die N<sup>10</sup>-Formyltetrahydrofolat übertragen bzw. als Substrat verwerten (Rey *et al.* 1996).

#### **A 7. Zielsetzung aufbauend auf der Sequenzanalyse**

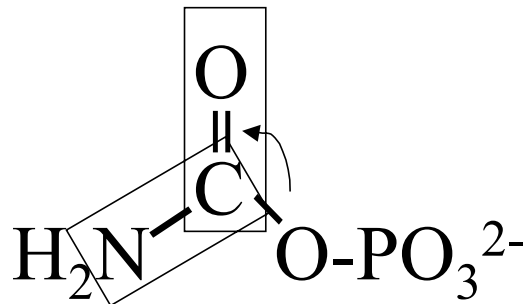
Die erarbeiteten bioinformatischen Daten deuten darauf hin, dass die CO bzw. CN-Bildung in der Hydrogenasereifung über einen neuartigen Mechanismus verlaufen muss, der



aufgrund der Konserviertheit der *hyp*-Genprodukte in allen [NiFe]-Hydrogenasen enthaltenden Bakterien auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist. Unter ihnen weisen HypF und HypE Ähnlichkeit zu Enzymen auf (Acylphosphatphosphatasen, Aminoimidazolsynthetasen, Thiaminmonophosphat-Kinasen, *O*-Carbamoyltransferasen) die in der Umwandlung von organischen Komponenten beteiligt sind. Sie konnten deswegen als wahrscheinliche Kandidaten für Enzyme gelten, die an der CN oder/und CO-Biosynthese beteiligt sind. Aufbauend auf den *in silico* Informationen konnte in der Tat das HypE-Protein aus *E. coli* (Bauer 2002) als eine spezifische magnesiumabhängige ATPase charakterisiert werden, die zur Bildung von ADP und Phosphat führt. Aminosäureaustausche in den Motiven PRIC und TRGG ergaben, dass sie für die optimale Funktion des HypE-Proteins (Bauer 2002) in der Hydrogenase-Reifung essentiell sind. Das Interesse der vorliegenden Dissertation konzentrierte sich auf die Analyse der Funktion des HypF-Proteins. Besonders das Vorhandensein des Histidin-reichen Motivs und des Acylphosphatase-Motivs deutete darauf hin, dass es sich hierbei um ein Protein handeln könnte, welches Carbamoylphosphat möglicherweise enzymatisch umzusetzen vermag.

## B. Rolle von Carbamoylphosphat in der Reifung der großen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenasen aus *E. coli*

Bei der Analyse der HypF-Proteinsequenz konnte ein Motiv identifiziert werden, das bei Enzymen angetroffen wird, welche O-Carbamoylierungen katalysieren. Das Substrat dieser Enzyme ist Carbamoylphosphat, also ein Acylphosphat (Abbildung 12) (Mao *et al.* 1999, Steffensky *et al.* 2000, Freiberg *et al.* 1997). Dies korreliert wieder mit dem Befund, dass der N-Terminus der HypF-Proteine signifikante Ähnlichkeit zu Sequenzen von Acylphosphat-Phosphatasen aufweist (Wolf *et al.* 1997)



**Abbildung 12. Struktur von Carbamoylphosphat, aus dem die Synthese sowohl von CO als auch CN abgeleitet werden kann.**

Theoretisch kann aus der Carbonylgruppe des Carbamoylphosphats CO nach einer Desaminierung und CN aus der Aminogruppe nach einer Dehydratisierung entstehen. Dies führte zu der Frage, ob Carbamoylphosphat für die Hydrogenase-Reifung benötigt wird und wenn ja, ob das HypF-Protein Carbamoylphosphat in die Reifungskaskade einschleust.

Zur Beantwortung wurde die Hydrogenasen-Biosynthese in *E. coli*-Stämmen mit Defizienz in der Synthese von Carbamoylphosphat untersucht. Um die physiologischen Grundlagen und die genetische Konstruktion solcher Stämme zu verstehen, soll hier zuerst auf die Synthese und die physiologische Bedeutung des Carbamoylphosphats eingegangen werden.

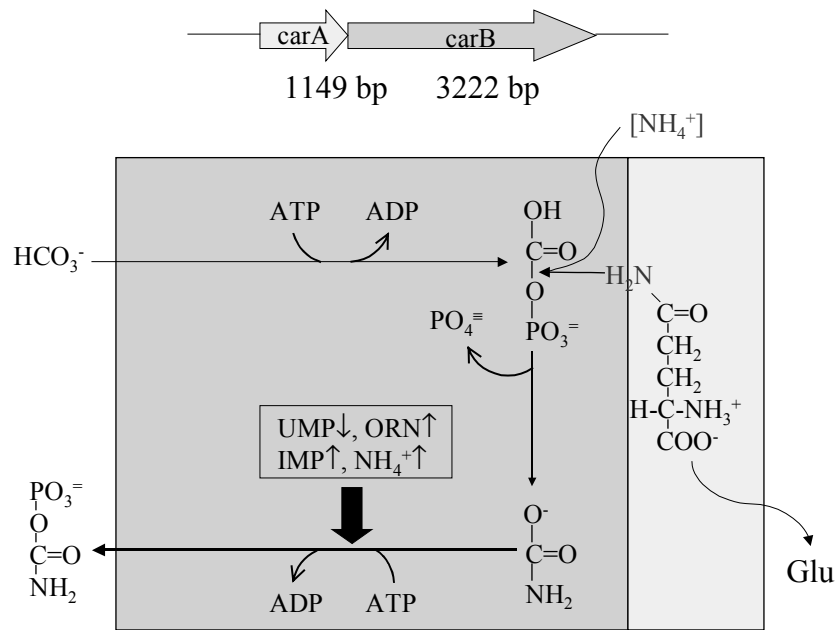
### B 1. Physiologische Bedeutung und Synthese des Carbamoylphosphats

Carbamoylphosphat nimmt im Stoffwechsel einer Zelle eine zentrale Rolle in der Biosynthese der Aminosäure Arginin (Glansdorff 1998) und des Kohlenstoffskeletts des Pyrimidinrings ein (Neuhard und Nygaard 1998). Im Arginin-Molekül stammt der Kohlenstoff

der Ureidogruppe und die an diesem Kohlenstoff gebundene Imino-Gruppe aus den Carbamoylphosphat. Das Enzym Ornithin-Transcarbamoylase katalysiert die Anlagerung des Carbamatrests des Carbamoylphosphats an Ornithin und es entsteht Citrullin, welches über zwei weitere enzymatische Reaktionen in Arginin umgewandelt wird. Die Aspartat-Carbamoyltransferase katalysiert den ersten Schritt der Pyrimidin-Biosynthese unter der Kondensation des Kohlenstoffs von Carbamoylphosphat mit der Aminogruppe des Aspartats, was zur Bildung von *N*-Carbamoylaspartat führt. Dieses zyklisiert unter Wasserabspaltung zu Dihydroorotat und bildet dadurch das Pyrimidin-Kohlenstoffskelett aus. Damit stammen die C-2- und N-3-Atome des Ringes aus dem Carbamoylphosphat.

In Leber- und Nebennieren-Zellen von Säugetieren wird aus dem Aminosäure-Katabolismus stammendes  $\text{NH}_4^+$  zuerst in Form von Carbamoylphosphat fixiert und im Zuge des Harnstoff-Zyklus als Harnstoff entsorgt (Shambaugh 1977). Schließlich dient Carbamoylphosphat bei Carbamoylierungsreaktionen diverser biologischer Substrate (Aminosäuren, Proteine, tRNA Antibiotika, Nod-Faktoren) als Carbamat-Donor (Rudzinska et al. 1972, Jabbouri et al. 1995, Jabbouri et al. 1998, D'Haese et al. 1999, Mao *et al.* 1999, Steffensky *et al.* 2000, Freiberg *et al.* 1997).

Das Carbamoylphosphat selbst entsteht in der Zelle in einer komplexen Reaktion, die vom Enzym Carbamoylphosphat-Synthetase bewerkstelligt wird. Unter Verwendung zweier ATP-Moleküle geht es aus einem Bicarbonat-Molekül und der  $\text{NH}_2$ -Gruppe des Säureamidrests des Glutamins hervor. Das erste ATP-Molekül wird für die Bildung des Carboxyphosphats, eines Reaktionsintermediats benötigt, an das nach Freisetzung des Phosphats die Aminogruppe von Glutamin übertragen wird, wobei sich ein enzymgebundenes Carbamat bildet. Das zweite ATP-Molekül wird für die Phosphorylierung des enzymgebundenen Carbamats benötigt. Anstelle der Aminogruppe des Glutamins kann das Enzym auch Ammoniumionen verwenden, jedoch mit geringerer Affinität als mit Glutamin (Rubino *et al.* 1987). In Abbildung 13 ist diese Biosynthese des Carbamoylphosphates schematisch aufgezeigt.



**Abbildung 13. Biosynthese von Carbamoylphosphat durch die Carbamoylphosphat-Synthetase.**

Schematische Darstellung der Funktion der zwei Untereinheiten der Carbamoylphosphat-Synthetase. Die regulatorische Wirkung von Produkten der Arginin- und Pyrimidin-Biosynthese auf die katalytische Aktivität der großen Untereinheit ist aufgezeigt. Die Organisation des *carAB*-Operons ist im oberen Teil wiedergegeben.  $\uparrow$  bedeutet Aktivierung,  $\downarrow$  Hemmung der Aktivität. (ORN: Ornithin, UMP:Uridylat, IMP:Inosinat)

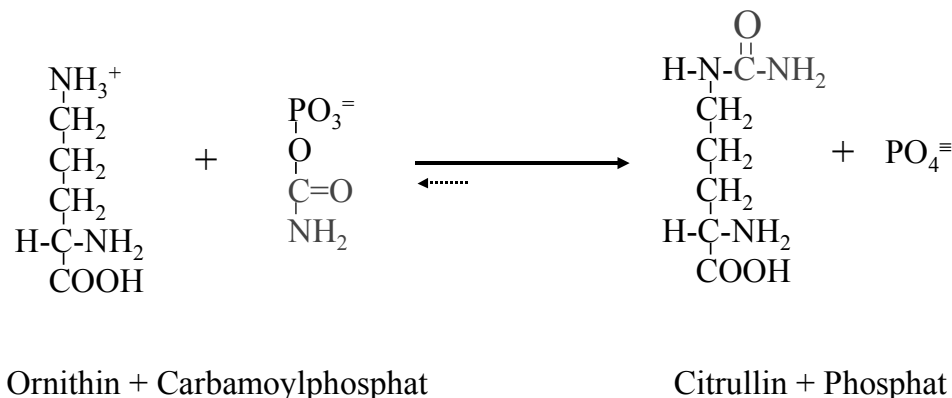
*E. coli* besitzt eine einzige Carbamoylphosphat-Synthetase, die aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist (Trotta *et al.* 1971). Die kleinere (42 kDa) liefert das Ammonium des Glutamins und die große (130 kDa) katalysiert die eigentliche Carbamoylphosphat-Synthese. Die Gene (*carAB*) für beide Untereinheiten liegen in einem Operon, wobei *carA* (früher *pyrA*) für die kleine und *carB* (früher *pyrB*) für die große Untereinheit kodiert. Aufgrund der besonderen Stellung des Enzyms im Arginin- und Pyrimidin-Biosyntheseweg wird die Aktivität des Enzyms von Produkten beider Stoffwechselwege spezifisch reguliert (Piérard *et al.* 1965, Piérard 1966). Eine Reihe von Mutationen im *carAB*-Locus wurden beschrieben (Mergeay *et al.* 1974). Kennzeichnendes Merkmal von Mutanten im *carAB*-Locus, ist die Tatsache, das sie sowohl Arginin als auch Uracil auxotroph sind.

In einigen Bakterien wird Carbamoylphosphat über die Carbamat-Kinase-Reaktion gemäß folgender Reaktionsgleichung gebildet (Abdelal 1979, Marshall und Cohen 1970):



Das Enzym Carbamat-Kinase katalysiert die Reaktion 4, während Reaktion 3 ohne Enzym stattfindet. Obwohl *E. coli* putative Gene für Carbamat-Kinasen besitzt, gibt es keine Hinweise, dass solche Reaktionen ablaufen (Marina *et al.* 1997, Uriarte *et al.* 1999, Alcántara *et al.* 2000).

Carbamoylphosphat kann in *E. coli* auch in der von der Ornithin-Transcarbamoylase katalysierten Reaktion gebildet werden. Während die Reaktion für die Biosynthese des Arginins in der Bakterienzelle essentiell ist, kann bei Überschuss von Citrullin die thermodynamisch ineffiziente Rückreaktion ablaufen (Shepherdson und Pardee 1960). Dabei wird Citrullin phosphorolytisch in Ornithin und Carbamoylphosphat gespalten. Eine Eigentümlichkeit vieler *E. coli* K12-Derivate ist der Besitz zweier Ornithin-Transcarbamoylase-Gene, *argF* und *argI*, deren Produkte miteinander interagieren und die Synthese von vier trimeren Isoenzymen erlauben (Legrain *et al.* 1972). Im hier verwendeten Stamm von MC4100 ist lediglich das *argI*-Gen vorhanden (persönliche Mitteilung M. Blokesch). In Abbildung 14 ist der Ablauf der Ornithin-Transcarbamoylase-Reaktion aufgezeigt.



**Abbildung 14. Bildung von Carbamoylphosphat aus der Reaktion des Citrullins zu Ornithin katalysiert durch die Ornithin-Transcarbamoylase.**

Abschließend soll auf eine Beobachtung eingegangen werden, die Carbamoylphosphat und CN miteinander in Verbindung setzt. Aus *E. coli*-Stämmen mit Deletionen im *carB*-Locus, können Derivate selektiert werden, die in Abwesenheit von Arginin und Uracil wachsen können, vorausgesetzt Cyanat ( $\text{OCN}^-$ ) ist im Medium anwesend (Gigot 1990). Es ist bekannt, dass  $\text{OCN}^-$

Proteine carbamoylieren kann. Da es als Vorstufe für  $\text{CN}^-$  angesehen werden kann und Carbamoylphosphat unter leicht alkalischen Bedingungen chemisch in  $\text{OCN}^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zerfällt (Spector *et al.* 1975), könnte Carbamoylphosphat tatsächlich die gesuchte Quelle für den CN-Liganden in *E. coli* darstellen.

## **B 2. Untersuchungen zur Bedeutung des Carbamoylphosphats für die Hydrogenasereifung**

Für eine erste Untersuchung der Bedeutung des Carbamoylphosphats in der Hydrogenasereifung wurden die Stämme JEF8 und JEF8  $\lambda^-$  verwendet, welche vom *E. coli* Genetic Stock Center (CGSC Database of *E. coli*; <http://cgsc.biology.yale.edu/>) bezogen wurden. Bei beiden Stämmen handelt es sich um P4X-Abkömmlinge, welche eine Deletion im *carB*-Gen besitzen (Mergeay *et al.* 1974). Der P4X-Stamm ist ein *E. coli* K12-Derivat mit Wildtyp-Eigenschaften, in welchem Hydrogenase-Aktivität nachgewiesen wurde (Ballantine und Boxer 1985, Sawers *et al.* 1985). Die Stämme wurden auf ihre Auxotrophie hin untersucht und wie erwartet wuchsen sie erst nach Supplementierung mit Uracil und Arginin (jeweils 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Da  $\Delta\text{hyp}$ -Stämme allesamt MC4100-Abkömmling sind, sollten die erhaltenen Ergebnisse noch in einem zu konstruierenden  $\Delta\text{carAB}$  Stamm, der MC4100-Abkömmling ist, untersucht werden.

## **B 3. Konstruktion eines *E. coli* MC4100-Derivates mit Deletion im *carAB*-Locus**

Um eine Carbamoylphosphat-Defizienz komplementieren zu können und um die Deletionsmutante zu konstruieren, wurde ein Plasmid konstruiert, welches das *carAB*-Operon trägt. Dazu wurde das *car*-Operon mit jeweils 200 bp stromaufwärts und stromabwärts liegenden Sequenzen über PCR amplifiziert. Es wurden die Oligonukleotide *carAB*/*HindIII* und *carAB*/*BamHI* verwendet, welche an ihren 5'-Enden jeweils *HindIII* und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen tragen. Chromosomale DNA aus MC4100 diene als DNA-Matrize für die PCR-Reaktion. Nach *BamHI* und *HindIII*-Restriktion und Reinigung des PCR-Fragments erfolgte eine Ligation mit entsprechend geschnittenem Vektor pBR322. Das erhaltene Plasmid wurde als pCarAB bezeichnet. Für die Konstruktion der *carAB*-Deletionsmutante wurde dieses Plasmid verwendet, aus dem durch Restriktion mit *EcoRV* und *Cfr9I* ein 3530 bp-Fragment (Position 336 des *carA*-Gens bis Position 2700 des *carB*-Gens) aus dem *carAB*-Operon deletiert wurde. Die Auffüllung des 5'-Überhangs und eine anschließende Religation ergaben das Plasmid

p $\Delta$ CarAB mit einer Deletion von 80,4 % der kodierenden Region des *carAB*-Operons. Über eine DNA-Sequenzierung mit dem Oligonukleotid tet/pBR wurde die *in frame* Deletion bestätigt.

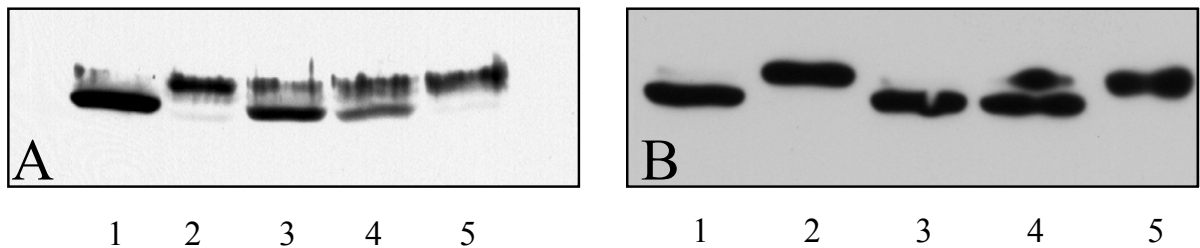
Das die Deletion im *carAB*-Operon tragende Fragment wurde durch *Bam*HI und *Hind*III Restriktion aus dem Plasmid p $\Delta$ CarAB isoliert und mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pMAK700 ligiert. Mit dem so konstruierten Plasmid p $\Delta$ CarAB erfolgte die Transformation von MC4100 und die Integration in das Chromosom nach der von Hamilton *et al.* (1989) beschriebenen Prozedur. Der erhaltene *carAB*-Deletionsstamm wurde als  $\Delta$ CarAB bezeichnet. Eine Untersuchung des Stammes bezüglich seiner Auxotrophie, wies ihn sowohl als Arginin- als auch Uracil-auxotroph aus.

#### **B 4. Phänotypische Charakterisierung der *carAB*-Deletionsmutanten**

Zuerst wurden die *car*-Deletionsmutanten auf ihre Fähigkeit zur H<sub>2</sub>-Bildung während anaeroben Wachstums in glukosehaltigem Medium getestet. Während sich im Fall der JEF8 und JEF8  $\lambda^-$ -Stämme ein gas-negativer Phänotyp abzeichnete, besaß der  $\Delta$ CarAB-Stamm noch die Fähigkeit zur Gasbildung. Interessanterweise gewannen die JEF8 und JEF8  $\lambda^-$ -Stämme ihre Fähigkeit zur H<sub>2</sub>-Bildung nach Komplementierung mit dem pCarAB-Plasmid zurück. Wichtig war die Beobachtung, dass Citrullin ebenfalls die H<sub>2</sub>-Bildungsfähigkeit rekonstituierte. Da Citrullin in der Zelle entweder nur in Carbamoylphosphat oder in Arginin umgewandelt werden kann, musste eine dieser beiden Substanzen für die Wiederherstellung der H<sub>2</sub>-Bildungsfähigkeit verantwortlich sein. Arginin konnte dabei ausgeschlossen werden, da es im Ansatz der Negativ-Kontrolle (JEF8-Stämme supplementiert mit Arginin und Uracil) nicht die Gasbildung erlaubte.

Da vermutlich bereits wenige Moleküle der Hydrogenasen ausreichen um den gaspositiven Phänotyp zu erzeugen, wurde als nächstes eine immunologische Untersuchung mit Antikörpern gegen die Hydrogenase 3 durchgeführt, in welcher die Fähigkeit zur Prozessierung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 geprüft wurde (Abbildung 15). Da nur prozessierte große Untereinheiten der Hydrogenasen aktiv sind (Maier und Böck 1996) sollte über diesen Ansatz eine aussagekräftigere Information zur Rolle von Carbamoylphosphat in der Hydrogenase-Reifung erreicht werden. In der immunologischen Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass in den  $\Delta$ *carB*- und  $\Delta$ *carAB*-Stämmen die Hydrogenase 3 zwar gebildet wird, aber unprozessiert vorliegt. Bei Anwesenheit von Carbamoylphosphat (Komplementation mit pCarAB), konnte eine voll prozessierte große Untereinheit der

Hydrogenase 3 nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von 200 µg/ml Citrullin im Ansatz erlaubte ebenfalls die Bildung aktiver Hydrogenase 3. Zusätzlich zeigt die immunologische Analyse, dass das HycE-Apoprotein in den  $\Delta car$ -*E. coli*-Zellen, bezogen auf die Proteinmenge stabil und quantitativ gleich exprimiert wird. Aufgrund dieser Resultate ist davon auszugehen, dass Carbamoylphosphat notwendig ist für die Ausbildung des Metallzentrums der Hydrogenase 3 und nicht über eine indirekte Reaktion in die Hydrogenase-Reifung eingreift.

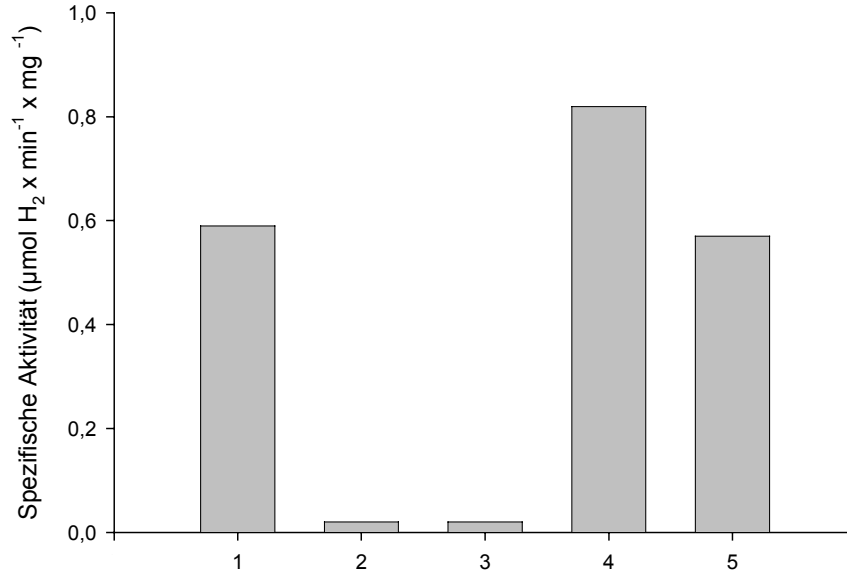


**Abbildung 15. Immunologischer Nachweis der Reifung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 in Carbamoylphosphat Synthese defizienten Stämmen.**

S10-Extrakte von anaerob angezogenen Zellen wurden in SDS-Polyacrylamidgelen (10%) aufgetrennt und die Hydrogenase-Untereinheit wurde mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Spuren: (A1 und B1) Wildtyp MC4100, (A2) JEF8 ( $\Delta carB$ ), (B2)  $\Delta CarAB$  ( $\Delta carAB$ ), bei Anzucht in Anwesenheit von 50 µg/ml Arginin und Uracil. (A3) JEF8/pCarAB, (B3)  $\Delta CarAB$ /pCarAB. Anzucht ohne Supplementierung mit Arginin und Uracil (A4) JEF8 ( $\Delta carB$ ), (B4)  $\Delta CarAB$  ( $\Delta carAB$ ). Anzucht in Anwesenheit von 50 µg/ml Arginin und Uracil und zusätzlich 200 µg/ml Citrullin. (A5) und (B5) Stamm DHP-F ( $\Delta hypF$ ).

*E. coli* besitzt drei detektierbare Hydrogenasen; es folgten deswegen als nächstes Untersuchungen, die dem Einfluß des Carbamoylphosphats auf die Reifung der einzelnen Hydrogenasen nachgehen sollten. Zu diesem Zweck wurde eine Messung der Hydrogenasenaktivität in frisch präparierten Extrakten (Abbildung 16) durchgeführt. Die Zellen waren dazu anaerob in TGYEP-Medium angezogen worden. Die ermittelten Daten zeigen eindeutig ein Fehlen der Hydrogenaseaktivität in Extrakten aus  $\Delta CarAB$ . Die Aktivität wird voll rekonstituiert, wenn der Stamm mit dem Plasmid pCarAB transformiert war, oder wenn die Anzucht in Anwesenheit von Citrullin erfolgte. Aus dem Vergleich der Aktivität der  $\Delta CarAB$ -Extrakte mit derjenigen der Negativ-Kontrolle (DHP-F), ist ersichtlich, dass die Aktivität aller drei Hydrogenasen betroffen ist.

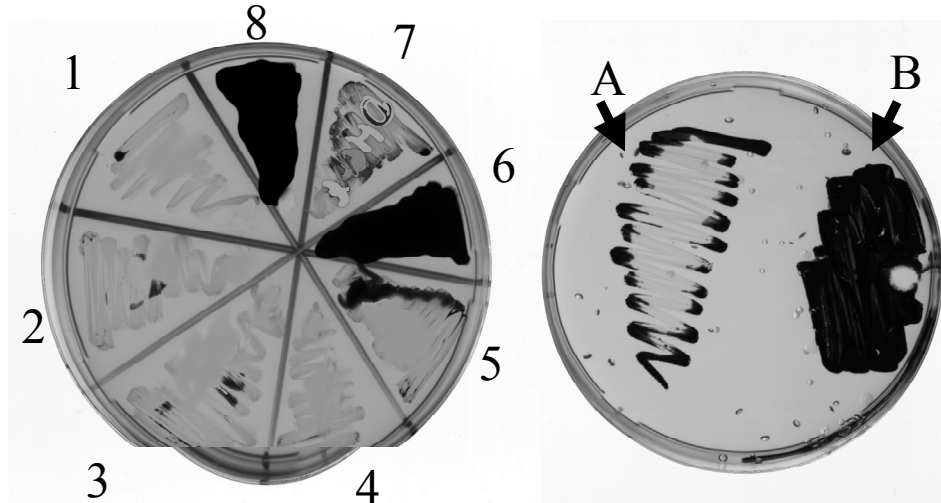




**Abbildung 16. H<sub>2</sub>:Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität in Rohextrakten der Mutante  $\Delta$ CarAB.**

Frisch präparierte S10-Extrakte von Zellen, die anaerob in TGYEP-Medium angezogen worden waren, wurden für die Aktivitätsmessung verwendet. Balken 1: Wildtyp MC4100, 2: Stamm DHP-F ( $\Delta$ *hypF*), 3:  $\Delta$ CarAB ( $\Delta$ *carAB*), Anzucht in Anwesenheit von 50  $\mu$ g/ml Arginin und Uracil, 4:  $\Delta$ CarAB/pCarAB (ohne Supplementierung von Arginin und Uracil), 5:  $\Delta$ CarAB ( $\Delta$ *carAB*), Anzucht in Anwesenheit von 50  $\mu$ g/ml Arginin und Uracil und 200  $\mu$ g/ml Citrullin.

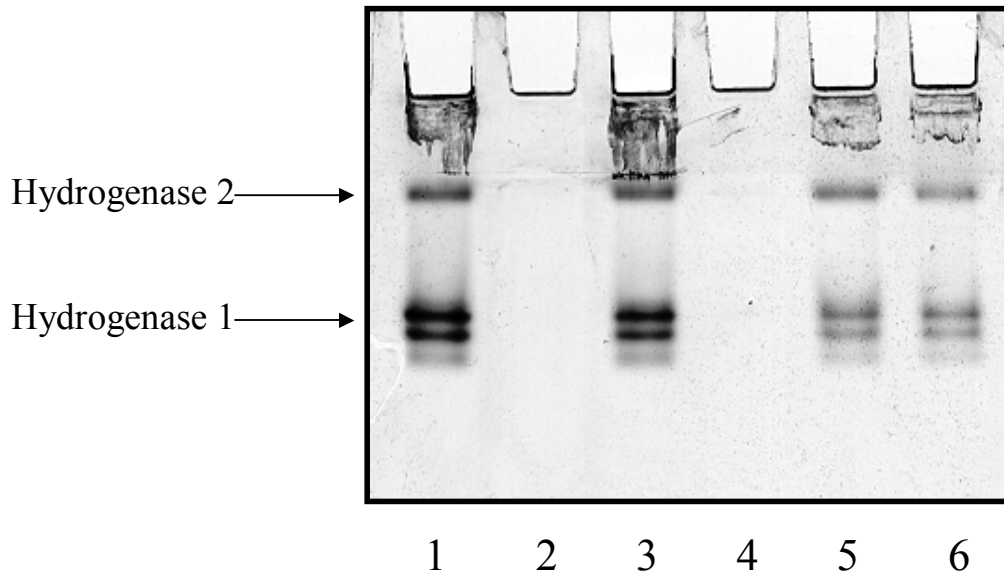
Dieses Resultat stimmt mit dem Ergebnis der H<sub>2</sub>:Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität bei Überschichtung von Kolonien Carbamoylphosphat-Synthetase defizienter Stämme überein. Sie reduzieren im Vergleich zu den Hydrogenase-positiven Stämmen Benzylviologen nicht (Abbildung 17).



**Abbildung 17.  $H_2$ :Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität bei Überschichtung von Kolonien Carbamoylphosphat-Synthetase defizienter Stämme.**

Die Zellen wurden auf TGYEP-Medium ausgestrichen und nach 24 h Wachstum in einer  $H_2$ -Atmosphäre mit Benzylviologen-Weichagar-Lösung durch Überschichtung entwickelt. Austriche 1., 2., 3., 4., und A stammten vom  $\Delta CarAB$ , 5 von JEF8, 6 von P4X, 7 DHP-F, 8 MC4100 und B von  $\Delta CarAB$  komplementiert mit pCarAB.

Um den Einfluß von Carbamoylphosphat auf die Synthese der *E. coli* Hydrogenasen 1 und 2 differenzierter zu untersuchen folgte eine Aktivitätsfärbung von Extrakten anaerob angezogener Zellen nach einer nicht denaturierenden PAGE (Abbildung 18). Unter dieser Bedingung ist die Aktivität der Hydrogenase 1 und 2 gut darstellbar, während die der Hydrogenase 3 wegen ihrer Labilität nicht darstellbar ist. Im  $\Delta carB$ -Stamm fehlen die Aktivitäten der Hydrogenase 1 und 2. Wird der Stamm mit dem pCarAB komplementiert, kann die Aktivität wieder restauriert werden. Das Gleiche erfolgt wenn der Stamm mit Citrullin angezogen wird.



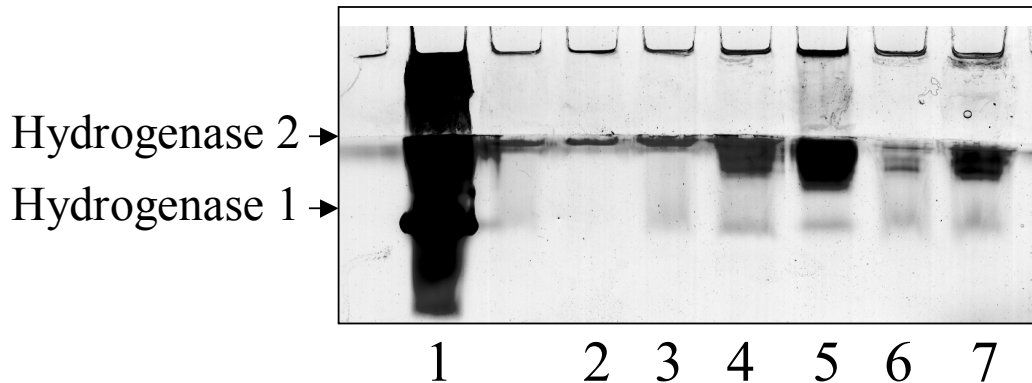
**Abbildung 18. H<sub>2</sub>:Benzyliologen-Oxidoreduktase-Aktivität von S10 Rohextrakten die in nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (10%) aufgetrennt wurden und anschließend unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre entwickelt wurden.**

Pro Spur wurden 100 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Entwicklung des Gels unter der H<sub>2</sub>-Atmosphäre dauerte 48 h. Spuren: (1) Wildtyp MC4100, (2) DHP-F ( $\Delta hypF$ ), (3) Wildtyp P4X, (4) JEF8 ( $\Delta carB$ ), (5) JEF8 transformiert mit dem Plasmid pCarAB und (6) JEF8 angezogen in Anwesenheit von 200 µg/ml Citrullin. Die Kulturen wurden in Minimalmedium angezogen, welches mit Uracil und Arginin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml supplementiert war. Im Fall des mit dem pCarAB transformierten JEF8 wurden Arginin und Uracil nicht zugegeben.

### B 5. Untersuchung der H<sub>2</sub>-Bildung durch den $\Delta CarAB$ -Stamm

Die beschriebenen Ergebnisse haben eindeutig gezeigt, dass Carbamoylphosphat einen Einfluß auf die Ausbildung der Hydrogenase-Aktivität in *E. coli* ausübt. In der  $\Delta CarAB$ -Mutante befindet sich das HycE-Apoprotein in der inaktiven Vorläuferform und Gleiches gilt für die großen Untereinheiten der Hydrogenasen 1 und 2. Erst durch die Komplementierung mit dem *carAB*-Locus tragenden pCarAB-Plasmid oder nach Wachstum in Gegenwart von Citrullin ist der Hydrogenase-positiven Phänotyp rekonstituiert. Obwohl keine aktive Hydrogenase 1 und 2 und keine prozessierte Hydrogenase 3 in der  $\Delta carAB$ -Mutante vorlagen, so war der Stamm dennoch zur Bildung von H<sub>2</sub> fähig. Während ein Test in LB-Medium signifikant die Gasbildung anzeigte, war eine Anzucht in TGYEP-Medium nur mit reduzierter Gasbildung verbunden. Wurde der Stamm in Minimal-Medium angezogen, war die Gasbildung sogar erhöht. Um einen Einfluß des Mediums auf die Hydrogenase-Aktivität zu überprüfen, wurde der  $\Delta carAB$ -Stamm über eine H<sub>2</sub>:Benzyliologen-Oxidoreduktase-Aktivitäts-Färbung analysiert (Abbildung 19). Bei

Anwesenheit von 0,5% SDS in den aufgetragenen Proben ergab sich folgendes Resultat. Das Wachstum bei niederem pH-Wert lieferte eine erhöhte Hydrogenase-Aktivität. Es zeigte sich auch, dass die Aktivität im  $\Delta$ CarAB-Stamm nie den Spiegel des Wildtyps MC4100 erreichte. Auch im Ansatz mit 30 mM Formiat war erhöhte Hydrogenase 2 Aktivität zu sehen.



**Abbildung 19.  $H_2$ :Benzylviologen-Oxidoreduktase-Aktivität von S10 Rohextrakten, die in nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (10%) aufgetrennt wurden und anschließend unter einer  $H_2$ -Atmosphäre entwickelt wurden.**

Pro Spur wurden 50  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt und vor dem Auftrag der Proben wurden diese mit 0,5% SDS versetzt. Die Entwicklung des Gels erfolgte in einer  $H_2$ -Atmosphäre für 48 h. Der Überstand jeder Anzucht wurde auf seinen pH-Wert überprüft; die Wert sind in der Klammer angegeben.

Spuren: (1) MC4100 in TGYEP-Medium bis  $OD_{600}$  von 1,0 angezogen (pH-Wert ~5,9), (2) und (3)  $\Delta$ CarAB in TGYEP-Medium bis  $OD_{600}$  von 1,0 angezogen (pH-Wert ~5,9), (4)  $\Delta$ CarAB in LB-Medium bis  $OD_{600}$  von 1,0 angezogen (pH-Wert ~4,5), (5)  $\Delta$ CarAB in WM-Medium bis  $OD_{600}$  von 0,7 angezogen (pH-Wert ~5,6), (6)  $\Delta$ CarAB in TGYEP-Medium supplementiert mit 30 mM Formiat bis  $OD_{600}$  von 1,0 angezogen (pH-Wert ~5,6), (7)  $\Delta$ CarAB in LB-Medium (zweifach konzentriert) bis  $OD_{600}$  von 1,0 angezogen (pH-Wert ~4,5)

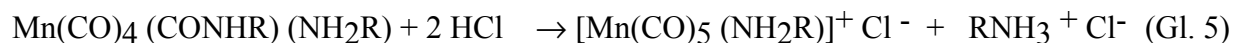
Es ist denkbar, dass chemisch spontan gebildetes Carbamat für diese Restaktivität verantwortlich ist, das einen kleinen Anteil reifer Hydrogenase liefert. Obwohl gezeigt wurde, dass die putativen Carbamat-Kinasen von *E. coli* nicht aktiv sind (Marina *et al.* 1997, Uriarte *et al.* 1999, Alcántara *et al.* 2000), könnten sie möglicherweise unter den niedrigen pH-Bedingungen die chemisch ablaufende Carbamatkinasereaktion dennoch katalysieren. Wie aus der Untersuchung der Prozessierungsreaktion gezeigt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass nur ein kleiner Anteil des HycE prozessiert (<1%) ist, der zwar immunologisch nicht nachweisbar, jedoch ausreichend für die Bildung des  $H_2$  und seinen Nachweis im Gastest ist.

In einigen Bakterien, die Arginin über den Deiminase-Weg abbauen können, fällt ebenfalls Carbamoylphosphat an (Abdelal 1979, Cunin *et al.* 1986). Zwar kann *E. coli* Arginin abbauen, aber nicht über den Deiminase-Weg sondern über den Arginin-Decarboxylase- und den Arginin-Succinyl-Transferase-Weg. Beim ersteren fällt Harnstoff an, der teilweise in wässriger Lösung als  $[\text{NH}_4][\text{NH}_2\text{COO}]^-$  vorliegen kann. Ob die hier anfallenden Mengen an Carbamat die Hydrogenase-Reifung beeinflussen können, kann nicht ermittelt werden.

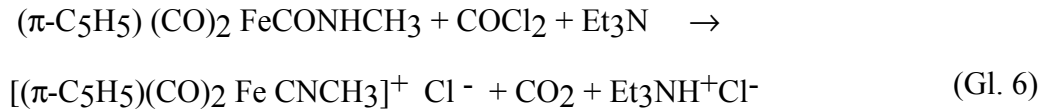
### **B 6. Metallorganische Modelreaktionen, die zur Bildung von CN und CO aus Carbamoylphosphat führen können.**

Der Befund, dass Carbamoylphosphat für die Reifung aktiver Hydrogenasen benötigt wird, verstärkt die Vermutung, dass es die Vorläufersubstanz für die Bildung von CO und/oder CN sein könnte. Aus der metallorganischen Chemie sind Reaktionsmechanismen bekannt, in denen die Bildung von CO und CN aus Metall-Carbamoyl-Komplexen erfolgen kann. In Diskussion mit Prof. Richard Glass von der Universität Arizona, Department of Chemistry (USA) wurden Möglichkeiten der CO/CN-Liganden-Bildung aus Carbamoylphosphat formuliert (Paschos *et al.* 2001). Sie leiten sich von bekannten Reaktionen aus der Metallorganik ab und sollen hier kurz erläutert werden.

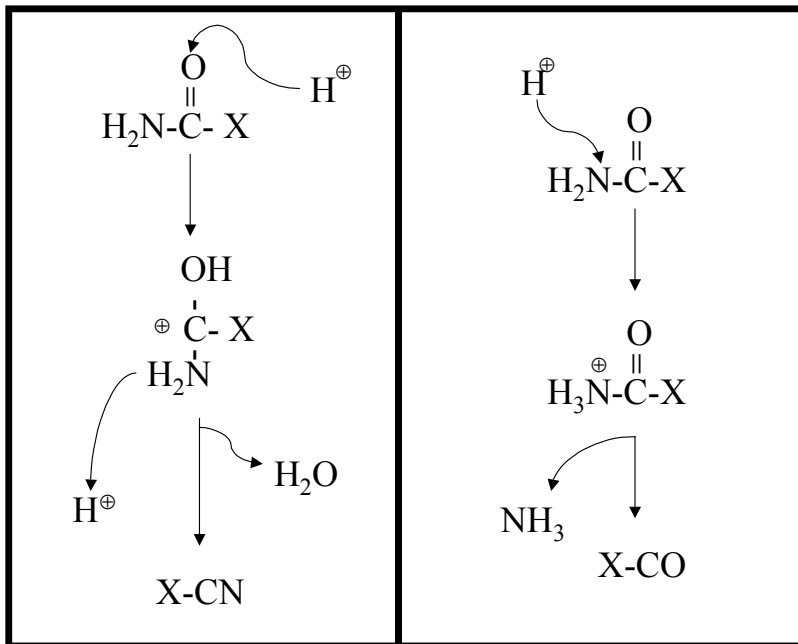
Metall-Carbamoyl-Komplexe sind in der Chemie durchaus geläufig jedoch bis dato wenig untersucht (Angelici 1972, Ford und Rokicki 1988, Anderson und Hill 2000). Auch die Umwandlung metallgebundener Carbamoyl-Gruppen in Cyano- oder Carbonyl-Gruppen sind bekannte chemische Prozesse. So wird z. B. bei der Behandlung des Carbamoyl-Mangan (I) Komplexes mit HCl der korrespondierende Mn-Carbonyl-Komplex gemäß Gleichung (5) dargestellt (Angelici und Denton 1968):



Die Konversion der an Metall assoziierten Carbamoyleinheit zu einer Cyano-Gruppe kann durch eine Dehydratisierungs-Reaktion des Carbamoyl-Mangan-Komplexes zum Cyano-Komplex (Behrens *et al.* 1972) oder durch Transformation eines Eisen-Carbamoyl-Liganden in einen Isocyanat-Liganden gemäß Reaktionsgleichung (6) (Fehlhammer *et al.* 1975) erfolgen:

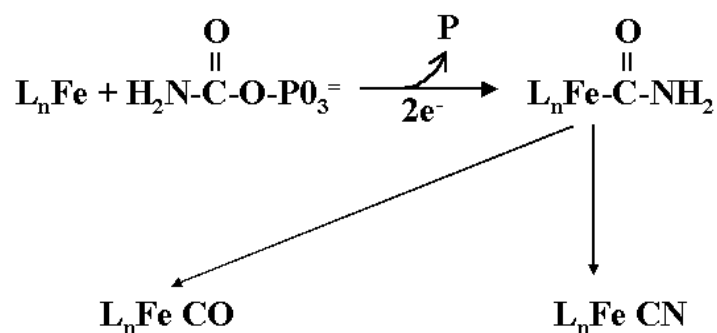


Anhand von Modellreaktionen aus der metallorganischen Chemie können Hypothesen über den Ablauf der Umwandlung eines Carbamoyl-Liganden entweder zum CN- oder zum CO-Liganden in biologischen Systemen aufgestellt werden. Vereinfacht ausgedrückt würde die Protonierung des Sauerstoff-Atoms der Carbamoyl-Einheit nach Dehydratisierung den Cyansäure-Liganden liefern, aus welchem nach einer Deprotonierung das CN resultiert. Alternativ würde die Protonierung des Stickstoff-Atoms nach anschließender C-N Heterolyse die CO-Formation erlauben (Abbildung 20).



**Abbildung 20. Schematische Darstellung eines vereinfachten Reaktionsmechanismus zur Bildung von CO und CN aus Carbamoylphosphat.**

X kann ein Enzym, ein Metall oder eine reaktive Gruppe darstellen. Nach Protonierung des Sauerstoff-Atoms der Carbonyl-Gruppe und anschließender Dehydratisierung kann CN entstehen. Erfolgt die Protonierung an der Aminogruppe mit anschließender Deaminierung kann das CO entstehen.



**Abbildung 21. Die Ausbildung eines Fe-Carbamoyl-Komplexes wäre der Initialschritt eines putativen Reaktionsweges für die Bildung von CO und/oder CN aus Carbamoylphosphat in Anlehnung an bekannte metallorganische Beispiele. (L:Ligand, P: Phosphat)**

Die Ausbildung eines Eisen-Carbamoyl-Komplexes würde möglicherweise den ersten Schritt in der Bildung des Eisen-Liganden Zentrums der [NiFe]-Hydrogenasen darstellen (Abbildung 21). Ist er einmal ausgebildet kann aus dem Carbamoyl-Rest CN und/oder CO gebildet werden. Eine vernünftige Hypothese zur Umwandlung des Carbamoyl-Liganden am Eisen zu einer Cyano-Gruppe unter biologische Bedingungen könnte nach folgendem Schema ablaufen. Die Protonierung des Sauerstoffs der Carbamoylgruppe (analog der bekannten *O*-Alkylierung von Eisen-Acylat-Komplexen durch „harte“ Nukleophile) führt zur formalen Bildung eines kationischen Metall-Carben-Komplexes (Simmelhack und Tamura 1983, Fischer *et al.* 1984). Eine anschließende Dehydratisierung dieses Intermediats resultiert in einen kationischen Metall-Komplex der Cyansäure. Metall-Komplexe der Isocyanate sind gut charakterisiert (Singleton und Oosthuizen 1983), solche der Cyansäure jedoch eher selten (Bruce und Wallis 1981). Verlieren letztere ein Proton, so entsteht die Metall-Cyano-Form. Weitaus schwieriger ist die Aufstellung einer Hypothese zur Umwandlung des Carbamoyl-Liganden am Eisen zur Carbonyl-Gruppe, wenn biologische Bedingungen beachtet werden müssen, aufgrund besonderer enzymatischer Anforderungen zur C-N-Heterolyse.

Die hier dargestellten chemischen Modelle bestärken die Annahme, das Carbamoylphosphat das Edukt der niedermolekularen Liganden des [NiFe]-Zentrums sein könnte.

### **B 7. Ist Carbamoylphosphat ein Substrat für das HypF-Protein?**

Da das Carbamoylphosphat eine essentielle Komponente im Reifungsprozess der [NiFe]-Hydrogenasen darstellt, sollte als nächstes eine biochemische Charakterisierung des HypF-Proteins durchgeführt werden. Da Carbamoylphosphat chemisch betrachtet ein Acylphosphat ist, könnte es theoretisch in der postulierten Acylphosphat-Phosphatase-Reaktion als Substrat umgesetzt werden. Zudem impliziert die putative *O*-Carbamoyltransferase-Funktion eine enzymatische Transferase-Funktion. Während erstere das Phosphat abspaltet und damit das Carbamat für einen Transfer freimacht, könnte der Carbamat-Rest durch die zweite Funktion entweder auf einen HypF-internen Aminosäurerest, auf ein Metall (z.B. Fe), auf ein weiteres Substrat, oder auch auf eines der anderen Hyp-Proteine übertragen werden. In den nachfolgenden Untersuchungen sollte dies überprüft werden.



## C. Biochemische Charakterisierung und Struktur-Funktions-Analyse des HypF-Proteins

### Allgemeines und historischer Rückblick

1975 wurde ein Bereich des *E. coli* Chromosoms charakterisiert und mit *hydA* bezeichnet, dessen Mutation zu einem Ausfall der Hydrogenase-Aktivität führt (Pascal *et al.* 1975). Die Sequenzierung dieses Locus ergab zwei offene Leserahmen (Karube *et al.* 1984), wobei einer Sequenzähnlichkeiten zu einem Gen aufwies, welches in den *hyp*-Operonen von *Azotobacter vinelandii* (Chen und Mortenson 1992) und *Rhizobium leguminosarum* (Rey *et al.* 1993) liegt und mit *hypF* bezeichnet wurde. 1996 wurde HypF dann als eines der sechs akzessorischen Hyp-Proteine, welche an der Reifung der Hydrogenasen beteiligt sind, identifiziert (Maier *et al.* 1996). Die Inaktivierung des *hypF*-Genprodukts durch Deletion führt zur Blockade der Reifung aller drei nachweisbaren Hydrogenasen in *E. coli*. Dieser Phänotyp ist charakterisiert durch das Ausbleiben der C-terminalen Prozessierung der großen Untereinheiten der Hydrogenasen und durch den kompletten Verlust der Hydrogenase 1, 2 und 3 Aktivität. Für Hydrogenase 3 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Prozessierungsdefekt von einer Blockade des Nickel-Einbaus begleitet ist. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass das *hypF*-Gen mit dem 5'-seitig gelegenen *hydN*-Gen ein Operon bildet, das ca. 13 kb vom *hypABCDE*-Operon entfernt liegt. Das *hydN-hypF*-Operon ist Teil des Formiat-Regulons und somit nur unter fermentativen Bedingungen gemeinsam mit dem *hypABCDE*-Operon induzierbar (Maier *et al.* 1996). Durch diese Charakterisierung des *hypF*-Gens konnte eine regulatorische Funktion, wie sie für das *hypF* aus *Rhodobacter capsulatus* beschrieben wurde (Colbeau *et al.* 1993), für *E. coli* ausgeschlossen werden.

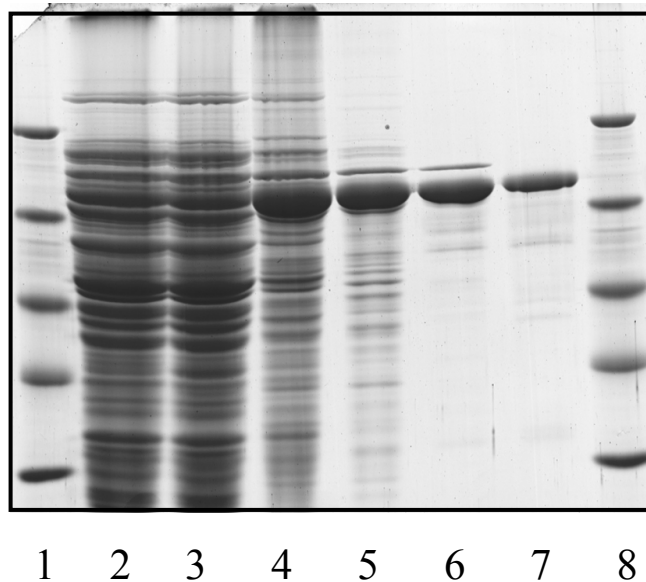
1996 gelang die Konstruktion eines Überexpressionsplasmides und es folgte die Aufstellung einer Reinigungsprozedur für das HypF-Protein aus *E. coli*, so daß eine erste Charakterisierung erfolgen konnte. Das HypF-Protein eluiert in Gelfiltrationsexperimenten als Monomer und das aerob gereinigte Protein ist nicht in der Lage *in vitro* Prozessierung von prä-HycE zu katalysieren (Zimmermann 1996).

Die Analyse ganzer Bakteriengenome lieferte HypF-homologe Proteinsequenzen vieler Mikroorganismen, die zur Expression von [NiFe]-Hydrogenasen befähigt sind (Tabelle 4). Das *hypF*-Genprodukt ist mit 700 bis 800 Aminosäuren das größte Hyp-Protein. Sein Gen kann in

einem Operon gemeinsam mit den anderen *hyp*-Genen vorliegen, meist in der Einheit *hypAFBCDE* oder es liegt ausserhalb des Operons wie in *E. coli* oder *R. capsulatus*.

### C 1. Reinigung von HypF

Das HypF-Protein wurde nach Überexpression des Gens auf dem Plasmid pUCF18 bis zur Homogenität aerob gereinigt. Dabei wurde die von Zimmermann (1996) aufgestellte Prozedur mit einem weiteren Schritt versehen, um eine optimale Reinigung zu erzielen. Sie umfasste somit folgende Schritte. Nach der Gewinnung des S100-Extraktes erfolgt eine Fällung bei 35% Ammoniumsulfat, wobei der Hauptanteil des HypF-Proteins ausfällt. Das Sediment wird gelöst, dialysiert und das Dialysat einer Anionenaustauscherchromatographie an der MonoQ-Säule unterzogen. Es folgen eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsuperose und eine Gelfiltration über Superdex-200, nachdem die HypF-enhaltenden Fraktionen über Centricon-Röhrchen aufkonzentriert wurden. Die erhaltene Proteinlösung ergab nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nur ein Proteinsignal, das von der Größe her dem für HypF theoretischen Wert von 81,9 kDa entsprach (Abbildung 22).



**Abbildung 22. Verlauf der Reinigung von HypF dargestellt anhand eines mit Coomassie gefärbten 10% SDS-Geles.** Spuren: (1 und 8) Molekularer Größenstandard ( $\beta$ -Galaktosidase, Rinder-Serumalbumin, Ovalbumin, Laktatdehydrogenase, Restriktionsendonuklease *Bsp98I*). (2) S10, (3) S100, (4) 0-35% Ammoniumsulfatfraktion, (5) vereinigte Fraktionen nach der MonoQ-Säule, (6) vereinigte Fraktionen nach der Phenyl-Superose-Säule und (7) vereinigte Fraktionen nach der Superdex 200 Gelfiltration

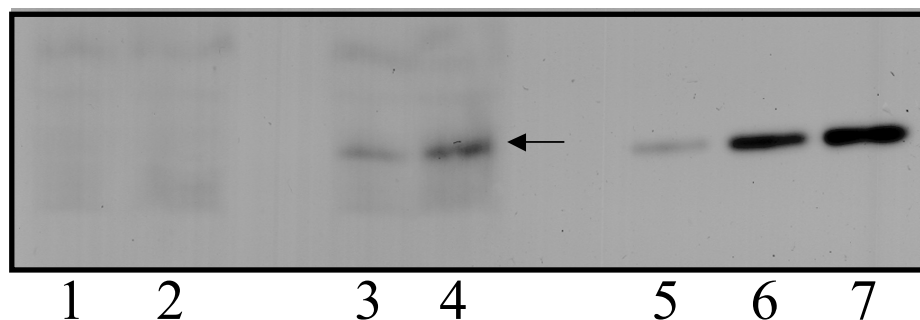
## C 2. Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität des HypF Proteins

Das gereinigte HypF wurde auf seine Fähigkeit zur Interaktion mit Carbamoylphosphat untersucht. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit eines Motivs des N-Terminus von HypF zu Acylphosphatasen erfolgte zuerst eine Untersuchung auf Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität. Dazu konnte auf etablierte Methoden zurückgegriffen werden.

### C 2. 1. Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivitätsfärbung von HypF in nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen

Eine im Jahr 1989 etablierte Aktivitätsfärbung in Polyacrylamid-Gelen erlaubte den Nachweis von durch Acylphosphatasen freigesetztem Phosphat (Mizuno *et al.* 1989). Zu diesem Nachweis werden Zellextrakte nach ihrer Auftrennung in Polyacrylamidgelen mit Acylphosphaten inkubiert. Das freigesetzte Phosphat kann durch Bleinitrat als weißes ausgefallenes Bleiphosphat sichtbar gemacht werden.

Der  $\Delta hypF$ -Stamm DHP-F wurde dazu mit dem Plasmid pAF1 oder pACYC184 transformiert und anaerob in TGYEP-Medium angezogen. Die gewonnenen Zellen wurden aufgebrochen, der S10-Extrakt über nicht denaturierende PAGE aufgetrennt und das Gel wurde einer Aktivitätsfärbung unterworfen (Abbildung 23).



**Abbildung 23. Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität nachgewiesen durch Aktivitätsfärbung in nicht denaturierendem Gel.** In den Spuren 5, 6 und 7 ist gereinigtes HypF-Protein aufgetrennt, in den Spuren 3 und 4 S10-Extrakt des DHP-F-Stamms, der das *hypF* auf dem pAF1 trägt. Als Kontrolle diente der gleiche Stamm mit dem Vektor pACYC184 (Spuren 1 und 2). In den Spuren 1 und 3 sind je 60  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen, in den Spuren 2 und 4 120  $\mu\text{g}$ . In den Spuren 5, 6 und 7 sind jeweils 2, 4 und 6  $\mu\text{g}$  reines HypF aufgetragen.

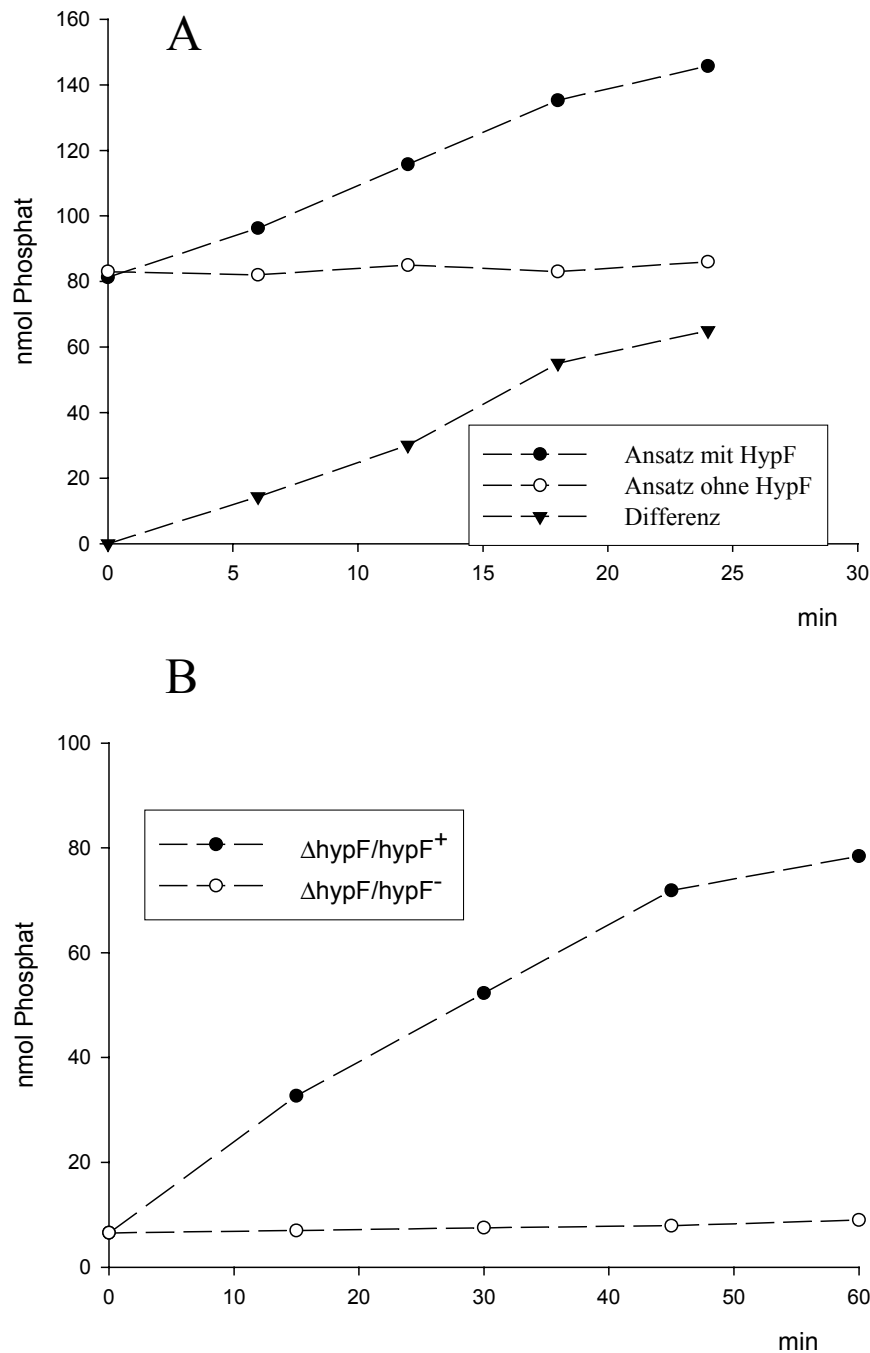
Inkubation des Gels mit Carbamoylphosphat führt zur Bildung von weißem Bleinitrat nur in den Spuren mit dem Extrakt der DHP-F/pAF1 Transformante und dem gereinigtem HypF-

Protein. Nur eine mit Blei darstellbare Phosphat-Bande wurde entwickelt. Da diese Bande in den Extrakten der Transformante DHP-F/pACYC184 gänzlich fehlt und da sie auf der gleichen Höhe wandert, wie die des gereinigten HypF-Proteins, kann davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um eine von HypF katalysierte Phosphat-Freisetzung handelt.

Neben Carbamoylphosphat wurde auch Acetylphosphat als Substrat eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich keine Phosphatfreisetzung, selbst bei längeren Inkubieren. Daraus kann entnommen werden, dass die Reaktion des HypF-Proteins mit Carbamoylphosphat spezifisch ist.

### **C 2. 2. Etablierung eines enzymatischen Ansatzes zur Untersuchung der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität von HypF**

Um die Phosphatase-Aktivität quantitativ zu bestimmen wurden Ansätze aus 50 mM Tris/Cl pH 7,4, 100 mM KCl, 1 mM MgAcetat, 0,1 mM DTT und Rinder Serumalbumin Frak. V (0,5 mg/ml) mit 1 µg HypF und 2,5 mM Carbamoylphosphat inkubiert. In Abständen von je 5 min wurden 200 µl entnommen und mit 20 µl 30% Trichloressigsäure versetzt. Nach Mischen und Zentrifugation wurde in den 220 µl nach der Methode von Heinonen und Lahti (1981) das freigewordene Phosphat ermittelt. Da Carbamoylphosphat ein relativ instabiles Molekül ist (Halbwertszeiten: ∞ bei -20°C, 16 h bei 0°C, 2 h bei 30°C, 50 min bei 37°C) (Spector *et al.* 1975), wurde im Parallelansatz ohne HypF dieser chemische Zerfall bestimmt. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass die Versuche bei 30°C durchgeführt wurden, um eine Halbwertszeit für Carbamoylphosphat von bis zu 2 h zu gewährleisten.



**Abbildung 24. Freisetzung von Phosphat aus Carbamoylphosphat durch gereinigtes HypF-Protein (A) und durch DHP-F/pAF1 Extrakte die nach einer 35% Ammoniumsulfatfällung angereichert wurden (B).** Die Bestimmung der Phosphatfreisetzung erfolgte nach Heinonen und Lahti (1981). In A ist die Art der Berechnung des Nettoumsatzes an Phosphat zu beachten. In B ist lediglich der Nettoumsatz dargestellt.

Es zeigte sich, dass HypF die Freisetzung von Phosphat katalysiert (Abbildung 24A). Im Ansatz ohne HypF konnte ebenfalls Phosphat nachgewiesen werden, was entweder auf spontane Hydrolyse des Carbamoylphosphats oder internes Lithiumphosphat (von der Synthese stammend) zurückzuführen ist. Diese nicht enzymatisch bedingte freigesetzte Phosphatmenge blieb über den Verlauf der Reaktion hindurch weitgehend konstant. Sie wurde stets vom enzymatisch freigesetzten Phosphat abgezogen um den tatsächlichen Netto-Phosphatumsatz zu ermitteln.

Als nächstes wurde untersucht, ob es möglich ist die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität in Zell-Extrakten nachzuweisen. Dazu wurden Extrakte von MC4100, DHP-F, DHP-F/pAF1 und DHP-F/pACYC184 verwendet. Während eine Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität in S10- und S100-Extrakten nicht messbar war, konnte nach einer Anreicherung durch Ammoniumsulfatfällung in S100-Extrakt aus der Transformante DHP-F/pAF1 die Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 24B). In Extrakten der Transformante DHP-F/pACYC184 war dagegen keine Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität nachweisbar.

### **C 2. 3. Substratspezifität des HypF-Proteins**

Nachdem nun bewiesen war, dass HypF Carbamoylphosphat-Phosphatase Aktivität besitzt, stellte sich die Frage nach der Substratspezifität dieser Reaktion. Neben Carbamoylphosphat sind in allen Zellen weitere biologisch relevante Acylphosphate anzutreffen. So ist Acetylphosphat ein häufiges Stoffwechselprodukt vieler Bakterien, besonders wenn diese unter anaeroben Bedingungen wachsen. Tabelle 7 zeigt, dass Acetylphosphat von HypF-Protein nicht als Substrat akzeptiert wird. Andere phosphorylierte Verbindungen wie Phosphoenolpyruvat, Kreatinphosphat und Glycerin-2-Phosphat werden ebenfalls nicht hydrolysiert. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass die Phosphatase Aktivität von HypF spezifisch für Carbamoylphosphat ist, jedenfalls unter den getesteten Substanzen.

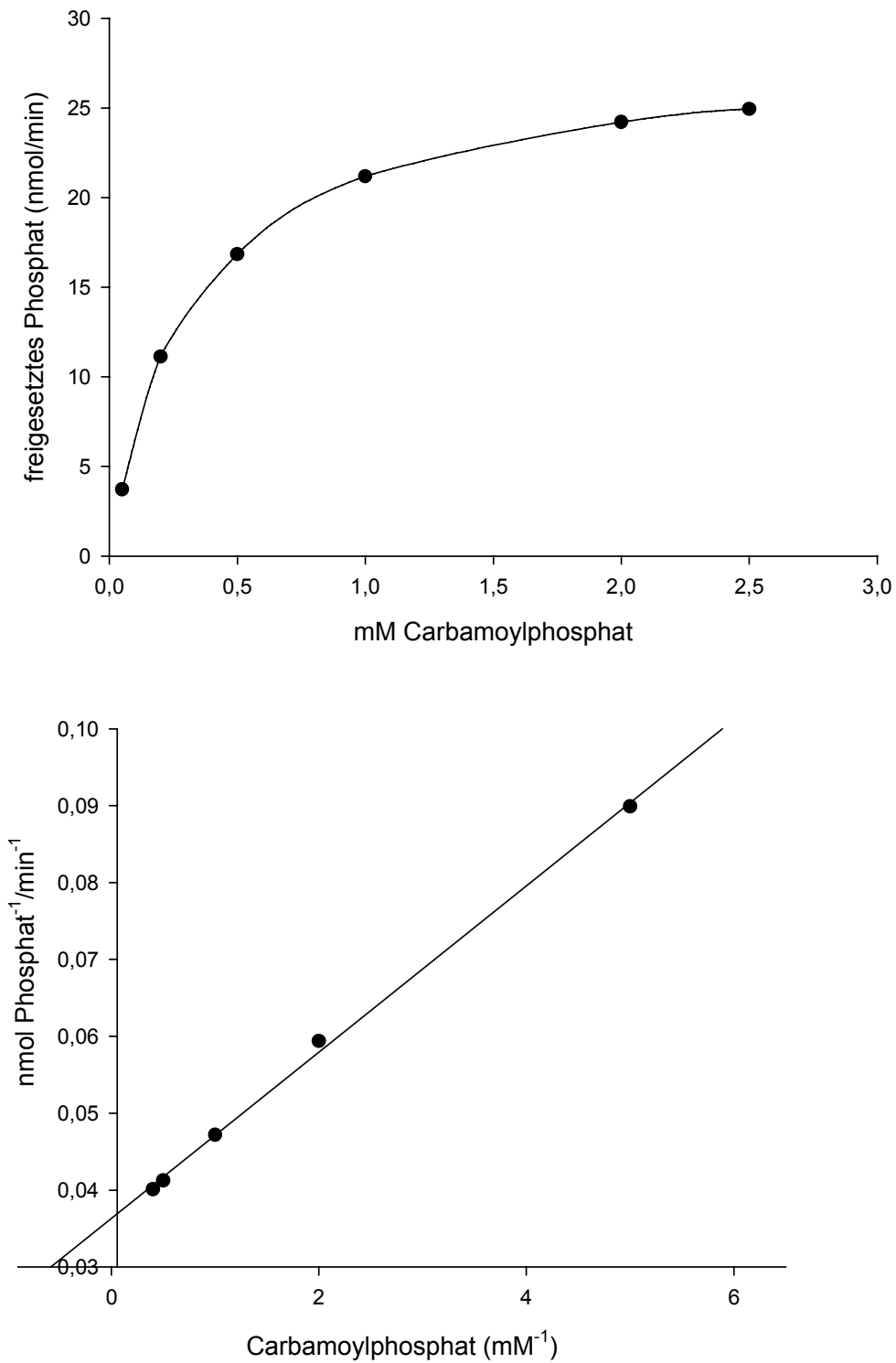
**Tabelle 7. Substratspezifität von HypF gemessen in der Phosphatase-Reaktion.**

Substrat <sup>+</sup>	Phosphatase Aktivität (pmol P <sub>i</sub> x pmol HypF <sup>-1</sup> x s <sup>-1</sup> )
Phosphoenolpyruvat	<0.01
Kreatinphosphat	<0.01
Acetylphosphat	<0.01
Glycerin-2-phosphat	<0.01
Carbamoylphosphat	6.7

<sup>+</sup> 2,5 mM Endkonzentration

#### **C 2. 4. Bestimmung der kinetischen Parameter der Carbamoylphosphat-Phosphatase Aktivität von HypF**

Die Kinetik der Freisetzung von Phosphat aus Carbamoylphosphat durch das HypF-Protein wurde als nächstes aufgenommen. Dazu wurde im Enzymtest die Phosphat-Freisetzung bei verschiedenen Konzentrationen von Carbamoylphosphat analysiert (Abbildung 25). Wie aus der Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Carbamoylphosphat-Konzentrationen ersichtlich ist, folgt die Carbamoyl-Phosphat-Phosphatase-Aktivität von HypF einer Michaelis-Menten-Kinetik. Aus den erhaltenen Daten verschiedener unabhängiger Messungen ergab sich in der Lineweaver-Burk-Auftragung ein  $K_M$ -Wert zwischen 260 und 330  $\mu\text{M}$  und ein  $k_{cat}$  von  $10 \text{ s}^{-1}$ .



**Abbildung 25. Kinetik der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion von HypF.** Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Darstellung der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität des HypF-Proteins bei verschiedenen Konzentrationen von Carbamoylphosphat.



## C 2. 5. Untersuchungen zur Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität von HypF

Als nächstes sollte der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion getestet werden. Die Anwesenheit der Zinkfinger-Motive im HypF-Protein ließ vermuten, dass Metalle daran binden können und dadurch einen Einfluß auf die Reaktion haben. Bei Zugabe von divalenten Kationen ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) einzeln und in Kombinationen zeigte sich jedoch keine Veränderung der Aktivität. Da nicht von vornherein ausgeschlossen werden konnte, dass an den Zinkfinger-Strukturen bereits Metalle gebunden sind, wurde HypF in Anwesenheit von 1 mM verschiedener Chelatoren (EDTA, EGTA, o-Phenanthrolin, Dipyridyl, Dimethylglyoxim) über Nacht dialysiert und anschließend im enzymatischen Ansatz auf seine Aktivität untersucht. In anderen Ansätzen wurden die gleichen Chelatoren in einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  ohne Vorinkubation zugesetzt. Es ergab sich auch hier kein Einfluss auf die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von DTT (0.1 mM, 1 mM) hatte ebenfalls keinen Einfluß.

Interessant schien die Frage nach der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität in Extrakten von Zellen, die eine Defizienz im Transport von Nickel besitzen. Da bei der Umwandlung des Harnstoffs zur Carbamat-Zwischenstufe in der Urease-Reaktion Nickel nach einem Model von Dixon *et al.* (1980) als Lewis-Säure an der Stabilisierung der Carboxyl-Gruppe beteiligt ist, wurde hier untersucht, ob das Nickel auch für die HypF-spezifische Reaktion möglicherweise als Stabilisator eines putativen Carbamats notwendig ist. Dazu wurde HypF-Protein verwendet, das im Stamm NPF600 (*nik $\Delta$ hypF*) exprimiert wurde. Es zeigte sich, dass die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität unabhängig von der Anwesenheit von Nickel in der Anzucht ist.

Die beschriebene Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität des HypF-Proteins ist zwar spezifisch, macht aber energetisch betrachtet wenig Sinn. Die Schwierigkeit liegt darin, dass die aufgewandte Energie zur Synthese von Carbamoylphosphat in der Reaktion der Carbamoylphosphat-Phosphatase verloren wird. Es wurde deshalb vermutet, dass diese Hydrolyse eine Nebenreaktion darstellt, die dann beschränkt wird, wenn die Hauptreaktion, z.B. eine Transcarbamoylierung, nicht stattfinden kann. Um eine solche mögliche Transcarbamoylierung nachzuweisen, folgte eine Analyse der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion bei Zugabe von Aminosäuren zum Reaktionsansatz. Die Anwesenheit von 100 mM L-Ala, L-His,  $\beta$ -Ala,  $\alpha$ -

Aminobuttersäure, D-Ala, L-Ser, L-Arg, L-Val, L-Glu, Gly vermochte die Aktivität jedoch nicht zu beeinflussen.

Es scheint, dass die Abspaltung des Phosphat-Restes und der Verbleib der Carbamoyl-Gruppe am Enzym vermutlich zur Freisetzung von Ammoniak und CO<sub>2</sub> oder zu Cyanat führt (Spector *et al.* 1975). Da weitere mögliche Reaktionspartner unbekannt sind und somit im Ansatz fehlen, scheint Wasser der bevorzugte Reaktionspartner in den Ansätzen zu sein.

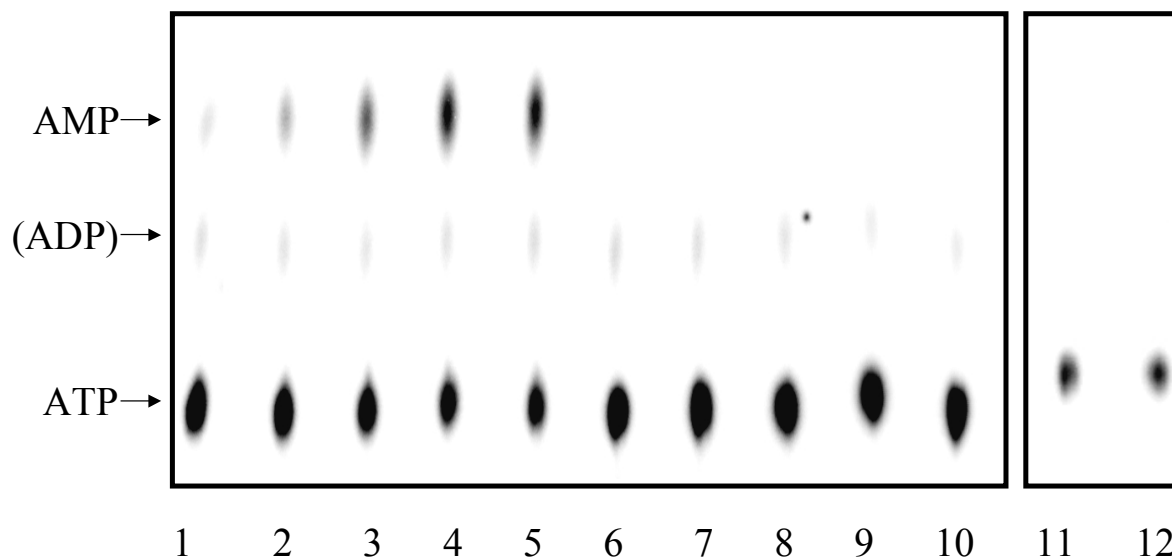
Ob bei dieser Reaktion HypF für eine gewisse Zeit carbamoyliert vorliegt oder ob die Hydrolyse des Carbamoylphosphats sofort stattfindet, konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Versuch eine carbamoylierte HypF-Zwischenform nach erfolgter Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion über Massenspektroskopie zu detektieren, lieferte aufgrund des ungünstigen Massenverhältnis von HypF-Protein zu Carbamoylphosphat (81880,9 g/mol zu 141,02 g/mol) kein Ergebnis.

### **C 3. Untersuchungen einer Carbamoylphosphat-vermittelnden ATP-Hydrolyse durch HypF**

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit charakterisierte A. Bauer (Bauer, 2002) das HypE-Protein aus *E. coli* und konnte diesem biochemisch eine ATP-hydrolysierende Aktivität zuordnen, die zur Bildung von ADP und Phosphat führt. Des weiteren konnte auch eine spezifische Interaktion zwischen dem HypE- und dem HypF-Protein aus *E. coli* nachgewiesen werden, die sich darin äußerte, dass beim Mischen der gereinigten Proteine und dem anschließenden Entwickeln in nicht denaturierende Polyacrylamidgelen, die Ausbildung einer zusätzlichen Migrationsform erfolgte. Ob es sich hierbei um einen HypE-HypF-Komplex handelt oder lediglich um eine andere Laufform eines der Proteine konnte nicht eindeutig charakterisiert werden.

Eine solche HypE-HypF Interaktion wurde für *H. pylori* während der Aufstellung einer sogenannte Protein-Protein-Interaktionkarte postuliert, in welcher *H. pylori* Proteine über ein Hefe-Zwei-Hybrid-System in einer hochkomplexen genomkodierten Polypeptid-Bibliothek nach Interaktionen analysiert wurden (Rain *et al.* 2001). Durch die Entwicklung eines Algorithmus konnte jeder möglichen Interaktion ein sogenannte *protein interaction score* zugeordnet werden (zwischen 0 (spezifisch) und 1(wahrscheinlich artifiziell)), welcher besagt, wie wahrscheinlich eine solche Interaktion auch *in vivo* anzutreffen ist. Aufbauend auf unserer Information über das HypE-Protein und der Tatsache, dass HypF mit Carbamoylphosphat als Substrat interagieren

kann, folgten nun weitere Untersuchungen zur ATP-Hydrolyse-Aktivität des HypE-Proteins, in Anwesenheit und Abwesenheit von HypF-Protein und mit und ohne Carbamoylphosphat. Dabei stellte sich heraus, das HypF selbst eine intrinsische ATP hydrolysierende Aktivität besitzt, die AMP und Pyrophosphat als Produkte liefert und die von der Anwesenheit von Carbamoylphosphat abhängig ist. Abbildung 26 stellt die Auftrennung der erhaltenen Produkte eines solchen HypF-ATP-Hydrolyse Ansatzes unter Verwendung von  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP in einer PEI-Dünnschichtchromatographie dar. Es kann eindeutig die  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -AMP-Bildung in Anwesenheit von Carbamoylphosphat detektiert werden.



**Abbildung 26. Hydrolyse von  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -ATP durch das HypF-Protein.** Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte der ATP-Hydrolyse-Reaktion von HypF auf einer PEI-Folie. In den Spuren 1 bis 5 ist der Reaktionsablauf in Anwesenheit von HypF-Protein plus Carbamoylphosphat aufgezeigt. In den Spuren 6 bis 10 fehlt im Ansatz das Carbamoylphosphat. Die Probenentnahme erfolgte jeweils nach 0, 2, 4, 8 und 16 min. In den Spuren 11 und 12 sind Proben aus einem Ansatz aufgetragen, der ATP und Carbamoylphosphat aber kein HypF-Protein enthält, jeweils 0 und 30 min nach Inkubation.

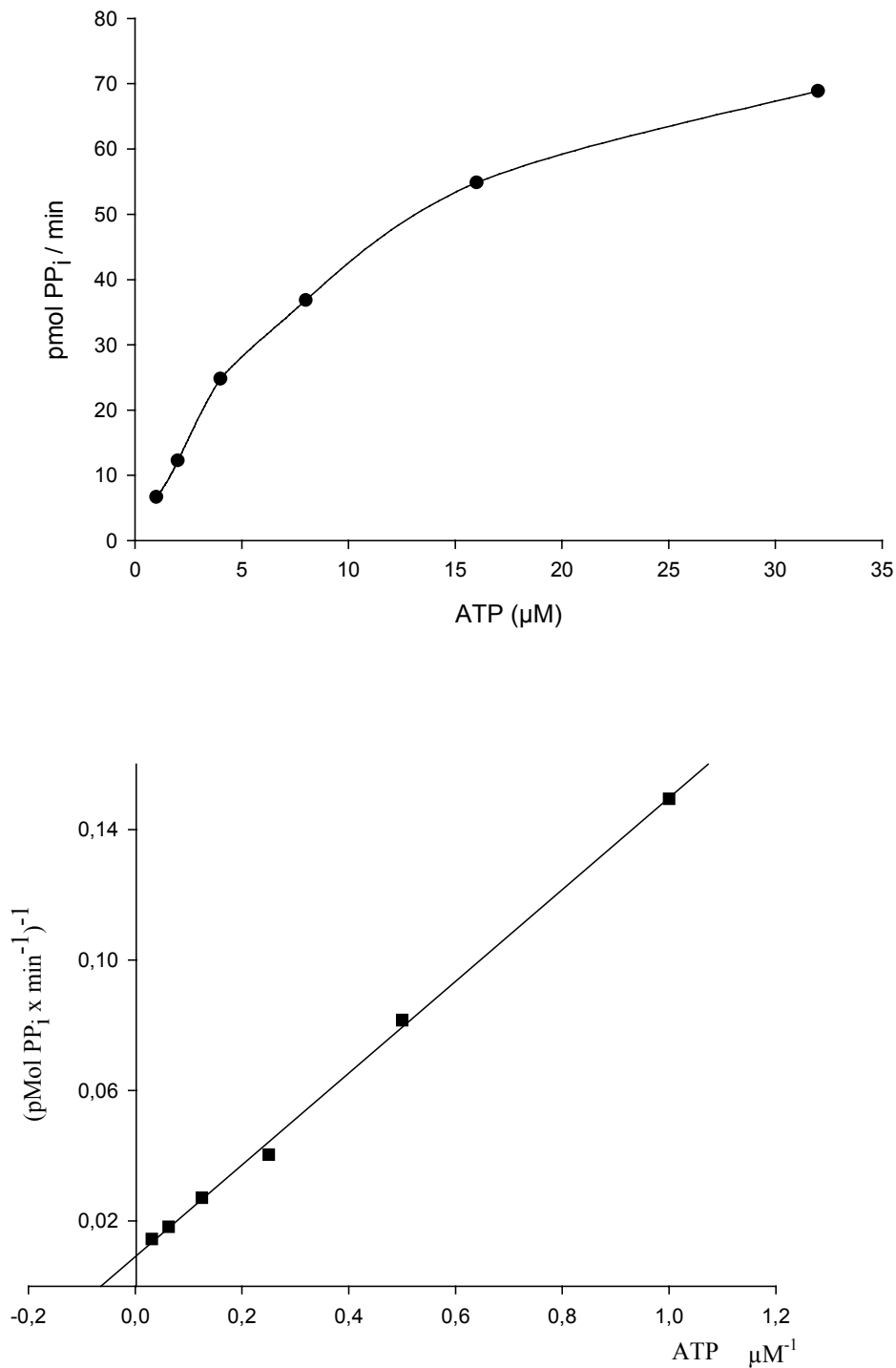
Eine Analyse der Proteinsequenz des HypF-Proteins auf signifikante Motive (Walker-Sequenzen, P-Loops) die charakteristisch für ATP bindende Enzyme sind, führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Lediglich das Vorhandensein des leicht abgewandelten Motivs GxGxxGA im *E. coli* HypF-Protein, das dem für ATP-Hydrolasen bekannten Motiv GxGxxGR/K ähnelt (Saraste *et al.* 1990) könnte auf die ATP-Hydrolyse-Fähigkeit hindeuten. Auffallend ist auch der

C-terminale Bereich des HypF-Proteins der glycinreich ist und der möglicherweise Phosphat-Gruppen von ATP stabilisieren könnte.

Von besonderen Interesse ist die Carbamoylphosphat-Abhängigkeit dieser ATP-Hydrolyse. Bauer (2002) konnte zwar die Spezifität auf Carbamoylphosphat eingrenzen, es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Substrate die ATP-Hydrolyse initiieren. Zu diesem Zweck wurde als nächstes die Fähigkeit des HypF-Proteins zur ATP-Hydrolyse in Anwesenheit weiterer Substrate untersucht, und zwar von carbamoylierten Aminosäuren (Carbamoyl-Arginin, Carbamoyl-Histidin, Carbamoyl-Aspartat, Carbamoyl-Prolin), von Substraten die Carbamat-Reste beinhalten (Biuret und Harnstoff), von Acetylphosphat, KCN und KOCN als putativen Produkten der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität. Diese Untersuchung erfolgte mit der weitaus sensitiveren PEI-Düschichtchromatographie und der Verwendung von  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP. Einzig und allein Carbamoylphosphat vermochte die ATP-hydrolysierende Aktivität zu stimulieren. Um auszuschließen, dass Carbamoylphosphat aufgrund seines hohen Gruppenübertragungspotentials mit ATP in einer rein chemisch ablaufenden Reaktion interagiert, wurde auch diese Kontrolle mitgeführt. In keinem dieser Ansätze wurde ein Einfluss auf die Grundaktivität beobachtet und nur in Anwesenheit des HypF-Proteins konnte ATP hydrolysierende Aktivität nach Zugabe von Carbamoylphosphat beobachtet werden.

### C 3.1. Kinetik der ATP-Hydrolyse

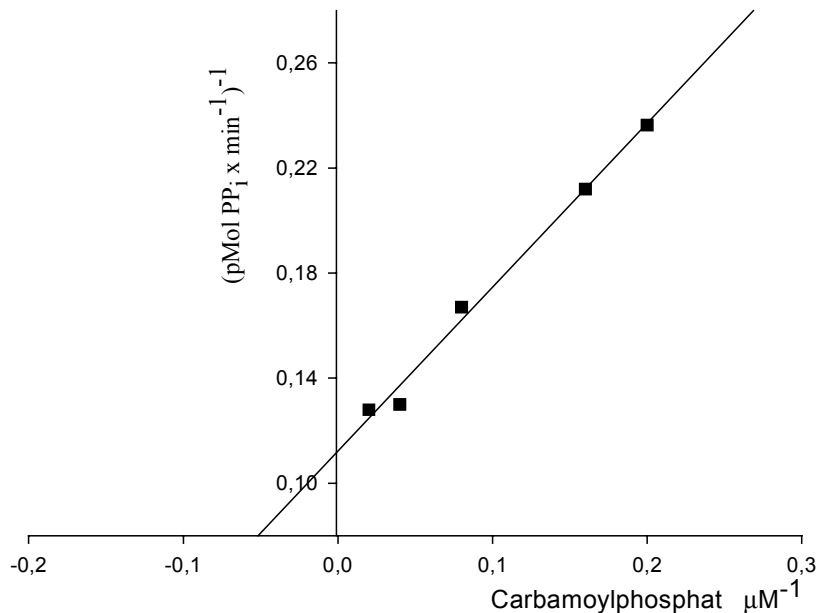
Die Carbamoylphosphat-abhängige ATP-Hydrolyse-Aktivität des HypF-Proteins wurde als nächstes auf die Kinetik der Reaktion analysiert. Die Untersuchung verlief unter Verwendung von  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP und die experimentelle Erfassung des abgespaltenen Pyrophosphates erfolgte durch Adsorption der AMP-Einheit an Perchlorsäure gewaschene Aktivkohle, wobei Pyrophosphat frei im Überstand unter sauren (Perchlorsäure-Anwesenheit) Bedingungen vorliegt. Das freigesetzte radioaktive Pyrophosphat konnte damit im Szintillationszähler gemessen werden. In diesen Ansätzen betrug die Konzentration des Carbamoylphosphats 100  $\mu\text{M}$ . In Abbildung 27 ist die graphische Darstellung der Kinetik der HypF katalysierten Reaktion aufgezeigt. Die graphische Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der ATP-Konzentrationen zeigt, dass die ATP-Hydrolyse-Aktivität von HypF der Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht. Aus den erhaltenen Daten ergab sich in der Lineweaver-Burk-Auftragung ein  $K_M$ -Wert von 15  $\mu\text{M}$  und ein  $k_{cat}$  von 1,5  $\text{s}^{-1}$ .



**Abbildung 27. Kinetik der carbamoylphosphatabhängigen ATP-Hydrolyse-Reaktion von HypF.** Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Darstellung der carbamoylphosphat-abhängigen ATP-Hydrolyse-Reaktion des HypF-Proteins bei verschiedenen Konzentrationen von ATP und in Anwesenheit von 100 μM Carbamoylphosphat.

### C 3. 2. Bestimmung der Carbamoylphosphat-Affinität des HypF-Proteins über die ATP hydrolysierende Aktivität

Die Analyse der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität des HypF-Proteins wurde dann weiterhin bei konstanter ATP-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) und bei verschiedenen Carbamoylphosphat-Konzentrationen bestimmt (Abbildung 28). Das Ergebnis zeigt, dass die ATP-Hydrolyse schon bei relativ niedrigen Carbamoylphosphat-Konzentrationen startet und dass bei Abwesenheit von Carbamoylphosphat keine ATP-Hydrolyse-Aktivität nachweisbar ist. In Ansätzen mit Carbamoylkonzentrationen höher 100  $\mu\text{M}$  zeichnete sich eine Erniedrigung der ATP-Hydrolyse Aktivität ab (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise besetzt Carbamoylphosphat bei höheren Konzentrationen über seinen Phosphatrest die ATP-Bindetasche des HypF-Proteins. Aus den erhaltenen Daten ergibt sich in der Lineweaver-Burk-Auftragung ein  $K_M$ -Wert von 5,8  $\mu\text{M}$ . Er liegt im Vergleich zum  $K_M$ -Wert (260 und 330  $\mu\text{M}$ ) der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität wesentlich niedriger und zeigt eine höhere Affinität des HypF-Proteins für das Carbamoylphosphat in dieser Reaktion an.

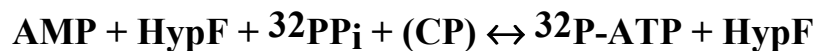
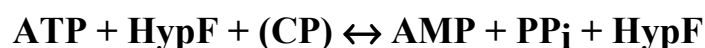


**Abbildung 28. Carbamoylphosphatabhängige ATP-Hydrolyse-Reaktion von HypF bei verschiedenen Carbamoylphosphat-Konzentrationen.** Lineweaver-Burk-Auftragung der carbamoylphosphat-abhängigen ATP-Hydrolyse-Aktivität des HypF-Proteins bei verschiedenen Konzentrationen an Carbamoylphosphat und Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  ATP dar.

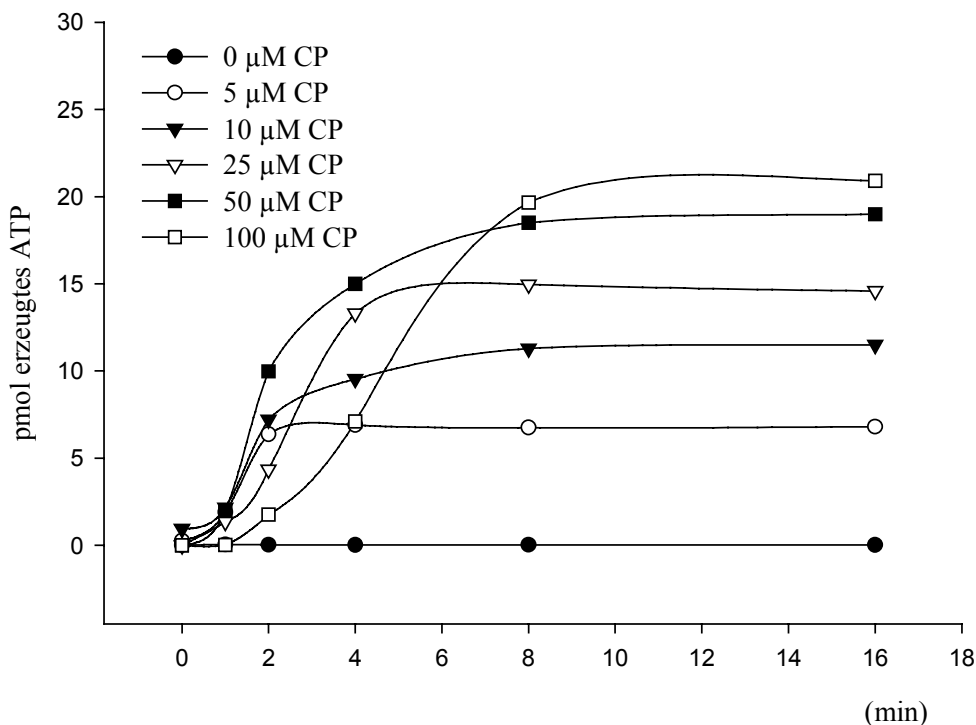
Untersucht man die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion in Anwesenheit von bis zu 100 mM ATP, zeigt sich kein Einfluß von ATP auf die Phosphatfreisetzung durch das HypF-Protein. Dadurch, dass bei diesem enzymatischen Test erst ab einer Carbamoylphosphat-Konzentration von mehr als 0,25 mM eine relativ gute Nachweisbarkeit des Phosphates durch die Methode von Heinonen und Lahti (1981) erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass die ATP-Hydrolyse bei dieser Carbamoylphosphat-Konzentration aufgrund der beschriebenen Hemmung nicht stattfindet. Auch der Einsatz des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons  $\alpha,\beta$ -Methylenadenosin-5-Triphosphat vermag die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion nicht zu stören. Eine Untersuchung der kinetischen Parameter der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion in Anwesenheit des  $\alpha,\beta$ -Methylenadenosin-5-Triphosphats ergab ebenfalls keine Änderung im Vergleich zur Reaktion mit hydrolysierbarem ATP. Um in dieser Richtung detailliertere Untersuchungen vorzunehmen, indiziert sich die Verwendung von [ $^{32}\text{P}$ ]-Carbamoylphosphat, welches dann bei niedrigen eingesetzten Konzentrationen über einen Szintillationszähler empfindlicher gemessen werden kann.

#### **C 4. Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion katalysiert durch das HypF-Protein**

Die Carbamoylphosphat Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse deutet darauf hin, dass Carbamoylphosphat möglicherweise ein kovalentes Intermediat entweder mit AMP oder Pyrophosphat ausbilden kann. Sollte dies der Fall sein, wäre es möglich dieses Intermediat indirekt über eine sogenannte Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion zu visualisieren (Calendar und Berg 1966, Simlot und Pfaender 1973). In der Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion wird zunächst ATP in AMP und Pyrophosphat in Gegenwart eines geeigneten Intermediat-bildenden Substrats (hier Carbamoylphosphat (CP)) durch das Enzym (hier HypF) umgewandelt. Da dieses Intermediat in einem Gleichgewicht mit dem Enzym vorliegt, kann bei Zugabe von [ $^{32}\text{P}$ ]-Pyrophosphat das Ausgangssubstrat ATP wieder generiert werden, welches nun die radioaktive Markierung trägt (s. Schema).



Da sich zeitabhängig ein Reaktionsgleichgewicht einstellt, kann das gebildete radioaktive ATP detektiert werden. Abbildung 29 zeigt, dass das HypF-Protein tatsächlich eine Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion in Anwesenheit von Carbamoylphosphat katalysiert. Das hier verwendete Verfahren zum Nachweis von radioaktiv gebildeten ATP bestand in seiner Adsorption an  $\text{HClO}_4$  gewaschene Aktivkohle und Entfernung des  $^{32}\text{P}$ -Pyrophosphates durch anschließende Filtration. Da Pyrophosphat vom Filter nicht zurückgehalten wird, kann durch eine Zunahme der Radioaktivität auf die Bildung von ATP geschlossen werden.



**Abbildung 29.** [ $^{32}\text{P}$ ]-Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktionen katalysiert durch HypF bei unterschiedlichen Konzentrationen von Carbamoylphosphat. (CP: Carbamoylphosphat)

Da in einigen ATP-Hydrolyse-Reaktionen die AMP als Produkt liefern, z.B. die SelD-Reaktion (Ehrenreich et al. 1992), das  $\gamma$ - und das  $\beta$ -Phosphat aufeinanderfolgend freigesetzt werden, wäre in solchen Fällen ein Pyrophosphat-ATP-Austausch-Test nicht möglich. Die erhaltenen Resultate bestärken somit zusätzlich die Tatsache, dass die ATP-Hydrolyse neben AMP direkt Pyrophosphat liefert. Das Erreichen des Plateaus könnte mit der



Gleichgewichtseinstellung der Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion oder der Abnahme des Substrats Carbamoylphosphat aufgrund seiner Labilität zusammenhängen.

### C 5. Struktur-Funktions Analyse von verschiedenen HypF-Varianten.

Die bisherigen Erkenntnisse von Wildtyp-HypF erlauben zusammenfassend folgende Aussagen:

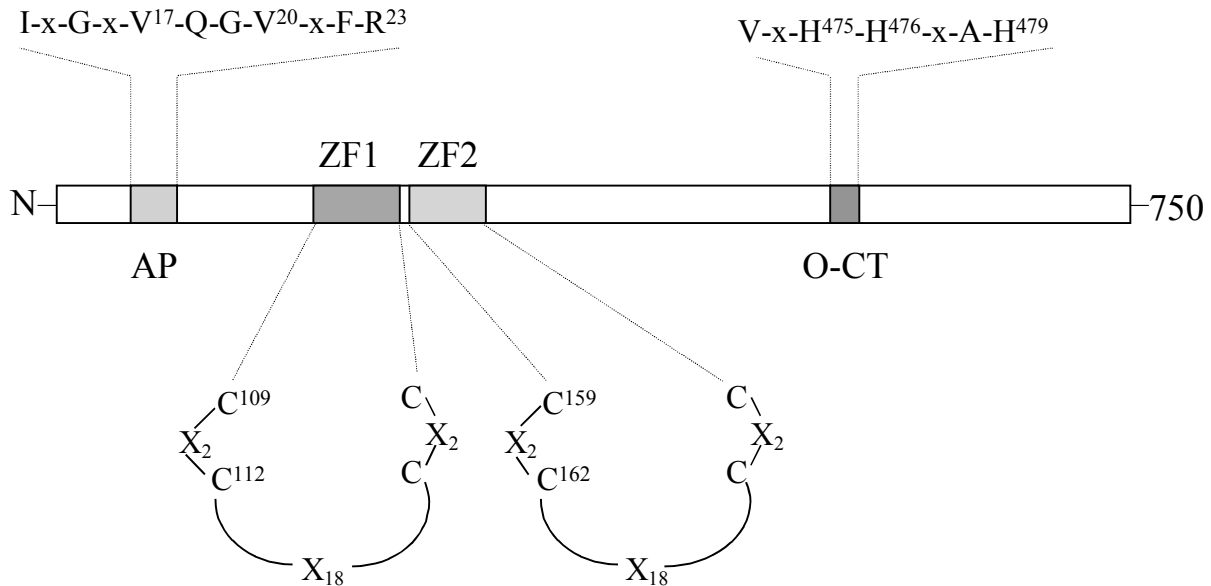
- (i) HypF ist ein akzessorisches Protein, das am Metall-Einbau der Hydrogenasen beteiligt ist (Maier *et al.* 1996).
- (ii) HypF besitzt die Aktivität einer Carbamoylphosphat-Phosphatase.
- (iii) HypF besitzt eine Carbamoylphosphat-abhängige ATP hydrolysierende Aktivität, die zur Bildung von AMP und Pyrophosphat führt.
- (iv) HypF katalysiert einen Pyrophosphat-ATP-Austausch in Gegenwart von Carbamoylphosphat.
- (v) HypF- und HypE-Protein können *in vitro* und *in vivo* interagieren (Rain *et al.* 2001, Bauer 2002, Reissmann persönliche Mitteilung)

Will man die biochemischen Eigenschaften von HypF in einen Zusammenhang mit dem Ablauf der Hydrogenase-Reifung (Metalleinbau, C-terminale Prozessierung, Assemblierung der großen und kleinen Untereinheit zu aktiven Hydrogenasen) stellen, muss untersucht werden, ob die beschriebenen HypF-Aktivitäten essentiell für dessen Funktion in der Reifung sind. Dazu sollten Punktmutationen in das *hypF*-Gen eingeführt werden und die erhaltenen HypF-Varianten anschließend auf Aktivität im Reifungsprozess untersucht werden. Dabei war zusätzlich Information über die Essentialität der konservierten Motive des HypF zu erwarten.

#### C 6.1. Gezielte Mutagenese des *hypF*-Gens

Für die gezielte Mutagenese kamen vor allem die konservierten Motive des HypF in Betracht, die in Abbildung 30 mit den durchgeführten Austauschen angegeben sind. Unter Berücksichtigung schon vorhandener Mutanten im Acylphosphat-Phosphatase-Motiv anderer Proteine wurde in HypF hauptsächlich das Arg-23 ausgetauscht (Swindells *et al.* 1993, Taddei *et al.* 1994). Von den zwei „Zink-Finger“-Motiven wurden jeweils die ersten beiden Cysteine einzeln oder jeweils nur das „zweite“ in Alanin umgewandelt. Im Poly-Histidin-Motiv wurde jedes der konservierten Histidine einzeln gegen Alanin ausgetauscht, wobei noch eine HypF-

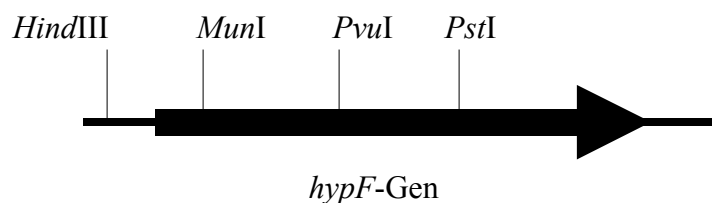
Variante konstruiert wurde, in der zwei Histidine in Alanine umgewandelt wurden. In einer weiteren HypF-Variante waren alle Histidine durch Tyrosine ersetzt.



**Abbildung 30. Schema des HypF-Proteins mit der relativen Position der mutierten Motive.** Die hochgestellten Zahlen geben die Position der Aminosäure an, die in der Mutationsanalyse spezifisch ausgetauscht wurde. AP stellt die Acylphosphat-Phosphatase-Domäne, ZF1 und ZF2 die zwei Zink-Finger-Motive und O-TC die putative *O*-Carbamoyl-Transferase-Domäne dar.

Zur Einführung der Punktmutationen in das *hypF*-Gen wurde eine Mutagenese mit mutagenen Oligonukleotiden nach der Methode der reversen PCR von Ochman *et al.* (1988) oder nach der Methode der überlappenden Oligonukleotide nach Ansaldi *et al.* (1996) angewandt. Wo es möglich war, wurde durch den Basenaustausch eine singuläre Restriktionsschnittstelle geschaffen oder eine bereits vorhandene entfernt. Dadurch wurde die Suche nach erfolgreichen Basenaustauschen erheblich erleichtert. Das Vorhandensein der Mutation und die Fehlerfreiheit der Gesamtsequenz wurde schließlich durch eine Sequenzierung verifiziert. Da das *hypF*-Gen sehr groß ist (2253 bp), und es im pACYC184-Vektor kloniert vorlag, der in der PCR-Reaktion ebenfalls mit amplifiziert wurde, bestand das Problem der Generierung von Mutationen innerhalb und außerhalb des *hypF*-Gens. Um solche statistisch durch die Polymerase eingebauten Fehler auszuschließen, wurde über die Auswahl geeigneter Restriktionsschnittstellen eine Umklonierung des mutagenisierten *hypF*-Genbereiches in das pAF1-Plasmid vollzogen. Dadurch entstanden pAF1-Derivate mit den HypF-Varianten, in denen letztendlich nur ein kleiner Teil des *hypF*-Gens

über die PCR-Reaktion synthetisiert wurde. Abbildung 31 zeigt die Restriktionsschnittstellen, die für solch einen Austausch gewählt wurden auf.



Motiv	Restriktionsschnittstelle
Acylphosphatase	<i>HindIII-MunI</i>
Erstes Zinfinger-Motiv	<i>MunI-PvuI</i>
Zweites Zinkfinger-Motiv	<i>MunI-PstI</i>
Poly-Histidin-Motiv	<i>PvuI-PstI</i>

**Abbildung 31. Wahl geeigneter Restriktionsschnittstellen bei der Umklonierung von über PCR amplifizierten pAF1-Derivaten in pAF1.**

### C 6.2. Kostruktion von DHP-F2

Da im Stamm DHP-F eine verkürzte Version von HypF immunologisch nachweisbar synthetisiert wird, die die geplanten Experimente stören könnte, erfolgte die Konstruktion einer neuen Deletionsmutante von *hypF*. Dadurch sollte unter anderem auch verhindert werden, dass es zur homologen Rekombination der Restsequenzen mit den mutierten Plasmid-Sequenzen, kommen kann. Aus dem *hypF*-tragenden Plasmid pAF1 wurde durch Restriktion mit *MunI* und *DraIII* ein 1715 bp Fragment (Position 178 bis 1893 des *hypF*-Gens) entfernt. Abbau des 3'-Überhangs des *DraIII*-Endes und Auffüllung des *MunI*-Endes ergaben das Plasmid pAdelF mit einer Deletion von 76,1% der kodierenden Region. Das verkürzte *hypF*-Gen wurde über die *BamHI*-Schnittstellen in pMAK700 umkloniert. Mit Hilfe dieses Konstruktes konnte über homologe Rekombination nach Hamilton *et al.* (1989) das Wildtyp *hypF*-Gen gegen das verkürzte *hypF*-Allel ausgetauscht werden. Der erhaltenen Stamm wurde DHP-F2 bezeichnet und verhielt sich bezüglich des Hydrogenase-Phänotyps identisch wie DHP-F.

### C 6.3. Mutationsanalyse von HypF

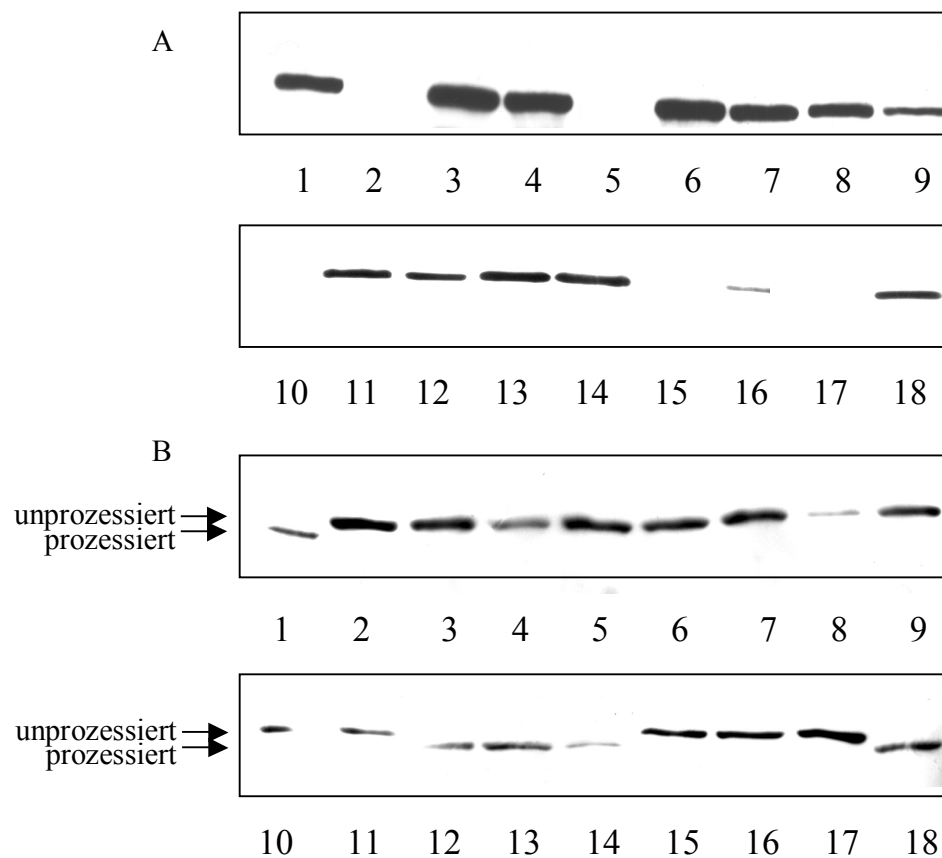
Die Analyse der erhaltenen HypF-Mutanten wurde durchgeführt, nachdem die Plasmide mit dem mutierten *hypF*-Gen jeweils in DHP-F und/oder DHP-F2 transferiert wurden. Als erstes wurde untersucht, welchen Einfluss die Aminosäureaustausche auf die Stabilität der synthetisierten HypF-Varianten hatte (Abbildung 32A).

Abgesehen von drei Ausnahmen werden alle *hypF*-Varianten stabil exprimiert. Diese Ausnahmen sind die R23K-, die C159A- und die H475A/476A-HypF-Varianten. Besonders interessant ist die C159A-Variante, zumal bei der Einführung der Doppelmutation C159A/162A stabiles Produkt erhalten wird. Schwach gebildet werden noch die Varianten C119A/121A und H456Y/457Y/458Y/459Y. Parallel zur Bestimmung der Stabilität der HypF-Varianten erfolgte die Analyse der Hydrogenase-Aktivität und der Fähigkeit zur H<sub>2</sub>-Bildung.

Es zeigte sich, dass Aminosäureaustausche im Acylphosphat-Phosphatase-Motiv einen drastischen Effekt auf die H<sub>2</sub>-Bildung haben. Lediglich der Austausch des Arg zu Asn lässt noch eine schwache Gasbildung zu. Alle weiteren HypF-Varianten, mutagenisiert im Acylphosphatase-Motiv, zeigten keine Gasbildung mehr.

Die Aminosäureaustausche in den beiden Zinkfinger-Motiven führten ebenfalls zum Totalverlust der Aktivität. Der Versuch durch Zugabe von Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> zum Anzuchtmedium alleine oder in Kombination die Aktivität zu rekonstituieren führt nicht zum Erfolg. Bei den Mutanten des Polyhistidin-Motivs beeinflusst ein einzelner Austausch der Histidine die Fähigkeit zur H<sub>2</sub>-Bildung nicht. Werden hingegen zwei Histidinreste ersetzt, ist das Protein instabil; werden alle vier ausgetauscht, ist keine H<sub>2</sub>-Produktion nachweisbar.

Die H<sub>2</sub>-Bildungs-Aktivität korreliert auch mit den Resultaten der Prozessierung der HycE-Untereinheit (Abbildung 32 B). Lediglich beim Austausch eines der Histidine in Alanin findet eine Prozessierung statt. Im Falle des Stammes mit der HypF-Variante R23Q war keine Prozessierung ersichtlich, obwohl eine geringe Gasbildung sichtbar war. In der Aktivitätsfärbung von S10-Extrakten in nicht denaturierender PAGE des DHP-F2-Stammes transformiert mit den HypF-Varianten tragenden Plasmiden ergab sich das gleiche Aktivitätsmuster für die Hydrogenase 1 und 2 (s. Tabelle 8). Lediglich die Einzelaustausche von Histidinen zu Alaninen führten zur Synthese aktiver Hydrogenasen 1 und 2.



**Abbildung 32. Immunologische Analyse der HypF-Varianten auf ihre *in vivo* Stabilität (A) und ihre Fähigkeit die Prozessierung der großen Untereinheit der Hydrogenase 3 bewerkstelligen (B).** Die Immunoblots zeigen 10% SDS-Gele in welchen Extrakte anaerob in TGYEP angezogene Zellen (0,1 OD<sub>600</sub>-Einheit) aufgetrennt wurden. Die aufgetrennten Proteine wurden für die Immunoblot-Analyse auf Membranen transferiert und diese mit Antikörpern gegen HypF (A) und HycE (B) entwickelt. Spur 1 und 18 Wildtyp HypF, Spur 2 und 17: DHP-F2, Spur 3-16: HypF-Varianten; 3: R23E, 4: R23H, 5: R23K, 6: R23Q, 7: R23EV17/20A, 8: C112A, 9: C109A/112A, 10: C162A, 11: C159A/162A, 12: H475A, 13: H476A, 14: H479A, 15: H475A/476A, 16: H475Y/476Y/477Y/479Y

#### C 6. 4. Auswirkung der Mutationen auf die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität von HypF

Als nächstes sollte geklärt werden, ob die eingeführten Aminosäureaustausche einen Einfluß auf die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität der HypF-Varianten ausüben. Dazu sollte ihre Fähigkeit zur *in vivo* Interaktion mit Carbamoylphosphat untersucht werden. Da eine Reinigungsprozedur für die HypF-Varianten noch nicht vorlag, wurde versucht über ihre Anreicherung aus Extrakten diese Untersuchung durchzuführen. Wie in C.2.2 gezeigt worden ist

können nach einem S100-Zentrifugationsschritt mit nachfolgender Ammoniumsulfatfällung bis zu einer Sättigung von 35% und anschließender Dialyse Extrakte erhalten werden, mit welchen eine Messung der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität erfolgen kann. Die dabei ermittelten Aktivitäten der HypF-Varianten sind in Tabelle 8. aufgeführt.

Es wurde gefunden, dass nur HypF-Varianten, die einzeln ausgetauschte Histidine zu Alanine besitzen, Carbamoylphosphat noch umzusetzen vermögen. Auch die Variante mit dem Austausch R23Q ist zu einer schwachen Phosphatfreisetzung fähig, die aber anscheinend nicht für die volle Rekonstitution der Hydrogenase-Aktivität ausreicht, da diese immunologisch nicht nachweisbar ist. Es wird von ihr dagegen eine geringe Menge H<sub>2</sub> gebildet. Obwohl die HypF-Varianten mit Austausch im Zinkfinger-Motiven exprimiert werden, besitzen sie überhaupt keine Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität. Hier kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine durch die Mutation verursachte strukturelle Veränderung zu diesem Verhalten führt. Ähnliches könnte auch für die Variante H475/476/477/479Y gelten.

Eine Zusammenfassung aller erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 8. wiedergegeben.

Ein Versuch in über Ammoniumsulfatfällung angereicherten Extrakten die carbamoylphosphatabhängige ATP-Hydrolyse zu messen schlug fehl, da offensichtlich dabei auch weitere ATP-umsetzende Enzyme angereichert werden. Es erfordert demnach die Reinigung der mutierten Proteine.

### **C 7. Untersuchung zum Metallgehalt des HypF-Proteins**

Die Frage der Funktion der zwei CxxCx<sub>18</sub>CxxC-Motive in HypF konnte auch die Mutationsanalyse nicht klären. Offenkundig ist ihre Essentialität bei der Ausbildung aktiver Hydrogenasen. In Versuchen mit Zugabe von divalenten Kationen in die Carbamoylphosphat-Phosphatase Enzytests kam es nicht zur Rekonstitution der Hydrogenase-Aktivität. Dennoch sollte untersucht werden, ob HypF einen Metall-Cofaktor besitzt. Zu diesem Zweck wurde das HypF einer AAS und ICP-AES-Analyse unterzogen. Da die Anwesenheit von EDTA, DTT oder anderer Metallchelatoren in den Puffern zum Metallverlust im Protein führen kann, wurde eine Reinigung des HypF-Proteins wie sie im Material und Methoden-Teil beschrieben ist durchgeführt jedoch in Abwesenheit von DTT und EDTA.

Tabelle 8. Zusammenfassung der Resultate der Mutationsanalyse des HypF-Proteins

HypF-Varianten	Stabilität <sup>a</sup>	Hydrogenase Aktivität			Gas- bildung	Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität <sup>d</sup>
		1 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>		
Wildtyp	+++	+	+	+	+++	25
-	-	-	-	-	-	< 0,1
pR23E, pR23H	+++	-	-	-	-	< 0,1
pR23EV17/20A	+++	-	-	-	-	< 0,1
pR23K	-	-	-	-	-	< 0,1
pR23Q	+++	-	-	-	+	2,2
pC112A	+++	-	-	-	-	< 0,1
pC109/112	++	-	-	-	-	< 0,1
pC162A	-	-	-	-	-	< 0,1
pC159/162A	++	-	-	-	-	< 0,1
pH475A	+++	+	+	+	+++	16,2
pH476A	+++	+	+	+	+++	21,2
pH479A	+++	+	+	+	+++	18,2
pH475/476A	-	-	-	-	-	< 0,1
pH475/476/478/479Y	+/-	-	-	-	-	< 0,1

<sup>a</sup> detektiert durch Immunoblot-Analyse mit Antikörpern gegen HypF

<sup>b</sup> detektiert durch Hydrogenase Aktivitäts Färbung in nicht denaturierender PAGE

<sup>c</sup> detektiert durch Immunoblot-Analyse mit Antikörpern gegen HycE

<sup>d</sup> bestimmt durch Carbamoylphosphat-Phosphatase Aktivität (freigesetztes Phosphat  $\times \text{s}^{-1}$ )

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Reinigung über mehrere Schritte und unter aeroben Bedingungen ebenfalls zum Metallverlust führen kann, erfolgte zusätzlich eine Anreicherung bzw. Reinigung über Affinitätschromatographie mittels Strep-tagII. Dem *hypF*-Gen wurde dazu sowohl C- als auch N-terminal die Strep-tagII-Extension anfusioniert. Die Konstruktion erfolgte über Amplifikation des *hypF*-Gens mittels PCR aus den Bakterienchromosom und über gerichtete Klonierung in pASK-IBA2 (für die C-terminale StrepTagII-Variate) oder pASK-IBA5 (für die N-terminale StrepTagII-Variate). Wurde ein  $\Delta hypF$ -Stamm mit diesen Plasmiden transformiert, zeigten die Transformanten einen Hydrogenase-positiven Phänotyp. In der immunologischen Untersuchung stellte sich jedoch heraus, dass die C-terminale StrepTagII-Variante instabil war (Daten nicht gezeigt). Für die AAS- und ICP-AES-Analyse wurde deshalb das aus anaerob angezogenen Zellen gewonnene N-terminale Strep-tagII-HypF-Protein unter Verwendung milder Pufferbedingungen angereichert.

Die Messung des aerob gereinigten HypF über ICP-AES ergab keinen Gehalt an Ni, Co, Cu, Mn und Mo. Die Anwesenheit von Fe und Zn konnte sowohl über ICP-AES als auch AAS bestätigt werden, jedoch lag sie unterstöchiometrisch vor. Bei der Messung des Strep-tagII-HypFs deuteten die Emissionslinien auf Anwesenheit von Fe und Zn hin, jedoch war eine Bestimmung ihres genauen Gehalts aufgrund der geringen Proteinkonzentration und Probenmenge schwierig bzw. mit hohen Fehlern behaftet.

**Tabelle 9. Atom-Absorptions-Spektroskopie und ICP-AES Analyse von aerob gereinigtem HypF**

Metall	Metallgehalt
Zn	1 mol Zn <sup>2+</sup> pro 2.5 mol HypF
Fe	1 mol Fe(?) pro 7.8 mol HypF
Ni, Co, Cu, Mn, Mo	kein Ni, Co, Cu, Mn, Mo

Eine interessante Beobachtung über eine mögliche Funktion des Cystein-Motivs kam über die Carbamoylphosphat-Aktivitätsfärbung in Gelen von dialysiertem HypF, das mit oder ohne DTT behandelt worden war. In Abwesenheit von DTT entwickelte sich in der Aktivitätsfärbung keine weiße Phosphat-Bande; anders lag der Fall bei Anwesenheit von DTT. Offenbar fokussiert die Anwesenheit von DTT das Wanderungsverhalten des HypF-Proteins in nicht denaturierenden



Gelen in einer präzisen Position im Gel, während die Abwesenheit von DTT zur Bildung von verschiedenen Laufformen führt, die in Form eines Schmiere im Gel verteilt vorliegen. So kann sich das freigesetzte Phosphat nicht an einer Zone sammeln und visualisiert werden. Diese Beobachtung verdeutlicht die Wichtigkeit der Cystein-Motive als ein möglicherweise strukturgebendes Element des HypF-Proteins.

### **C 8. Der erste und der letzte Schritt in der Reifung der großen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenasen**

Die Beteiligung des Carbamoylphosphats an der Reifung der großen Untereinheiten der Hydrogenasen in *E. coli* und seine Einschleusung über das HypF-Protein in die Reifungskaskade, stellen vermutlich die ersten Schritte in der Biosynthese des [NiFe]-Zentrums dar. In der Biosynthese aktiver [NiFe]-Hydrogenasen besteht der abschließende Reifungsschritt der großen Hydrogenase-Untereinheit in der proteolytischen Entfernung eines C-terminalen Peptids. Dabei wird die C-terminale Extension der großen Untereinheit nach der Inkorporation von Eisen mit seinen niedermolekularen Liganden und von Nickel durch eine spezifische Protease entfernt (Böck 1998). Diese Prozessierung induziert vermutlich die Umlagerung des [NiFe]-Metallzentrums in eine „geschlossene“ Konformation tief im Inneren des Proteins, wie sie die Röntgenstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* zeigt (Volbeda *et al.* 1995). Mit wenigen Ausnahmen (sensorische Hydrogenase aus *R. eutropha* (Bernhard *et al.* 2001), Hydrogenase 4 aus *E. coli* (Andrews *et al.* 1997)) besitzt jede große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenasen ihre spezifische Protease (Böck 1998). Über die Bestimmung der 3D Struktur einer solchen Reifungsprotease sollten Anhaltspunkte für deren Funktion erhalten werden. Diese Untersuchung verliefen parallel zur Analyse des HypF-Proteins über die gesamte Promotionszeit hinweg in enger Kooperation mit E. Fritsche von Max-Planck-Institut für Biochemie.

## D. Struktur und Funktion der an der Hydrogenase-Reifung beteiligten Endopeptidasen

Auf der Suche nach der prozessierenden Aktivität von Vorläufer-HycE konnte aus *E. coli*-Zellen ein 17 kDa großes Protein isoliert und angereichert werden, mit Hilfe dessen anschließend das zugehörige Gen *hycI* identifiziert wurde (Rossmann *et al.* 1995). Mit gereinigtem HycI-Protein und gereinigtem HycE-Vorläufer lief die Prozessierungsreaktion – soweit ersichtlich- ohne Beteiligung weiterer Komponenten ab. In HycE befindet sich die Spaltstelle 32 Aminosäuren entfernt vom C-Terminus, unmittelbar benachbart zum konservierten C-terminalen Cys-Motiv der Hydrogenasen. Die Prozessierungsreaktion wird von konventionellen Proteaseinhibitoren, wie PMSF, Benzamidin, EDTA oder EGTA nicht gehemmt, was mit der Tatsache korreliert, dass eine Suche nach charakteristischen Motiven für Serin-, Zink- oder saure Proteasen erfolglos blieb. Nur Inhibitoren gegen Cysteinproteasen zeigten eine gewisse Wirkung, die aber vermutlich auf der Entfernung von Ni aus dem Metallzentrum beruht (Sauter 1992). Da die Sequenzhomologien der Proteasen untereinander relativ gering sind, könnte dies ihre strikte Substratspezifität erklären (Rossmann *et al.* 1995).

Obwohl die C-terminale Prozessierung schon am Beginn der vorliegenden Arbeit den am besten charakterisierten und verstandenen Schritte in der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen darstellte, waren dennoch eine Reihe von Fragen unbeantwortet geblieben. Von besonderem Interesse war dabei die Art des Katalysemechanismus, da diese Proteasen aufgrund der Inhibitionsstudien sich nicht in Reaktionsschematas der vier Grundtypen von Proteasen einordnen lassen. Damit verknüpft sich die Frage nach dem aktiven Zentrum dieser Proteasen-Familie und parallel damit hängt die Fragestellung nach dem Vorhandensein eines typischen Substraterkennungsmotivs zusammen.

Zur Beantwortung dieser Fragen war es unerlässlich, eine dieser Proteasen einer kristallographischen Analyse näher zu bringen. Sie gelang mit HybD, der Protease der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 (HybC) (Fritsche *et al.* 1998). Die Struktur lieferte wertvolle Einblicke in die nickelabhängige Proteolyse im Rahmen des Hydrogenase-Reifungsprozesses. Diese Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit Erich Fritsche in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Huber vom MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

### D.1. Kristallzucht und Datensammlung

Das *hybD*-Gen wurde im Rahmen der Diplom-Arbeit (Paschos 1997) durch PCR aus dem Genom von *E. coli* MC4100 amplifiziert und in den Expressionsvektor pT7-7 kloniert.

Das native Protein konnte nach der Überexpression über einen Q-Sepharose Anionenaustauscher, eine Phenyl-Sepharose XK16/10 hydrophobe Interaktionssäule und eine Superdex-75 XK/60 Gelfiltrationssäule bis zur Homogenität gereinigt werden. Durch die Verwendung der selben Reinigungsprozedur wurde das Selenomethionin enthaltende HybD-Protein gereinigt.

Die Kristallzucht, die Datensammlung und die Auflösung der Kristallstruktur erfolgten ausschließlich am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durch Erich Fritsche. Ein ausgedehntes Screening-Verfahren mit der Methode der Dampfdiffusion bei 20°C führte zu folgenden optimalen Kristallisationsbedingungen. 2 µl Proteinlösung (25 mg/ml) in 10 mM MES/NaOH pH 6,5 und 4 µl Reservoirlösung (100 mM MES/NaOH, 0,9 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM CdSO<sub>4</sub> pH 6,5 ) wurden gemischt und als hängender Tropfen gegen die Reservoirlösung äquilibriert. Unter diesen Bedingungen erschienen nach 2 Tagen Kristalle, die eine Größe von 0,2 x 0,2 x 0,2 mm<sup>3</sup> aufwiesen.

Die Beugungsbilder dieser Kristalle wurden auf einem Image Plate Detektor mit einem Rigaku RU200 Dreanodengenerator als Röntgenquelle oder an der Beamline BW6 des DESY aufgenommen. Die Phasenbestimmung, der Modellbau und die Verfeinerung des Modells erfolgten mit dafür entwickelten Rechnerprogrammen.

## D.2. Kristallstruktur der Protease HybD aus *E. coli*

Die hier präsentierte HybD-Kristallstruktur ist Bestandteil der mit E. Fritsche gemeinsamen Veröffentlichung „Crystal Structure of the Hydrogenase Maturing Endopeptidase HYBD from *Escherichia coli*“ (Fritsche *et al.* 1999). Die ermittelten kristallographischen Daten des HybD-Proteins sind in den dafür bestimmten Datenbanken hinterlegt und jederzeit unter Eingabe nachfolgender Zugangs-Codes einsehbar:

Brookhaven Protein Data Bank

PDB: 1CFZ

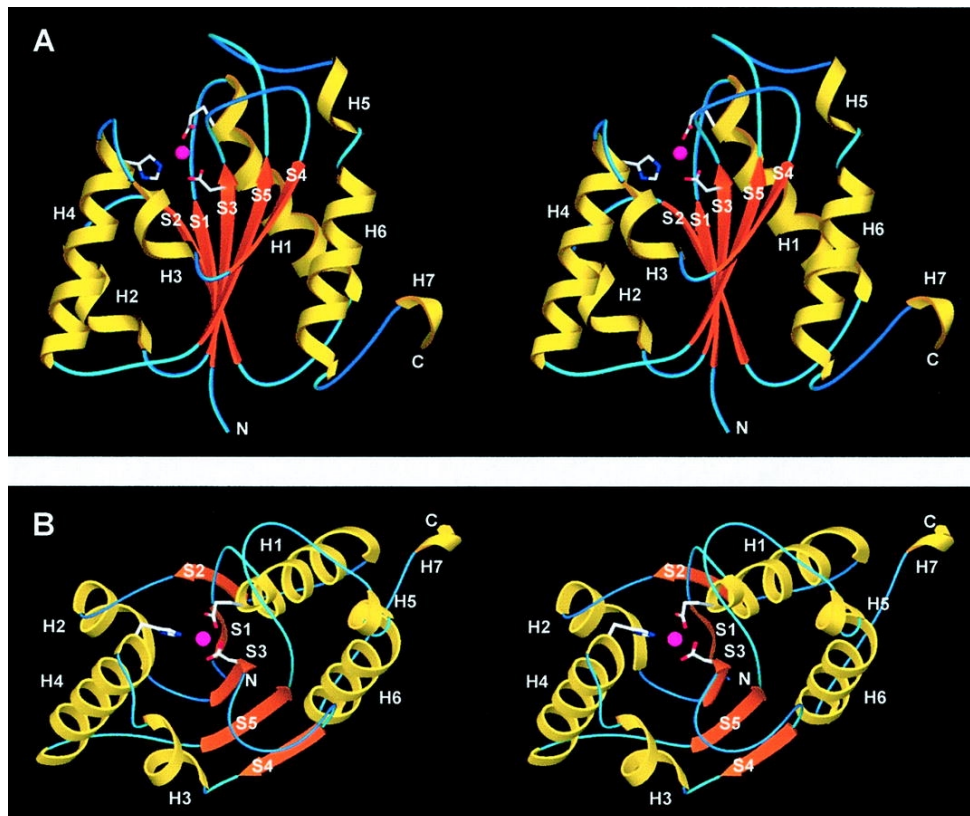
Molecular Modeling DataBase

MMDB: 12956

Das erhaltene 3D-Modell besteht aus 6 HybD-Molekülen. Es umfasst somit 972 Aminosäuren (6 x 162 Aminosäuren), dazu kommen noch 274 Wassermoleküle und jedes HybD-Molekül beinhaltet ein Metallion. Jedes HybD-Molekül besitzt eine Ausdehnung von 35 x 35 x 25 Å<sup>3</sup>.

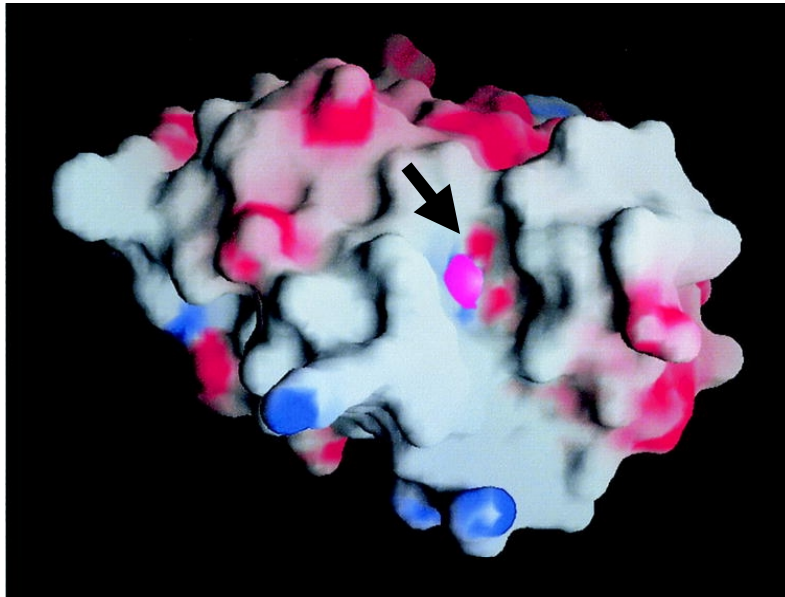
Ein HybD-Molekül ist aus einem fünf-strängigen β-Faltblatt (S1, S2, S3, S4 und S5) das von vier (H1, H5, H6 und H7) bzw. drei Helices (H2, H3 und H4) auf jeder Seite

umgeben ist aufgebaut. Die Topologie des  $\beta$ -Faltblattes ist S2-S1-S3-S5-S4, wobei S4 antiparallel zu den anderen Strängen ist. Die Helices H2 und H3 auf der einen Seite und H1 und H6 auf der anderen Seite machen den Kontakt zum  $\beta$ -Faltblatt, berühren jedoch nicht die Stränge S2 und S4 und exponieren sie somit der Umgebung. Die Helices H4, H5 und H7 sind nicht am Kontakt zum  $\beta$ -Faltblatt beteiligt. Der N-Terminus des HybD-Proteins bildet den Strang S3 aus und die Helix H7 bildet sich aus dem C-Terminus aus.



**Abbildung 33. Die Struktur von HybD.** Die Metall-ligandierenden Aminosäuren Glu16, Asp62 und His93 sind in der *ball-and-stick* Darstellung und das Metall ist als rosafarbene Kugel gezeigt. (A) Ansicht des HybD von der Seite. (B) Ansicht von oben auf die vorgeschlagene Peptidbindungsfurche und das gebundene Metall-Ion. (Die Abbildung wurde von Erich Fritsche mit SETOR (Evans 1993) erstellt)

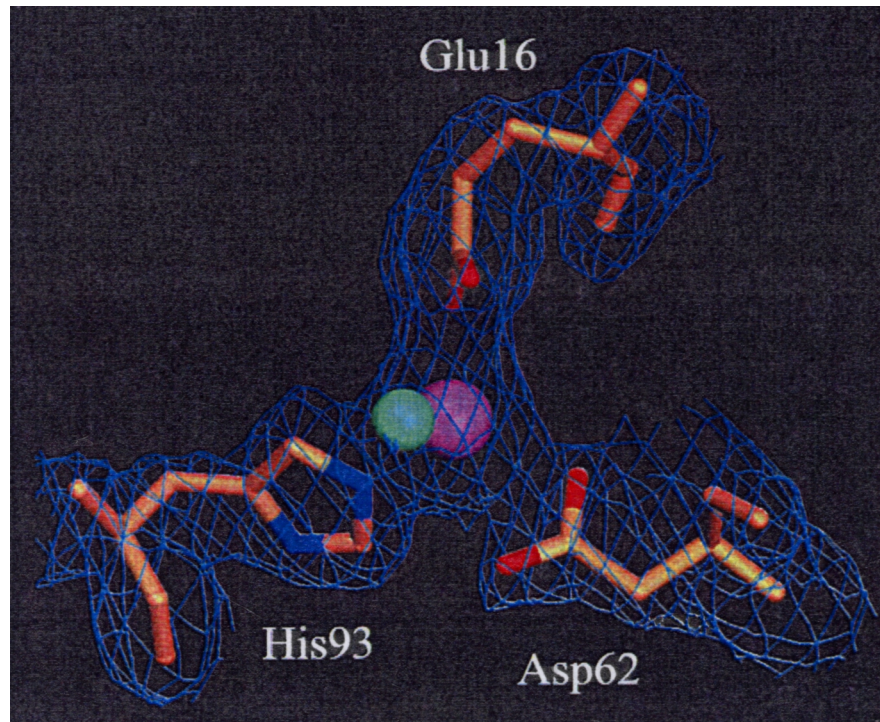
In der Darstellung der Raumauffüllung des HybD-Moleküls ist auf der Oberfläche eine Furche zu erkennen. Am Boden dieser Furche befindet sich eine Einbuchtung, in der das Metallion koordiniert vorliegt. Dieses Metall ist  $\text{Cd}^{2+}$ , welches aus dem Kristallisationspuffer stammt. Das  $\text{Cd}^{2+}$  liegt im HybD pentakoordiniert vor. Es ist durch die Sauerstoffatome  $\text{O}^{\epsilon 1}$  (2,2 Å) und  $\text{O}^{\epsilon 2}$  (2,5 Å) des Glu16, das Sauerstoffatom  $\text{O}^{\delta 2}$  des Asp62 (2,5 Å), das Stickstoffatom  $\text{N}^{\epsilon 2}$  des His93 (2,9 Å) und einem Wassermolekül pseudotetraedrisch angeordnet. Das freibleibende Sauerstoffatom  $\text{O}^{\delta 2}$  des Asp62 bildet eine Wasserstoffbrücke zu dem Stickstoffatom  $\text{N}^{\delta 2}$  des Gln94 (2,9 Å) aus.



**Abbildung 34. Die elektrostatische Oberfläche von HybD.** Die vorgeschlagene Peptidbindungsfurche ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Der blaue Bereich entspricht dem His93 und die zwei roten Bereiche Glu16 und Asp62. Das Metall ist nicht eingeschlossen. (Die Abbildung wurde von Erich Fritsche mit GRASP (Nicholls *et al.* 1993) erstellt)

Im Inneren von HybD liegen fast ausschließlich hydrophobe Aminosäuren. Das erklärt den ungewöhnlichen Gehalt (ca. 31%) an Leu, Ile und Val. Die strikt konservierte Aminosäure Leu149 baut mit acht weiteren Resten im Inneren des Proteins einen hydrophoben Cluster auf. Dieser ist eventuell für die Stabilität des Proteins wichtig.

In der 3D-Darstellung der 6 HybD-Moleküle greift der C-Terminus (Helix H7) des vorangehenden HybD's in die Furche des nachfolgenden HybD-Moleküls ein. Dabei gehen die Sauerstoffatome der terminalen Carboxylatgruppe des Ser162 Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Stickstoffatom N des His93 (2,9 Å), mit dem Sauerstoffatom O<sup>γ</sup> des Ser-91 (2,7 Å) und mit einem Wassermolekül (2,4 Å) ein. Letzteres bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glu-16 O<sup>ε2</sup> (3,2 Å) aus. Die Helix H7 klammert sich zusätzlich über Wasserstoffbrückenbindungen der Guanidinogruppe von Arg159 mit den Carbonylsauerstoffatomen von Gln-28 (2,8 Å), Glu27 (3,0 Å) und Tyr30 (3,4 Å) der Helix H1 des nächsten HybD-Moleküls. Somit kontaktiert die Helix H7 nicht das Cd<sup>2+</sup>-Ion (5,9 Å entfernt), sondern füllt vielmehr die Furche aus. Diese beobachtete Konformation des C-Terminus könnte durch die Kristallpackung aufgezwungen sein und muß nicht der nativen Struktur in Lösung entsprechen (persönliche Mitteilung Erich Fritsche).

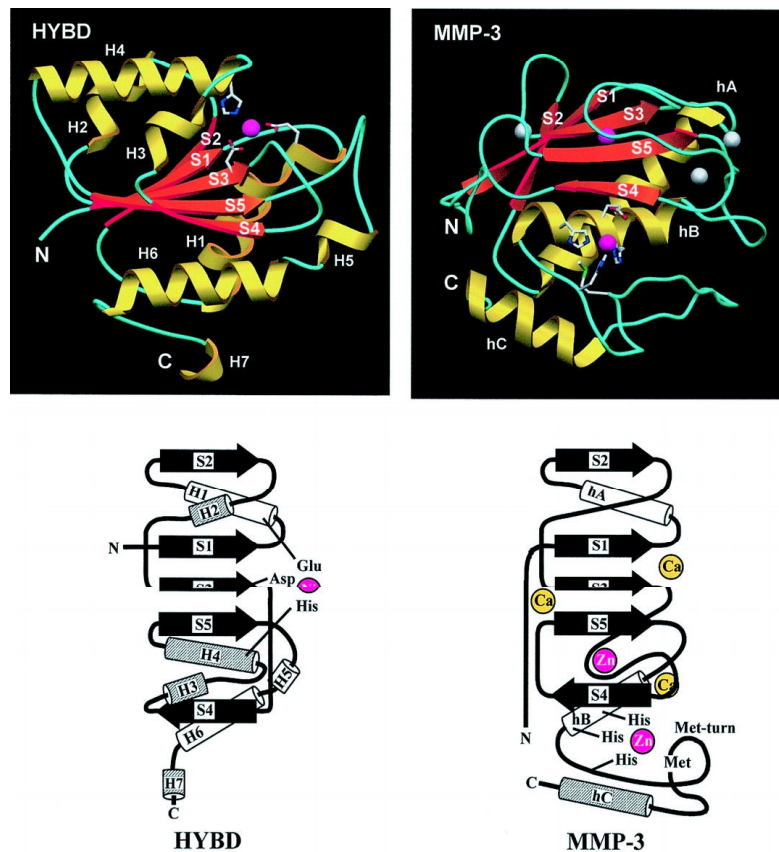


**Abbildung 35. Die Metallbindestelle.** Das Metal (rosa) wird pseudo-tetraedrisch durch Glu16, Asp62, His93 und einem Wassermolekül (grün) koordiniert. (Die Abbildung ist von Erich Fritsche erstellt worden).

### D.3. Vergleich mit Metzincinen

Die Struktur der nickelabhängigen Protease HybD aus *E. coli* zeigt eine topologische Verwandtschaft zu Mitgliedern der Metzincin-Familie der Zink-Endoproteasen obwohl keinerlei Sequenzähnlichkeit vorhanden ist. Die Metzincin-Familie umfasst Proteine wie die Astacine, die Serralysine, die Adamalysine und die Matrixine (Matrixmetalloproteasen) (Bode *et al.* 1993, Stöcker *et al.* 1995). Obwohl bereits kristallographische Analysen dieser Protease-Klasse vorliegen (Bode *et al.* 1992, Baumann 1994, Gomis-Rüth *et al.* 1994, Becker *et al.* 1995), konnte ihre genaue biologische Funktion –besonders eine Interaktion mit ihren physiologischen Substraten- noch nicht aufgeklärt werden. Astacine werden in den Krabben angetroffen, Serralysine werden als Pathogenitätsfaktoren diskutiert, Adamalysine sind Bestandteil des Giftes von Klapperschlangen und Matrixine hydrolysieren die extracelluläre Matrix von Zellverbänden.

Die Metzincine bestehen aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne die durch eine Substratbindungsfurche getrennt sind. Zusätzliche Zink- und/oder Kalzium-Ionen einiger Metzincine üben eine strukturelle Funktion aus und kommen nicht in HybD vor.



**Abbildung 36. Vergleich von HybD mit Metzincinen.** Oben: Bänder-Darstellung von HybD und dem Metzincin MMP-3 (engl. Matrix metalloproteinases-3, stromelysin-1). Unten : Schematische Darstellung der Topologie von HybD und MMP-3. Strukturelemente, die nur in HybD vorkommen, sind mit parallelen Linien ausgefüllt und umfassen die Helices H2, H3, H4 und H7. Das katalytische Metall und seine Liganden, „strukturelle“ Metallionen (nur in Metzincinen), sowie der N- und C-Terminus sind angegeben. (Die Abbildung wurde von Erich Fritsche mit SETOR (Evans et al. 1993) erstellt)

#### D.4. Wichtige Erkenntnisse aus der kristallographischen Struktur von HybD

Die wertvollste Information, die aus der dreidimensionalen Struktur der Protease HybD gewonnen wurde, ist, dass drei Aminosäuren des HybD, das Glu16, das Asp62 und das His93 ein  $\text{Cd}^{2+}$ -Ion ligandieren. Da diese Aminosäuren unter den Hydrogenase-spezifischen Proteasen hochkonserviert sind (eine Ausnahme liegt bei HycI vor; hier ist das Glu16 durch das gleichgeladene Asp16 ersetzt), kann vermutet werden, dass es sich hierbei um eine in allen Reifungsproteasen enthaltende potentielle Metallbindestelle und zwar für Nickel handelt. Das Vorhandensein einer solchen Metallbindestelle in diesen Proteasen lässt die Aufstellung zweier alternativer Modelle zu ihrer Funktion zu. Entweder handelt es sich bei diesen Proteinen um nickelabhängige Metalloproteasen oder die Protease ist am Nickeltransfer und an seiner Inkorporation in die große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase beteiligt. Obwohl vieles für die erste Möglichkeit spricht, kann auch die zweite Möglichkeit nicht ganz ausgeschlossen werden. Wichtige Argumente für die erste Möglichkeit sind, dass

die Vorläuferform der großen Untereinheit, die sich in dem *hycI*-defizienten Stamm HD709 ansammelt bereits Nickel enthält. Weiterhin setzen sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Prozessierung den vorangegangenen Nickeleinbau voraus (Rossmann *et al.* 1994). Diese Beobachtung wird durch die *in vitro*-Experimente mit Extrakten der NCI900-Mutante (*nik<sup>-</sup>ΔhycI*) gestützt, bei der erst die gleichzeitige Zugabe von Nickel und HycI zur Prozessierung von pre-HycE führt (Maier und Böck 1996). Obwohl in den *nik<sup>-</sup>ΔhycI*-Extrakten über eine Cochromatographie mit <sup>63</sup>Ni nachgewiesen wurde, dass nur Fraktionen mit dem <sup>63</sup>Ni-Signal die reife Form von HycE enthalten (Maier 1997), konnte nicht ganz ausgeschlossen werden, dass womöglich das Nickel über die Protease eingefügt wurde. Um hierüber Klarheit zu erhalten, wurde unter Verwendung des *in vitro*-Prozessierungssystem (Rossmann *et al.* 1994, Maier und Böck 1996) eine entsprechende Untersuchung durchgeführt.

#### D.5. Gereinigte Endopeptidasen HybD und HycI enthalten keinen Metallcofaktor

Um herauszufinden, ob die gereinigte Protease bereits ein Metall trägt, wurden HybD und das HycI einer Atomabsorptionsspektroskopie-Analyse unterzogen. Die Durchführung erfolgte durch Helmut Hartl im Labor von Prof. Dr. Zenk im Institut für Pharmazeutische Chemie. Die erhaltenen Daten sind in der Tabelle 10 angegeben. Die verwendeten Proteasen HybD und HycI wurden dazu von auf dem Plasmid kodierten Genen unter aeroben Bedingungen überproduziert und aerob über eine FPLC-Anlage gereinigt. Um auszuschließen, dass Metalle im Reinigungs-Puffer enthalten sind, wurde dieser als Referenz ebenfalls gemessen. In den Puffer war kein Metall nachzuweisen. Auch in den Proteasen war kein messbarer Gehalt an Ni, Fe und Mn nachzuweisen, lediglich Zink lag unterstöchiometrisch vor und reflektiert höchstwahrscheinlich eine unspezifische Metallbindung an diese Proteine oder stellt eine Verunreinigung dar.

**Tabelle 10. Atom Absorptions Spektroskopie von gereinigtem HybD und HycI.**

Protein	Metall	Metallgehalt
HybD	Zn	1 Zn <sup>2+</sup> pro 28 Moleküle HybD
	Ni, Fe, Mn	nicht nachweisbar
HycI	Zn	1 Zn <sup>2+</sup> pro 22 Moleküle HycI
	Ni	nicht nachweisbar



## D.6. Die Protease HycI bildet keinen stabilen Komplex mit Nickel aus

Es konnte damit eindeutig nachgewiesen werden, dass weder HybD noch HycI *a priori* Nickel enthalten. Dies wurde in Mutagenese-Studien bekräftigt, die zeigten, dass die drei Aminosäuren Glu, Asp und His essentielle Reste der Hydrogenase-Proteasen darstellen (Theodoratou *et. al.* 2000). Ihr spezifischer Austausch im HycI führte zu einem dramatischen Aktivitäts-Verlust der Protease. Dennoch blieb weiterhin ungelöst, ob die Protease das Nickel in der Hydrogenase erkennt oder ob sie das Metall in das Apoprotein im Zuge der Reifung einsetzt. Um dies zu eruieren, wurde nachfolgendes Ni-Inkorporations-Experiment durchgeführt. Die Protease HycI wurde mit 1 mM NiCl<sub>2</sub> vorinkubiert und anschließend gegen 10 mM Tris/Cl, pH 7.4 dialysiert um etwaige Nickel-Reste zu entfernen. Das so behandelte Protein wurde im *in vitro* Prozessierungssystem für pre-HycE untersucht. Dazu wurden Extrakte aus den Stämmen HD709 ( $\Delta hycI$ ) und NCI900 (*nik*<sup>-</sup>,  $\Delta hycI$ ) in Kombinationen mit und ohne Nickelzusatz mit der so vorbehandelten Protease inkubiert. Tabelle 11 fasst die untersuchten Kombinationen zusammen und zeigt die erhaltenen Resultate ausgedrückt in % Prozessierung von pre-HycE.

Die mit Nickel vorinkubierte und anschließend dialysierte Protease kann das pre-HycE nur in Anwesenheit von neu zugesetzten Nickel proteolytisch modifizieren (50%). Die Prozessierungsrate entspricht dabei der Menge, die sich auch mit unbehandeltem HycI ergibt (48%). Dies deutet darauf hin, dass das dialysierte HycI Nickel nicht binden kann, da lediglich eine unspezifische Prozessierung stattfindet (15%) wenn die Protease im Ansatz ohne Nickel vorhanden ist. Sie entspricht ungefähr der Menge, die mit Protease ohne Vorbehandlung erhalten wird (17%). Die erhaltenen Daten sprechen stark dafür, dass die Protease im Apoprotein bereits inkorporiertes Nickel erkennt und erst durch die Erkennung den Prozessierungsschritt durchführt.

**Tabelle 11. *In vitro* Prozessierung von pre-HycE durch die Endopeptidase HycI vorinkubiert in Anwesenheit von Nickel.**

Stamm (Genotyp)	HycI-Zugabe		Ni <sup>2+</sup> (400µM)	% Prozessierung von pre-HycE
	unbeh. <sup>a</sup>	vorbeh. <sup>a</sup>		
HD709 ( $\Delta hycI$ )				8
NCI900 ( $nik^-$ , $\Delta hycI$ )				18
HD709 ( $\Delta hycI$ )	+			50
HD709 ( $\Delta hycI$ )		+		56
NCI900 ( $nik^-$ , $\Delta hycI$ )	+			17
NCI900 ( $nik^-$ , $\Delta hycI$ )		+		15
NCI900 ( $nik^-$ , $\Delta hycI$ )			+	24
NCI900 ( $nik^-$ , $\Delta hycI$ )	+		+	48
NCI900 ( $nik^-$ , $\Delta hycI$ )		+	+	50

<sup>a</sup> Die Vorbehandlung von HycI beinhaltete ein Vorinkubation mit 1 mM NiCl<sub>2</sub> und anschließende Dialyse gegen 10 mM Tris/Cl, pH 7.4.

#### **D.7. Analyse des Einflusses von Inhibitoren und Metallen auf die Prozessierungsreaktion katalysiert durch HycI**

Schon früher konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Prozessierungsreaktion nicht von klassischen Inhibitoren für Serin- und Metallo-Proteasen gestört wird (Rossmann *et al.* 1995). Aufbauend auf diese Beobachtung folgten weitere Untersuchungen, welche zusätzliche Inhibitoren in Betracht zogen und unterschiedliche Verhältnisse von Metallchelatoren und Nickel berücksichtigten (Tabelle 12).

Aus den erhaltenen Daten ist ersichtlich, dass Nickel welches schon im Apoprotein enthalten ist (HD709), nicht durch die Metallchelatoren entfernt werden kann, selbst wenn diese 10 min auf das Protein einwirken. Offenbar liegt das Nickel fest im Protein ligandiert vor. Auch die Verwendung von Inhibitoren, die Substratbindetaschen von Proteasen besetzen, vermögen die Prozessierung nicht zu stören. Entweder besetzten diese Inhibitoren nicht die in der kristallographischen Analyse dargestellte Peptidbindungsfurche von HycI, oder die Prozessierungsreaktion läuft nicht wie bei den üblichen Proteasen ab. In den Extrakten, in denen das Apoprotein noch nicht mit Nickel beladen ist (NCI900), findet keine Prozessierung statt, wenn die Metallchelatoren im Überschuß zugegeben werden und somit alles Nickel abfangen. Liegt die Konzentration von Nickel dagegen höher als die der Metallchelatoren,

findet eine Prozessierung erwartungsgemäß statt. Die *in vitro* Prozessierung ist stark von der Verfügbarkeit freier Nickelatome abhängig.

**Tabelle 12. Effekt von Inhibitoren auf die *in vitro* Prozessierungsreaktion. Die Zahlen geben % Prozessierung von pre-HycE an.**

Inhibitor	HycI-Zugabe	HD709	NCI900	
		( $\Delta hycI$ ) <sup>a</sup>	(nik <sup>-</sup> , $\Delta hycI$ ) <sup>b</sup>	
---	---	9	19 (-Ni <sup>2+</sup> )	
---	+	38	44 (+Ni <sup>2+</sup> )	
			Verhältnis Ni : Inhibitor	
			7 : 1	1 : 2.5
p-Aminobenzamidin	+	36	46	40
Argininal	+	33	44	50
Leupeptin	+	32	43	47
o-Phenantrolin	+	34	41	9
Dipyridyl	+	37	45	15
Dimethylglyoxime	+	36	40	15

<sup>a</sup> Die HD709 Extrakte wurden für 10 min mit Inhibitoren in der Konzentration von 1 mM vorinkubiert. Die Reaktion startete nach Zugabe von 2,5 µg HycI

<sup>b</sup> Extrakte wurden für 10 min mit Inhibitoren vorinkubiert; anschließend erfolgte die Zugabe von Nickel und der Endopeptidase HycI. Die Nickel-Konzentration war 400 µM, während der Inhibitor eine Endkonzentration von je 1 mM (Verhältnis 1 : 2,5) bzw. 58 µM (Verhältnis 7 : 1) aufwies. Jeder Ansatz enthielt 2,5 µg HycI. Die Prozessierung wurde densitometrisch bestimmt.

Ein Versuch die Protease durch Zugabe von divalenten Kationen (Zn, Co, Cu, Cd) (13,5 Metallatome pro Proteasemolekül) zu hemmen, blieb erfolglos (Daten nicht gezeigt). Es fand stets eine Prozessierung statt. Wenn das Verhältnis von Metallionen zu Protease jedoch 1:1350 war, war die Prozessierungsreaktion sichtlich gestört. Bei so hohen unphysiologischen Metall-Konzentration kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Proteine im Ansatz unspezifisch beeinflusst werden.

## DISKUSSION

CO- und CN-Liganden von [NiFe]-Hydrogenasen sind ein neuartiger Typ niedermolekularer Moleküle in metallenthaltenden Enzymen. Aufgrund ihrer Toxizität und hohen Affinität zu Metallen beinhalten ihre Biosynthese und ihr Einbau eine Reihe von interessanten bioanorganischen Aspekten.

Folgende grundlegende Fragen sind dabei relevant:

Was ist die Herkunft der niedermolekularen Liganden?

Welche Hyp-Proteine sind an ihrer Synthese beteiligt?

Wie erfolgt ihre Biosynthese?

Wie erfolgt ihr Transport und die Anlagerung an das Eisen des NiFe-Zentrums?

Wie werden sie in die große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenasen eingebaut?

Als Modellsystem der Untersuchungen wurde dabei das experimentell gut etablierte Hydrogenase-Reifungssystem aus *E. coli* herangezogen, da die großen Untereinheiten aller drei Hydrogenasen dieses Organismus immunologisch detektiert werden können

Auf die kristallographische Analyse der für Hydrogenasen spezifischen Protease, die in Kooperation mit E. Fritsche aus der Struktur-Abteilung des MPI für Biochemie durchgeführt wurde, wird abschließend eingegangen.

### **Herkunft der niedermolekularen Liganden**

Aufgrund der komplexen Struktur des bimetalischen-Zentrums erfordert der Metall-Einbau in [NiFe]-Hydrogenasen eine posttranslationale Reifungsmaschinerie, die durch akzessorische Proteine bewältigt wird. Im Falle von *E. coli* wurden sechs Gene identifiziert, deren Produkte für die Ausbildung der Aktivität der drei *E. coli*-Hydrogenasen verantwortlich sind (Lutz *et al.* 1991, Maier *et al.* 1996).

Anhand der Charakterisierung in der Carbamoylphosphat-Synthese defizienter *E. coli*-Stämme konnte dem Carbamoylphosphat eine essentielle Rolle in der Hydrogenase-Reifung zugewiesen werden. In einer  $\Delta carAB$ -Mutante sammelt sich inaktives HycE-Apoprotein an und gleiches gilt für die großen Untereinheiten der Hydrogenasen 1 und 2. Durch Komplementierung mit dem *carAB*-Operon tragenden pCarAB-Plasmid kann die Fähigkeit zur Hydrogenasen-Synthese wieder zurück gewonnen werden. Ein weiteres Argument für die Rolle von Carbamoylphosphat ist, dass die Hydrogenase-Aktivität wieder erlangt wird, wenn der Stamm in Anwesenheit von Citrullin angezogen wird.

In *E. coli* liefern die Produkte der Gene des *carAB*-Locus und von *argF/argI* Carbamoylphosphat. Aus der Rolle des Carbamoylphosphates in der Hydrogenasereifung kann gefolgert werden, dass alle Enzyme welche Carbamoylphosphat-Synthese bewerkstelligen, neben den Produkten des *hyp*- (Jacobi *et al.* 1992, Maier *et al.* 1996) und des *nik*-Operons (Wu *et al.* 1989, Navarro *et al.* 1993) eine pleiotrope Wirkung auf die Hydrogenasen-Synthese ausüben.

In Bakterien die keine Carbamoylphosphat-Synthetase besitzen, wie z.B. *Pyrococcus*-Arten (Alcántara *et al.* 2000), aber zur Synthese von [NiFe]-Hydrogenasen fähig sind, könnte sich deswegen das Carbamoylphosphat aus der Carbamat-Kinase-Reaktion bilden. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass solche Mikroorganismen möglicherweise die *argF/argI*-Reaktion ausnutzen, wenn Citrullin anwesend ist, um daraus Carbamoylphosphat zu gewinnen.

Der Befund, dass Carbamoylphosphat für die Reifung aktiver Hydrogenasen essentiell ist, lässt die Vermutung zu, dass es die Vorläufersubstanz für die Bildung von CO und/oder CN darstellt. Chemische Modelle in denen die Bildung von CO und CN aus Carbamoylphosphat erfolgen kann, bestärken zudem die Annahme, dass es das Edukt der niedermolekularen Liganden des [NiFe]-Zentrums sein könnte (Paschos *et al.* 2001). Diese Modelle sind des weiteren insofern interessant, weil sie die Beteiligung von Eisen mitberücksichtigen, über dessen Einbau in die [NiFe]-Hydrogenasen noch nichts bekannt ist. Wie bereits in B. 6 beschrieben wurde existieren Reaktionsmechanismen, die die Bildung des CO- und des CN-Moleküls aus Carbamoylphosphat erlauben (Gleichungen 5 und 6).

Sollten solche an die Metallorganik angelehnte Mechanismen in der Reifungskaskade ablaufen, wäre möglicherweise die Entstehung eines Eisen-Carbamoyl-Komplexes als Intermediat zwingende Voraussetzung. Aus der metallorganischen Chemie ist die Bildung von Eisen-Carbamoyl-Komplexen lediglich bei der Reaktion des  $(\pi\text{-C}_5\text{H}_5)\text{Fe}(\text{CO})_2^-$  mit Carbamoylchlorid bekannt (King 1963). Theoretisch denkbar ist auch die Bildung eines Eisen-Carbamoyl-Komplexes durch anionische niedervalente Eisen-Komplexe wie das  $\text{Fe}(\text{CO})_4^{2-}$  (Collman's Reagenz) (Collmann 1975, Pearson und Figdore 1980) von denen bekannt ist, dass sie exzellente Nukleophile bei Reaktionen mit Alkyl- und Acylhalogenen sind.

In Analogie zu den anorganischen Mechanismen der Bildung des Eisen-Carbamoyl-Komplexes scheint die biologische Ausbildung solcher Intermediate wahrscheinlich anders abzulaufen und zwar aus folgendem Grund. Für die Bildung eines Eisen-Carbamoyl-Komplexes ist ein nukleophiler Austausch des Phosphats am Kohlenstoff des

Carbamoylphosphats durch Eisen nötig. Da diese Art des nukleophilen Austauschs formal eine oxidative Addition am Eisen darstellt, müssten mechanistische Möglichkeiten in Betracht gezogen werden, in denen das Eisen in biologisch relevanten Oxidationsstufen anzutreffen wäre. Im Vergleich mit bereits bekannten, biologisch erlaubten Mechanismen können drei mögliche Wege postuliert werden, über die der nukleophile Austausch gewährleistet sein könnte.

1. Die Bildung einer Fe(I)-Form durch Reduktion gefolgt vom nukleophilen Austausch resultiert in einer Fe(III)-Form. Dieser Mechanismus ist vergleichbar der Alkylierungsreaktion von Co(I), die bei der Reduktion des Vitamin B<sub>12</sub> zu Vitamin B<sub>12s</sub> (Schrauzer *et al.* 1968) stattfindet.

2. Alternativ generiert ein nukleophiler Austausch an einem Fe(II) ein Fe(IV)-Intermediat, das durch Thiolat-Liganden stabilisiert werden kann, da diese gute  $\sigma$ - und  $\pi$ -Elektronen Donatoren sind. Solche hochvalente Eisen-Formen werden bei Reaktionen gebildet, an denen Cytochrom P-450 beteiligt ist (Ortiz de Montelanno 2000). Das Eisen-Zentrum in diesen Enzymen ist von einem Thiolat eines Cystein-Restes ligandiert.

3. Eine dritte Möglichkeit, die im Falle der [NiFe]-Hydrogenasen am wahrscheinlichsten scheint, ist der nukleophile Austausch am Fe(II) durch das Phosphat des Carbamoylphosphats mit gleichzeitiger stattfindender Oxidation von Thiolat-Liganden durch zwei Elektronen. So geben die zwei Thiolat-Liganden je ein Elektron ab und das Eisen würde sofort auf die carbamoylierte Fe(II)-Stufe zurückfallen, während die Thiolate eine Disulfidbrücke ausbilden. Diese Disulfidbrücke kann durch nachfolgende Reduktion die Sulfide erneut generieren. Diese letzte Betrachtung ist umso spannender, da für die Anlagerung jedes Carbamoyl-Restes am Eisen zwei Elektronen benötigt werden. Diese sind für die Ausbildung der Komplexbindung zwischen dem Eisen und dem neu hinzukommenden Liganden zwingend notwendig.

Es sollte schließlich beachtet werden, dass die Umwandlung des Carbamoyl-Liganden am Eisen in eine Carbonyl- oder Cyano-Gruppe davon abhängt, ob der Stickstoff oder der Sauerstoff des Carbamoyl-Liganden protoniert wird. Die Stelle der Protonierung hängt wiederum davon ab, welchen Oxidationszustand das Eisen hat und wie viele Liganden schon daran gebunden sind.

## Beteiligung der Hyp-Proteine an der Synthese der Eisen-Liganden

Die Beteiligung der Hyp-Proteine und der Reifungsprotease an der Biosynthese des Metall-Zentrums der [NiFe]-Hydrogenasen ist zwar nachgewiesen (Jacobi *et al.* 1992, Maier *et al.* 1996), aber ihre genaue Funktion war bisher unbekannt. Mittels *in silico* Untersuchungen konnte in den HypF-Proteinen aller Mikroorganismen die Aminosäuresequenz VH[H/F/L]xAH identifiziert werden, welche in dieser Form noch bei Enzymen die *O*-Carbamoylierungen katalysieren anzutreffen ist. Dieses und das bereits bekannte Acylphosphat-Phosphatase-Motiv (Wolf *et al.* 1998), sowie die essentielle Rolle des Carbamoylphosphats in der Hydrogenase-Reifung (Paschos *et al.* 2001), erzwangen eine Untersuchung der Interaktion von HypF mit Carbamoylphosphat. Tatsächlich vermag HypF Carbamoylphosphat spezifisch in einer Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion umzusetzen. Die Aktivität der Reaktion konnte weder durch Zugabe von divalenten Metallionen noch von weiteren möglichen Substraten erhöht oder inhibiert werden; sie war nicht von Sauerstoff gehemmt und war auch nicht nickelabhängig. Die Enzymreaktion folgt der Michaelis-Menten-Kinetik. Ein Vergleich des  $K_M$ -Wertes des HypF-Proteins in der Phosphatase-Reaktion (260-330  $\mu\text{M}$ ) mit dem weiterer Carbamoylphosphat umsetzender Enzyme (196-1700  $\mu\text{M}$ ) zeigt, dass er durchaus in einem physiologischen Bereich liegt.

Enzyme mit Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität sind lediglich bei einer Krebszell-Linie des Ehrlich-Ascites-Tumors beschrieben worden (Black und Jones 1984). In diesen Tumorzellen liegen drei verschiedene Carbamoylphosphat-hydrolysierende Phosphatasen vor, die lysosomal, cytosolisch und mikrosomal verteilt sind. Obwohl ihre physiologische Rolle unbekannt ist, scheint auch hier die Reaktion aufgrund der biochemischen Daten spezifisch zu verlaufen.

Die biochemische Rolle der Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität des HypF-Proteins kann erst aus den Ergebnissen zur ATP-Hydrolyse-Aktivität verstanden werden. Das besondere Merkmal dieser zweiten Aktivität ist ihre strikte Abhängigkeit von der Gegenwart von Carbamoylphosphat und die Tatsache, dass die ATP-Hydrolyse zur Bildung von AMP und Pyrophosphat führt. Nur in sehr wenigen Reaktionen der Biochemie werden die  $\beta$  und  $\gamma$  Phosphorylgruppen des ATP gemeinsam als Pyrophosphat abgespalten; dazu gehören die Fettsäureaktivierung bei der  $\beta$ -Oxidation, die Aminosäurenaktivierung in der ribosomalen und der nicht ribosomalen Proteinsynthese, die Aktivierung des Citrullins bei der Synthese des Argininosuccinats, die Aktivierung des Luciferins bei tierischen Leuchtvorgängen, die Aktivierung des Sulfats bei der Sulfatreduktion, die Aktivierung der Glukose in der Stärkesynthese und die Adenylat-Cyclase-Reaktion. Somit reiht sich das HypF-Protein als ein

weiteres Protein dazu. Außer der Adenylat-Cyclase-Reaktion erfolgt in all den anderen Fällen eine Aktivierung des betreffenden Substrats. Diese Aktivierung geht mit der Ausbildung einer kurzlebigen Enzym-AMP-Zwischenstufe einher, die über die Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion visualisiert werden kann. Dies war auch der Fall für das HypF-Protein. Entsprechend läge hier eine „Aktivierung“ des Carbamoylphosphats vor, die zur Bildung von Carbamoyl-Adenylat führt. Ein Problem ist jedoch, dass Carbamoylphosphat ein bereits energetisch hochgestelltes Molekül darstellt ( $\Delta G^{\circ} = -51,5$  KJ/mol). Die Hydrolyse des Carbamoylphosphats über die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion liefert –wenn auch kurzlebig- Carbamat, das reaktiv und stabil für weiterfolgende Reaktionen gehalten werden muss. Erst die Verknüpfung mit AMP könnte das Carbamat vor seinem Zerfall zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  schützen, Transferstabilität gewährleisten und es durch die Pyrophosphat-Gruppen-Abspaltung auf das gleiche energetische Niveau ( $\Delta G^{\circ} = -60,2$  KJ/mol) wie das Carbamoylphosphat halten. Ein evolutionäres Argument zur Ausbildung des Carbamoyl-Adenylats könnte zudem aus folgender Sachlage abgeleitet werden. Der Zusammenhang zwischen HypF und Carbamoylphosphat wird in *Pyrococcus furiosus* beindruckend ersichtlich, da hier das *hypF*-Gen gemeinsam in einer Transkriptionseinheit mit der Ornithintranscarbamoylase (ORF 615154), getrennt von den übrigen *hyp*-Genen vorliegt (Schut *et al.* 2001). Es wird hier vermutet, dass Citrullin als eigentlicher Lieferant für Carbamoylphosphat dient, da dieses aufgrund seiner thermischen Instabilität nur eine Halbwertszeit von 2 sec in der Zelle bei hohen Temperatur besäße (Legrain *et al.* 1977), während Citrullin stabil ist.

Aminosäureaustausche in den einzelnen Motiven des HypF-Proteins beweisen eine essentielle Funktion des HypF-Proteins in der Hydrogenase-Reifung. Während der Austausch einiger Aminosäurereste zu Stabilitätsverlust der entsprechenden HypF-Varianten führte, zeigte sich eindeutig, dass alle anderen Motive des HypF-Proteins, deren Mutation stabile Varianten lieferte, wichtig für den Ablauf der Hydrogenase-Reifung sind. Sie waren nicht mehr fähig die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Reaktion zu katalysieren. Dies bestärkt die Annahme einer Essentialität des Carbamoylphosphats in der Hydrogenase-Reifung und spricht für seine Funktion als Edukt in der Liganden-Synthese. Anscheinend „kooperieren“ die verschiedenen Domänen von HypF dabei, da Mutationen in allen Motiven, zur Inaktivität führten.

Während im Fall von *E. coli* alle Motive des HypF-Proteins wichtig für den Ablauf der Hydrogenase-Reifung sind, existiert in *R. eutropha* neben der üblichen HypF-Spezies



auch eine verkürzte HypF-Variante, die sich pleiotrop auf die Reifung der drei Hydrogenasen auswirkt (Dernedde *et al.* 1996, Wolf *et al.* 1998, Buhrke *et al.* 2001). In welcher Form diese HypF-Variante wirkt und ob eine Interaktion mit Carbamoylphosphat stattfindet, konnte noch nicht untersucht werden (persönliche Mitteilung O. Lenz).

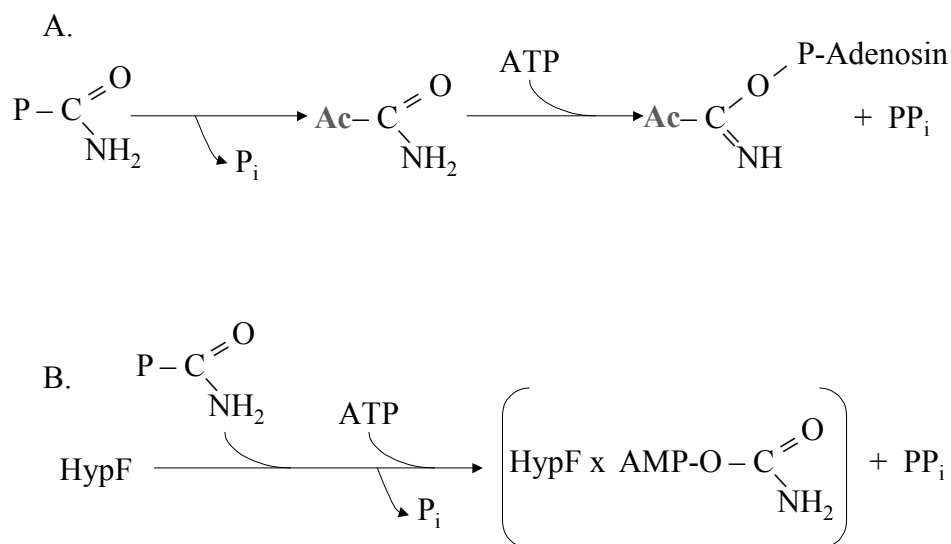
Welche Funktionen die einzelnen Motive des HypF-Proteins im Rahmen der Hydrogenase-Reifung erfüllen ist im Moment noch nicht eindeutig geklärt. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Acylphosphat-Phosphatase-Motiv für die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität ausschlaggebend ist. Die vor kurzem veröffentlichte Kristallstruktur dieser Domäne zeigt in Übereinstimmung damit auch die Anwesenheit einer Phosphatbinde-Tasche (Rosano *et al.* 2002). Welche Aminosäurereste für die ATP-Hydrolyse-Aktivität notwendig sind, ist jedoch noch nicht bekannt. Da kristallographisch eine Interaktion der YrdC-ähnlichen Domäne von HypF mit synthetischen RNA-Molekülen gezeigt werden konnte (Teplova *et al.* 2000), kann sie möglicherweise an der ATP-Bindung beteiligt sein.

Die Funktion der beiden Cystein-Motive bleibt ebenso unklar. Eindeutig ist ihre Essentialität für die Hydrogenase-Reifung, wie aus der Mutagenese gezeigt werden konnte. Ob sie eine Protein- oder DNA-Interaktionsfläche anbieten oder vielleicht einen redoxaktiven Bereich im HypF-Protein darstellen, ist noch offen. Die Anwesenheit von Zink in HypF, wie es die ICP-AES-Analyse gezeigt hat, könnte möglicherweise an die Existenz der Cystein-Motive gekoppelt sein. Die Kombination von Cystein-Motiven der Struktur  $Cx_2Cx_{18}Cx_2C$  mit unüblicher enzymatischer Aktivität (ATP-Hydrolyse) ist neben dem HypF-Protein auch noch für Clpx-Proteine gezeigt worden (Wojtkowiak *et al.* 1993), also Proteasen mit ATP-Hydrolyse-Aktivität und dem Besitz einer Zinkfinger-Domäne; ein Zusammenhang zwischen beiden Proteinen ist jedoch nicht ersichtlich.

### **Wie erfolgt die CO und CN- Biosynthese?**

Wenn Carbamoylphosphat die Ausgangssubstanz für die Bildung des diatomaren Liganden CN darstellt, so könnte seine Synthese wie folgt ablaufen. Die Carbamoyl-Gruppe könnte unter Abspaltung des Phosphatrests auf einen Akzeptor, hier auf das HypF Protein übertragen werden und dabei dephosphoryliert werden. Die ATP hydrolysierende Aktivität und die *O*-Carbamoyltransferase-Aktivität von HypF Protein könnten das enzymgebundene Carbamoyl-Adenylat entstehen lassen. Durch die Abspaltung des AMP-Restes könnte direkt die Cyanogruppe entstehen (Abbildung 33). Alternativ könnte die CN-Gruppe jedoch auch über die phosphorylierende Aktivität des HypE-Proteins entstehen. Neuere experimentelle Befunde sprechen tatsächlich für diese zweite Möglichkeit und zwar dass die Carbamoyl-

Gruppe durch HypE in einen, dem PurM ähnlichen Reaktionsmechanismus (s. Abbildung 8), in die Cyanid-Gruppe umgewandelt wird. Dabei wird vermutlich der Sauerstoffrest der tautomeren Form der Carbamoyl-Einheit phosphoryliert und nach Entfernung des Phosphats vom entstandenen Imin bleibt die CN-Gruppe am HypE-Protein zurück.



**Abbildung 33. Mögliche Formen des enzymgebundenen Carbamoyl-Adenylats, die als Vorläufer zur Bildung der CN-Liganden führen können.** Während im Fall A die CN-Bildung direkt über die AMP-Freisetzung verlaufen könnte, muß im Fall B nach Transfer der Carbamoyl-Einheit auf eine reaktive Gruppe die Keto-Gruppe erneut phosphoryliert werden. (Ac: Akzeptor, P<sub>i</sub>: anorganisches Phosphat)

Wie auch der genaue Ablauf der Reaktion aussehen mag, in beiden Fällen erfolgt sie in Übereinstimmung mit den von der Metallorganik vorgegebenen Reaktionsmöglichkeiten. Man erinnere sich, dass die Konversion der Carbamoyleinheit zu einer Cyano-Gruppe durch eine Dehydratisierungs-Reaktion des Carbamoyl-Mangan-Komplexes zum Cyano-Komplex (Behrens *et al.* 1972) oder durch Transformation eines Eisen-Carbamoyl-Liganden in einen Isocyanat-Liganden gemäß Reaktionsgleichung 6 (Fehlhammer *et al.* 1975) erfolgt. Nichts anderes passiert auch durch die Entfernung des Sauerstoff-Atoms des Carbamat-Rests. Hier findet eine Dehydratisierungsreaktion statt, die über eine Phosphorylierungsreaktion getragen wird.

Bekannte Mechanismen die über die Ausbildung von Phosphat-Intermediaten zur Bildung von CN führen, sind bei der Detoxifikation phosphathaltiger Insektizide die Alkylphosphatvergiftungen hervorrufen beschrieben worden (Forth, Henschler, Rummel und Starke 1992, 6. Auflage). Dabei findet eine Dephosphorylierung des phosphorylierten Enzyms (z.B. Cholinesterase) durch nukleophilen Angriff eines Cholinesteraseaktivators

(Pyridin-(2)-Aldoximethyliodid) statt. Der Zerfall des Phosphoryloxims führt zum Nitril und zur Dialkylphosphorsäure, die das Enzym nicht phosphorylieren kann. Wesentlichere Ähnlichkeiten zu den zwei hier formulierten Möglichkeiten der CN-Gruppen-Generierung in der Hydrogenasen-Reifung, jedoch in umgekehrter Richtung, zeigt sich in der Umwandlung eines Nitrils zu einem Acetamid auf, die über das Enzym Nitril-Hydratase katalysiert wird.



Das Nitril wird hierbei, durch eine reaktive Thiolgruppe nukleophil am Nitril-Kohlenstoff angegriffen, wobei sich ein enzymgebundenes Imin bildet, das zu einem Zwischenprodukt mit tetraedrischem Kohlenstoff hydratisiert wird. Letztendlich fungiert das Enzym selbst als Abgangsgruppe und es entsteht das Amid (Endo *et al.* 2001). Gleichungen 6 und 7 zeigen auf, dass es generell möglich ist, aus Carbamoyl-Einheiten CN-Liganden zu bilden.

Es existieren derzeit noch keine Anhaltspunkte, ob und falls ja wie die Carbamoyl-Gruppe in CO umgewandelt wird. Zwar ist die metallorganische Umwandlung der Carbamoyl-Gruppe in CO bekannt (Gleichung 5), aber ihr Ablauf in der Biologie benötigt noch den abschließenden Beweis. Es wird postuliert, dass der dritte Ligand zwangsläufig aus chemischen Gründen CO sein muss, da aufgrund der bereits vorliegenden zwei CN-Liganden, der neu angelagerte Ligand nur zu CO dirigiert werden kann (Mitteilung Prof. R. Glass).

Denkbar wäre eine Desaminierung des Carbamoylphosphats mit Heterolyse der C-N-Bindung, ohne jedoch Anhaltspunkte über eine Amidase-Funktion eines Hyp-Proteins zu haben. Denkbar wäre zudem die Synthese des CO aus einer noch unbekannt Substanz am unüblichen [FeS]-Zentrum des HypD-Proteins. Diese Synthese könnte spontan, rein chemisch am Eisen-Zentrum, wie in der Einleitung schon beispielhaft für die spontane CO-Bildung aus Oxosäuren beschrieben wurde, oder in einen komplexen Reaktionsweg unter Beteiligung der Hyp-Proteine beschriftet werden. Spekulativ ist auch die Annahme eines enzymgebundenen Carboxyphosphats als Quelle des CO-Liganden, welches im Prinzip mit genau dem gleichen Reaktionsmechanismus des HypF- und HypE-Proteins zum CO führen würde. Weitere Untersuchungen sind zur Aufklärung notwendig.

Werden die hier dargestellten Reaktionen des HypF-Proteins zur Bildung von CN mit anderen aus der Cyanogenese bekannten Mechanismen verglichen, so stellen sie einen neuartigen Reaktionsmechanismus dar. Durch den niedrigen  $k_{cat}$  des HypF-Proteins in der Phosphatase- und ATPase-Reaktion (jeweils 10 und 1,5 pro  $s^{-1}$ ) wird in der Zelle wahrscheinlich gewährleistet, dass  $\text{CN}^-$  nur in kleinen Mengen und langsam produziert werden kann, ohne andere Enzyme und Metallzentren zu vergiften.

Da das HypF- und HypE-Protein bis jetzt in jedem Organismus der zur Synthese von [NiFe]-Hydrogenasen befähigt ist, angetroffen wird, handelt es sich hierbei um einen ubiquitären Mechanismus der CN-Bildung. Es ist aber nicht ganz auszuschließen, dass in Organismen, besonders denjenigen die HypX/HoxX-ähnliche Proteine synthetisieren die Bildung der CN-Liganden anders verläuft. So konnte für *R. eutropha* gezeigt werden, dass die Anwesenheit des HoxX-Proteins die Synthese Sauerstoff toleranter Hydrogenasen zur Folge hat (T. Buhrke persönliche Mitteilung). Für die lösliche Hydrogenase aus *R. eutropha* konnte die Anwesenheit von vier CN und einem CO im Metallzentrum nachgewiesen werden (Happe *et al.* 2000), wobei eine der CN-Gruppen an Nickel gebunden vorliegt und genau dieses CN ist von der Aktivität von HoxX-abhängig. Es wird vermutet, dass dieser CN-Ligand der Hydrogenase die Sauerstoff-Insensitivität verleiht (Buhrke *et al.* 2002, COST Meeting, Cercedilla).

Weiterhin ungelöst bleibt auch die Frage zur CO/CN-Bildung in den [Fe]-Hydrogenasen, da noch kein molekularbiologisches und genetisches System existiert, das eine Untersuchung erlauben würde. Da keine vollständige Genom-Analyse eines Organismus der lediglich [Fe]-Hydrogenasen besitzt vorliegt, kann über bioinformatische Ansätze auch keine Aussage getroffen werden. Im Fall von *C. acetobutylicum*, das sowohl [Fe]- und [NiFe]-Hydrogenasen besitzt (Nolling *et al.* 2001), wurde die Anwesenheit des HypF und HypE-Proteins bewiesen, allerdings gibt es keinen Hinweis, ob sie auch an der Synthese der [Fe]-Hydrogenasen beteiligt sind. Carbamoylphosphat als Substrat für die Synthese der Liganden wäre auch bei den [Fe]-Hydrogenasen denkbar, da aufgrund des Fe-Cysteins im Molekül die postulierte Chemie ablaufen könnte (Paschos *et al.* 2001). Durch die Anwesenheit von zusätzlichen Thiolen (Abbildung 1B) besteht auch Ähnlichkeit zu der von Wächtershäuser (1998) beschriebenen Pyritchemie (Duve und Miller 1991). Da in modifizierten Millerschen Experimenten die Anwesenheit von Carbamoylphosphat und ähnlichen Komponente wie Formamid, Harnstoff bestätigt wurde (Schlesinger und Miller 1983), wäre aufgrund der postulierten Chemie eine direkte Interaktion zwischen Eisen und Carbamoylphosphat wie in Paschos *et al.* (2001) beschrieben durchaus denkbar.

## Wie erfolgt der Transport und die Anlagerung der CO- und CN-Liganden an das Eisen?

In welchem Stadium des Reifungsprozesses die Anlagerung der Liganden an das Eisen erfolgt, ist noch nicht genau geklärt. Die Reaktionen des HypF- und HypE-Proteins selbst scheinen metallfrei abzulaufen, wie in den Analysen mit Metallchelatoren gezeigt werden konnte. Aufgrund des unterstöchiometrischen Gehalts von Eisen und Zink kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden, dass Metalle daran beteiligt sind. Es wäre denkbar, dass Eisen benötigt wird, um die neusynthetisierten Liganden sofort abzufangen. Da das HypD-Protein ein unübliches [FeS]-Zentrum besitzt (Jacobi 1992, Drapal 1998), könnte spekuliert werden, dass dieses möglicherweise die Liganden bindet oder dass deren Synthese durch HypF und HypE direkt am HypD erfolgt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass es in einem *ΔcarAB*-Stamm zur Akkumulation eines [HypC•HypD]-Komplexes kommt (Blokesch und Böck 2002).

In den letzten Monaten neu dazu gekommene Daten zur Hydrogenase-Reifung zeigen mittlerweile ein klareres Modell der Reifungskaskade der [NiFe]-Hydrogenase aus *E. coli* auf. Mittlerweile ist das 1998 aufgestellte Modell (Abbildung 6) mit der Funktion jedes akzessorischen Hyp-Proteins vervollständigt worden. Vieles deutet daraufhin, dass die Reifung nach dem Schema, wie es in Abbildung 34 für das HycE-Protein dargestellt ist, ablaufen könnte.

### HybD, eine Reifungsprotease mit Metallbindetasche zur Erkennung des Nickels im Hydrogenase-Apoprotein

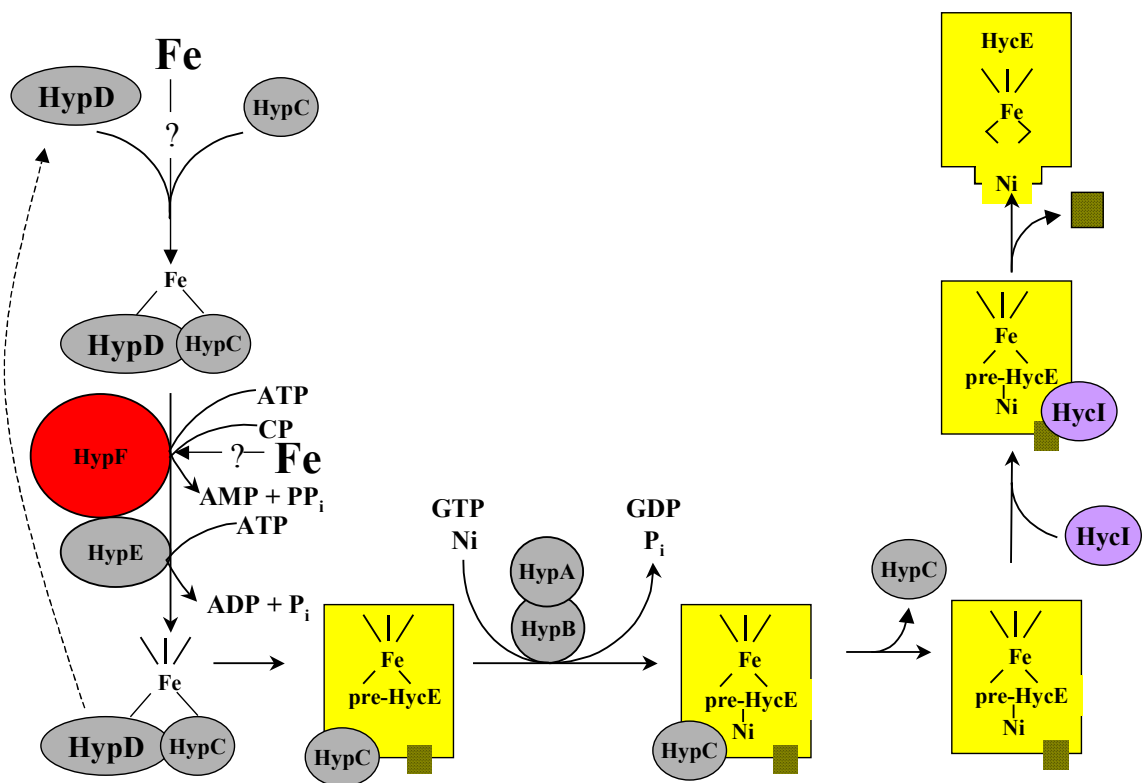
Über die kristallographische Analyse des HybD-Proteins als Beispiel einer Hydrogenase spezifischen Protease wurden neue Erkenntnisse zum Ablauf der Prozessierungsreaktion gewonnen (Fritsche *et al.* 1999). Das Protein bildet Kristalle aus, die ein Cd<sup>2+</sup>-Ion aus dem Kristallisationspuffer enthalten, wobei das Metall pentakoordiniert durch die Aminosäuren Glu16, Asp62 und His93 und ein Wassermolekül in einer pseudotetraedrischen Anordnung vorliegt.

In der Oberflächendarstellung des HybD-Proteins (Abbildung 34) kann eine Furche mit dem Metall-Ion am Boden erkannt werden, die als Ort der Substratbindung angenommen wird. Aus der Struktur konnten jedoch keine Anhaltspunkte über den Mechanismus der C-terminalen Prozessierung gewonnen werden. In der Nähe der Peptidbindungsfurche und in der Umgebung des Metalls befinden sich zwar Aminosäurereste (Thr43, Ser91, Asp40, Asn10),

die als potentielle Nukleophile in Betracht kämen, über den endgültigen Mechanismus der Reaktion kann jedoch nur die Struktur eines Enzym/Substrat-Komplexes Antwort geben. Versuche solche Komplexe zwischen HybD und dem Oligopeptid Argininal zu erhalten blieben erfolglos. Auch das *in vitro* synthetisierte C-terminale Peptid des HybC-Proteins (DPCMACAVH) lieferte im Kristallisationsansatz keinen Enzym/Substrat-Komplex. Die Identifizierung einer HycI-Variante (Asp62Asn), welche die Ausbildung eines stabilen Komplexes zwischen HycI und dem pre-HycE-Protein zur Folge hat (E. Theodoratou, unveröffentlichte Resultate), könnte einen neuen Ansatzpunkt zur Generierung eines Hydrogenase-Protease-Komplexes liefern. Zusätzliche Erkenntnisse hierbei könnte auch das vergleichende Studium von Keimungs-Proteasen sporenbildender Bakterien (*Clostridium* und *Bacillus*) liefern, die anscheinend einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie die Reifungsproteasen aufweisen (Pei und Grishin 2002).

Die beschriebenen biochemischen Daten schließen aus, dass die Protease die Nickelionen an das Apoprotein liefert und dort einsetzt. Es zeigte sich vielmehr, dass die Position des Cd<sup>2+</sup>-Ions unter nativen Bedingungen von Nickel eingenommen wird und dass das eingebaute Metall als molekulares Erkennungsmotiv für die Reifungs-Endopeptidase dient. Obwohl die Anwesenheit von Nickel im pre-HycE sicher ein wichtiges strukturelles Motiv für den Ablauf der Proteolyse darstellt, müssen zusätzlich zur Nickel-Erkennung auch Domänen des Apoproteins mit der Protease interagieren. Daran müssen sowohl Bereiche der C-terminalen Verlängerung, als auch des restlichen HycE-Proteins beteiligt sein (Theodoratou *et al.* 1999).

Eine Bestätigung für die Wichtigkeit des Nickels als Erkennungsmotiv lieferte auch die gestörte *in vitro* Prozessierung des HycE-Proteins bei Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Ionen (Magalon *et al.* 2001). Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Untersuchung des Reifungs-Systems der großen Untereinheit der Hydrogenase von *Azotobacter vinelandii* getroffen (Menon und Robson 1994).



**Abbildung 34. Schema der Reifung von [NiFe]-Hydrogenasen, das die unveröffentlichten Ergebnisse der letzten Monate berücksichtigt (farbig dargestellte Bereiche sind Bestandteil dieser Arbeit).** Die Synthese der Liganden erfolgt durch das biochemische Zusammenspiel von HypF und HypE. Wie in dieser Arbeit beschrieben erfolgt die Ausbildung des Carbamoyl-Adenylats am HypF-Protein. Dieses kann durch HypE über ATP-Hydrolyse in CN umgewandelt werden. Ein Modell für die Synthese des CO kann derzeit noch nicht beschrieben werden. Der vorgebildete HypC•HypD-Komplex fungiert vermutlich als Träger der Liganden (Blokesch und Böck 2002). Die Ausbildung eines fertigen  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Clusters am HypD mit der anschließenden Übertragung durch HypC auf HycE ist wahrscheinlich (Drapal und Böck 1998, Blokesch und Böck 2002). Der Nickeleinbau erfolgt durch das Zusammenspiel von HypB und HypA (Olson *et al.* 2001, Hube *et al.* 2002). Vermutlich fungiert HypB als Nickel-Donor, der durch HypA zum HycE geleitet wird. Durch die GTP-Hydrolyse am HypB könnte der Transfer des Nickels oder die Dissoziation des Transferkomplexes erfolgen (Maier *et al.* 1993, Maier *et al.* 1995). Nach dem Nickeleinbau erfolgt die Prozessierung durch die Protease HycI (Rossmann *et al.* 1994, Rossmann *et al.* 1995, Fritsche *et al.* 1998, Theodoratou *et al.* 2000). Im HycE-Apoprotein eingebautes Nickel kann durch die Protease erkannt werden; es folgen der proteolytische Schritt und die Internalisierung des Metallzentrums.

## ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden drei Aspekte der Reifung der Hydrogenasen in *E. coli* näher untersucht:

- Die Bedeutung des Carbamoylphosphats als essentielles Substrat für die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli* konnte aufgezeigt werden.
- Als Schnittpunkt zwischen Carbamoylphosphat-Verwertung und [NiFe]-Metallzentrums-Biosynthese fungiert das HypF-Protein.
- Anhand der Kristall-Struktur von HybD wurden neue Einblicke in den Mechanismus der proteolytischen Reifung der großen Untereinheit der Hydrogenasen gewonnen.

### **Carbamoylphosphat ist an der Reifung der großen Untereinheiten der Hydrogenasen beteiligt**

Eine Deletion im *carAB*-Locus führt zum Verlust der Synthese aktiver Hydrogenasen in *E. coli*. Die Aktivität kann wiederhergestellt werden, wenn der Stamm mit einem *carAB*-tragenden Plasmid transformiert oder wenn er in Anwesenheit von Citrullin angezogen wird. Da der *carAB*-Locus für das Enzym der Carbamoylphosphat-Synthese kodiert und Citrullin in der Zelle in Carbamoylphosphat umgewandelt werden kann, ist Carbamoylphosphat die Ausgangssubstanz für die Synthese der Liganden des Metallzentrums. Aufgrund seiner Struktur wurden Reaktionsmechanismen postuliert, über die es in CN- und/oder CO-Einheiten umgewandelt werden kann.

### **HypF: Struktur/Funktions-Beziehung und Biochemie einer neuartigen Phosphatase**

Dem HypF-Protein konnte die biochemische Funktion einer Carbamoylphosphat-Phosphatase zugeschrieben werden, zusätzlich besitzt es eine an die Anwesenheit von Carbamoylphosphat gekoppelte ATP-hydrolysierende Aktivität. Die ATP-Hydrolyse durch HypF führt zur Bildung von AMP und PP<sub>i</sub> und sie geht parallel mit der Ausbildung eines adenylierten Reaktionsintermediats wie über die Pyrophosphat-ATP-Austausch-Reaktion gezeigt wurde. Beim adenylierten Intermediat handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Carbamoyl-Adenylat. Es wird postuliert, dass dieses Substrat vom HypE-Protein zur Bildung des CN-Liganden durch einen Wasserentzug über eine PurM-ähnliche Reaktion verwendet wird.

Durch spezifische Mutagenisierung konnten HypF-Varianten konstruiert werden, die zur Bildung aktiver Hydrogenasen unfähig waren. Die drei strukturell auffälligsten Motive



des HypF-Proteins (Acylphosphat-Phosphatase-, Zink-Finger- und *O*-Carbamoyl-Transferase-Motiv) sind wichtig für die optimale Reifung der Hydrogenasen. Diese *in vivo* Unfähigkeit der Mutanten aktive Hydrogenasen zu synthetisieren geht mit dem Verlust der Carbamoylphosphat-Phosphatase einher.

### **Nickelabhängige Endopeptidasen katalysieren den abschließenden Reifungsschritt**

Die kristallographische Analyse des HybD-Proteins als Beispiel einer spezifisch an der Hydrogenasen-Reifung beteiligten Protease, zeigte die Anwesenheit einer essentiellen Metallbindetasche, an deren Ausbildung Glu, Asp und His beteiligt sind und die in einer Peptidbindungsfurche liegt. Die Metalltasche fungiert spezifisch als Nickelerkennungsstelle in der Prozessierung, da nur Nickel-enthaltendes Apo-Protein prozessiert werden kann.

## LITERATURVERZEICHNIS

### A

Abdelal A. (1979) *Annu. Rev. Microbiol.* **33**, 139-168.

Abdullah K.M., Lo R.Y.C. und Mellors A. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 5597-5603

Adams M.W.W. und Stiefel E.I. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 214-220

Alcántara C., Cervera J. und Rubio V. (2000) *FEBS Lett.* **484**, 261-264

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. und Lipman D.J. (1997) *Nucleic. Acids. Res.* **25**, 3389-3402

Anderson M. E., DeRose V. J., Hoffman B. M. und Lindahl P. A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12204-12205.

Anderson S., Hill A.F. und Ng Y.T. (2000) *Organometallics* **19**, 15-21

Andrews S.C., Berks B.C., McClay J., Ambler A., Quail M.A., Golby P. und Guest J.R. (1997) *Microbiology* **143**, 3633-3647

Angelici R.J. und Denton D.L. (1968) *Inorg. Chim. Acta* **2**, 3-7

Angelici R.J. (1972) *Acc. Chem. Res.* **5**, 335-341

Ansaldi, M., Lepelletier, M., und Mejean, V. (1996) *Analyt. Biochem.* **234**, 110-111

Antoun H., Beauchamp C.J., Goussard N., Chabot R. und Lalande R. (1998) *Plant Soil* **204**, 57-67

Arnér E.S.J. und Holmgren A (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102-6109

**B**

Balbas, P., Soberon, X., Meriono, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N., und Bolivar, T. (1986) *Gene* **50**, 3-40

Ballantine, S.P. und Boxer, D.H. (1985) *J. Bacteriol.* **163**, 454-459

Bauer A. (2002) Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München

Baumann U. (1994) *J. Mol. Biol.* **242**, 244-251

Begg, Y.A., Whyte, J.N. und Haddock, B.A. (1997) *FEMS Microbiol. Lett.* **2**, 47-50

Behrens H., Lindner E., Maertens D., Wild P. und Lampe R.-T. (1972) *J. Organomet. Chem.* **34**, 367-377.

Benett B., Lemon B.J. und Peters J.W. (2000) *Biochemistry* **39**, 7455-7460

Berg J.M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6513-6516

Bernhard M., Buhrke T., Bleijlevens B., De Lacey A.L., Fernandez V.M., Albracht S.P. und Friedrich B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15592-15597

Binder U., Maier T. und Böck A. (1996) *Arch. Microbiol.* **165**, 69-72

Black M.J. und Jones M.E. (1984) *Cancer Res.* **44**, 4366-4376

Blasco F., Guigliarelli B., Magalon A., Asso M., Giordano G. und Rothery R.A. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 179 –193

Blokesch M., Magalon A. und Böck A. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 2817-2822

Blokesch M. und Böck A. (2002) *J. Mol. Biol.* **324**, 287-296

Blum H. Beier H. und Gross H.J. (1987) *Electrophoresis* **8**, 93-99

Böck, A. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes* Eds. Barrett A.J., Drawlings D.R. und Woessner J.F., Academic Press 1587-1589

Bode W., Gomis-Rüth F.X., Huber R., Zwillig R. und Stocker W. (1992) *Nature* **358**, 164-7

Bode W., Gomis-Rüth F.X. und Stöcker W. (1993) *FEBS Lett.* **331**, 134-140

Bonam D., Murrell S.A. und Ludden P.W. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 693-699

Bourne H.R., Sanders D.A. und McCormick F. (1991) *Nature* **394**, 117-127

Bradford M.M. (1976) *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254

Bruce M.I. und Wallis R.C. (1981) *Aust. J. Chem.* **34**, 209-213.

Brysk M.M. und Ressler C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 1156

Brysk M.M., Lauinger M.C. und Ressler C. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **184**, 583

Buhrke T., Bleijlevens B., Albracht S.P.J. und Friedrich B. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 7087-7093

Buhrke T. und Friedrich B. (1998) *Arch. Microbiol.* **170**, 460-463

## C

Calendar R. und Berg, P. (1996) *Biochemistry* **5**, 1681-1686

Casadaban M.J. und Cohen S.N. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4530-4533

Castric P.A. (1977) *J. Bacteriol.* **130**, 826-831

Castric P.A. (1981) *The metabolism of hydrogen cyanide by bacteria* in Vennesland B., Conn E.E., Knowles C.J., Westley J., Wissing F *Cyanide in biology*, Academic, London, 233-261

- Cheesbrough T.M. und Kolattukudy P.E. (1984), *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 6613-6617
- Chang, A.C.Y., und Cohen, S.N. (1987) *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156
- Chen J.C. und Mortenson L.E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 199-202
- Chung C.T., Niemela S.L. und Miller R.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **86**, 2172-2175
- Colbeau A., Magnin J.P., Cauvin B., Champion T. und Vignais P.M. (1993) *Mol. Microbiol.* **8**, 15-29
- Collman J.P. (1975) *Acc. Chem. Res.* **8**, 342-347.
- Cruse I. und Maines M.D. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3348
- Cunin R., Glansdorff N., Pierard A. und Stalon V. (1986) *Microbiol. Rev.* **50**, 314-352
- D**
- de Duve C. und Miller S.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10014-10017
- Dernedde J., Eitinger T., Patenge N. und Friedrich B. (1996) *Eur. J. Biochem.* **235**, 351-358
- D'Haese W., Van Montagu M., Prome J.C. und Holsters M. (1999) *Mol. Plant. Microbe Interact.* **12**, 68-73
- Diekert G. (1988) in *The Bioinorganic Chemistry of Nickel* Eds. Lancaster Jr., J.R., VCH Publishers, New York, 299-309
- Diekert G., Graf E.G. und Thauer R.K. (1979) *Arch. Microbiol.* **122**, 117-120
- Dixon N.E., Riddles P.W., Gazzola C., Blakeley R.L. und Zerner B. (1980) *Can. J. Biochem.* **58**: 1335-1344

Dole F., Fournel A., Magro V., Hatchikian E.C., Bertrand P. und Guigliarelli B. (1997) *Biochemistry* **36**, 7847-7854

Drake H.L. (1982) *J. Bacteriol.* **149**, 561-566

Drapal N. (1998) Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München

Drapal N. und Böck A. (1998) *Biochemistry* **37**, 2941–2948

Drews G. (1976) in Mikrobiologisches Praktikum, Springer Verlag

## E

Ehrenreich, A., Forchhammer, K., Tormay, P., Veprek, B., und Böck, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**, 767-773

Endo I., Nojiri M., Tsujimura M., Nakasako M., Nagashima S., Yohda M. und Odaka M. (2001) *J. Inorg. Biochem.* **83**, 247-53

Engel R.R., Matsen J.M., Chapman S.S. und Schwartz S. (1972) *J. Bacteriol.* **112**, 1310-1315

Evans S.V (1993) *J. Mol. Graphics* **11**, 134-138

Evered D. und Harnett S. (1988) *Cyanide compounds in biology*, Eds. Evered D. und Harnett S. Wiley Chichester, Ciba Foundation Symposium 140

Ewart G.D. und Smith G.D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 327-337

Ewart G.D., Reed K.C. und Smith G.D. (1990) *Eur. J. Biochem.* **187**, 215-223

## F

Fehlhammer W.P. und Mayr A. (1975) *Angew. Chem.* **87**, 776-777.

Fischer E.O., Schneider T. und Ackerman K. (1984) *Z. Naturforsch.* **39b**, 468-473

Ford C. und Rokicki A. (1988) *Adv. Organomet. Chem.* **28**,139-217.

Forth W., Henschler D., Rummel W. und Starke K. (1992) in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie Ärzte, Tierärzte und Apotheker.* 6. Auflage, Mannheim/Leipzig/Wien/Zürich BI-Wissenschaftsverlag

Fraenkel, D.G. und Neidhardt, F. C. (1961) *Biochim. Biophys. Acta.* **53**, 96-100

Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosental A. und Perret X. (1997) *Nature* **387**, 394-401.

Fritsche E., Paschos A., Beisel H.G., Böck A., und Huber R. (1999) *J. Mol. Biol.* **288**, 989-998

Fuchs G. (1986) *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 181-213

## G

Gallagher L. A. und Manoil C. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6207-6214

Garcin E., Vernéde X., Hatchikian E.C., Volbeda A., Frey M., Fontecilla-Camps J.C. (1999 ) *Structure* **7**, 557-566

Gigot D. (1990) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **98**, B128

Glansdorff (1998) *Biosynthesis of Arginine and Polyamines in Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular Biology* Eds. Neidhardt F.C., Ingraham J.L, Brooks Low K., Magasanik B., Schaechter M. und Umbarger H.E., American Society for Microbiology, Washington D.C.

Goldfarb W.B. und Margraf H. (1967) *Annals of Surgery* **165**, 104

Gomis-Rüth F.X., Kress L.F., Kellermann J., Mayr I., Lee X., Huber R. und Bode W. (1994) *J. Mol. Biol.* **239**, 513-44

Graham A., Jenkins H.E., Smith N.H., Mandrand-Berthelot MA, Haddock B.A. und Boxer D.H. (1980) *FEBS Lett.* **113**, 167-172

## H

Hamilton C.M., Aldea M., Washburn B.K., Babitzke P. und Kushner S.R. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 4617-4622

Hampsey M., Na J.G., Pinto I., Ware D.E. und Berroteran R.W. (1991) *Biochimie* **73**, 1445-1455

Hanahan D. (1985) in DNA Cloning, Vol 1. IRL Press, Oxford

Happe R.P., Roseboom W., Egert G., Friedrich C.G., Massanz C., Friedrich B. und Albracht S.P.J. (2000) *FEBS Lett.* **446**, 259-263

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

Harada F. und Nishimura S. (1972) *Biochemistry* **11**, 301-308

Hartmann G.C., Klein A.R., Linder M und Thauer R.K. (1996) *Arch. Microbiol.* **165**, 187-193

Hausinger R.P.(1994) *Sci. Total. Environ.* **148**, 157-166

Heinonen, J.K. und Lahti, R.J. (1981) *Analytical Biochemistry* **113**, 313-317

Heo J., Staples C.R., Halbleib C.M. und Ludden P.W. (2000) *Biochemistry* **39**, 7956-7963

Higuchi Y., Yagi T. und Yasuoka N (1997) *Structure* **5**, 1671-1680

Higuchi Y und Yagi T. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 295-299

Higuchi Y., Toujou F., Tsukamoto K., und Yagi T (2000) *J. Inorg. Biochem.* **80**, 205-211



Hildebrand U., Taraz K., Budzikiewicz H., Korth H und Pulverer G (1985) *Z. Naturforsch.* **40c**, 201-207

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

Holmgren A (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2275-2279

## J

Jabbouri S., Fellay R., Talmont F., Kamalaprija P., Burger U., Relic B., Prome J.C. und Broughton W.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22968-22973

Jabbouri S., Relic B., Hanin M., Kamalaprija P., Burger U., Prome D., Prome J.C. und Broughton W.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 12047-12055

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

Jacobi A. (1994) Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München

## K

Karube I., Tomiyama M. und Kikuchi A. (1984) *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 165-168

Kerby R.L., Ludden P.W. und Roberts G.P. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 2241-2244

Khan A.A. und Kolattukudy P.E. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 1379-1386

King R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1918-1922

Knowles C.J. (1988) *Cyanide compounds in biology*, Eds. Evered D. und Harnett S. Wiley Chichester, Ciba Foundation Symposium 140, 3-15

Knowles C.J. und Bunch A.W. (1986) *Adv. Microb. Physiol.* **27**, 73-111

Kuchino Y., Kasai H., Nihei K. und Nishimura S. (1976) *Nucleic Acids Res.* **3**, 393-8

Kumar M., Lu W.-P., Liu L. und Ragsdale S. W. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11646-11647.

Kunz D.A., Chen J.L. und Pan G. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4452-4459

## L

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

Laville J., Blumer C., Von Schroetter C., Gaia V., Défago G., Keel C. und Haas D. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3187-3196

Legrain C., Halleux P., Stalon V. und Glansdorff N. (1972) *Eur. J. Biochem.* **27**, 93-102

Legrain C., Villeret V., Roovers M., Gigot D., Dideberg O, Piérard A und Glansdorff N. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247**:1046–1055.

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

Li C., Kappock J.T, Stubbe J.A., Weaver T.M. und Ealick S.E. (1999) *Structure Fold. Des.* **7**, 1155-1166

Lieberi R., Selmar D. und Biehl B. (1985) *Plant Syst. Evol.* **150**, 49–63.

Ljungdahl L.G. (1986) *Annu. Rev. Microbiol.* **40**, 415-450

Lowe D.J. und Thorneley R.N. (1984a) *Biochem. J.* **224**, 877-886

Lowe D.J. und Thorneley R.N. (1984b) *Biochem. J.* **224**, 895-901

Luo G.X. und Horowitz P.M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8220-8225

Lupton F.S., Conrad R. und Zeikus J.G. (1984) *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 263-268

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

**M**

Madigan M.T., Martinko J.M. und Parker J. (2000) in *Brock Biology of Microorganisms* Ninth Edition Eds. Corey P.F., Prentice-Halle, Inc. Upper Saddle River, New Jersey 07458

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

Magalon A., Blokesch M., Zehelein E. und Böck A. (2000) *FEBS Lett.* **499**, 73-76

Maier T. (1997) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Maier T. und Böck A. (1996a) *Biochemistry* **35**, 10089-10093

Maier T. und Böck A. (1996b) *Mechanisms of Metallocenter Assembly* Eds. Hausinger R.P., Eichhorn G.L. und Marzilli L.G., VCH Publishers Inc., New York, 173-192

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

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

Maier T., Binder U. und Böck A. (1996) *Arch. Microbiol.* **165**, 333-341

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

Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J. (1989) in *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, New York

Mao Y., Varoglu M. und Sherman D.H. (1999) *Chem. Biol.* **6**, 251-263

Marina A., Uriarte M., Barcelona B., Fresquet V., Cervera J. und Rubio V. (2000) *Eur. J. Biochem.* **253**, 280-91

Marshall M. und Cohen P.P. (1970) *Methods Enzymol.* **17**, 229-234.

Matias P.M., Soares C.M., Saraiva L.M., Coelho R., Morais J., LeGall J. und Carrondo M.A. (2001) *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 63-81

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

Mergeay D., Gigot J., Beckmann N., Glansdorff N. und Pierard A. (1974) *Mol. Gen. Genet.* **133**, 299 -316

Meyer O. und Schlegel H.G. (1983) *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 277-310

Michaels R., Hankes L.V., Corpe W.A. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 121-125

Mitoma C. und Udenfriend S. *Methods Enzymol.* (1962) **5**, 816-819

Miyahara S. und Takahashi H. (1971) *J. Biochem.* **69**, 231-3

Mizuno, Y., Ohba, Y., Fujita, H., Kanesaka, Y., Tamura, T., und Shiokawa H. (1989) *Analyt. Biochem.* **183**, 46-49

Miller J.H. (1972) in A short course in bacterial genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Modesti A., Taddei N., Chiti F., Bucciantini M., Magherini F., Rigacci S., Stefani M., Raugei G. und Ramponi G. (1996) *J. Protein. Chem.* **15**, 27-34

Moncrief M.B. und Hausinger R.P.(1997) *J. Bacteriol.* **179**, 4081-4086

Montet Y., Amara P., Volbeda A., Vernede X., Hatchikian E.C., Field M.J., Frey M., Fontecilla-Camps J.C. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 523-526

Mueller E.J., Oh S., Kavalerchik E., Kappock T.J., Meyer E., C. Li C., Ealick S.E., und Stubbe J. (1999) *Biochemistry* **38**, 9831-9839

Mullins, L.S., Hong, S.B., Gibson, G.E., Walker H., Stadtman, T.C. und Rauschel, F.M. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 6684–6685.

## N

Na J.G., Pinto I. und Hampsey M. (1992) *Genetics* **131**, 791-801

Nandi D.L., Horowitz P.M. und Westley J. (2000) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 465-473

Navarro C., Wu L.-F. und Mandrand-Berthelot M.-A. (1993) *Mol. Microbiol.* **9**, 1181-1191

Nebert D.W. und Gelboin H.V. (1968) *J. Biol. Chem.* **243** 6242-6249.

Nediani C., Fiorillo C., Marchetti E., Bandinelli R., Degl'Innocenti D. und Nassi P. (1995) *Biochemistry* **34**, 6668-6674

Neuhard und Nygaard (1998) *Purines and Pyrimidines in in Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular Biology* Eds. Neidhardt F.C., Ingraham J.L, Brooks Low K., Magasanik B., Schaechter M. und Umbarger H.E., American Society for Microbiology, Waschington D.C.

Nicholls A., Bharadwaj R. und Honig B. (1993) *Biophys. J.* **64** A166

Nicolet Y., Piras C., Legrand P., Hatchikian C.E. und Fontecilla-Camps J.C. (1999) *Structure Fold. Des.* **7**, 13-23

Niven D.F., Collins P.A. und Knowles C.J. (1975) *J. Gen. Microbiol.* **90**, 271-285

Noguchi S., Yamaizumi Z., Ohgi T., Goto T., Nishimura Y., Hirota Y. und Nishimura S. *Nucleic Acids Res.* **5**, 4215-4223

Nolling J., Breton G., Omelchenko M.V., Makarova K.S., Zeng Q., Gibson R., Lee H.M., Dubois J., Qiu D., Hitti J., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Sabathe F., Doucette-Stamm L., Soucaille P., Daly M.J., Bennett G.N., Koonin E.V. und Smith D.R. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 4823-38

**O**

Ochman H., Gerber A.S und Hartl D.L. (1998) *Genetics* **120**, 621-623

Okada N., Noguchi S., Nishimura S., Ohgi T., Goto T., Crain P.F. und McCloskey J.A. *Nucleic Acids Res.* **5**, 2289-2296

Ortiz de Montellano P.R. (1995) in *Cytochrome P 450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, Plenum, New York

**P**

Pascal. M.-C., Casse F., Chippaux M. und Lepelletier M. (1975) *Mol. Gen. Genet.* **141**, 173-179

Paschos A. (1997) Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München

Paschos A., Glass R. und Böck A. (2001) *FEBS Lett.* **488**, 9-12

Pearson R.G. und Figdore P.E. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 1541-1547.

Pei J. und Grishin N.V. (2002) *Protein Sci.* **11**, 691-697

Peters J.W., Lanzilotta W.N., Lemon B.J. und Seefeldt L.C. (1998) *Science* **282**, 1853-1858

Piérard A. (1966) *Science* **154**, 1572-1573

Piérard A., Glansdorff N., Mergeay M und Wiame J.M. (1965) *J.Mol.Biol.* **14**, 23-36

Pierik A.J., Roseboom W., Happe R.P., Bagley K.A. und Albracht S.P.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **274**, 3331-3337

**R**

Ragsdale S.W. (1991) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 261-300

- Ragsdale S.W., Wood H.G., Morton T.A., Ljungdahl L.G. und DerVartanian D.V (1988) *The Bioinorganic Chemistry of Nickel* Eds. Lancaster Jr., J.R., VCH Publishers, New York, 311-332
- Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A., und Legrain, P. (2001) *Nature* **409**, 211- 215
- Raybuck S.A. (1992), *Biodegradation* **3**, 3-18
- Rawlings N.D. und Barrett A.J. (1995) *Meth. Enzymol.* **248**, 183-228
- Rey L., Fernandez D., Brito B., Hernando Y., Palacios J.-M, Imperial J. Und Ruiz-Argüeso T. (1996) *Mol. Gen. Gen.* **252**, 237-248
- Rey L. Murillo J., Hernando Y, Hidalgo E., Cabrera E, Imperial J. Und Ruiz-Argüeso T. (1993) *Mol. Microbiol.* **8**, 471-481
- Robson, R. (2001) in *Hydrogen as a fuel: Learning from Nature* Eds. Cammack R., Frey M. und Robson R., Taylor & Francis, London U.K., 57-72
- Rodgers P.B. und Knowles C.J. (1978) *J. Gen Microbiol.* **108**, 261-267
- Rodrigue A., Batia N., Müller M., Fayet O., Böhm R., Mandrand-Berthelot M.-A. und Wu L.F. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 4453-4460
- Rosano C., Zuccotti S., Bucciantini M., Stefani M., Ramponi G. und Bolognesi M. (2002) *J. Mol. Biol.* **321**, 785-96
- Rossmann R. (1995) Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München
- Rossmann R., Sauter M., Lottspeich F. und Böck A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **220**, 377-384
- Rossmann R., Maier T., Lottspeich F. und Böck A. (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 545-550

Rubino S.D., Nyuoya H. und Lusty C.J. (1987) *J. Bacteriol.* **116**, 627-635

Rudzinska M., Wallace R., Escarmis C. und Grisolia S. (1972) *Physiol. Chem. Phys.* **4**, 527-34

## S

Sambbrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989) in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY

Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467

Saraste, M., Sibbald, P.R., und Wittinghofer, A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430-4

Sauter M. (1992) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München

Sauter M., Böhm R. und Böck A. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 1523-1532

Sawers R.G., Ballantine S.P. und Boxer D.H. (1985) *J. Bacteriol.* **164**, 1324-1331

Shambaugh G.E. 3rd. (1977) *Am. J. Clin. Nutr.* **30**, 2083-2087

Schendel F.J., Mueller E., Stubbe J., Shiau A. und Smith J.A. (1989) *Biochemistry* **28**, 2459-2471

Schlesinger G. und Miller S.L. (1983) *J. Mol. Evol.* **19**, 383-90

Schut G.J., Zhou J. und Adams M.W. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 7027-36

Schrauzer G.N., Deutsch E. und Windgassen R.I. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2441-2442

Schrimsher, J.L., Schendel, F.J., Stubbe, J. und Smith, J.M. (1986) *Biochemistry* **25**, 4366-4371

Semmelhack M.F. und Tamura R. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4099-4100.



- Seravalli J. und Ragsdale S.W. (2000) *Biochemistry* **39**, 1274-1277
- Shepherdson M. und Pardee A.B. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 3233-3237
- Singleton E. und Oosthuizen H.E. (1983) *Adv. Organomet. Chem.* **22**, 209-310
- Simlot M.M., und Pfaender P. (1973) *FEBS Lett.* **35**, 201-203
- Solomonson L.P. (1981) in *Cyanide as a metabolic inhibitor*. in: Vennesland B., Conn E.E., Knowles C.J., Westley J., Wissing F. (eds) in *Cyanide in biology*. Academic, London, 11–28
- Soriano A., Colpas G.J. und Hausinger R.P. (2000) *Biochemistry* **39**, 12435-12440
- Soriano A. und Hausinger R.P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11140-11144
- Spector L., Jones M.E. und Lipmann F. (1975) in *Methods in Enzymology III*, Eds. Colowick K, Academic Press Inc. Publisher, NY
- Sprinzi M., Steegborn C., Hubel F. und Steinberg S. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 68-72
- Stefani M., Liguri G., Berti A., Nassi P. und Ramponi G. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **208**, 37-41
- Stefani M., Taddei N. und Ramponi G. (1997) *Cell Mol. Life Sci.* **53**,141-151
- Steffensky M., Muhlenweg A., Wang Z.X., Li S.M. und Heide L. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1214-1222.
- Stöcker W., Grams F., Baumann U., Reinemer P., Gomis-Rüth F.X., McKay D.B. und Bode W. (1995) *Protein Science* **4**, 823-840
- Studier F.W. und Moffatt B.A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
- Sun Y., Rotenberg M.O. und Maines M.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8212-8217

Szabo A., Korszun R., Hartl F.U. und Flanagan J. (1996) *EMBO J.* **15**, 408-417

**T**

Taddei N., Chiti F., Fiaschi T., Bucciantini M., Capanni C., Stefani M., Serrano L., Dobson C.M. und Ramponi G. (2000) *J. Mol. Biol.* **300**, 633-647

Taddei N., Modesti A., Bucciantini M., Stefani M., Magherini F., Vecchi M., Raugei G. und Ramponi G. (1995) *FEBS Lett.* **362**, 175-179

Taddei N., Stefani M., Magherini F., Chiti F., Modesti A., Raugei G. und Ramponi G. (1996) *Biochemistry* **35**, 7077-7083

Teplova M., Tereshko V., Sanishvili R., Joachimiak A., Bushueva T., Anderson W.F. und Egli M (2000) *Protein Sc.* **9**, 2557–2566

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

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

Thorneley R.N. und Lowe D.J. (1984a) *Biochem. J.* **224**, 887-894

Thorneley R.N. und Lowe D.J. (1984b) *Biochem. J.* **224**, 903-909

Trotta P., Burt M.E., Haschenmeyer R.H. und Meister A. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2599-2603

Troxler R.F. und Dokos J.M (1973) *Plant Physiol.* **51**, 72-75

**U**

Uffen R.L. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3298-3302

Uriarte M., Marina A., Ramón-Maiques S., Fita I. und Rubio V (1999) *J. Mol. Biol.* **274**, 16295-16303

**V**

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

Vennesland B., Conn E.E., Knowles C.J., Westley J. und Wissing F (1981) in *Cyanide in biology*, Academic, London, 349-362

Verma A., Hirsch D.J., Glatt C.E., Ronnett G.V. und Snyder S.H. (1993) *Science* **259**, 381-384

Vignais P.M., Billoud B. und Meyer J. (2001) *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 455-501

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

Voisard C., Bull C.T., Keel C., Laville J., Maurhofer M., Schnider U., Défago G. und Haas D (1994) in *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms* Eds. O’Gara F., Dowling D.N., Boesten B. VCH, Weinheim, 67-89

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

Volbeda A., Garcin E., Piras C., de Lacey A.L. und Fernandez V.M. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12989-12996

von Tigerstrom M. und Campbell J.J.R. (1966) *Can. J. Microbiol.* **12**, 1005-1013

**W**

Wächtershäuser G. (1988) *Microbiol. Rev.* **52**, 452-484

Webb E. und Downs D. (1997) *J. Mol. Biol.* **272**, 15702-15707

- Whitaker J.R. und Granum P.E. (1980) *Analyt. Biochem.* **109**, 156-159
- Wierenga R.K., Terpstra P. und Hol W.G. (1986) *J. Mol. Biol.* **187**, 101-107
- Wilson M.T., Antonini G., Malatesta F., Sarti P. und Brunori M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24114-24119
- Wissing F. (1974) *J. Bacteriol.* **117**, 1289-1294
- Wittinghofer A. (1993) *Curr. Biol.* **3**, 874-876
- Wolf, I., Buhrke, T., Dervedde, J., Pohlmann, A. und Friedrich B. (1980) *Arch. Microbiol.* **170**, 451-459
- Wojtkowiak D., Georgopoulos C. und Zylicz M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22609-17
- Wood H.G. und Ljungdahl L.G. (1991) in *Variations in Autotrophic Life*, Academic Press, New York 201-250
- Wood H.G., Ragsdale S.W. und Pezacka E. (1986a) *Biochem. Int.* **12**, 421-440
- Wood H.G., Ragsdale S.W. und Pezacka E. (1986b) *Trends Biochem. Sci.* **11**, 14-18
- Wood H.G., Ragsdale S.W. und Pezacka E. (1986c) *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 345-362
- Woodcock D., Crowther P., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S., Michael M und Graham M. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 3469-3478
- Wray J.W. und Abeles R.H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21466-21469
- Wu L.-F., Mandrand-Berthelot. M.-A., Waugh R., Edmonds C.J., Holt S.E. und Boxer D.H. (1989) *Mol. Microbiol.* **3**, 1709-1718

**Y**

Yagi T. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 194-195

Yamamoto, T., Tomiyama, M., Mita, H., Sode, K. und Karube, I. (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* **66**, 187-192

Yanisch-Perron C., Vieira J. und Messing J. (1985) *Gene* **33**, 103-109

**Z**

Zakhary R., Poss K.D., Jaffrey S.R., Ferris C.D., Tonegawa S., Snyder S.H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**,14848-14853

Zimmermann A. (1996) Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München



## ANHANG

### I.

Organismen die ein Protein mit dem Motiv [V/I][Q/I/S]HH[H/Y/F/L]AH oder eine abgewandelte Form von diesem enthalten, sind aufgelistet. Eine Vielzahl der hier aufgeführten Proteine die dieses Sequenz-Motiv enthalten wurden als *O*-Transcarbamoylasen annotiert, ohne dass jedoch Beweise für solch eine biochemische Aktivität vorliegen.

- Biosynthese von Antibiotika

Aminosäuresequenz	Organismus	Proteinbezeichnung	Antibiotikum
VPHHLAH	<i>Streptomyces spheroides</i>	NovN	Novobiocin
VNHHLAH	<i>Streptomyces lavendulae</i>	MmcS	Mitomycin C
PDHHLIH	<i>Streptomyces verticillus</i>	BlmD	Bleomycin

- Biosynthese von Nodulationsfaktoren

Aminosäuresequenz	Organismus	Proteinbezeichnung
VEHHLAH	<i>Pyrococcus abyssi</i>	NolO
VEHHLAH	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	NolO
VGHHQAH	<i>Bradyrhizobium sp. WM9</i>	NolO
VSHHLSH	<i>Rhizobium sp. NGR234</i>	NolO
VSHHQAH	<i>Mesorhizobium loti</i>	NolO
VPHHVAH	<i>Streptomyces coelicolor</i>	NolO
VPHHLAH	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	
MNHHEVH	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	NolO
PGHHIAH	<i>Deinococcus radiodurans</i>	NodU
ISHHLAH	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	NolO
YEHHLCH	<i>Methanococcus jannaschii</i>	MJ1058
FYHHISH	<i>Methanococcus jannaschii</i>	MJ1051
NEHHQSH	<i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>	
TEHHLAH	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	
YPHVTSH	<i>Sinorhizobium freudii</i>	
YPHVTGH	<i>Rhizobium tropici</i>	
APHVMGH	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	NodU
MAHHNAH	<i>Mycobacterium leprae</i>	

- möglicherweise zu Carbamoyltransferasen ähnliche Proteine

Aminosäuresequenz	Organismus
VEHHLAH	<i>Pyrococcus abyssi</i>
VEHHLAH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VDHHYAH	<i>Myxococcus xanthus</i>
IDHHECH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>





## DANKSAGUNG

- Herrn Prof. Dr. August Böck möchte ich an dieser Stelle für die Vergabe des spannenden Themas, für sein fortwährendes Interesse an dem Projekt und für die vielen wertvollen Anregungen danken, mit denen er diese Arbeit begleitete.
- Bei Prof. Dr. Robert Huber und Erich Fritsche vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bedanke ich mich ganz herzlich für die kristallographische Analyse der Protease HybD und für die angenehme und besonders effektive und fruchtbare Zusammenarbeit.
- Bei Prof. Dr. Richard Glass von der Universität Arizona bedanke ich mich ganz herzlich für seine Diskussionsbereitschaft und sein Recherchieren der chemischen Modelle, die ein wichtiger Beitrag zur Untersuchung und Verständnis des Carbamoylphosphats als Quelle der Liganden für die [NiFe]-Hydrogenasen sind.
- Bei Helmut Hartl bedanke ich mich für die AAS- und ICP-AES-Analysen der Proteine HycI, HybD und HypF. Bei Dr. Hakan Sarioglou und Dr. Frank Siedler bedanke ich mich für die massenspektroskopische Untersuchung des HypF- und des „roten“-Proteins.
- Bei meinen zwei Diplomantinnen Monika und Anette, meinem „Teilzeit“-Diplomanten Toni und der Praktikantin Michaela bedanke ich mich für die tolle und aufregende Zusammenarbeit. Es hat Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten!
- Bei Eva Zehelein bedanke ich mich für die vielen praktischen Tipps und Tricks, speziell im molekularbiologischen Arbeiten. Wegen ihres steten Interesses zur Mitarbeit und Ihrer Hilfe bei der Konstruktion des DHPF-2 und der Strep-tagII-HypF-Varianten, bin ich ihr ebenfalls zu Dank verpflichtet.
- Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Mikrobiologie, insbesondere den Laborkollegen Katerina, Melanie, Stefie, Martin, Dani, Armin, Mike, Susanne und Tobias, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die freundliche Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.



# Lebenslauf

## Angaben zur Person:

Name: Athanasios Paschos  
Geburtstag: 6. Juli 1972  
Geburtsort: München  
Eltern: Charisios Paschos (Rentner)  
Panagiota Paschou, geb Boukou (Hausfrau)

## Ausbildung

1978-1984 Griechische Grundschule in München  
1984-1987 Griechisches Gymnasium in München  
1987-1990 Griechisches Lyzeum in München; Apolyterion  
1990-1991 Studienkolleg bei den wissenschaftlichen Hochschulen des Freistaates Bayern in München  
1991-1997 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München; Diplom  
1997-2002 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck

