

**ATP-getriebener Elektronentransfer bei der
enzymatischen Dehydratisierung von (*R*)-2-
Hydroxyglutaryl-CoA zu (*E*)-Glutaconyl-CoA
in Clostridien**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Marcus Hans

aus Koblenz

Marburg/Lahn 2000

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

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Zweitgutachter: Prof. Dr. R.K. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung am _____

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Deckblatt	i
Fachbereichserklärung	ii
Inhaltsverzeichnis	iii-vii
Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	2-3
Einleitung	4-26
1. Anaerober Glutamatabbau	4
2. Eisen-Schwefel-Cluster und Flavine in Proteinen	8
2.1 EPR- und Mössbauer-Spektroskopie an Eisen-Schwefel-Proteinen	13
2.1.1 Grundlagen der EPR-Spektroskopie	13
2.1.2 Grundlagen der Mössbauer-Spektroskopie	16
3. (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	18
4. Zum Mechanismus der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	21
5. Zielsetzung der Arbeit	26
Material und Methoden	27-53
1. Verwendetes Material	27
1.1 Chemikalien und Biochemikalien	27
1.2 Gase	27
1.3 Säulenmaterialien und Geräte	27
1.4 Bakterien	29
1.4.1 <i>Acidaminococcus fermentans</i>	29
1.4.2 <i>Clostridium symbiosum</i> HB25	30
1.4.3 <i>Escherichia coli</i> XL1-blue MRF ^c	31
1.4.4 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	31
1.5 Plasmide	31
2. Molekularbiologische Methoden	32
2.1 Verwendete Puffer	32
2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	32
2.3 Restriktion von DNA	32
2.4 Reinigung der DNA-Fragmente	33
2.5 Ligation von DNA	33

2.6	Plasmid-Minipräparation	33
2.6.1	Midipräparation von Plasmid-DNA	34
2.6.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA	34
2.7	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektrotransformation	34
2.8	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	35
2.9	Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion	35
2.10	Primer-Extension-Experiment zur Bestimmung des Transkriptionsstartes	35
2.11	Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA mit IRD-markierten Primern	36
2.12	Herstellung eines Polyacrylamid-Sequenzgels und Elektrophorese	37
2.13	Verarbeitung von DNA-Sequenzdaten	37
2.14	Präparation genomischer DNA aus <i>A. fermentans</i> und <i>C. symbiosum</i>	37
2.15	Präparation genomischer RNA aus <i>C. symbiosum</i>	38
3.	Biochemische Methoden	39
3.1	Reinigung der Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus <i>A. fermentans</i> und <i>C. symbiosum</i>	39
3.2	Test der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	40
3.3	Synthese von rekombinanter Komponente A aus <i>A. fermentans</i> für den Aktivitätstest	41
3.4	Synthese und Reinigung von rekombinanter Komponente A aus <i>A. fermentans</i>	42
3.5	Reinigung des Flavodoxins aus <i>A. fermentans</i>	42
3.6	Proteinbestimmung	43
3.6.1	Proteinbestimmung mit dem Pierce-BCA-Macro-Assay	43
3.6.2	Proteinbestimmung mit dem Bradford-Test	44
3.7	Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen	44
3.8	Bestimmung von säurelabilem Schwefel	45
3.9	Iodometrische Bestimmung der Sulfidkonzentration	45
3.10	Bestimmung von Flavinen	46
3.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.12	Synthese von Acetyl-CoA	48
3.13	Synthese von 2-Hydroxyglutaryl-CoA und (<i>E</i>)-Glutaconyl-CoA	48
3.14	Bestimmung der Konzentration von CoA-Estern mit gekoppeltem DTNB-Assay	48

3.15	Bestimmung der ATPase-Aktivität der Komponente A	49
3.16	Chelatisierungsexperimente mit Bathophenanthrolin-Disulfonat	50
3.17	Redox-titrations des Flavodoxins zur Bestimmung der Mittelpunkt- potentiale	51
3.18	Herstellung definierter Redoxzustände der Komponente A und des Flavodoxins	52
3.19	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	53
	Ergebnisse	54-120
1.	Klonierung und Sequenzierung der Gene der (<i>R</i>)-2-Hydroxyglutaryl-CoA- Dehydratase aus <i>C. symbiosum</i>	54
1.1	Analyse von HgdC aus <i>C. symbiosum</i>	61
1.2	Analyse von HgdA aus <i>C. symbiosum</i>	62
1.3	Analyse von HgdB aus <i>C. symbiosum</i>	63
2.	Optimierung der Reinigungsmethoden der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i> und <i>A. fermentans</i>	65
3.	Eigenschaften der Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydra- tase aus <i>C. symbiosum</i> sowie Charakterisierung der prosthetischen Gruppe	67
3.1	UV-vis-Spektrum der nativen Komponente D aus <i>C. symbiosum</i>	67
3.2	Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster der Komponente D aus <i>C. symbiosum</i> mit EPR- und Mössbauer-Spektroskopie	69
4.	Eigenschaften der Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA- Dehydratase aus <i>A. fermentans</i> sowie Charakterisierung der prosthetischen Gruppen	74
4.1	UV-vis-Spektrum der nativen Komponente D aus <i>A. fermentans</i>	74
4.2	Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster der Komponente D aus <i>A. fermentans</i> mit EPR- und Mössbauer-Spektroskopie	75
4.3	Resistenz der prosthetischen Gruppen der Komponente D aus <i>A. fermentans</i> gegen Veränderung des Oxidationszustandes	78
5.	Klonierung und Expression der Gene <i>hgdAB</i> der 2-Hydroxyglutaryl-CoA- Dehydratase aus <i>A. fermentans</i> in <i>E. coli</i>	78
5.1	Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Komponente D aus <i>E. coli</i>	79
6.	Reinigung und Stabilisierung der rekombinanten Komponente A der	81

2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus <i>A. fermentans</i> mit StrepTactin-Affinitätschromatographie	
7. Charakterisierung des Eisen-Schwefel-Clusters der rekombinanten Komponente A aus <i>A. fermentans</i>	83
8. Analyse der Sauerstoff-Empfindlichkeit der Komponenten der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus <i>A. fermentans</i>	89
9. Untersuchungen zur Konformation der Komponente A: Effekte der Nukleotidbindung und des Redoxzustandes des [4Fe-4S] ⁺ Clusters	95
9.1 Chelatisierungsexperimente mit Bathophenanthrolin-Disulfonat	95
9.2 ATPase-Studien an reduzierter und oxidiertter Komponente A	96
10. Reinigung und Charakterisierung eines 16 kDa-Flavodoxins aus <i>A. fermentans</i> : ein natürlicher Elektronendonator der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	97
11. <i>In vitro</i> -Elektronentransfer von Flavodoxin-Hydrochinon auf oxidierte Komponente A in Gegenwart von ADP	99
12. Redox titration des Flavodoxins	102
13. Erzeugung eines superreduzierten [4Fe-4S] ⁰ Clusters in rekombinanter Komponente A aus <i>A. fermentans</i>	104
14. Kristallisation der rekombinanten Komponente A aus <i>A. fermentans</i> und Auflösung der dreidimensionalen Struktur	109
15. Kombinierte EPR- und Mössbauer-spektroskopischen Untersuchungen zur Interaktion zwischen den Komponenten A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus <i>A. fermentans</i>	113
Diskussion	121-136
1. Die Gene <i>hgdCAB</i> der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus <i>C. symbiosum</i>	121
2. Vergleich der Komponenten D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratasen aus <i>A. fermentans</i> und <i>C. symbiosum</i>	122
3. Produktion aktiver rekombinanter Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus <i>A. fermentans</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	124
4. Reinigung der rekombinanten Komponente A mit StrepTag-Affinitätschromatographie sowie Charakterisierung der prosthetischen Gruppen	125
5. Sauerstoffinaktivierung der Komponenten A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	126

6.	Reinigung und Charakterisierung des 16 kDa-Flavodoxins, einem natürlichen Elektronendonator des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Systems aus <i>A. fermentans</i>	128
7.	Der Einfluss der Nukleotidbindung und des Redoxzustandes des [4Fe-4S] ⁺²⁺ Clusters auf die Konformation der rekombinanten Komponente A	130
8.	Die superreduzierte rekombinante Komponente A aus <i>A. fermentans</i> enthält einen [4Fe-4S] ⁰ Cluster.	131
9.	Die Struktur der rekombinanten Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	132
10.	Zur Funktion der reduzierten Komponente A: ATP-getriebener Elektronentransfer zur Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase	135
	Literatur	137-148
	Erklärung	149
	Danksagung	150

Abkürzungsverzeichnis

dNTP	2'-Desoxynukleosid-(Adenosin, Guanosin, Thymidin, Cytosin)- 5'-triphosphat
DTNB	5, 5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

Zusammenfassung

Die zur Gattung der Clostridien gehörenden Bakterien *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum* fermentieren Glutamat über den Hydroxyglutaratweg zu den Produkten Acetat, Butyrat, Ammonium, Kohlendioxid und molekularen Wasserstoff. Das intermediär entstehende (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA wird zu (*E*)-Glutaconyl-CoA dehydratisiert. Obwohl die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase [4Fe-4S]Cluster und Flavine enthält, katalysiert sie keine Redoxreaktion. Diese Dehydratisierung ist von großem mechanistischem Interesse, da ein nicht azides Proton ($pK_S > 30$) am C-3 des 2-Hydroxyglutaryl-CoA abstrahiert werden muß. In der vorliegenden Arbeit wurden biochemische, molekularbiologische sowie spektroskopische Studien zur Untersuchung dieses Katalysemechanismus durchgeführt, in dem Ketylradikalanionen die zentrale Rolle spielen sollen.

Die Gene *hgdCAB* der Komponenten A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* wurden kloniert und sequenziert. Sie bilden eine eigene Transkriptionseinheit, während im Hydroxyglutaratoperon aus *A. fermentans* noch drei andere Gene von Enzymen des Fermentationsweges dazugehören. Die Komponente A aus *A. fermentans* wurde in *E. coli* überproduziert und mit StrepTag-Affinitätschromatographie gereinigt. Durch Zugabe von 1 mM ATP und 10 mM MgCl₂ konnte das Enzym stabilisiert und kristallisiert werden. Kombinierte Auswertungen der biochemischen, spektroskopischen und strukturellen Daten identifizierten ein homodimeres Protein, dessen Untereinheiten über die Cysteine 127 und 166 durch einen [4Fe-4S]⁺Cluster verbrückt sind. Jede Untereinheit bindet ADP/ATP an eine für Zucker-Kinasen typische Bindestelle. Der [4Fe-4S]⁺Cluster zeigt aufgrund eines Elektronenspin-Grundzustandes von $S = 3/2$ ungewöhnliche spektroskopische Eigenschaften. Dieses Phänomen scheint allen verbrückenden [4Fe-4S]⁺Clustern gemein zu sein. ATPase- und Chelatisierungsexperimente belegten, daß die Bindung der Nukleotide und der Redoxzustand des [4Fe-4S]⁺Clusters einen Einfluß auf die Konformation des Proteins haben.

Für die Komponenten D aus *A. fermentans* und *C. symbiosum* wurden die Reinigungsmethoden optimiert sowie die prosthetischen Gruppen charakterisiert. Das Enzym aus *A. fermentans* enthält einen [4Fe-4S]²⁺Cluster und ein FMNH₂, während in Komponente D aus *C. symbiosum* zwei [4Fe-4S]²⁺Cluster und ein FMNH₂ gefunden wurden. Studien an äquimolaren Mischungen aus reduzierter Komponente A und aus Komponente D gaben starke Hinweise auf einen durch ATP-Hydrolyse getriebenen Elektronentransfer von Komponente A nach Komponente D. Während die Oxidation der Komponente A durch die ATPase-Aktivität

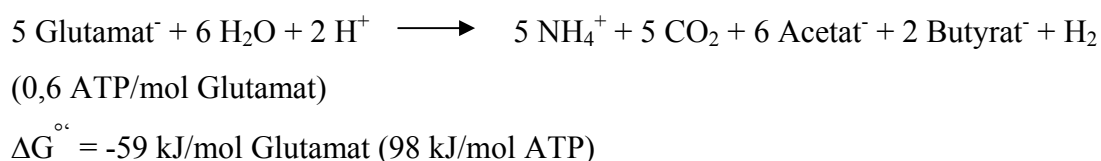
und durch charakteristische Mössbauer-Spektren nachgewiesen wurde, ist die Rolle der Komponente D als Akzeptor noch nicht belegt. Beide bisher identifizierten prosthetischen Gruppen, der $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster und das FMNH_2 , ändern ihren Redoxzustand in Anwesenheit von reduzierter Komponente A und ATP nicht. Es konnte jedoch ein EPR-Signal detektiert werden, das mit der Oxidation der Komponente A korrelierte. Dieses Signal zeigt untypische Parameter für reduzierte $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster, während sie gut zu einem d^1 -Metall-Spektrum passen. Somit wird ein Wolfram- oder Molybdän-Kofaktor als dritte prosthetische Gruppe der Komponente D vorgeschlagen.

Ein 16 kDa-Flavodoxin aus *A. fermentans* wurde als natürlicher Elektronendonator der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase identifiziert. Die vollreduzierte Hydrochinonform konnte das Reduktionsmittel Ti(III)citrat im Aktivitätstest ersetzen. UV-vis-spektroskopische Studien zeigten, daß Elektronen vom Flavodoxin-Hydrochinon zur oxidierten Komponente A übertragen werden. Zugabe von überschüssigem Ti(III)citrat zu Komponente A führt zur Superreduktion des Eisen-Schwefel-Clusters. Neben dem Fe-Protein der Nitrogenase ist dies erst das zweite biologische System, in dem ein $[4\text{Fe-4S}]^0$ Cluster detektiert werden konnte. Im Gegensatz zum Fe-Protein besitzt superreduzierte Komponente A jedoch keine katalytische Aktivität. Strukturelle, biochemische und spektroskopische Studien zeigten weitere große Ähnlichkeiten zu dem Fe-Protein der Nitrogenase, obwohl die Proteine nicht homolog sind. Im Gegensatz dazu finden sich in vielen anaeroben Bakterien und Archaea aus DNA-Sequenzen abgeleitete Proteine, die bis zu 40 % Identität zu Komponente A aufweisen. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß der in *A. fermentans* entdeckte ATP-getriebene Elektronentransfer ein allgemeines Prinzip darstellt, um chemisch schwierige Reduktionen zu katalysieren.

Einleitung

1. Anaerober Glutamatabbau

Clostridien sind eine sehr heterogene Gruppe von anaeroben Bakterien. Es sind sowohl sporenbildende als auch nicht-sporenbildende Vertreter dieser Gattung bekannt. Die phylogenetische Verwandtschaft der in dieser Gruppe zusammengefassten Spezies divergiert erheblich, somit erscheint eine Unterteilung in mindestens 19 Untergruppen erforderlich [1]. Diese Organismen besitzen die einzigartige Fähigkeit, Aminosäuren zur Energiekonservierung zu fermentieren. Jede der 20 vorhandenen proteinogenen Aminosäuren wird dabei über mindestens einen Abbauweg zu Ammonium, Kohlendioxid, kurzkettigen Fettsäuren sowie molekularem Wasserstoff umgesetzt. Die am besten untersuchte Aminosäure stellt Glutamat dar: hier sind mindestens vier verschiedene Fermentationswege bekannt. Die beiden wichtigsten Abbauwege verlaufen über 3-Methylaspartat oder 2-Hydroxyglutarat und führen zu identischen Produkten [2]:



Die Fermentation von Glutamat über 2-Hydroxyglutarat („Hydroxyglutaratweg“, Fig. 1) wird durch oxidative Desaminierung und anschließende Reduktion der 2-Ketogruppe initiiert. Nach Überführung in den entsprechenden 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Ester erfolgt eine Wasserabspaltung zu Glutaconyl-CoA [3] [4]. Diese Reaktion wird vom Schlüsselenzym des Abbauweges, der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase, katalysiert. Die nachfolgende Decarboxylierung des Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA ist mit dem Aufbau eines elektrochemischen Natriumionengradienten verbunden [5] [6]. Disproportionierung des Crotonyl-CoA führt zur Bildung von Acetat, Butyrat, molekularem Wasserstoff und ATP (Substratkettenphosphorylierung). Der Hydroxyglutaratweg wurde bislang ausschließlich in Clostridien und verwandten Bakterien nachgewiesen, welche in anaeroben Nischen des Menschen, anderen Säugern und der Vögel leben, so z. B. *Acidaminococcus fermentans*, *Clostridium symbiosum*, *Fusobacterium nucleatum* oder *Peptostreptococcus asaccharolyticus*.

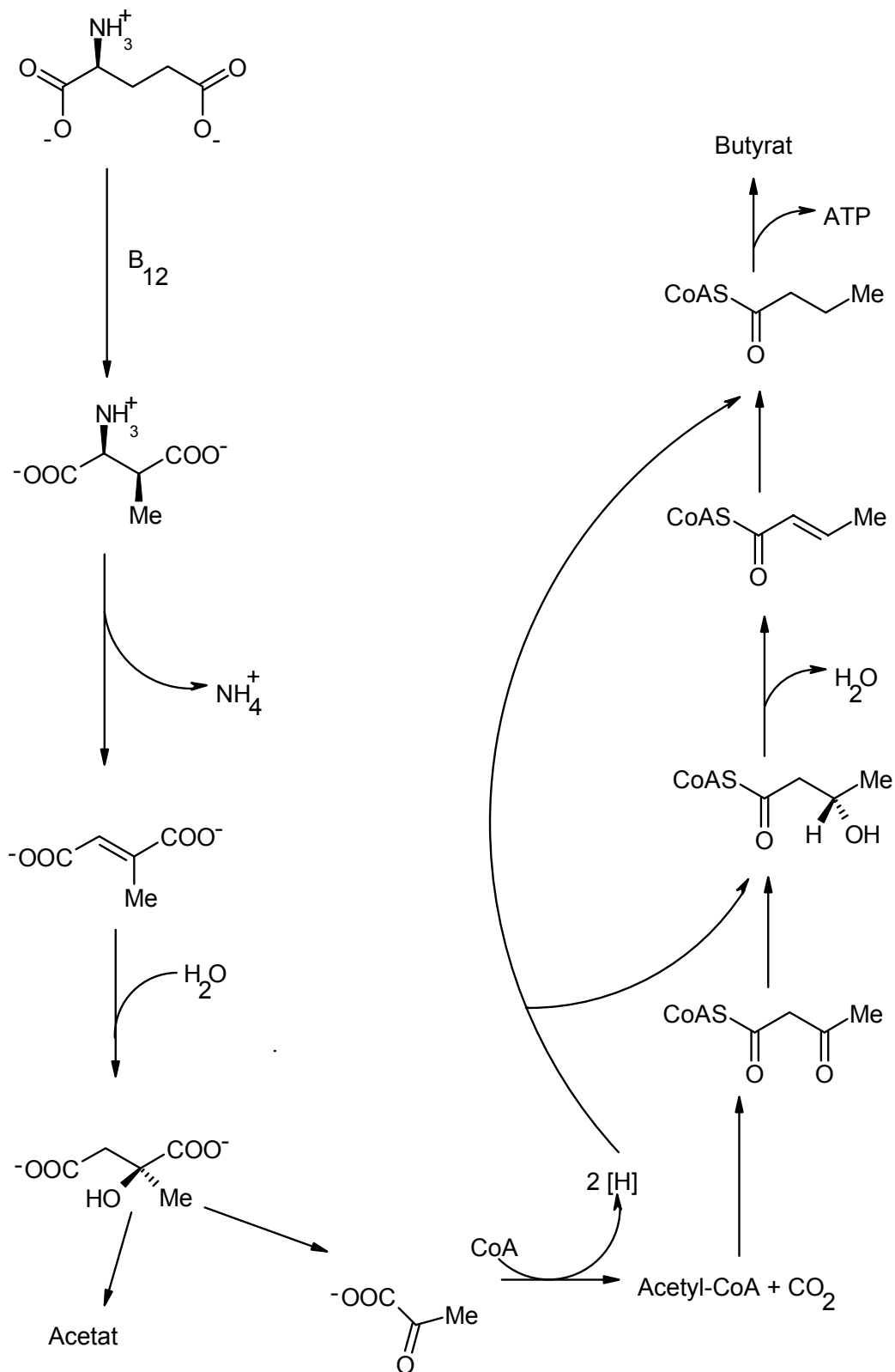
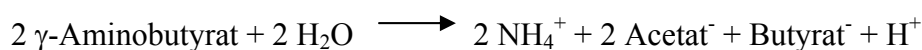


Fig. 2. Glutamat-Fermentation über den Methylaspartat-Weg

Der Methylaspartatweg (Fig. 2) stellt einen alternativen Glutamatfermentationsweg dar [7] [8] [9], der von im Boden lebenden Clostridien und verwandten Bakterien benutzt wird. Im ersten Schritt wird Glutamat mittels einer Coenzym B₁₂-abhängigen Mutase zu (2*S*, 3*S*)-3-Methylaspartat umgelagert. Diese Kohlenstoffgerüstumlagerung erleichtert die nachfolgende Ammoniumeliminierung, da das β-H nun aktiviert vorliegt. Der weitere Abbau erfolgt über Mesaconat, woraus nach Hydratation Citramalat entsteht. Letzteres wird analog zu Citrat durch eine Lyase zu Acetat und Pyruvat gespalten [10]. Ein weiterer bekannter Glutamatabbauweg benötigt zwei verschiedene Organismen und beinhaltet γ-Aminobutyrat als Zwischenstufe. Ein Organismus muß zur Decarboxylierung von Glutamat fähig sein, während ein anderer das entstandene γ-Aminobutyrat fermentiert.



(Glutamat Decarboxylase)



γ-Aminobutyrat wird von vielen Eukaryoten und Bakterien gebildet. In tierischen Organismen dient es als Neurotransmitter, während viele Bakterien diesen Stoff exkretieren. *Clostridium aminobutyricum* (Cluster XI) ist derzeit der einzig bekannte Organismus, welcher γ-Aminobutyrat fermentieren kann. Dabei wird das Substrat zuerst zum Succinatsemialdehyd desaminiert und anschließend NADH-abhängig reduziert, was zur Bildung von 4-Hydroxybutyrat führt [11]. Der weitere Abbau von 4-Hydroxybutyrat ist dem aus *Clostridium kluveri* sehr ähnlich [12] [13]. Der vierte Weg der Glutamatfermentation führt zu Propionat und ist in *Selenomonas acidaminophila* und *Barkera propionica* (Cluster IX) anzutreffen. Es ist davon auszugehen, daß dieser Abbauweg eine Kombination aus dem besprochenen Methylaspartatweg (Abbau von Glutamat zu Acetat und Pyruvat) und einer Disproportionierung von Pyruvat zu Propionat und zusätzlichem Acetat darstellt. Somit sollten zwei Coenzym B₁₂-abhängige Enzyme beteiligt sein, die Glutamat-Mutase und die Methylmalonyl-CoA-Mutase, 2 Mol ATP werden aus 3 Mol Glutamat konserviert.



$$\Delta G^\circ = -187 \text{ kJ/3 mol Glutamat (94 kJ/mol ATP)}$$

2. Eisen-Schwefel-Cluster und Flavine in Proteinen

Vor fast 40 Jahren begann für die Metalloproteinforschung mit der Entdeckung von Eisen-Schwefel-Clustern als prosthetische Gruppen von Proteinen eine neue Ära. Der bahnbrechende Fund von Helmut Beinert war die Zuordnung von EPR-Signalen zu den eisenhaltigen Proteinkomplexen der Atmungskette. Der Nachweis EPR-aktiver Spezies in Nicht-Häm-Eisen-Proteinen und die gleichzeitige Bestimmung von säurelabilem Schwefel ließ die Anwesenheit von Eisen-Schwefel-Clustern in diesen Enzymen als gesichert gelten. Heutzutage, fast 40 Jahre nach Beinerts Entdeckungen, stellen Eisen-Schwefel-Proteine unter den Metalloproteinen mit mehreren hundert bekannten Beispielen die größte und komplexeste Gruppe dar [14-19]. Zahlreiche hochaufgelöste dreidimensionale Strukturen von Eisen-Schwefel-Proteinen und Modellkomplexen sind mittlerweile verfügbar; gemeinsame Untersuchungen von Chemikern, Physikern und Mikrobiologen erlauben einen detaillierten Einblick in Struktur und Funktion der verschiedenen Eisen-Schwefel-Cluster. Derzeit werden vier verschiedene Clustertypen zu den Eisen-Schwefel-Clustern gezählt: Rubredoxin-artige, [2Fe-2S], [3Fe-4S] und [4Fe-4S] Cluster (Fig. 3).

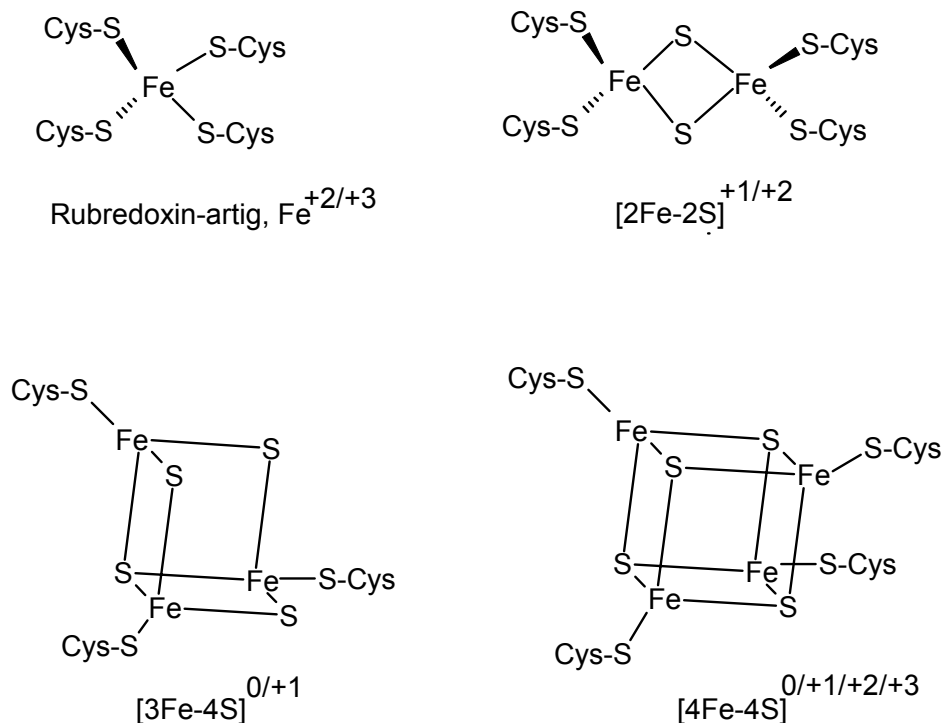


Fig. 3: Die vier verschiedenen Typen von Eisen-Schwefel-Clustern

Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß Rubredoxin-artige Eisenzentren keinen säurelabilen Schwefel enthalten, trotzdem werden sie zu den Eisen-Schwefel-Proteinen gezählt. Weiterhin existieren modifizierte Eisen-Schwefel-Cluster, die sich in ihrer Struktur von den oben aufgeführten Systemen unterscheiden; ein Beispiel sind die P-Cluster und der FeMoCo-Kofaktor der Nitrogenase [20] [21] [22]. Die sogenannten Rieske-Zentren sind [2Fe-2S]Cluster, die durch zwei Cysteine und zwei Histidine an das Protein gebunden sind [23]. Jeder Eisen-Schwefel-Cluster kann in verschiedenen Oxidationszuständen vorliegen. Mössbauer-spektroskopische Untersuchungen konnten zeigen, daß die Elektronen in diesen Clustern häufig delokalisiert sind, es ist also nur ein Mittelwert der einzelnen Eisen-Oxidationszuständen messbar [24] [18]. Die mit Abstand größte Gruppe von Eisen-Schwefel-Proteinen stellen die [4Fe-4S]Cluster enthaltenden Proteine dar. Diese einem verzerrten Cuban ähnelnden Strukturen können in 4 verschiedenen Redoxzuständen auftreten, wobei der am häufigsten anzutreffende Zustand $[4Fe-4S]^{2+}$ diamagnetisch ist (Elektronenspin = 0) und somit EPR-inaktiv ist.

Die verschiedenen Redoxzustände von [4Fe-4S]Clustern in Proteinen

<u>Clustertyp</u>	<u>Oxidationszustände des Eisens</u>	<u>Elektronenspin</u>
$[4Fe-4S]^{3+}$ (HIPIP)	3 Fe(III), 1 Fe(II)	S = 1/2
$[4Fe-4S]^{2+}$	2 Fe(III), 2 Fe(II)	S = 0 (diamagnetisch)
$[4Fe-4S]^{1+}$	1 Fe(III), 3 Fe(II)	S = 1/2, 3/2, 5/2, 7/2, 9/2
$[4Fe-4S]^0$ (All ferrous)	4 Fe(II)	S = 4

So unterschiedlich die Struktur und das Redoxverhalten der Eisen-Schwefel-Cluster sind, um so vielfältiger sind ihre in der Natur auftretenden Funktionen. Mit Abstand am häufigsten sind Einelektronentransfer-Reaktionen. Typische Beispiele sind [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]Cluster enthaltende Ferredoxine, bei denen es sich um kleine monomere oder dimere Proteine mit molekularen Massen zwischen 6 kDa und 15 kDa handelt [25]. Aber auch die Eisen-Schwefel-Systeme der an der Atmungskette beteiligten Komplexen I und II erfüllen elektronenübertragende Aufgaben. Weiterhin wurden Proteine identifiziert, in denen [4Fe-4S]Cluster als Lewis-Säure Substrate koordinieren. Beispiele dafür sind die Aconitasen des Citratzyklus [26]; aber auch für die L-Serin-Dehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* und für die Fumarase aus *Escherichia coli* wurde ein ähnlicher Mechanismus nachgewiesen [27-30]. All diesen [4Fe-4S]Clustern ist gemeinsam, daß nur drei

der vier Eisen-Atome durch Cystein koordiniert vorliegen. Das vierte Eisen-Atom, Fe a oder α -Eisen genannt, hat an der vierten Koordinationsstelle eine Hydroxylgruppe sitzen, welche beim Turnover protoniert wird. Das Substrat bindet daraufhin an die 5. und 6. Koordinationsstelle. Dieses α -Eisen fehlt im inaktiven Aconitase-Cluster, wodurch ein [3Fe-4S]Cluster entstanden ist. Interessant ist, daß der aktive [4Fe-4S]Cluster durch Zusatz von Fe(II) und Sulfid regenerierbar ist. Eisen-Schwefel-Cluster können auch regulatorische Funktionen ausüben. Ein sehr intensiv untersuchtes Beispiel ist der Sauerstoff-Sensor FNR aus *E. coli* (Fumarat Nitrat Reduktion) [31]. Dieser Transkriptionsfaktor steuert die Expression der Gene für den anaeroben Stoffwechsel fakultativ anaerober Organismen. Die aktive, einen [4Fe-4S]²⁺Cluster enthaltende Form wird von molekularem Sauerstoff zu einem inaktiven [2Fe-2S]²⁺Cluster umgewandelt. Auch dieser Übergang ist reversibel, *in vivo* wird die [2Fe-2S]-FNR-Form unter anaeroben Bedingungen wieder in die [4Fe-4S]-Form überführt [32]. Schließlich existieren Eisen-Schwefel-Proteine, bei denen die Funktion des Metallzentrums unklar ist; ein Beispiel ist die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase aus *Bacillus subtilis* [33] [34]. Obwohl dieses Enzym keine Redoxreaktion katalysiert, ist ein [4Fe-4S]²⁺Cluster für die Katalyse entscheidend. Derzeit wird dem Cluster eine strukturelle Bedeutung beigemessen.

Die Flavinforschung begann im Jahr 1933 mit der Isolierung des gelben Proteins Old Yellow Enzyme (OYE) aus *Saccharomyces cerevisiae* von Otto Warburg [124]. Zu diesem Zeitpunkt wußte man weder von der Existenz von Flavinen noch hatte man Anhaltspunkte über die Funktion von OYE. Ersteres hat sich zwar in den darauffolgenden Jahrzehnten grundlegend geändert, aber die Funktion von OYE ist paradoxerweise bis heute Gegenstand intensiver Diskussion. Flavoenzyme stellen heute eine sehr große Gruppe von Proteinen dar, welche sehr vielfältige Funktionen aufweisen [35]. Allen gemeinsam ist der Flavin-Kofaktor. Dieser besteht im Kern aus einem Isoalloxazinring, einem Pterinskelett mit angegliedertem Benzolring. Man unterscheidet zwei Flavin-Coenzyme, das Flavin-5'-monophosphat und das Flavin-5'-adeninucleotid (Fig. 4). Neuerdings wird auch die Rolle des Riboflavins selbst als Kofaktor diskutiert [36]. Der Flavin-Kofaktor ist hauptsächlich in Elektronentransferprozesse involviert, wobei die Proteinklasse der Flavodoxine die bekannteste und am ausführlichsten charakterisierte Gruppe darstellt [37] [38]. Flavodoxine erfüllen in der Zelle die gleichen Funktionen wie die schon besprochenen Ferredoxine. Sie enthalten FMN als prosthetische Gruppe und weisen mit 14 kDa-20 kDa eine etwas größere molekulare Masse auf. Flavoproteine können drei verschiedene Oxidationszustände

annehmen. Die Redoxpotentiale sind dabei sehr unterschiedlich, je nach Proteinumgebung und Funktionen reichen sie von +200 mV bis hin zu -550 mV [39]. Neben alleinigen Elektronentransfer-Prozessen sind Flavoproteine auch an anderen biologischen Reaktionen beteiligt. Zum Beispiel dienen Flavine oder Flavinderivate in der DNA-Photolyase und in Cryptochromen als „Energiefänger“, das Flavin wird durch Licht angeregt, diese Energie wird dann für chemische Reaktionen wie z. B. DNA-Reparatur oder Signaltransduktion eingesetzt [40, 41]. In Monooxygenasen binden Flavine molekularen Sauerstoff, wodurch ein Hydroperoxid als Intermediat entsteht [125]. Ein Sauerstoffatom wird nachfolgend auf das Substrat übertragen. Wahrscheinlich können Flavine in D-Aminosäure-Oxidasen die Aminogruppe elektrophil angreifen; durch Oxidation des Substrates entsteht eine Iminosäure, das Flavin wird gleichzeitig reduziert.

In den letzten Jahren wurden vermehrt Enzyme charakterisiert, in denen Flavine und Eisen-Schwefel-Cluster zusammen mit anderen Kofaktoren an der Katalyse beteiligt sind. Bekannte Beispiele sind die Flavocytochrome, in denen eine zusätzliche Hämgruppe vorhanden ist [42]. Eine andere Proteinklasse sind die Eisen-Schwefel-Flavoproteine, welche unter anderem deswegen für das 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Projekt von Bedeutung sind, weil die Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase, wie noch ausführlich beschrieben wird, ebenfalls Eisen-Schwefel-Cluster und ein Flavin beinhaltet. Bislang charakterisierte Enzyme wie die Trimethylamin-Dehydrogenase aus *Methylophilus methylotrophus* [43], Adenylylsulfat-Reduktase aus *Desulfovibrio vulgaris* [44] und manche Dehydroorotat-Dehydrogenasen z. B. aus *Bacillus subtilis* [45] katalysieren Redoxreaktionen; ein wahrscheinlicher Redoxmechanismus wird auch für die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase postuliert [46].

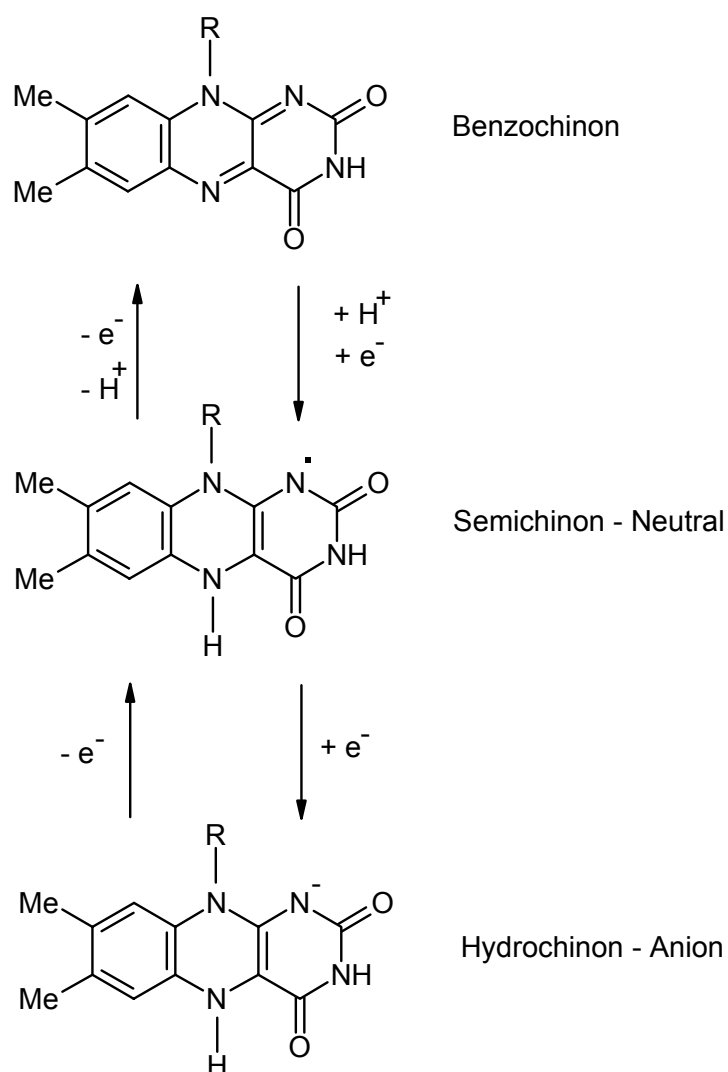
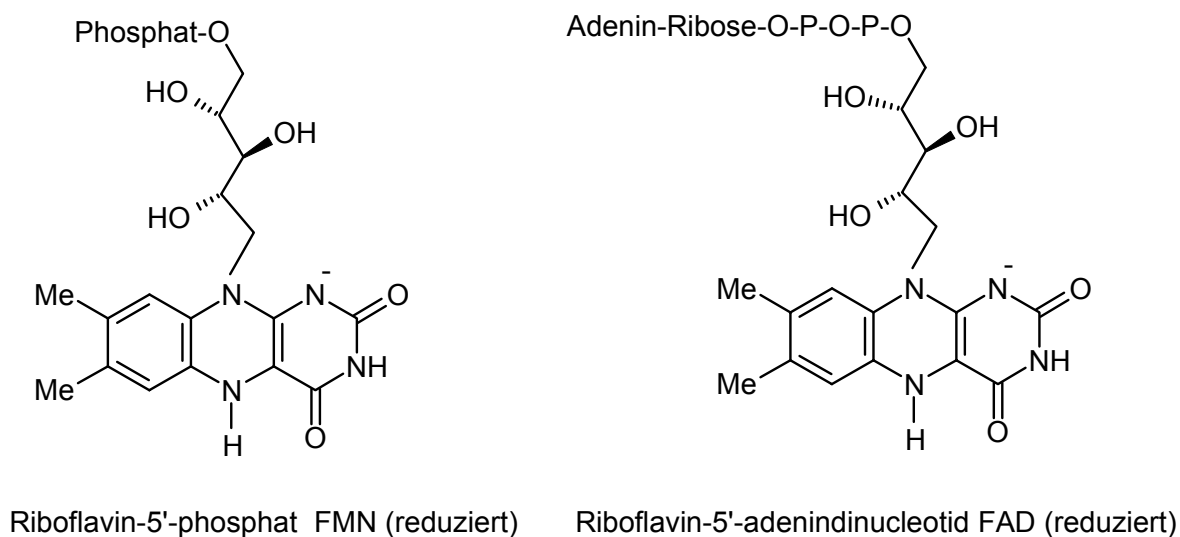


Fig. 4. FMN, FAD und die drei Redoxzustände der Flavine

2.1 EPR- und Mössbauer-Spektroskopie an Eisen-Schwefel-Proteinen

2.1.1 Grundlagen der EPR-Spektroskopie

Da jeder Eisen-Schwefel-Cluster-Typ paramagnetische Redoxzustände aufweist, eignet sich die EPR-Spektroskopie in idealer Weise zur Charakterisierung von Eisen-Schwefel-Proteinen [47] [19]. Bei Anwesenheit eines externen magnetischen Feldes B spaltet ein Paramagnet aufgrund des Zeeman-Effektes in zwei energetisch unterschiedliche Energieniveaus auf. In der klassischen Beschreibungsweise repräsentieren diese Energiezustände jeweils die parallele und die antiparallele Anordnung des Paramagneten-Spins zum magnetischen Feld. Elektromagnetische Strahlung kann nun eine Anregung des Paramagneten vom niedrigen zum hohen energetischen Zustand bewirken. Dies ist die Grundlage der Elektronen-Paramagnetischen-Resonanz-Methode. Hier wird die Interaktion mit elektromagnetischer Strahlung in einem sich verändernden magnetischen Feld von 0-1 Tesla bei konstanter Mikrowellenfrequenz untersucht. Aus gerätetechnischen Gründen werden die EPR-Spektren als 1. Ableitung des Absorptionsspektrums dargestellt. Weiterhin ist als X-Achse das magnetische Feld B , und nicht die Energie dargestellt. Integration führt somit zur Darstellung des Absorptionsspektrums, woraus sich die Spinkonzentration ermitteln läßt, wenn das Spektrometer mit einem bekannten Standard kalibriert wurde. Um Information aus einem EPR-Spektrum zu gewinnen, muß die Resonanz-Gleichung angewendet werden:

$$\Delta E = h\nu = g\mu_B B$$

ΔE ist die Energieaufspaltung der zwei Zeeman-Zustände, $h\nu$ steht für die Energie des eintreffenden Energiequantums, μ_B ist das Bohrsche Magneton, B das angelegte magnetische Feld. Der sogenannte g -Wert charakterisiert einen zu untersuchenden Paramagneten. Ein freies Elektron im Vakuum hat einen g -Wert von 2,0023, wohingegen Ionen, Moleküle oder Cluster aufgrund Spin-Bahn-Wechselwirkungen andere g -Werte besitzen. Diese g -Werte erlauben eine Identifizierung einer paramagnetischen Substanz durch Vergleich und theoretische Berechnung. Da die meisten paramagnetischen Substanzen keine Kugelsymmetrie besitzen, wird die Energie des Überganges in einem externen Feld durch die Orientierung beeinflusst. Wenn ein Paramagnet gemessen wird, dessen Orientierung zufällig ist (z. B. wenn eine Lösung eingefroren wurde), wird ein Spektrum mit Signalen erwartet, die allen möglichen Orientierungen entsprechen. Im Ableitungsspektrum wird dies durch drei

verschiedene g -Werte, g_x , g_y und g_z sichtbar, wobei jeder g -Wert einer Hauptachse der drei Dimensionen des Raumes entspricht. Somit lassen sich drei Fälle unterscheiden: Ein EPR-Spektrum mit unterschiedlichen g -Werten für alle drei Achsen wird als rhombisch bezeichnet. Sind die g -Werte für zwei der drei Achsen identisch, liegt ein axiales Spektrum vor. Systeme mit drei identischen g -Werten ergeben ein isotropes Signal. Welche Situation z. B. bei paramagnetischen Eisen-Schwefel-Proteinen vorliegt, ist sehr unterschiedlich und kann im voraus nicht bestimmt werden. Viele $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster mit $S = 1/2$ enthaltende Proteine zeigen rhombische Signale. Es existieren jedoch auch axiale Beispiele, wobei derzeit noch unklar ist, welche Faktoren zu Veränderungen z. B. des Grades der Rhombizität führen. Jeder paramagnetische Eisen-Schwefel-Cluster kann durch charakteristische g -Werte und Temperaturbereiche identifiziert werden.

Paramagnetischer Fe-S-Cluster

Typische g -Werte / Temperaturbereich

$[2\text{Fe-2S}]^+ S = 1/2$	1,89 ; 1,95 ; 2,05 bei $T < 100$ K
$[3\text{Fe-4S}]^+ S = 1/2$	1,97 ; 2,00 ; 2,02 bei $T < 20$ K
$[4\text{Fe-4S}]^+ S = 1/2$	1,88 ; 1,95 ; 2,05 bei $T < 20$ K

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde von zahlreichen Beispielen für $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster berichtet, deren EPR-spektroskopisches Verhalten nicht mit der oben aufgeführten Theorie interpretierbar war. Es stellte sich heraus, daß diese Cluster einen Elektronenspin-Grundzustand von $S > 1/2$ besaßen. Hier kann durch quantenmechanische Berechnungen aufgezeigt werden, daß $S > 1/2$ -Paramagneten auch in Abwesenheit eines magnetischen Feldes nicht-entartete Energiezustände besitzen. Dabei sind die Situationen in Spin-Halb-Integer oder Kramers-Systemen ($S = 3/2, 5/2, \dots$) zu denen der Spin-Integer oder Nicht-Kramers-Systemen ($S = 2, 3, \dots$) grundverschieden. In diesem Abschnitt soll nur die grundlegende Theorie des Kramers-Systems $S = 3/2$ diskutiert werden.

Kramers-Systeme besitzen in Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes ($S+1/2$) zweifach entartete Energiezustände, sogenannte Kramers-Dubletts. Ein externes Feld führt zur Aufhebung dieser Entartung; die Dubletts spalten auf. Im konkreten Fall eines $S = 3/2$ Kramers-Systems spalten also zwei zweifach entartete Dubletts im externen Feld auf. Aufspaltung der Kramers-Dubletts wird quantenmechanisch über den folgende Spin-Hamilton-Operator beschrieben:

$$H = \mathbf{S} \cdot \mathbf{D}' \cdot \mathbf{S} + \beta \mathbf{B} \cdot \mathbf{G} \cdot \mathbf{S} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Der erste Ausdruck steht für die Nullfeld-Wechselwirkung mit dem Tensor \mathbf{D}' und dem Spin-Vektor \mathbf{S} , der zweite Ausdruck stellt die Zeeman-Wechselwirkung mit dem \mathbf{g} -Tensor im angelegten Feld \mathbf{B} und dem Spin-Vektor \mathbf{S} dar, β ist das Bohrsche Magneton. Die Eigenwerte der Schrödingergleichung, welche diesen Spin-Hamilton-Operator, den Spin S und ihre jeweiligen Spin-Eigenfunktionen beinhalten, entsprechen den erlaubten Spin-Projektionen m_S , und definieren die Energie der Zustände für ein gegebenes magnetisches Feld, die Orientierung, sowie die Vektoren \mathbf{D}' und \mathbf{g} . Die entarteten Paare der $-m_S$ und $+m_S$ Spin-Eigenfunktionen bilden das Kramers-Dublett. Gleichung 1 kann nach Austausch von \mathbf{D}' durch die axialen und rhombischen Nullfeld-Parameter E und D in Gleichung 2 überführt werden.

$$H = D[S_Z^2 - S(S+1)/3] + E(S_X^2 - S_Y^2) + \beta \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Mit der Annahme, daß der Zeeman-Term eine Störung der Nullfeld-Wechselwirkung darstellt, spalten die ursprünglich entarteten $-m_S$ und $+m_S$ -Funktionen linear mit zunehmendem Magnetfeld auf. Ein EPR-Übergang findet statt, wenn die magnetfeld-induzierte Energieaufspaltung mit dem Mikrowellenquantum ($0,3 \text{ cm}^{-1}$) korreliert. Da die Dubletts, obwohl sie aufgespalten sind, verglichen mit dem Mikrowellen-Quantum energetisch voneinander hinreichend separiert sind, setzt sich das EPR-Spektrum aus einer Summe von Subspektren der Intra-Dublett-Übergänge zusammen. In einer schwachen Feld-Begrenzung stellt sich die Suche nach einem Feld B , welches Energie-Aufspaltungen $h\nu$ bei gegebenem D , E und \mathbf{g} -Tensor produziert, als relativ einfach dar. Der effektive g -Wert, der sich aus Feld B und der Mikrowellenfrequenz berechnet, ist vom D -Parameter und der Mikrowellenfrequenz bei gegebenem \mathbf{g} -Tensor und E/D unabhängig. Im Falle eines isotropen \mathbf{g} -Tensors und vernachlässigbarer Spin-Bahn-Kopplung ist das Verhältnis E/D der einzige verbleibende Parameter für einen Gesamtspin S und das Dublett $\pm m_S$. Der absolute Wert für dieses dimensionslose Verhältnis, E/D , die sogenannte Rhombizität, kann zwischen 0 und $1/3$ variieren. Effektive g -Werte als Funktion der Rhombizität wurden für die Dubletts für $S = 3/2$ berechnet. Einfach verwendbare Darstellungen dieser Berechnungen sind die sogenannten Rhombogramme, in welchen die g -Werte als Funktion der Rhombizität aufgeführt sind. Ein generelles Problem ist jedoch, daß manche theoretisch detektierbaren g -Werte im experimentellen Spektrum nicht sichtbar sind; meist handelt es sich um die g -Werte bei hohem Feld. Dies hängt mit den großen Linienbreiten der Signale zusammen; häufig betragen sie mehrere 1000 Gauss, wodurch die Amplituden zu klein werden. Empirisch konnte belegt

werden, daß sich die spektrale Linienbreite umgekehrt proportional zum Quadrat des g -Wertes verhält. Deshalb sind meist nur Niedrigfeld- g -Werte detektierbar.

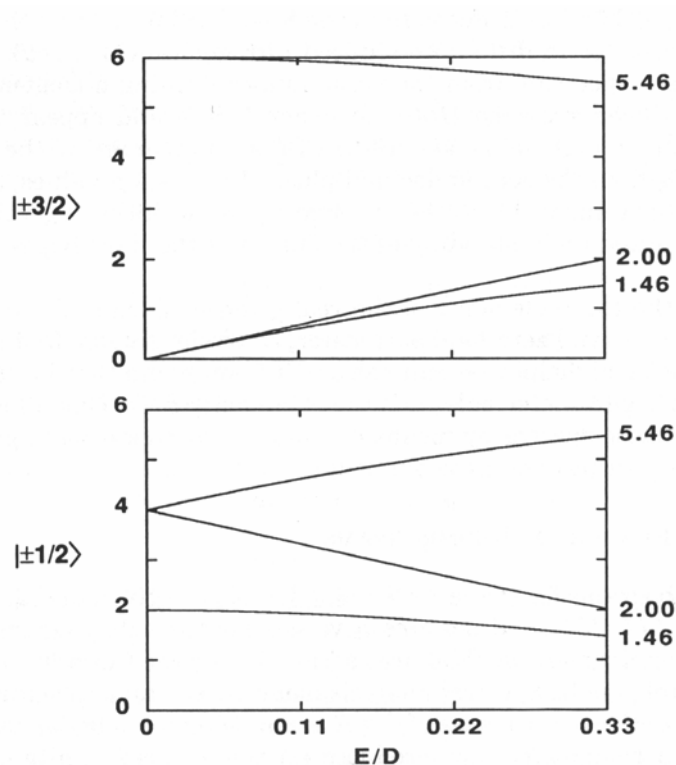


Fig. 5. Rhombogramm für den Elektronenspin-Grundzustand $S = 3/2$. Dargestellt sind die Abhängigkeiten der g -Werte von der Rhombizität E/D .

2.1.2 Grundlagen der Mössbauer-Spektroskopie

Die Mössbauer-Spektroskopie hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten als eine wichtige ergänzende Methode zur EPR-Spektroskopie zur Untersuchung von Eisen-Schwefel-Clustern entwickelt [24] [48]. Mössbauer-Spektroskopie kann außer an Fe-Atomen auch an bestimmten Isotopen des Goldes (Au), Zinns (Sn) sowie anderen Elementen durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird aber ausschließlich das Eisen besprochen. Entscheidend bei dieser Spektroskopie ist der sogenannte Mössbauer-Effekt, welcher auch als rückstoßfreie Emission bezeichnet wird. Als Strahlenquelle wird ^{57}Co verwendet. Dieses

Isotop zerfällt langsam ($t_{1/2} = 270$ Tage) in einen angeregten Zustand des ^{57}Fe , der beim Übergang zum Grundzustand ein γ -Quant emittiert. Wenn dieses Photon in einem anderen Teil des Spektrometers auf einen ^{57}Fe -Kern im Grundzustand trifft, wird es absorbiert, sonst nicht. Die Schärfe dieser Resonanz hat mehrere Gründe: zum einen ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes so lang, daß seine Energie ausreichend genau definiert ist. Entscheidender ist jedoch ein anderer Effekt: Bei Emission eines γ -Quants erleidet der ^{57}Fe -Kern einen Rückstoß, der ihm eine Geschwindigkeit von etwa 100 m/s verleiht. Aufgrund der Doppler-Verbreiterung würde daraus eine hohe Frequenzverschiebung resultieren, die zu einer hohen Energieunschärfe führen würde. Im Mössbauer-Experiment erfolgt die Emission jedoch praktisch rückstoßfrei. Dies wird durch Einbettung des ^{57}Co -Metalls in ein Kristallgitter realisiert. Die durch den Rückstoßimpuls freiwerdende Energie wird durch das Kristallgitter aufgenommen. Das führt zu einer extrem kleinen Rückstoßgeschwindigkeit und somit zu einer sehr kleinen Doppler-Verbreiterung. Die Emission kann also praktisch als rückstoßfrei bezeichnet werden.

Im Mössbauer-Experiment wird die Strahlenquelle auf eine bewegliche Apparatur montiert und mit einer veränderbaren Frequenz bewegt. Die Energie des von der Quelle emittierten Photons läßt sich mit Hilfe des Doppler-Effektes kontrollieren. Veränderungen der Frequenz resultieren in einer veränderten Energie des Photons. Oft kann schon eine geringe Geschwindigkeit von wenigen mm/s zur Absorption führen. Zwei Parameter des Mössbauer-Spektrums geben Informationen über den Eisen-Kern preis: Die Isomerieverschiebung δ und die Quadrupolaufspaltung ΔE_Q (Fig. 6). Die Isomerieverschiebung beruht auf unterschiedlichen Kernradien von Grundzustand und angeregtem Zustand. Da der Beitrag der s-Orbitale zur Elektronendichte in der unmittelbaren Umgebung des Kerns in diesen Parameter einfließt, ist er ein direktes Maß für den Oxidationszustand des Fe-Atoms. Die Quadrupolaufspaltung beruht darauf, daß der angeregte ^{57}Fe -Kern im Gegensatz zum Grundzustand aufgrund eines veränderten Kernspins eine Quadrupolsymmetrie besitzt. Dies verändert die Energie des Kerns je nach Symmetrie der Umgebung. In einer oktaedrischen Umgebung hängt die Energie des Kerns nicht von der Orientierung ab, während dies bei axialer Symmetrie der Fall ist. Das Quadrupolmoment gibt also Auskunft über die Symmetrie der Elektronenverteilung in der Nähe des aktiven Kerns.

Zur Messung von Mössbauer-Spektren von Eisen-Schwefel-Proteinen muß eine Anreicherung mit ^{57}Fe vorgenommen werden. Dies kann durch Wachstum der Bakterien auf ^{57}Fe -haltigem Medium geschehen; alternativ kann das Eisen-Schwefel-Protein in Gegenwart von ^{57}Fe zurückgefaltet werden. Während im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich erstere Methode

angewandt wurde, ist die Rückfaltung für kleinere Proteine wie Ferredoxine beschrieben worden.

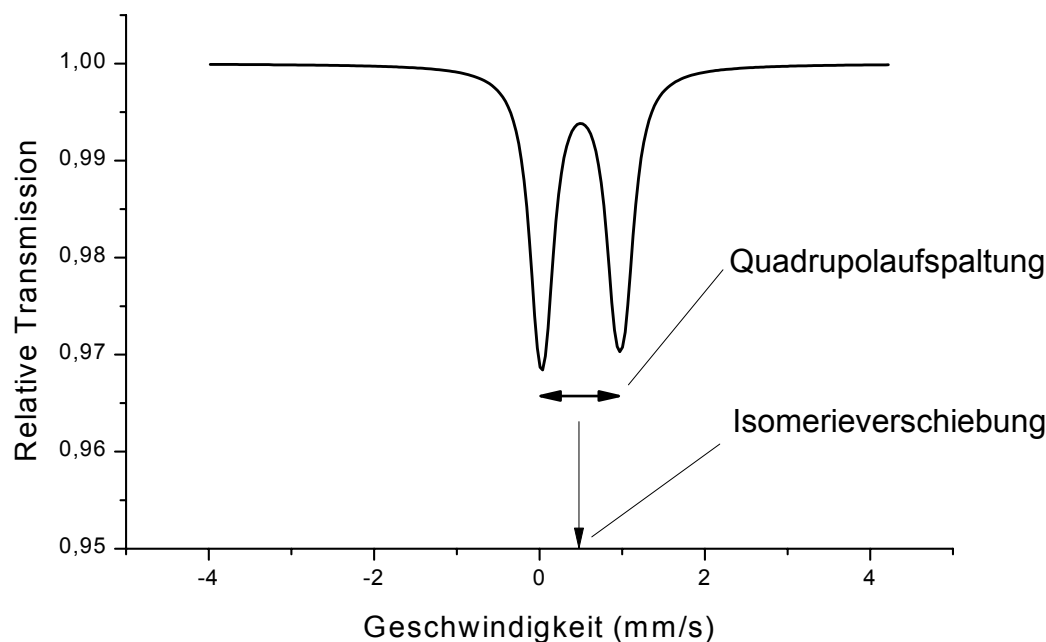
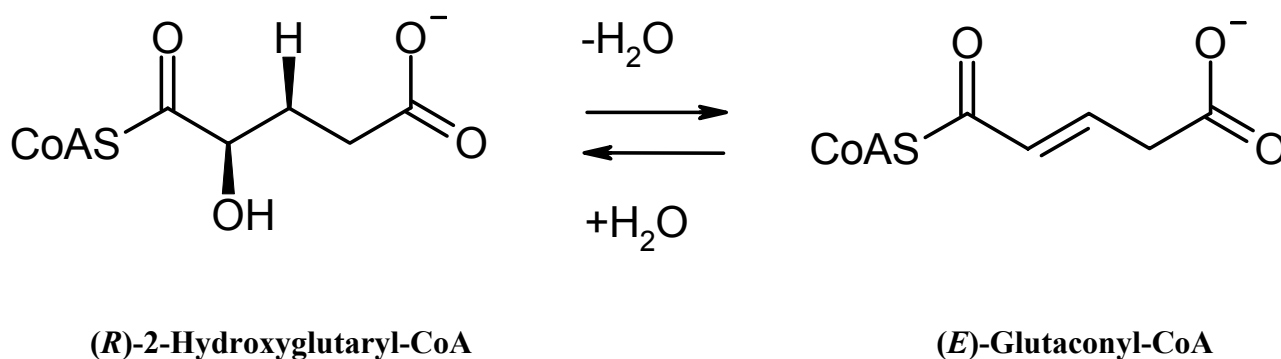


Fig. 6. Ein typisches Mössbauer-Spektrum mit den Parametern *Isomerieverschiebung* sowie *Quadrupolaufspaltung*.

Der große Vorteil der Mössbauer-Spektroskopie gegenüber der EPR-Spektroskopie besteht darin, daß prinzipiell alle Redoxzustände eines Mössbauer-Kerns detektierbar sind. Dadurch ist diese Methode gerade zur Detektion von Eisen-Schwefel-Enzymen von unschätzbarem Wert.

3. (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Das Enzym (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase ist das Schlüsselenzym des Hydroxyglutaratweges und katalysiert die reversible *syn*-Eliminierung von Wasser aus (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA zu (*E*)-Glutaconyl-CoA nach folgendem Schema:



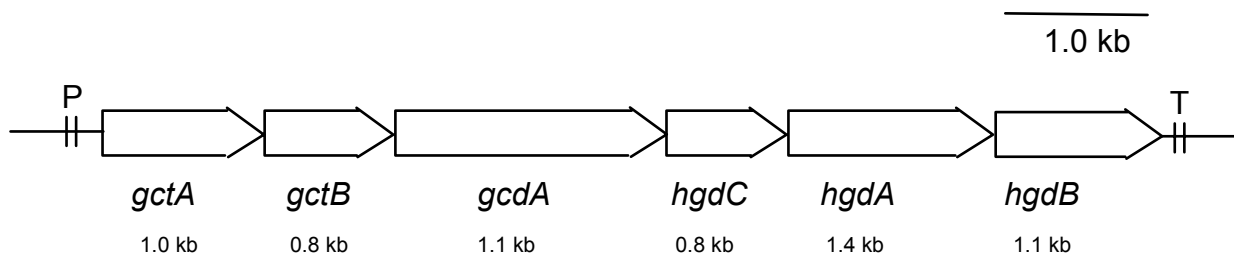
Diese Reaktion ist als chemisch schwierig anzusehen, da zur Wasserabspaltung ein am C-3 befindliches Proton abgespalten werden muß, dessen pK_S -Wert über 30 liegt [46]. Außerdem würde im Falle einer E2-ähnlichen Eliminierung eine am C-2 positive Partialladung entstehen, welche sich in direkter Nachbarstellung zum ebenfalls partial positiv geladenen Carbonylkohlenstoff befinden würde. Diese Nachbarstellung zweier positiver Ladungen ist ebenfalls als energetisch ungünstig zu betrachten. Weiter wäre für die Rückreaktion eine Addition des Wassers an C-3 des Glutaconyl-CoA zu erwarten; gefunden wurde jedoch ausschließlich das an C-2 substituierte Produkt. Es wurde ein Mechanismus für diese schwierige Wasserabspaltung postuliert, der über radikalische Zwischenstufen, sogenannte Ketyl-Radikalanionen läuft. Dieser Mechanismus umgeht die genannten Probleme dieser Reaktion, indem das Auftreten zweier positiver Partialladungen durch eine Umpolungsreaktion vermieden wird und die Acidität des C-3-Protons deutlich erhöht wird. Im nachfolgenden Kapitel wird der Ketylmechanismus ausführlich diskutiert.

2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase konnte bislang aus drei verschiedenen glutamatfermentierenden Organismen, *Acidaminococcus fermentans*, *Clostridium symbiosum* und *Fusobacterium nucleatum* nachgewiesen werden [36] [49] [50] [51] [52] [3]. Durch erste biochemische Untersuchungen wurde gezeigt, daß 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* und *C. symbiosum* aus 2 Proteinen besteht, den Komponenten A und D. Komponente D, welche das katalytisch aktive Protein darstellt, besitzt in beiden Organismen eine heterodimere Struktur mit sehr ähnlicher molekularer Masse ($\alpha\beta$, 96 kDa), während für die Komponente A aus *A. fermentans* homodimere Struktur (γ_2 , 54 kDa) angenommen wird. Kombinierte HPLC- und UV-vis-Experimente zeigten, daß Komponente D zu der Gruppe von Eisen-Schwefel-Flavoproteinen gehört. Mit chemischen Methoden konnten in den Heterodimeren aus *A. fermentans* ca. 4 Nicht-Häm-Eisen und 3 säurelabile Schwefel und aus

C. symbiosum ca. 8 Nicht-Häm-Eisen sowie 7 säurelabile Schwefel bestimmt werden, die für das Vorhandensein eines bzw. zweier [4Fe-4S]Cluster sprechen. Mittels EPR-Spektroskopie konnte bislang kein Nachweis dieses Clustertyps erbracht werden. Das mag am Redoxzustand der Cluster gelegen haben; der wahrscheinlichste [4Fe-4S]²⁺-Oxidationszustand ist diamagnetisch und somit EPR-inaktiv. Versuche zur Reduktion der Cluster zwecks Überführung in eine EPR-aktive Oxidationsstufe schlugen fehl. Es wurden lediglich EPR-Signale mit 5-10 % Spinkonzentration detektiert, welche von [3Fe-4S]⁺Clustern stammten. Diese Cluster sind jedoch höchstwahrscheinlich inaktivem Enzym zuzuschreiben. Aktive Komponente D könnte [4Fe-4S]Cluster beinhalten. Des weiteren beinhaltet Komponente D aus beiden Organismen 1 FMN/Dimer. Substöchiometrische Mengen Riboflavin (<0,3/Dimer) konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, daß Riboflavin physiologische Bedeutung besitzt, zumal die spezifische Aktivität des Enzyms nie mit der Riboflavinmenge korrelierte. Wahrscheinlich handelt es sich um unspezifisch gebundenes Riboflavin.

Über die Komponente A des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratasesystems liegen bislang nur wenig gesicherte Daten vor. Das Protein aus *A. fermentans* enthält 3 Nicht-Häm-Eisen/Dimer sowie 4 säurelabile Schwefel/Dimer. Somit kann die Existenz eines [4Fe-4S]Clusters angenommen werden. Aufgrund der extremen Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber vielen Chemikalien und Sauerstoff, welche sich in einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden unter aeroben Bedingungen ausdrückt, konnten weitergehende Untersuchungen bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht durchgeführt werden.

Bedingungen zur Stabilisierung der Komponente A sind nicht gefunden worden. Während die Gene des Dehydratasesystems aus *A. fermentans* vollständig kloniert und sequenziert wurden, sind aus *C. symbiosum* noch keine vollständigen Sequenzen bekannt. In *A. fermentans* existiert ein sogenanntes Hydroxyglutarat-Operon, in dem sich neben den drei am Dehydratasesystem beteiligten Genen *hgdC*, *hgdA* und *hgdB* die Gene der Glutaconat-CoA-Transferase *gctA* und *gctB* sowie das Gen der α -Untereinheit der membranständigen Glutaconyl-CoA-Decarboxylase *gcdA* befinden [53]. Ob in *C. symbiosum* ein ähnliches Operon existiert, ist bislang nicht bekannt.



2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Fusobacterium nucleatum* besteht im Gegensatz zu den Enzymen aus *A. fermentans* und *C. symbiosum* aus einem einzigen heterotrimeren Protein ($\alpha\beta\gamma$, 42+34+29 kDa). Chemische Bestimmungen von Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel von je 3,5 Mol/Trimer deuten ebenfalls auf einen [4Fe-4S]Cluster hin. EPR-Untersuchungen konnten dies nicht belegen. Es wurden jedoch Signale detektiert, die einem [3Fe-4S]⁺Cluster zugeordnet werden konnten; hierbei handelt es sich jedoch sehr wahrscheinlich um die Clusterspezies des inaktiven Enzyms. Flavinbestimmungen ergaben bis zu 0,5 Riboflavin/Trimer, aber kein FMN. Ob die Dehydratase wirklich Riboflavin als Kofaktor enthält, ist noch nicht eindeutig geklärt und muß durch weitergehende Experimente untersucht werden.

Zur Aktivierung des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Systems aus *A. fermentans* und *C. symbiosum* sind neben beiden Komponenten D+A weiterhin ATP, Mg²⁺-Ionen sowie ein starkes Reduktionsmittel (Ti(III)citrat oder Dithionit) notwendig. Es ist davon auszugehen, daß *in vivo* das Reduktionsmittel reduziertes Flavodoxin oder Ferredoxin darstellt. Während der Dehydratasereaktion werden nur substöchiometrische Mengen ATP zu ADP und P_i hydrolysiert. ATP kann dabei weder durch GTP noch durch ein nicht hydrolysierbares ATP-Analogon ersetzt werden. Die Aminosäuresequenz der Komponente A aus *A. fermentans* offenbart ein ATP-Bindemotiv ähnlich zu denen verschiedener Zucker-Kinasen. Eine schwache, aber signifikante ATPase-Aktivität wurde nachgewiesen.

4. Zum Mechanismus der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Der Ketylmechanismus: Dehydratisierung als Redoxreaktion

Die Wasserabspaltung von 2-Hydroxyglutaryl-CoA zu Glutaconyl-CoA stellt aus den bereits beschriebenen Gründen eine chemisch schwierige Reaktion dar. Da diese Reaktion

katalysierende Enzymsystem weist demgegenüber für Dehydratasen einzigartige Eigenschaften auf: zum einen enthalten beide Komponenten Eisen-Schwefel-Cluster. Komponente D besitzt zusätzlich ein FMN. Zum anderen ist die Aktivität des Enzyms von ATP sowie von Reduktionsäquivalenten abhängig. Dies läßt vermuten, daß die Katalyse über eine Redoxreaktion abläuft (Fig. 7) [46].

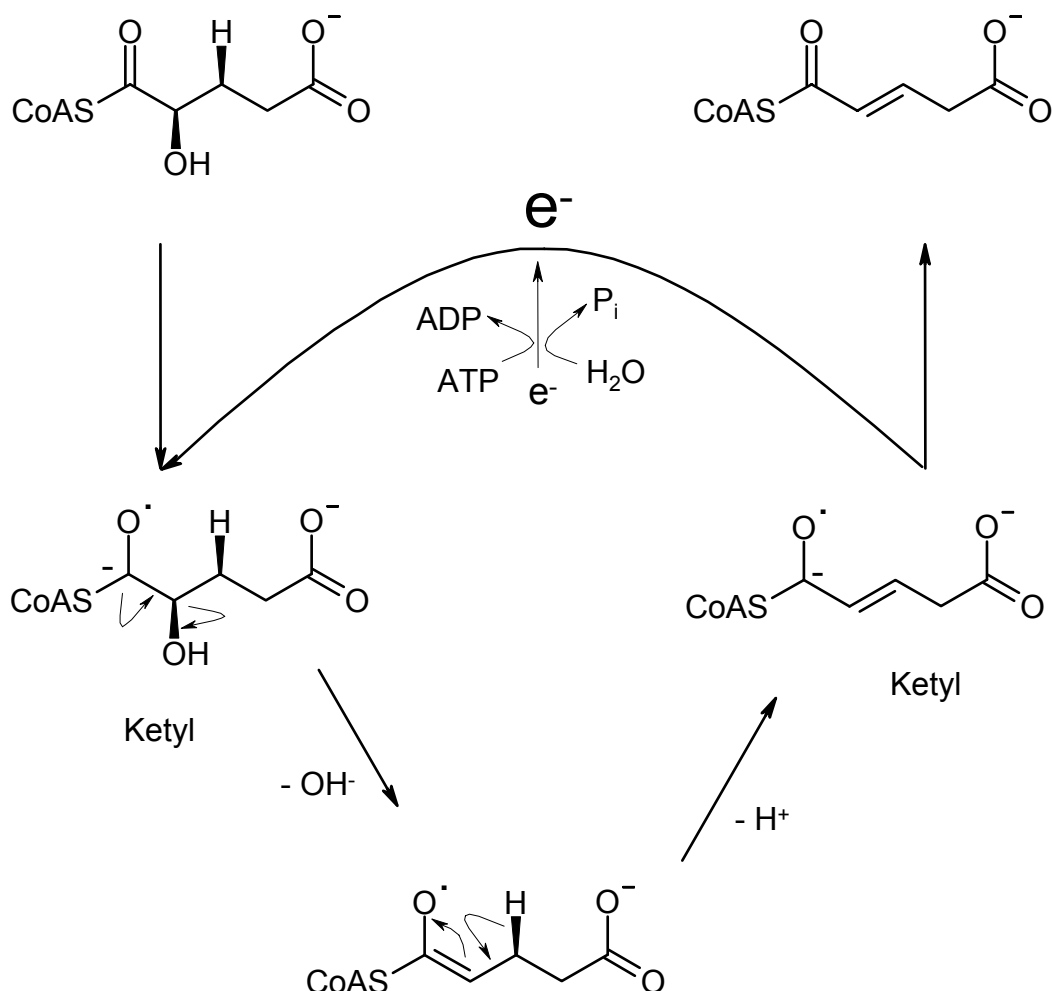


Fig. 7. Der postulierte Ketylmechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Der entscheidende Vorgang dieses postulierten Mechanismus ist eine Einelektronenreduktion der Thioestercarbonylgruppe des Substrates 2-Hydroxyglutaryl-CoA, wodurch ein Ketylradikalanion entsteht; durch diese Umpolungsreaktion ist der Carbonylkohlenstoff nun partial negativ geladen. Da jetzt das Problem zweier benachbarter Ladungen nicht mehr besteht, kann die Hydroxylgruppe an C-2 einfacher eliminiert werden. Im entstandenen

Enoxyradikal ist das Proton an C-3 durch Mesomerieeffekte bedeutend acider geworden und kann abstrahiert werden. Das daraus resultierende weitere Ketylradikalanion wird reoxidiert, wodurch das Produkt (*E*)-Glutaconyl-CoA entsteht. Nachdem das Enzym wieder reduziert vorliegt, kann das Reduktionsäquivalent für mehrere Turnover verwendet werden. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß nur substöchiometrische Mengen Reduktionsmittel zur Aktivierung notwendig sind. Diese Aktivierung scheint also lediglich ein einmaliger Vorgang zu sein; die weiteren Turnover kommen ohne Zusatz von Reduktionsäquivalenten und ATP-Hydrolyse aus.

Zur postulierten Rolle der Komponente A

Derzeit wird angenommen, daß Komponente A mittels ATP-Bindung und/oder Hydrolyse „Niedrig-Potential-Elektronen“ liefert, die dann in Komponente D für eine Reduktion des 2-Hydroxyglutaryl-CoA verwendet werden. Ein nach diesem Prinzip arbeitendes Enzym ist das Nitrogenase-Fe-Protein. Die Nitrogenase katalysiert die von 16 ATP getriebene Reduktion von einem molekularem Stickstoff zu zwei Ammonium sowie molekularem Wasserstoff. Zwar ist diese Reaktion mit H₂ als Reduktionsmittel exergon, aber aufgrund sehr hoher Aktivierungsenergien ist ATP unerlässlich. Zwei Proteine sind an der Katalyse beteiligt, das Fe-Protein und das MoFe-Protein [22] [54] [55] [56]. Ersteres überträgt unter ATP-Hydrolyse Elektronen auf letzteres. Das MoFe-Protein besitzt zwei einzigartige Metallcluster; einen sogenannten P-Cluster, der aus zwei cysteinverbrückten [4Fe-4S]Clustern besteht, sowie den MoFe-Kofaktor, in dem die Eisen-Atome trigonal pyramidal durch Schwefel koordiniert sind, ein Molybdän vorhanden ist und ein Homocitrat gebunden ist. Obwohl in den letzten zwei Jahrzehnten großer Aufwand betrieben wurde, die Nitrogenasereaktion zu verstehen, ist der Mechanismus nach wie vor nicht aufgeklärt. Sicher ist jedoch, daß die Reduktionsäquivalente über reduziertes Flavodoxin zum Nitrogenase Fe-Protein fließen. Von dort findet ein an ATP-Hydrolyse gekoppelter Elektronentransfer über das P-Cluster zum MoFe-Protein statt. Das Fe-Protein kann als ein ATP-abhängiger Redoxverstärker bezeichnet werden. Allein die Bindung von ATP setzt das Redoxpotential des [4Fe-4S]Clusters von -300 mV auf -430 mV herab [57-59]. Für Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wird eine ähnliche Funktion angenommen, da erste biochemische Studien, analog zum Fe-Protein, eine homodimere Struktur sowie ein die Untereinheiten verbrückenden [4Fe-4S]Cluster vermuten lassen.

Postulierte mechanistische Ähnlichkeit zwischen 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase und Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica*

In dem Bakterium *Thauera aromatica* kann der anaerobe Aromatenabbau nicht über Oxygenasereaktionen zur Ringspaltung durchgeführt werden. Statt dessen wird der Aromat nach Umwandlung und Aktivierung zum CoA-Ester der Benzoesäure in Cyclohexan-1,5-dien-1-carboxy-CoA überführt (Fig. 8) [60].

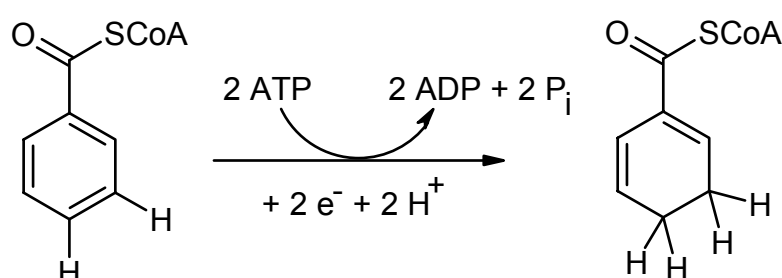


Fig. 8. Reduktion von Benzoyl-CoA zu Cyclohexan-1,5-dien-1-carboxy-CoA

Diese Reaktion wird von der Benzoyl-CoA-Reduktase katalysiert, wobei für diesen Zweielektronenübertragungsprozess zwei ATP zu ADP hydrolysiert werden; im Gegensatz zur 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase werden somit stöchiometrische Mengen an Elektronen und ATP aufgewendet [61-63]. Das Enzym liegt nativ als Heterotetramer ($\alpha\beta\gamma\delta$, 48, 45, 38 und 32 kDa) vor und enthält drei [4Fe-4S]Cluster, welche ein Redoxpotential von unter -500 mV aufweisen. Für die Benzoyl-CoA-Reduktase wurde ebenfalls ein Mechanismus postuliert, in dem ein Ketylradikalanion als Intermediat auftritt (Fig. 9).

Diese Annahme wird durch einen CoA-Ester als Substrat und einen [4Fe-4S]Cluster als gemeinsame prosthetische Gruppen gefestigt; bemerkenswert ist jedoch eine signifikante Sequenzidentität (30-40 % Identität) zwischen den Untereinheiten der Benzoyl-CoA-Reduktase und den Untereinheiten des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratasesystems. BcrB und BcrC sind zu den Untereinheiten HgdA und HgdB der Komponente D homolog, während BcrA und BcrD Sequenzidentitäten zu HgdC aufweisen [51] [50]. Zwei unterschiedliche Komponente A-homologe Untereinheiten könnten darauf hindeuten, daß zur Reduktion des

Benzoyl-CoA zwei Reduktionsäquivalente mit jeweils unterschiedlichem Redoxpotential übertragen werden müssen.

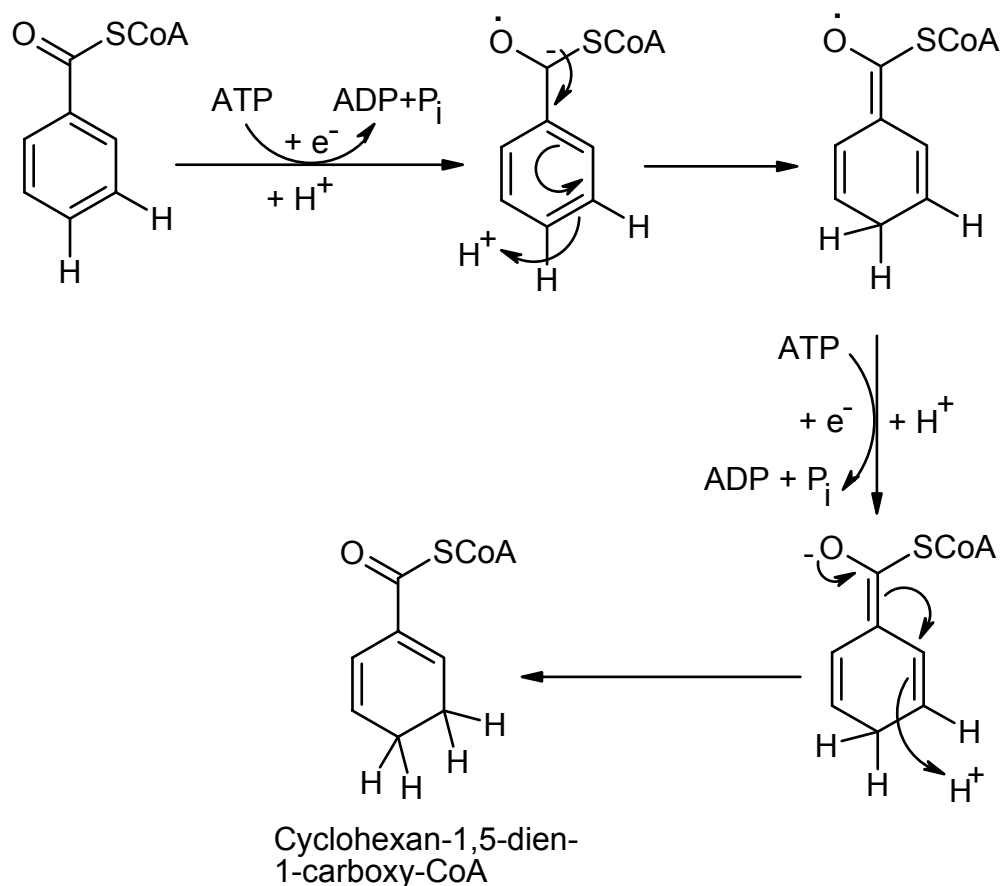


Fig. 9. Der postulierte Mechanismus der Benzoyl-CoA-Reduktase

Auch andere chemisch schwierige Reaktionen, an denen CoA-Ester beteiligt sind, könnten über vergleichbare Ketylmechanismen ablaufen. Beispiele hierfür sind die Dehydratisierung von Lactat und Phenyllactat durch die Lactyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium propionicum* [64, 65] bzw. die Phenyllactyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium sporogenes* [66] [67, 68]. Ketylen könnten auch bei der Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA eine Schlüsselrolle spielen, obwohl diese dort durch Oxidation erzeugt werden müssten [46]. Auch für Decarboxylasen, welche *para*-Hydroxyphenylacetat zu Kresol umsetzen, werden Ketylen als reaktive Intermediate diskutiert (Selmer, T. & Buckel, W., nicht veröffentlicht).

5. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Gene des (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Systems aus *Clostridium symbiosum* kloniert und sequenziert werden. Es soll untersucht werden, in wie weit die Aminosäuresequenzen zu denen aus *A. fermentans* Identitäten aufweisen, woraus Rückschlüsse auf die an der Kofaktorbindung beteiligten Aminosäurereste möglich sein sollten. Diese Arbeit soll zeigen, ob eine dem Hydroxyglutarat-Operon vergleichbare Anordnung der Gene vorliegt.

Des Weiteren soll die Reinigungsprozedur für Komponente D aus *A. fermentans* optimiert werden und eine Methode zur Isolation von Komponente A entwickelt werden. Mittels kombiniertem Einsatz von FPLC, HPLC sowie UV-vis, EPR- und Mössbauer-Spektroskopie sollen die prosthetischen Gruppen der Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Im Falle einer erfolgreichen Isolation der Enzyme sollen ergänzend Kristallisationsansätze durchgeführt werden, wobei als Fernziel die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur zu nennen ist.

Schließlich sollen spektroskopische Experimente am kompletten 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-System unter Turnover-Bedingungen zeigen, ob Interaktionen zwischen den Proteinen nachweisbar sind, Ladungsübertragungen zwischen den Kofaktoren sichtbar sind und ein Substratradikal als Intermediat entsteht. Dies würde einen Redoxmechanismus für die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase unterstützen.

Material und Methoden

1. Verwendetes Material

1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) bezogen. Die verwendeten Enzyme oder Coenzyme wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim) oder Biomol (Hamburg) geliefert. Der Molekularmassenstandard für SDS-PAGE stammte von Pharmacia (Freiburg). Für die Proteinbestimmung nach Bradford [69] wurde das Bradford-Reagenz von Bio-Rad-Laboratories (München) verwendet, die Proteinbestimmung nach Pierce wurde mit dem BCA-Kit von Pierce (Rockford, USA) durchgeführt.

Aus *Acidaminococcus fermentans* wurden von Frau Iris Schall die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase und die zum Dehydratase-Test benötigten Hilfsenzyme gereinigt [5] [70].

1.2 Gase

Stickstoff (99,996 %), Stickstoff-Wasserstoff-Gemisch (95 % N₂, 5 % H₂) und flüssigen Stickstoff lieferte Messer Griesheim (Düsseldorf).

1.3 Säulenmaterialien und Geräte

Die Säulenmaterialien DEAE-Sepharose Fast Flow, Phenyl-Sepharose Fast Flow, Superdex 200 High Performance sowie Q-Sepharose High Performance stammten von Pharmacia (Freiburg). Das Säulenmaterial Superose 12 lieferte Sigma (Deisenhofen). HPLC-Säulen wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. StrepTactin-Sepharose stammte von IBA GmbH (Göttingen).

Die Anaerobenzelte stammten von Coy Laboratories, Ann Arbor MI, USA; sie waren mit Formiergas befüllt. Die Enzymtests wurden anaerob mit Hilfe eines Ultrospec III - Photometers mit 6-fach- Kuvettenwechsler der Firma LKB (Freiburg) oder mit einem UV-vis Spektrophotometer UVIKON943 der Firma Kontron (Eching bei München) durchgeführt. Zur Reinigung der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Enzyme und des Flavodoxins wurde eine FPLC-Anlage von Pharmacia (Freiburg) verwendet. Die Ultrazentrifuge stammte von Beckman (München), die Kühlzentrifugen wurden von Sorvall (München) bezogen; die Analysen mittels HPLC wurden mit einem Gerät der Firma Sykam (Gilching) durchgeführt. Das EPR Spektrometer ESP300E cw stammte von Bruker, der Heliumflußkryostat ESR910 wurde von Oxford Instruments (Oxford, England) bezogen. Spin-Quantifizierungen wurden mit Doppelintegrationen der experimentellen Ableitungsspektren und Vergleich mit einem Cu(I)-Standard (1 mM in Wasser) durchgeführt. Spin-Hamilton-Simulationen der EPR-Spektren der $S = 3/2$ Signale wurden mit einem Programm berechnet, welches von Gaffney und Silverstone entwickelt wurde [71]. Die Simulationen der $S = 3/2$ -Spektren basierten auf der Spin-Hamilton-Gleichung für das elektronische Spin-Grundzustands-Multiplett:

$$H = D[S_z^2 - S(S+1)/3 + (E/D)(S_x^2 - S_y^2)] + \mu_B \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S}$$

Dabei ist S der Spin des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters ($3/2$); D und E/D sind die axialen und rhombischen Nullfeld-Parameter. Verteilungen von E/D wurden durch Summierungen einer bestimmten Anzahl von Pulverspektren berücksichtigt, welche mit bestimmten Werten dieser Parameter aufgenommen wurden. Zur Bestimmung der Verteilungen wurden mindestens 20 Spektren ausgewertet. Mössbauerspektren wurden mit Spektrometern des Typs mit konstanter Beschleunigung gemessen. Die Proben temperatur wurde mit Hilfe eines VARIOX oder eines SPECTROMAG Kryostates (Oxford Instruments GmbH) geregelt. Letzteres ist ein Magnetsystem mit supraleitender Spule für Felder bis 8T (senkrecht zum γ -Strahl) und Proben temperaturen im Bereich 1,5 - 250 K. Die Mössbauerquelle hat Raumtemperatur und befindet sich in einem 'Reentrant-Bore Tube' ca. 85 mm von der Probe entfernt im Spalt des Spulenpaares in einer Nullstelle des Feldes. Die minimale Linienbreite der Spektrometer ist ca. 24 mm/s. Isomerieverschiebungen werden relativ zu metallischem Eisen bei Raumtemperatur angegeben.

Alle Proben für die EPR- und Mössbauer-Spektroskopie wurden unter Ausschluß von molekularem Sauerstoff in den Anaerobenzelten angefertigt und dort mit flüssigem Stickstoff oder mit tiefgekühltem Ethanol eingefroren. Flüssiger Stickstoff wurde in fest verschlossenen Edelstahl-Thermoskannen möglichst schnell ins Anaerobenzelt eingeschleust und dort sofort geöffnet, um die Entstehung von Überdruck zu vermeiden. Das Einfrieren der EPR-Proben in den dafür vorgesehenen dünnen Quartzglas-Röhrchen erfolgte sehr langsam von unten nach oben, um ein Platzen des Glases zu verhindern. Die Proben wurden im eingefrorenen Zustand ausgeschleust und in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C bis zur Messung gelagert.

1.4. Bakterien

1.4.1 *Acidaminococcus fermentans*

Acidaminococcus fermentans ATCC 25085 wurde unter anaeroben Bedingungen in einem Medium folgender Zusammensetzung kultiviert:

pro L Medium

Natriumglutamat	0.1	M
Hefeextrakt	5	g
Natriumthioglykolat	1	g
Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 7)	10	ml
Biotin (2 mg/ml)	50	µl
Spurenelementelösung (SL10)	1	ml

Zusammensetzung der Spurenelementelösung SL10 [72]

HCl (25 %)	70	mM
FeCl ₂	7,5	mM
ZnCl ₂	0,5	mM
MnCl ₂	0,5	mM
H ₃ BO ₃	0,1	mM
CoCl ₂	0,7	mM
CuCl ₂	0,01	mM
NiCl ₂	0,1	mM
Na ₂ MoO ₄	0,15	mM

Vor dem Einschleusen des Mediums in ein Anaerobenzelt wurde in der Schleuse 15 min im Ölpumpenvakuum entgast. Das Reduktionsmittel Natriumthioglykolat wurde im Zelt zugesetzt. Serumflaschen (120 ml) wurden mit jeweils 50 mL Medium gefüllt, mit Gummistopfen verschlossen und autoklaviert. Für die Stammhaltung wurde das Medium mit 5 % Inokulum beimpft und 16 Stunden bei 16 °C inkubiert. Die Bakterien wurden alle 4 Wochen überimpft und die hochgewachsenen Kulturen bei 4 °C aufbewahrt.

Um große Zellmengen zu erhalten, wurde *Acidaminococcus fermentans* in einem 100 L-Fermenter gezüchtet. Dazu wurde das Kulturmedium schrittweise vergrößert. 2×2 L Medium wurden mit zwei 50 mL-Kulturen beimpft, welche als Inokulum für den 100 L-Fermenter dienten. Nach 16 Stunden Inkubation bei stetigem Rühren bei 37 °C wurden die Zellen mittels einer Durchflußzentrifuge (Heraeus Sepatech Contifuge 17 RS, Heraeus Christ, Osterode) anaerob geerntet. Die Ausbeute betrug 200-250 g Feuchtzellen. Die Zellen konnten anaerob unter N₂-Überdruck bei -80 °C gelagert werden.

1.4.2 *Clostridium symbiosum* HB 25

Clostridium symbiosum HB 25 wurde in dem gleichen Glutamatmedium wie für *A. fermentans* beschrieben gezüchtet. Bei der Großzucht im 100 L-Maßstab betrug die Ausbeute ca. 300-400 g Feuchtzellen. Diese wurden in 25 g-Portionen bei -80 °C unter N₂-Überdruck gelagert.

1.4.3 *Escherichia coli* XL1-blue MRF^c

Escherichia coli XL1-blue MRF^c ($\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F}^c \text{ proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15Tn10 (Tet}^r\text{)]$), (Stratagene, Heidelberg) wurde bei 30 °C oder 37 °C auf Standard I-Nährmedium kultiviert.

Flüssigmedium: Standard I-Nährmedium (25 g/L)

Agarplatten: Standard I-Nährmedium mit 1,5 % Agar

E. coli XL1-blue MRF^c wurde zur Klonierung der Gene der Komponenten A und D sowie zur rekombinanten Synthese der Komponente A aus *A. fermentans* verwendet.

1.4.4 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Escherichia coli BL21 (DE3) (B F⁻ ompT hsdS(_{r_B-m_B-}) dcm⁺ Tet^r gal (DE3) endA Hte), (Stratagene, Heidelberg) wurde bei 37 °C auf M9-Medium + Casaminsäuren kultiviert.

Flüssigmedium: M9-Medium + Casaminsäuren

Agarplatten: M9-Medium + Casaminsäuren

E. coli BL21 (DE3) wurde zur rekombinanten Synthese der Komponente D aus *A. fermentans* verwendet.

1.5 Plasmide

Zur Klonierung sowie Expression der Gene der Komponenten A + D des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratasesystems aus *A. fermentans* wurden folgende Plasmide verwendet:

- Plasmid pBluescript KS sowie KS (Stratagene, Heidelberg)
- Plasmid pQE70 (Qiagen, Hilden)
- Plasmid pASK-IBA3 (IBA GmbH, Göttingen)

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Verwendete Puffer

Lösung	Zusammensetzung
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0
TAE-Puffer (50×)	2 M Tris; 57,1 mL Eisessig; 50 mM EDTA
SSC-Puffer (20×)	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat/NaOH pH 7,0
Farbmarker für Agarosegele	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylen - Xyanol FF; 0,25 % Orange G in 40 % (w/v) Saccharose in Wasser

2.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten wurden Horizontalgele mit einer Agarose-Konzentration von 0,8 % (w/w) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Farbmarker versetzt und bei 100 V aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die Gele mit Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) angefärbt, mehrmals mit Wasser gewaschen und unter UV-Licht fotografiert.

2.3 Restriktion von DNA

Zur Restriktion der DNA wurden die von den Herstellern angegebenen Reaktionspuffer verwendet. Bezogen auf die Menge zu schneidender Restriktionsstellen wurden die Enzymaktivitäten in 2-4-fachem Überschuß eingesetzt. Die Inkubationsdauer bei 37 °C betrug 1-2 Stunden.

2.4 Reinigung der DNA-Fragmente

Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurden die im UV-Licht sichtbaren Banden im Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA in diesen Gelstücken wurde mit GeneClean III von Dianova (Hamburg) aufgereinigt und in 20 µL Wasser aufgenommen.

2.5 Ligation von DNA

10×Ligationspuffer (Boehringer)

660 mM Tris/HCl pH 7,5

50 mM MgCl₂

10 mM Dithiothreitol

10 mM ATP

Die Ligation der DNA erfolgte nach einem Protokoll der Firma Boehringer Mannheim. Die Ansätze wurden 12 Stunden bei 16 °C inkubiert.

2.6 Plasmid-Minipräparation

Lösungen:

SolA:	50 mM Glucose
	25 mM Tris/HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
SolB:	0,2 N NaOH
	1,0 % SDS
SolC	3 M Kaliumacetat/Essigsäure pH 4,8

Die Plasmid-Minipräparation wurde nach einem Protokoll von Birnboim & Doly [73] durchgeführt. Plasmidtragende Einzelkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in jeweils 2 mL Standard I-Medium mit entsprechenden Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Jeweils 1 mL der Kulturen wurde bei 12000×g 3 min abzentrifugiert. Das

Bakterienpellet wurde in 100 μL SolA resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 μL frisch angesetzttem SolB wurde der Ansatz vorsichtig umgeschwenkt und 5 min auf Eis gestellt. Daraufhin wurden 150 μL eiskaltes SolC zugesetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde 30 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 300 μl Isopropanol versetzt. Nach gutem Durchmischen wurde 30 min bei 12000 \times g, 4 °C zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen, zum Trocknen 15 min bei 37 °C inkubiert und in 20 μL TE-Puffer +DNase-freie RNase (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aufgenommen.

2.6.1 Midipräparation von Plasmid-DNA

Eine Übernachtskultur (25 ml) der plasmidtragenden *E. coli*-Stämme wurde zentrifugiert; die DNA wurde mit einem Plasmid-Reinigungs-Kit (Qiagen, Düsseldorf) isoliert.

2.6.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA

Zur Bestimmung der Konzentration von doppelsträngiger DNA [74] in Lösung wurde die Extinktion im Photometer (LKB Ultrospec III, Pharmacia Freiburg) bei 260 nm in einer Quarz-Mikroküvette gemessen. Dabei wurde angenommen, daß die Extinktion $\Delta E = 1,0$ dem Gehalt doppelsträngiger DNA von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entspricht.

2.7 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektrotransformation

Standard I-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurde mit 1 % einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,5-0,8 wurden die Zellen bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Volumen sterilem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit 0,5 Volumen sterilem Wasser und weiter mit 1/50 Volumen 10 % Glycerin wiederholt. Die Zellen wurden unter

Eiskühlung in 1/500 Volumen 10 % Glycerin suspendiert und in 50 µL-Portionen bei -80 °C eingefroren.

2.8 Elektrotransformation von *E. coli*

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1-3 µL DNA versetzt und in eine eisgekühlte Transformationsküvette überführt (Gene pulser cuvette, 0,1 cm Elektrodenspalt, BioRad München). Die Elektrotransformation wurde unter folgenden Transformationsbedingungen durchgeführt:

Widerstand 200 Ohm, Kapazität 25 µF, angelegte Spannung 1,8 kV. Nach erfolgter Elektrotransformation wurden die Zellen sofort in 1 mL Standard I-Medium aufgenommen und für 0,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Verschiedenen Mengen der Zellen wurden auf Standard I-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.9 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA-Fragmente wurden aus der genomischen DNA von *Acidaminococcus fermentans* amplifiziert. Bei einem Gesamtvolumen von 50 µL hatten die Reaktionsansätze folgende Zusammensetzung [75]: 4 µg genomische DNA, 7 nmol der vier dNTPs, jeweils 50 pmol der Oligonukleotidprimer, 5 µL 10×Reaktionspuffer sowie 1,5 U Tac-Polymerase. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach fünfminütiger Denaturierung der DNA bei 95 °C folgten 30 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C (1 min), Primeranlagerung bei 59 °C (1 min) und Polymerisation bei 72 °C (3 min). Die Reaktion wurde durch fünfminütige Inkubation bei 70 °C abgeschlossen.

2.10 Primer-Extension-Experiment zur Bestimmung des Transkriptionsstartes

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartes wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

RNA aus <i>C. symbiosum</i>	50 µg
-----------------------------	-------

IRD-markierter Primer	2 pmol
Reverse Transkriptase-Puffer (10-fach)	3 μ L
M-MuLV-Reverse Transkriptase (New England Biolabs)	1 U
RNAse-freies Wasser (Diethylpyrocarbonat behandelt)	auf 30 μ L auffüllen

Durch reverse Transkription wird ein DNA-Fragment erzeugt, welches genau bis zum Transkriptionsstart reicht, da dort die mRNA beginnt. Sequenzierung dieses DNA-Fragments gibt Aufschluß über die exakte Lage des Transkriptionsbeginns.

2.11 Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA mit IRD-markierten Primern

Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde ausschließlich mit IRD(infra-red dye)-markierten Primern sequenziert, da diese Methode ohne radioaktiv markierte Nukleotide auskommt und somit für den Experimentator schonender ist.

Für das „Cycle Sequencing“ wurde der Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing-Kit der Firma Amersham (Braunschweig) eingesetzt. Pro 1 kb zu sequenzierende DNA (bezogen auf die gesamte Plasmidgröße) wurden 0,5-1,0 μ g DNA eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde mit 2 pmol IRD-markiertem Primer (MWG-Biotech) gemischt und mit Wasser auf 13 μ L aufgefüllt. Zu je 1,0 μ L Lösung A,C,G bzw. T des Sequenzierungs-Kits in Reaktionsgefäßen wurden 3,0 μ L des DNA-Primer-Gemischs pipettiert und mit 30 μ L Mineralöl überschichtet. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. 3 min 95 °C
2. 20 sec 95 °C
3. 30 sec 60 °C
4. 40 sec 70 °C (30 Zyklen 2.-4.)
5. 20 sec 95 °C
6. 30 sec 70 °C (15 Zyklen 5.-6.)

7. 5 min 4 °C
8. 5 min 75 °C

Nach dem letzten Schritt wurde den Reaktionsgefäßen 3,0 µL Stopp- bzw. Auftragspuffer zugesetzt, die Ansätze wurden entweder sofort auf das Sequenzgel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

2.12 Herstellung eines Polyacrylamid-Sequenzgels und Elektrophorese

Die wie unter 2.11 beschrieben hergestellten einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden mit einem Polyacrylamid-Sequenzgel in einer Licor-Sequenzierungsapparatur der Firma MWG-Biotech aufgetrennt. Die Sequenzdaten wurden mit der zugehörigen Software ausgewertet.

Die zwei Glasplatten wurden mit 10 % SDS gereinigt, mit Wasser gespült und mit 70 %igem Ethanol trockengewischt. Die Spacer wurden eingelegt, die Platten zusammenschraubt, anschließend wurde das Gelgemisch zwischen letztere gegossen. Der Gelmix setzte sich aus 28 mL Sequagel™XR, 7 mL Sequagel™Complete (beide von Biozym) sowie 280 µl 20 % APS zusammen und polymerisierte innerhalb einer Stunde. Anschließend wurde das Gel in die Licor-Apparatur eingespannt. Nach 30 min Vorlauf und Einsetzen des Haifischkamms (48 Bahnen) wurden die Proben (je 1,0 µL Reaktionsmischung) geladen. Die Elektrophorese (1500 V, 50 °C) dauerte etwa 8 h.

2.13 Verarbeitung von DNA-Sequenzdaten

Datenverarbeitung und Sequenzanalyse wurden mit LASERGENE Software (DNASStar, Madison, USA) durchgeführt.

2.14 Präparation genomischer DNA aus *A. fermentans* und *C. symbiosum*

Für die Präparation genomischer DNA wurden 1 g Feuchtzellen in 2 mL Tris/HCl-Saccharose-Puffer (Tris/HCl 50 mM pH 8, 25 % Saccharose) resuspendiert [74]. Nach

Zugabe von 50 mg Lysozym erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei 37 °C. Nachfolgend wurden 2 mL Tris-EDTA-Puffer (Tris/HCl 50 mM pH 8, 25 mM EDTA) zugegeben und die Suspension 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5 mL 1 % SDS, 100 µg RNase und 10 mg Proteinase K wurden die Zellen 2 Stunden bei 37 °C vorsichtig geschwenkt. Durch dreimalige Extraktion mit Phenol und einmalige Chloroform/Isoamylalkoholbehandlung wurden die Proteine entfernt. Die DNA-haltige Phase wurde über Nacht gegen 5 L TE-Puffer dialysiert. Die Reinheit der DNA wurde durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Bei einem Verhältnis $\Delta E_{260}/\Delta E_{280} \approx 1,8$ konnte die DNA für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

2.15 Präparation genomischer RNA aus *C. symbiosum*

Eine *C. symbiosum*-Kultur wurde in der exponentiellen Phase abgeerntet; die genomische RNA wurde mit einem Midi-Reinigungs-Kit(Qiagen, Düsseldorf) isoliert.

3. Biochemische Methoden

Alle Reinigungen sowie Aktivitätsmessungen der untersuchten Enzyme erfolgten unter anaeroben Bedingungen. Die Reinigungen wurden in einem Anaerobenzelt unter einer Formiergasatmosphäre (95 % N₂, 5 % H₂) bei einer Temperatur von 18 °C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch anaerobisiert, indem sie kurz aufgekocht und unter Vakuum abgekühlt wurden. Anschließend wurden sie in das Anaerobenzelt eingeschleust, wahlweise mit Reduktionsmittel (Dithionit oder Dithiothreitol) versetzt und mindestens 12 h vor Gebrauch im Anaerobenzelt inkubiert. Puffer ohne Reduktionsmittel wurden mindestens 24 h im Anaerobenzelt inkubiert. Alle verwendeten Geräte wurden mindestens 24 h vor Gebrauch in das Anaerobenzelt eingeschleust. Eingesetzte Chemikalien wurden in anaerobisierten Puffern gelöst.

3.1 Reinigung der Komponente D der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* und *C. symbiosum*

Feuchtzellen (25 g) wurden in Aufschlußpuffer (15 mM Mops pH 7, 2 mM Dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 1 mg DNase I) resuspendiert und mit Ultraschall (5×6 min, 70 W, Branson Sonifier, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) bei einer Temperatur von maximal 12 °C aufgeschlossen. Der Aufschluß mußte diskontinuierlich erfolgen, da die Zellsuspension sonst trotz Eisbad zu warm geworden wäre. Der Zellaufschluß wurde in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen überführt, luftdicht verschlossen und 90 min bei 100000×g in einer Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, München) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Filtration (0,45 µm-Filter) von Partikeln befreit und mit einer Flußrate von 4 mL/min auf eine DEAE-Sepharose Fast-Flow-Säule (2,6×14 cm) aufgetragen, die vorher mit 300 mL 15 mM Mops pH 7, 2 mM Dithiothreitol äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 50 mL des gleichen Puffers gewaschen, die Proteine wurden mit einem linearen 700 mL-Natriumchlorid-Gradienten von 0-0,7 M bei einer Flußrate von 3 mL/min eluiert. Komponente D eluierte bei 0,4 M NaCl in einem Volumen von 60 mL.

Die aktiven Fraktionen des DEAE-Sepharose-Laufs wurden vereinigt, ihre (NH₄)₂SO₄-Konzentration wurde auf 1 M eingestellt. Diese Proteinlösung wurde auf eine Phenyl-Sepharose HiLoad-Säule (2,6×20 cm) mit einer Flußrate von 4 ml/min aufgetragen, die vorher mit 300

mL 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 50 mL des gleichen Puffers gespült, bevor die Proteine mit einem linearen 600 mL- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten von 1-0 M bei einer Flußrate von 3 mL/min eluiert wurden. Komponente D eluierte bei 0,5-0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in einem Volumen von 80 mL. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration (YM 10-Membran, Amicon, Witten) wurde die Proteinlösung entsalzt und nachfolgend auf eine Q-Sepharose High Performance-Säule (1,5×16 cm) aufgetragen, die vorher mit 150 mL 15 mM Mops pH 7, 2 mM Dithiothreitol äquilibriert worden war. Nach Spülen der Säule mit 50 mL desselben Puffers wurde das Protein bei einer Flußrate von 2 mL/min mit einem linearen 400 mL-NaCl-Gradienten von 0-0,7 M eluiert. Die bis zur Homogenität reine Komponente D eluierte bei 0,4 M NaCl in einem Volumen von 15 mL.

Komponente D wurde mit Ultrafiltration auf ein Volumen von 1 mL ankonzentriert und konnte anaerob bei -80 °C gelagert werden.

3.2 Test der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Die Aktivität der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Komponenten wurde unter Ausschluß von Sauerstoff photometrisch bestimmt [36]. Alle Testreagenzien wurden unter anaeroben Bedingungen mit anaerobem Wasser in 2 mM Dithiothreitol angesetzt; es wurden Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

Testansatz zur Bestimmung der Komponente D-Aktivität

	Konz.	Vorinkubation	Konz.	Test
Kaliumphosphatpuffer pH 7	0,22	M	50	mM
Triton X-100	0,44	%	0,1	%
NaCl	90	mM	20	mM
Titan(III)citrat	0,63	mM	0,14	mM
ATP	0,66	mM	0,15	mM
MgCl ₂	22	mM	5	mM
Acetyl-Phosphat	0,44	mM	0,1	mM
CoASH	0,44	mM	0,1	mM

NAD	4,4	mM	1	mM
Hilfsenzyme	0,2	mg		
Glutaconyl-CoA-Decarboxylase	0,04	U		
Dithiothreitol	22	mM	5	mM
Komponente D bzw. Probe	10	μ L		

Dieser Testansatz (160 μ L) wurde 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Zur Herstellung der Ti(III)citrat-Lösung (10 mM) wurden im Anaerobenzelt 216 μ L einer Titan(III)chlorid-Lösung (15 % in 10 % HCl) in eine anaerobe 50 mM Tris-Natriumcitrat-Lösung (Endvolumen 25 ml) gegeben. Der pH wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Dem vorinkubierten Testansatz wurde Komponente A im Überschuss zugesetzt; zur Messung der Aktivität der Komponente A im umgekehrten Fall wurde in Gegenwart von überschüssiger Komponente D gemessen. Zuletzt wurde mit anaerobem Wasser (1 mM Dithiothreitol) im Anaerobenzelt auf 1 mL aufgefüllt, die Glasküvetten wurden mit Gummistopfen verschlossen. Zum Starten der Reaktion wurde außerhalb des Anaerobenzeltes mit einer anaeroben Unimetrics-Mikroliter-Spritze 10 μ L einer 100 mM (*R*)-2-Hydroxyglutarat-Lösung zugesetzt. Verfolgt wurde die Bildung von NADH ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Messungen wurden mit Hilfe eines 6-fach-Küvettenwechslers durchgeführt, so daß 6 Ansätze gleichzeitig gemessen werden konnten.

3.3 Synthese von rekombinanter Komponente A aus *A. fermentans* für den Aktivitätstest

Das Plasmid pMH4 (*hgdC* aus *A. fermentans* kloniert in pQE70), welches für die C-terminal His₆-getaggte Komponente A kodiert, wurde in *E. coli* XL1-blue MRF^c transformiert. Unter anaeroben Bedingungen wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ = 0,4 mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren zwei Stunden Wachstum wurde abgeerntet und unter anaeroben Bedingungen mit French Press oder Ultraschall in MOPS 20 mM pH 7,0, 300 mM NaCl, 2 mM Dithiothreitol, 10 mM MgCl₂ aufgeschlossen. Die so angefertigten Rohextrakte wurden direkt in den Aktivitätstest für Komponente D eingesetzt. Eine weitere Aufreinigung der rekombinanten Komponente A war für diese Anwendung nicht notwendig. Reinigung über

Ni-NTA war nicht möglich, da das Protein durch die Elutionsmethoden (pH-Erniedrigung unter pH 5 oder Zusatz von 200 mM Imidazol) inaktiviert wurde.

3.4 Synthese und Reinigung von rekombinanter Komponente A aus *A. fermentans*

Plasmid pMH5 (*hgdC* aus *A. fermentans* kloniert in pASK-IBA3), welches für die C-terminal mit einem StrepTag-fusionierte Komponente A kodiert, wurde in *E. coli* XL1-blue MRF^c transformiert. Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen bei einer OD₆₀₀ von 0,3 mit 30 µg/L Anhydrotetracyclin induziert und nach weiteren drei Stunden abgeerntet. Der Aufschluss erfolgte mit einer anaeroben French Press-Zelle mit 20 mM MOPS pH 7,0, 2 mM Dithionit oder Dithiothreitol, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, eine Spatelspitze DNase I (6 g Feuchtzellen aus 10 L Kultur wurden in 30 mL Aufschlusspuffer resuspendiert). Nach Ultrazentrifugation bei 100000×g für 1 h bei 4 °C wurde der Überstand durch einen 0,45 µm-Filter filtriert; die Lösung wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mL/min auf eine 20 mL StrepTactin-Sepharose-Affinitätsäule mit Schwerkraftfluß aufgetragen, welche mit 5 Volumen Puffer A (MOPS 20 mM pH 7, 2 mM Dithiothreitol, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) äquilibriert worden war. Es folgte ein Waschschriff mit 5 Volumen Puffer A + 1 mM ATP. Komponente A eluierte in 3-5 mL Volumen mit Puffer A + 1 mM ATP + 3 mM D-Desthiobiotin. Das Protein wurde nachfolgend durch Ultrazentrifugation (YM10-Membran) je nach Verwendung bis auf 1,5 mM ankonzentriert und anaerob bei 4 °C gelagert, da Einfrieren eine vollkommene Inaktivierung durch Zerstörung des Eisen-Schwefel-Zentrums verursachte.

3.5 Reinigung des Flavodoxins aus *A. fermentans*

Alle Schritte dieser Reinigung wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, obwohl das Flavodoxin nicht sauerstoffempfindlich ist. Es war jedoch von Vorteil, anaerobe Enzympräparationen zu erhalten, da hauptsächlich Interaktionen mit Komponente A untersucht werden sollten, dort hätten kleinste Mengen Sauerstoff zur Inaktivierung der Komponente A geführt. Feuchtzellen (25 g) wurden in Aufschlußpuffer (15 mM Mops pH 7, 2 mM Dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 1 mg DNase I) resuspendiert und mit Ultraschall (5×6

min, 70 W, Branson Sonifier, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) bei einer Temperatur von maximal 12 °C aufgeschlossen. Der Aufschluß mußte diskontinuierlich erfolgen, da die Zellsuspension sonst trotz Eisbad zu warm geworden wäre. Der Zellaufschluß wurde in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen überführt, luftdicht verschlossen und 90 min bei 100000×g in einer Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, München) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Filtration (0,45 µm-Filter) von Partikeln befreit und mit einer Flußrate von 4 ml/min auf eine DEAE-Sepharose Fast-Flow-Säule (2,6×14 cm) aufgetragen, die vorher mit 300 mL 15 mM Mops pH 7, 2 mM Dithiothreitol äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 50 mL des gleichen Puffers gewaschen, die Proteine wurden mit einem linearen 700 mL-Natriumchlorid-Gradienten von 0-0,7 M bei einer Flußrate von 3 mL/min eluiert. Das Flavodoxin eluierte als tiefblaue Fraktion bei 0,4 M NaCl in einem Volumen von 30 mL. Das Protein wurde durch Ultrafiltration (YM 3-Membran) auf ein Volumen von 4 mL eingengt. Die Enzymlösung wurde mit einem 2 mL-Loop auf eine Superose 12-Gelfiltrationssäule (2×60 cm) aufgetragen, welche mit 5 Volumen 20 mM MOPS pH 7, 300 mM NaCl, 2 mM Dithiothreitol äquilibriert worden war. Das Flavodoxin eluierte bei einem Volumen von 50 mL, was einer molekularen Masse von 12 kDa entsprach. Die vereinigten Fraktionen wurde durch Ultrazentrifugation (YM 3-Membran) entsalzt. Der letzte Reinigungsschritt bestand aus Chromatographie an Q-Sepharose High Performance-Material (1,5×16 cm Säule). Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 400 mL 0-0,7 M NaCl bei einem Salzgehalt von 0,4 M NaCl eluiert und konnte bei -80 °C gelagert werden.

3.6 Proteinbestimmung

3.6.1 Proteinbestimmung mit dem Pierce-BCA-Macro-Assay

Der Pierce-BCA-Macro-Assay [76] beruht auf einer erweiterten Biuret-Reaktion. Proteine komplexieren und reduzieren unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} -Ionen. Bei Zusatz von Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure-Dinatriumsalz) wird Cu^+ komplexiert, der entstandene farbige Komplex hat ein Absorptionsmaximum von 562 nm.

Je 0,1 mL Probe oder Standard (20 - 1000 µg Protein) wurden mit 2 mL Reagentienmix vermischt, für 30 min bei 60 °C inkubiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

3.6.2 Proteinbestimmung mit dem Bradford-Test

Die Proteinbestimmung nach Bradford [69] beruht darauf, daß sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliantblau von 465 nach 595 nm verschiebt, wenn sich der Farbstoff an Protein bindet. Die Proteinbestimmung wurde mit dem Biorad-Microassay (Biorad-Laboratories, München) durchgeführt, als Standard diente Rinderserumalbumin. 800 µL Probe, die maximal 8 µg Protein enthielten, wurden mit 200 µL Biorad-Reagenz versetzt, gut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen.

3.7 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Zur Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen [77] wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung A: 2,25 % Kaliumpermanganat in 0,6 M HCl, frisch angesetzt

Lösung B: 6,5 mM Ferrozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonat)-1,2,4-Triazin, Dinatriumsalz), 13,2 mM Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-Phenantrolin), 2 M Ascorbinsäure, 5 M Ammoniumacetat

Nicht-Häm-Eisen wurde mit saurer Kaliumpermanganat-Lösung aus dem Protein freigesetzt und nach Reduktion mit Ascorbinsäure zu Fe^{2+} kolorimetrisch als Ferrozin-Komplex nachgewiesen. 200 µL Lösung A wurde mit 400 µL Probe oder Standardlösung (0,1-2 µg Eisen) versetzt und für 3 h bei 60 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 µL Lösung B versetzt. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Als Standard wurde eine FeCl_3 -Lösung (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

3.8 Bestimmung von säurelabilem Schwefel

Lösung 1: 2 % Zinkacetat in 0,1 % Eisessig

Lösung 2: 0,2 % N,N'-Dimethyl-p-phenylendiammoniumchlorid in 3,75 M
H₂SO₄

Lösung 3: 10 % NH₄Fe(SO₄)₂

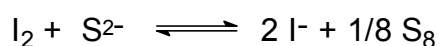
Zur Bestimmung von säurelabilem Schwefel nach der modifizierten Methode nach Cline [78] wurden die Eisen-Schwefel-Cluster mit Schwefelsäure hydrolysiert. Das freigesetzte Sulfid wurde als Zinksulfid gebunden und mit N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumchlorid in Gegenwart von Fe³⁺-Ionen zu Methylenblau umgesetzt. Der Farbstoff Methylenblau besitzt ein Absorptionsmaximum bei 670 nm und konnte somit photometrisch zur Bestimmung der Schwefelmenge verwendet werden.

Zur Erstellung einer Eichgrade wurde eine Na₂S-Stammlösung verwendet, deren Sulfid-Konzentration iodometrisch bestimmt wurde.

100 µL Probe oder Sulfidstandard (0-25 nmol) wurde in 100 µL Lösung A pipettiert. Lösung B und C wurden im Verhältnis 20:1 gemischt. Von dieser Mischung wurden 105 µL zum Reaktionsansatz gegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde dem Ansatz 1 mL Wasser zugegeben, worauf die Extinktion bei 670 nm gemessen wurde.

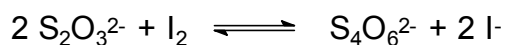
3.9 Iodometrische Bestimmung der Sulfid-Konzentration

Mit Hilfe der Iodometrie kann die Sulfidmenge einer Lösung bestimmt werden. Diesem Prinzip liegt folgende reversible Gleichung zugrunde:



Die I₂-Lösung ist tiefbraun gefärbt, da sie Kaliumiodid enthielt und sich daher Triiodid-Ionen I₃⁻ bilden. Ist das Iod bei vollständiger Reduktion komplett zu Iodid umgesetzt, verschwindet die tiefbraune Farbe schlagartig, woran man das Ende der Titration erkennen kann. Es ist nicht ratsam, Na₂S direkt gegen Iod zu titrieren, da sich ein Teil des Na₂S als H₂S verflüchtigt und somit zu geringe Mengen an Sulfid bestimmt werden. Daher wird Na₂S in überschüssige

Iod-Lösung eingelassen, der Iod-Überschuß wird durch Rücktitration mit Natriumthiosulfat-Lösung ermittelt. Thiosulfat wird in neutraler bis schwach saurer Lösung durch Iod zu Tetrathionat oxidiert.



Nach Einstellen der Maßlösung wurde eine 0,25 mM Na₂S-Lösung angesetzt, 50-200 µL dieser Lösung wurde in 5 mL Iod-Lösung hineinpipettiert. Der Iod-Überschuß wurde mit Natriumthiosulfat rücktitriert. Die Sulfid-Konzentration wurde anhand des weniger verbrauchten Thiosulfats zu Iod berechnet.

Die Eichlösung wurde in anaerobem H₂O (quarzdest.) angesetzt und verschlossen im Anaerobenzelt aufbewahrt.

3.10 Bestimmung von Flavinen

Die Flavine wurden mit der HPLC quantifiziert und charakterisiert. Die Enzymlösung wurde 20 min auf 75 °C erhitzt, das denaturierte Protein wurde nachfolgend durch Zentrifugation entfernt. Der von Flavin gelb gefärbte Überstand wurde mit 1 N HCl auf pH 3,0 eingestellt und auf die HPLC aufgespritzt. Es wurde eine hydrophobe RP-18- Säule (5 µm) der Firma Merck verwendet. Die Proben wurden isokratisch mit 25 % Methanol in 50 mM Ammoniumformiat eluiert [79]. Als Standard wurden 10 µM Lösungen von Riboflavin, FMN sowie FAD verwendet, die der gleichen Prozedur unterzogen wurden. Die Flußrate betrug bei allen HPLC-Läufen 0,7 mL/min. Flavin wurde bei 266 nm detektiert. Die Retentionszeiten betragen für FAD 2,9 min, für FMN 3,9 min und für Riboflavin 6,3 min. Zur quantitativen Bestimmung der Flavine wurden Eichgeraden von 0-10 nmol erstellt.

3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Reinheit und die apparente molekulare Masse der Untereinheiten von Proteinen untersuchen zu können, wurden 15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele angefertigt, die mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet waren [80]. Die Elektrophorese wurde mit einer Mini Protean II Elektrophoreseapparatur (BioRad-Laboratories, München) durchgeführt. Die Gelgröße betrug 9×7×0,15 cm.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Konz. der Stammlösungen	15 % Trenngel		Sammelgel	
1 M Tris/HCl pH 8,8	3	mL		
1 M Tris/HCl pH 6,8			470	μL
H ₂ O	1,37	mL	2,9	mL
10 % SDS	85	μL	40	μL
Acrylamid/Bisacrylamid (40%/1,6%)	2,75	mL	585	μL
5 % TEMED	85	μL	40	μL
Start der Polymerisierungsreaktion mit				
10 % Ammoniumperoxodisulfat	115	μL	80	μL

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 5 Teilen SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % Glycerin, 10 % Mercaptoethanol, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau) versetzt und für 10 min aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Es wurden pro Spur 15 μL Probe aufgetragen. Als Molekularmassenstandard wurde eine Mischung aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α-Lactalbumin (14,4 kDa) verwendet.

Der Elektrodenpuffer bestand aus 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,8. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 130 V (Mini Power Pack P 20, Biometra, Göttingen) so lange durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker gerade aus dem Gel herausgewandert war.

Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliantblau R-250 angefärbt. Das Gel wurde in einer 0,1 %igen Lösung des Farbstoffes in Methanol/Wasser/Eisessig (5:4:1) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nichtgebundener Farbstoff wurde daraufhin mit einem Methanol/Wasser/Eisessig-Gemisch (4:5:1) über Nacht auf einem Schüttler entfernt.

3.12 Synthese von Acetyl-CoA

Coenzym A (20 mg) wurde unter Zusatz von 1 Spatelspitze KHCO_3 in 1 mL Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 μL Acetanhydrid zugegeben und sofort gut durchmischt. Inkubation erfolgte so lange, bis der DTNB-Test auf freies Coenzym A negativ ausfiel. Dies war meist nach 10 min der Fall. Mit 1 M HCl wurde der pH-Wert des Reaktionsansatzes auf pH 2 eingestellt und bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Zum DTNB-Assay: Eine mit KHCO_3 abgepufferte DTNB-Lösung (20 mg in 1 mL Wasser) wurde auf Filterpapier getropft. Durch Zusatz der Reaktionslösung auf den Filter entsteht eine gelbe Farbe, verursacht durch freies Thiol wie z. B. freies Coenzym A.

3.13 Synthese von (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA und (*E*)-Glutaconyl-CoA

Die Synthese der Substrate der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase erfolgte enzymatisch unter Verwendung der rekombinanten Glutaconat-CoA-Transferase aus *Acidaminococcus fermentans* im Anaerobenzelt: 50 μL einer 38 mM Acetyl-CoA-Lösung wurden mit 200 μL einer 250 mM 2-Hydroxyglutaryl-CoA- oder Glutaconyl-CoA-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 40 μg rekombinanter Glutaconat-CoA-Transferase aus *A. fermentans* [53] wurde der Ansatz mit 150 μL Tris/HCl 50 mM pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 auf ein Gesamtvolumen von 0,4 mL aufgefüllt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Zentrifugation mit Centricon YM30-Röhrchen die CoA-Transferase abgetrennt. Nach Bestimmung der CoA-Ester-Konzentration im Durchfluß wurde die Lösung direkt für die Versuche verwendet.

3.14 Bestimmung der Konzentrationen von CoA-Estern mit gekoppeltem DTNB-Assay

Durch photometrische Endpunktbestimmung bei 412 nm kann die Konzentration von 2-Hydroxyglutaryl-CoA oder Glutaconyl-CoA bestimmt werden. Dabei werden die Glutaconat-CoA-Transferase und die Citrat-Synthase als Hilfsenzyme eingesetzt.

Assayzusammensetzung:

1 M KPP pH 7 + 2 M Natriumacetat	100 μ L
Oxalacetat 0,1 M	10 μ L
DTNB pH 8 (20 mg/mL Wasser)	20 μ L
Citrat-Synthase (10 mg/mL)	2 μ L
CoA-Ester bzw. Probe	5-10 μ L, je nach Konzentration
Wasser	800 μ L

Der Ansatz wird gut gemischt, daraufhin der Extinktionswert als Nullwert notiert. Eventuell noch vorhandenes Acetyl-CoA ist dann abreagiert.

Nach Zusatz von 40 μ g Glutaconat-CoA-Transferase wandelt das Enzym die CoA-Ester in Acetyl-CoA um, welches mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert. Das freie Coenzym A wird durch DTNB photometrisch detektiert.

Mit der Extinktionsdifferenz und dem bekannten molaren Extinktionskoeffizienten von DTNB von $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kann die Konzentration des CoA-Esters berechnet werden.

3.15 Bestimmung der ATPase-Aktivität der Komponente A

Die nachfolgenden Schritte werden unter Ausschluß von molekularem Sauerstoff durchgeführt: Durch enzymatische Bestimmung des freiwerdenden ADP bei ATP-Hydrolyse kann auf die ATPase-Aktivität geschlossen werden. Das entstandene ADP wird durch die Pyruvat-Kinase mit Phosphoenolpyruvat zu ATP und Pyruvat umgesetzt. Letzteres wird durch die Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert wird; dieser Vorgang kann photometrisch über die Abnahme der Extinktion bei 340 nm verfolgt werden.

Testansatz:

ATP 100 mM	10 μ L
Phosphoenolpyruvat 100 mM	10 μ L
NADH 10 mM	10 μ L
Pyruvat-Kinase	2 U
Lactat-Dehydrogenase	2 U
Tris/HCl 1 M pH 8	960 μ L
Probe	10 μ L

Über den molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm von $6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kann die Volumenaktivität und bei bekannter Proteinkonzentration der Komponente A die spezifische ATPase-Aktivität bestimmt werden.

3.16 Chelatisierungsexperimente mit Bathophenanthrolin-Disulfonsäure-Natriumsalz

Die Chelatisierungsversuche wurden unter Ausschluß von Sauerstoff im Anaerobenzelt ausgeführt. Folgender Ansatz wurde gewählt:

Tris/HCl 50 mM pH 8	700 μ L
ADP oder ATP 10 mM	100 μ L
Bathophenanthrolin-Disulfonat 50 mM	100 μ L
Komponente A	50-100 μ L

Das Gesamtvolumen des Assays betrug immer 1 mL. Die Fe(II)-Komplexierung durch Bathophenanthrolin-Disulfonat wurde photometrisch bei 535 nm ($\epsilon_{535} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt. Mittels Endpunktbestimmung und der Kinetik der Komplexierung lassen sich sowohl die absoluten Mengen an komplexiertem Fe(II) als auch die Geschwindigkeitsraten bestimmen.

3.17 Redox titrationen des Flavodoxins zur Bestimmung der Mittelpunkt-potentiale

Die Redox titration ist ein stationäres Verfahren zur Bestimmung des Redoxpotentials einer redoxaktiven Spezies. Durch Zugabe eines Oxidations- bzw. Reduktionsmittels kann ein definiertes Potential der Lösung und damit auch der Probe eingestellt werden. Das Potential wird mit einer Redoxelektrode bestimmt, welche in die Lösung eingetaucht wird. Zur raschen Äquilibrierung wurden zusätzlich Mediatoren zugesetzt und die Lösung wurde kontinuierlich gerührt. Beide Maßnahmen dienen zur raschen Äquilibrierung. Das Verhältnis von oxidiertes zu reduziertes Spezies wurde mit UV-vis-Spektroskopie ermittelt. In der Praxis werden aber auch andere Methoden wie EPR-Spektroskopie eingesetzt.

2-3 mL einer 0,05 mM Lösung des Flavodoxins (MOPS 20 mM pH 7) wurden in Gegenwart der Mediatoren (je 10 µM) Methylviologen, Benzylviologen, Anthrachinon-2-Sulfonat, 2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon, 2-Methyl-1,4-Naphtochinon, Menadion, Thionin unter Verwendung einer Ingold Pt 4805-S7/120 Platinelektrode mit Dithionit oder Kaliumhexacyanoferrat (III) titriert. Zur Ermittlung des Standardwasserstoffpotentials (SHE) wurde das Potential der Ag/AgCl-Referenzelektrode von -197 mV einberechnet. In Abständen von 30-60 mV wurden Proben entnommen. Für das Flavodoxin wurde der Absorptionswert bei 578 nm verfolgt. Durch Auftragen der gemessenen Absorptionen gegen die Potentiale läßt sich das Mittelpunktpotential ermitteln.

Die Daten lassen sich entweder durch sigmoide Simulation oder durch Anwendung der Nernst-Gleichung auswerten:

$$E = E^0 + RT/nF \times \ln ([\text{ox}]/[\text{red}])$$

E: Redoxpotential

E⁰: Standardredoxpotential

F: Faraday-Konstante

n: Anzahl der beteiligten Elektronen

[ox], [red]: Konzentrationen der oxidierten bzw. reduzierten Spezies

Für den Fall, daß die oxidierte Redox-Spezies ein Signal zeigt, ergibt sich:

$$[\text{ox}] = 1 / \{1 + \exp^{[nF \times (E_0 - E) / RT]}\}$$

In KaleidaGraph oder Origin lautet die Fitgleichung:

$$y = m3 / (1 + \exp ((m1/25,693) \times (m2 - m0)))$$

Für den Fall, daß die reduzierte Redox-Spezies ein Signal zeigt, ergibt sich:

$$[\text{red}] = 1 / \{1 + \exp^{[\ln F \times (-E_0 + E) / RT]}\}$$

$$y = m3 / (1 + \exp((m1/25,693) \times (m0 - m2)))$$

m0: eingestelltes Potential während der Titration

m1: Anzahl der beteiligten Elektronen des Redoxüberganges (hier: immer 1)

m2: Redoxpotential in mV

m3: Signalintensität, normiert auf 1

3.18 Herstellung definierter Redoxzustände der Komponente A und des Flavodoxins

Reduktion der Komponente A und des Flavodoxins

Das Flavodoxin wurde in Tris/HCl 50 mM pH 8,0 überführt, Komponente A enthielt zusätzlich 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl₂ und 1 mM ADP. Nach Zusatz eines 10-fachen Überschusses an Dithionit und 10-minütiger Inkubation bei 18 °C wurde das Reduktionsmittel über eine Sephadex-G25-Gelfiltrationssäule abgetrennt. Die Vollständigkeit der Reduktion wurde mit UV-vis-Spektroskopie überprüft.

Oxidation der Komponente A

Es wurde analog zur Reduktion vorgegangen. Anstelle des 10-fachen Dithionit-Überschusses wurde 10-facher Thionin-Überschuss eingesetzt. Das Thionin wurde in anaerobem Wasser als 1 mM Stammlösung angesetzt. Thionin ist in NaCl-haltigen Puffern sehr schlecht löslich, da die Löslichkeit sehr stark von der Ionenstärke des Lösungsmittels abhängt.

3.19 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Transferpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol
PVDF-Färber:	0,1 % Coomassie Brilliantblau in 10 % Methanol
PVDF-Entfärber:	45 % Methanol, 10 % Essigsäure

Nach beendeter SDS-PAGE wurde das Gel mit Transferpuffer äquilibriert (10 min). Die Polyvinylidendifluorid-Membran (Problott PVDF-Membran, Applied Biosystems, Weiterstadt) wurde nach Benetzung mit 100 % Methanol ebenfalls mit Transferpuffer äquilibriert (10 min). Das Protein wurde bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Semi Dry Sartoblott II-Anlage (Sartorius, Göttingen) übertragen. Membranen, die zur Bestimmung *N*-terminaler Aminosäuresequenzen dienten, wurden anschließend in PVDF-Färber inkubiert (1 min). Nicht proteingebundener Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen mit PVDF-Entfärber entfernt. Danach wurden die Membranen zur Entfernung des Glycins zweimal 24 Stunden gegen 5 L Wasser dialysiert. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und durch Dr. D. Linder am Biochemischen Institut des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen *N*-terminal ansequenziert.

Ergebnisse

1. Klonierung und Sequenzierung der Gene der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum*

Im Rahmen der Diplomarbeit von Jörg Sievers (Philipps-Universität Marburg, 1996) konnten die Gene der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* teilweise kloniert und sequenziert werden. Unter Verwendung einer Phagen-Genbank (λ -ZAP-Express, Stratagene) wurde ein positiver 3,7 kb-Klon isoliert, der das komplette *hgdB*-Gen sowie das *hgdA*-Gen enthielt. Bei letzterem fehlten jedoch etwa 50 Basen der 5'-Region.

Da durch diese Vorarbeiten Teile der Sequenzen bekannt waren, konnten mit der PCR-Methode die restlichen Gene der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase kloniert und sequenziert werden. Der fehlende 5'-Bereich von *hgdA* sowie der 3'-Bereich von *hgdC* konnte mit folgenden PCR-Primern durch Amplifikation eines 0,8 kb-Fragments identifiziert werden:

Primer 1: 5'-CAGATGAA(CT)GA(CT)AA(AG)TG(CT)GC-3'

Primer 2: 5'-ACAGCAGAGAACGAAGTCC-3'

Primer 1 wurde aus einem Bereich des bekannten *hgdC*-Gens aus *A. fermentans* abgeleitet, welcher durch Sequenzvergleiche mit hypothetischen Proteinen aus Eubakterien und Archaea hohe Identitäten aufwies. Primer 2 wurde aus dem 5'-Bereich des oben beschriebenen 3,7 kb-Klons abgeleitet. Der 5'-Bereich von *hgdC* konnte wiederum durch PCR mit folgendem Primer amplifiziert werden:

Primer 4: 5'-CAGAACACGCGCCATAACATC-3'

Dieser Primer wurde aus dem 3'-Bereich von *hgdC* aus *C. symbiosum* abgeleitet. Ohne Zusatz eines weiteren Primers konnte ein 1,0 kb-Fragment amplifiziert werden; Primer 4 hat somit zusätzlich etwa 400 Basen stromaufwärts von *hgdC* gebunden. Die Lagen der synthetisierten PCR-Fragmente sind in Fig. 10 dargestellt. Sequenzvergleiche der erhaltenen Proteine HgdCAB aus *C. symbiosum* mit den bereits bekannten Homologen aus *A. fermentans* wiesen eine 65-80 %ige Identität auf, die die nahe Verwandtschaft beider Organismen bestätigt, welche durch Vergleiche der 16S rRNA belegt wurde. (Fig. 12 A-C).

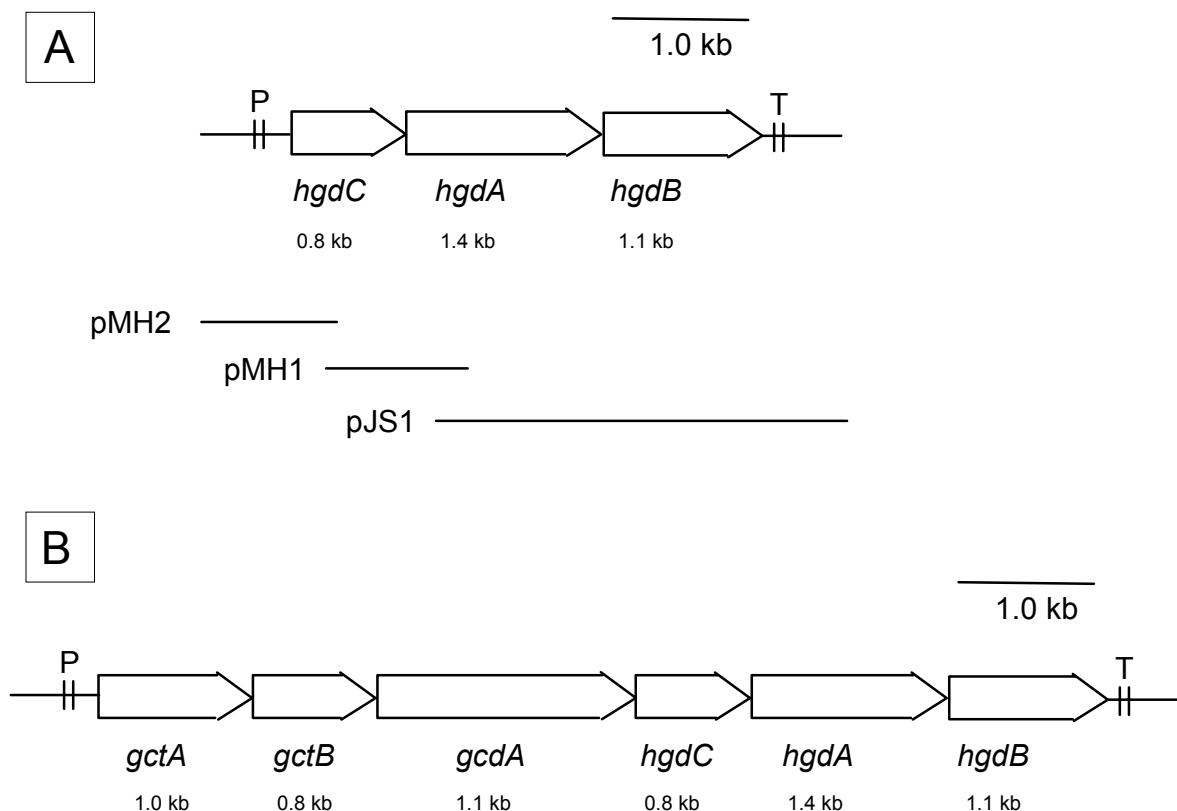


Fig. 10. Schematische Anordnung der Gene der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* und *A. fermentans*. **A:** Anordnung der Gene *hgdCAB* in *C. symbiosum*. Dargestellt sind die Positionen der PCR-Fragmente: pMH2 (1,0 kb-PCR-Fragment kloniert in pCR2.1), pMH1 (0,8 kb-PCR-Fragment kloniert in pCR2.1), pJS1 (3,7 kb-Fragment kloniert in pBK-CMV). P: Promotor, T: Terminationsstelle. **B:** Das Hydroxyglutaratoperon aus *A. fermentans*.

Des weiteren zeigt der Sequenzvergleich mit hypothetischen Proteinen aus Eubakterien und Archaea ebenfalls signifikante Identitäten. HgdC zeigt 30-40 %ige Identität zu zwei Untereinheiten der Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* und *Rhodopseudomonas palustris* sowie zu hypothetischen Proteinen aus *Methanopyrus kandleri*, *Methanococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus* unter anderen Organismen. Auffällig dabei ist die strenge Konservierung zweier Cysteine und eines potentiellen ATP-Bindemotives, das denen der Hexokinase, der Glycerinkinase und der Hitzeschockproteine Hsp70 sehr ähnelt. Diese Cysteine könnten an der Bildung eines Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt sein; im Fall eines dimeren Proteins würde ein [4Fe-4S]Cluster die Untereinheiten verbrücken. Die Proteine

HgdAB zeigen ebenfalls signifikante Identitäten bis 40 % zu Untereinheiten der Benzoyl-CoA-Reduktase und hypothetischen Proteinen aus den bereits genannten Eubakterien und Archaea. Hier existieren jedoch keine größeren konservierten Bereiche. Es sind jedoch zwei bzw. drei konservierte Cysteine in HgdA und HgdB vorhanden, die ebenfalls an der Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese beteiligt sein könnten.

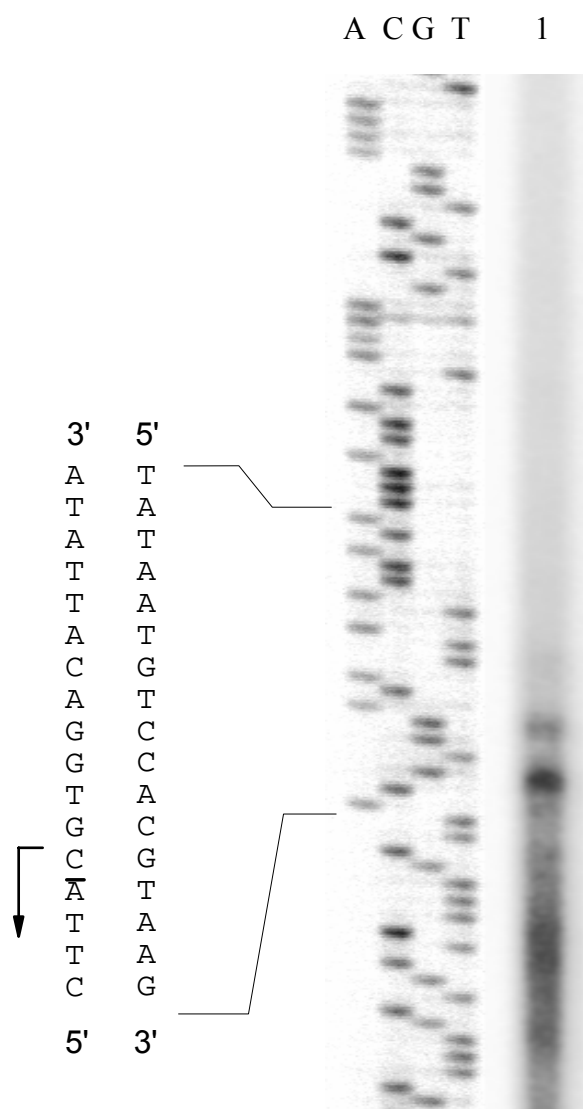


Fig. 11. Primer-Extension Experiment. Reverse Transkription mit PrimerA weist auf einen möglichen Transkriptionsstart bei Nukleotid G 118 Basen stromaufwärts von *hgdC* hin.

Bis 400 Basen stromaufwärts von *hgdC* ist kein weiterer offener Leserahmen vorhanden. Zusätzlich haben Primer-Extension-Experimente einen Transkriptionsstart bei dem Nukleotid G 118 Basen stromaufwärts von *hgdC* aufgezeigt (Fig. 11). Für die reverse Transkription wurde folgender Primer verwendet:

PrimerA: 5'-GTGTTGGGATGGTTGGGTAGGTTG-3'

Dieser Transkriptionsstart zeigt, daß in *C. symbiosum* keine dem Hydroxyglutaratoperon aus *A. fermentans* vergleichbare Genanordnung vorliegt. Die Gene *hgdCAB* bilden eine eigene Transkriptionseinheit.

A

```

HgdC_C.symbiosum      MSGIYTLGIDVGSSTASKCIVLK-DGK---EIVAKS--LIDVAGTSGPQRAIEAVLNEAG 54
HgdC_A.fermentans     MS-IYTLGIDVGSSTASKCIILK-DGK---EIVAKS--LVAVGTGTSGPARSISEVLENAH 53
AF1959_A.fulgidus    ---MIAAGIDIGSLTAKCALMR-DGK---LIAYKV--IKVSPNLEETAERVFQETLKAAG 51
MJ0004_M.jannaschii ---MILGIDVGSSTTKMVLME-DSK---IIWYK---IEDIGVVE--EDILLKMWKEIE 47
YJIL_E.coli          MAVAYSIGIDSGSTATKGILLA-DG---VITRRF--LVPTPFRP---ATAITEAWETLR 50
Orf6_M.kandleri      ---MRVLGVDAGSSHLKCAIVE-DGS---LEDHTV--VESTGPKV---KVLRRALDELG 47
BcrD_T.aromatica     --MTITAGIDIGTGAVKTVLFRVEGDKTEWLAKRNDRIQRDPFKLA-EEAYNGLLEEAG 57
BadG_R.palustris     --MTITSGLDVGGAIKVVAFEVDGDQERCLAKRVERVRQRDPMKLS-GDIYDDMLKETG 57
                        * * * *

HgdC_C.symbiosum      MKKEDMAYTLATGYGRSTLMDGIADKQMSSELSCHAKGATFLFPNVHTVIDIGGQDVKVLH 114
HgdC_A.fermentans     MKKEDMAFTLATGYGRNS-LEGIADKQMSSELSCHAMGASF IWPNVHTVIDIGGQDVKVIH 112
AF1959_A.fulgidus    IGREEVERIVATGYGRNK--VGFADKKVTEISCHARGAIYFIPARTVVDIGGQDSKVIA 109
MJ0004_M.jannaschii QKYP-IDKIVATGYGRHK--VSFADKIVPEVIALGKGANYFFNEADGVIDIGGQDTKVLK 104
YJIL_E.coli          EGLETPPFLTLTYGYGRQL--VDFADKQVTEISCHGLGARFLAPATRAVIDIGGQDSKVIQ 108
Orf6_M.kandleri      AGIDDFDVTAVTYGREA-LSDFEDETVPPELPAVALGASQLVEGARTVIDVGGQDTKVMK 106
BcrD_T.aromatica     LKASDVDVYVATTGEG-ES--LAFHTGHFYSMTTHARGAVYLNPEARAVIDIGALHGRAIR 114
BadG_R.palustris     LARADVAYCSTTTGEG-EE--LTFHTGHFYSMTTHARGAIYLNPASRAVLDTGALHVRAIR 114
                        ** * * * *

HgdC_C.symbiosum      ID-NGAMTNFQMNDKCAAGTGRFLDVMARVLEVKVEDLGRLGAMSRKKVIGISSTVTFVFAE 173
HgdC_A.fermentans     VE-NGTMTNFQMNDKCAAGTGRFLDVMANILEVKVSDLAELGAKSTKRVAISSTVTFVFAE 171
AF1959_A.fulgidus    IE-NGKVAEFVMNDKCAAGTGRFLEVMAAALNLKVEELGDVAERATKATKISSSTVTFVFAE 168
MJ0004_M.jannaschii IDKNGKVVDFILSDKCAAGTGKFLKALDILKIDKNEINKY--KSDNIAKISSMCAVFAE 162
YJIL_E.coli          LDDDGNLCDFLMNDKCAAGTGRFLEVISRTLGT SVEQLDSIT-ENVTPHAITSMCAVFAE 167
Orf6_M.kandleri      VE-DGKVVDFQVNDKCAAGTGRFVENVCRRLGIEMSEVDEHASGADDPVKINSMCAVFAE 165
BcrD_T.aromatica     NDERGKVTYKMTSQCASGSGQFLENIARYLGLIAQDEIGSLSTQADNPEVVSSICAVLAE 174
BadG_R.palustris     MDERGKVLAYKMTSQCASGSGQFLENIARYLGLIAQDEIGSLSQRADNPEKVSIGICAVLAE 174
                        * * * * *

HgdC_C.symbiosum      SEVISQLAMGTDKCDIIDGIHRSVAHRVTGLAHRIGVVP-DVVMTGGVAQNEGVVKALQD 232
HgdC_A.fermentans     SEVISQLSKGTDKIDIIAGIHRSVASRVIGLANRVGIVK-DVVMTGGVAQNYGVRGALEE 230
AF1959_A.fulgidus    SEVISHLASGEKVEDIVAGIHEAIASRIAAMARRVKIEP-DIVLTGGVAKNKAMKKALEK 227
MJ0004_M.jannaschii SEIISLLSKKVPKEGILMGVYESIINRVIPMTNRLKIQ--NIVFSGGVAKNKVLVEMFEK 220
YJIL_E.coli          SEAISLRSAGVAPEAILAGVINAMARRSANFIARLSCEA-PILFTGGVSHCQKFARMLES 226
Orf6_M.kandleri      TEVISLVNRGIDVERILLGVLD SVAERVATMIDKVSPEP-EVVLVGGMARCRVFAELLS 224
BcrD_T.aromatica     TDVINMVSRGISAPNILKGIHISMAGRLAKLLKSVGARDGVVLTGGLALDEGLKLTNE 234
BadG_R.palustris     TDVINMVSRGISSPNILRGIHESMADRLAKLLKTLGSLDGTVMQMTGGLALDTGLVEAMKD 234
                        * * * * *

HgdC_C.symbiosum      -----ELGCPINTSPLTQYNGALGAALLAWQAASRRQSNS----- 267
HgdC_A.fermentans     -----GLGVEIKTSPLAQYNGALGAALYAYKKAAC----- 260
A.fulgidus            -----EFGMEVKTPPEPQIVGAVGAALLA----- 251
MJ0004_M.jannaschii -----KLNKLLIPKEPQIVCCVGAAILV----- 243
YJIL_E.coli          -----HLRMPVNTHPDAQFAGAIGA AVIGQRVTRR----- 257
Orf6_M.kandleri      -----RLEMGINVPNEAHVAGAFGAALWVLEK----- 251
BcrD_T.aromatica     SIQE QKMAVVAYNHPDSPYAGAI GAALWGAFRHEKLARLGGQQVAEAA 282
BadG_R.palustris     AVVKAKVEVAIESHPDSIYAGAI GAALWGAFRHKRLA---D--MARAA 277
                        * *

```

B

HgdA_C.symbiosum	MAKQVSPGVLALRKVVDDVHKEAREAKARGELVWSSSKFPCELAAAFDLNVMYPENQAA	60
HgdA_A.fermentans	MPKTVSPGVQALRDVVEKVVYRELREAKERGEKVGWSSSKFPCELAESFRLHVGYPENQAA	60
BadE_R.palustris	MTVIVGPKTKPPEAIKDASMARQKQMVNAHYDRLASAKERGEKVAATF-----VPGN---	52
BcrB_T.aromatica	---MSAKTN-PEVIKESMVVKQKEMIAGNYDRLTGTKESGEKVVSTF-----VPGN---	47
AF1958_A.fulgidus	----MTLKKLRANDRMKQIMAGYYMMGNQAEVKGWITSGAPVELLYAMDIYPVYPEN---	53
Orf7_M.kandleri	---MDIREIWKELGIDLERHDELLEALPEVYEEIFLSQENRPERMSYFDEVVADIHG---	54
HgdA_C.symbiosum	GIAANRYGEMMCQAAEDLGYDNDICGYARISLAYAAGVVRVSRKYDAETGEYIIDPAT-GK	119
HgdA_A.fermentans	GIAANRDGEVMCQAAEDIGYDNDICGYARISLAYAAGFRGANKMDKD-GNYVINPHS-GK	118
BadE_R.palustris	-LN----ELLMCFDMVNN-----LPEVNAIQNGLR--RQS----GGYVMEAEK-LG	91
BcrB_T.aromatica	-LN----ELIMCFDMVNN-----LPEVNAIQNGMR--KQS----GGMIMDAEK-AG	86
AF1958_A.fulgidus	-----H--GALIGAAKQ-----GPYFSDFAERKG	75
Orf7_M.kandleri	--ARVRELYEMRQEGKPILG--TFCVYVPEEIVLAAGGVCVGLCG---GAEPPIPADEKY	107
HgdA_C.symbiosum	PLKDAEGNVVIDEATGPKPKDPKTQTPYLVLDNLEIEALPDGPEKERRLEAISPQRMR	179
HgdA_A.fermentans	QMKDANGKKVFD-ADGKPVIDPKTLKPFATDNIYEIAALPEGEEKTRRQNALHKYRQMT	177
BadE_R.palustris	HSEDVCTYVKSD-----IGMMAKGNIGPNKPK-----	118
BcrB_T.aromatica	HSEDVCTYVKAD-----IGMMGRGNIAPNGPK-----	113
AF1958_A.fulgidus	FSRDLCSYARCD-----IGCVFAG-TSPIGG-----	100
Orf7_M.kandleri	LPRDLCPLIKSS-----FGFLVSR-LCP-----	129
HgdA_C.symbiosum	IPQPDFVLCNNICNCMTKWYENIARMCNVPLIMIDIPYNNTVEVHDDNVKYVRAQF-DK	238
HgdA_A.fermentans	MPMPDFVLCNNICNCMTKWYEDIARRHNIPLIMIDVPYNEFDHVNEANVKYIRSQL-DT	236
BadE_R.palustris	LPDPPVLLLSYTGCTTFMKWFELLRQYKCEITIMFQTPYLADGRIKDMRISYVMVKQLRQD	178
BcrB_T.aromatica	MPAPDMLLSYTGCTTFMKWFELLRHEYKCPVVMLQIPYQGDGKI TKNMDFVVKLKEE	173
AF1958_A.fulgidus	LPEPTFLFACNNICNTVVKWYEVLSRIFKVPVFLVLDTPFVFR--KELKESYVKYVHDQL--YE	158
Orf7_M.kandleri	YCQVATVIVGENTCDGKKKMYEIMSEHK--DVYVMEPMQVK---DEEGLEYWHEQL-IK	182
HgdA_C.symbiosum	AIKQLEELTGKGFDEKFKFEKACSNANRTAQAWLKVCYDLYQYKPAPYSG-FDLFNHMADV	297
HgdA_A.fermentans	AIRQMEIITGKGFDEKFEQCCQANRTAKAWLKVCYDLYQYKPAPFNG-FDLFNHMADV	295
BadE_R.palustris	VIPKLERISGVKFDIDLRLREYLKRSAKAEDDHVWVLSAKHKPSPIDAYFGGIYYIGPIF	238
BcrB_T.aromatica	VIPMFQVSVGVKFDIDLRLREYLKNSAKAEDDLVWVLESANRPSPIDAYFGGVYIYIGPMF	233
AF1958_A.fulgidus	FVDFLEKTTGRELSDSKLRDVTIKSIQGVKAYAEVLGMARHKPSPLTC-FDAFINMAPIV	217
Orf7_M.kandleri	FKEFVEELSNEITYESLLDAIERVNAKREAFRKLVELRKHDPAPISG-RDANLIAQIAF	241
HgdA_C.symbiosum	TA-RARVEAAEFELLADDLEETVKKGE-TTTP----FPEKYRVMFEGIPCWPKLPNLFK	351
HgdA_A.fermentans	TA-RGRVEAAEFELLAKLEQHVKEGT-TTAP----FKEQHRIMFEGIPCWPKLPNLFK	349
BadE_R.palustris	GAFRGTDDAIEYKFLRAEVEQRIAGKGPVTPDGMGQERYRLVVEGPPNYTNFRQFWK	298
BcrB_T.aromatica	TAFRTADAVEYYGLLRGEIEQRIRIEGKGPITPEGDMKEEKYRLVVEGPPNWTFRFQFWK	293
AF1958_A.fulgidus	CL-RGTDYPVQFYAEMKEELEERVKRGEGAIEN-----EERLLWDNIPVWYRLKWFSE	270
Orf7_M.kandleri	YD--DVDRFTEKVNELNEELKRVKEGEGVAE-----EAPRILVAGTPMPIPHWKLLY	292
HgdA_C.symbiosum	PLKEHGVNVTAVVYAPA-----FGFV---YNNID--EMARAYYK-APNSVCIE--QGVDW	398
HgdA_A.fermentans	PLKANGLNITGVVYAPA-----FGFV---YNNLD--ELVKAYCK-APNSVSIIE--QGVAV	396
BadE_R.palustris	MFYDEGAVVASSYTKVGGTYDYGFR--HDPDRPLESLAEYCLNVYTNRNLP--MRVDM	353
BcrB_T.aromatica	LFYDEGAVVASSYTKVGGTYDYGFR--HDPNDPLGTLADYCLGCYTNNNLP--QRVEL	348
AF1958_A.fulgidus	FFAERNAACLVDYTNNAW----TGFIS--IDKSDIFWSMAEYTYTFIYLNIGLE--HMAEA	322
Orf7_M.kandleri	VVESCAGAVVCEESCTGTRYFEREVSTEGDDVEDLIKNI AEAYMETKCAIFTPNDERVKD	352
HgdA_C.symbiosum	REGICRDNKVDGVLVHYNRSKPKWSGYMAEMQRRFTEDLGVPCAGFDGDQADPRNFNAAQ	458
HgdA_A.fermentans	REGLIRDNKVDGVLVHYNRSKPKWSGYMPQMRRFTKDMGIPTAGFDGDQADPRNFNAAQ	456
BadE_R.palustris	LENYINEYADGLLINSIKSINSFSAGQLMMREVEKRTGKPAAFIETDLVDPYFSAAN	413
BcrB_T.aromatica	LEKYMNEYQADGLLINSIKSINSFSAGQLMMREIEKRTGKPAAFIETDLVDPYFSAAN	408
AF1958_A.fulgidus	INRLIDYDVGAVIHSNRSKPKYSPFGQYELQ---KMIEVPSVIEADMVDSRTFSEAQ	378
Orf7_M.kandleri	I IKKYKWNCDGVILYNLKFQOPYAVEHSKIESR-LREEGIPALKLESYSEE---DVEQ	408
HgdA_C.symbiosum	YETRVQGLVEAMEANKQAKEAK--	480
HgdA_A.fermentans	YETRVQGLVEAMEANDEKKGK---	477
BadE_R.palustris	VKNRLESYFQMI EQKRAGFRGAA-	436
BcrB_T.aromatica	VKNRLESYFQMV DQKRSGASLATA	432
AF1958_A.fulgidus	VETRLEAFLEMLR-----	391
Orf7_M.kandleri	LKTRIETFLESIA-----	421

C

HgdB_C.symbiosum	-----MSINALLDEFKVKAAATPKQQLAEYKAQGKKVIGVLPYYAPEELVYAAGMVP	51
HgdB_A.fermentans	-----MAISALIEEFQKVSASPKTMLAKYKAQGKKAIGCLPYYVPEELVYAAGMVP	51
BadD_R.palustris	MLDRPHHTTADI IARCEALFSDLSTAAREWKAEEPGRIVVGFLPYYAPRELVHAAGGLP	60
BcrC_T.aromatica	-----MSTADIIARCEALYEDLDFTAARQWKEADPSRKVIAYMPVYVPREI IHAAGMLP	54
AF1957_A.fulgidus	-----MNVGYLCTYTPKELIDAAGFTP	22
	* * * * *	
HgdB_C.symbiosum	MGIWGS--NNKTISRKEYCATFYCTIAQLALEMLLDGTMQDLDGIITPTI C DTLRPMSQN	110
HgdB_A.fermentans	MGVWGC--NGKQEVRSKEYCASFYCTIAQQSLEMLLDGTLGDLGIITPVLDTLRPMSON	110
BadD_R.palustris	LGIFGGDQLEVIHGDAYYQSYICRIPRSTIELGVSGRLDFVDGMMFPSSI C DVIRNLSGM	120
BcrC_T.aromatica	LGIMGGDGLLEVIHGDAFYQSYICRIPRSTIELGLSKRMDFVDGMLFPSSI C DVIRNLSGM	114
AF1957_A.fulgidus	IRIFAG--DMQISLATAHIQSYA C SQARGSLERALRGELD-VQAVVFR C DTLMRLADI	79
	* * * * *	
HgdB_C.symbiosum	FRVAMGDKMAVIFLAQPQNRFEDEFGLQFSVDQYTNVKKLEKLVAGKEITNEAIQDAIKVY	170
HgdB_A.fermentans	FKVAMKDKMPVIFLAHPQVRQNAAGKQFTYDAYSEVKGHLEECGHEITNDAILDAIKVY	170
BadD_R.palustris	WKLMPFSKG-ARYIDLPHNFDDDLGGEFYVSELRETCEWLS'TLTGKPITSDAIRASIAVF	179
BcrC_T.aromatica	WKLMPFGKY-VRYFDVPQNYRDDVGGNYTAEINELREGLHLSGRKITDDALRASIKVY	173
AF1957_A.fulgidus	WERNT--DMR-VYNIEFP-TRVEERSKDYFNELKDFVKVLEEWGG-GVTLESLRESLKLY	135
	* * * * *	
HgdB_C.symbiosum	NKSRAARRKFVELASAHCDVITPTKRSAVLKSFFFMEKPEYIEKLEELNAELEKLPVCDW	230
HgdB_A.fermentans	NKSRAARREFCKLANEHPDLIPASVRATVLRAAAYFMLKDEYTEKLEELNKELAAAPAGKF	230
BadD_R.palustris	NDNRRLIRALYQLRADEPWNVPSSELYLLL RAGMVI PVEEHNQMLADYLAAVRLQQRPIK	239
BcrC_T.aromatica	NENRKLVDVYGLRSREPWKVPSADVYLLMRAGLVLPVEEHNQMLKDYLA AAVKVEAQKR	233
AF1957_A.fulgidus	HELEKLRKLFSLKPD---YEAAKRVQEMNVREAIKFVDERLRKAE-----S--EGGK	183
	* * * * *	
HgdB_C.symbiosum	QGTVVTSGIICDNP--KLEIFEENNI AIAADDVGHESRSFRVDAPEDADALMALAKQ	288
HgdB_A.fermentans	DGHKVVVSGI IYNTP--GILKAMDDNKLAI AADDCAYESRSFAVDAPEDLDNGLHALAVQ	288
BadD_R.palustris	DNSRVVICGMFCEQPPLNLIKSIELSGCYIVDDDFILVTRWENSVDALDGDPLSNLASAY	299
BcrC_T.aromatica	DNCRVLIINGSFCEQPPLNLIKSIELSGCYIVDDDYMIVHRFLRNEVSTAGDPQMNL SLAF	293
AF1957_A.fulgidus	--PRVLTGSVC--PFVEVYTLFEEAG-FALKDDICTGTRFFTFNTPPREIGSVDEGLRF	238
	* * * * *	
HgdB_C.symbiosum	NAGIPHIKLGIDQQMRDFGQASTAIQAFADVLEMQK--	383
HgdB_A.fermentans	AHHIPHVKIGVDQMTDRDFGQAQTALEAFAESL-----	379
BadD_R.palustris	SHGIPQIAFKYAENSGQMQRIREQAGTFPDSIKLWSGA	394
BcrC_T.aromatica	ENKVPYISFKYAENSGQMQRIREQAGTFADSIKLWS--	386
AF1957_A.fulgidus	EMGKKVLLLELEFP IASIEQLRTRIEAFYEVIA-----	329
	*	

Fig. 12. Vergleich der Aminosäuresequenzen des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Systems aus *C. symbiosum* mit anderen charakterisierten oder hypothetischen Proteinen. Bad und Bcr sind die Untereinheiten der Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* und *Rhodopseudomonas palustris*. Die Sequenzvergleiche wurden mit der ClustalW-Methode durchgeführt. Lücken wurden mit einem Längsstrich markiert. Identische Reste wurden mit einem Stern markiert. Die konservierten Cysteine und die Aminosäurereste des potentiellen ATP-Bindemotivs in HgdC wurden rot bzw. gelb markiert.

1.1 Analyse von HgdC aus *C. symbiosum*

Molekulare Masse	28054,3 Da
1 Mikrogramm entspricht	35,6 pmol
Isoelektrischer Punkt	6,59
Ladung bei pH 7	- 1,26

Fig. 13. Charakteristische Eigenschaften von HgdC aus *C. symbiosum*.

TTT	Phe	F	2	TCT	Ser	S	1	TAT	Tyr	Y	3	TGT	Cys	C	4
TTC	Phe	F	3	TCC	Ser	S	6	TAC	Tyr	Y	1	TGC	Cys	C	2
TTA	Leu	L	2	TCA	Ser	S	2	TAA	Ter	*	0	TGA	Ter	*	0
TTG	Leu	L	1	TCG	Ser	S	1	TAG	Ter	*	1	TGG	Trp	W	1
CTT	Leu	L	5	CCT	Pro	P	0	CAT	His	H	4	CGT	Arg	R	5
CTC	Leu	L	2	CCC	Pro	P	0	CAC	His	H	2	CGC	Arg	R	3
CTA	Leu	L	0	CCA	Pro	P	1	CAA	Gln	Q	1	CGA	Arg	R	0
CTG	Leu	L	11	CCG	Pro	P	4	CAG	Gln	Q	9	CGG	Arg	R	2
ATT	Ile	I	7	ACT	Thr	T	5	AAT	Asn	N	7	AGT	Ser	S	3
ATC	Ile	I	7	ACC	Thr	T	6	AAC	Asn	N	2	AGC	Ser	S	5
ATA	Ile	I	3	ACA	Thr	T	4	AAA	Lys	K	7	AGA	Arg	R	1
ATG	Met	M	11	ACG	Thr	T	2	AAG	Lys	K	8	AGG	Arg	R	0
GTT	Val	V	9	GCT	Ala	A	2	GAT	Asp	D	12	GGT	Gly	G	7
GTC	Val	V	4	GCC	Ala	A	11	GAC	Asp	D	5	GGC	Gly	G	11
GTA	Val	V	6	GCA	Ala	A	9	GAA	Glu	E	5	GGA	Gly	G	11
GTG	Val	V	6	GCG	Ala	A	6	GAG	Glu	E	6	GGG	Gly	G	1

Fig. 14. Codongebrauch im *hgdC*-Gen aus *C. symbiosum*. Die Aminosäuren sind im Drei-Buchstaben-Code und im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Die Zahlen entsprechen der Häufigkeit des Auftretens eines Codons.

Aminosäuren	Anzahl	Häufigkeit (%)
stark basisch (KR)	26	9,7
stark sauer (DE)	28	10,4
hydrophobe (AILFWV)	97	36,3
polare (NCQSTY)	64	23,9
Insgesamt	267	100

Fig. 15. Aminosäurezusammensetzung von HgdC aus *C. symbiosum*

1.2 Analyse von HgdA aus *C. symbiosum*

TTT	Phe	F	5	TCT	Ser	S	1	TAT	Tyr	Y	16	TGT	Cys	C	5
TTC	Phe	F	12	TCC	Ser	S	4	TAC	Tyr	Y	6	TGC	Cys	C	10
TTA	Leu	L	4	TCA	Ser	S	2	TAA	Ter	*	1	TGA	Ter	*	0
TTG	Leu	L	0	TCG	Ser	S	0	TAG	Ter	*	0	TGG	Trp	W	6
CTT	Leu	L	10	CCT	Pro	P	7	CAT	His	H	4	CGT	Arg	R	13
CTC	Leu	L	3	CCC	Pro	P	0	CAC	His	H	1	CGC	Arg	R	6
CTA	Leu	L	0	CCA	Pro	P	6	CAA	Gln	Q	1	CGA	Arg	R	1
CTG	Leu	L	13	CCG	Pro	P	15	CAG	Gln	Q	15	CGG	Arg	R	1
ATT	Ile	I	7	ACT	Thr	T	5	AAT	Asn	N	11	AGT	Ser	S	2
ATC	Ile	I	13	ACC	Thr	T	5	AAC	Asn	N	16	AGC	Ser	S	3
ATA	Ile	I	0	ACA	Thr	T	6	AAA	Lys	K	19	AGA	Arg	R	4
ATG	Met	M	14	ACG	Thr	T	1	AAG	Lys	K	17	AGG	Arg	R	0
GTT	Val	V	17	GCT	Ala	A	19	GAT	Asp	D	15	GGT	Gly	G	13
GTC	Val	V	5	GCC	Ala	A	12	GAC	Asp	D	17	GGC	Gly	G	13
GTA	Val	V	11	GCA	Ala	A	22	GAA	Glu	E	15	GGA	Gly	G	1
GTG	Val	V	4	GCG	Ala	A	1	GAG	Glu	E	25	GGG	Gly	G	0

Fig. 16. Codongebrauch im *hgdA*-Gen aus *C. symbiosum*. Die Aminosäuren sind im Drei-Buchstaben-Code und im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Die Zahlen entsprechen der Häufigkeit des Auftretens eines Codons.

Aminosäuren	Anzahl	Häufigkeit (%)
stark basisch (KR)	61	12,7
stark sauer (DE)	72	15,0
hydrophobe (AILFWV)	164	34,1
polare (NCQSTY)	109	22,7
Insgesamt	480	100

Fig. 17. Aminosäurezusammensetzung von HgdA aus *C. symbiosum*

Molekulare Masse	53980,6 Da
1 Mikrogramm entspricht	18,5 pmol
Isoelektrischer Punkt	5,22
Ladung bei pH 7	-10,7

Fig. 18. Charakteristische Eigenschaften von HgdA aus *C. symbiosum*.

1.3 Analyse von HgdB aus *C. symbiosum*

Aminosäuren	Anzahl	Häufigkeit (%)
stark basisch (KR)	43	11,2
stark sauer (DE)	56	14,6
hydrophobe (AILFWV)	141	36,8
polare (NCQSTY)	89	23,2
Insgesamt	383	100

Fig. 19. Aminosäurezusammensetzung von HgdB aus *C. symbiosum*

Molekulare Masse	43032,5 Da
1 Mikrogramm entspricht	23,2 pmol
Isoelektrischer Punkt	4,86
Ladung bei pH 7	-12,8

Fig. 20. Charakteristische Eigenschaften von HgdB aus *C. symbiosum*.

TTT	Phe	F	5	TCT	Ser	S	2	TAT	Tyr	Y	6	TGT	Cys	C	5
TTC	Phe	F	14	TCC	Ser	S	4	TAC	Tyr	Y	7	TGC	Cys	C	2
TTA	Leu	L	5	TCA	Ser	S	0	TAA	Ter	*	1	TGA	Ter	*	0
TTG	Leu	L	3	TCG	Ser	S	0	TAG	Ter	*	0	TGG	Trp	W	2
CTT	Leu	L	10	CCT	Pro	P	2	CAT	His	H	2	CGT	Arg	R	9
CTC	Leu	L	1	CCC	Pro	P	0	CAC	His	H	1	CGC	Arg	R	4
CTA	Leu	L	0	CCA	Pro	P	7	CAA	Gln	Q	1	CGA	Arg	R	0
CTG	Leu	L	13	CCG	Pro	P	7	CAG	Gln	Q	20	CGG	Arg	R	0
ATT	Ile	I	8	ACT	Thr	T	5	AAT	Asn	N	7	AGT	Ser	S	2
ATC	Ile	I	15	ACC	Thr	T	4	AAC	Asn	N	10	AGC	Ser	S	7
ATA	Ile	I	1	ACA	Thr	T	7	AAA	Lys	K	17	AGA	Arg	R	0
ATG	Met	M	16	ACG	Thr	T	0	AAG	Lys	K	13	AGG	Arg	R	0
GTT	Val	V	11	GCT	Ala	A	10	GAT	Asp	D	12	GGT	Gly	G	9
GTC	Val	V	2	GCC	Ala	A	9	GAC	Asp	D	12	GGC	Gly	G	5
GTA	Val	V	9	GCA	Ala	A	20	GAA	Glu	E	17	GGA	Gly	G	5
GTG	Val	V	1	GCG	Ala	A	2	GAG	Glu	E	15	GGG	Gly	G	0

Fig. 21. Codongebrauch im *hgdB*-Gen aus *C. symbiosum*. Die Aminosäuren sind im Drei-Buchstaben-Code und im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Die Zahlen entsprechen der Häufigkeit des Auftretens eines Codons.

2. Optimierung der Reinigungsmethoden der Komponente D aus *C. symbiosum* und *A. fermentans*.

Während für die Komponente D aus *C. symbiosum* im Rahmen einer Diplomarbeit eine reproduzierbare vier Chromatographieschritte umfassende Reinigungsprozedur etabliert werden konnte [51], fehlte eine vergleichbare Methode für das Enzym aus *A. fermentans*. Die weiteren biochemischen Arbeiten zeigten jedoch, daß sich beide Proteine sehr ähnlich verhalten, das aufgrund der hohen Sequenzidentitäten auch zu erwarten war. Somit konnte für Komponente D aus beiden Organismen eine identische, lediglich drei Chromatographieschritte umfassende Reinigungsmethode etabliert werden. Der erste Schritt war eine Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose. Komponente D eluierte zwischen 0,2 und 0,3 M NaCl. Es folgte eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie an Phenyl-Sepharose. Dabei eluierte das Protein mit absteigendem Ammoniumsulfat-Gradienten zwischen 0,5 und 0,3 M Ammoniumsulfat. Letzte Verunreinigungen wurden durch eine weitere Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose entfernt. Das homogene Protein eluierte mit steigendem NaCl-Gradienten bei 0,3 M NaCl. Nachfolgend konnte Komponente D mit einer Rührzelle (YM30-Filter) ankonzentriert und bei -20 °C anaerob gelagert werden.

Komponente D aus *C. symbiosum*

Reinigungsschritt	Aktivität	Protein	Spez. Aktivität	Reinigung	Ausbeute
	U	mg	U/mg	-fach	%
Rohextrakt	3033	2376	1.27	1.0	100
DEAE-Sepharose	2250	1051	2.14	1.68	74
Phenyl-Sepharose	1260	167	7.56	5.90	42
Q-Sepharose	864	27	32.0	25.1	28

Komponente D aus *A. fermentans*

Reinigungsschritt	Aktivität	Protein	Spez. Aktivität	Reinigung	Ausbeute
	U	mg	U/mg	-fach	%
Rohextrakt	2300	2700	0,9	1,0	100
DEAE-Sepharose	1500	1230	1,2	1,3	65
Phenyl-Sepharose	1100	185	5,9	6,5	47
Q-Sepharose	426	52	8,2	9,1	19

Fig. 22. Reinigung der Komponente D (HgdAB) der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* und *A. fermentans*. Die Enzyme wurden aus je 25 g Feuchtzellen isoliert.

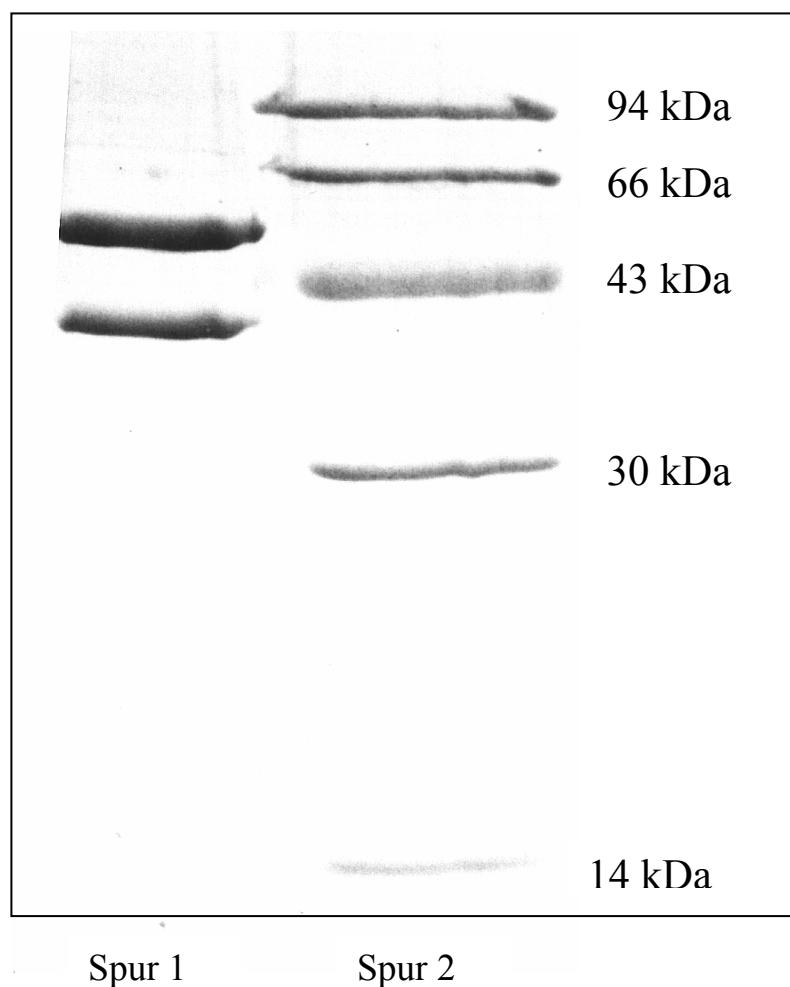


Fig. 23. SDS/PAGE der gereinigten Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum*. SDS/PAGE (15% Acrylamid) mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Spur 1: 10 µg gereinigtes Protein, Spur 2: Marker-Proteine.

Die Reinigungstabellen zeigen, daß mit der gleichen Prozedur aus *A. fermentans* verglichen mit *C. symbiosum* etwa die 2-fache Menge (52 mg) Komponente D isoliert werden konnte. Des weiteren wies das Enzym aus *A. fermentans* mit 8 U/mg eine deutlich geringere spezifische Aktivität als Komponente D aus *C. symbiosum* (32 U/mg) auf. Da beide Komponenten D fast identische molekulare Massen besitzen, zeigten sie identisches Laufverhalten im SDS/PAGE [50], weshalb ausschließlich Komponente D aus *C. symbiosum* abgebildet ist.

3. Eigenschaften der Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* sowie Charakterisierung der prosthetischen Gruppen

Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* ist ein heterodimeres Enzym ($\alpha\beta$, 96 kDa), das durch SDS/PAGE (Fig. 23) sowie durch Gelfiltrationsexperimente mit Superose 12-Material bestätigt werden konnte. Chemische Analysen ergaben $7,5 \pm 0,3$ Nicht-Häm-Eisen/Dimer sowie $8,1 \pm 0,4$ säurelabilen Schwefel/Dimer. Diese Stöchiometrie weist auf die Anwesenheit zweier [4Fe-4S]Cluster hin. Kombinierte HPLC- und UV-vis-Experimente identifizierten $1,0 \pm 0,1$ Riboflavin-5'-monophosphat (FMN) als weitere prosthetische Gruppe. In manchen Präparationen wurden bis zu 0,2 Riboflavin/Dimer nachgewiesen. Hierbei wird es sich jedoch höchstwahrscheinlich um unspezifisch gebundenes Riboflavin oder um das Hydrolyseprodukt des FMN gehandelt haben, zumal der Riboflavinanteil nie mit der spezifischen Aktivität korrelierte.

3.1 UV-vis Spektrum der nativen Komponente D aus *C. symbiosum*

Das UV-vis-Spektrum der nativen Komponente D aus *C. symbiosum* zeigte eine Absorption bei 420 nm, die wiederum auf einen [4Fe-4S]²⁺Cluster hinweist. Aus der Proteinkonzentration errechnet sich ein molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{420} = 32 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Da [4Fe-4S]²⁺Cluster gewöhnlich Extinktionskoeffizienten von 13-20 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ aufweisen, liegen wahrscheinlich zwei [4Fe-4S]²⁺Cluster im Protein vor. Dies legte auch die chemische Bestimmung von 8,1 Nicht-Häm Eisen und 7,0 säurelabilem Schwefel/Dimer nahe. Interessanterweise ist kein

Flavinanteil im Spektrum sichtbar. Sowohl der oxidierte (Benzochinon-) Zustand wie auch der radikalische (Semichinon-) Zustand zeigen starke Absorptionen im UV-vis. Dies zeigt, daß das FMN im vollreduzierten (Hydrochinon-) Zustand vorliegt, welcher im sichtbaren Wellenlängenbereich nur sehr schwach absorbiert ($\epsilon_{400} = 4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Nur Denaturierung des Proteins durch Hitze oder 3 % Trichloressigsäure führte zur Freisetzung des Flavins im Benzochinonzustand und somit zur Detektion.

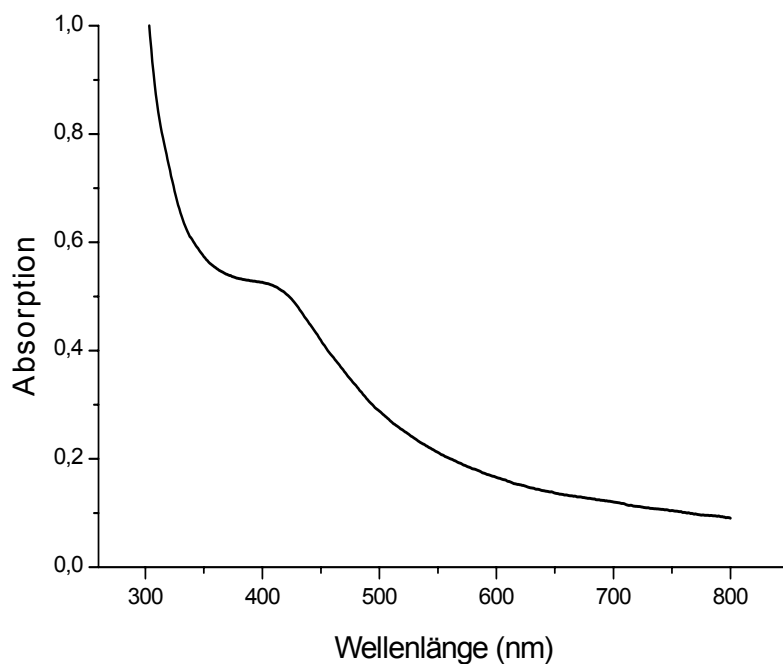


Fig. 24. UV-vis-Spektrum der nativen Komponente D aus *C. symbiosum*. Die Proteinkonzentration betrug 1,6 mg/mL (16,6 μM).

3.2 Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster der Komponente D aus *C. symbiosum* mit EPR- und Mössbauer-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster wurden EPR-Experimente an nativer Komponente D und in Gegenwart von starken Reduktionsmitteln wie Dithionit oder 5'-Deazaflavin/Licht/Oxalat durchgeführt. Native Komponente D gab lediglich ein typisches Signal eines $[3\text{Fe-4S}]^+$ Clusters bei $g = 2,01$ mit einer Spinkonzentration von 10-15 %. Dies zeigte, daß mindestens 85 % der Eisen-Schwefel-Zentren diamagnetisch waren (Fig. 25). Um die Eisen-Schwefel-Cluster zu reduzieren und somit in einen paramagnetischen Zustand zu überführen, wurde Komponente D mit starken Reduktionsmitteln versetzt. Aber auch so ließen sich keine EPR-Signale der Cluster detektieren (Fig. 26). Der $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster wurde mit Photoreduktion kaum zum $[3\text{Fe-4S}]^0$ Cluster reduziert, das sehr ungewöhnlich ist. Diese Cluster besitzen meist Mittelpunkt-Redoxpotentiale von -100 mV.

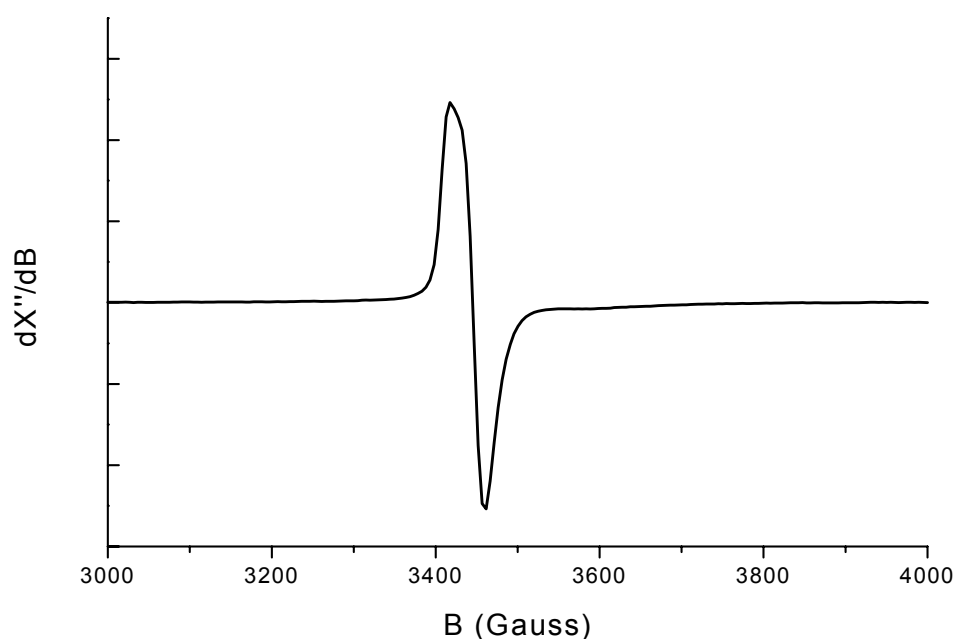


Fig. 25. EPR-Spektrum nativer Komponente D aus *C. symbiosum*. Meßbedingungen: Frequenz: 9,642 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 2 mW.

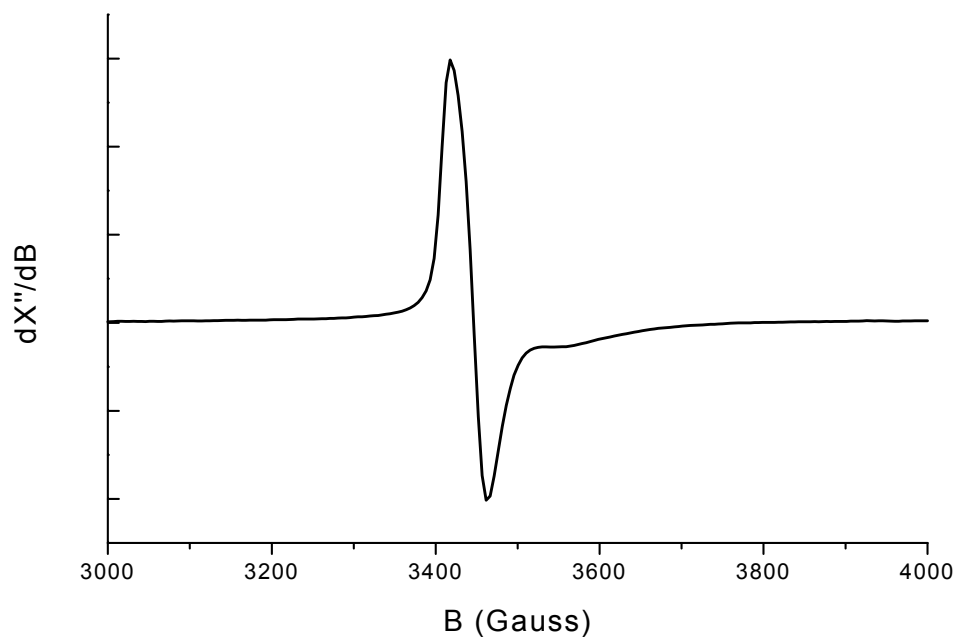


Fig. 26. EPR-Spektrum der nativen Komponente D aus *C. symbiosum* nach Photoreduktion. Meßbedingungen: Frequenz: 9,642 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 2 mW. Bedingungen der Photoreduktion: 10 mM Natriumoxalat, 10 μ M 5'-Deazariboflavin, 10 minütige Bestrahlung mit Licht.

In Fig. 26 ist in sehr geringem Maße ein Signal bei $g \sim 1,95$ sichtbar, welches einem $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster zugeordnet werden kann. Die Intensität ist jedoch für eine Quantifizierung zu gering. Zusatz von 60 % anaerobem DMSO und nachfolgende Photoreduktion führte zur fast vollständigen Reduktion des $[3\text{Fe-4S}]^+$ Clusters, die im Parallel Mode EPR-Spektrum durch ein unaufgelöstes breites Signal bei tiefem Feld (0-50 mT) gezeigt werden konnte. Dieses Signal stammt von einem Integer Spin $S = 2$ des $[3\text{Fe-4S}]^0$ Clusters (Fig. 28). Im Perpendicular Mode wird ein Signal mit g -Werten < 2 sichtbar, welches einem $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster zugeordnet werden kann (Fig. 27). Der Zusatz von DMSO führt jedoch zu inaktivem, nicht nativ gefaltetem Enzym. Deswegen handelt es sich hier nur um einen Hinweis auf einen $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster im nativen Enzym. Der Zusatz von DMSO ist in der Literatur als eine Möglichkeit beschrieben worden, Proteine partiell zu entfalten, um so schwer reduzierbare Eisen-Schwefel-Cluster zu erreichen [126].

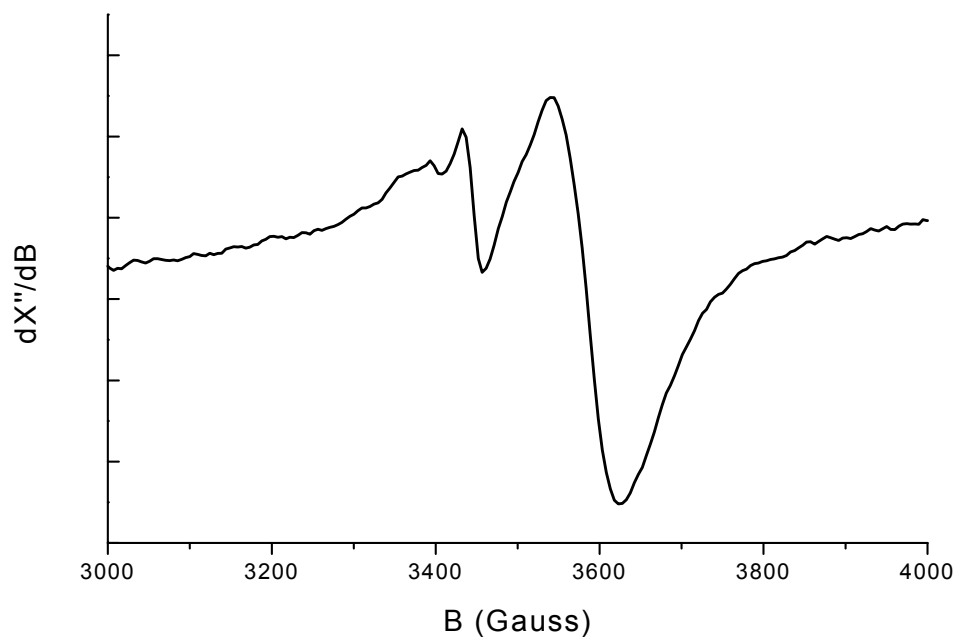


Fig. 27. EPR-Spektrum von Komponente D aus *C. symbiosum* in 60 % DMSO. Meßbedingungen: Frequenz: 9,642 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 2 mW

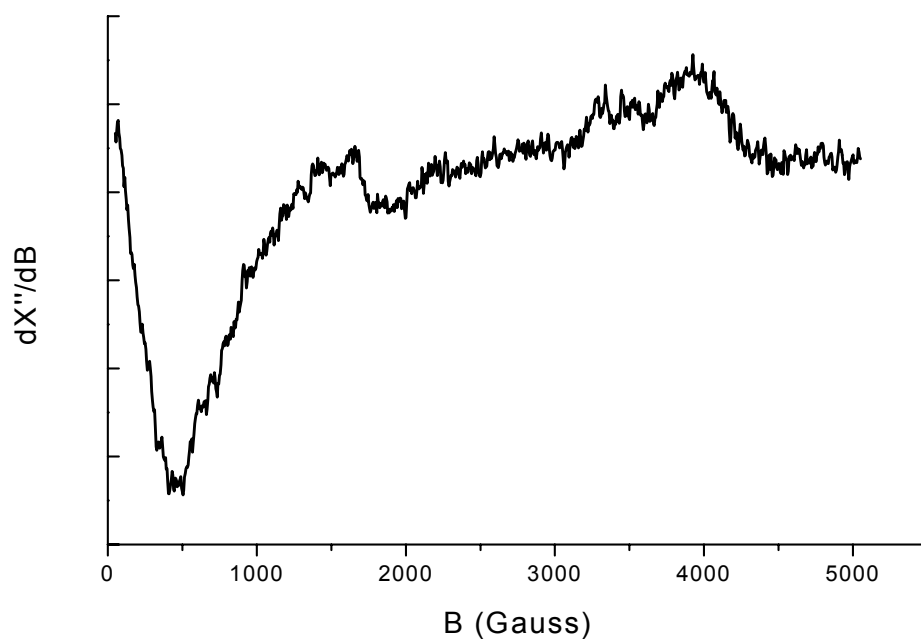
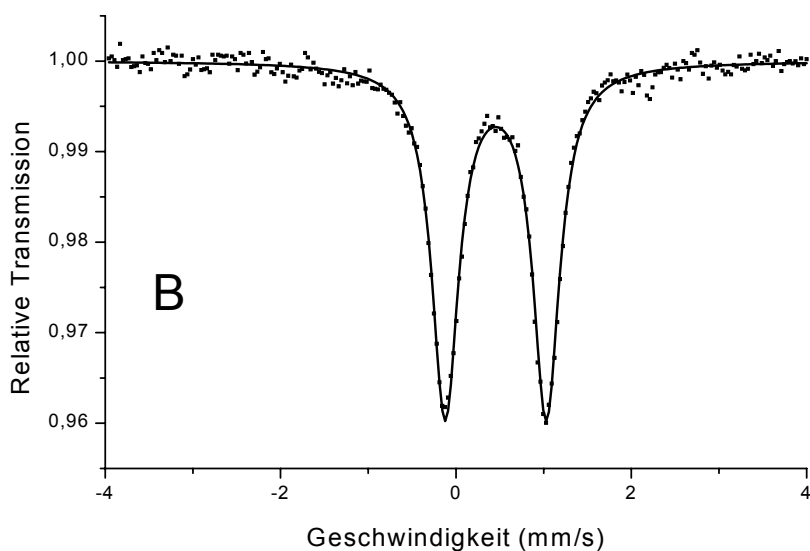
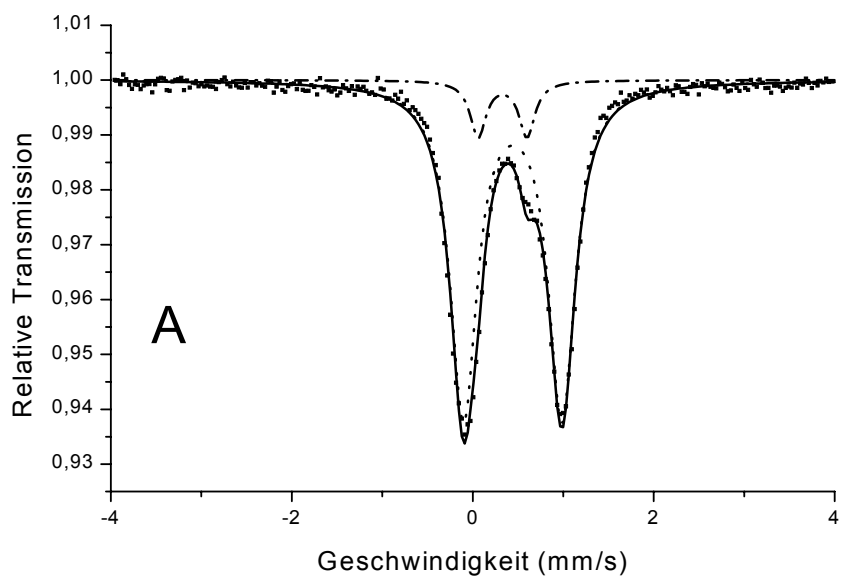


Fig. 28. Parallel Mode-EPR Spektrum der Komponente D aus *C. symbiosum* in 60 % DMSO. Meßbedingungen: Frequenz: 9,355 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 2 mW

Erst die Anwendung der Mössbauer-Spektroskopie konnte belegen, daß in nativer Komponente D aus *C. symbiosum* diamagnetische und somit EPR-inaktive $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster vorlagen (Fig. 29). Eine Isomerieverschiebung δ von 0,43 mm/s und eine Quadrupolaufspaltung ΔE_Q von 1,05 deuten auf $\text{Fe}^{+2,5}$ in einer tetraedrischen Schwefelkoordination hin.



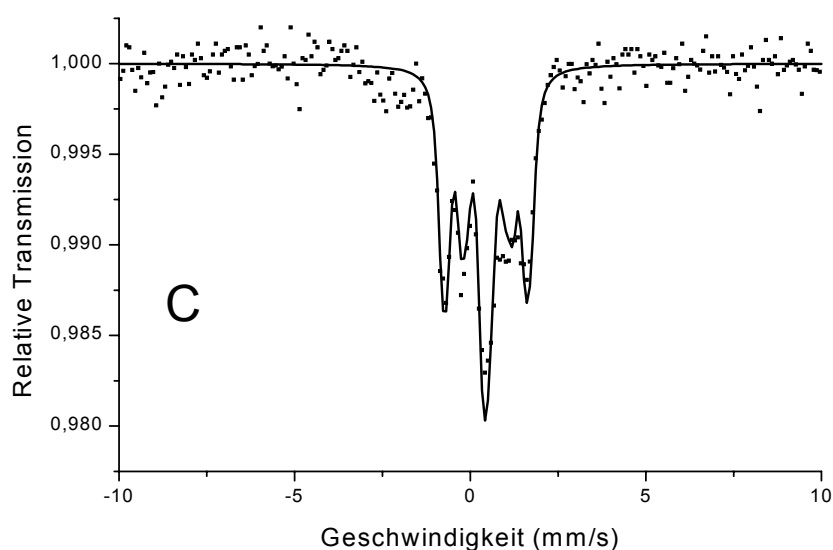


Fig. 29. Mössbauer-Spektren der nativen Komponente D aus *C. symbiosum*. (A) Nullfeldspektrum bei 80 K. Das Spektrum konnte mit zwei Quadrupol-Dubletts simuliert werden: (1) Dublett 1 (10 % relative Intensität). $\delta = 0,30$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,84$ mm/s, $\Gamma = 0,20$ mm/s. (2) Dublett 2 (90 % relative Intensität). $\delta = 0,43$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,05$ mm/s, $\Gamma = 0,32$ mm/s. (B) Nullfeldspektrum bei 4 K. Das Spektrum konnte mit einem Quadrupol-Dublett simuliert werden. $\delta = 0,43$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,05$ mm/s, $\Gamma = 0,37$ mm/s. (C) Spektrum in Anwesenheit eines externen Feldes von 7 T. Das Spektrum konnte unter der Annahme, daß alle Fe-Atome eine diamagnetische Umgebung aufweisen ($S = 0$) mit folgenden Asymmetrie-Parametern simuliert werden: $\eta = 0,8$ mm/s, $\Gamma = 0,25$ mm/s.

In einem diamagnetischen $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster sind die Ladungen komplett delokalisiert, wodurch jedes Eisen-Atome den gleichen Oxidationszustand aufweist. Der Diamagnetismus wurde durch Messung in einem 7 Tesla-Magnetfeld sowie Simulation des $S = 0$ Zustandes nachgewiesen (Fig. 29C). Im 80 K-Nullfeldspektrum (Fig. 29A) ist der Anteil von etwa 10 % eines $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster deutlich sichtbar, der schon durch das EPR-Spektrum (Fig. 25) gezeigt werden konnte. Die Parameter deuten auf Fe^{+3} in tetraedrischer Schwefel-Koordination. Bei 4 K ist dieser Anteil nicht mehr detektierbar; dieses Temperaturverhalten ist für $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster typisch. Die Anwendung kombinierter EPR- und Mössbauer-Spektroskopie zeigt deutlich, daß 90 % diamagnetische $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster und lediglich 10 % $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster vorliegen.

4. Eigenschaften der Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* sowie Charakterisierung der prosthetischen Gruppen

4.1 UV-vis Spektrum der nativen Komponente D aus *A. fermentans*

Chemische Analyse des Eisen-Schwefel-Gehaltes der Komponente D aus *A. fermentans* von 4,2 Nicht-Häm Eisen und 3,5 säurelabilem Schwefel/Dimer deuten auf einen [4Fe-4S]Cluster hin. UV-vis-Spektroskopie am nativen Enzym zeigte die für [4Fe-4S]Cluster typische Absorption bei 420 nm (Fig. 30). Der berechnete molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{420} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ würde für die Anwesenheit nur eines [4Fe-4S]Clusters sprechen. Wie schon für Komponente D aus *C. symbiosum* beschrieben, ist im UV-vis kein Flavinanteil sichtbar, HPLC- und UV-vis-Analytik ergaben jedoch 1,0 FMN/Dimer. Das FMN liegt somit vollreduziert im Hydrochinon-Zustand vor.

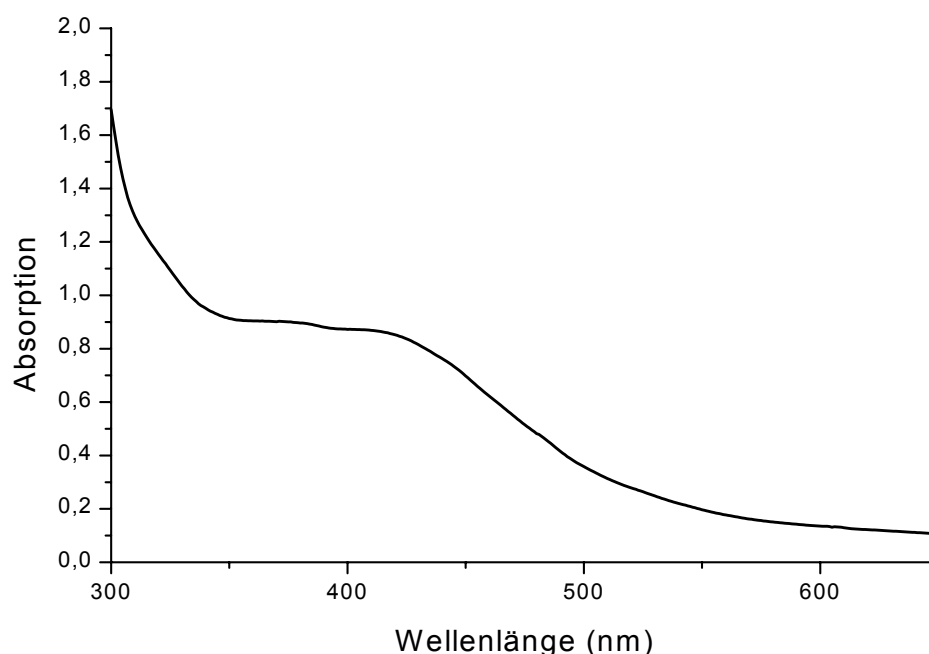


Fig. 30. UV-vis-Spektrum der nativen Komponente D aus *A. fermentans*. Die Proteinkonzentration betrug 3,8 mg/mL (40,1 μM).

4.2 Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster der Komponente D aus *A. fermentans* mit EPR- und Mössbauer-Spektroskopie

Die EPR- und Mössbauer-Daten der Komponente D aus *A. fermentans* ähneln sehr den gewonnenen Daten aus *C. symbiosum*. Im nativen Zustand ist im EPR-Spektrum lediglich ein $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster-Signal bei $g = 2,01$ mit einer Spinkonzentration von 10-15 %, abhängig von der Proteinprobe, detektierbar (Fig. 31). Dies zeigt, daß der Großteil der Eisen-Schwefel-Cluster (85-90 %) diamagnetisch ist und somit im EPR kein Signal ergibt.

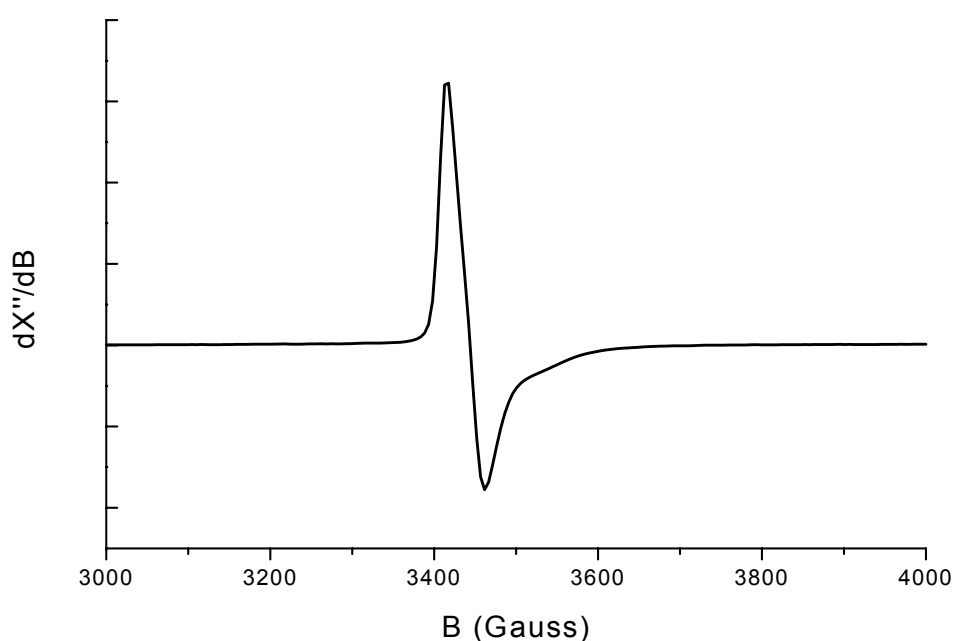


Fig. 31. EPR-Spektrum nativer Komponente D aus *A. fermentans*. Meßbedingungen: Frequenz: 9,642 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 2 mW.

Reduktion mit Dithionit oder 5'-Deazariboflavin führt im Gegensatz zum Enzym aus *C. symbiosum* zur fast vollständigen Reduktion des $[3\text{Fe-4S}]^+$ Clusters, wie in Fig. 32 dargestellt. Zusätzlich war ein sehr schwaches breites Signal bei $g = 2,1 - 1,9$ detektierbar, das nicht zu einem Eisen-Schwefel-Zentrum gehören kann. Zusatz von 60 % DMSO und nachfolgende Photoreduktion mit 5'-Deazariboflavin führte ebenfalls zur Entstehung eines Signals bei $g_{av} < 2$, welches einem $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster zugeordnet werden konnte (Fig. 33). Mössbauer-Spektroskopie zeigte schließlich, daß im nativen Enzym zu 80-90 % diamagnetische $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster vorhanden waren. Das Nullfeld-Spektrum konnte in Analogie zum Spektrum der

Komponente D aus *C. symbiosum* mit 2 Quadrupoldoublets simuliert werden (Fig. 34A), dessen Parameter einem $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster (10 % relative Intensität) und einem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster entsprechen.

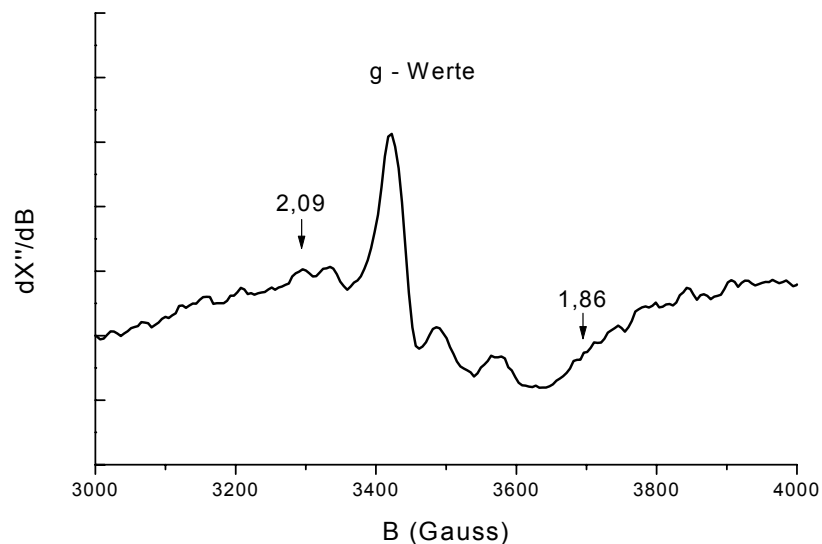


Fig. 32. EPR-Spektrum der nativen Komponente D aus *A. fermentans* nach Photoreduktion. Meßbedingungen: Frequenz: 9,642 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 2 mW. Bedingungen der Photoreduktion: 10 mM Natriumoxalat, 10 μM 5'-Deazariboflavin, 10 minütige Bestrahlung mit Licht.

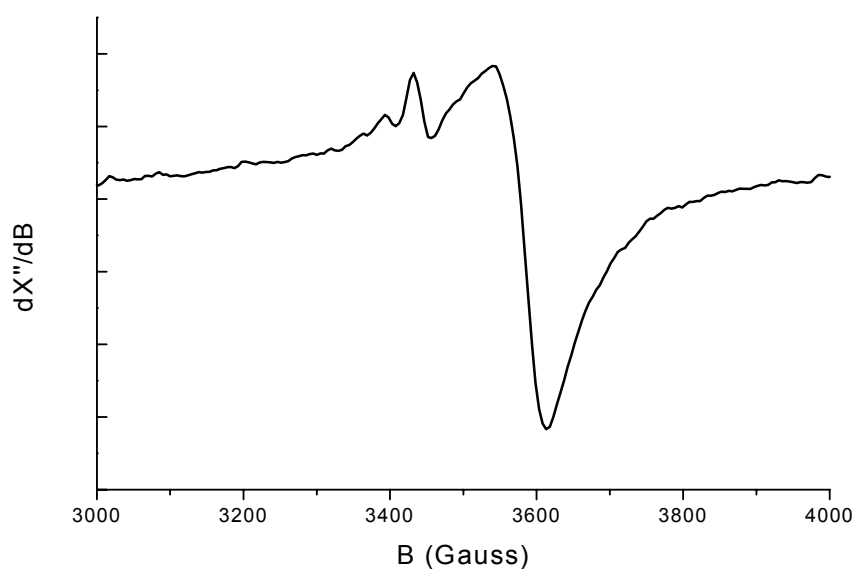


Fig. 33. EPR-Spektrum der Komponente D aus *A. fermentans* in 60 % DMSO nach Photoreduktion. Meßbedingungen: Frequenz: 9,642 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 2 mW. Bedingungen der Photoreduktion: 10 mM Natriumoxalat, 10 μM 5'-Deazariboflavin, 10 minütige Bestrahlung mit Licht.

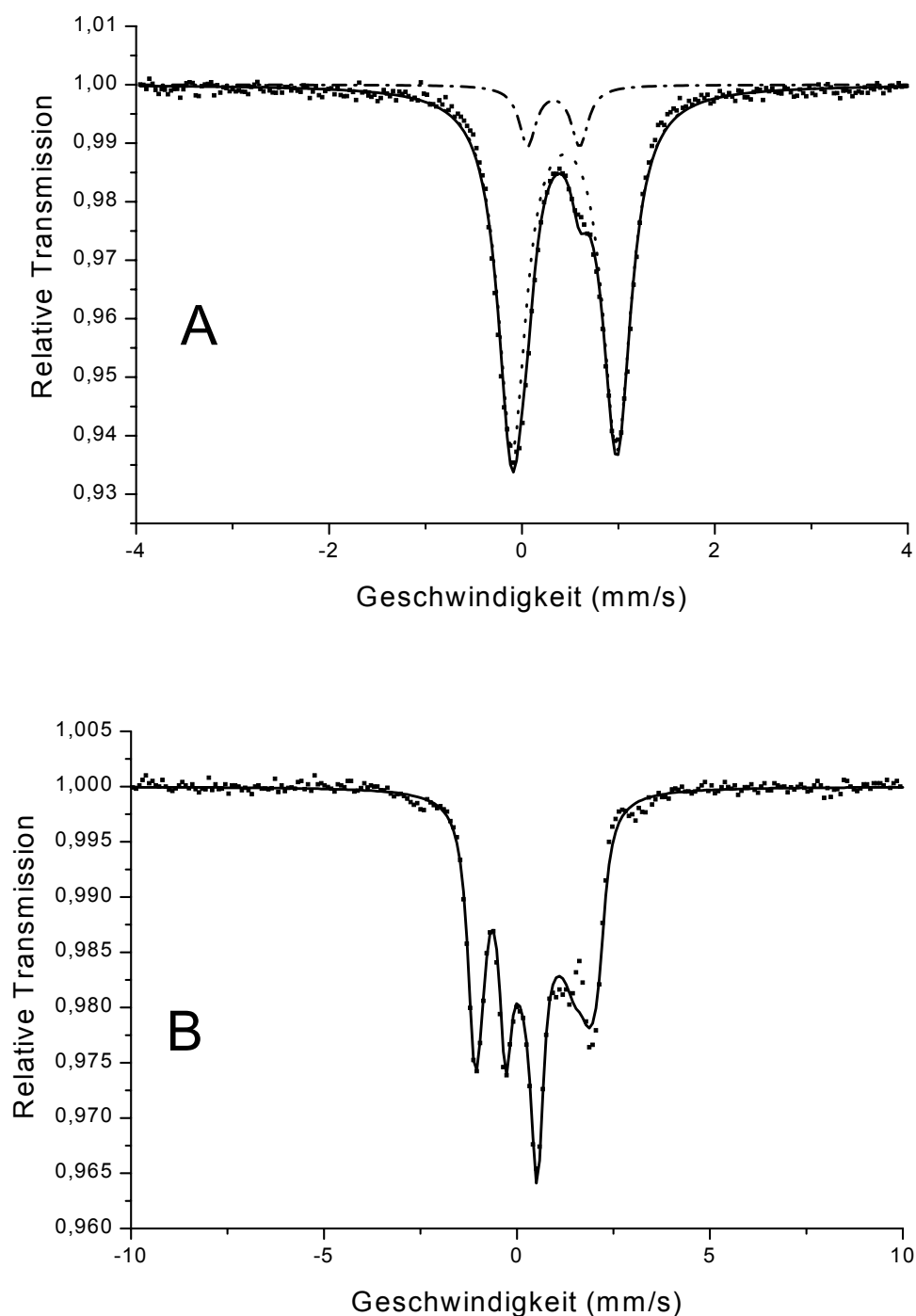


Fig. 34. Mössbauer-Spektren von nativer Komponente D aus *A. fermentans*. (A) Nullfeldspektrum bei 80 K. Das Spektrum konnte mit zwei Quadrupol-Dubletts simuliert werden: (1) Dublett 1 (10 % relative Intensität). $\delta = 0,29$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,90$ mm/s, $\Gamma = 0,22$ mm/s. (2) Dublett 2 (90 % relative Intensität). $\delta = 0,44$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,10$ mm/s, $\Gamma = 0,32$ mm/s. (B) Spektrum in Anwesenheit eines externen Feldes von 7 T. Das Spektrum konnte mit der Annahme, daß alle Fe-Atome eine diamagnetische Umgebung aufweisen ($S = 0$) mit folgenden Asymmetrie-Parametern simuliert werden: $\eta = 0,8$ mm/s, $\Gamma = 0,27$ mm/s.

4.3 Resistenz der prosthetischen Gruppen der Komponente D aus *A. fermentans* gegen Veränderung des Oxidationszustandes.

Die spektroskopischen Untersuchungen an der Komponente D aus *A. fermentans* haben bereits gezeigt, daß sich der $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster als resistent gegen Reduktion mit den herkömmlichen Reduktionsmitteln wie Dithionit oder Photoreduktion mit 5'-Deazariboflavin erwiesen hat. Die Versuche, den $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster mit Cyanoferrat (III) zum $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ Cluster zu oxidieren, waren ebenfalls nicht erfolgreich. Die weiteren Untersuchungen zum Redoxverhalten des reduzierten FMN zeigten weiterhin, daß dieser Kofaktor weder mit Thionin, 2,6-Dichloroindophenol oder Cyanoferrat(III) oxidiert werden konnte. Der Zusatz von letzterem führte zur Ablösung des Flavins und zur Zerstörung des Eisen-Schwefel-Clusters. Sowohl das FMN-Hydrochinon als auch der $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster sind gegen Veränderungen des Redoxzustandes geschützt. Erst Inkubation der Proteine unter aeroben Bedingungen für mehrere Tage führte zur Oxidation des Flavins, größtenteils wurde der Kofaktor jedoch aus dem Enzym herausgelöst. Somit könnten diesen Redoxzuständen der Kofaktoren eine wichtige Rolle in der Katalyse zukommen.

5. Klonierung und Expression der Gene *hgdAB* der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* in *E. coli*.

Die Gene *hgdAB* der Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* konnten kloniert und zusammen in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden. PCR-Ansätze mit den Primern *hgd1* (5'-GCGCGCACTAGTAAAGAAGGAAGGA-TCATTATGCCA-3') und *hgd2* (5'-GCGCGCCTCGAGCTTACAGGCTT-TCTGCGAAAGCTT-3') sowie genomischer DNA aus *A. fermentans* führten zu einem 2,5 kb-DNA-Fragment, welches beide Gene *hgdAB* der Komponente D beinhaltet. Nach Restriktion des Fragments, welches eine BamH1-Schnittstelle beinhaltet, mit den Restriktionsendonukleasen SpeI, XhoI (deren Schnittstellen in den Primern unterstrichen hervorgehoben sind) sowie BamH1 wurden zwei etwa 1,2 kb große DNA-Fragmente erhalten.

Die Fragmente wurden getrennt in pBlueskript KS entgegen der Richtung des lac-Promotors kloniert. Anschließend wurden die Plasmide aus *E. coli* XL1blue MRF^c isoliert und die Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten. Durch eine Ligation, in der beide Fragmente sowie der mit SpeI und XhoI vorbehandelte pBlueskript-Vektor eingesetzt wurden, konnten die Gene *hgdAB* entgegen der Richtung des lac-Promotors kloniert werden. Das Plasmid wurde zur Expression von *hgdAB* in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Zellen wurden anaerob auf Minimal-Medium M9 mit Casaminosäuren bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 gezogen und mit 1 mM IPTG induziert. Nach drei Stunden wurde durch anaerobe French Press aufgeschlossen. Rohextraktmessungen zeigten, daß die rekombinante Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aktiv war.

5.1 Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Komponente D aus *E. coli*

Die Reinigung der rekombinanten Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *E. coli* wurde mit dem gleichen Reinigungsschema durchgeführt wie für das Wildtyp-Protein aus *A. fermentans* beschrieben. Aus 5-7 g *E. coli*-Feuchtzellen ließen sich ca. 2,5 mg rekombinante Komponente D mit einer spezifischen Aktivität von 3,0 U/mg isolieren (Fig. 35). Dies entspricht etwa 60 % der spezifischen Aktivität des Wildtyp-Enzyms.

Das UV-Vis-Spektrum zeigte die für [4Fe-4S]²⁺Cluster typische Absorption bei 400 nm (Fig. 36). Ein Flavinanteil war nicht zu beobachten, somit lag das FMN wie im Wildtyp-Enzym als Hydrochinon vor. Der Nachweis des FMN erfolgte durch Hitzeinaktivierung des Proteins, wodurch das Flavin als Benzochinon herausgelöst und mit UV-vis-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte (Fig. 37). Der FMN-Gehalt lag bei 0,3 FMN/Heterodimer, woraus die etwas niedrigere spezifische Aktivität des rekombinanten Proteins erklärt werden kann. Die Daten zeigen, daß *E. coli* in der Lage ist, unter anaeroben Bedingungen sowohl das FMNH₂ als auch den [4Fe-4S]²⁺Cluster in Komponente D einzubauen. Zusätzliche spezielle Enzymsysteme sind offensichtlich nicht erforderlich.

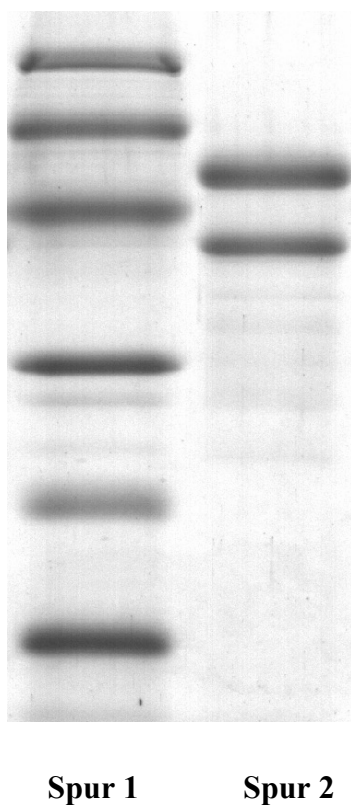


Fig. 35. SDS-PAGE der gereinigten rekombinanten Komponente D aus *E. coli* der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase von *A. fermentans*. Spur 1: Molekularmassenmarker; Spur 2: 10 µg homogene rekombinante Komponente D.

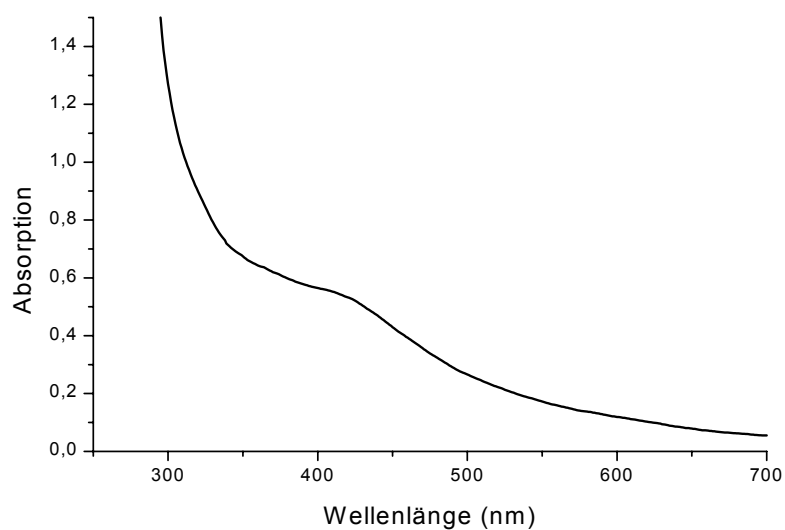


Fig. 36. UV-vis-Spektrum der rekombinanten Komponente D aus *A. fermentans*. Proteinkonzentration 30 µM.

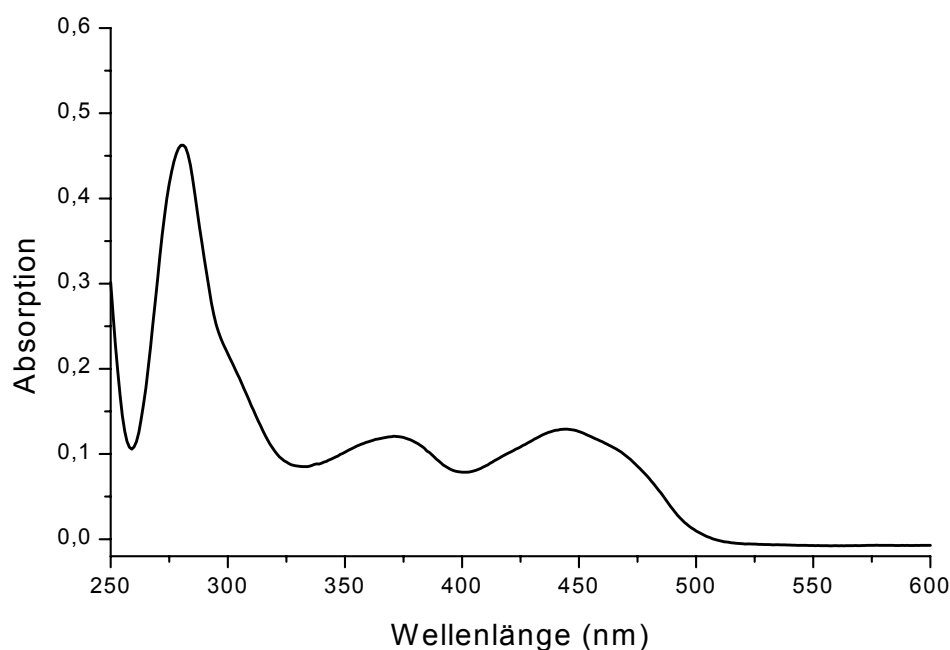


Fig. 37. UV-vis-Spektrum des hitzedenaturierten Überstandes der rekombinanten Komponente D-Präparation. Mit dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{450} von 12,4 errechnet sich eine Flavinkonzentration von 10 μM , was 0,3 FMN/Heterodimer entspricht.

6. Reinigung und Stabilisierung der rekombinanten Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* mit StrepTactin-Affinitätschromatographie

Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase ist ein sehr sauerstoffempfindliches Enzym. Die Halbwertszeit unter aeroben Bedingungen liegt nur bei wenigen Sekunden. Das Protein erwies sich in früheren Arbeiten als äußerst instabil, wodurch eine erfolgreiche reproduzierbare Reinigung und Charakterisierung nicht möglich war. Herkömmliche Säulenchromatographie an Anionenaustauschern oder hydrophobem Material war nur unter fast vollständigem Verlust der katalytischen Aktivität durchführbar. Erste Versuche, die rekombinante Komponente A mit Affinitätschromatographie zu reinigen, waren nicht erfolgreich; das Enzym mit einem C-terminalen His-Tag war zwar aktiv, konnte aber aufgrund der Elutionsbedingungen (pH < 5 oder 200 mM Imidazol) nicht aktiv von der Säule eluiert werden. Im Rohextrakt wurde es für Aktivitätsbestimmungen der Komponente D eingesetzt. Fusionen mit Intein oder dem maltosebindendem Protein MalE führten stets zu

inaktivem Protein. Erst durch den Einsatz von StrepTactin-Affinitätschromatographie konnte aktive Komponente A zur Homogenität gereinigt werden. Dabei wurde rekombinante Komponente A mit einem C-terminalen Peptid aus 8 Aminosäuren NH₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH synthetisiert, welches eine hohe Affinität zu dem an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Streptavidin besitzt. Nach Kopplung des rekombinanten Proteins an das Streptavidin konnte die Wechselwirkung durch Zusatz von 2-3 mM D-Desthiobiotin aufgehoben und das Enzym so eluiert werden. Das Protein war frei von Verunreinigungen und wies eine spezifische Aktivität von 25-30 U/mg auf (Fig. 38). Aus 1 g rekombinanten *E. coli*-Zellen ließen sich etwa 1-2 mg Komponente A isolieren. Weitere Untersuchungen zeigten, daß das Enzym ohne Zusatz von Mg²⁺-Ionen und Nukleotide (ATP oder ADP) innerhalb einer Stunde komplett inaktiviert wurde (Fig. 39). Zusatz von 10 mM MgCl₂ bewirkte eine hohe Stabilisierung, aber erst die Kombination von 10 mM MgCl₂ und 1 mM ATP bzw. ADP ergab eine Stabilisierung für mehrere Tage. Unter letzteren Bedingungen konnte das Enzym anaerob für etwa 1 Woche ohne erheblichen Verlust der Aktivität bei 4 °C gelagert werden; die extreme Sauerstoffempfindlichkeit blieb jedoch bestehen. Einfrieren und anschließendes Auftauen resultierte immer in vollständiger Inaktivierung.

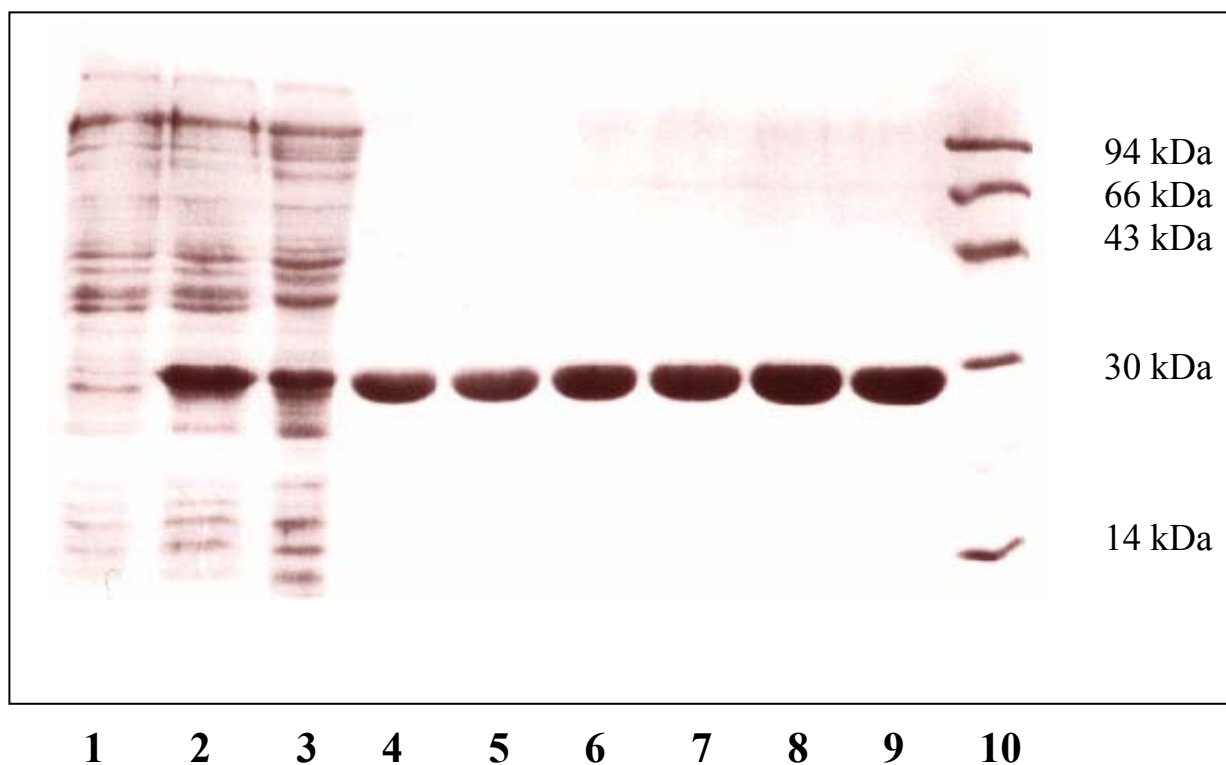


Fig. 38. SDS/PAGE der gereinigten rekombinanten Komponente A aus *A. fermentans*. Spur 1: Uninduzierte Zellen, Spur 2: Zellen nach Induktion mit 50 µg AHT/L, Spur 3: Säulendurchlauf, Spuren 4-9: Fraktionen mit homogener aktiver Komponente A, Spur 10: Molekularmassen - Marker

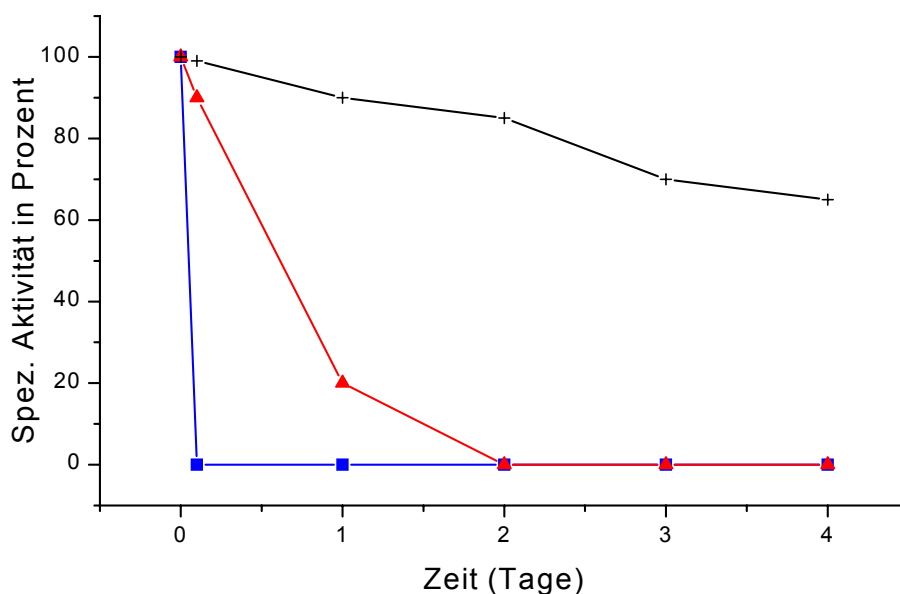


Fig. 39. Stabilität der rekombinanten Komponente A in Abhängigkeit von Magnesiumchlorid und Nukleotiden (ATP oder ADP): (Quadrate) Stabilität ohne Zusatz von MgCl₂ oder Nukleotiden, (Dreiecke) Stabilität durch Zusatz von 10 mM MgCl₂, (Kreuze) Stabilität durch Zusatz von 10 mM MgCl₂ und 1 mM ATP bzw. ADP.

7. Charakterisierung des Eisen-Schwefel-Clusters der rekombinanten Komponente A aus *A. fermentans*

UV-vis-Spektroskopie an rekombinanter Komponente A deutete auf die Anwesenheit eines reduzierten [4Fe-4S]⁺Clusters hin; die typische Absorption bei 420 nm fehlte, anstelle dessen konnte ein Absorptionsmaximum bei 360 nm detektiert werden (Fig. 40). Die Reduktion eines [4Fe-4S]²⁺Clusters ist immer mit einer Abnahme der Absorption, hauptsächlich im Bereich von 350-400 nm, verbunden. In Übereinstimmung damit konnte das Mössbauer-Nullfeld-Spektrum mit Parametern simuliert werden, die auf Fe^{+2,25} in tetraedrischer Schwefel-Koordination hinweisen (Fig. 41). Diese Situation ist im [4Fe-4S]⁺Cluster gegeben.

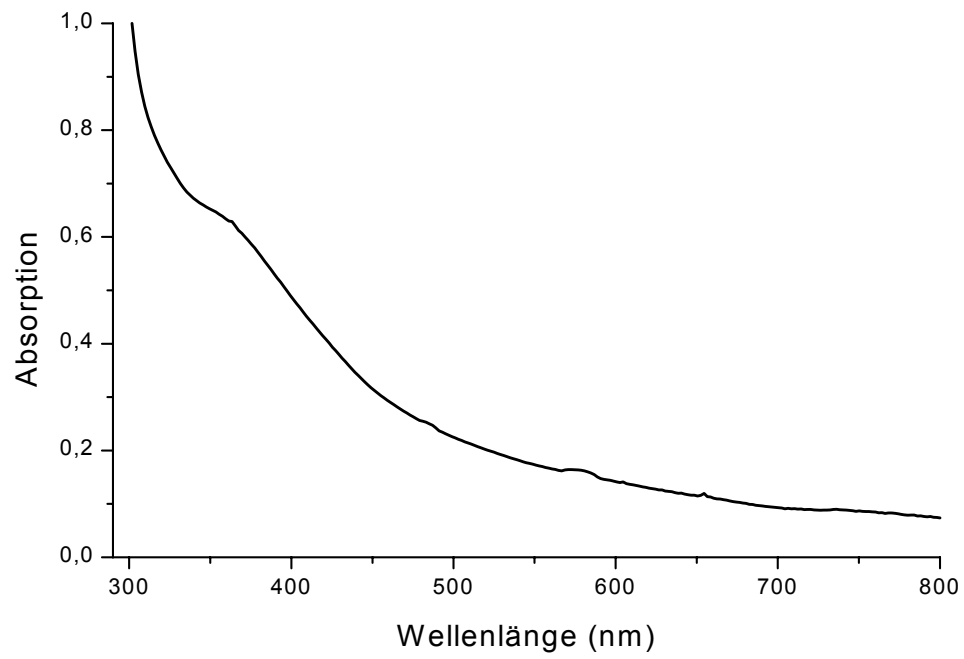


Fig. 40. Native rekombinante Komponente A aus *A. fermentans*. Die Proteinkonzentration betrug 3,1 mg/mL (59 μ M).

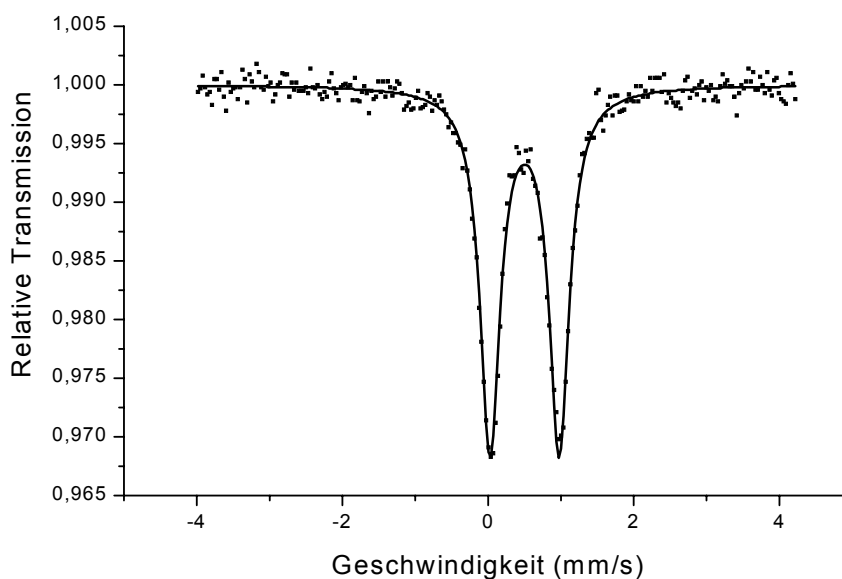


Fig. 41. Nullfeld-Mössbauer-Spektrum nativer rekombinanter Komponente A aus *A. fermentans*. Meßtemperatur: 80 K. Das Spektrum konnte mit einem Quadrupoldublett mit folgenden Parametern simuliert werden: $\delta = 0,53$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,95$ mm/s, $\Gamma = 0,30$ mm/s.

Erste EPR-Untersuchungen bei typischen Meßbedingungen für $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster ergaben jedoch keinen Hinweis auf einen solchen Oxidationszustand. Weitere Experimente zeigten, daß Komponente A einen $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster mit einem ungewöhnlichen Elektronenspin-Grundzustand von $S = 3/2$ enthielt. Die überwiegende Zahl von reduzierten Eisen-Schwefel-Clustern zeigten aufgrund eines $S = 3/2$ - Grundzustandes sehr breite absorptionsähnliche Spektren, bei denen die Signale fast über den gesamten Feldbereich verteilt sind [81, 82] [19]. Ein sehr kleines scharfes Signal bei g -Werten ~ 2 wurde ebenfalls detektiert. Hierbei handelt es sich um 3 % einer $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster-Spezies mit $S = 1/2$, wie Fig. 42B beschreibt. Der $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster in Komponente A liegt also zu 97 % im $S = 3/2$ Grundzustand vor. Dieser Grundzustand konnte unter Verwendung folgender Parameter simuliert werden (Fig. 42A): $D = 1,3 \text{ cm}^{-1}$, $E/D = 0,213$, $\sigma(E/D) = 0,11$, $g = 1,873$, Gauss-Linienbreite 1600 G bei $g = 2$, konstant auf Frequenzachse (d. h. feldabhängig). Dies zeigt also, daß eine Verteilung von Rhombizitäten E/D , also von geometrischen Zuständen des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters angenommen werden muß. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Spektrum aus zwei Signalen der $\pm 1/2$ -sowie $\pm 3/2$ -Dubletts des Spin $3/2$ -Kramers-Systems besteht (Fig. 43). Mössbauer-Spektroskopie in Gegenwart eines externen magnetischen Feldes bestätigte diesen $S = 3/2$ Grundzustand des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters (Fig. 44).

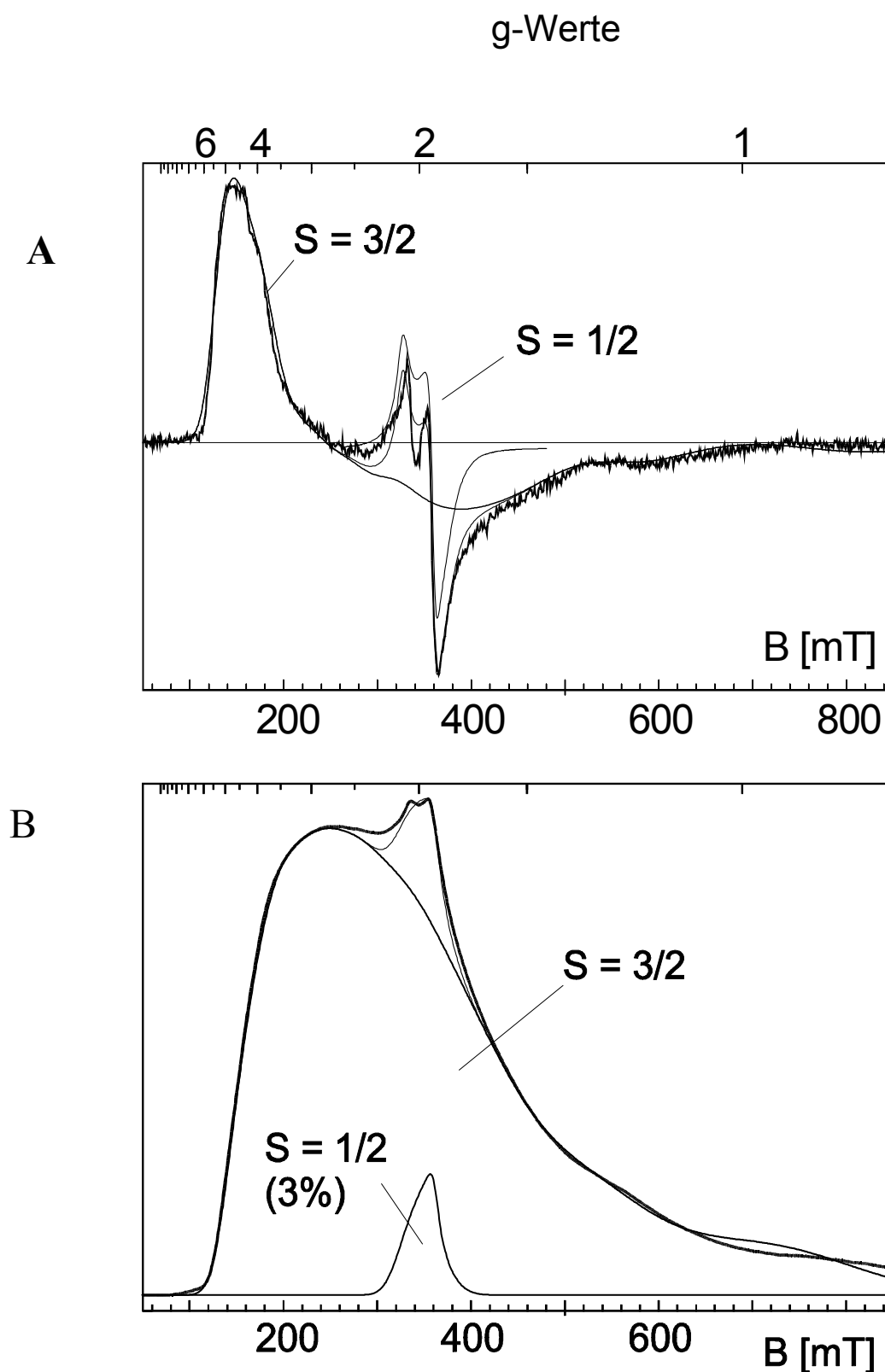


Fig. 42. EPR-Spektrum nativer rekombinanter Komponente A: Das Spektrum zeigt ein $S = 3/2$ System eines $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters. (A) EPR-Spektrum im Bereich von 0-8000 Gauss. Meßbedingungen: Frequenz: 9,6320 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 30 G, Mikrowellenleistung: 50 μW . Die durchgezogenen Linien sind $S = 3/2$ - und $S = 1/2$ - Simulationen mit den im Text angegebenen Parametern. (B) Die Integrationspektren lassen sich mit 97 % $S = 3/2$ sowie 3 % $S = 1/2$ simulieren.

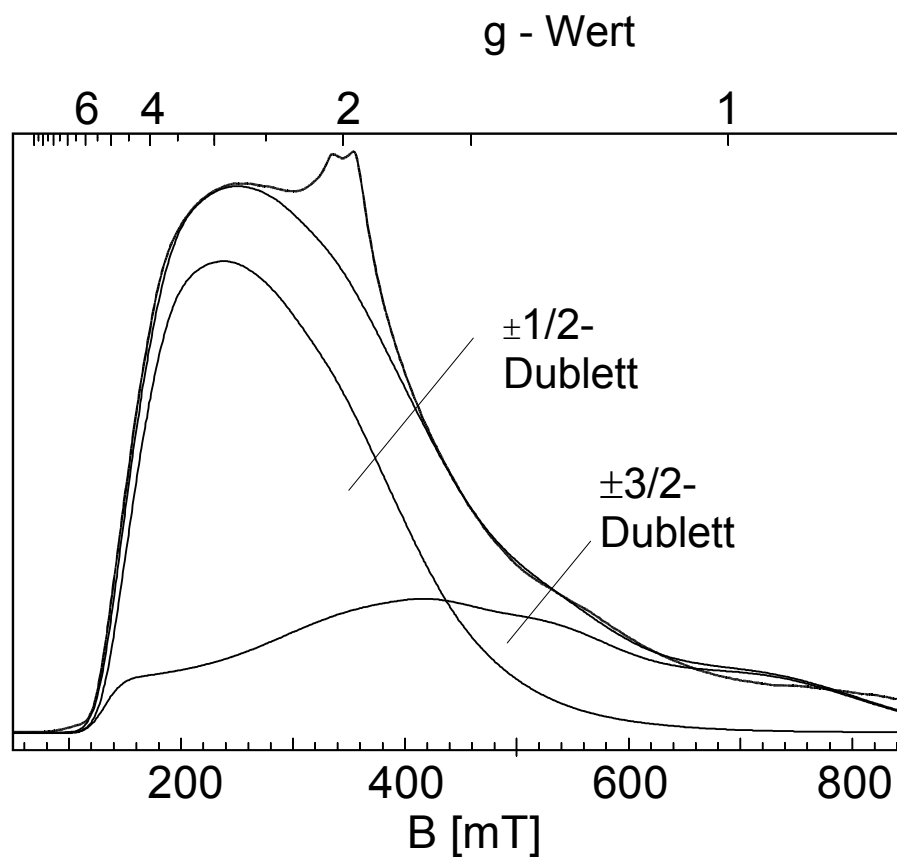


Fig. 43. Integration des EPR-Spektrums aus Fig. 42. Über eine Simulation konnte gezeigt werden, daß das Spektrum aus 2 Signalen besteht, welche dem $\pm 1/2$ -und dem $\pm 3/2$ -Dublett des $S = 3/2$ -Kramers-System zugeordnet werden konnten. Beide Zustände sind etwa zu 50 % besetzt.

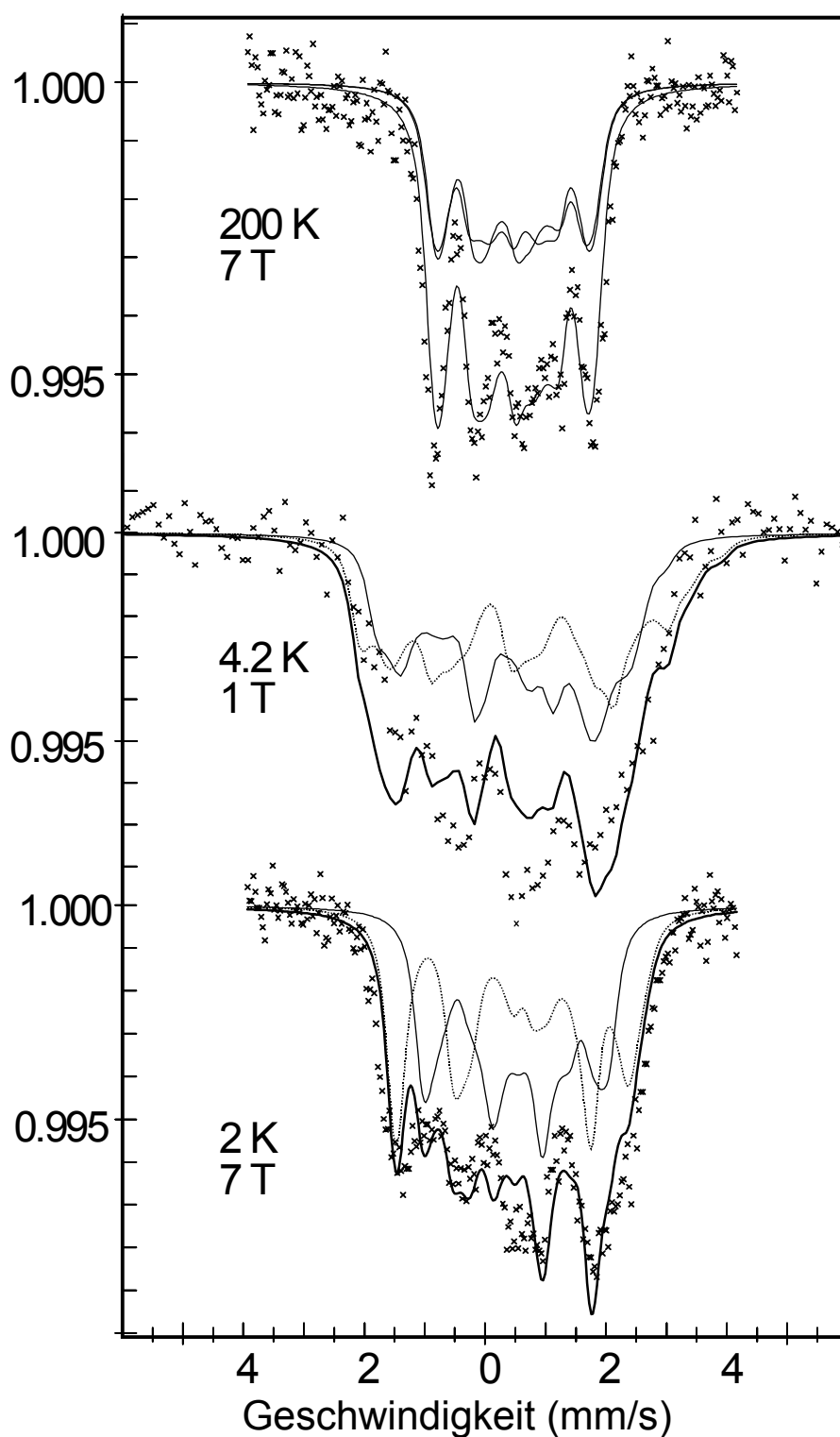


Fig. 44. Magnetfeld-Mössbauer-Spektren bei unterschiedlichen Feldstärken und Temperaturen. Die Spektren konnten mit den angegebenen Bedingungen unter Verwendung der folgenden Parameter simuliert werden (die Simulationen sind als durchgezogene Linien dargestellt): $D = 1,3 \text{ cm}^{-1}$, $E/D = 0,22$, $g = 1,873$, Subspektrum 1 (50%): $\delta = 0,55 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = +0,98 \text{ mm/s}$, $\eta = 0,63$, $A/g\mu_B = -11,99 \text{ T}$; Subspektrum 2 (50%): $\delta = 0,55 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,98 \text{ mm/s}$, $\eta = 1$ (Vorzeichen von ΔE_Q hat keine Bedeutung mehr), $A/g\mu_B = -9,23 \text{ T}$.

8. Analyse der Sauerstoff-Empfindlichkeit der Komponenten der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans*

Wie bereits beschrieben, sind die Komponenten A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase empfindlich gegen molekularen Sauerstoff. Während die Komponente A mit einer Halbwertszeit von etwa 10 s an Luft extrem sauerstoffempfindlich ist, wird Komponente D ebenfalls durch Luft inaktiviert; dieser Prozeß verläuft aber bedeutend langsamer mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Tagen. Zur Klärung der molekularen Grundlage dieser Inaktivierungen wurden kombinierte EPR- und Mössbauer-Messungen an beiden Komponenten durchgeführt.

Die Inaktivierung der Komponente D wird durch eine $[4\text{Fe-4S}]^{2+} \rightarrow [3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster-Umwandlung hervorgerufen

Native Komponente D zeigte wie bereits beschrieben im EPR-Spektrum ein $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster Signal mit ca. 10 % Spinkonzentration. Diese Clusterspezies wurde inaktivem Enzym zugeordnet. Versuche mit sauerstoffinaktivierter Komponente D zeigten, daß die Abnahme der Aktivität mit der Zunahme der $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster-Spinkonzentration korreliert (Fig. 45).

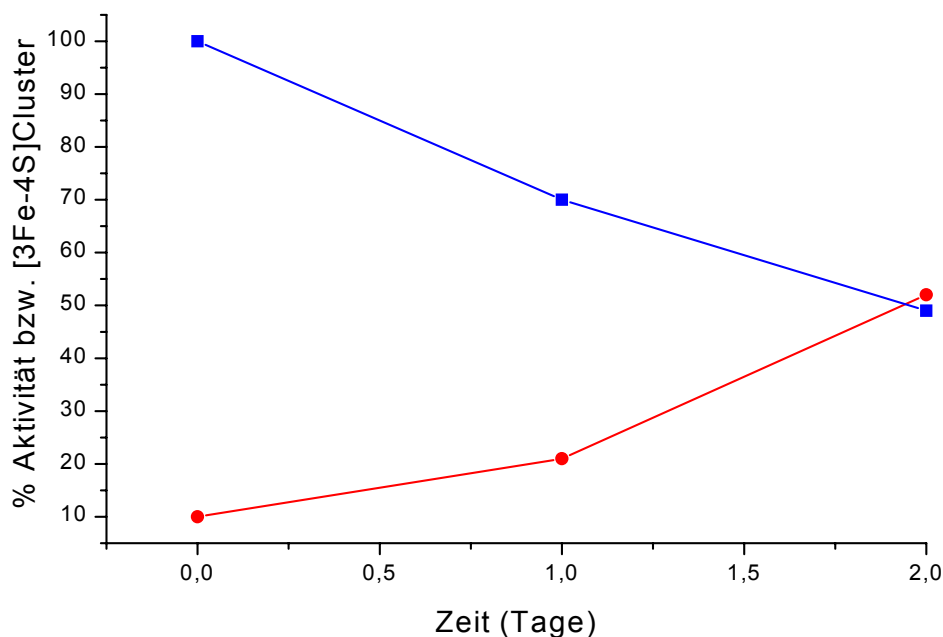


Fig. 45. Aktivitätsabnahme bei Komponente D unter aeroben Bedingungen und damit korrelierende $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster Bildung. (Quadrate) Abnahme der Aktivität, (Kreise) Bildung des $[3\text{Fe-4S}]^+$ Clusters.

Diese Daten konnten ebenfalls mit Mössbauer-Experimenten verifiziert werden. Unter aeroben Bedingungen nahm der Anteil des der $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster-Spezies zugeordneten Quadrupoldubletts ebenfalls in dem Maße zu, in dem die Aktivität verloren ging (Fig. 46). Aerobisierung führt nicht zu einer Oxidation des FMN-Hydrochinons. Erst nach mehreren Tagen ist FMN-Benzochinon mit UV-Vis-Spektroskopie zu detektieren; hierbei wird es sich wahrscheinlich um freies, nicht mehr protein-gebundenes Flavin gehandelt haben.

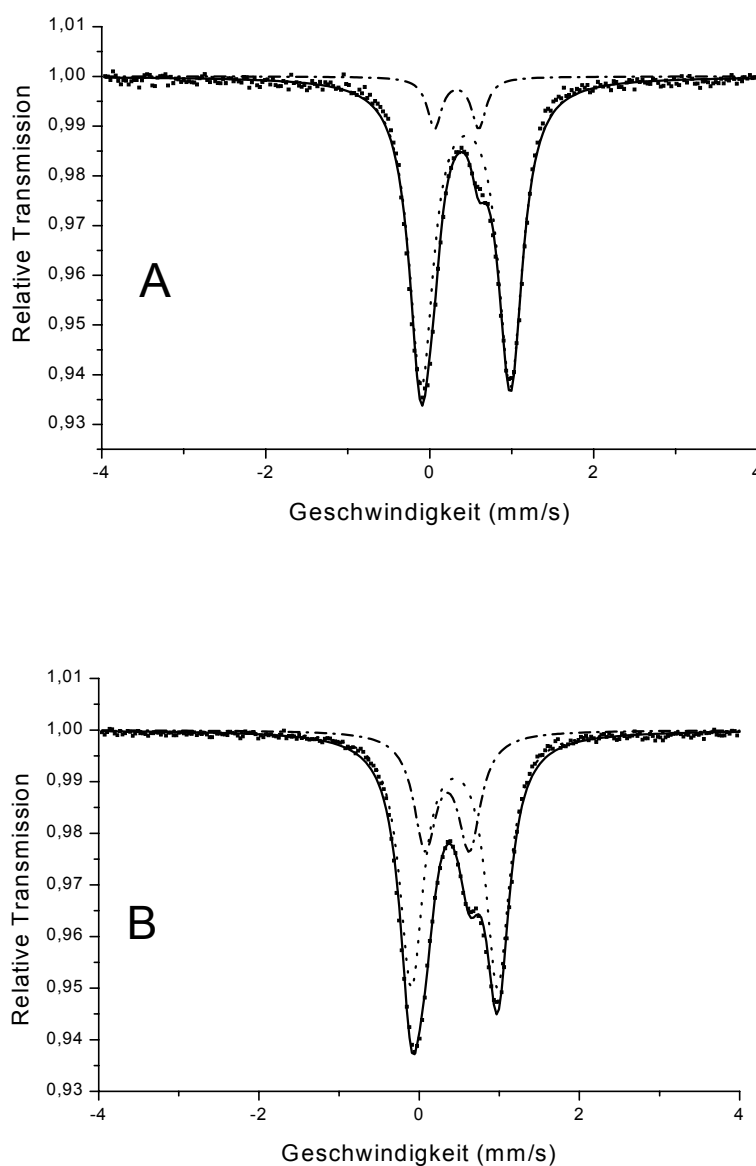


Fig. 46. Mössbauer-Nullfeld-Spektren der Komponente D. Effekt von molekularem Sauerstoff: (A) Nullfeldspektrum bei 80 K. Das Spektrum konnte mit zwei Quadrupol-Dubletts simuliert werden (durchgezogene Linie): (1) Dublett 1 (10 % relative Intensität). $\delta = 0,29$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,78$ mm/s, $\Gamma = 0,22$ mm/s. (2) Dublett 2 (90 % relative Intensität). $\delta = 0,44$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,10$ mm/s, $\Gamma = 0,32$ mm/s. (B) Nullfeldspektrum bei 80 K nach 30-stündiger Inkubation unter aeroben Bedingungen. Das Spektrum konnte mit zwei Quadrupol-Dubletts simuliert werden (durchgezogene Linie): (1) Dublett 1 (30 % relative Intensität). $\delta = 0,29$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,90$ mm/s, $\Gamma = 0,22$ mm/s. (2) Dublett 2 (70 % relative Intensität). $\delta = 0,44$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,10$ mm/s, $\Gamma = 0,32$ mm/s.

Die Inaktivierung der Komponente A wird durch einen $[4\text{Fe-4S}]^+ \rightarrow [2\text{Fe-2S}]^{2+}$ Cluster-Zerfall hervorgerufen

Im Gegensatz zur Komponente D hat inaktive Komponente A im Vergleich zur aktiven Spezies ein verändertes UV-vis-Spektrum. Die durch den $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster hervorgerufene braune Farbe geht in einen rot-braunen Farbton über (Fig. 47).

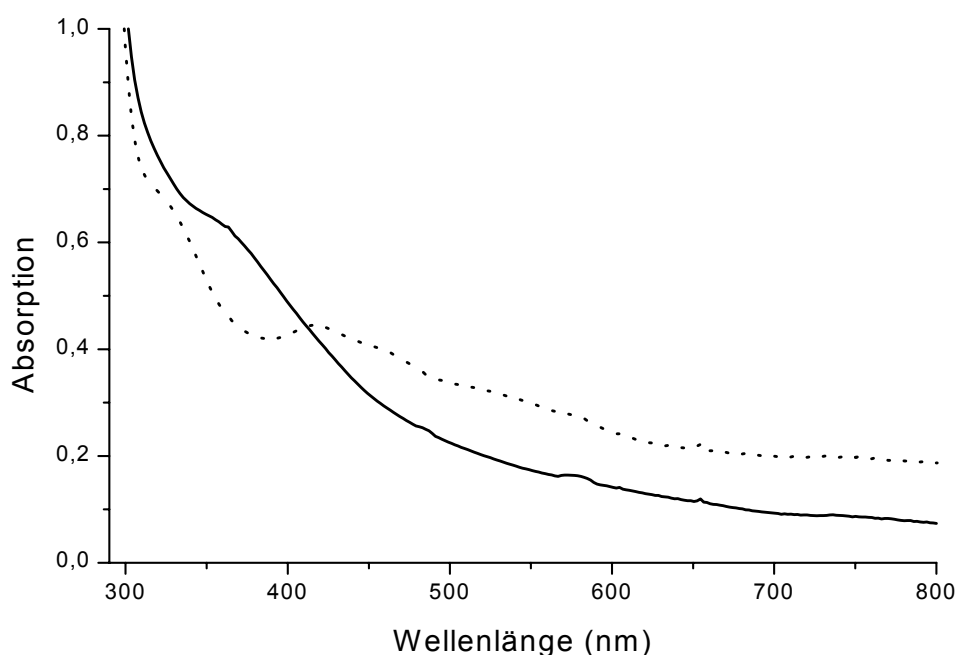


Fig. 47. Effekt von Sauerstoff auf die UV-vis-Spektren von rekombinanter Komponente A. **(Durchgezogene Linie)** Native rekombinante Komponente A. **(Gestrichelte Linie)** Rekombinante Komponente A nach einminütiger Inkubation an Luft. Die Proteinkonzentrationen betragen 3,1 mg/mL (59 μM).

Das Spektrum der sauerstoffinaktivierten Komponente A deutet auf die Bildung eines $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ Clusters hin. Typische Absorptionen bei 425 nm, 450 nm sowie 550 nm weisen auf diese Spezies hin. Eine Kinetik des $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters-Zerfalls konnte dabei nicht aufgenommen werden, da die Umwandlung bereits in wenigen Sekunden beendet ist; dies korreliert mit der schnellen Inaktivierung. Sauerstoffinaktivierte Komponente A zeigte kein EPR-Signal, wie für einen diamagnetischen $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ Cluster auch zu erwarten war. Die Reduktion des Clusters zu einem paramagnetischen $[2\text{Fe-2S}]^+$ Cluster war mit Dithionit oder Photoreduktion

mit 5'-Deazariboflavin nur in geringen Mengen (ca. 1 % der Gesamtclustermenge) erreichbar (Fig. 48). Aufgrund der g -Werte und des Relaxationsverhaltens bei 70 K kann auf einen $[2\text{Fe-2S}]^+$ Cluster geschlossen werden. Reduzierte $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster sind durch Relaxationseffekte bei diesen Temperaturen nicht mehr sichtbar.

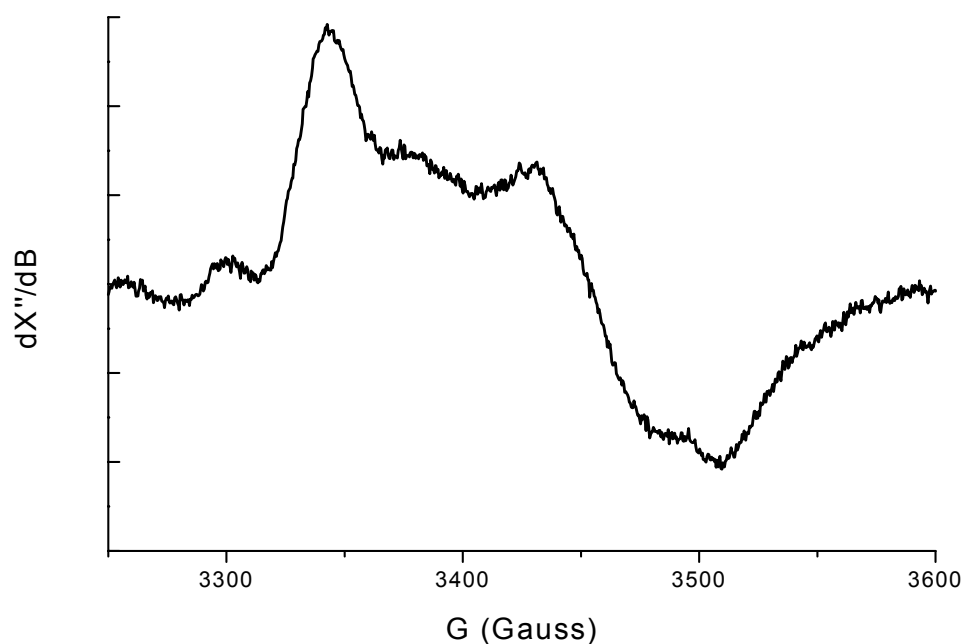


Fig. 48. EPR-Spektrum von sauerstoffinaktivierter rekombinanter Komponente A nach Reduktion mit Dithionit (10-facher Überschuss). Meßbedingungen: Frequenz: 9,435 GHz, Temperatur: 70 K, Modulationsamplitude: 30 G, Mikrowellenleistung: 20 mW.

Durch Mössbauer-Spektroskopie wurde gezeigt, daß in sauerstoffinaktivierter Komponente A ein diamagnetischer $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ Cluster vorliegt (Fig. 49). Das Nullfeld-Spektrum ließ sich mit typischen Parametern für Fe^{3+} in tetraedrischer Schwefel-Koordination simulieren. Mit etwa 10 % relativer Intensität konnte zusätzlich eine Fe(II)-Spezies simuliert werden, die durch die $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster-Zerstörung entstanden war. Das 7 T-Magnetfeld-Spektrum belegte den Diamagnetismus der inaktivierten Komponente A. Das Spektrum beinhaltet ebenfalls einen sehr breiten Anteil, welcher mit Sicherheit von paramagnetischen oxidischem Fe (III)-Abbauprodukten des $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters stammt.

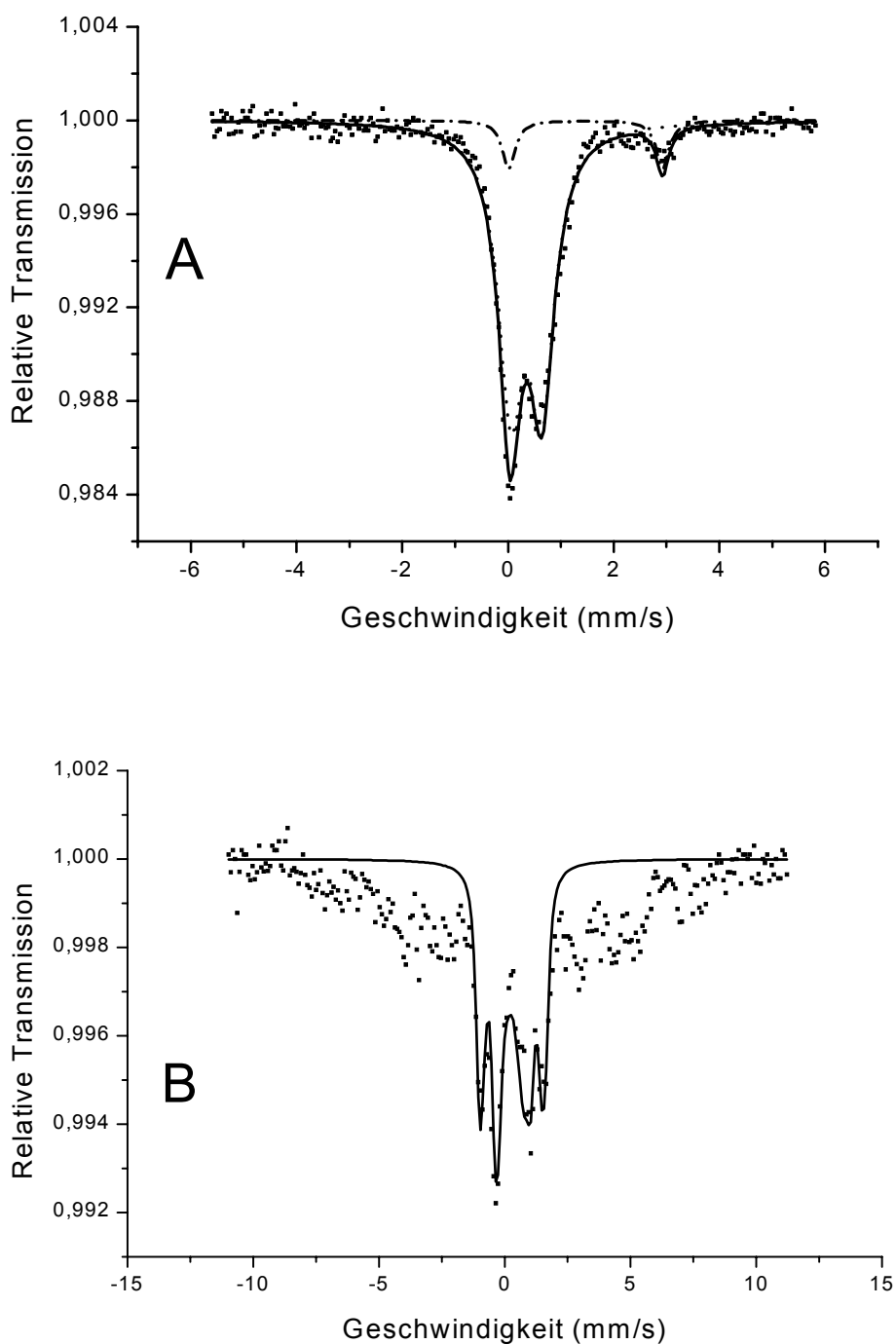


Fig. 49. Mössbauer-Spektren von sauerstoffinaktivierter rekombinanter Komponente A. (A) Nullfeld-Spektrum sauerstoffinaktivierter Komponente A bei 80 K. Das Spektrum konnte mit 2 Quadrupoldoublets simuliert werden (durchgezogene Linie): Dublett 1 (90 % relative Intensität), $\delta = 0,30$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,75$ mm/s, $\Gamma = 0,22$ mm/s. (2) Dublett 2 (10 % relative Intensität). $\delta = 1,54$ mm/s, $\Delta E_Q = 2,96$ mm/s, $\Gamma = 0,40$ mm/s. Dublett 2 stammt von oxidischem Fe(II), welches bei Zerstörung des [4Fe-4S]Clusters entstanden ist. (B) 7 T-Magnetfeld-Spektrum. Das Spektrum konnte mit der Annahme eines S = 0 Zustandes (alle 4 Fe-Atome koppeln zu einem diamagnetischen System) simuliert werden. Asymmetrie-Parameter $\eta = 0,6$ mm/s, $\Gamma = 0,25$ mm/s.

9. Untersuchungen zur Konformation der Komponente A: Effekte der Nukleotidbindung und des Redoxzustandes des [4Fe-4S]Clusters.

9.1 Chelatisierungsexperimente mit Bathophenanthrolin - Disulfonat

Zur Untersuchung der Fe (II)-Chelatisierung in Gegenwart von Komponente A wurde das Protein mit 10-fach-überschüssigem Dithionit pH 8,0 bzw. 10-fach-überschüssigem Thionin (Lauths Violett, 3, 7-Diamino-5-Phenothiazinium-Acetat) versetzt und nach 10-minütiger Inkubationszeit mit einer Sephadex-G25-Chromatographiesäule von niedermolekularen Bestandteilen befreit. So konnte Komponente A mit definiertem Redoxzustand des [4Fe-4S]⁺²⁺ Clusters dargestellt werden. Die Untersuchungen der Chelatisierungsraten in Abhängigkeit der Nukleotide ADP und ATP offenbarten eine 9-fach höhere Chelatisierungsrate in Gegenwart von ATP. Dies impliziert eine bessere Zugänglichkeit des [4Fe-4S]Clusters zum Lösungsmittel, es existieren je nach Art des gebundenen Nukleotids mindestens zwei verschiedene Komponente A - Konformationen; die ATP-Konformation besitzt somit einen stärker an der Oberfläche des Proteins lokalisierten [4Fe-4S]Cluster. Diese Effekte sind für oxidierte und reduzierte Komponente A identisch (Fig. 50). Der Redoxzustand hat also hinsichtlich der Clusterposition im Enzym keine offensichtliche Bedeutung.

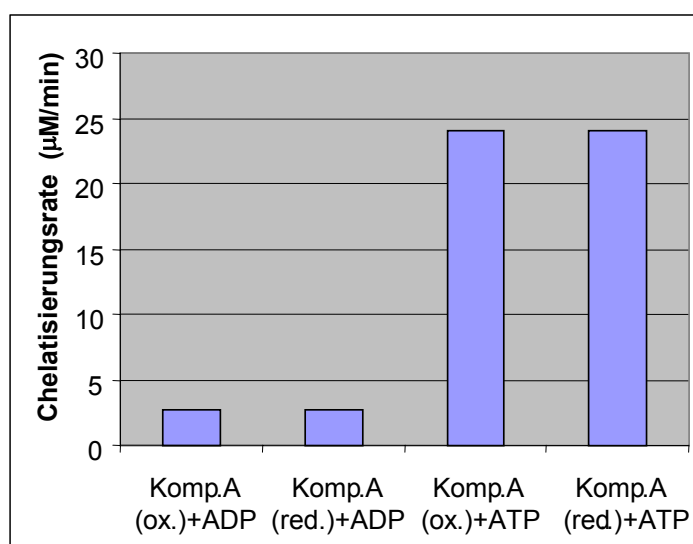


Fig. 50. Chelatisierungsraten von Fe(II) aus Komponente A in Abhängigkeit von Nukleotiden. Die Ansätze (1 mL Volumen) beinhalten 20 µM Komponente A, 5 mM Bathophenanthrolin-Disulfonat, 1-10 mM Nukleotide (ATP oder ADP) in Tris/HCl 50 mM pH 8,0.

9.2 ATPase-Studien an reduzierter und oxidierter Komponente A

Definierte Redoxzustände des [4Fe-4S]Clusters der Komponente A wurden wie unter 9.1 beschrieben hergestellt. Mit einem gekoppelten ATPase-Aktivitätstest konnte gezeigt werden, daß oxidierte Komponente A mit einem [4Fe-4S]²⁺Cluster eine starke ATPase-Aktivität von 4-6 U/mg aufweist (Fig. 51). Der K_M-Wert für ATP war 3 µM. Im Gegensatz dazu besitzt reduzierte, einen [4Fe-4S]⁺Cluster enthaltenden Komponente A eine kaum meßbare ATPase-Aktivität, welche wahrscheinlich auf kleine Mengen an reoxidierter Komponente A zurückzuführen sein kann. Dieses Resultat weist darauf hin, daß der Redoxzustand des [4Fe-4S]Clusters strukturelle Veränderungen an der ATP-Bindestelle hervorruft. Zugabe äquimolarer Konzentrationen Komponente D führte zu einer 75%igen Wiedergewinnung der ATPase-Aktivität der Komponente A, während das Substrat 2-Hydroxyglutaryl-CoA keinen signifikanten Effekt zeigte.

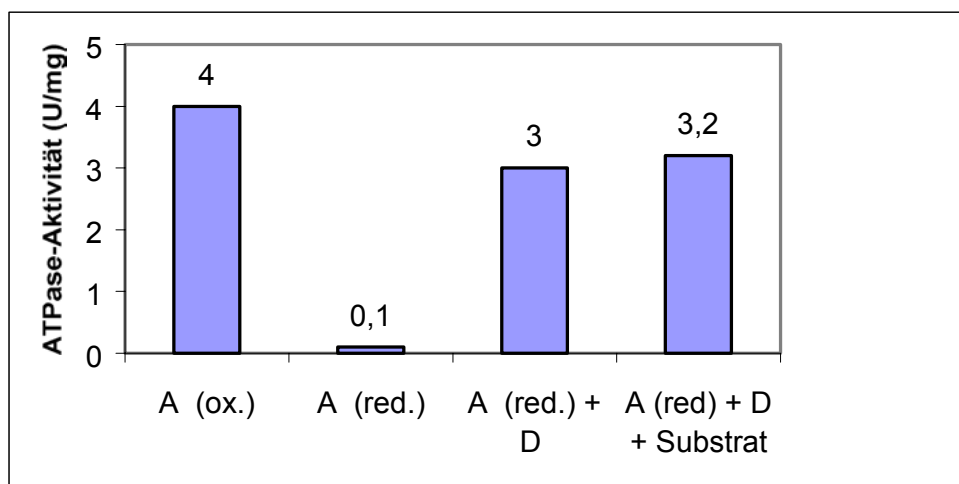


Fig. 51. ATPase-Aktivitäten der reduzierten und oxidierten Komponente A. Zusammensetzung des Testansatzes (1 mL Volumen): 1 mM ATP, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 0,1 mM NADH, 2 U Pyruvat-Kinase, 2 U Lactat-Dehydrogenase, 10 µL Probe in Tris/HCl 50 mM pH 8,0.

10. Reinigung und Charakterisierung eines 16 kDa-Flavodoxins aus *A. fermentans*: ein natürlicher Elektronendonator der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Wiebke Thamer (Philipps-Universität Marburg) identifizierte ein $[4\text{Fe-4S}]^{+2+}$ Cluster-enthaltendes 6 kDa großes Ferredoxin als einen natürlichen Elektronendonator der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase. Katalytische Mengen des reduzierten Ferredoxins reichen aus, um Vollaktivität der Dehydratase zu erzeugen. Wachstum von *A. fermentans* unter Eisenmangelbedingungen führte zur Synthese eines neuen Elektronentransfer-Proteins, einem Flavodoxin. Das Ferredoxin wurde nur noch in sehr geringen Mengen gebildet. Das Flavodoxin wurde mit einer drei Chromatographiesäulen umfassenden Methode zur Homogenität gereinigt. Zuerst wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephrose eingesetzt. Daraufhin wurden die Flavodoxin enthaltenden Fraktionen vereinigt und ankonzentriert. Der zweite Schritt umfasste eine Gelfiltrations-Chromatographie an Superose 12. Die restlichen Verunreinigungen wurden durch eine weitere Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sephrose entfernt (Fig. 52). Aus 20 g Feuchtzellen wurden ca. 10 mg Flavodoxin isoliert.

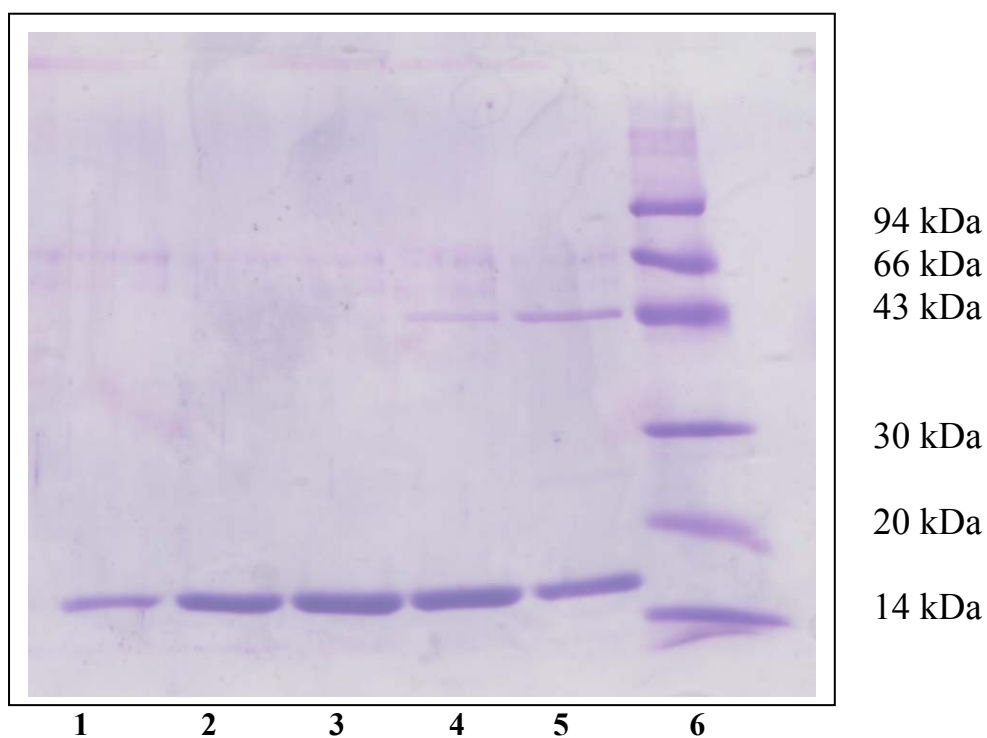


Fig. 52. SDS/PAGE des gereinigten Flavodoxins aus *A. fermentans*. Spuren 1-5: Flavodoxin-haltige Fraktionen nach Q-Sephrose, Spur 6: Molekularmassenmarker.

Die SDS/PAGE der Flavodoxin-Fractionen zeigt das Flavodoxin bei einer apparenten molekularen Masse von 16 kDa. Kombinierte UV-vis- und HPLC-Experimente identifizierten $1,0 \pm 0,1$ FMN/Monomer als prosthetische Gruppe. Das Flavodoxin wies eine violett-blaue Farbe auf, die auf den O_2 -empfindlichen FMN-Semichinon-Radikalzustand zurückzuführen war. Diese Semichinone können als sogenannte blaue und rote Formen vorliegen, je nachdem, ob das Radikal protoniert und somit neutral oder deprotoniert und dadurch anionisch geladen ist. Mit EPR- und UV-vis-Spektroskopie wurde nachgewiesen, daß die blaue Farbe der neutralen Semichinon-Form zuzuordnen war (Fig. 54, Fig. 55).

Aktivitätsbestimmungen haben gezeigt, daß ausschließlich der vollreduzierte Flavodoxin-Hydrochinon-Zustand eine Aktivierung der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase bewirkt. Dabei waren katalytische Mengen Flavodoxin zur Vollaktivierung ausreichend (Fig. 53).

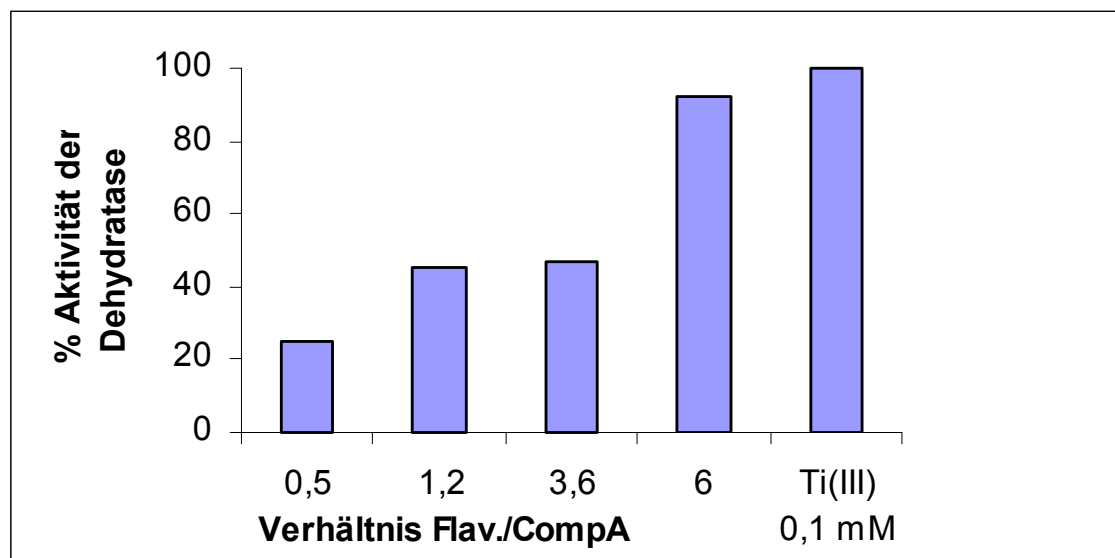


Fig. 53. Aktivierung der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis $c(\text{Flavodoxin-Hydrochinon})/c(\text{CompA})$ im Aktivitätstest. Zum Vergleich ist die Vollaktivität bei $100 \mu\text{M Ti(III)citrat}$ angegeben.

Bezogen auf die Konzentration der Komponente A im Aktivitätstest war ein 6-facher Überschuss an Flavodoxin-Hydrochinon zur Vollaktivierung notwendig. Das Ti(III)citrat muß zur Vollaktivierung in bedeutend höheren Konzentrationen eingesetzt werden.

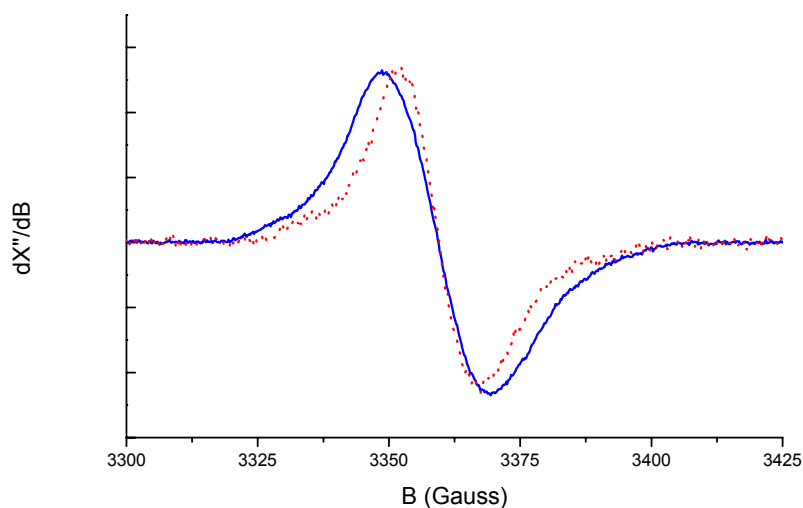


Fig. 54. D₂O- und H₂O-Spektrum des zur Homogenität gereinigten Flavodoxin-Semichinons. Meßbedingungen: Frequenz: 9,434 GHz, Temperatur: 80 K, Modulationsamplitude: 5,0 G, Mikrowellenleistung: 20 μ W. **(Durchgezogene Linie)** Spektrum des Flavodoxins. Die Linienbreite beträgt 20 Gauss. **(Gestrichelte Linie)** Spektrum in D₂O-MOPS-Puffer 20 mM pH 7,0. Die Linienbreite ist auf 15 Gauss verringert.

Das EPR-Spektrum zeigt eine Linienbreite des Signals von 20 Gauss. Zusätzlich bewirkt ein Austausch gegen D₂O-Puffer eine Verringerung der Linienbreite um 5 Gauss. Dies zeigt, daß das Semichinon-Radikal protoniert und somit neutral vorliegt. Im UV-vis-Spektrum ist die für neutrale Semichinone deutliche Absorption zwischen 450 nm und 650 nm sichtbar.

11. *In vitro*-Elektronentransfer von Flavodoxin-Hydrochinon auf oxidierte Komponente A in Gegenwart von ADP.

Um zu untersuchen, ob Komponente A Elektronen vom reduzierten Flavodoxin-Hydrochinon aufnehmen kann, wurden UV-vis spektroskopische Studien mit den gereinigten Proteinkomponenten in definierten Redoxzuständen durchgeführt. Die drei möglichen Redoxzustände des Flavodoxins unterschieden sich hinsichtlich ihres UV-vis-Absorptionsverhaltens stark voneinander (Fig. 55). Während die oxidierte Benzochinonform typische Maxima bei 370 nm und 445 nm aufweist, absorbiert die radikalische neutrale Semichinonform über einem breiten Wellenlängenbereich von 450 nm bis 650 nm. Die vollreduzierte Hydrochinonform hingegen besitzt im sichtbaren Bereich kaum Absorption.

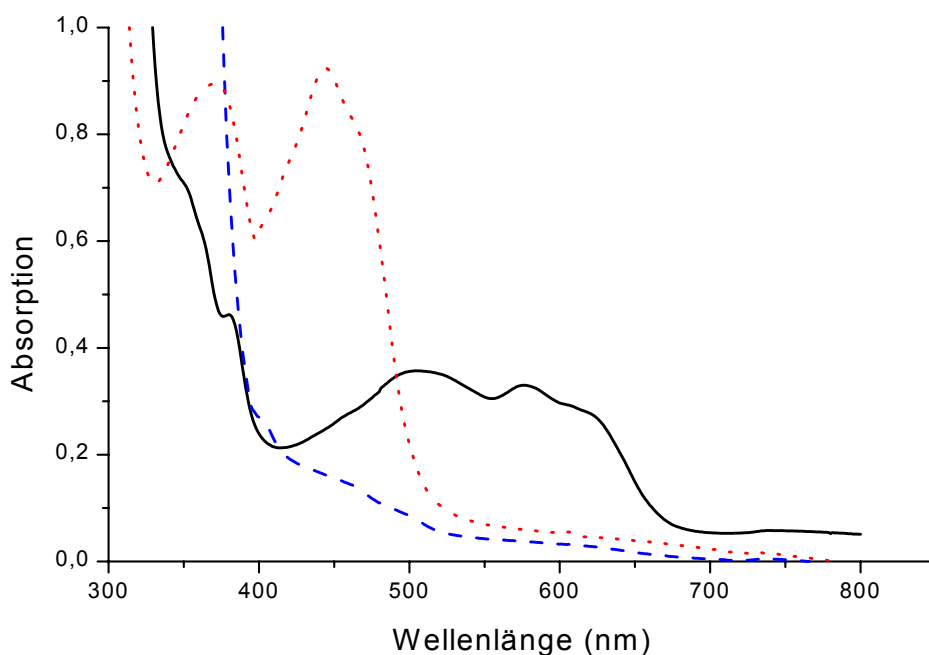


Fig. 55. UV-vis-Spektren der drei Oxidationszustände des Flavodoxins. (Gepunktete Linie) Benzochinonform. **(Durchgezogene Linie)** Neutrale Semichinonform. **(Gestrichelte Linie)** Hydrochinonform. Die Proteinkonzentration betrug 70 μM .

Da auch die Komponente A je nach Oxidationszustand des $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters ein unterschiedliches Absorptionsverhalten aufweist ($\Delta\epsilon_{400} = 4,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), eignet sich die UV-vis-Spektroskopie ideal zur Untersuchung möglicher Elektronentransferreaktionen zwischen beiden Proteinen. Flavodoxin-Hydrochinon und oxidierte Komponente A wurden als äquimolare Mischung und zum Vergleich getrennt UV-vis-spektroskopisch untersucht. Das Resultat zeigt Fig. 56. Die beiden grauen Spektren zeigen das Absorptionsverhalten der einzelnen Proteinkomponenten. Die schwarze gestrichelte Linie beschreibt ein Summenspektrum der Einzelkomponenten in der Annahme, daß kein Elektronentransfer stattfindet. Die schwarze durchgezogene Linie stellt das beobachtete Spektrum nach äquimolarer Mischung beider Proteine dar. Deutlich zu sehen ist eine im Vergleich zum Summenspektrum erhöhte Absorption im langwelligen Bereich, welche aufgrund der Form dem neutralen Radikalzustand zugeordnet werden konnte. Bei 400 nm ist eine deutliche Abnahme der Absorption zu erkennen, die von der Einelektronenreduktion des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Clusters der oxidierten Komponente A herrührt. Dies zeigt, daß bei äquimolarer Mischung der Enzyme ein Elektron vom Flavodoxin-Hydrochinon zur oxidierten Komponente A transferiert wird. Durch Kenntnis der molaren Extinktionskoeffizienten für

beide Übergänge (Komponente A $\Delta\epsilon_{400} = 4,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Flavodoxin Hq/Sq $\Delta\epsilon_{570} = 4,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kann dieser Elektronentransfer als quantitativ betrachtet werden.

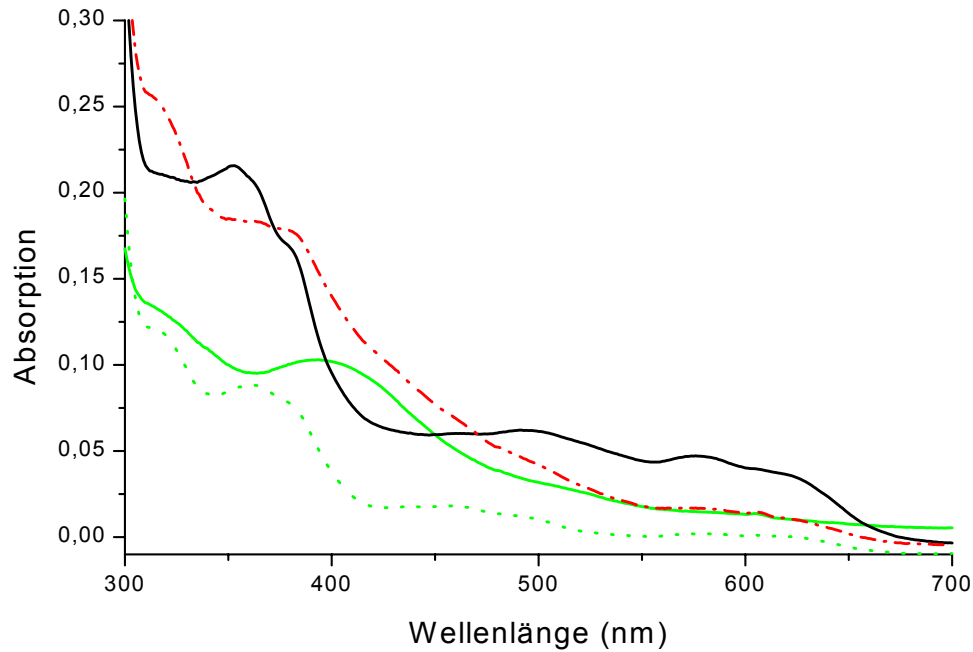
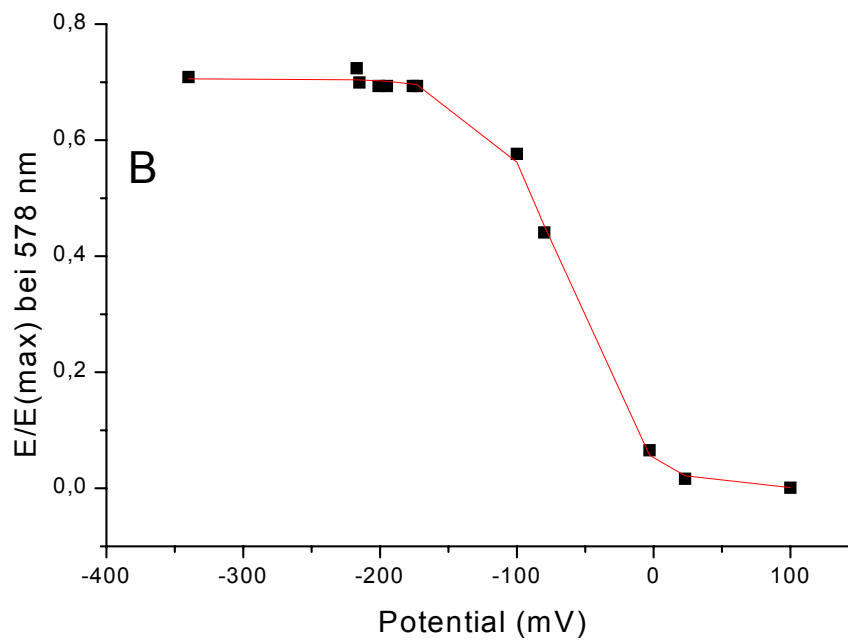
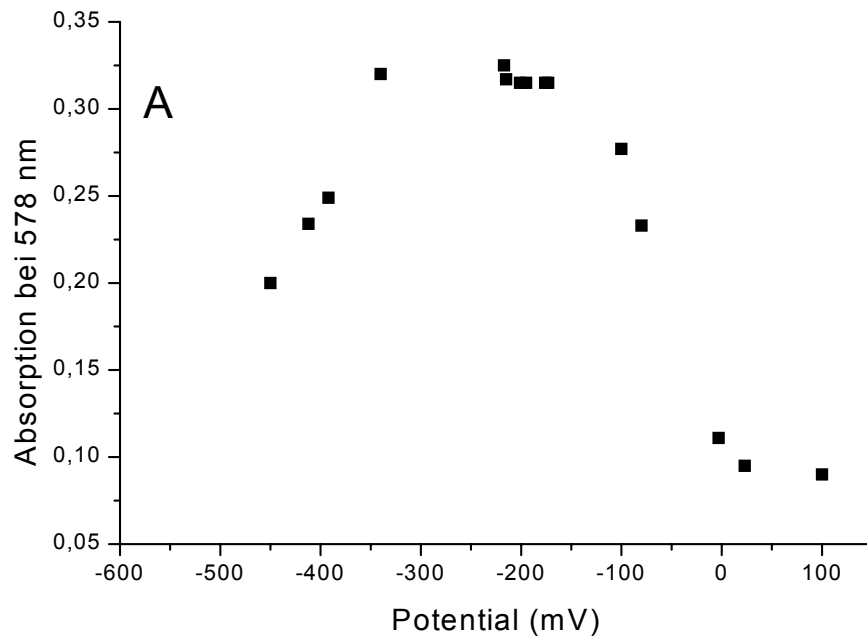


Fig. 56. UV-vis-Elektronentransfer-Studien an Flavodoxin-Hydrochinon und oxidiertes Komponente A. Puffer für beide Proteine: 50 mM Tris/HCl pH 8. Komponente A wurde zusätzlich mit 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl₂ und 1 mM ADP stabilisiert. Die beiden grauen Linien beschreiben die getrennten Spektren des Flavodoxins (gestrichelt) und der Komponente A (durchgezogen). Die schwarze gestrichelte Linie stellt ein Summenspektrum beider Einzelkomponenten dar. Die schwarze durchgezogene Linie beschreibt das aufgenommene Spektrum nach Mischung beider Proteine. Proteinkonzentration: 6 μM jedes Proteins.

12. Redox titration of Flavodoxin

Zur Ermittlung der Mittelpunktspotentiale der im Flavodoxin auftretenden Elektronenübergänge wurden Redox titrationen durchgeführt.



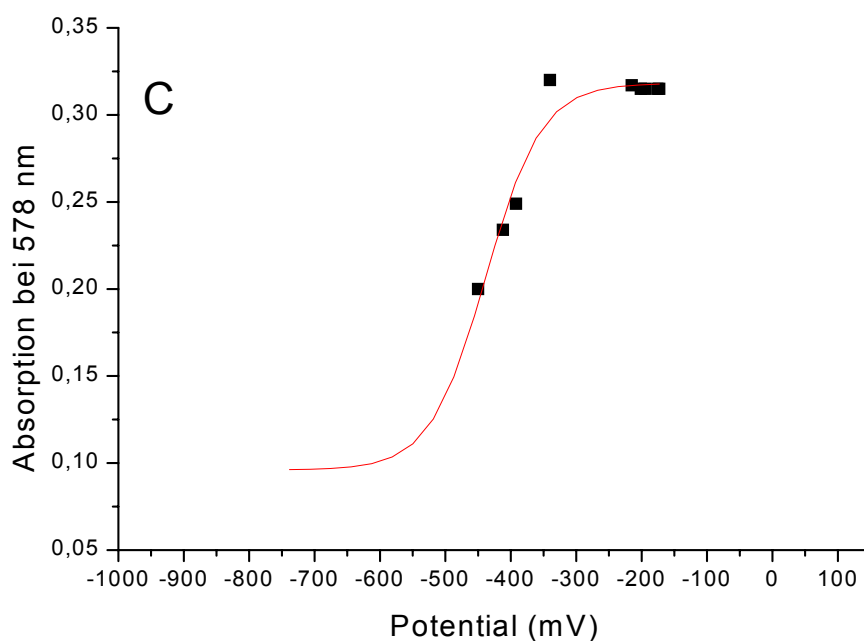


Fig. 57. Redox-Titration des Flavodoxins. Das Protein war in 20 mM MOPS pH 7 gelöst. (A) Aufgenommene Meßpunkte der Redox Titration. **(B)** Meßpunkte, die den Semichinon/Benzochinon-Übergang beschreiben. Durch Verwendung der Nernst-Gleichung konnte das Mittelpunkt-Potential dieses Überganges von -65 mV ermittelt werden. **(C)** Meßpunkte, die einen Teil des Überganges Hydrochinon/Semichinon beschreiben. Durch eine sigmoide Simulation bei Kenntnis der theoretischen Absorption des Hydrochinon-Zustandes konnte ein Mittelpunktpotential von -435 mV berechnet werden.

Der niedrige Übergang konnte nicht bis zur Vollreduktion verfolgt werden, da das negativste Potential mit Titan(III)citrat etwa -470 mV beträgt. Somit konnte dieser Übergang nur näherungsweise sigmoid simuliert werden, woraus sich ein berechnetes Mittelpunktpotential für das Hydrochinon/Semichinon-Redoxpaar von $-435 \text{ mV} \pm 20 \text{ mV}$ ergab. Der höhere Elektronenübergang konnte vollständig verfolgt und mit der Nernst-Gleichung simuliert werden. Das Mittelpunktpotential für das Semichinon/Benzochinon-Redoxpaar wurde als $-65 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ bestimmt.

13. Erzeugung eines superreduzierten $[4\text{Fe-4S}]^0$ Clusters in rekombinanter Komponente A aus *A. fermentans*

Komponente A in Puffer Tris/HCl 50 mM pH 8, 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ATP konnte in Gegenwart eines 10-fachen Überschusses des Reduktionsmittels Titan(III)citrat pH 8,0 zu einer Spezies reduziert werden, in der ein $[4\text{Fe-4S}]^0$ Cluster vorliegt. In diesem superreduzierten Redoxzustand existieren formal alle 4 Eisenatome im Fe(II)-Zustand. Das Protein ist jetzt leicht rot gefärbt, das sich im UV-vis-Spektrum durch eine Absorptionsschulter bei etwa 500 nm ausdrückte (Fig. 58).

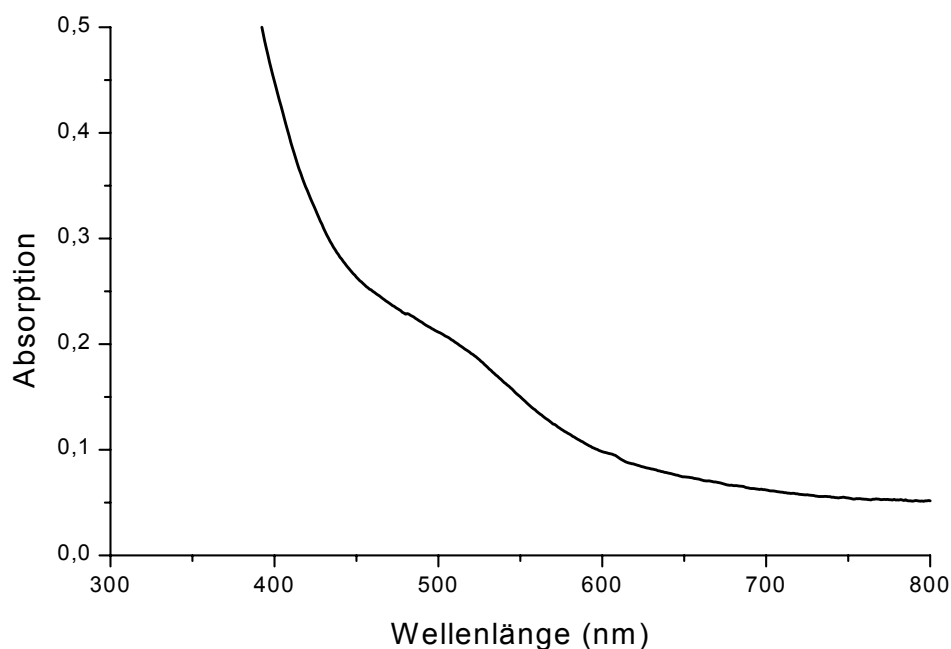


Fig. 58. UV-vis-Spektrum der superreduzierten Komponente A. Bedingungen: Proteinkonzentration 3 mg/mL. Reduktion erfolgte mit 10-fachem Überschuss an Titan(III)citrat mit 10 minütiger Inkubationszeit. Das überschüssige Reduktionsmittel wurde über Gelfiltration mit Sephadex G-25 abgetrennt.

Mössbauer-Spektroskopie belegte die Anwesenheit von 50 % vollreduzierten $[4\text{Fe-4S}]^0$ Clustern. Das Nullfeld-Spektrum konnte mit 2 Quadrupoldubletts simuliert werden (Fig. 59), welche beide etwa 50 % relative Intensität aufwiesen. Das scharfe Dublett wies folgende Parameter auf: : $\delta = 0,54$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,98$ mm/s, $\Gamma = 0,32$. Diese Werte sind wie in Abschnitt 7 gezeigt typisch für $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster, hierbei handelt es sich demnach um

reduzierte Komponente A. Das breitere Dublett mit den Parametern $\delta = 0,76$ mm/s, $\Delta E_Q = 2,15$ mm/s, $\Gamma = 1,31$ zeigte die ungewöhnlich hohe Isomerieverschiebung, die bei Fe(II)-Spezies in tetraedrischer Schwefelkoordination beobachtet wird, zum Beispiel bei reduziertem Rubredoxin. Somit kann die Entstehung eines $[4\text{Fe-4S}]^0$ Clusters angenommen werden.

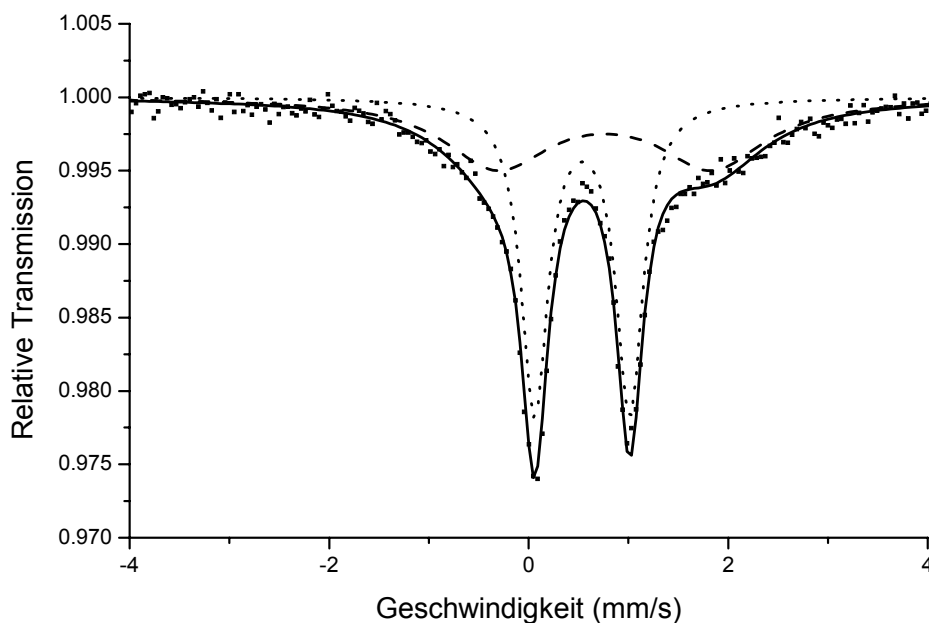


Fig. 59. Mössbauer-Spektrum der superreduzierten Komponente A. Das Spektrum konnte mit 2 Quadrupoldubletts simuliert werden: Dublett 1 (55 % relative Intensität) $\delta = 0,54$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,98$ mm/s, $\Gamma = 0,32$. Dublett 2 (45 % relative Intensität) $\delta = 0,76$ mm/s, $\Delta E_Q = 2,15$ mm/s, $\Gamma = 1,31$. Dublett 2 wies typische Parameter für Fe(II) in tetraedrischer Schwefelkoordination auf. Proteinkonzentration: 20 mg/mL (0,4 mM).

Zur Untersuchung der magnetischen Eigenschaften der Cluster wurden Mössbauer-Experimente in Anwesenheit eines externen magnetischen Feldes durchgeführt. Die Simulation stellte sich in ersten Experimenten als äußerst schwierig dar, zumal, wie im Nullfeld-Spektrum gezeigt, zwei unterschiedliche Spezies vorhanden sind. Das 0,1 T- und 7 T-Spektrum machte jedoch deutlich, daß beide Subspektren ein inneres Feld besitzen, d.h. beide haben einen Spin $S \neq 0$ (Fig. 60). Über den Spin des $[4\text{Fe-4S}]^0$ Clusters liessen sich mit Mössbauer-Spektroskopie keine sicheren Aussagen machen.

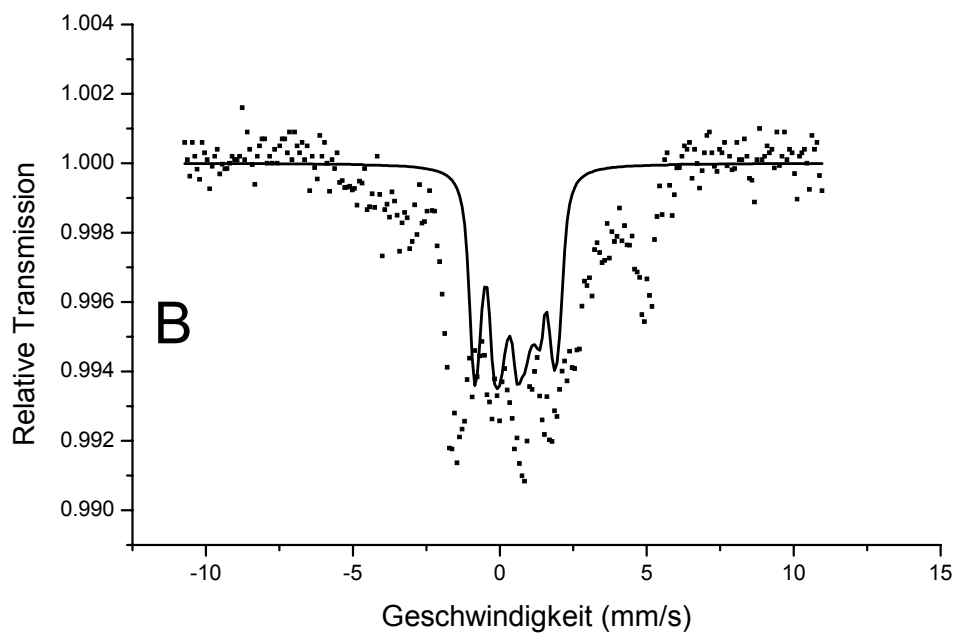
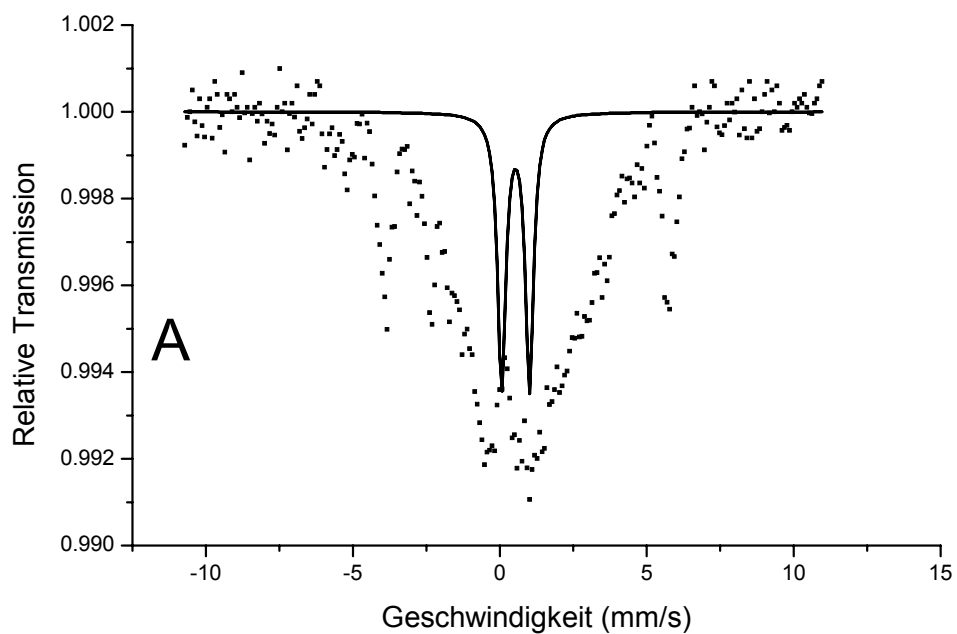


Fig. 60. Mössbauer-Spektrum der superreduzierten Komponente A in Anwesenheit eines externen Feldes von (A) 0,1 T und (B) 7 T. Die durchgezogene Linie stellt eine Simulation mit der Annahme $S = 0$ dar. Dies zeigt, daß beide Subspektren zu einem Spinsystem $S \neq 0$ zuzuordnen sind.

Mit EPR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, daß der superreduzierte $[4\text{Fe-4S}]^0$ Cluster einen ganzzahligen Spin besitzt. Vergleiche mit dem zur Zeit einzigen Beispiel eines $[4\text{Fe-4S}]^0$ Clusters, dem superreduzierten Nitrogenase Fe-Protein, weisen auf ein $S = 4$ System hin [83, 84].

Perpendicular mode EPR zeigte das schon im Mössbauer-Spektrum detektierte Signal des reduzierten $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der Komponente A bei g -Werten zwischen 4 und 5 (Fig. 61). Zusätzlich waren zwei schwache kleine Signale bei $g = 11$ und $g = 16$ erkennbar, die nicht zum $S = 3/2$ -Signal gehören konnten.

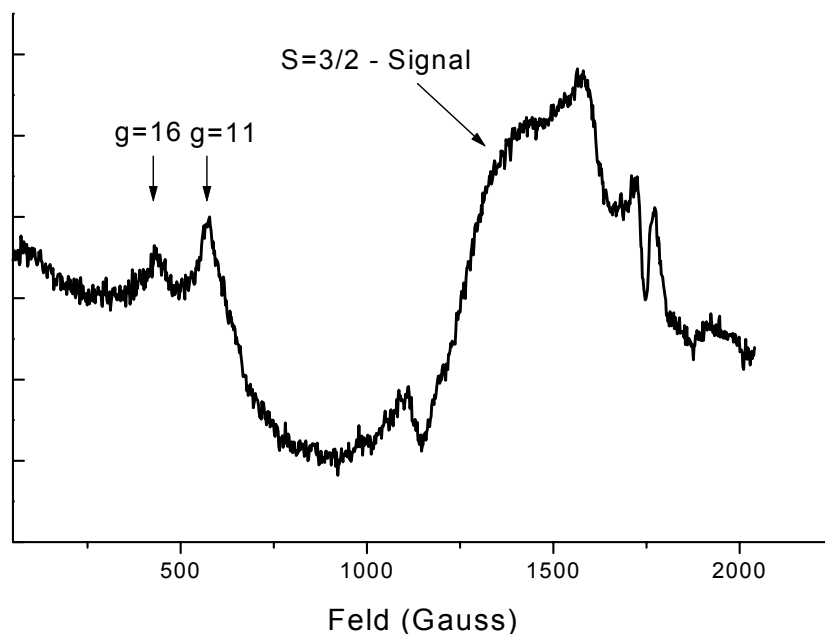


Fig. 61. Perpendicular mode EPR-Spektrum der superreduzierten Komponente A. Meßbedingungen: Frequenz: 9,633 GHz, Temperatur: 3 K, Modulationsamplitude: 19,9 G, Mikrowellenleistung: 1,6 mW. Das breite Signal bei 1200-1700 Gauss ist dem $S = 3/2$ -Zustand des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der Komponente A zuzuordnen. Die Signale bei $g = 11$ und $g = 16$ gehören zur superreduzierten Form. Proteinkonzentration 1,4 mM.

Übergänge ganzzahliger Spin-Systeme sind im Perpendicular Mode EPR aufgrund des Symmetrieverbotes nur sehr schwach sichtbar. Deswegen wurde Parallel Mode EPR-Spektroskopie angewandt, bei welcher diese Übergänge erlaubt und somit von höherer Intensität sind. Im Spektrum sind zwei sehr scharfe Signale bei $g = 11$ und 16 sichtbar (Fig. 62). Zusätzlich ist unter diesen scharfen Signalen ein sehr breites Signal zu erkennen. Die

Temperaturabhängigkeit der scharfen Signale zeigt deutlich, daß das $g = 11$ Signal vom Grundzustand herrührt. Vergleiche mit dem Fe-Protein der Nitrogenase bestätigen die Vermutung, daß der $[4\text{Fe-4S}]^0$ Cluster der superreduzierten Komponente A einen Spin $S = 4$ aufweist. Somit gehört das $g = 11$ -Signal zum ± 3 -Dublett und das $g = 16$ -Signal zum ± 4 -Dublett. Die Simulation dieser Signale konnte nicht vorgenommen werden, zumal ein $S = 4$ System extrem kompliziert aufgebaut ist und die Signale bislang noch nicht detailliert verstanden sind.

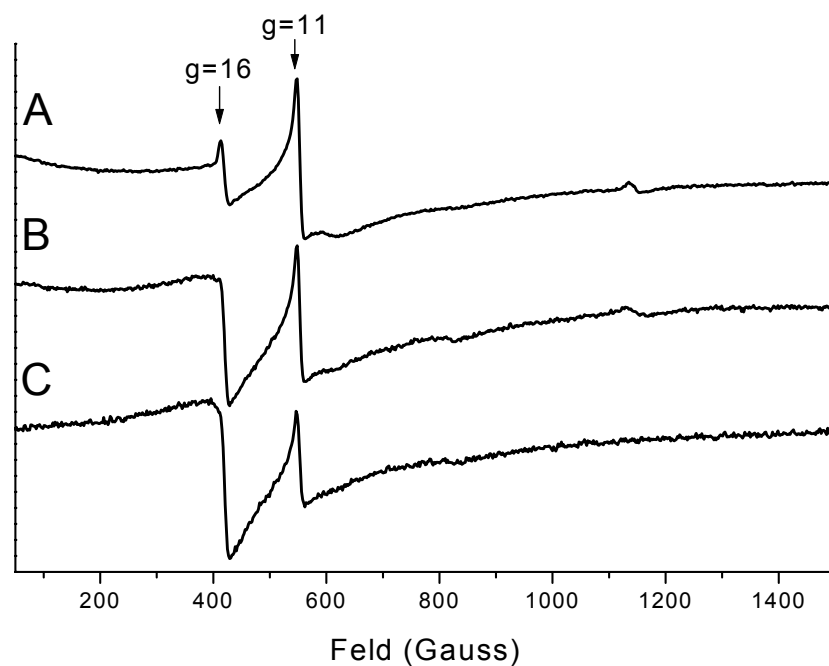


Fig. 62. Parallel Mode-EPR-Spektren superreduzierter Komponente A. Proteinkonzentration: 1,4 mM. Meßbedingungen: Frequenz: 9,338 GHz, Modulationsamplitude: 11,4 G, Mikrowellenleistung: 1,6 mW. (A) Temperatur: 3 K, (B) 10 K (C) 20 K.

14. Kristallisation der rekombinanten Komponente A aus *A. fermentans* und Auflösung der dreidimensionalen Struktur

Die Experimente zur Kristallisation der Komponente A sowie die Aufnahme der Datensätze wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthalts im Labor von Prof. Dr. Douglas C. Rees am California Institute of Technology in Pasadena, Kalifornien, U.S.A. durchgeführt. Komponente A konnte anaerob mit der Sitting drop-Methode unter folgenden Bedingungen kristallisiert werden:

Mutterlauge: Tri-Natriumcitratpuffer 100 mM pH 5,6, 20 %
PEG 4000, 20 % Isopropanol, 2 mM Dithionit

Proteinlösung: Komponente A 40 mg/mL in Tris/HCl 50 mM
pH 8, 0,3 M NaCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM
ADP, 4 mM Dithionit

Die Mutterlauge (0,5 mL) wurde im Sitting drop-Reservoir vorgelegt, die Proteinlösung wurde 1:2 mit Mutterlauge verdünnt (Gesamtvolumen 4 µL) und auf die dafür vorgesehene Position aufgetragen. Die Ansätze wurden mit selbstklebender Klarsichtfolie verschlossen und bei 25 °C im Anaerobenzelt aufbewahrt. Kristalle wuchsen innerhalb von 24 Stunden. Es waren ausschließlich dünne große Platten mit den maximalen Maßen 1,0 mm * 0,3 mm * 0,01 mm zu erhalten. Diese Kristalle wurden unter anaeroben Bedingungen zum Einfrieren in Citratpuffer 100 mM pH 5,6, 25 % PEG 4000, 25 % Isopropanol, 4 mM Dithionit überführt. Mit einem 200 µm-Loop wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Messungen der Diffraktion erfolgten am Stanford Synchrotron Radiation Laboratory in Stanford, Kalifornien, U.S.A.. Die Raumgruppe der Kristalle war P2₁ mit $\alpha \neq \beta = \gamma$. Komplette Datensätze wurden durch Drehung des Kristalls in 2 ° - Schritten für einen Bereich von 180 ° aufgenommen. Die Kristalle streuten maximal bis zu einer Auflösung von 2,2-2,0 Angström, aufgrund der registrierten Strahlenschäden wurde die Bestrahlungszeit entsprechend verringert; die Auflösung betrug maximal 2,7 Angström. Datensätze wurden bei drei verschiedenen Energien aufgenommen, welche auf der Eisen-Absorptionskante

lokalisiert waren (Fig. 63). Mit der MAD-Technik (Multi wavelength anomalous dispersion) konnte das Phasen-Problem überwunden werden. Dr. Kaspar P. Locher (California Institute of Technology) löste und verfeinerte die Struktur der Komponente A bis zu einer Auflösung von 3,0 Angström.

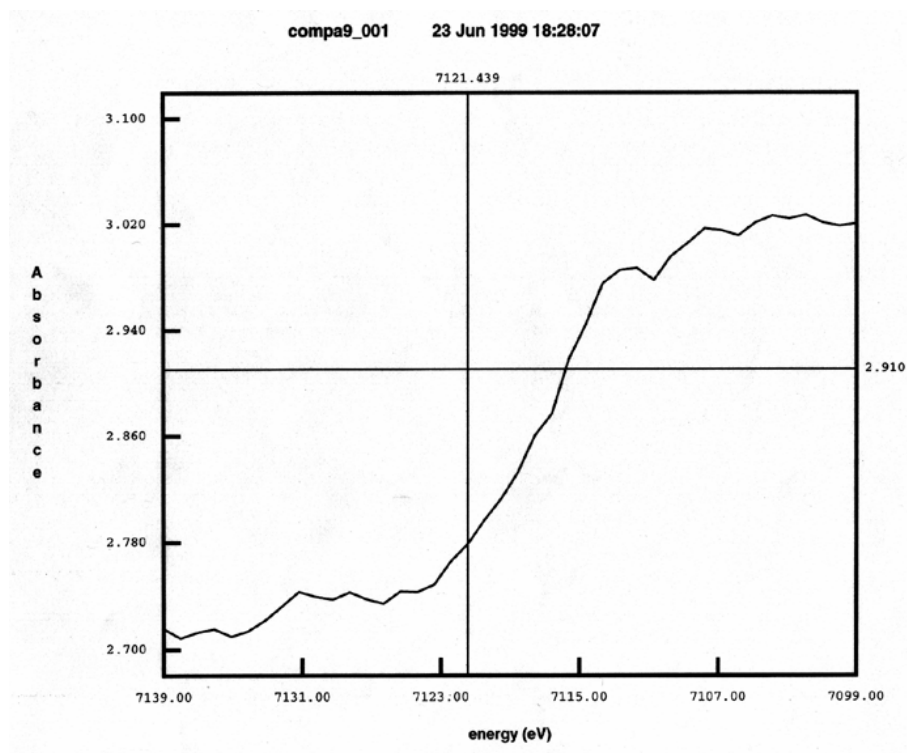


Fig. 63. Die Absorptionskante des [4Fe-4S]Clusters der rekombinanten Komponente A aus *A. fermentans*.

In der Kristallstruktur liegt Komponente A als homodimeres Protein vor (Fig. 64). Der [4Fe-4S]Cluster ist zwischen den Untereinheiten lokalisiert und wird von den Cysteinen 127 und 166 aufgespannt (Fig. 67). Zusätzlich hat jede Untereinheit ein ADP-Molekül gebunden (Fig. 64, Fig. 65). Die Faltung der Komponente A ähnelt denen mancher Zucker-Kinasen, der Hsp 70-Familie sowie des Aktins (Fig. 66). Dementgegen existiert kaum Ähnlichkeit zur Nitrogenase-Fe-Protein-Faltung.

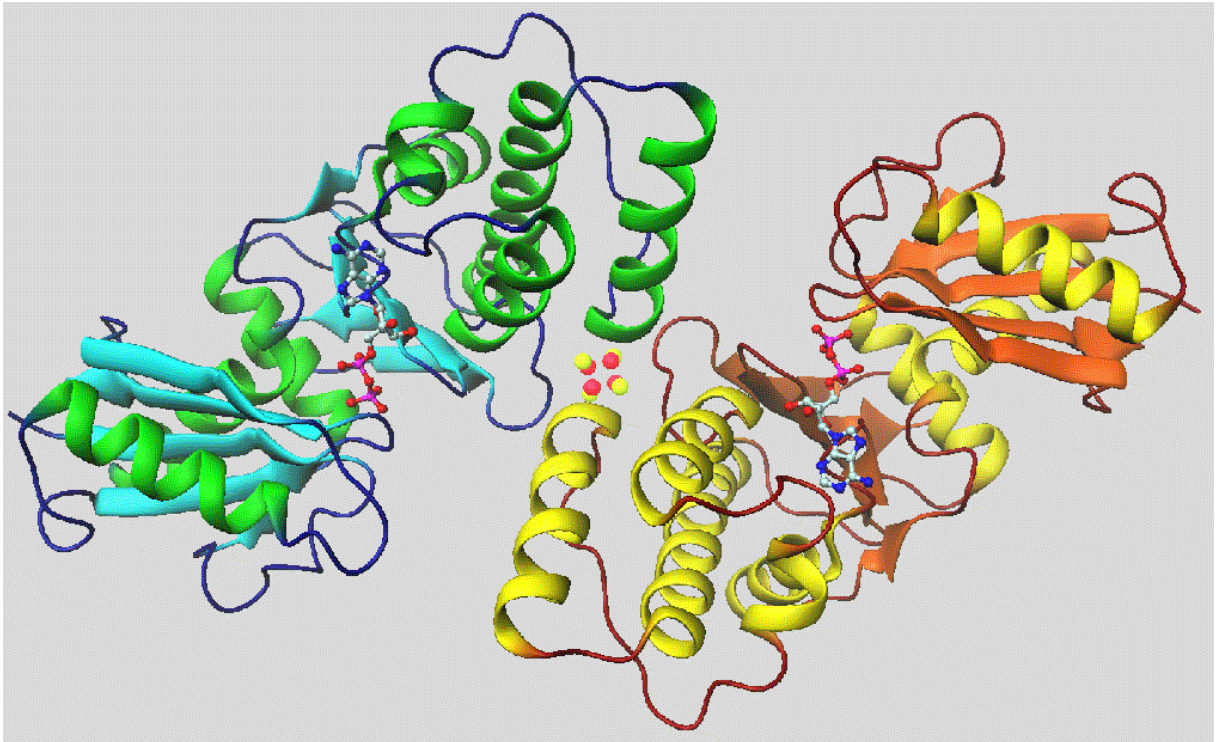


Fig. 64. Kristallstruktur der homodimeren rekombinanten Komponente A aus *A. fermentans*. Der [4Fe-4S]Cluster verbrückt beide Untereinheiten über die Cysteine 127 und 166. Pro Untereinheit ist ein ADP-Molekül gebunden.



Fig. 65. Vergleich der ATP-Bindestellen der Komponente A mit Rinder-Hsp70

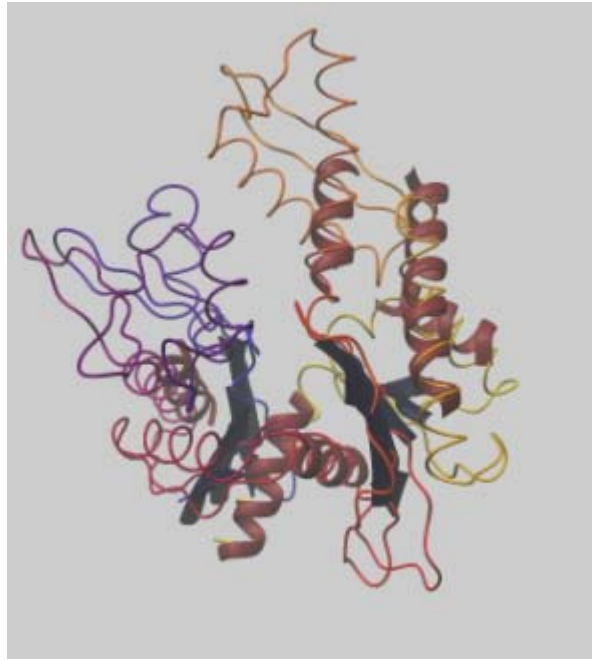


Fig. 66. Vergleich der Faltungstypen von Komponente A (links) und Rinder-Hsp70 (rechts). Die roten Strukturbereiche (eine β -Faltblattregion und 3 α -Helices) zeigen den sehr ähnlichen Faltungstyp beider Proteine auf.

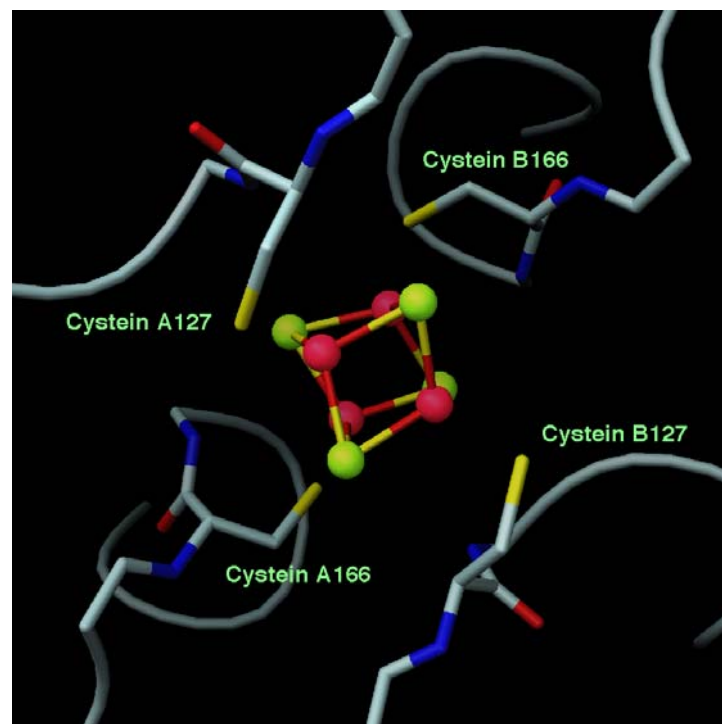


Fig. 67. Koordination des [4Fe-4S]Clusters in Komponente A durch die Cysteine 127 und 166.

15. Kombinierte EPR- und Mössbauer-spektroskopische Untersuchungen zur Interaktion zwischen den Komponenten A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans*

Zur Untersuchung des postulierten Katalysemechanismus wurde Komponente D mit äquimolaren Mengen reduzierter Komponente A versetzt. Mit EPR- und Mössbauer-Spektroskopie wurde der Einfluß der Nukleotide ADP, ATP und der Effekt des Substrats 2-Hydroxyglutaryl-CoA untersucht. Die zentrale Fragestellung dabei war, ob ein Elektronentransfer von reduzierter Komponente A auf Komponente D beobachtet werden kann und ob ein Substratradikal detektierbar ist.

Der Einfluß von ADP, ATP und 2-Hydroxyglutaryl-CoA

EPR-spektroskopische Untersuchungen an äquimolaren Mischungen von Komponente D mit reduzierter Komponente A in Gegenwart von ADP ergaben keine Hinweise auf mögliche Interaktionen der Proteine oder auf einen Elektronentransfer. Das Gesamtspektrum besteht aus der Summe der Einzelspektren der Komponenten der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase. Die Figur 68A zeigt das breite unaufgelöste $g \sim 4-6$ Signal des $S = 3/2$ $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der reduzierten Komponente A. Bei $g \sim 2$ ist das scharfe Signal des $[3\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der inaktivierten Komponente D sichtbar (Fig. 69A). Mössbauer-Studien an selektiv ^{57}Fe -markierter Komponente D in Anwesenheit eines schwachen externen magnetischen Feldes von 0,1 T zeigten einen oxidierten diamagnetischen $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster (Fig. 70A). Im Falle einer Reduktion würde das Signal weiter aufspalten und die Isomerieverschiebung würde sich von 0,44 mm/s auf 0,53 mm/s vergrößern (Meßgenauigkeit $\pm 0,01$ mm/s).

ATP induziert eine Interaktion zwischen den Komponenten A und D

Der Zusatz von ATP zu der äquimolaren Mischung der reduzierten Komponente A und der Komponente D bewirkte eine signifikante Veränderung des EPR-Signals des $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters der Komponente A. Vor ATP-Zugabe konnte eine Verteilung von E/D beobachtet werden, die durch eine Inhomogenität der Struktur des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der Komponente A

verursacht wurde. Mit ATP entstand ein neues Signal bei $g = 5,5$, das einer Rhombizität von 0,33 zugeordnet werden konnte; ATP stabilisiert wahrscheinlich in Anwesenheit der Komponente D einen katalytisch relevanten Zustand. Ohne Komponente D lassen sich diese Effekte nicht beobachten. Die beschriebenen spektroskopischen Veränderungen können als Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen den Komponenten A und D verstanden werden. Weiterhin ist ein EPR-Signal bei $g < 2$ mit maximal 25 % Spinkonzentration entstanden. (Fig. 69B). Untersuchungen an verschiedenen Enzympräparationen, in denen der Anteil des $[3\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der inaktiven Komponente D minimal war, zeigten, daß alle g -Werte dieses Signals zwischen $g = 1,95 - 1,85$ lagen (Fig. 71, Fig. 72). Ein $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster mit $S = 1/2$ weist in der Regel einen g -Wert > 2 auf, meist zwischen 2,04 und 2,06. Deshalb gehört dieses Signal wahrscheinlich zu einem anderen Paramagneten. Anhand der g -Werte könnte ein d^1 -Metall, z. B. Mo (V) oder W (V) ($S = 1/2$ Paramagneten) in Frage kommen.

Wird jetzt zusätzlich das Substrat 2-Hydroxyglutaryl-CoA zugegeben, ähnelt das EPR-Signal des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der reduzierten Komponente A wieder dem des Ausgangszustandes. Der $S = 1/2$ Zustand ist nicht mehr sichtbar (Fig. 69C). Alle $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster sind jetzt im $S = 3/2$ Zustand (Fig. 68C). Die Bindung des Substrates an Komponente D hat offensichtlich eine Veränderung der Struktur des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der Komponente A zur Folge. Mössbauer-Experimente an selektiv ^{57}Fe -markierter Komponente D zeigten, daß unter allen genannten Bedingungen keine Reduktion des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Clusters der Komponente D stattgefunden hat (Fig. 70).

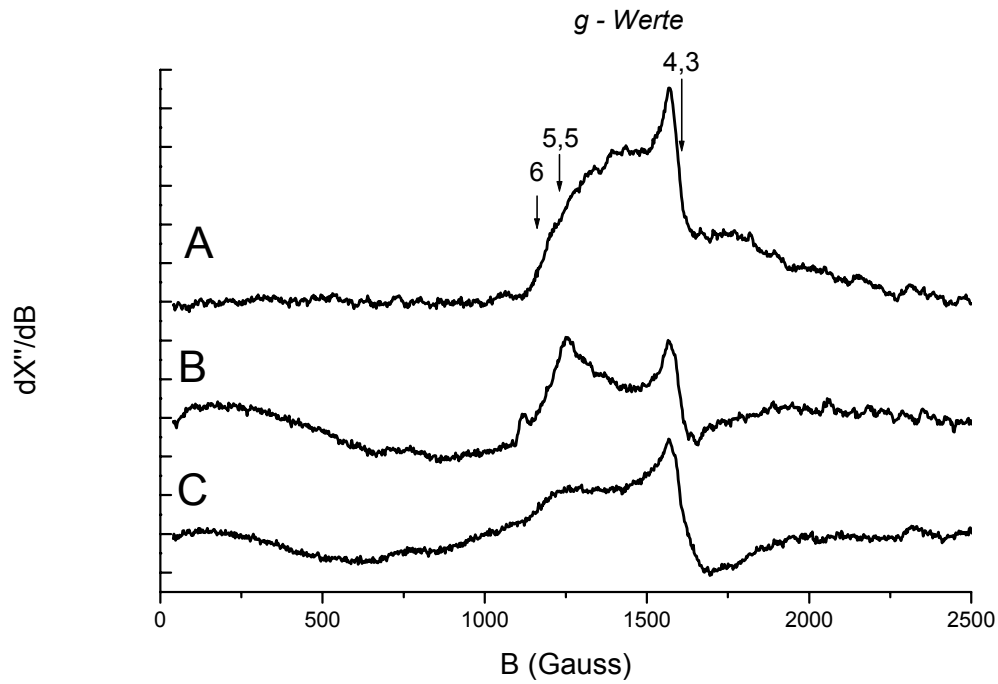


Fig. 68. EPR-Spektren einer äquimolaren Mischung aus Komponente D mit reduzierter Komponente A. Proteinkonzentration je 150 μM . Komponente D in 20 mM MOPS pH 7, Komponente A in 50 mM Tris/HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ADP. Meßbedingungen: Frequenz: 9,634 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 12,8 G, Mikrowellenleistung: 20 mW, Feldbereich von 50-2500 Gauss. (A) Zusatz von 10 mM ADP. (B) Zusatz von 10 mM ATP. (C) Zusatz von 10 mM ATP + 1 mM 2-Hydroxyglutaryl-CoA.

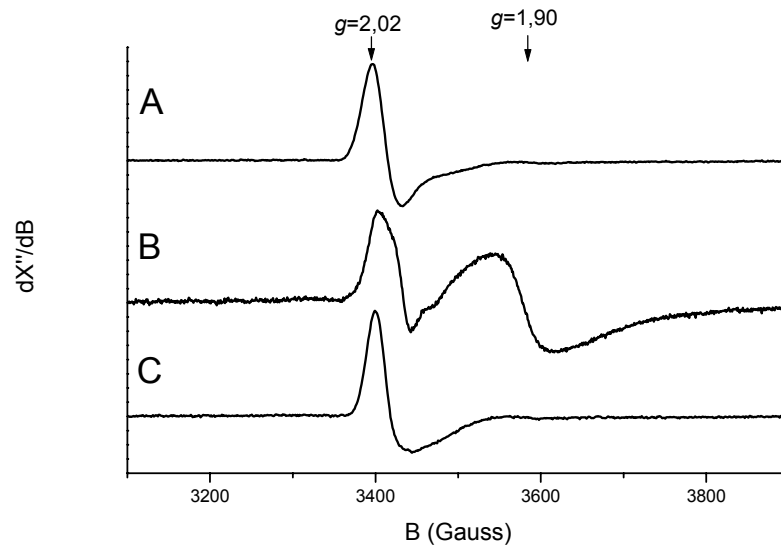


Fig. 69. EPR-Spektren einer äquimolaren Mischung aus Komponente D mit reduzierter Komponente A. Proteinkonzentration je 150 μM . Komponente D in 20 mM MOPS pH 7, Komponente A in 50 mM Tris/HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ADP. Meßbedingungen: Frequenz: 9,634 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 12,8 G, Mikrowellenleistung: 0,1 mW. (A) Zusatz von 10 mM ADP. (B) Zusatz von 10 mM ATP. (C) Zusatz von 10 mM ATP + 1 mM 2-Hydroxyglutaryl-CoA.

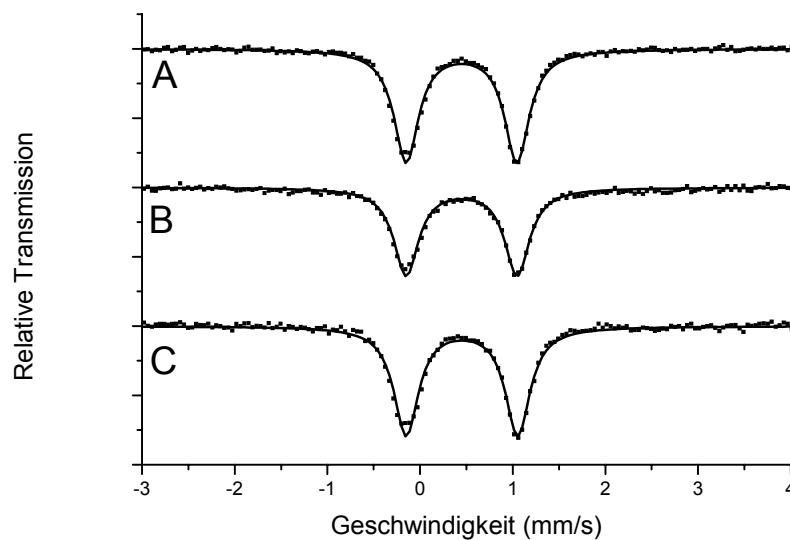


Fig. 70. Mössbauer-Spektren einer äquimolaren Mischung aus ^{57}Fe -Komponente D + reduzierter Komponente A in Anwesenheit von 0,1 T externen Feldes. (A) Zusatz von 10 mM ADP. (B) Zusatz von 10 mM ATP. (C) Zusatz von 10 mM ATP + 1 mM 2-Hydroxyglutaryl-CoA. Die drei Spektren konnten mit einem Quadrupoldublett mit folgenden Parametern unter der Annahme $S = 0$ simuliert werden: $\delta = 0,44$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,20$ mm/s, $\eta = 0,7$, $\Gamma = 0,32$, $S = 0$.

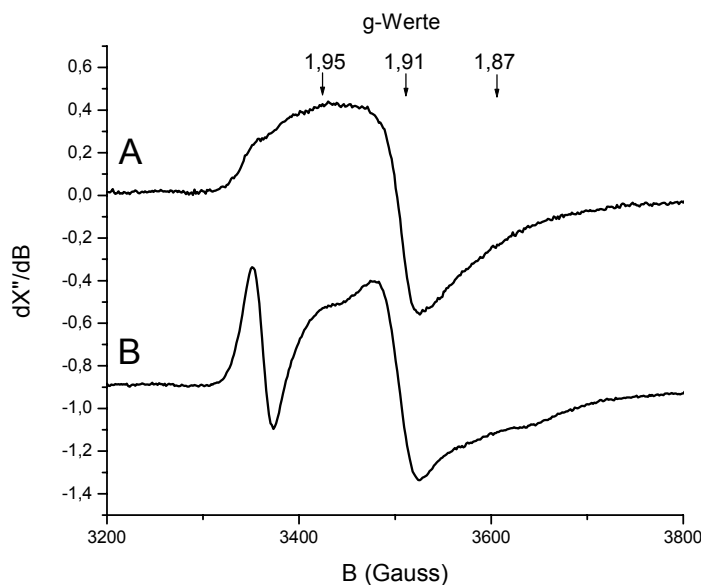


Fig. 71. EPR-Spektren einer äquimolaren Mischung aus Komponente D mit reduzierter Komponente A. Proteinkonzentration je 150 μM . Komponente D in 20 mM MOPS pH 7, Komponente A in 50 mM Tris/HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM ATP (A) oder 10 mM AMP-PNP (B). Die EPR-Signale zeigen g -Werte < 2 (das scharfe Signal bei $g = 2,01$ in (B) gehört zu einem $[\text{3Fe-4S}]^+$ Cluster der inaktiven Komponente D). Anhand der g -Werte könnte es sich um ein d^1 -Metall handeln. Meßbedingungen: Frequenz: 9,433 GHz, Temperatur: 10 K, Modulationsamplitude: 12,8 G, Mikrowellenleistung: 0,1 mW.

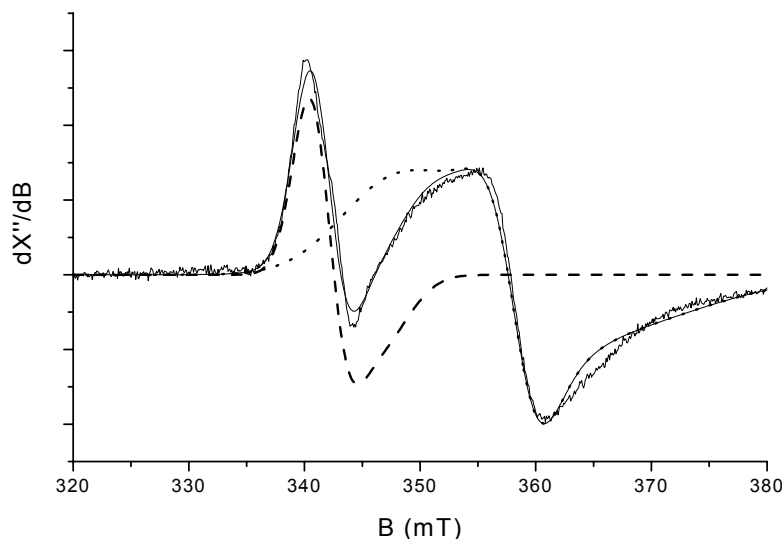


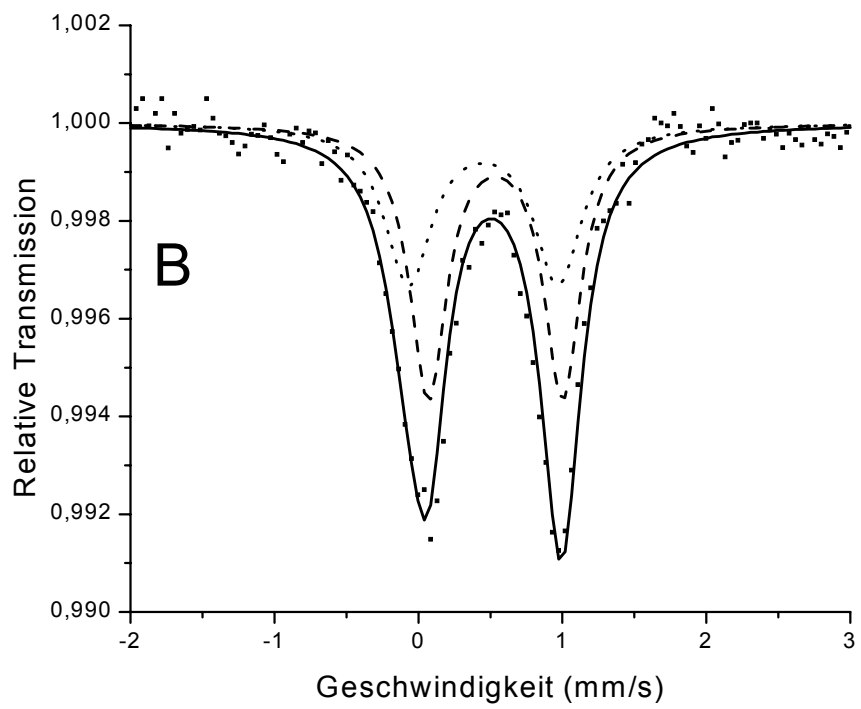
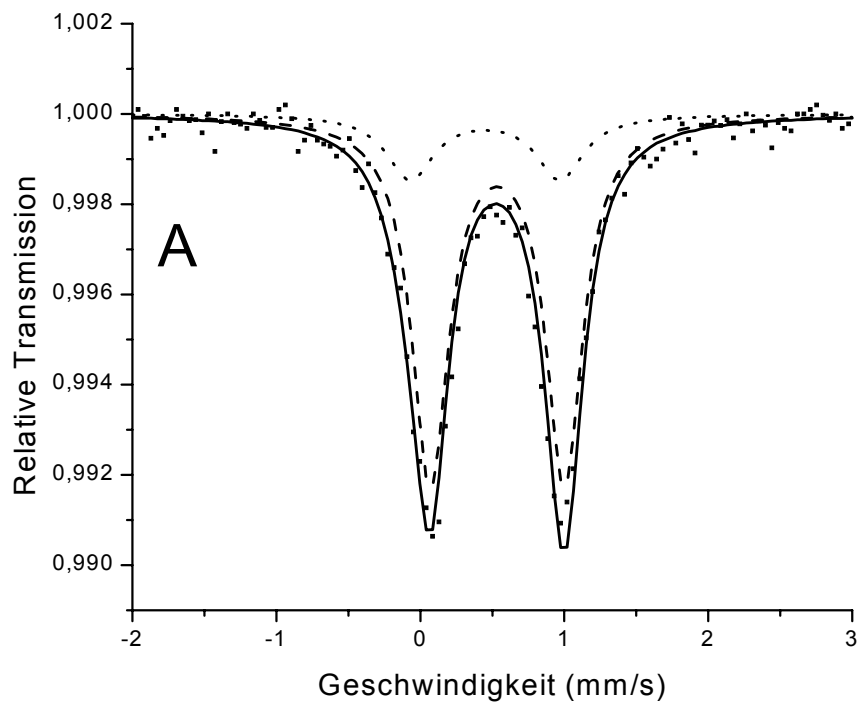
Fig. 72. Simulation des EPR-Spektrums 69B. (Durchgezogene Linie) Simulation des Gesamtspektrums mit 2 EPR-Signalen: (gestrichelte Linie) g -Werte: 2,015; 2,015; 1,983. Linienbreiten: 4,6, 4,6 und 6,7 mT. Die Parameter können einem $[\text{3Fe-4S}]^+$ Cluster zugeordnet werden. (gepunktete Linie) g -Werte: 1,978; 1,921; 1,866. Linienbreiten: 14,8, 4,5 und 26,8 mT. Die Parameter könnten einem d^1 -Metall zugeordnet werden (z. B. Mo (V) oder W (V)).

Die Oxidation der Komponente A in Gegenwart von Komponente D ist ATP-abhängig

In Fig. 68 ist deutlich zu erkennen, daß das EPR-Signal der Komponente A in Gegenwart von äquimolaren Mengen Komponente D nach Zugabe von ATP deutlich abnimmt. Man kann aus diesen Versuchen eine Oxidation des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters zum $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster erkennen. Eine Quantifizierung dieser breiten EPR-Signale ist vor allem durch die Veränderungen der Rhombizitäten E/D nicht möglich. Da der oxidierte $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster diamagnetisch und deswegen EPR-inaktiv ist, wurden Mössbauer-Experimente mit äquimolaren Mischungen von unmarkierter Komponente D und selektiv ^{57}Fe -markierter reduzierter Komponente A durchgeführt (Fig. 73). Die Daten belegen, daß zur Oxidation des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters der Komponente A ATP benötigt wurde. Während die Komponente A mit ADP zu 85 % reduziert vorlag, wurden nach ATP-Zugabe etwa 45 % der $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster zum $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster oxidiert. Zusatz des Substrates 2-Hydroxyglutaryl-CoA hatte eine komplette Oxidation der Komponente A zur Folge.

Ein unbekannter Kofaktor als Elektronenakzeptor der Komponente D ?

Mit den angewandten spektroskopischen Methoden konnte der Elektronenakzeptor nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Da in den Versuchen keine potentiellen niedermolekularen Oxidationsmittel vorhanden waren, muß Komponente D die Elektronen aufgenommen haben und daher reduziert worden sein. Die Redoxzustände der bislang identifizierten prosthetischen Gruppen, einem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster und einem FMNH₂, änderten sich nicht. Es ist möglich, daß Komponente D einen weiteren Kofaktor enthält, der als Elektronenakzeptor fungiert. Ein Indiz dafür ist, daß das neue, für einen $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster untypische Signal erst bei Oxidation der Komponente A entsteht.



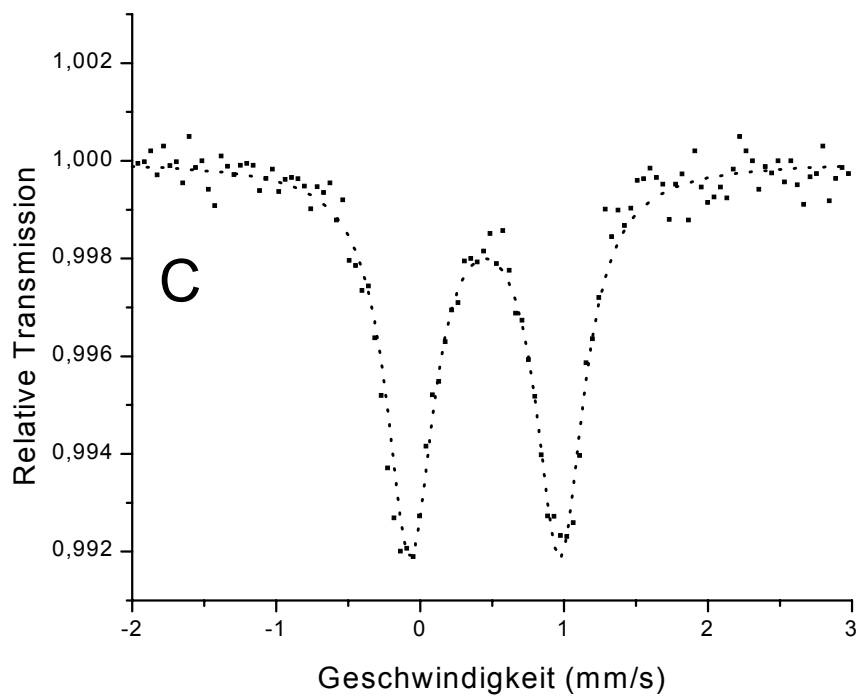


Fig. 73. Mössbauer-Spektren einer äquimolaren Mischung aus Komponente D + reduzierter ^{57}Fe -Komponente A ohne externes Feld. (A) Zusatz von 10 mM ADP. (B) Zusatz von 10 mM ATP. (C) Zusatz von 10 mM ATP + 1 mM 2-Hydroxyglutaryl-CoA. Die Spektren 73A und 73B können mit 2 Quadrupoldoublets simuliert werden (durchgezogene Linie). Subspektrum I ($\delta = 0,45$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,04$ mm/s, $\Gamma = 0,39$ mm/s): oxidierter $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ Cluster (gepunktete Linie). Subspektrum II ($\delta = 0,53$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,93$ mm/s, $\Gamma = 0,31$ mm/s): reduzierter $[\text{4Fe-4S}]^+$ Cluster (gestrichelte Linie). Mit ADP (Spektrum 73A) enthielt die Probe 15 % oxidierte Komponente A. Mit ATP (Spektrum 73B) konnte 45 % oxidierte Komponente A bestimmt werden. Zusatz von Substrat (Spektrum 73C) führte zu > 90 % oxidierten Komponente A.

Diskussion

1. Die Gene *hgdCAB* der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum*

Die drei Gene *hgdCAB* der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. symbiosum* wurden kloniert und sequenziert. Es wurde dabei deutlich, daß in diesem Organismus keine dem Hydroxyglutaratoperon vergleichbare Genanordnung vorliegt [53] [85]. Die Gene *hgdCAB* bilden eine eigene Transkriptionseinheit. Bis zu 400 Basen stromaufwärts konnte kein potentieller offener Leserahmen identifiziert werden. Somit ist die Lage der Gene *gctAB* der Glutaconat-CoA-Transferase sowie *gcdA* der α - Untereinheit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase unbekannt. Im Hydroxyglutaratoperon von *A. fermentans* liegen diese Gene stromaufwärts von den Dehydratasegenen. Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Proteine HgdC, HgdA und HgdB zeigen bis zu 76 % Sequenzidentitäten zu den Untereinheiten der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* und *Fusobacterium nucleatum*. Übereinstimmend damit wurden beide letztgenannten Organismen mit Hilfe ihrer 16S rRNA-RNA als Clostridien klassifiziert [1]. Darüber hinaus existieren Sequenzidentitäten zwischen 20 % und 45 % zu meist hypothetischen Proteinen aus methanogenen Archaea sowie anaeroben Eubakterien (Tabelle 1) [85]. Hinsichtlich mechanistischer Studien ist die Sequenzidentität zu den Untereinheiten der heterotetrameren Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* und *Rhodopseudomonas palustris* hervorzuheben [86] [87] [60]. Die Enzyme katalysieren unter stöchiometrischem Verbrauch von ATP sowie Reduktionsäquivalenten die Reduktion von Benzoyl-CoA zum entsprechenden Cyclohexadienderivat [61-63]. Es existiert je eine homologe Untereinheit zu den Proteinen HgdA und HgdB, während die beiden anderen Untereinheiten zu HgdC homolog sind [85]. Für die Benzoyl-CoA-Reduktase und die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase werden verwandte Mechanismen postuliert, bei denen Ketylradikalanionen als reaktive Intermediate eine zentrale Rolle spielen [46]. Alle HgdC-homologen Proteine weisen zwei strikt konservierte Aminosäurebereiche auf. Zum einen ist eine den Zucker-Kinasen ähnliche ATP-Bindestelle konserviert [88], zum anderen sind in allen Sequenzen zwei Cysteine erhalten. Letztere sind wahrscheinlich für die Bildung eines [4Fe-4S]Clusters verantwortlich, wie es für Komponente A (HgdC)₂ gezeigt werden konnte. Zwei Cysteine jeder Untereinheit (C127 und C166) spannen einen Cluster im dimeren Protein auf, woraus eine kovalente

Untereinheitenverbrückung resultiert. Das Vorhandensein dieser zu HgdC homologen Proteine könnte auf ein allgemeines mechanistisches Prinzip in anaeroben Organismen hindeuten, chemisch schwierige Reduktionen durch ATP-Hydrolyse zu katalysieren. Die zu HgdA und HgdB homologen Proteine weisen keine derart signifikanten konservierten Bereiche auf. Es liegen nur zwei bzw. drei strikt konservierte Cysteine vor. Auch diese könnten an der Bildung des [4Fe-4S]Clusters in Komponente D aus *A. fermentans* und an einem der beiden [4Fe-4S]Cluster in Komponente D aus *C. symbiosum* beteiligt sein.

2. Vergleich der Komponenten D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* und *C. symbiosum*

Die Reinigungsprozeduren der Komponenten D aus *A. fermentans* und *C. symbiosum* konnten im Rahmen dieser Arbeit entscheidend verbessert werden. Aufgrund der großen Ähnlichkeit konnten beide Enzyme mit der gleichen Reinigungsmethode in drei Chromatographieschritten zur Homogenität gereinigt werden. Im Gegensatz zu früheren Methoden wurden Gelfiltrationsmaterialien umgangen, die zu hohen Aktivitätsverlusten führten. Aus 25 g Feuchtzellen *A. fermentans* konnten 50 mg Komponente D erhalten werden, während aus der gleichen Menge *C. symbiosum* Zellen 25 mg Enzym isoliert werden konnte. Dies zeigte, daß in *A. fermentans* die doppelte Menge dieses Proteins vorhanden war. Gleichzeitig wurde jedoch eine im Vergleich zur Komponente D aus *C. symbiosum* eine 6-fach niedrigere spezifische Aktivität gemessen, die hinsichtlich der starken Ähnlichkeiten beider Enzyme unerwartet war. Beide Proteine besitzen im nativen Zustand heterodimere Struktur, die Untereinheiten weisen jeweils eine 65-75 %ige Identität auf Aminosäureebene auf. Kombinierte HPLC- sowie UV-vis-spektroskopische Studien identifizierten $1,0 \pm 0,1$ FMN-Hydrochinon/Heterodimer in beiden Organismen. Weiterhin wurden in Abhängigkeit von der Enzympräparation bis zu $0,1$ Riboflavin/Heterodimer nachgewiesen. Da die Riboflavinmenge nicht mit der spezifischen Aktivität korrelierte, wird es sich dabei wahrscheinlich um unspezifisch gebundenes Riboflavin handeln. Das FMN-Hydrochinon erwies sich als äußerst resistent gegen Oxidation. Weder mit Thionin noch mit DCPIP war die Oxidation zu einem Semichinon- oder Benzochinonzustand möglich. Zusatz von Hexacyanoferrat (III) führte zur Denaturierung des Enzyms. Chemische Bestimmungen von Nicht-Häm-Eisen sowie von säurelabilem Schwefel in Verbindung mit Mössbauer-Spektroskopie an ^{57}Fe -angereicherter Komponente D zeigten, daß Komponente D aus *A. fermentans* nur einen $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster enthält, während in *C. symbiosum* zwei solche Cluster gefunden wurden. Ebenso wie FMNH_2

sind diese Cluster resistent gegen eine Veränderung der Redoxzustände. Mit chemischen Reduktionsmitteln wie Dithionit pH 8 oder Photoreduktion mit 5'-Deazariboflavin konnte keine Reduktion der $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster beobachtet werden.

Clostridien - Cluster						
	HgdA	100%	HgdB	100%	HgdC	100%
<i>Clostridium symbiosum</i> (XIVa)						
<i>Acidaminococcus fermentans</i> (IX)	HgdA	73%	HgdB	63%	HgdC	76%
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (XIX)	HgdA	57%	noch nicht kloniert			
Archaea, Euryarchaeota						
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AF1958	25%	AF1957	17%	AF1959	46%
<i>Methanopyrus kandleri</i>	Orf7	11%	Orf7	21%	Orf6	35%
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	nicht gefunden				OrfX	29%
<i>Methanosarcina barkeri</i>	nicht gefunden				OrfX	24%
<i>Methanococcus jannaschii</i>	MJ0007	14%	MJ0007	20%	MJ0004	31%
					MJ0800	27%
Proteobakterien						
<i>Escherichia coli</i> (γ -Gruppe)	nicht gefunden		YJIM	16%	YJIL	36%
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (α -Gruppe)	BadE	16%	BadD	22%	BadG	25%
<i>Thauera aromatica</i> (β -Gruppe)	BcrB	15%	BcrC	20%	BcrD	25%

Tabelle 1. Vergleich der Aminosäuresequenzen von HgdA, HgdB und HgdC aus *C. symbiosum* mit anderen charakterisierten oder hypothetischen Proteinen aus Eubakterien und Archaea.

In allen Enzympräparationen konnte ein geringer Anteil von 5-10 % $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Sauerstoffinaktivierung der Komponente D, auf die im folgenden noch genauer eingegangen wird, konnten diesen Clustertyp inaktivem Enzym zuordnen.

3. Produktion aktiver rekombinanter Komponente D der 2-Hydroxy-glutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* in *E. coli* BL21 (DE3)

Das gesamte *HgdAB*-Fragment konnte bisher nicht über PCR amplifiziert und in einen Vektor ligiert werden. Die Konstrukte erwiesen sich als instabil und verloren das Insert. Die Gründe hierfür sind nicht ersichtlich. Eventuell spielen bakterienspezifische Methylierungsmuster für die Stabilität der Fragmente im Vektor eine Rolle. Möglich ist auch, daß die DNA Sekundärstrukturen ausbildet und ab einer bestimmten Länge nicht mehr in Vektoren ligierbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit war es erstmals gelungen, die beiden Gene einer 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase zusammen aktiv in *E. coli* zu exprimieren. Die erfolgreiche Klonierungsstrategie bestand darin, die Gene erst einzeln zu klonieren, die Fragmente aus *E. coli* zu isolieren und später zusammen mit dem Expressionsvektor zu ligieren. Aus 5 g *E. coli* Feuchtzellen konnten ca. 2-3 mg Komponente D mit einer spezifischen Aktivität von 3 U/mg isoliert werden. Dies entspricht etwa 50 % der spezifischen Aktivität des Wildtyp-Enzyms. Rekombinante Komponente D besitzt ebenso wie das Wildtyp-Enzym 1,0 $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster, aber nur 0,3 reduziertes FMN, wodurch die niedrigere spezifische Aktivität erklärt werden kann. Die Synthese aktiver rekombinanter Komponente D in *E. coli* zeigt, daß keine für Clostridien spezifischen Proteine an der Biosynthese des Eisen-Schwefel-Zentrums beteiligt sind. Für die meisten Eisen-Schwefel-Proteine wird angenommen, daß die Clusterbildung ein spontaner Prozeß ist und keine Hilfsenzyme notwendig sind. Eine Ausnahme stellt das Nitrogenase Fe-Protein dar. Das Protein NifS ist für den Einbau des $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters essentiell; es katalysiert die Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Disproportionierung von Cystein zu Alanin und einem Protein-gebundenem Persulfid [89] [90]. Interessant ist der substöchiometrische Gehalt an FMNH_2 , da in der Regel die Synthesekapazität von Riboflavin in *E. coli* nicht den limitierenden Schritt bei der Überproduktion von Flavoproteinen darstellt (Florence Lederer, Gif-sur-Yvette, persönl. Mitteilung).

4. Reinigung der rekombinanten Komponente A mit StrepTag-Affinitätschromatographie sowie Charakterisierung der prosthetischen Gruppen

Frühere Untersuchungen zur Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* belegten die hohe Instabilität des Proteins, insbesondere gegen Sauerstoff. Daraus resultierte, daß eine Reinigung des Proteins weder aus dem Organismus selbst noch rekombinant aus *E. coli* möglich war. Versuche, das Protein rekombinant durch Fusion an maltosebindende Proteine, Inteine oder Histidin-Tags aktiv zu isolieren, scheiterten ebenfalls. In Fusionsproteinen wurde der [4Fe-4S]Cluster nicht im Protein eingebaut, mit einem C-terminalen His-Tag war Komponente A zwar aktiv, konnte aber nicht aktiv von der Ni-NTA-Säule eluiert werden, da die Elutionsbedingungen bei $\text{pH} < 5$, mit 200 mM Imidazol oder Histidin zur Inaktivierung führten. Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose war als einzige Methode geeignet, rekombinante Komponente A in aktiver Form zu isolieren [91] [92-94]. Dazu wurde ein zu Streptavidin hochaffines Peptid C-terminal an Komponente A fusioniert. Das Protein ließ sich durch Zusatz von 3 mM Desthiobiotin aktiv eluieren und wies eine spezifische Aktivität von 25-30 U/mg auf. Rekombinante Komponente A wurde durch Mg^{2+} -Ionen und ATP bzw. ADP stabilisiert. Dieser Effekt beruht auf der Bindung der Nukleotide an die Untereinheit des homodimeren Proteins. Müller & Buckel postulierten schon 1995 anhand Sequenzvergleichen eine den Zucker-Kinasen ähnelnde ATP-Bindestelle [49]. Aber erst die Kristallstruktur der Komponente A zeigte endgültig, daß pro Untereinheit ein Nukleotid an das Zucker-Kinase-Motiv bindet. Der Grund für die Stabilisierung des Enzyms durch Mg^{2+} -Ionen ist noch unklar, da die Auflösung der Kristallstruktur zur Detektion eines Mg^{2+} -Ions nicht ausreichend ist. Vorstellbar ist eine Koordination an das Nukleotid oder an einen Aminosäurerest. EPR-spektroskopische Studien konnten einen ungewöhnlichen $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster als prosthetische Gruppe der Komponente A identifizieren. Gewöhnlich zeigen $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster mit dem Elektronenspin $S = 1/2$ ein scharfes EPR-Signal bei $g = 2,05, 1,99$ und $1,87$. Der $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster der Komponente A hingegen besitzt zu mindestens 97 % einen Elektronenspin $S = 3/2$. Dieser Zustand zeigt im EPR sehr breite, fast über den gesamten Feldbereich verteilte Signale [19] [81, 82] [95]. Diese weisen neben der starken Linienbreite eine sehr geringe Signalintensität auf. Bemerkenswert ist, daß die Simulation des Signals nur mit einer Verteilung von Rhombizitäten erreicht werden konnte. Dies zeigt, daß das Protein inhomogen ist. Anders ausgedrückt, Komponente A besteht aus mehreren, wenn auch sehr ähnlichen Konformationen. Die Veränderungen einer Protein- oder

Clusterstruktur, welche zur Veränderung der Rhombizität beitragen, können minimal sein, trotzdem sind sie signifikant. Reine oder fast reine $S = 3/2$ -Signale sind bisher kaum beschrieben worden. Das einzige gut charakterisierte $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster-Protein mit $S = 3/2$ ist eine Mutante des *Pyrococcus furiosus* Ferredoxins [96]. Der sauerstoffregulierte Transkriptionsfaktor FNR aus *E. coli* scheint ebenfalls einen 100 % igen $S = 3/2$ -Zustand aufzuweisen [97]. Im Regelfall bestehen die reduzierten $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster aus Spinmischungen mit $S = 1/2$, $3/2$ und in manchen Fällen sogar $5/2$ und $7/2$. Das am besten untersuchte Beispiel ist das Fe-Protein der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* [82] [81]. Dieses Enzym, welches die ATP-gekoppelte Elektronenübertragung auf das MoFe-Protein der Nitrogenase zur Stickstoffreduktion katalysiert, besteht immer aus einem gemischten Spinsystem mit $S = 1/2$ und $3/2$. Der Zusatz von Substanzen wie Ethylenglycol oder Harnstoff kann die Verhältnisse stark beeinträchtigen; mehr als 80 % einer Spezies werden aber nie erreicht. Der Wildtyp des *Pyrococcus furiosus* Ferredoxins zeigt sogar eine Mischung aus $S = 1/2$, $3/2$ und $5/2$. Welche Faktoren das Auftreten eines bestimmten Spinzustandes eines $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters bedingen, ist noch größtenteils unverstanden. Durch die Struktur des Nitrogenase Fe-Proteins konnte belegt werden, daß sich $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster mit $S = 3/2$ kaum von jenen mit $S = 1/2$ unterscheiden [54]. Systematische Studien an synthetischen Modellverbindungen belegten, daß ein Spinzustand nicht einer bestimmten Clusterverzerrung zugeordnet werden kann [98] [99, 100]. Trotzdem scheint der $S = 3/2$ -Zustand gegen Veränderungen der Proteinumgebung des $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters sehr empfindlich zu sein, die sich in einer Veränderung der Rhombizität E/D ausdrücken. Dieser Befund ermöglichte den Einsatz des $S = 3/2$ $[4\text{Fe-4S}]^+$ Clusters als Sonde für Protein-Protein-Interaktionen.

5. Sauerstoffinaktivierung der Komponenten A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Die spektroskopischen Untersuchungen der beiden Proteinkomponenten der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase zeigten, daß beiden Proteinen molekularer Sauerstoff einen Zerfall der $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster bewirkt. Der $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster der Komponente D wandelt sich in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff mit einer Halbwertszeit von 2 Tagen in einen $[3\text{Fe-4S}]^+$ Cluster um, wobei die enzymatische Aktivität in gleichem Maße abnahm. Dementgegen wird der $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster der Komponente A so rasch durch Luft in einen

[2Fe-2S]²⁺Cluster umgewandelt, daß eine Zerfallskinetik nicht verfolgt werden konnte. Eisen-Schwefel-Cluster-Umwandlungen sind keine neuartigen Phänomene. Am häufigsten wurde die [4Fe-4S] → [3Fe-4S] Umwandlung beschrieben, typische Beispiele sind die Aconitase aus Schweineherz und Serin-Dehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* und *E. coli* [18, 101, 102] [27] [28]. Für beide Enzyme hat diese Umwandlung keine physiologische Bedeutung. Sie zeigte jedoch, daß die [4Fe-4S]Cluster beider Proteine eine ungewöhnliche Koordination eines der vier Eisenatome aufwiesen. Während drei Eisenatome durch ein Cystein an das Protein koordiniert sind, ist der vierte Ligand eines Eisenatoms (des sogenannten Fe_a) ein Hydroxylion. Während der Katalyse wird dieses Hydroxylion protoniert, Fe_a bindet zwei Sauerstoffatome des Citrates, insgesamt sind sechs Liganden verzerrt oktaedrisch koordiniert [103, 104]. Diese einzigartige Clusterkoordination wurde durch kombinierte EPR- und Mössbauerstudien sowie durch ENDOR-Spektroskopie belegt [105, 106] [107-109]. Von Vorteil war dabei, daß der [4Fe-4S] → [3Fe-4S]-Übergang in der Aconitase reversibel ist. Durch Zusatz von Eisen(II) und Sulfid wurde der [4Fe-4S]²⁺Cluster rekonstituiert. Somit konnte durch selektiven Einbau von ⁵⁷Fe mit Mössbauer-Spektroskopie ausschließlich die Koordination des Fe_a-Atoms untersucht werden. Die [4Fe-4S]Cluster der Komponenten A und D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase ließen sich bisher nicht rekonstituieren; es gibt allerdings Hinweise, daß eine Rekonstitution im Zellextrakt von *A. fermentans* möglich ist [110]. Die sauerstoffinaktivierte, [2Fe-2S]²⁺Cluster-haltige Komponente A ist trotz Mg²⁺-Ionen und Nukleotiden instabil und besitzt eine starke Tendenz zur Präzipitation. [4Fe-4S] → [2Fe-2S] Umwandlungen sind bedeutend seltener als die diskutierten [4Fe-4S] → [3Fe-4S]-Übergänge anzutreffen. Beispiele sind das Nitrogenase Fe-Protein aus *Azotobacter vinelandii* [111], das FNR-Protein aus *E. coli* [97] [32] und die Biotin-Synthase aus *E. coli* [112]. Luftsauerstoff führt in allen diesen Proteinen zur Clusterumwandlung. Für das Fe-Protein der Nitrogenase ist zusätzlich nachgewiesen worden, daß Fe(II)-Chelatoren wie α, α'-Bipyridyl oder Bathophenanthrolin-Disulfonat zur [2Fe-2S]²⁺Cluster-Spezies führen [111]. Die [4Fe-4S] → [2Fe-2S]-Umwandlungen des FNR-Proteins und der Biotin-Synthase besitzen im Gegensatz zum Fe-Protein, aber auch zu allen bisher bekannten [4Fe-4S] → [3Fe-4S]-Umwandlungen eine physiologische Bedeutung und sind reversibel. FNR ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in seiner aktiven dimeren, zwei [4Fe-4S]Cluster-haltigen Form die Gene des anaeroben Metabolismus aktiviert, unter anderen die Fumarat-Reduktase-Gene und die Nitrat-Reduktase-Gene. Molekularer Sauerstoff bewirkt einen Zerfall des Dimers zum inaktiven [2Fe-2S]Cluster-haltigen Monomer. Unter anaeroben Bedingungen wird die aktive dimere Form zurückgebildet. Die Biotin-Synthase wird unter

aeroben Bedingungen als inaktives [2Fe-2S]Cluster-haltiges Monomer isoliert und kann durch Zusatz von überschüssigem Fe(II) sowie Reduktionsmittel in die aktive, dimere [4Fe-4S]Cluster haltige Form überführt werden. Wahrscheinlich besitzt die Umwandlung der Cluster eine regulatorische Funktion gegen oxidative Stressbedingungen [112].

6. Reinigung und Charakterisierung des 16 kDa-Flavodoxins, einem natürlichen Elektronendonors des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-systems aus *A. fermentans*

Wie in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, ist die Aktivität der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase strikt von starken Reduktionsmitteln abhängig [36] [49]. Im Enzymtest wird aus diesem Grund Titan(III)citrat zugesetzt. In *A. fermentans* müsste somit ein Elektronendonors vorhanden sein, der Elektronen auf die Dehydratase übertragen kann. Die zur Aktivierung der Dehydratase notwendigen Reduktionsäquivalente werden in *A. fermentans* von NADH vermutlich auf die membranständige Flavin- und [4Fe-4S]Cluster haltige Oxidoreduktase übertragen (Julia Bresser, persönliche Mitteilung). Dieses Protein senkt wahrscheinlich durch reversen Elektronentransport das Potential der Elektronen auf ~ -400 mV ab, das zur Reduktion z. B. von Eisen-Schwefel-Zentren notwendig ist. Wiebke Thamer identifizierte ein 6 kDa-Ferredoxin als natürlichen Elektronendonors. Dieses Protein besitzt zwei miteinander koppelnde [4Fe-4S]^{2+/+}Cluster, wie durch EPR-Spektroskopie gezeigt werden konnte. Austausch des Reduktionsmittels Titan(III)citrat gegen reduziertes Ferredoxin im Enzymtest führte zur Vollaktivierung der Dehydratase. Wachstum von *A. fermentans* unter Eisenmangelbedingungen führte zur Synthese eines 16 kDa-Flavodoxins, während das Ferredoxin nicht mehr produziert wurde. Daß Organismen je nach Wachstumsbedingungen verschiedene Elektronentransferproteine nutzen können, ist seit langem bekannt. Eingehend untersucht ist das Ferredoxin/Flavodoxin-Verhältnis in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration im Medium in *Clostridium formicoaceticum* [113]. Das Flavodoxin aus *A. fermentans* wurde in der blauen Semichinonform SQ[•] isoliert. Es wirkte aber nur in der vollreduzierten Hydrochinonform QH₂ auf die Dehydratase aktivierend, das aufgrund der bestimmten Mittelpunktspotentiale des Proteins (-430 mV und -60 mV) zu erwarten war. Kinetische Studien zeigten weiterhin, daß zur Vollaktivierung der Dehydratase mit Flavodoxin QH₂ eine 6-fach höhere Konzentration im Vergleich zu Komponente A zugesetzt werden musste. Dagegen führten erst 100 µM Ti(III)citrat zur Vollaktivierung [36],

während die Konzentration des Flavodoxin-Hydrochinon 0,5-3 μM betrug. Dies zeigt, daß das Flavodoxin ein bedeutend effektiverer Elektronendonator als Ti(III)citrat ist, obwohl das Mittelpunktpotential von letzterem mit -500 mV bei $\text{pH } 8$ [84] angegeben wird. Da die Elektronen aber vom Flavodoxin zur Dehydratase höchstwahrscheinlich durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung übertragen werden, ist die Effizienz des Transfers nicht nur vom Potential, sondern sicher auch von der Entfernung der Redoxzentren abhängig [114]. Für die Oxidationsreaktion eines Flavodoxin-Semichinons konnte darüberhinaus nachgewiesen werden, daß die Ionenstärke und die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Reaktionspartnern entscheidend die Reaktionsrate beeinflusst [37] [115, 116]. UV-vis-spektroskopische Studien an äquimolaren Mischungen von Flavodoxin-Hydrochinon und oxidierter Komponente A belegten, daß *in vitro* Elektronen quantitativ auf oxidierte Komponente A übertragen werden. Dies impliziert, daß Komponente A auch *in vivo* als Elektronenakzeptor des 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratasesystems fungiert. Im Gegensatz zu den spektroskopischen Befunden zeigt die kinetische Analyse, daß ein 6-facher Überschuss an Flavodoxin-Hydrochinon relativ zu Komponente A zur Vollaktivierung der Dehydratase notwendig ist. Eine mögliche Erklärung wären Sauerstoffspuren, da der Enzymtest in verschlossenen Küvetten außerhalb des Anaerobenzeltes durchgeführt wurde. Welche Funktionen das Flavodoxin neben der Aktivierung der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase ausübt, ist noch nicht hinreichend untersucht worden. In *A. fermentans*-Rohextrakten wurde eine signifikante Hydrogenase-Aktivität gemessen [117]. Erste molekularbiologische Experimente ergaben Hinweise auf eine komplexe Fe-Hydrogenase (Julia Bresser, persönliche Mitteilung). Diese Enzyme sind jedoch sehr instabil und zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht nativ isoliert worden. Es ist möglich, daß das Flavodoxin ebenfalls als natürlicher Elektronendonator bzw. Akzeptor dieser Hydrogenase fungiert.

7. Der Einfluß der Nukleotidbindung und des Redoxzustandes des [4Fe-4S]⁺²⁺ Clusters auf die Konformation der rekombinanten Komponente A

Die meisten [4Fe-4S]Cluster in Proteinen erweisen sich als äußerst resistent gegen Fe (II)-Chelatoren wie Bathophenanthrolin-Disulfonat oder α, α' -Bipyridyl. Die Cluster sind durch die Polypeptidumgebung vor Angriff durch Chelatoren und ähnliche Nukleophile geschützt. Zwei Ausnahmen sind in der Literatur beschrieben worden. Der [4Fe-4S]²⁺Cluster der aktiven Aconitase wird durch Inkubation mit Bathophenanthrolin-Disulfonat in einen [3Fe-4S]⁺Cluster umgewandelt [118]. Dieser Clusterabbau wird durch die bereits unter 5. besprochene besondere Koordination des Fe_a-Atoms begünstigt. Der [4Fe-4S]⁺Cluster des aktiven Nitrogenase-Fe-Proteins wird durch Chelatoren wie Bathophenanthrolin-Disulfonat oder α, α' -Bipyridyl in einen [2Fe-2S]²⁺Cluster überführt [111] [119]. Die Chelatisierungsrate erhöht sich durch den Zusatz von ATP, während mit ADP kaum ein Effekt zu beobachten ist. Diese Experimente wurden als Indiz für mindestens zwei verschiedene Konformationen des Proteins gedeutet, wobei die ATP-induzierte Konformation einen stärker zur Proteinoberfläche hin exponierten [4Fe-4S]Cluster aufweist. Chelatisierungsexperimente mit rekombinanter Komponente A belegten eindeutig, daß Nukleotidbindung an die ATP-Bindestellen zu einer Veränderung der Proteinkonformation führt. Inkubation von 20 μ M Komponente A mit ADP führte zu einer schwachen Chelatisierungsrate von 2,4 μ M Fe(II)/min, während ATP-Zusatz eine Erhöhung der Rate auf 27 μ M Fe(II)/min bewirkte. In der ATP-induzierten Konformation scheint der [4Fe-4S]^{2+/+}Cluster näher zur Proteinoberfläche hin exponiert zu sein. Während die Chelatisierungsraten durch den Redoxzustand des [4Fe-4S]⁺²⁺Clusters nicht beeinflusst wurden, war der Effekt auf die ATPase-Aktivitäten der Komponente A signifikant. Das oxidierte, einen [4Fe-4S]²⁺Cluster enthaltende Enzym wies mit 4–6 U/mg eine hohe ATPase-Aktivität auf. Dagegen besaß das reduzierte, einen [4Fe-4S]⁺Cluster enthaltende Protein mit <0,1 U/mg eine verschwindend geringe ATPase-Aktivität. Der Redoxzustand des [4Fe-4S]⁺²⁺Clusters verändert die ATPase-Aktivitäten wahrscheinlich durch schwache, aber signifikante strukturelle Veränderungen im Bereich der ATP-Bindestelle.

8. Die superreduzierte rekombinante Komponente A aus *A. fermentans* enthält ein [4Fe-4S]⁰Cluster

[4Fe-4S]Cluster konnten in biologischen Systemen mit Nettoladungen von +1 bis +3 spektroskopisch charakterisiert werden, formal bestehen sie aus Mischungen von Fe(II)- und Fe(III)-Atomen. Eine [4Fe-4S]⁴⁺ - Form mit 4 Fe(III)-Atomen ist bis heute unbekannt [19]. Münck *et al.* publizierten 1997 das erste Beispiel eines [4Fe-4S]⁰Clusters im Nitrogenase Fe-Protein [120]. In diesem Clustertyp liegen alle vier Eisenatome als Fe(II) vor. Der [4Fe-4S]⁰Cluster wurde biochemisch und spektroskopisch eingehend charakterisiert [84] [83]. Über die Funktion dieses superreduzierten Redoxzustandes kann bislang nur spekuliert werden. Das superreduzierte Fe-Protein kann Elektronen auf das MoFe-Protein übertragen und die Reduktion des Stickstoffes katalysieren. Mit EPR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß dabei 2 Elektronen vom [4Fe-4S]⁰Cluster übertragen werden, wodurch ein oxidiertes [4Fe-4S]²⁺Cluster gebildet wird. Kinetische Untersuchungen zum Verbrauch von ATP/e⁻ zeigten, daß unter Bedingungen, bei denen die superreduzierte Form des Fe-Proteins gebildet wird, die Nitrogenase-Reaktion anscheinend effizienter abläuft; dabei wurde das ATP/2e⁻Verhältnis mit Titan(III)citrat mit ~ 2 angegeben, während es mit Dithionit ~ 5 betrug. Dies legt nahe, daß die superreduzierte Form tatsächlich pro 2 ATP zwei Elektronen übertragen kann. Die Reaktionsraten der 2 ATP/2e⁻ Reaktion sind jedoch bedeutend niedriger als für die 5 ATP/2e⁻ Reaktion. Die ATP/2e⁻ Verhältnisse der Nitrogenase-Reaktion wurden *in vivo* mit 0,6 – 3,7 bestimmt, sie liegen somit trotz einer gewissen Streubreite der Daten alle unter den Werten der Einelektronen-Reaktion mit 5 ATP/2e⁻. Deswegen geht man davon aus, daß beide Reaktionen je nach Bedingungen in den Zellen nebeneinander vorkommen könnten.

Neben dem Nitrogenase-Fe-Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit mit der superreduzierten Komponente A ein zweites Beispiel für einen [4Fe-4S]⁰Cluster in einem biologischen System vorgestellt werden. Der Cluster dieses Proteins besitzt spektroskopische und biochemische Eigenschaften, die zum superreduzierten Fe-Protein der Nitrogenase sehr ähnlich sind. Es handelt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls um ein S = 4 System, dessen im Niedrigfeld unter Parallel Mode gemessene EPR-Signale eindeutig zugeordnet werden konnten [84, 120]. *In vivo* hat die superreduzierte Komponente A wahrscheinlich keine Funktion, da sie die Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase im Enzymtest nicht aktivieren konnte. Frühere Beobachtungen zeigten, daß eine Erhöhung der Ti(III)citrat-Konzentration im Enzymtest von 0,1 mM auf 1 mM zur Inaktivierung führte. Dieser Befund

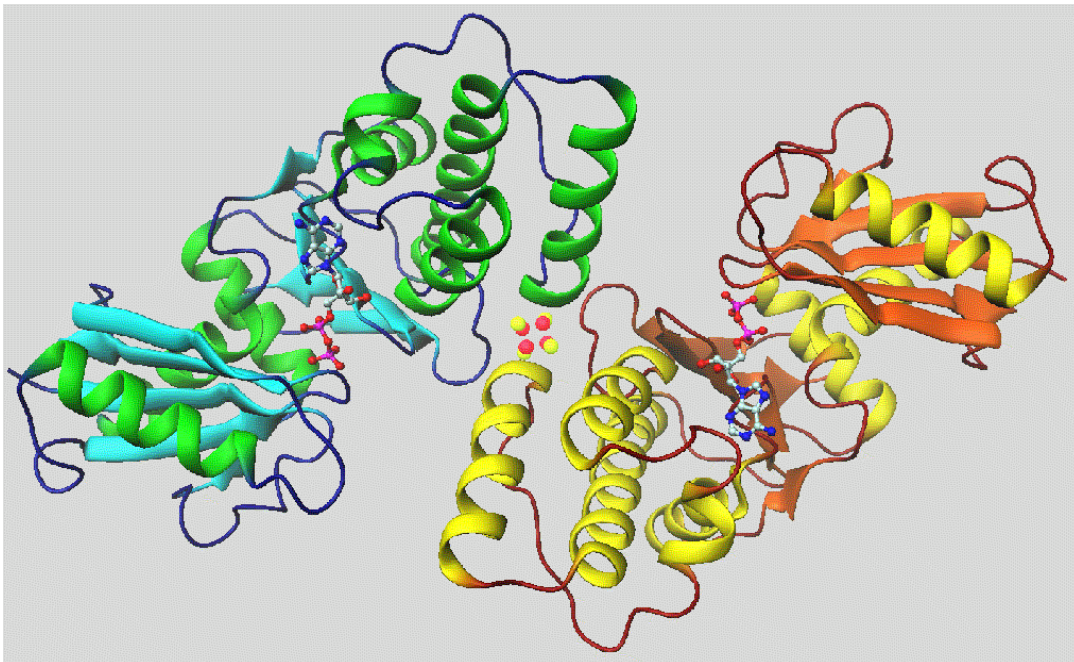
wurde durch Wechselwirkungen mit den Hilfsenzymen erklärt. Die hier vorgestellten neueren Untersuchungen legen jedoch nahe, daß die Komponente A superreduziert wurde und somit inaktiv war. Diese Inaktivität belegt weiterhin, daß ein negativeres Redoxpotential nicht automatisch zu einer höheren Aktivität der Dehydratase führt, wie es der postulierte Ketylmechanismus suggeriert. Die aktive $[4\text{Fe-4S}]^+$ - Komponente A weist mit ca. -350 mV ein bedeutend positiveres Redoxpotential als die superreduzierte Form mit ca. -500 mV auf.

9. Die Struktur der rekombinanten Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes bei Prof. Dr. Douglas C. Rees am California Institute of Technology (Pasadena, CA, U.S.A.) konnte die rekombinante Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase kristallisiert sowie die dreidimensionale Kristallstruktur bestimmt werden. Die Struktur zeigte ein homodimeres Protein, bei dem die Untereinheiten durch den $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster verbrückt waren. Jede Untereinheit hatte ein ADP gebunden. Somit konnten die aus den biochemischen Untersuchungen abgeleiteten Strukturmerkmale bestätigt werden [49, 50]. Gelfiltrationsstudien wiesen auf ein homodimeres Protein hin, während Sequenzvergleiche mit zwei Untereinheiten der Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* [61-63] und mehreren hypothetischen Proteinen aus methanogenen Archaea und Eubakterien [85] eine potentielle ATP-Bindestelle sowie zwei streng konservierte Cysteine identifizierten. Letzere sprachen für die Koordination eines $[4\text{Fe-4S}]$ Clusters zwischen den Untereinheiten, die anhand der Kristallstruktur belegt werden konnte. Die potentielle ATP-Bindestelle wies hohe Identitäten zu den Bindemotiven in Zucker-Kinasen, Aktin und Hsp70-Proteinen auf [88]. Wie erwartet war das ADP in der Kristallstruktur genau an diese Aminosäurereste koordiniert. Die Analyse des Komponente A-Faltungstyp offenbarte schließlich eine hohe Ähnlichkeit zu den Faltungstypen der Zucker-Kinasen, des Aktins sowie des Hsp70-Proteins [88]. In diesen Proteinen führt die Nukleotidbindung zu starken konformationellen Veränderungen. Bei Aktin oder den Hsp70-Chaperonen wird dadurch eine Affinität zu anderen Proteinen erzeugt. Zum Beispiel beeinflußt ATP die Affinität zwischen Aktin und Myosin. Ähnlichkeiten zur Faltung des Fe-Proteins der Nitrogenase waren nicht erkennbar. Nur die Quartärstrukturen des Fe-Proteins und der Komponente A weisen Ähnlichkeiten auf: beide Proteine sind homodimer, ihre

Untereinheiten haben fast identische molekulare Massen von etwa 27 kDa und werden von [4Fe-4S]Clustern verbrückt (Fig. 73).

A



B

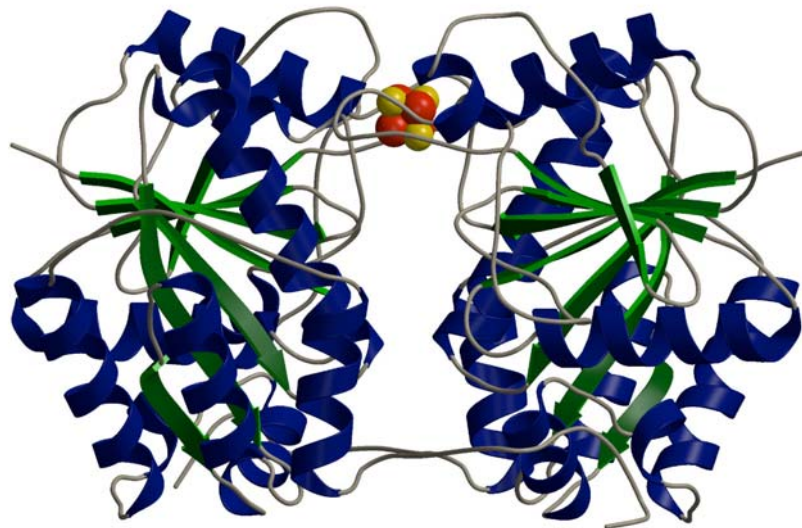


Fig. 74. Vergleich der Quartärstrukturen der rekombinanten Komponente A der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase (A) und des Fe-Proteins der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* [54] (B). Die Untereinheiten werden von dem [4Fe-4S]Cluster verbrückt.

Trotz unterschiedlicher Faltung und fehlender Aminosäuresequenz-Identitäten zeigen beide Proteine mehrere biochemische und spektroskopische Gemeinsamkeiten, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Aufgrund dieser Daten liegt es nahe, für beide Enzyme eine gemeinsame Funktion zu postulieren: ATP-getriebener Elektronentransfer für chemisch schwierige Reduktionen.

Quartärstruktur:	<ul style="list-style-type: none"> - homodimere Proteine, UE ~ 27 kDa - Die [4Fe-4S]Cluster verbrücken die UE - Pro UE ein ATP-Bindemotiv
Biochemische Eigenschaften:	<ul style="list-style-type: none"> - extrem sauerstoffempfindliche Enzyme - Molekularer Sauerstoff bewirkt einen [4Fe-4S] → [2Fe-2S]Cluster-Zerfall - Fe(II)-Chelatoren können den [4Fe-4S] Cluster zerstören
Spektroskopische Eigenschaften:	<ul style="list-style-type: none"> - die reduzierten Proteine besitzen einen [4Fe-4S]⁺Cluster mit dem ungewöhnlichen Elektronenspin $S = 3/2$ - mit Ti(III)citrat ist Superreduktion zum [4Fe-4S]⁰Cluster möglich: beide Proteine sind die einzigen Beispiele in der Literatur für diesen Redoxzustand in biologischen Systemen

Tabelle 2. Gemeinsame strukturelle, biochemische und spektroskopische Eigenschaften der Komponente A und des Fe-Proteins, welche eine gemeinsame Funktion beider Proteine implizieren.

10. Zur Funktion der reduzierten Komponente A: ATP-getriebener Elektronentransfer zur Komponente D der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase

Die EPR- und Mössbauer-spektroskopischen Versuche belegen eindeutig, daß reduzierte Komponente A in Gegenwart von ATP mit Komponente D interagiert und etwa 50 % oxidiert wird, während ohne ATP weder eine Interaktion der reduzierten Komponente A mit Komponente D noch eine Oxidation zu beobachten war. Dies steht im Einklang mit ATPase-Studien, in denen isolierte reduzierte Komponente A keine Aktivität aufwies, wohingegen oxidierte Komponente A mit 4 – 6 U/mg eine hohe Aktivität besaß. Zusatz von Komponente D zu reduzierter Komponente A führte stets zu einer 60-70 prozentigen Wiedergewinnung der ATPase-Aktivität. Substratzugabe führte lediglich zu einer geringen weiteren Erhöhung der ATPase-Aktivität. Mössbauer-Experimente weisen jedoch darauf hin, daß ATP in Gegenwart von Komponente D eine ca. 50 prozentige Oxidation der Komponente A bewirkt; Zusatz von Substrat führt jedoch zu einer > 90 prozentigen Oxidation der Komponente A. Obwohl die spektroskopischen und kinetischen Daten quantitativ nicht ganz übereinstimmen, ist die Tendenz jedoch gleich. Ein Grund für diese Abweichungen können Konzentrationsunterschiede sein, da im Mössbauer-Experiment wesentlich höhere Proteinkonzentrationen (0,1-0,2 mM von jeder Komponente) eingesetzt wurden. Eventuell wird dadurch der Elektronentransfer beeinflusst. Beide Befunde stimmen aber mit der postulierten Rolle der Komponente A überein, wonach unter ATP-Hydrolyse Elektronen zur Reduktion des 2-Hydroxyglutaryl-CoA auf Komponente D übertragen werden [46]. Komponente A fungiert demnach als Redoxverstärker zur Katalyse der chemisch schwierigen Reduktion des 2-Hydroxyglutaryl-CoA zum entsprechenden Ketylradikalanion. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Substratradikal nachgewiesen werden. Substratradikale sind oft sehr kurzlebige Intermediate und daher schwer detektierbar. Wahrscheinlich müssen schnelle kinetische Analysemethoden wie Freeze Quench EPR oder Stopped Flow verwendet werden, um eventuelle radikalische Zwischenprodukte zu detektieren. Ketylradikalanionen sind bislang noch nicht zweifelsfrei in biologischen Systemen nachgewiesen worden. Für die Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* wurde ein Mechanismus postuliert, in dem Ketylradikale eine zentrale Rolle spielen [61, 62]. Auch die Ribonukleotid-Reduktase aus *E. coli* könnte ein Ketylradikalanion als Substratintermediat produzieren [121]. Hier wurde ein Radikal detektiert, das einer solchen Spezies zugeordnet wurde. Unklar bleibt weiterhin, welcher Kofaktor der Komponente D die Elektronen der Komponente A aufnimmt. Die

kombinierten UV-vis-, EPR- und Mössbauer-spektroskopischen Studien ergaben einen $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ Cluster und ein FMNH_2 als Kofaktoren der Komponente D, deren Redoxzustände sich nach ATP-Zusatz nicht ändern. Somit kann angenommen werden, daß ein dritter, bislang unbekannter Kofaktor in der Komponente D existiert. Da nur ein Elektron übertragen wird, sollte entweder vor oder nach der Elektronenübertragung eine paramagnetische Spezies vorhanden sein. Ein Kohlenstoffradikal als Intermediat kann dabei ausgeschlossen werden, da diese Radikale sehr scharfe Signale im EPR-Spektrum aufweisen.

Ein Nicht-Eisen-Schwefel-Kofaktor als Elektronenakzeptor in der Komponente D ?

Zusatz von ATP bewirkt neben den schon beschriebenen Veränderungen des EPR-Signals der Komponente A die Bildung eines neuen EPR-Signals bei $g < 2$. Die g -Werte sind für $[4\text{Fe-4S}]^+$ Cluster mit $S = 1/2$ untypisch, da einer der drei g -Werte in der Regel > 2 ist. Die beobachteten g -Werte könnten jedoch einem d^1 -Metall zugeordnet werden [122]. Das neue Signal konnte mit den g -Werten 1,97; 1,92 und 1,87 simuliert werden. Solche g -Werte sind z. B. für die Wolfram-haltige Formiat-Dehydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* beschrieben [123]. Molybdän (V) besitzt eine viel geringere Anisotropie des EPR-Signals. Dies bedeutet, daß alle drei g -Werte meist nahe bei 2,00 liegen. Zusätzlich sind die Linienbreiten der einzelnen g -Werte kleiner [122]. Um dieses Metall zweifelsfrei nachzuweisen, muß eine Analyse mittels Neutronenaktivierung durchgeführt werden. Zusätzlich kann ein potentieller Pterin-Kofaktor mit HPLC detektiert werden [123]. Ein d^1 -Metall-Kofaktor könnte den Sauerstoff der Thioester-Carbonylgruppe des 2-Hydroxyglutaryl-CoA koordinieren und so Elektronen zur Bildung des Ketylradikalanions übertragen. Es ist möglich, daß der $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster das Elektron der Komponente A aufnimmt und an den potentiellen dritten Kofaktor weiterleitet.

Literatur

1. Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. and Farrow, J.A.E. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 812-826.
2. Buckel, W. and Barker, H.A. (1974) Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* **117**, 1248-1260.
3. Schweiger, G., Dutschko, R. and Buckel, W. (1987) Purification of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. An iron-sulfur protein. *Eur. J. Biochem.* **169**, 441-448.
4. Horler, D.F., Westlake, D.W.S. and McConnell, W.B. (1966) Glutaconic acid, a product of the fermentation of glutamic acid by *Peptococcus aerogenes*. *Can. J. Microbiol.* **12**, 1247-1252.
5. Buckel, W. and Liedtke, H. (1986) The sodium pump glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*. Specific cleavage by n-alkanols. *Eur. J. Biochem.* **156**, 251-257.
6. Beatrix, B., Bendrat, K., Rospert, S. and Buckel, W. (1990) The biotin-dependent sodium ion pump glutaconyl-CoA decarboxylase from *Fusobacterium nucleatum* (subsp. *nucleatum*). Comparison with the glutaconyl-CoA decarboxylases from gram-positive bacteria. *Arch. Microbiol.* **154**, 362-369.
7. Barker, H.A. (1937) On the fermentation of glutamic acid. *Enzymologia* **2**, 175-182.
8. Barker, H.A., Weissbach, H. and Smyth, R.D. (1958) A coenzyme containing pseudovitamin B12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **44**, 1093-1097.
9. Barker, H.A. (1961) Fermentations of nitrogenous compounds. In Gunsalus JC, Stanier RY (eds) *The bacteria* (Vol. 2) Academic Press New York, San Francisco, London.
10. Buckel, W. and Bobi, A. (1976) The enzyme complex citramalate lyase from *Clostridium tetanomorphum*. *Eur. J. Biochem.* **64**, 255-262.
11. Scherf, U. and Buckel, W. (1993) Purification and properties of an iron-sulfur and FAD-containing 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-

- CoA delta 3-delta 2- isomerase from *Clostridium aminobutyricum*. *Eur. J. Biochem.* **215**, 421-429.
12. Scherf, U., Söhling, B., Gottschalk, G., Linder, D. and Buckel, W. (1994) Succinate-ethanol fermentation in *Clostridium kluyveri*: purification and characterisation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl- CoA delta 3-delta 2-isomerase. *Arch. Microbiol.* **161**, 239-245.
 13. Willadsen, P. and Buckel, W. (1990) Assay of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**, 187-191.
 14. Beinert, H. (1976) Iron-sulfur proteins, the most numerous and most diversified components of the mitochondrial electron transfer system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **74**, 137-149.
 15. Beinert, H. and Thomson, A.J. (1983) Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 333-361.
 16. Beinert, H. (1985) Electron-paramagnetic-resonance spectroscopy in biochemistry: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 542-547.
 17. Beinert, H. (1990) Recent developments in the field of iron-sulfur proteins. *Faseb J.* **4**, 2483-2491.
 18. Beinert, H., Holm, R.H. and Münck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-659.
 19. Cammack, R. and Sykes, A.G. (1999) *Advances In Inorganic Chemistry: Iron Sulfur Proteins*, Vol. 47.
 20. Grossman, J.G., Hasnain, S.S., Yousafzai, F.K., Smith, B.E., Eady, R.R., Schindelin, H., Kisker, C., Howard, J.G., Tsuruta, H., Müller, J. and Rees, D.C. (1999) Comparing crystallographic and solution structures of nitrogenase complexes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **55**, 727-728.
 21. Smith, B.E. and Eady, R.R. (1992) Metalloclusters of the nitrogenases. *Eur. J. Biochem.* **205**, 1-15.
 22. Rees, D.C. and Howard, J.B. (1999) Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J. Mol. Biol.* **293**, 343-350.
 23. Link, T.A., Saynovits, M., Assmann, C., Iwata, S., Ohnishi, T. and von Jagow, G. (1996) Isolation, characterisation and crystallisation of a water-soluble fragment of the Rieske iron-sulfur protein of bovine heart mitochondrial bc1 complex. *Eur. J. Biochem.* **237**, 71-75.

24. Huynh, B.H. and Kent, T.A. (1984) Mössbauer studies of iron proteins. *Adv. Inorg. Biochem.* **6**, 163-223.
25. Bruschi, M. and Guerlesquin, F. (1988) Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **4**, 155-175.
26. Beinert, H. and Kennedy, M.C. (1993) Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *Faseb J.* **7**, 1442-1449.
27. Hofmeister, A.E., Albracht, S.P. and Buckel, W. (1994) Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. *FEBS Lett.* **351**, 416-418.
28. Grabowski, R., Hofmeister, A.E. and Buckel, W. (1993) Bacterial L-serine dehydratases: a new family of enzymes containing iron-sulfur clusters. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 297-300.
29. Flint, D.H., Tuminello, J.F. and Emptage, M.H. (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**, 22369-22376.
30. Flint, D.H. (1993) *Escherichia coli* fumarase A catalyzes the isomerization of enol and keto oxalacetic acid. *Biochemistry* **32**, 799-805.
31. Kiley, P.J. and Beinert, H. (1998) Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 341-352.
32. Popescu, C.V., Bates, D.M., Beinert, H., Münck, E. and Kiley, P.J. (1998) Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 13431-13435.
33. Switzer, R.L. (1989) Non-redox roles for iron-sulfur clusters in enzymes. *Biofactors* **2**, 77-86.
34. Onate, Y.A., Vollmer, S.J., Switzer, R.L. and Johnson, M.K. (1989) Spectroscopic characterization of the iron-sulfur cluster in *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* **264**, 18386-18391.
35. Fraaije, M.W. and Mattevi, A. (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 126-132.

36. Klees, A.G., Linder, D. and Buckel, W. (1992) 2-Hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Fusobacterium nucleatum* (subsp. nucleatum): an iron-sulfur flavoprotein. *Arch. Microbiol.* **158**, 294-301.
37. Simonsen, R.P. and Tollin, G. (1980) Structure-function relations in flavodoxins. *Mol. Cell. Biochem.* **33**, 13-24.
38. Mayhew, S.G. and Tollin, G. (1992) General properties of flavodoxins. In: Müller, F. (ed) Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, vol. 3. CRC Press, Boca Raton, 389-426.
39. Steensma, E., Heering, H.A., Hagen, W.R. and Van Mierlo, C.P. (1996) Redox properties of wild-type, Cys69Ala, and Cys69Ser *Azotobacter vinelandii* flavodoxin II as measured by cyclic voltammetry and EPR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **235**, 167-172.
40. Butenandt, J., Epple, R., Wallenborn, E.U., Eker, A.P., Gramlich, V. and Carell, T. (2000) A comparative repair study of thymine- and uracil-photodimers with model compounds and a photolyase repair enzyme. *Chemistry* **6**, 62-72.
41. Kleiner, O., Butenandt, J., Carell, T. and Batschauer, A. (1999) Class II DNA photolyase from *Arabidopsis thaliana* contains FAD as a cofactor. *Eur. J. Biochem.* **264**, 161-167.
42. Chapman, S.K., Welsh, F., Moysey, R., Mowat, C., Doherty, M.K., Turner, K.L., Munro, A.W. and Reid, G.A. (1999) Flavocytochromes: transceivers and relays in biological electron transfer. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 185-189.
43. Scrutton, N.S., Basran, J., Wilson, E.K., Chohan, K.K., Jang, M.H., Sutcliffe, M.J. and Hille, R. (1999) Electron transfer in trimethylamine dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 196-201.
44. Fritz, G., Büchert, T., Huber, H., Stetter, K.O. and Kroneck, P.M. (2000) Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1 alphabeta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes--high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism. *FEBS Lett.* **473**, 63-66.
45. Kahler, A.E., Nielsen, F.S. and Switzer, R.L. (1999) Biochemical characterization of the heteromeric *Bacillus subtilis* dihydroorotate

- dehydrogenase and its isolated subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* **371**, 191-201.
46. Buckel, W. (1996) Unusual dehydrations in anaerobic bacteria: considering ketyls (radical anions) as reactive intermediates in enzymatic reactions. *FEBS Lett.* **389**, 20-24.
47. Pierik, A.J. (1993) Studies on the Iron-Sulfur clusters of hydrogenase, sulfite reductase, nitrogenase and the prismane protein. Dissertation, Landwirtschaftliche Universität Wageningen, Niederlande.
48. Beinert, H. (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 2-15.
49. Müller, U. and Buckel, W. (1995) Activation of (R)-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Eur. J. Biochem.* **230**, 698-704.
50. Müller, U. (1995) Der Aktivator der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus Clostridien: Ein Beispiel für einen ATP-getriebenen Elektronenverstärker. Dissertation Marburg. .
51. Hans, M. (1996) Untersuchungen zum Katalysemechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium symbiosum* und *Acidaminococcus fermentans*. Diplomarbeit Marburg.
52. Dutschko, R., Wohlfarth, G., Buckel, P. and Buckel, W. (1989) Cloning and sequencing of the genes of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Eur. J. Biochem.* **181**, 741-746.
53. Mack, M., Bendrat, K., Zelder, O., Eckel, E., Linder, D. and Buckel, W. (1994) Location of the two genes encoding glutaconate coenzyme A-transferase at the beginning of the hydroxyglutarate operon in *Acidaminococcus fermentans*. *Eur J Biochem* **226**, 41-51.
54. Georgiadis, M.M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J.J. and Rees, D.C. (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**, 1653-1659.
55. Kim, J., Woo, D. and Rees, D.C. (1993) X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution. *Biochemistry* **32**, 7104-7115.

56. Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J.L., Howard, J.B. and Rees, D.C. (1997) Structure of ADP x AlF₄(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* **387**, 370-376.
57. Lanzilotta, W.N., Ryle, M.J. and Seefeldt, L.C. (1995) Nucleotide hydrolysis and protein conformational changes in *Azotobacter vinelandii* nitrogenase iron protein: defining the function of aspartate 129. *Biochemistry* **34**, 10713-10723.
58. Lanzilotta, W.N. and Seefeldt, L.C. (1996) Electron transfer from the nitrogenase iron protein to the [8Fe-(7/8)S] clusters of the molybdenum-iron protein. *Biochemistry* **35**, 16770-16776.
59. Lanzilotta, W.N., Fisher, K. and Seefeldt, L.C. (1996) Evidence for electron transfer from the nitrogenase iron protein to the molybdenum-iron protein without MgATP hydrolysis: characterization of a tight protein-protein complex. *Biochemistry* **35**, 7188-7196.
60. Breese, K., Boll, M., Alt-Morbe, J., Schagger, H. and Fuchs, G. (1998) Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **256**, 148-154.
61. Boll, M. and Fuchs, G. (1995) Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**, 921-933.
62. Boll, M., Albracht, S.S. and Fuchs, G. (1997) Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosinetriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **244**, 840-851.
63. Boll, M. and Fuchs, G. (1998) Identification and characterization of the natural electron donor ferredoxin and of FAD as a possible prosthetic group of benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* **251**, 946-954.
64. Kuchta, R.D. and Abeles, R.H. (1985) Lactate reduction in *Clostridium propionicum*. Purification and properties of lactyl-CoA dehydratase. *J. Biol. Chem.* **260**, 13181-13189.

65. Kuchta, R.D., Hanson, G.R., Holmquist, B. and Abeles, R.H. (1986) Fe-S centers in lactyl-CoA dehydratase. *Biochemistry* **25**, 7301-7307.
66. Dickert, S., Pierik, A.J., Linder, D. and Buckel, W. (2000) The involvement of coenzyme A esters in the dehydration of (R)-phenyllactate to (E)-cinnamate by *Clostridium sporogenes*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 3874-3884.
67. Machacek-Pitsch, C., Rauschenbach, P. and Simon, H. (1985) Observations on the elimination of water from 2-hydroxy acids in the metabolism of amino acids by *Clostridium sporogenes*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **366**, 1057-1062.
68. Pitsch, C. and Simon, H. (1982) The stereochemical course of the water elimination from (2R)-phenyllactate in the amino acid fermentation of *Clostridium sporogenes*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **363**, 1253-1257.
69. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
70. Braune, A., Bendrat, K., Rospert, S. and Buckel, W. (1999) The sodium ion translocating glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*: cloning and function of the genes forming a second operon. *Mol. Microbiol.* **31**, 473-487.
71. Gaffney, B.J. and Silverstone, H.J. (1993) in EMR of Paramagnetic Molecules (Berliner, L.J. and Reuben, J., eds.), Vol. 13, Plenum Press, New York, London.
72. Imhoff-Struckle, D. and Pfennig, N. (1983) Isolation and characterization of a nicotinic acid-degrading sulfate reducing bacterium, *Desulfococcus niacini*, sp. nov. *Arch. Microbiol.* **136**, 194-198.
73. Birnboim, H.C. and Doily, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
74. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Manniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour, New York* .
75. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
76. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fuyimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J. and Klenk,

- D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
77. Fish, W.W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol.* **158**, 661-668.
78. Cline, J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**, 454-458.
79. Eikmanns, U. and Buckel, W. (1990) Properties of 5-hydroxyvalerate CoA-transferase from *Clostridium aminovalericum*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **371**, 1077-1082.
80. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
81. Lindahl, P.A., Day, E.P., Kent, T.A., Orme-Johnson, W.H. and Münck, E. (1985) Mössbauer, EPR, and magnetization studies of the *Azotobacter vinelandii* Fe protein. Evidence for a [4Fe-4S]¹⁺ cluster with spin S = 3/2. *J. Biol. Chem.* **260**, 11160-11173.
82. Lindahl, P.A., Gorelick, N.J., Münck, E. and Orme-Johnson, W.H. (1987) EPR and Mössbauer studies of nucleotide-bound nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **262**, 14945-14953.
83. Erickson, J.A., Nyborg, A.C., Johnson, J.L., Truscott, S.M., Gunn, A., Nordmeyer, F.R. and Watt, G.D. (1999) Enhanced efficiency of ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis utilizing reductants that form the all-ferrous redox state of the Fe protein. *Biochemistry* **38**, 14279-14285.
84. Angove, H.C., Yoo, S.J., Münck, E. and Burgess, B.K. (1998) An all-ferrous state of the Fe protein of nitrogenase. Interaction with nucleotides and electron transfer to the MoFe protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 26330-26337.
85. Hans, M., Sievers, J., Müller, U., Bill, E., Vorholt, J.A., Linder, D. and Buckel, W. (1999) 2-Hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Clostridium symbiosum*. *Eur. J. Biochem.* **265**, 404-414.
86. Eglund, P.G., Pelletier, D.A., Dispensa, M., Gibson, J. and Harwood, C.S. (1997) A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 6484-6489.
87. Harwood, C.S. and Gibson, J. (1986) Uptake of benzoate by *Rhodospseudomonas palustris* grown anaerobically in light. *J. Bacteriol.* **165**, 504-509.

88. Bork, P., Sander, C. and Valencia, A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 7290-7294.
89. Lang, T. and Kessler, D. (1999) Evidence for cysteine persulfide as reaction product of L-Cyst(e)ine C- S-lyase (C-DES) from *Synechocystis*. Analyses using cystine analogues and recombinant C-DES. *J. Biol. Chem.* **274**, 189-195.
90. Clausen, T., Kaiser, J.T., Steegborn, C., Huber, R. and Kessler, D. (2000) Crystal structure of the cystine C-S lyase from *Synechocystis*: stabilization of cysteine persulfide for FeS cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 3856-3861.
91. Skerra, A. and Schmidt, T.G. (1999) Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. *Biomol. Eng.* **16**, 79-86.
92. Schmidt, T.G. and Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein. Eng.* **6**, 109-122.
93. Schmidt, T.G. and Skerra, A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the Strep tag & immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr. A.* **676**, 337-345.
94. Schmidt, T.G., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766.
95. Hagen, W.R., Dunham, W.R., Braaksma, A. and Haaker, H. (1985) On the prosthetic group(s) of component II from nitrogenase. EPR of the Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Lett.* **187**, 146-150.
96. Duderstadt, R.E., Brereton, P.S., Adams, M.W. and Johnson, M.K. (1999) A pure $S = 3/2$ $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ cluster in the A33Y variant of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin. *FEBS Lett.* **454**, 21-26.
97. Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H. and Kiley, P.J. (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O_2 : $[\text{4Fe-4S}]$ to $[\text{2Fe-2S}]$ conversion with loss of biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 6087-6092.
98. Laskowski, E.J., Frankel, R.B., Gillum, W.O., Papaefthymiou, G.C., Renaud, J., Ibers, J.A. and Holm, R.H. (1978) Synthetic Analogues of the 4-

- FE Active Sites of Reduced Ferredoxins. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 5322-5337.
99. Carney, M.J., Papaefthymiou, G.C., Spartalian, K., Frankel, R.B. and Holm, R.H. (1988) Ground State Variability in $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SR})_4]^{3-}$. Synthetic Analogues of the Reduced Clusters in Ferredoxins and Other Iron Sulfur Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6084-6095.
100. Carney, M.J., Papaefthymiou, G.C., Whitener, M.A., Spartalian, K., Frankel, R.B. and Holm, R.H. (1988) Alternative Spin States in Synthetic Analogues of biological Clusters: Spin Quartet Ground States and Structures. *Inorganic Chemistry* **27**, 346-352.
101. Beinert, H. and Kennedy, M.C. (1993) Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *Faseb J.* **7**, 1442-1449.
102. Beinert, H. and Kiley, P. (1996) Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters? *FEBS Lett.* **382**, 218-221.
103. Lauble, H., Kennedy, M.C., Beinert, H. and Stout, C.D. (1992) Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* **31**, 2735-2748.
104. Lauble, H., Kennedy, M.C., Beinert, H. and Stout, C.D. (1994) Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound. *J. Mol. Biol.* **237**, 437-451.
105. Emptage, M.H., Dreyers, J.L., Kennedy, M.C. and Beinert, H. (1983) Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase. *J. Biol. Chem.* **258**, 11106-11111.
106. Emptage, M.H., Kent, T.A., Kennedy, M.C., Beinert, H. and Münck, E. (1983) Mössbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the $[\text{4Fe-4S}]$ cluster on binding of citrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**, 4674-4678.
107. Telser, J., Emptage, M.H., Merkle, H., Kennedy, M.C., Beinert, H. and Hoffman, B.M. (1986) ^{17}O electron nuclear double resonance characterization of substrate binding to the $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ cluster of reduced active aconitase. *J. Biol. Chem.* **261**, 4840-4846.
108. Kennedy, M.C., Werst, M., Telser, J., Emptage, M.H., Beinert, H. and Hoffman, B.M. (1987) Mode of substrate carboxyl binding to the $[\text{4Fe-4S}]^{+}$

- cluster of reduced aconitase as studied by ^{17}O and ^{13}C electron-nuclear double resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8854-8858.
109. Werst, M.M., Kennedy, M.C., Beinert, H. and Hoffman, B.M. (1990) ^{17}O , ^1H , and ^2H electron nuclear double resonance characterization of solvent, substrate, and inhibitor binding to the $[\text{4Fe-4S}]^+$ cluster of aconitase. *Biochemistry* **29**, 10526-10532.
110. Buckel, W. (1980) The reversible dehydration of (R)-2-hydroxyglutarate to (E)-glutaconate. *Eur. J. Biochem.* **106**, 439-447.
111. Anderson, G.L. and Howard, J.B. (1984) Reactions with the oxidized iron protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase: formation of a 2Fe center. *Biochemistry* **23**, 2118-2122.
112. Duin, E.C., Lafferty, M.E., Crouse, B.R., Allen, R.M., Sanyal, I., Flint, D.H. and Johnson, M.K. (1997) $[\text{2Fe-2S}]$ to $[\text{4Fe-4S}]$ cluster conversion in *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **36**, 11811-11820.
113. Ragsdale, S.W. and Ljungdahl, L.G. (1984) Characterization of ferredoxin, flavodoxin, and rubredoxin from *Clostridium formicoaceticum* grown in media with high and low iron contents. *J. Bacteriol.* **157**, 1-6.
114. Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J. and Valentine, J.S. (1994) Bioinorganic Chemistry. University Science Books, Sausalito, California, U.S.A.
115. Simonsen, R.P., Weber, P.C., Salemme, F.R. and Tollin, G. (1982) Transient kinetics of electron transfer reactions of flavodoxin: ionic strength dependence of semiquinone oxidation by cytochrome c, ferricyanide, and ferric ethylenediaminetetraacetic acid and computer modeling of reaction complexes. *Biochemistry* **21**, 6366-6375.
116. Simonsen, R.P. and Tollin, G. (1983) Transient kinetics of redox reactions of flavodoxin: effects of chemical modification of the flavin mononucleotide prosthetic group on the dynamics of intermediate complex formation and electron transfer. *Biochemistry* **22**, 3008-3016.
117. Härtel, U. and Buckel, W. (1996) Sodium ion-dependent hydrogen production in *Acidaminococcus fermentans*. *Arch. Microbiol.* **166**, 350-356.
118. Plank, D.W., Kennedy, M.C., Beinert, H. and Howard, J.B. (1989) Cysteine labeling studies of beef heart aconitase containing a 4Fe, a cubane 3Fe, or a linear 3Fe cluster. *J. Biol. Chem.* **264**, 20385-20393.

119. Ljones, T. and Burris, R.H. (1978) Nitrogenase: the reaction between the Fe protein and bathophenanthrolinedisulfonate as a probe for interactions with MgATP. *Biochemistry* **17**, 1866-1872.
120. Angove, H.C., Yoo, S.J., Burgess, B.K. and Münck, E. (1997) An all ferrous state of the Fe-protein of nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8730-8731.
121. Lawrence, C.C., Bennati, M., Obias, H.V., Bar, G., Griffin, R.G. and Stubbe, J. (1999) High-field EPR detection of a disulfide radical anion in the reduction of cytidine 5'-diphosphate by the E441Q R1 mutant of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8979-8984.
122. Johnson, M.K., Rees, D.C. and Adams, M.W.W. (1996) Tungstoenzymes. *Chem. Rev.* **96**, 2817-2839.
123. Almendra, M.J., Brondino, C.D., Gavel, O., Pereira, A.S., Tavares, P., Bursakov, S., Duarte, R., Caldeira, J., Moura, J.J. and Moura, I. (1999) Purification and characterization of a tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Biochemistry* **38**, 16366-16372.
124. Warburg, O. and Christian, W. (1933). *Biochemische Zeitschrift* **266**, 377-411.
125. Eisenreich, W., Hultschig, C., Hartmann, S., Fuchs, G., Bacher, A. and Ghisla, S. (1999) Hydroxylation by Flavin Enzymes: Evidence for NIH-shift Mechanism. In: *Flavins and Flavoproteins*. Editors: Ghisla, S. and Kroneck, P., 359-366. Rudolf Weber Scientific Publications, Berlin.
126. Cammack, R. (1973) "Super-reduction" of *chromatium* high-potential iron sulfur protein in the presence of dimethyl sulphoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 548-554.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

ATP-getriebener Elektronentransfer bei der enzymatischen Dehydratisierung von (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA zu (*E*)-Glutaconyl-CoA in Clostridien

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

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

(Ort, Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Buckel für die interessante Themenstellung und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer sei für die Bereitschaft gedankt, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen.

Unseren Kooperationspartnern Dr. Eckhard Bill (Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim) und Prof. Dr. Douglas C. Rees sowie Dr. Kaspar P. Locher (beide California Institute of Technology, Pasadena, U.S.A.) danke ich für ihr großes Interesse an dem 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase-Projekt und die gute Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe Buckel sowie den benachbarten Arbeitsgruppen Bremer und Völker sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt.