

**Untersuchungen zu biochemischen und spektroskopischen
Eigenschaften der selenhaltigen Hydrogenasen
aus *Methanococcus voltae***

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ruth Bingemann
aus Eschwege

Marburg/Lahn 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 1997 bis Mai 2000 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn unter der Leitung von Professor Dr. A. Klein durchgeführt.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 08. 2000

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Klein

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. K. Thauer

Aus den während der Dissertation durchgeführten Arbeiten sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

Pfeiffer, M., Bingemann, R. and Klein, A. (1998). Fusion of two subunits does not impair the function of a [NiFeSe]- hydrogenase in the archaeon *Methanococcus voltae*, Eur. J. Biochem. 256, 447-52.

Bingemann, R., Pierik, A. J. and Klein, A. (2000). Biochemical properties of a [NiFe] hydrogenase created by fusing two subunits that form the active site, Arch. Microbiol. (Manuskript eingereicht)

Bingemann, R. and Klein, A. (2000). Conversion of the central [4Fe-4S]cluster into a [3Fe-4S] cluster leads to reduced hydrogen uptake activity of the F₄₂₀-reducing hydrogenase of *Methanococcus voltae*, Eur. J. Biochem. (Manuskript eingereicht)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Methanogenese	2
1.2 Klassifizierung der Hydrogenasen	4
1.3 Hydrogenasen in <i>M. voltae</i>	7
1.4 EPR- und FT-IR-spektroskopische Methoden	9
1.4.1 EPR-Spektroskopie	9
1.4.2 FT-IR-Spektroskopie	12
1.5 Eisen-Schwefel-Zentren	14
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 MATERIAL	17
2.1.2 Chemikalien und Gase:	17
2.1.3 Geräte und Material:	17
2.1.4 Säulenmaterial und Säulen:	17
2.1.5 Organismen:	18
2.1.8 Plasmide:	19
2.2 METHODEN	21
2.2.1.1 Anzucht und Kultivierung von <i>Methanococcus voltae</i>	21
2.2.1.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.1.3 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren	22
2.2.1.3.1 Präparation chromosomaler DNA aus <i>M. voltae</i>	22
2.2.1.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	23
2.2.1.4 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
2.2.1.4.1 Phenolextraktion	24
2.2.1.4.2 DNA-Fällung mit Ethanol	24
2.2.1.4.3 DNA-Fällung mit Isopropanol	25
2.2.1.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	25
2.2.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese:	25
2.2.1.5.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	26
2.2.1.6 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>M. voltae</i>	26

2.2.1.6.1 Transformation von <i>E. coli</i> und Herstellung elektrokompetenter Zellen	26
2.2.1.6.2 Transformation von <i>M. voltae</i> mit liposomalen Reagentien	27
2.2.1.7 Southern-Blot Analyse	28
2.2.1.7.1 DNA-Transfer auf Nylon-Membran:	28
2.2.1.7.2 DNA-DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG)	28
2.2.1.8 Kolonihybridisierung	29
2.2.1.9 Amplifikation, Klonierung und Mutagenese von DNA	29
2.2.1.9.1 Polymerasekettenreaktion (PCR):	30
2.2.1.9.2 Klonierungstechniken	30
2.2.1.9.3 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit Polynukleotidkinase	31
2.2.1.9.4 Ortsgerichtete Mutagenese mit Schnittstellenselektion	31
2.2.1.10 DNA-Sequenzierung	32
2.2.2.1 Reinigung der F₄₂₀ reduzierenden und der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus <i>M. voltae</i>	32
2.2.2.1.1 Zellaufschluß und Zentrifugation:	33
2.2.2.1.2 Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sepharose fast flow:	33
2.2.2.1.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie an Phenyl Sepharose high performance fast flow:	33
2.2.2.1.4 Anionenaustauschchromatographie mit starken Anionentauschern:	34
2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.2.2.3 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität mit Benzylviologen oder F₄₂₀ als Elektronenakzeptor	35
2.2.2.4 Präparation von EPR- und IR-Proben	36
2.2.2.4.1 Redoxtitration der [FeS]-Zentren:	36
2.2.2.5. EPR-Spektroskopie	37
2.2.2.6 FT-IR Spektroskopie	37
2.2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.2.8 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western-Blot) oder auf PVDF-Membran	39
2.2.2.9 Immunanfärbungen	40
2.2.2.9.1. Immunanfärbung mit alkalischer Phosphatase	41
2.2.2.9.2 Immunanfärbung mit Meerrettich-Peroxidase	41
3. ERGEBNISSE	41
3.1 UNTERSUCHUNG DER FUSIONIERTEN GROßEN UNTEREINHEIT VHU_F DER F₄₂₀ NICHT REDUZIERENDEN HYDROGENASE AUS <i>M. VOLTAE</i>	41
3.1.1 Reinigung und biochemische Charakterisierung der VhuF Hydrogenase	41
3.1.2 EPR-spektroskopische Eigenschaften der VhuF Hydrogenase	44
3.1.3 FT-IR-spektroskopische Messung der VhuF-Hydrogenase	47

3.2 UNTERSUCHUNG DER HYDROGENASEN AUS SELENFREI GEWACHSENEN ZELLEN	50
3.2.1 Fermentation von <i>M. voltae</i> in selenfreiem Medium	50
3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUM ELEKTRONENTRANSPORT IN DER KLEINEN UNTEREINHEIT DER F₄₂₀ REDUZIERENDEN HYDROGENASE AUS <i>M. VOLTAE</i>	52
3.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese zur Umwandlung des zentralen [4Fe-4S] Clusters in einen [3Fe-4S] Cluster	52
3.3.2 Reinigung der Hydrogenasen aus dem transformierten Stamm Fru*	61
3.3.3 EPR-Spektroskopische Untersuchung der FruC195A, C205P (Fru*) Hydrogenase aus <i>M. voltae</i>	63
3.3.4 Bestimmung der Redoxpotentiale der [Fe-S] Cluster	68
3.3.5 Überprüfung der Hydrogenasekonzentration Vhu in dem Mutantenstamm Fru*	69
4. DISKUSSION	71
4.1 Einfluß der fusionierten großen Untereinheit VhuF auf die biochemischen Eigenschaften der F ₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase von <i>M. voltae</i>	71
4.2 Selenfreie Hydrogenasen in <i>M. voltae</i>	74
4.3 Der Austausch des zentralen [4Fe-4S] Clusters der F ₄₂₀ -reduzierenden Hydrogenase Fru in einen [3Fe-4S] Cluster führt zu einem deutlichen Aktivitätsverlust.	76
4.4 Ausblick	80
5. Zusammenfassung	81
6. Literaturverzeichnis	83

Abkürzungen:

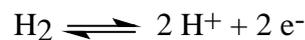
BSA	Rinderserumalbumin
BV	1,1'-Dibenzyl-4,4'-bipyridin, Benzylviologen
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOTAP	N-[1-(2,3Dioleyloxy)propyl]-N, N, N,-trimethylammoniummethylylsulfat
DTT	Dithiothreitol
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FT-IR	Fourier-Transformierte-Infrarot-Spektroskopier
K_M	Michaelis-Menten Konstante
MCS	Multiple Cloning Site
OD	Optische Dichte
Vol	Volumenanteil
XAFS	X-Ray Absorption Fine Structure

Standardabkürzungen und Abkürzungen, die nach den Anweisungen für Autoren des European Journal of Biochemistry ohne Definition gebraucht werden können, sind nicht aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Methanogenese

Methanococcus voltae ist ein mesophiler, moderat halophiler Organismus, der zu den methanogenen Archaea zählt (Whitman et al., 1982), (Jones et al., 1983). Neben den Bacteria und Eucarya stellen Archaea eine weitere Domäne der Organismen (Woese et al., 1990). Methanogene Archaea leben strikt anaerob. Ihre Energiegewinnung verläuft über den Stoffwechselweg der Methanogenese (Weiss und Thauer, 1993), (Thauer, 1997)). Dabei wird CO₂, aber auch Substrate wie Formiat, Acetat, Methanol und Methylamine zu Methan umgesetzt unter der Verwendung von H₂ als Reduktionsmittel (Ferry, 1997). Die für die Reduktion von CO₂ benötigten Elektronen werden aus der Oxidation von molekularem Wasserstoff gewonnen. *M. voltae* ist ebenfalls in der Lage auf Formiat als Substrat zu wachsen, das allerdings zuvor in CO₂ und H₂ gespalten wird. Hydrogenasen spielen in diesem Stoffwechselweg eine wesentliche Rolle. Sie katalysieren die heterolytische Spaltung von H₂ in Protonen und Elektronen.



Diese Reaktion ist reversibel (Krasna und Rittenberg, 1954). Hydrogenasen werden daher sowohl in Wasserstoff bildenden als auch verbrauchenden Organismen nachgewiesen (Teixeira et al., 1983), (Adams und Mortenson, 1984), (Juszczak et al., 1991). Hydrogenasen sind dabei so effektiv, daß sie bei Wasserstoffpartialdrücken von 10 Pa (10⁻⁴ bar) arbeiten können (Wolfe, 1971). In Abb. 1.1 ist der Stoffwechselweg der Methanogenese dargestellt. Die Reduktion von CO₂ zu CH₄ erfolgt an Coenzym gebundene C₁ Intermediate wie Methanofuran (MFR), Tetrahydromathanopterin (H₄MPT) und Coenzym M (H-S-CoM), (Weiss und Thauer, 1993), (Thauer, 1997), (Ferry, 1997). An den mit H₂ gekennzeichneten Stellen werden jeweils Elektronen des Wasserstoffs übertragen. F₄₂₀ reduzierende Hydrogenasen (1) übertragen dabei die Elektronen über eine FAD-haltige Untereinheit auf den Cofaktor F₄₂₀. Diese Hydrogenase ist in *M. voltae* auch an Membranen lokalisiert, wo sie die Oxidation des reduzierten F₄₂₀ und die Reduktion des Heterodisulfids aus 2-Mercaptoethansulfonat und 7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat katalysiert, das ein Elektronenakzeptor im letzten Schritt der Methanogenese ist (Brodersen et al., 1999). Bei F₄₂₀ handelt es sich um den *N*-(*N*-L-lactyl-*g*-L-glutamyl)-L-Glutaminsäure-diphosphoester des 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavins, einem Flavinanalogon (Eirich et al., 1978). F₄₂₀ ist ein Zwei-Elektronen-Akzeptor mit einem

Redoxpotential von -340mV bis -350 mV. Die F_{420} nicht reduzierende Hydrogenase (2) überträgt die Elektronen auf einen bisher noch nicht identifizierten Elektronenakzeptor. Es könnte sich dabei möglicherweise um ein Polyferredoxin oder Flavodoxin handeln (Nolling et al., 1995), (Wasserfallen et al., 1995). Im Fall der Hydrogenasen aus *Methanosarcina mazei* Gö1 wurde ein Methanophenazin als Elektronenakzeptor isoliert (Abken et al., 1998). Die F_{420} nicht reduzierende Hydrogenase ist sowohl an der Reaktion von CO_2 zu N-formylmethanofuran als auch am letzten Schritt der Methanogenese beteiligt, der Reduktion von Methyl-CoM zu Methan.

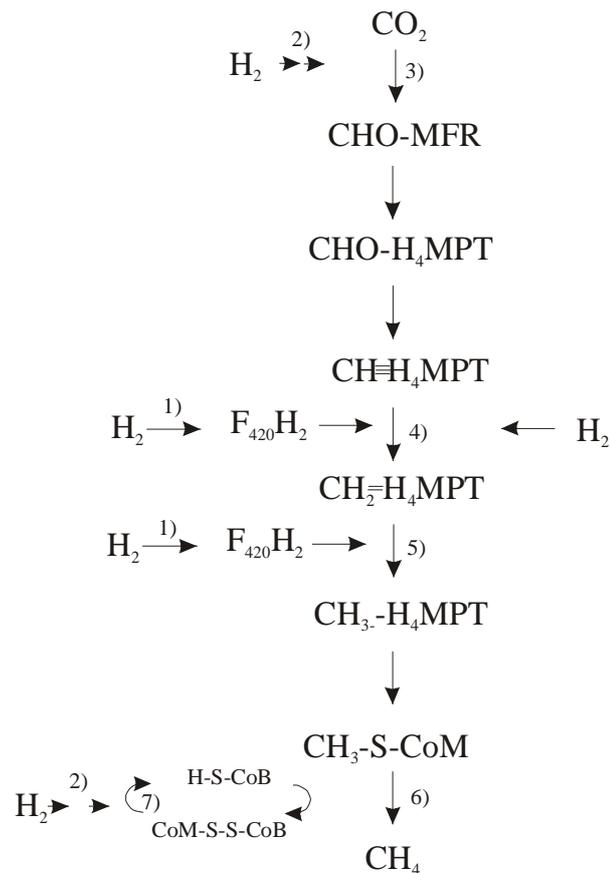


Abb.1.1. Schematische Darstellung der Methanogenese

Die Reduktion von CO_2 zu Methan erfolgt über die C_1 -Intermediate Methanofuran (MFR), Tetrahydromethanopterin (H_4MPT), und Coenzym M (CoM) (DiMarco et al., 1990), (Weiss und Thauer, 1993). F_{420} reduzierende Hydrogenasen liefern die dafür notwendigen Reduktionsäquivalente, indem sie den Cofaktor F_{420} reduzieren (1). $F_{420}H_2$ ist der Elektronendonator für die F_{420} -abhängige N^5,N^{10} -Methylen- H_4MPT -Reduktase (5) und die N^5,N^{10} -Methylen- H_4MPT -Dehydrogenase (4), wobei diese auch in der Lage ist, H_2 direkt zu oxidieren und die Elektronen auf Methylen- H_4MPT zu übertragen. Die F_{420} nicht reduzierenden Hydrogenasen (2) übertragen Elektronen auf einen unbekanntem Akzeptor. Der physiologische Elektronendonator für die Formyl-MFR-Dehydrogenase (3) ist unbekannt. Der Elektronenüberträger im letzten Schritt der Reaktion, der Reduktion von Methyl-S-CoM zu Methan, ist reduziertes Coenzym B (H-S-CoB), das durch die Heterodisulfid-Reduktase (7) wieder regeneriert wird. (Modifiziert nach Weiss und Thauer, 1993)

1.2 Klassifizierung der Hydrogenasen

Man unterscheidet ja nach ihrem Metallgehalt verschiedene Klassen von Hydrogenasen. Metallfreie Hydrogenasen benötigen mehrere Cofaktoren um die Spaltung von Wasserstoff durchzuführen (Zirngibl et al., 1992), (Thauer et al., 1996)). Bei den metallhaltigen Hydrogenasen handelt es sich um [Fe] Hydrogenasen und [NiFe] Hydrogenasen. Die [Fe] Hydrogenasen enthalten kein anderes Metall außer Eisen. Die Kristallstruktur der [Fe] Hydrogenase aus *C. pasteurianum* konnte aufgeklärt werden (Peters et al., 1998). Das Protein enthält insgesamt fünf [Fe-S] Cluster. Das aktive Zentrum besteht aus einer Anordnung von sechs Fe-Atomen, dem sogenannten H-Cluster. Er setzt sich aus einem [4S-4S] Subcluster zusammen, der über einen Cystein-Rest mit einem [2S-2S] Subcluster verbunden ist.

Die meisten bekannten Hydrogenasen zählen zu den [NiFe] Hydrogenasen (Albracht, 1994). Sie enthalten neben [Fe-S] Clustern je ein Nickel- und ein Eisen-Atom im aktiven Zentrum. Aus dieser Klasse wurden die Kristallstrukturen der Hydrogenasen aus *D. gigas* (Volbeda et al., 1995) und *D. vulgaris* Hildenborough (Higuchi et al., 1997) mit je 1,8 Å Auflösung bestimmt. Dabei wurde auch Fe als zweiter Metallligand des Nickels nachgewiesen. Die [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* als Modellbeispiel enthält ein heterobimetallisches Ni-Fe Zentrum. Das Ni-Ion ist umgeben von vier Schwefel-Atomen der Cysteinreste Cys65, 68, 530 und 533 im Abstand von 2,0 Å bis 2,6 Å. Das Fe-Ion befindet sich im Abstand von 2,6 Å zum Nickel (Wang et al., 1984) und ist über zwei der Schwefel-Liganden verbrückt. Zusammen mit einem weiteren fünften Liganden (wahrscheinlich eine Oxo-Gruppe) nimmt der Komplex eine quadratisch pyramidale bzw. verzerrt oktaedrische Konformation ein. In der Kristallstruktur wurden noch weitere zweiatomige Liganden im aktiven Zentrum am Fe festgestellt, bei denen es sich um CN⁻ bzw CO handeln könnte. Deren Identität wurde durch Infrarot-Spektroskopie aufgeklärt (Happe et al., 1997). Es handelt sich dabei um zwei CN⁻ und einen CO-Liganden. Weiterhin wurde die Lage der [Fe-S] Cluster in der kleinen Untereinheit der Hydrogenase sowie deren Liganden ermittelt. Dabei wurden zwei [4Fe-4S] Cluster identifiziert, ein proximaler und distaler Cluster, die von konservierten Cystein-Liganden koordiniert werden, wobei der distale Cluster einen His-Rest als Liganden besitzt. Bei dem zentralen Cluster handelt es sich um einen [3Fe-4S] Cluster.

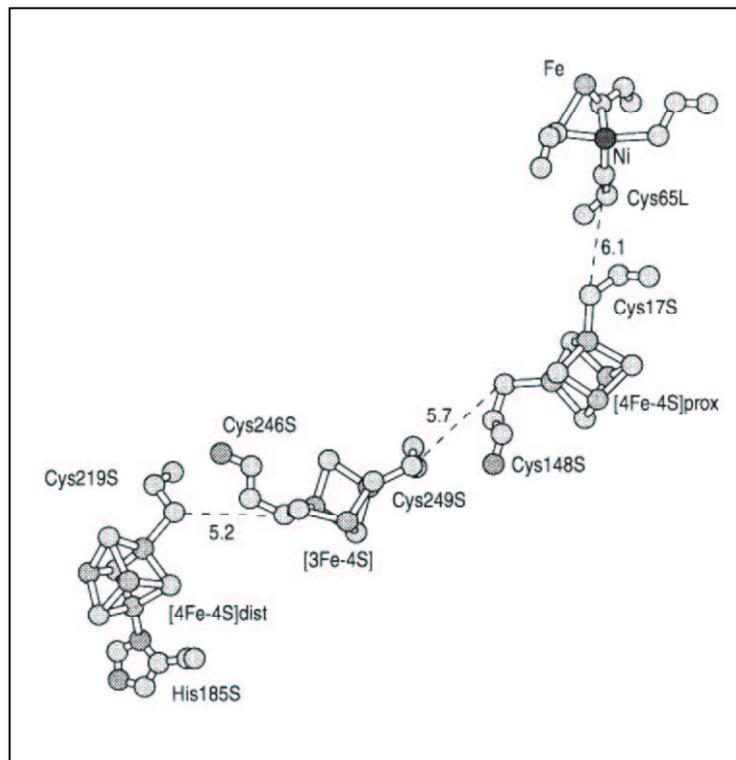


Abb. 1.2 Ausschnitt aus der Kristallstruktur der Hydrogenase aus *D. gigas* (Volbeda et al., 1995)

Dargestellt sind die Metallzentren der Hydrogenase, an denen der Elektronentransport vom aktiven [Ni-Fe]-Zentrum über die [Fe-S] Cluster erfolgen kann. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Abstände zwischen den nächstliegenden Cystein-Resten der [Fe-S] Cluster ist in Å angegeben.

Es gibt weiterhin [NiFe] Hydrogenasen, die Selen in Form von Selenocystein enthalten. Sie werden als [NiFeSe] Hydrogenasen bezeichnet (Yamazaki, 1982), (Teixeira et al., 1986), (Teixeira et al., 1990), (Sorgenfrei et al., 1993b). Die Kristallstruktur der Se-haltigen Hydrogenase aus *D. baculatum* konnte mit einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt werden (Garcin et al., 1999). Im Gegensatz zur Hydrogenase aus *D. gigas* wurde die Struktur im reduzierten Zustand gelöst. Der fünfte Ligand neben den vier Schwefel-Liganden, bei dem es sich vermutlich um eine Hydroxo-, bzw. Oxo-Gruppe handelt konnte nicht gefunden werden. Der Abstand des bimetalischen Ni-Fe Zentrums war im Vergleich zu der inaktiv kristallisierten Hydrogenase um 0,4 Å geringer. Die Sauerstoffverbrückung tritt daher nur in der oxidierten inaktiven Form auf, bei Reduktion und Übergang in die aktive Form ist sie nicht vorhanden. Am aktiven bimetalischen Zentrum konnten sonst keine Unterschiede festgestellt werden. Die Liganden des Fe wurden ebenfalls als zwei CN^- und CO identifiziert. Weiterhin konnte Selen in Form des Sec487 als Ligand des Ni bestätigt werden. Über die Funktion von Selen anstelle von Schwefel als Ligand konnte die Struktur keine Auskunft geben. Es wird vermutet, daß Selen eine wichtige Rolle bei Redoxprozessen spielt. Selenol hat einen niedrigeren pKs-Wert als Thiol, pKs Selenol = 5,2, pKs Thiol = 8,0. Wenn die Selenocysteingruppe als Base fungiert und bei der H_2 -Spaltung

ein Proton aufnimmt, ist sie als stärkerer Protonendonator (niedrigerer pKs) in der Lage die Protonen schneller an einen Akzeptor (Glutamin) in der Nähe abzugeben. Ein weiterer Unterschied besteht zwischen den [Fe-S] Clustern. Anstelle eines [3Fe-4S] Clusters in der mittleren Position enthält die Hydrogenase aus *D. baculatum* einen [4Fe-4S] Cluster. Im aktiven Zentrum, nahe des C-Terminus, wurden noch Anzeichen weiterer Metalle gefunden. Im Fall der [NiFe] Hydrogenase aus *D. gigas* und *D. vulgaris* handelt es sich dabei um Magnesium, das an der Reifung des Enzyms beteiligt sein könnte, bzw. einen Einfluß auf die Aktivierung des Wasserstoffs hat (Menon et al., 1993), (Volbeda et al., 1996), (Higuchi et al., 1997). Bei der selenhaltigen Hydrogenase aus *D. baculatum* handelt es sich dabei um Eisen. Obwohl die Identität der Hydrogenasen aus *D. gigas* und *D. baculatum* nur 36 % beträgt, gibt es nur wenige Abweichungen in der Gesamtstruktur. Die Synthese des aktiven [NiFe] Zentrums wurde an verschiedenen Hydrogenasen untersucht (Maier und Böck, 1996), (Hausinger, 1997). Für die Hydrogenase 3 aus *E.coli* als generelles Modell wurde ein GTP-abhängiges nickelbindendes Protein identifiziert, das den Nickeleinbau in die unprozessierte Hydrogenase bewirkt (Maier et al., 1995). Weitere Proteine dienen als Chaperone und sind an der Stabilisierung der Vorläufer-Hydrogenase vor dem Nickeleinbau beteiligt bzw. stellen die CO und CN⁻-Liganden des Fe zur Verfügung. Deren Rolle ist aber noch nicht geklärt (Drapal und Bock, 1998). Nach dem Einbau des Nickels erfolgt die C-terminale Prozessierung der großen Untereinheit (Rossmann et al., 1994), (Menon and Robson, 1994), (Maier and Böck, 1996). Sie wird durch eine spezifische Protease am C-terminal konservierten Histidin katalysiert (Menon et al., 1993), (Sorgenfrei et al., 1993b)a. Anschließend erfolgt die Assoziation der anderen Untereinheiten, wobei der Einbau der [Fe-S] Cluster in die kleine Untereinheit noch unklar ist.

Die für die Bindung von Übergangsmetallen des aktiven Zentrums und der [Fe-S] Cluster notwendigen Cysteine lassen sich in mehreren konservierten Sequenzmotiven finden (Reeve and Beckler, 1990), (Voordouw, 1992), (Przybyla et al., 1992), (Wu und Mandrand, 1993). Das Aminosäuremotiv RxCGxCxxxH wurde N-terminal gefunden und die Sequenz DPC/UxxCxxH am C-Terminus identifiziert (Albracht, 1994). Dabei sind die Cysteine und Selenocystein (U) direkte Liganden des Nickels im primären Reaktionszentrum (He et al., 1989), (Eidsness et al., 1989), was für Selenocystein auch im Fall von *M. voltae* gezeigt wurde (Sorgenfrei et al., 1993b), (Sorgenfrei et al., 1997a).

1.3 Hydrogenasen in *M. voltae*

In *M. voltae* konnten vier Genegruppen identifiziert werden, die für Hydrogenasen kodieren (Halboth und Klein, 1992). Die Genegruppen sind in Abb. 1.3 dargestellt.

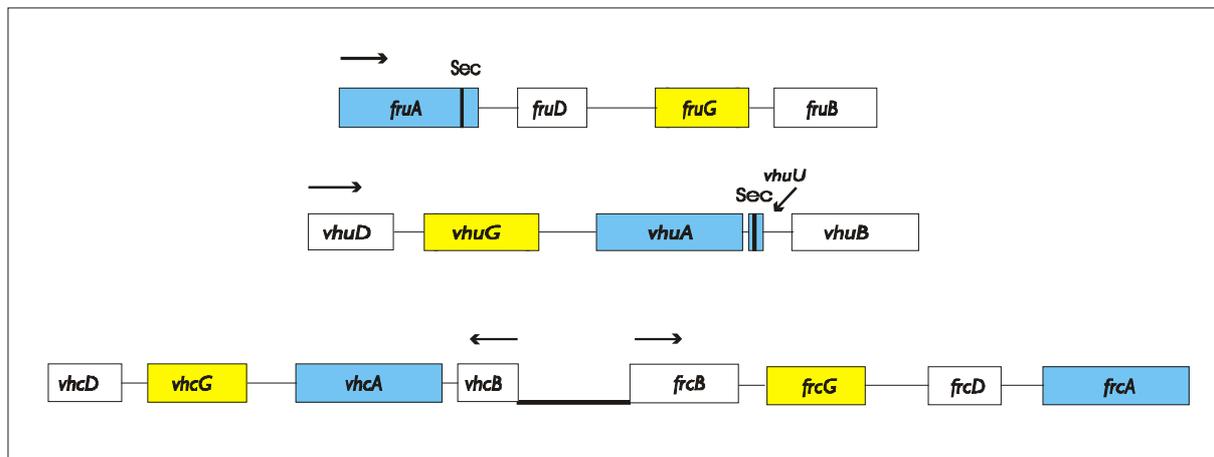


Abb. 1.3 Anordnung der Hydrogenasegengruppen in *M. voltae*.

Die Genegruppen *fru* und *frc* kodieren die F_{420} reduzierenden Hydrogenasen. Die F_{420} nicht reduzierenden Hydrogenasen werden von den Genegruppen *vhu* und *fru* kodiert. Homologe Bereiche wie die A- und G-Untereinheiten der großen und kleinen Untereinheiten der Hydrogenasen haben die gleiche Farbgebung. Die Untereinheiten *fruA* und *vhuA* enthalten an den mit Sec gekennzeichneten Stellen ein Selenocystein-Codon. Die Gene *frcA* und *vhcA* haben an diesen Stellen Cystein-Codons. Die selenfreien Hydrogenasen werden aus einer gemeinsamen intergenen Region heraus transkribiert, die durch einen dicken Balken gekennzeichnet ist. Sie enthält die Promotoren und die für die Regulation wichtigen Sequenzelemente (Noll et al., 1999). Transkriptionsrichtungen sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet. Das *vhuU*-Genprodukt ist Bestandteil der großen Untereinheit der selenhaltigen F_{420} nicht reduzierenden Hydrogenase, *vhuU* entspricht dem 3'-Ende der Gene *frcA*, *vhcA* und *fruA*. Bei den Genprodukten FruD und FrcD handelt es sich vermutlich um Proteasen, die an der Reifung der jeweiligen Hydrogenasen beteiligt sind (Rossmann et al., 1995). Die Gene *vhcB* und *vhuB* enthalten die für Polyferredoxine typische Consensus-Sequenz der Cystein Liganden, CxxCxxCxxxC, (Steigerwald et al., 1990). Die Funktion der Genprodukte VhuD und VhcD ist bisher unbekannt.

Es handelt sich dabei um die Gruppe der selenhaltigen F_{420} reduzierenden und F_{420} nicht reduzierenden Hydrogenasen Fru und Vhu und um die entsprechenden selenfreien Hydrogenasen Frc und Vhc. Diese selenfreien Hydrogenasen werden aus einer gemeinsamen intergenen Region heraus (Abb.1.3) und nur unter Selenmangel transkribiert. Die selenhaltigen Hydrogenasen hingegen werden konstitutiv gebildet (Berghöfer et al., 1994). Beide Hydrogenasen konnten gereinigt und EPR-spektroskopisch untersucht werden (Muth et al., 1987), (Sorgenfrei et al., 1993a), (Sorgenfrei et al., 1996), (Sorgenfrei et al., 1997a). Die F_{420} reduzierende Hydrogenase setzt sich aus der großen und der kleinen Untereinheit, FruA und FruG, zusammen. Zusätzlich besitzt sie noch eine FAD-haltige Untereinheit, FruB, die als 26 kDa Bande gereinigt wurde und vermutlich an der Elektronenübertragung auf den Cofaktor F_{420} beteiligt ist. Die F_{420} nicht reduzierende Hydrogenase setzt sich aus den Genprodukten *vhuA*, *vhuU* und *vhuG* zusammen.

Bei VhuA und VhuG handelt es sich um die große und die kleine Untereinheit, wie sie klassischerweise bei den meisten Hydrogenasen vorkommen. Zusätzlich enthält sie aber noch die VhuU-Untereinheit, die mit dem C-Terminus der großen Untereinheit anderer [NiFe] Hydrogenasen vergleichbar ist. Das Gen *vhuU* wird durch ein eigenes offenes Leseraster unabhängig von *vhuA* transkribiert. Die Untereinheit VhuU ist ein Polypeptid von 25 Aminosäuren (ca. 3 kDa) und enthält zwei Liganden des aktiven Zentrums. Dabei handelt es sich um einen Cystein- und einen Selenocystein- Liganden, dessen Koordination zu Ni im aktiven Zentrum nachgewiesen wurde (Sorgenfrei et al., 1993b), (Sorgenfrei et al., 1996). Ein ähnlicher Aufbau der großen Untereinheit wurde bei einer [NiFe] Hydrogenase aus *M. jannaschii* gefunden (Bult et al., 1996). Die im Genom identifizierten Gene *vhuA* und *vhuU* zeigen eine hohe Homologie zu der Vhu-Hydrogenase aus *M. voltae*, wobei VhuU auch das für den Einbau von Selenocystein notwendige Sequenzmotiv enthält. In *M. jannaschii* konnte durch Markierung der Zellproteine mit dem Isotop ^{75}Se ein dem VhuU entsprechendes Polypeptid mit einer Masse von 3,9 kDa nachgewiesen werden (Wilting et al., 1997).

Aufgrund der Tatsache, daß VhuU als eigenständige Untereinheit vorliegt, wurde ein Modell entwickelt, bei dem diese Untereinheit an der negativen Regulation der selenfreien Hydrogenasen *frc* und *vhc* beteiligt sein könnte (Sorgenfrei et al., 1997b). Da VhuU nur in Anwesenheit von Se vollständig translatiert werden kann, könnte es bei Anwesenheit von Selen als Corepressor wirken und die Transkription der *frc* und *vhc* Gene blockieren. Bei Abwesenheit von Selen wirkt das für Selenocystein kodierende TGA-Codon als Stopcodon, VhuU wird nicht mehr vollständig translatiert und die Repression der Transkription der selenfreien Hydrogenasen würde aufgehoben. Durch eine Fusionsmutante, bei der VhuA und VhuU als eine Gesamtuntereinheit vorliegen, sollte geprüft werden, ob sich dieses Modell bestätigen läßt. Anhand von Reporter-genversuchen konnte kein Einfluß auf die selenabhängige negative Regulation der selenfreien Hydrogenasen gezeigt werden (Pfeiffer et al., 1998b). Durch eine Deletionsmutante, bei der *vhuU* deletiert wurde, wurden nur Transformanten isoliert, die sowohl die Deletion als auch Kopie des *vhuU*-Gens besaßen. Damit konnte gezeigt werden, daß die Vhu-Hydrogenase essentiell für die Zelle ist und in selenfreiem Medium nicht durch die homologe selenfreie Hydrogenase Vhc ersetzt werden kann (Pfeiffer et al., 1998a). Die biologische Bedeutung der Aufteilung der großen Untereinheit der F_{420} nicht reduzierenden Hydrogenase ist daher noch unklar.

M. voltae besitzt vermutlich noch zwei weitere Hydrogenasegruppen. Es handelt sich dabei zum einen um eine metallfreie Hydrogenase, die H_2 -abhängig die Reduktion von N^5 , N^{10} -

Methenyl-5, 6, 7, 8, -tetrahydromethanopterin zu N⁵, N¹⁰-Methylen-5, 6, 7, 8, -tetrahydromethanopterin katalysiert (von Büнау et al., 1991), (Thauer et al., 1996). Der Reaktionsmechanismus bei der Umsetzung von H₂ unterscheidet sich dabei von den metallhaltigen Hydrogenasen (Klein et al., 1995), (Thauer et al., 1996). Unter Nickel-limitierenden Bedingungen konnte eine Zunahme der Aktivität für *M. thermoautotrophicum* Stamm Marburg festgestellt werden, wobei gleichzeitig eine Abnahme der Aktivität der Nickelhaltigen F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase beobachtet wurde (Afting et al., 1998). Unter Nickelmangel ersetzt das metallfreie Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase-System wahrscheinlich die Reduktion von F₄₂₀ mit H₂. In *Methanosarcina barkeri* wurde außerdem noch eine der [NiFe] Hydrogenase aus *E. coli* (Hydrogenase 3) ähnliche Gengruppe gefunden (Künkel et al., 1998). Sequenzvergleiche zeigten, daß in *M. thermoautotrophicum* Stamm □H und *M. jannaschii* homologe Leserahmen gefunden wurden (Bult et al., 1996), (Künkel et al., 1998), so daß vermutlich auch in *M. voltae* eine solche Hydrogenase vorhanden ist.

1.4 EPR- und FT-IR-spektroskopische Methoden

1.4.1 EPR-Spektroskopie

Mit Hilfe von EPR-Spektroskopie können freie Radikale oder Übergangsmetallkomplexe mit einem ungepaarten Elektron untersucht werden. Die Methode eignet sich daher gut für die Untersuchung des aktiven Zentrums von [NiFe] Hydrogenasen (Teixeira et al., 1985), (Cammack et al., 1987), (Moura et al., 1988), (Albracht, 1994), (Roberts und Lindahl, 1994), (Guigliarelli et al., 1995). Das Ni-Zentrum kann in verschiedenen paramagnetischen Redoxzuständen vorliegen und ist daher EPR-spektroskopisch detektierbar und unterscheidbar. Das gleiche gilt für die Fe-Zentren des Enzyms. Das Prinzip beruht darauf, daß ein Elektron mit einem gewissen Spin in einem Magnetfeld verschiedene Orientierungen annehmen kann. Der Zustand ist nicht mehr entartet (Zeeman-Effekt). Die Energieniveaus des Elektronenspins m_s im Magnetfeld B sind gegeben durch

$$E_{m_s} = g_e \mu_B m_s B \quad m_s = \pm 1/2 \quad (1.1)$$

Der Abstand der Energieniveaus $m_s = +1/2$ und $m_s = -1/2$ ist dann gegeben durch

$$\Delta E = E_{+1/2} - E_{-1/2} = g_e \mu_B B \quad (1.2)$$

und die Resonanzbedingung ist deshalb

$$h\nu = g_e \mu_B B \quad (1.3)$$

Dabei ist g_e der spektroskopische Aufspaltungsfaktor, eine experimentell zugängliche Tensorgröße, d.h. richtungsabhängig. Diese beträgt für ein freies Elektron 2,0023. μ_B ist das Bohr'sche Magneton und B die Stärke des Magnetfeldes. Ist die Resonanzbedingung (1.3) erfüllt, so findet eine starke Strahlungsabsorption statt. Dabei wird aus meßtechnischen Gründen die Strahlungsenergie, die im Mikrowellenbereich von ca. 10 GHz (X-Band) liegt, fest eingestellt. Durch Veränderung der magnetischen Feldstärke wird die Resonanzstelle g ermittelt und als erste Ableitung des Signals detektiert. Das Ni-Atom im aktiven Zentrum kann verschiedene Redoxzustände annehmen. Für die Hydrogenasen aus *D. gigas* und *C. vinosum* konnte gezeigt werden, daß bei der anaeroben Reinigung das Enzym in der sogenannten Ni-A Form und dem Redoxzustand $Ni_u(III)$ mit einer d^7 Konfiguration vorliegt, also paramagnetisch ist. Durch Eliminierung von Sauerstoff geht es in den Ni-B Zustand, $Ni_r(III)$, über, von dem es durch Inkubation mit H_2 leicht in den aktiven Zustand Ni-C übergehen kann. Ni-Zentren im aktiven Zustand zeigen typisch rhombische Spektren, also Spektren, bei denen der g -Tensor drei verschiedene Hauptwerte besitzt ($g_x > g_y > g_z$). Im Gegensatz dazu zeigen axiale Spektren g -Tensoren mit identischen Hauptwerten ($g_x = g_y = g_z$). Bei Ni im aktiven Zustand herrscht noch keine Klarheit über das Redoxpotential. Da es paramagnetisch ist, kann es sich nur um Ni in der d^7 , Ni(III) H^- oder d^9 , Ni(I) Konfiguration handeln (Schneider et al., 1996), (Teixeira et al., 1989), (Wang et al., 1992), (Barondeau et al., 1994)). Ni(I) und Ni(III) sind praktisch immer magnetisch. Das Ligandenfeld hat in der Regel den low spin Zustand mit $S = 1/2$. Wenn man von einem oktaedrischen Ligandenfeld ausgeht, liegt bei Ni(III) der d_z^2 Grundzustand vor, d. h. das freie Elektron befindet sich im d_z^2 -Orbital. Ni(III)-Komplexe im $d_x^2-y^2$ -Zustand liegen vermutlich bei Ni-EDTA-Komplexen bzw. bei Bestrahlung mit weißem Licht vor (Ni-L), (Sorgenfrei et al., 1996)). Weitere Reduktion führt zu einem EPR-inaktiven Zustand, dem sogenannten Ni-SI (silent) Zustand mit Ni(II), d^8 Konfiguration, in dem kein freies Elektron vorliegt und das Zentrum diamagnetisch ist. Der Übergang Ni-A zu Ni-SI ist bei den Hydrogenasen aus *D. gigas* und *C. vinosum* EPR-spektroskopisch gut charakterisiert (Albracht, 1985), (Teixeira et al., 1986). Das Ni-Zentrum hat noch eine zusätzliche Besonderheit, nämlich daß es lichtempfindlich ist und unter Bestrahlung mit weißem Licht den lichtinduzierten Zustand Ni-L einnimmt. Dieser Zustand wurde zuerst von van der Zwaan et al. (van der Zwaan et al., 1985) an der reduzierten Hydrogenase aus *C. vinosum* beobachtet und konnte auch bei vielen anderen Hydrogenasen

festgestellt werden (Cammack et al., 1987), (Sorgenfrei et al., 1993a), (Medina et al., 1996) Die Reaktion ist reversibel und kann durch Inkubation im Dunkeln bei Erwärmung auf ca. 200 K rückgängig gemacht werden. Diese Tatsache ist insofern nützlich, als daß die meisten anderen Substanzen nicht lichtempfindlich reagieren, und so störende Signale in EPR-Spektren durch Subtraktion der Lichtspektren herausgefiltert werden können (s. 3.1.2). Typische g-Werte für Ni-C und Ni-L sind in der folgenden Tabelle (Tab. 1.1) und in dem Diagramm (Abb.1.4) dargestellt (Albracht et al., 1982), (Zorin and Gogotov, 1982), (Teixeira et al., 1983), (Patil et al., 1988), (Asso et al., 1992), (Coremans et al., 1992) (Erkens et al., 1996), (Sorgenfrei et al., 1997a). Die g-Werte des Ni-C zeigen für die in Tab. 1.1 aufgelisteten Hydrogenasen keine großen Abweichungen, während die g-Werte für den Ni-L1 und Ni-L2-Zustand relativ weit auseinanderliegen.

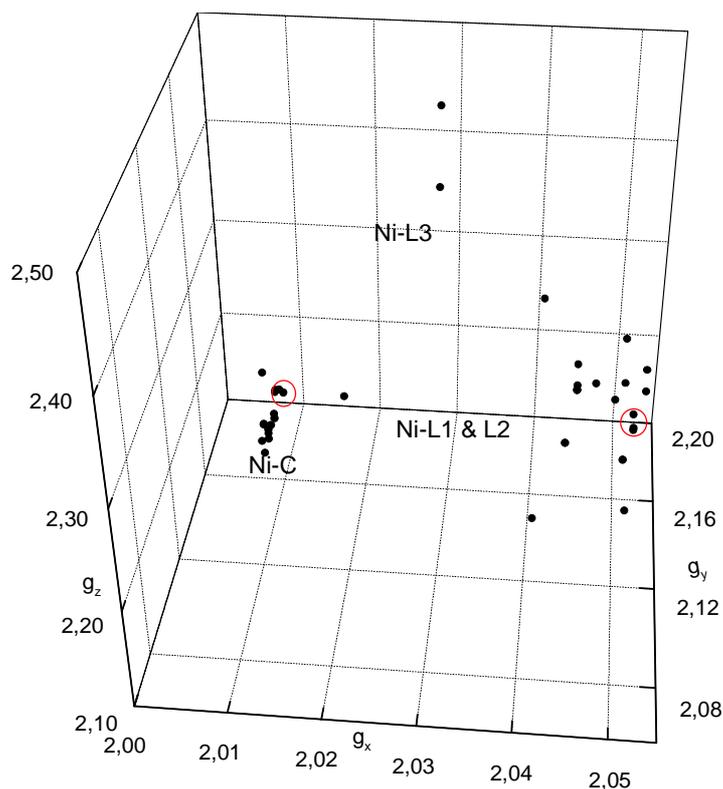


Abb.1.4: 3-D Darstellung aller bekannter g-Werte im Ni-C und Ni-L1-L3 Zustand.

Die g-Werte der Hydrogenasen aus Tab.1.1 sind in diesem Diagramm räumlich, entsprechen der g_x , g_y und g_z Achse dargestellt. Die für die Hydrogenasen aus *M. voltae* ermittelten Werte sind eingekreist.

Tab.1.1: Zusammenfassung aller g-Werte für Ni-C und Ni-L1-L3 aus verschiedenen Organismen

Hydrogenase	Ni-C			Ni-L1			Ni-L2			Ni-L3		
	g _x	g _y	g _z	g _x	g _y	g _z	g _x	g _y	g _z	g _x	g _y	g _z
[NiFeSe] <i>M.voltae</i> Vhu	2,212	2,154	2,010	2,287	2,110	2,051	2,326	2,133	2,050	2,328	2,133	2,050
[NiFeSe] <i>M.voltae</i> VhuF	2,212	2,153	2,010	2,289	2,110	2,051	2,320	2,112	2,052			
[NiFeSe] <i>M.voltae</i> Fru	2,212	2,153	2,011	2,289	2,116	2,051	2,332	2,116	2,052			
[NiFeSe] <i>D.baculatum</i>	2,215	2,161	2,008	2,300	2,124	2,047	2,337	2,145	2,041	2,478	2,163	2,029
[NiFe] <i>A.eutrophus</i> sensor	2,191	2,133	2,010	2,244	2,089	2,041	2,300	2,071	2,050			
[NiFe] <i>C.vinosum</i>	2,207	2,155	2,018	2,295	2,135	2,045	2,280	2,130	2,045			
[NiFe] <i>D. gigas</i>	2,192	2,146	2,009	2,264	2,113	2,044	2,293	2,124	2,045	2,410	2,160	ND
[NiFe] <i>D.fructosovorans</i>	2,192	2,146	2,009	2,264	2,113	2,044	2,293	2,124	2,045			
[NiFe] <i>A.eutrophus</i> membrane-bound	2,200	2,160	2,010	2,310	2,120	2,050						
[NiFe] <i>W.succinogenes</i>	2,195	2,150	2,010	2,295	2,125	2,045						
[NiFe] <i>M.therm</i> F ₄₂₀ -red	2,196	2,140	ND									
[NiFe] <i>A.eutrophus</i> soluble	2,200	2,140	2,010	2,280	2,100	2,050						
[NiFe] <i>M.therm.</i> F ₄₂₀ -n.-red.	2,210	2,130	2,010									
[NiFe] <i>D.vulgaris</i> Hildenborough	2,190	2,150	2,010									
[NiFe] <i>T.roseopersicina</i>	2,190	2,140	2,010		2,265	2,121	2,041					
[NiFe] <i>D. vulgaris</i> Miyazaki	2,196	2,144	ND		2,300	2,117	2,049					

1.4.2 FT-IR-Spektroskopie

Mit der FT-IR-Spektroskopie (Fourier-Transformierte-Infrarot-Spektroskopie) besteht eine weitere Möglichkeit, das aktive Zentrum der [NiFe] Hydrogenasen zu untersuchen. Mit IR-spektroskopischen Untersuchungen der [NiFe] Hydrogenase aus *C. vinosum* konnte festgestellt werden, daß bei Inhibitionsversuchen mit CO neben der erwarteten Bande bei 2060 cm⁻¹ noch drei zusätzliche Signale bei 2082, 2069 und 1929 cm⁻¹ zu sehen waren (Bagley et al., 1994). Weitere Experimente zeigten, daß die Signale sich in Abhängigkeit des Redoxzustandes des Enzyms ebenfalls verschoben. Daraus wurde geschlossen, daß es sich dabei um mögliche zweiatomige Liganden des Fe im aktiven Zentrum handeln könnte, die entweder doppel- oder dreifach Bindungen enthalten müssen. Es könnte sich demnach um nicht proteingebundene CO- oder CN-Liganden handeln. Dies wurde anhand der ¹³C und ¹⁵N markierten [NiFe] Hydrogenase aus *C. vinosum* bestätigt (Pierik et al., 1999) und konnte auch kristallographisch in den Hydrogenasen aus *D. gigas* und *D. baculatum* (Abb. 1.5) festgestellt werden (Volbeda et al.,

1995), (Garcin et al., 1999). Die [NiFe]Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F, deren Kristallstruktur zu 1,8 Å aufgelöst wurde, unterscheidet sich dahingehend, daß als dritter Ligand des Fe im aktiven Zentrum eine SO-Gruppe angenommen wird (Higuchi et al., 1997). Der Nachweis der SO-Bande über Infrarot-Spektroskopie, die im Bereich von 900-1200 cm⁻¹ liegt, wurde aber noch nicht gezeigt.

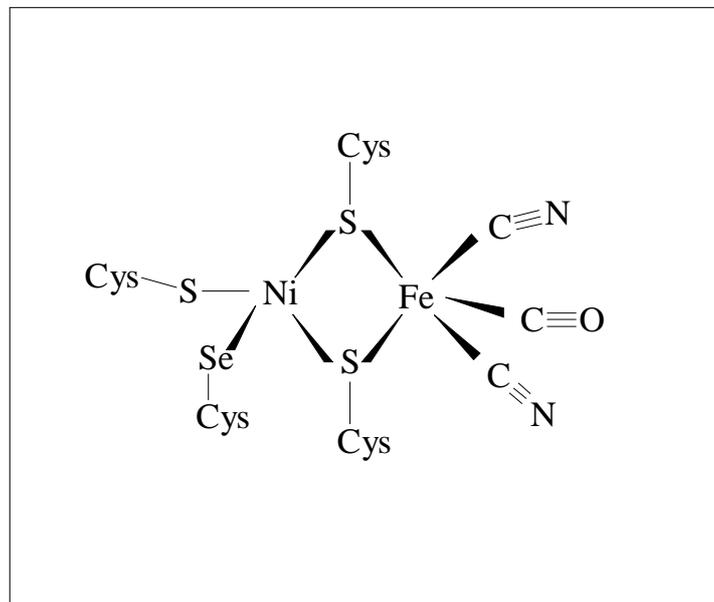


Abb. 1.5: Modell des reduzierten aktiven Zentrums der selenhaltigen Hydrogenase aus *D. baculatum* (nach Garcin, 1999).

Das primäre Reaktionszentrum wird durch die beiden Übergangsmetalle Nickel und Eisen gebildet, die über S-Liganden konservierter Cystein-Reste verbrückt sind und Bestandteile des konservierten Sequenzmotivs GxxxxPRGxxxH sind. Die anderen Liganden, die zusammen eine quadratisch pyramidale Konformation mit Ni im Zentrum ergeben stammen aus dem konservierten Sequenzmotiv DPC/UxxCxxH der kleinen Untereinheit (Albracht, 1994). Selen steht in axialer Position zum Ni. Das Fe-Zentrum hat ein verzerrt oktaedrisches Ligandenfeld, daß sich aus den beiden S-Verbrückungen und den nicht Protein-gebundenen Liganden zusammensetzt. Dabei wäre die Aminosäure Arg aus dem konservierten Abschnitt GxxxxPRGxxxH der großen Untereinheit an der Komplexierung eines CN⁻ beteiligt (Albracht, 1994). Über den Einbau dieser Liganden in das aktive Zentrum ist bisher noch nichts bekannt.

Die nicht proteingebundenen Liganden CN⁻ und CO absorbieren in sehr charakteristischen Wellenzahlenbereichen von 2150 – 1850 cm⁻¹. Sie können deshalb erkannt werden, da die restliche Proteinstruktur keine Absorption in diesem Wellenlängenbereich zeigt. Mit Hilfe der Fourier-Technik ist es möglich auch die verhältnismäßig geringen Signalintensitäten in Proteinen

zu identifizieren. Dabei werden die IR-Spektren über ein Interferogramm erfasst und über Fourier-Transformation in die Frequenzen der einzelnen Schwingungen zerlegt. Dadurch verkürzt sich die Meßzeit erheblich, so daß niedrig konzentrierte Proben beliebig oft (6000fach) in relativ kurzer Zeit aufgenommen werden können und die Signalintensität wesentlich verstärkt wird.

1.5 Eisen-Schwefel-Zentren

Die heterolytische Aktivierung von H_2 am bimetallicen aktiven Zentrum der Hydrogenasen erfolgt am Ni unter Beteiligung einer benachbarten Base, bei der es sich um einen Thiolat bzw. Selenolatliganden handeln kann. Für die Reaktion wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen (Moura et al., 1988), (Maroney et al., 1991), (Kolodziej, 1994). Dabei kommt es zu einem Übergangszustand, bei dem das entstandene Hydrid wahrscheinlich ein Ligand des Fe wird und das Proton an eine benachbarte Base gebunden wird (Sorgenfrei et al., 1997b). Der Elektronenübergang erfolgt dann auf den nächstgelegenen [Fe-S] Cluster, wo der Elektronentransport über eine Reihe hintereinander angeordneter Cluster zu einem Elektronenakzeptor erfolgt.

Die Kristallstruktur der Hydrogenase aus *D. gigas* bzw. *D. vulgaris* gibt neben Einblicken in das aktive Zentrum auch die Lage der [Fe-S] Cluster in der kleinen Untereinheit an. Der Abstand zwischen den Zentren beträgt in etwa 12 Å. Es handelt sich dabei um einen proximalen, dem aktiven Zentrum am nächsten gelegenen [4Fe-4S] Cluster, einen zentral gelegenen [3Fe-4S] Cluster und einen distalen [4Fe-4S] Cluster (Abb. 1.2). Die Cystein-Liganden, die die Cluster komplexieren, lassen sich nicht alle der typischen Consensus-Sequenz der Polyferredoxine zuordnen. Die Polyferredoxin Consensus-Sequenz wird im Fall der Hydrogenasen aus *D. gigas* und *D. baculatum* nur bei dem zentralen Cluster gefunden, ansonsten variiert die Anordnung der Cystein-Liganden je nach Organismus und Hydrogenase (Albracht, 1994). Durch einen Sequenzvergleich mit der kristallisierten Hydrogenase aus *D. gigas* konnten für *M. voltae* die Cystein-Reste, die als Liganden der [Fe-S] Cluster in Frage kommen, ermittelt werden (Abb. 3.3.1).

Anhand der Kristallstrukturen erkennt man eine Anordnung der Cluster entlang einer Linie. Dies legt die Vermutung nahe, daß der Elektronentransport von einem Cluster zum nächsten erfolgt. Durch Mößbauer-Spektroskopie und Redox titrationen wurden die Redoxpotentiale der Cluster von *D. gigas* ermittelt, die jeweils -340 mV, -70 mV und -290 mV betragen (Teixeira et al., 1989). Das Redoxpotential des mittleren Clusters liegt deutlich über dem der benachbarten Cluster, was die Frage aufwirft, ob und inwieweit der zentrale Cluster überhaupt am Elektronentransport beteiligt ist oder ob er hauptsächlich zur Stabilisierung der Proteinstruktur gebraucht wird. In Hydrogenasen mit drei [4Fe-4S] Clustern wie in *D. baculatum* betragen die apparenten Redoxpotentiale für alle beteiligten Cluster in etwa -360 mV, so daß auch in diesem Fall keine große Potentialdifferenz vorliegt, entlang derer ein gerichteter Elektronentransport stattfinden könnte.

Durch Mutationen, bei der der zentrale [3Fe-4S] Cluster [NiFe] Hydrogenase aus *D. fructosovorans* gegen einen [4Fe-4S] Cluster ausgetauscht wurde, konnte das Redoxpotential dieses Clusters von $+65$ mV auf -250 mV abgesenkt werden (Rousset et al., 1998). Der Unterschied zu dem proximalen und distalen [4Fe-4S] Cluster mit je -380 mV war zwar nicht mehr so hoch, es zeigte sich aber nur einen sehr geringer Einfluß auf die Aktivität des Enzyms, so daß die Frage nach der Funktion des zentralen Clusters und dessen Redoxpotential noch offen blieb.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb geklärt werden, welche Rolle der zentrale Cluster am Beispiel der Hydrogenasen aus *M. voltae* übernimmt und inwieweit er am Elektronentransport beteiligt ist. Dazu wurde die F₄₂₀ reduzierende Hydrogenase gewählt, deren natürlicher Elektronenakzeptor bekannt ist und die auch in der Lage ist künstliche Elektronenakzeptoren wie Viologene zu reduzieren. Der zentrale Cluster sollte von einem [4Fe-4S] Cluster in einen [3Fe-4S] Cluster umgewandelt werden und die Auswirkungen auf die biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften des Enzyms überprüft werden.

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob es eine biologische Relevanz gibt, die die Trennung der Gene *vhuA* und *vhuU* erklärt. Die Fusionsmutante VhuF wurde daher biochemisch und spektroskopisch mit der entsprechenden Hydrogenase aus dem Wildtyp verglichen. Aufgrund der Tatsache, daß *M. voltae* ohne eine intakte selenhaltige F₄₂₀ nicht reduzierende Hydrogenase nicht überlebensfähig war, war es außerdem noch von Interesse festzustellen, in welchem Maß die selenfreien Hydrogenasen in der Zelle vorhanden sind und welche Unterschiede sich bezüglich den biochemischen Eigenschaften zwischen selenhaltigen und schwefelhaltigen Hydrogenasen eines Organismus feststellen lassen. Dazu wurde versucht die Hydrogenasen aus Zellen zu reinigen, die unter selenfreien Bedingungen gewachsen waren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.2 Chemikalien und Gase:

Die während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert angegeben, bei den Firmen Biomol (Hamburg), BioRad (München), Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Promega (Heidelberg), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Restriktionsendonukleasen sowie DNase I und Ribonuklease A wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Boehringer Mannheim (Mannheim) oder New England Biolabs (NEB, Schwalbach/Taunus) bezogen. Der Cofaktor F₄₂₀ wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Thauer zur Verfügung gestellt. Die folgenden Gase wurden von der Firma Messer-Griesheim (Siegen) bezogen: Gasgemisch 5 % H₂ 20 % CO₂ 75 % N₂, (Reinheit 4.6, 4.5, 4.3), Gasgemisch 80 % H₂ 20 % CO₂, (Reinheit 3.0, 4.5), Formiergas 5 % N₂, 95 % N₂ (Reinheit 3.0, 4.6), Wasserstoff (Reinheit 3.0), Stickstoff (Reinheit 4.6), Schwefelwasserstoff (Reinheit 99,3 %).

2.1.3 Geräte und Material:

Anaerobenzelt (Coy Laboratories, Ann Arbor, USA), Kanülen und Spritzen (B. Braun, Melsungen), Mikroliterspritzen (Hamilton, Schweiz), Mini-Protean II und Transfer Apparat "Trans-Blot SD" (BioRad, München), Ultrazentrifuge "Beckmann" (Beckmann, München), FPLC Gesamtanlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), FPLC 2000 (Waters, USA), Omega Membranfilter (Filtron, Karlstein), EPR-Spektrometer (Bruker, USA)
ECL Western-Blotting Detektion Reagenzien (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

2.1.4 Säulenmaterial und Säulen:

DEAE Sepharose fast flow, Phenyl Sepharose fast flow, high load 16/10, Phenyl Sepharose high performance, Mono Q HR 5/5, Resource 15P (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), Uno Q (BioRad, München)

2.1.5 Organismen:

Methanococcus voltae PS, DSM 1537 wurde von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) bezogen.

Escherichia coli: DH5 α (Hanahan, 1983), XL1blue, XLmutS, Sure (Stratagene, Heidelberg)

2.1.6 Antikörper:

Konjugat aus Immunglobulin gegen Kaninchen IgG und alkalischer Phosphatase (BioRad, München), Konjugat aus Immunglobulin gegen Kaninchen IgG und Peroxidase (Sigma, Deisenhofen), Antikörper aus Kaninchen gegen die große Untereinheit der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae* (Firma Eurogentec, Seraign, Belgien), diese Arbeit.

2.1.7 Oligonukleotide:

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) und der Firma Interactiva (Ulm) bezogen. Alle Primer, die mit ir bezeichnet sind, enthalten außerdem eine 5' Markierung mit dem Infrarot-aktiven Farbstoff IRD800 (MWG Biotech):

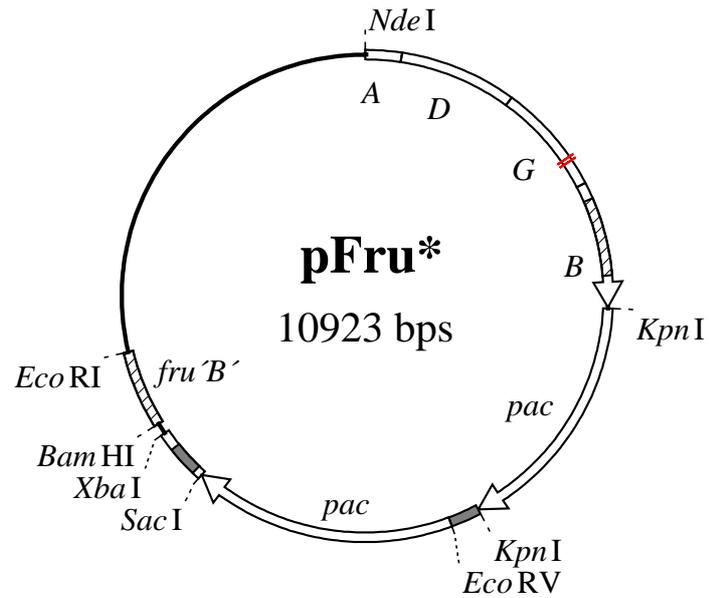
Selektionsprimer	
ScaI->MluI	CTGTGACTGGTGACGCGTCAACCAAGTC
PstI->HindIII	CGATGGCGCCAGAAGCTTGCGGCCGCC
Phagenprimer	
lamda481	CGGAGTCTCTGGCATTCTTCAGTTCC
lamda731	GGTAAACAGGCTGCGGCATTTTGTCC
Lambda Kpn	GGA ACTATTGGGTACCAACGCCATCG
Lambda Xba	CTGTGGCTCCGTCTAGAACAGTGAGC
Lambda Sac	GAAATTGAGAACGAAGAGCTCCGCCGG

Sequenzierungsprimer:	
M13reverse	CAGGAAACAGCTATGACC
M13forward	GTAAAACGACGGCCAGT
pSL-lacZ'	TTGTAAAACGACGGCCAGTGCC
Primer in fru	
fru3.33	GGTTTAGAAAGTGGATCCCTTGATGGGGTAATTGTTCG
fru3.92	CCATAGCTTTATAGAATTCTTCACCTTTTGCGGTTCTTATG
fru2.89ALA	GCTGTAACAATGGAGGCTGGAAGGCCTGC
fru3.02ALA	GACAAAGAAATTGCTATAAAAATGCGGTGCTTGTAGCG
fru3.02PRO	GACAAAGAAATTCCTATAAAAATGCGGTGCTTGTAGCG
fru1.77ir	CAGGTACTTACTTTATTGACG
fru2.41	GCCAATACAATGGTTAAAGTTGC
fru2.89ir	GGTAGTGAAGCTTGCGGATGC
fru2.95	GCTGCACAAGCTCCACATCC
fru3.72ir	CCCAGAATTTACCTTTTCCG
fru4.03ir	GCACATAGAAAAGAAATAGG
fruNde	GGCTACCACCACAAATATGCGG
fruNru	GTTTAATTTTCAATTTTTTTATTATTGATATATCACCT

2.1.8 Plasmide:

- pBlueskript SK+/- (Alting-Mees and Short, 1989) Acc.Nr.: X52328 (Stratagene)
 pSL1180 (Brosius, 1989) Acc.Nr.: IG0323 (Amersham Pharmacia Biotech)
 pMipuidA (Noll et al., 1999)
 pFruC195A,C205P (pFru*) diese Arbeit

Das Plasmid pFru* wurde außerdem noch mit Aminosäureaustauschen im *fruG*-Gen, die zu den Plasmiden pFruC195A,C205A, pFruC205A und pFruC205P führten, hergestellt: Die Mutationen befinden sich an der mit zwei parallelen Strichen gekennzeichneten Stelle im *fruG*-Gen.



2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.2.1.1 Anzucht und Kultivierung von *Methanococcus voltae*

Methanococcus voltae wurde auf einem Komplexmedium nach (Whitman et al., 1982) modifiziert nach (Jones et al., 1983), angezogen. Dem Medium wurden weiterhin 1 ml/l 1000x Vitaminlösung zugefügt, die Eisensulfatkonzentration wurde auf 12 μ M erhöht und die Natriumselenitkonzentration auf 1 μ M gesenkt.

1000x Vitaminlösung: Biotin 20 mg/l, Folsäure: 20 mg/l, Liponsäure: 50 mg/l, Na-D-Panthenat: 500 mg/l, Pyridoxin/HCl: 100 mg/l, Riboflavin: 50 mg/l, Thiamin/HCl: 50 mg/l, Vitamin B₁₂: 5 mg/l, Biotin: 20 mg/l, Folsäure: 20 mg/l, Liponsäure: 50 mg/l, Na-D-Panthenat: 500 mg/l, Pyridoxin/HCl: 100 mg/l, Riboflavin: 50 mg/l, Thiamin/HCl: 50 mg/l)

Das Medium wurde unter Stickstoff-Begasung aufgekocht und in Flaschen abgefüllt in denen Cystein (0,7 g/l) und NaHCO₃ (3 g/l) vorgelegt wurde. Bis zum Farbumschlag des Resazurins von rot zu farblos wurde das Medium mit Stickstoff begast und je nach Bedarf anaerob in kleinere Serumflaschen abgefüllt. Die Kultivierung von *M. voltae* erfolgte in 100 ml Serumflaschen in 10 ml Medium und 90 ml Gasphase (H₂/CO₂, 80 %/20 %). Der Gasdruck betrug ca. 15 hPa (1,5 bar). Vancomycin wurde zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben, Puromycin wurde dem Selektionsmedium zu 10 μ g/ml zugegeben.

Um *M. voltae* unter Selen-limitierenden Bedingungen wachsen zu lassen wurde Aminosäuremedium verwendet. Dazu wurde Hefe und Trypton aus dem Komplexmedium durch folgende Aminosäurelösungen zu je 100 mg/l Endkonzentration ersetzt:

Aminosäuren 1: Asn, Asp, Gln, Met, Glu, pH 7.

Aminosäuren 2: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, pH 7.

Aminosäuren 3: Arg, Lys, Ser, Thr, pH 7,

Aminosäuren 4: Pro, Phe, Tyr, Trp, pH 11.

Tryptophan wurde zu einer Endkonzentration von 250 mg/l und Histidin zu 225 mg/l zugegeben. Für die Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Medium 1,5 % Agar zugesetzt.

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium in ein Anaerobenzelt eingeschleust und unter der 5 % H₂, 20 % CO₂, 75 % N₂-Atmosphäre gerührt, bis sich ein stabiler pH-Wert einstellte (Auflösung des Niederschlags). Die Platten wurden unter Zugabe des jeweiligen Selektionsmarkers gegossen,

Um eine größere Zellmasse zu erhalten, wurde *M. voltae* in 10 l Fermentern unter H₂/CO₂ (80 %/20 %, 96 ml/min) und H₂S (3 ml/min)-Begasung angezogen. Die Zellen wurden unter starkem Rühren bis zur stationären Phase wachsen gelassen (7x10⁹ Zellen/ml). Danach wurden sie unter Ausschluß von Sauerstoff in einer Durchflußzentrifuge (Heraeus Contifuge 17RS, Rotor HCT 22.2.300, Heraeus, Hanau) abzentrifugiert und möglichst zügig aerob geerntet. Die Zellen wurden sofort in 10 g Päckchen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde auf Standard I-Medium bei 37°C angezogen. Zur Herstellung von Festmedien wurden 1,5 % Agar zugegeben. Je nach Bedarf wurden dem Medium zusätzlich noch 100 µg/ml Ampicilin, 50 µg/ml Kanamycin und 0,004 % X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galaktopyranosid in Dimethylformamid) zugegeben. Zur Stammhaltung wurden die Zellen bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert, mit 0,5 Vol 87 % Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

2.2.1.3.1 Präparation chromosomaler DNA aus *M. voltae*

Die Reinigung chromosomaler DNA aus *M. voltae* erfolgte nach der Methode von Sitzmann und Klein (Sitzmann and Klein, 1991). Dazu wurden die Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur bei 4°C und 5000 x g abzentrifugiert und in 1/40 des Kulturvolumens NTEE-Puffer (400 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 10 mM EGTA) aufgenommen. Danach wurden 1/10 des Volumens an 1 % N-Laurylsarkosinatlösung, 0,2 mg/ml Proteinase K und 0,1 mg/ml Ribonuklease A zugegeben, um die Zellen aufzuschließen. Der Ansatz wurde für 12 h bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch dreimal mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.2.1.4.1). Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol. Die wäßrige

Phase wurde mit 5 M Natriumacetat versetzt und die DNA durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol gefällt. Die DNA wurde 30 min bei 13 000 x g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Für kleinere Mengen wurde die DNA über Anionenaustauschersäulchen gereinigt (QIAamp Tissue kit, Qiagen, Hilden). Hierzu wurden 2 ml einer stationär gewachsenen *M.voltae*-Kultur bei 13000 x g für 1 min sedimentiert und in 175 µl dest. Wasser lysiert. Nach Zugabe von 20 µl Protease (20 mg/ml) wurden die Proben bei 55°C für 4 h inkubiert. RNA wurde durch eine RNase-Behandlung bei 20°C für 2 min abgebaut. Die Bindung der DNA an das Anionenaustauschermaterial, sowie Waschen und Elution in 200 µl Elutionspuffer erfolgten nach den Angaben der Hersteller.

2.2.1.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

analytischer Maßstab:

Plasmide wurde sowohl nach der Methode nach Holmes und Quigley (Holmes und Quigley, 1981) als auch durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) gereinigt. Für erstere Methode wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur bei 13 000 x g für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 400 µl STET-Puffer (6 % Saccharose, 5 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) suspendiert. Anschließend wurden 30 µl einer 1 %igen Lysozymlösung zugegeben, 5 min bei 18°C inkubiert und 2 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen bei 4°C wurde das Lysat für 15 min bei 13 000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol gefällt und bei 4°C und 13 000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag in 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA unter Vakuum getrocknet und in 30 µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Bei der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly wurden die Zellen in 100 µl 50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA suspendiert und mit 200 µl 0,2 M NaOH, 0,1 % SDS versetzt. Anschließend wurden die Proteine mit 100 µl kalter 3 M Na-Acetatlösung pH 5,2 gefällt und 20 min bei 13 000 x g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von 280 µl Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

präparativer Maßstab:

Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte durch alkalische Lyse der Zellen und anschließender Reinigung über Anionenaustauschersäulen. Die Säulen wurden von den Firmen Macherey & Nagel (Düren) bzw. Qiagen (Hilden) bezogen und nach den Angaben der Hersteller verwendet.

2.2.1.4 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.1.4.1 Phenolextraktion

Zur Aufreinigung von DNA aus Lösungen wurden Proteine durch Zugabe von 1 Vol Phenol und kräftigem Schütteln gefällt. Anschließend wurde 10 min bei 13 000 x g zentrifugiert und die wäßrige Phase ohne den Niederschlag an der Phasengrenze abgenommen. Bei Bedarf wurde dieser Schritt wiederholt. Die wäßrige Phase wurde anschließend mit 0,5 Vol Phenol, 0,5 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) versetzt, kräftig geschüttelt und wiederum abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) extrahiert und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt.

2.2.1.4.2 DNA-Fällung mit Ethanol

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 0,1 Vol 3 M Na-Acetat pH 7,5 und mit 2,5 Vol eiskaltem Ethanol (96 %) versetzt. Nach mehrmaligem Schütteln und 10 min Inkubation bei -80°C wurde die DNA bei 13 000 x g, 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 13 000 x g für 5 min zentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Der getrocknete Niederschlag wurde anschließend in Wasser oder TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1 mM EDTA) aufgenommen.

2.2.1.4.3 DNA-Fällung mit Isopropanol

Die DNA-Lösung wurde wie bei der Ethanol-Fällung mit 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt. Nach Zugabe von 0,8 Vol Isopropanol wurde für 20 min bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 13 000 x g für 5 min zentrifugiert, im Vakuum getrocknet und in Wasser oder TE aufgenommen.

2.2.1.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Abschätzung der DNA-Konzentration in Agarosegelen (2.2.1.6) wurde eine bestimmte Menge an DNA zusammen mit DNA bekannter Konzentration aufgetragen. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und über Vergleich der Fluoreszenzstärke eine Mengenabschätzung vorgenommen.

Für eine genauere Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei $\lambda = 260$ nm gemessen (UV-1000, Amersham Pharmacia Biotech). Für doppelsträngige DNA mit einer spezifischen Konzentration von 1 mg/ml wird eine Extinktion von $E_{260} = 20$ (einzelssträngige $E_{260} = 27$) angenommen (Ausubel et al, 1996). Zur Feststellung des Reinheitsgrades der DNA-Lösung wurde zusätzlich die Extinktion bei $\lambda = 280$ nm gemessen und der Quotient E_{260}/E_{280} gebildet, der bei DNA bei 1,8 liegen sollte.

2.2.1.5 DNA-Agarosegelelektrophorese:

Genomische DNA, PCR- oder DNA-Fragmente wurden zur Analyse oder Präparation in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt.

Die Agarose (0,8 %-2 %, je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente) wurde in Elektrodenpuffer (1x TAE: 40 mM Tris/Essigsäure, pH 7,2, 20 mM Natriumacetat, 0,1 mM EDTA) zur Homogenität erhitzt, auf ca. 50°C abgekühlt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm gezogen und das Agarosegel in einer Gelapparatur mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Probenpuffer (10 x Probenpuffer 0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 0,42 % (w/v) Xylencyanol, 25 % (w/v) Orange G, 50 % (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA) versetzt und in die Taschen pipettiert. Als Größenstandards wurde mit *Pst*I verdaute λ -DNA oder der DNA ladder marker (MBI) verwendet. Die Elektrophorese wurde dann bei einer konstanten Spannung von 5-10 V/cm durchgeführt. Zum Anfärben der DNA-Fragmente wurde das Gel 5 bis 10 min in Ethidiumbromidlösung (0,002 % (w/v) in TAE-Puffer) geschwenkt. Nach kurzem Wässern wurde das Gel unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) analysiert und fotografiert.

2.2.1.5.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten (2.2.1.5) und in einen vorher mit Wasser ausgekochten Dialyseschlauch mit einer geringen Menge an TAE-Puffer gegeben. Die DNA wurde durch Elektroelution (Sambrook et al., 1989) bei einer Spannung von 110 mV für 30 min aus dem Gelstreifen eluiert. Alternativ wurde die Isolierung der DNA aus Agarosegelen unter Verwendung des Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) bzw. des JetSorb-Kits (Genomed) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.2.1.6 Transformation von *E. coli* und *M. voltae*

2.2.1.6.1 Transformation von *E. coli* und Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen (Hanahan, 1983) wurden 400 ml Kulturen der jeweiligen Stämme (DH5 α , X11-blue, SURE) bei 20°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,6-0,9 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C und 5000 x g für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde mit 200 ml steriler 10 % (v/v) Glycerin-Lösung gewaschen und wieder zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 100 ml 10 % Glycerin gewaschen nochmals zentrifugiert und in 1 ml 10 % Glycerin (X11-blue) bzw. GYT-Medium (0,125 % Hefeextrakt, 0,25 % Trypton in 10 % Glycerin) aufgenommen, aliquotiert und im Ethanol/Trockeneis-Gemisch eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Vor der Elektroporation wurde der zu transformierende Ligationsansatz auf einer Membran (25 nm Porendurchmesser, Millipore) gegen dest. Wasser dialysiert, um eine geringe Leitfähigkeit zu erhalten. Für die Transformation der Stämme DH5 α und X11-blue wurden Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm benutzt für SURE-Zellen 1 mm, mit denen eine nach Herstellerangaben höhere Transformationseffizienz erreicht werden soll. Die DNA-Lösung (1-4 μ l) wurde in die auf Eis vorgekühlten Küvetten gegeben und mit den kompetenten Zellen vermischt (60 μ l). Die Zellen wurden mit einem exponentiell abfallenden Puls elektroporiert (Gene Pulser Apparatus, BioRad). Bei 2 mm Küvetten wurde eine Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 μ F und einem Widerstand von 200 Ω angelegt, bei 1 mm Küvetten 1,7 kV. Nach erfolgtem Spannungsstoß wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MnCl₂, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) suspendiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden entsprechende Mengen der Zellen auf festem Selektionsmedium

(2.2.1.2) ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.6.2 Transformation von *M. voltae* mit liposomalen Reagentien

Die Transformation von *M. voltae* wurde unter anaeroben Bedingungen (5 % H₂, 20 % CO₂, 75 % N₂-Atmosphäre) mit anaeroben Lösungen nach einer modifizierten Methode von Metcalf (Metcalf et al., 1997) durchgeführt. Für die Transformation wurden frisch angewachsene *M. voltae*-Kulturen mit einer OD₅₇₈ von 0,4-0,6 in 0,5 ml 0,68 M Saccharose aufgenommen, so daß die Zellen auf ca. 10⁹ Zellen/ml verdünnt wurden. Die lyophilisierte DNA (0,5 pmol) wurde in 22,5 µl HEPES pH 7,0 gelöst und mit 2,5 µl EscortTM transfection reagent (Sigma, Deisenhofen) gemischt. Nach 10 min Inkubation wurde das DNA-Gemisch zu den Zellen gegeben und für 1-2 h inkubiert. Danach wurde der Ansatz in flüssigem Medium ohne Selektion bei 37°C für 14 h inkubiert und die Zellen auf Puromycin-haltigen Platten ausplattiert.

Alternativ wurde die Transformation mit DOTAP (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Hierzu wurde die DNA in 25 µl HEPES gelöst und zu 5 µl DOTAP, das 1:10 in HEPES verdünnt wurde, gegeben. Der Ansatz wurde zu den suspendierten Zellen gegeben und für 4 h bei RT inkubiert. Danach wurde das Gemisch in 10 ml Medium ohne Selektion bei 37 °C für 14 h geschüttelt und auf Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden in einem Anaerobentopf in einer Atmosphäre von 1,5 bar 80 % H₂, 20 % CO₂ mit 30 ml H₂S inkubiert, bis nach 10 Tagen Kolonien sichtbar wurden.

2.2.1.7 Southern-Blot Analyse

2.2.1.7.1 DNA-Transfer auf Nylon-Membran:

Die Übertragung von DNA aus Agarosegelen auf Nylon-Membran wurde nach der Methode von Chomczynski (Chomczynski, 1992) unter mäßig alkalischen Bedingungen durchgeführt. Im Anschluß an die gelelektrophoretische Trennung wurde das Gel für 30 min in Denaturierungslösung (3 M NaCl, 0,4 M NaOH) und anschließend für 15 min in Transferlösung (3 M NaCl, 8 mM NaOH) inkubiert. Für den Transfer wurden 3 cm saugfähiges Papier und 4 Lagen Whatman-3MM-Papier in der Größe des Gels aufgeschichtet. Hierauf wurde die Nylon-Membran gelegt und darauf das Gel luftblasenfrei plaziert. Auf das Gel wurden 4 Lagen mit Transferlösung getränktes Whatman-Papier gelegt und mit einem längeren Streifen eine Salz-

Brücke zu einem Vorratsgefäß gelegt. Um den Aufbau vor Austrocknung zu schützen wurde er mit einem Plastikdeckel abgedeckt. Der Transferprozess betrug für 1 % Gele eine Stunde und entsprechend mehr für höherprozentige Gele. Danach wurde die Membran mit der übertragenen DNA 10 min in Neutralisierungslösung (0,2 M Phosphatpuffer, pH 6,8) geschwenkt. Zum Fixieren der DNA wurde die Membran 10 min bei 80°C inkubiert und mit UV-Licht (254 nm, UV Stratalinker 2400) 3 min bestrahlt.

2.2.1.7.2 DNA-DNA-Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG)

Bei der nicht radioaktiven Southern-Hybridisierung wurde das DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet. Hierbei wurden 1-2 µg DNA mit Digoxigenin-11-dUTP nach der Zufallsprimer-Methode (DIG-High Prime Mix) nach den Vorgaben des Herstellers markiert. Die Membran mit der gebundenen DNA wurde mit Hybridisierungspuffer (7 % SDS, 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0) bzw. mit Boehringer Standard-Hybridisierungspuffer ohne Formamid 1 h bei 60°C in Hybridisierungsröhren (Biometra, Göttingen) prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der DIG- markierten Sonde erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Waschvorgänge des Filters, die Detektion mit anti-DIG markierten Antikörpern und die nachfolgende Chemolumineszenzreaktion wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.8 Koloniehybridisierung

Mit Hilfe der Koloniehybridisierung (Ausubel et al., 1996) wurde ein Abschnitt des *fru*-Gens isoliert. Dazu wurde genomische DNA von *M. voltae* mit *NdeI* und *NruI* geschnitten, das entsprechende Größenfragment wurde aus dem Gel extrahiert (2.2.1.5.1) und in den Vektor pSL1180 kloniert (2.2.1.9.1). Nach der Transformation (2.2.1.6.1) wurden für die Koloniehybridisierung Platten vorbereitet, die ca. 200 der zu untersuchenden Kolonien trugen. Die Platten wurden vorgekühlt und passende Nitrocellulosefilter für 1 min auf die Platten aufgelegt. Die Orientierung wurde markiert, die Filter vorsichtig abgezogen und kurz auf trockenes Whatmann-3MM-Papier gelegt. Die Filter wurden dann nacheinander auf Whatman-Papier gelegt (Kolonien nach oben), das mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) getränkt war (15 min), mit Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) (15 min) und mit 2x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat pH 7,0), zwischendurch wurden die Filter

jedesmal auf trockenes Whatman-Papier gelegt. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, UV Stratalinker 2400) für 3 min fixiert. Um Zellreste zu entfernen wurden die Filter mit Proteinase K-Lösung (2mg/ml) behandelt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Letzte Zellreste wurden mechanisch abgewaschen. Die Filter wurden wie in 2.2.1.7.2 beschrieben mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert.

2.2.1 9 Amplifikation, Klonierung und Mutagenese von DNA

2.2.1.9.1 Polymerasekettenreaktion (PCR):

Die Amplifikation von bestimmten DNA-Fragmenten erfolgte durch die Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988). Dabei wurden zwei synthetische Oligonucleotide (MWG, Ebersberg, Interactiva, Ulm) eingesetzt, die antiparallel zueinander an einen komplementären DNA-Abschnitt binden können. Die Oligonucleotide wurden so ausgewählt, daß sie nach einer von Britten und Davidson, (Britten und Davidson, 1985), bzw. Anderson und Young, (Anderson und Young, 1985) veröffentlichten Formel die gleiche Schmelztemperatur hatten.

$$T_M = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 650/n \quad (n = \text{Anzahl der Nukleotide})$$

Standardreaktionen enthielten die zu amplifizierende DNA (100 ng/µl genomische DNA, 3,0 ng/µl Plasmid-DNA), dNTP (je 2,5 mM), die jeweiligen Primer (25 pmol/µl), MgCl₂-Lösung (25 mM), 0,5 U *Taq*-Polymerase (Gibco, Eggenstein) und die entsprechende Menge des 10fach-Puffers der vom Hersteller mitgelieferten *Taq*-Polymerase in 25 µl Gesamtvolumen. Die Reaktion wurden in PCR-Maschinen von Biometra bzw. Biozym durchgeführt. Das PCR-Protokoll umfaßte folgendes Programm, 3 min 94°C, um die DNA zu denaturieren, Denaturierung 0,5 min, Anlagerung an die Zielsequenz 1 min und Elongation bei 72°C 1 min/kb wurde 30–35 mal wiederholt. Die Anlagerungstemperatur wurde an die Schmelztemperatur des Primers angepasst und ca 2-5°C niedriger gewählt. Die Kettenverlängerungszeit richtete sich nach der Größe der zu amplifizierenden Sequenz und der benutzten Polymerase (1 min/1 kb). Anschließend wurden noch 5 min 72 °C beibehalten, um die PCR-Produkte möglichst vollständig mit A-Überhängen am 5'-Ende zu versehen. Zum Einführen von Mutation (Schnittstellen etc.) wurden Primer gewählt, die jeweils vor und hinter den Fehlbasenpaarungen noch mindestens 10 der Zielsequenz komplementäre Basen hatten. Optimale Reaktionsbedingungen (Anlagerungstemperatur, Magnesiumgehalt) wurden für die jeweiligen

Oligonukleotide ausgetestet. Die Amplifikationsprodukte wurde anschließend gelelektrophoretisch untersucht (2.2.1.5).

2.2.1.9.2 Klonierungstechniken

Restriktionsendonukleasen, T4-Ligasen und weitere für Klonierungen von DNA notwendige Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller oder nach Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) eingesetzt.

2.2.1.9.3 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit Polynukleotidkinase

Für die 5' Phosphorylierung von 3 nmol Oligonukleotiden wurden 200 mM ATP; 30 U Polynukleotidkinase und die entsprechende Menge an 10fach Puffer vermischt. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase bei 65°C für 15 min denaturiert, die DNA über Phenolextraktion (2.2.1.4.1) aufgereinigt und mit Isopropanol gefällt (2.2.1.4.3).

2.2.1.9.4 Ortsgerichtete Mutagenese mit Schnittstellenselektion

Zur Einführung von Mutationen wurde das ChameleonTM Double-Strand, Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Mit diesem Kit ist es möglich, zielgerichtet Basenaustausche vorzunehmen, ohne einzelsträngige DNA herstellen zu müssen. Die zu mutagenisierende DNA befindet sich auf einem Plasmid. Die DNA wird denaturiert und zum einen ein Oligonukleotid, das die veränderten Basen enthält, angelagert und ein zweites, das eine bestimmte Mutation in einer singuläre Schnittstelle des Plasmids (im Amp-Gen) trägt (Deng und Nickoloff, 1992). Voraussetzung ist, daß die Primer vorher phosphoryliert wurden (2.2.1.9.3), damit sie *in vitro* verlängert werden können und das doppelsträngige Plasmid wiederhergestellt werden kann. Wenn man davon ausgeht, das beide Primer mit derselben Wahrscheinlichkeit an das Plasmid binden, können durch eine Restriktionsbehandlung mit dem Enzym der singulären Schnittstelle alle Plasmide eliminiert werden, an die wahrscheinlich auch der Mutageneseprimer nicht gebunden hat. Die Plasmide werden in einen Stamm mit fehlender Mismatchreparatur transformiert (*XlmutS*), wo Plasmide sowohl mit der parentalen als auch mit der rekombinaten

Schnittstelle entstehen. Die Plasmide aus diesen Zellen werden isoliert und wieder mit dem Enzym der singulären Schnittstelle geschnitten, damit die Plasmide, an die auch der Mutageneseprimer nicht gebunden hat entfernt werden. Anschließend wird in einen herkömmlichen *E. coli* Stamm transformiert und die Transformanten auf die erwünschte Mutation hin untersucht. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach den Angaben der Hersteller mit den in Tabelle 2.1.7 aufgelisteten Selektions- und Mutationsprimern.

2.2.1.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Infrarot-markierten (IRD-40 oder IRD-800) Oligonukleotiden (MWG Biotech, Ebersberg) und dem Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Dazu wurde eine Stammlösung aus 0,2 – 0,5 µg DNA/kb mit 0,2 pmol Infrarotprimer auf ein Gesamtvolumen von 13 µl angesetzt. Nach GC-Gehalt der DNA wurden 0,1-1 % DMSO der Stammlösung beigemischt. Jeweils 3 µl der Lösung wurden zu 1 µl des Sequenase Mixes mit den jeweiligen ddNTP's zugegeben. Die Amplifikation der Abbruchprodukte wurde in einem PCR-Gerät mit folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 2 min, erste Schleife 20 s bei 90 °C, 20 s bei 60 °C, 30 s bei 70 °C (29x), zweite Schleife 20 s bei 95 °C, 30 s bei 70 °C (14x). Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit einem Polyacrylamidgelsystem (6 %T) (Biozym) aufgetrennt. Das Auswerten des Gels und das Lesen der Basenabfolge wurde mit einem automatischen Sequenzer (LI-COR 4000S, MWG Biotech) und dem Programm Image Analysis V4.00 durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Lasergene (DNASStar) bzw. mit dem Programm Vektor NTIviewer (Informax) bearbeitet.

2.2.2 Biochemische und analytische Methoden

2.2.2.1 Reinigung der F₄₂₀ reduzierenden und der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae*

Die Reinigung der Hydrogenase erfolgte nach einer von O. Sorgenfrei (Sorgenfrei et al., 1993) veränderten Methode. Alle säulenchromatographischen Arbeiten wurden an einer FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg oder Waters, Eschborn) in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratories, Ann Arbor, USA) unter Schutzgas 5 % H₂, 95 % N₂ durchgeführt.

2.2.2.1.1 Zellaufschluß und Zentrifugation:

Für eine Reinigung wurden 10 g Zellen (Nassgewicht) in 60 ml Tris-Puffer (50 mM pH 7,5) mit je 20 µM DNase I und RNase A für 15 min gerührt. Durch das Auftauen in dem gering salzhaltigen Puffer wurden die Zellen aufgeschlossen. Das Zellysate wurde anschließend 1 h bei 4°C und 100.000 x g zentrifugiert.

2.2.2.1.2 Anionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sepharose fast flow:

Die DEAE -Sepharose fast flow Säule (2,6 x 10 cm) wurde mit Tris-Puffer äquilibriert und der Überstand der Zentrifugation (Rohextrakt) wurde aufgetragen. Danach wurde die Säule mit 100 ml Trispuffer gewaschen und durch folgendem Stufengradienten mit NaCl-Puffer (2 M NaCl in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) eluiert: 100 ml 0,2 M NaCl (10 % NaCl-Puffer), 100 ml 0,25 M NaCl (17,5 %), 100 ml 0,3 M NaCl (15 %), 70 ml 0,35 M NaCl (17,5 %), 50 ml 0,4 M NaCl (20 %) und 60 ml 2 M NaCl (100 %). Anschließend wurde die Säule wieder mit Tris-Puffer gewaschen. Die Flußrate betrug 2 ml/min, die Elution der Proteine wurde mit einem UV-Detektor bei 280 nm aufgezeichnet.

2.2.2.1.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie an Phenyl Sepharose high performance fast flow:

Die aktiven Fraktionen der DEAE-Säule wurden mit Hilfe von hydrophobem Säulenmaterial, Phenyl Sepharose high performance fast flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), weiter

gereinigt. Dazu wurde eine XK 26/10 Leersäule mit 30 ml Säulenmaterial befüllt. Die Fraktionen der DEAE-Sepharose fast flow Säule, die Hydrogenase Aktivität enthielten (0,25 M NaCl) wurden vereinigt und mit einer 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (in Tris-Puffer) auf eine Konzentration von 0,8 M eingestellt. Die Säule wurde ebenfalls mit 0,8 M Ammoniumsulfat äquilibriert und die Fraktionen der DEAE-Sepharose aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 40 ml 0,8 M, danach mit 60 ml 0,6 M Ammoniumsulfatlösung gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem über 250 ml linear abfallenden Gradienten auf 0 M Ammoniumsulfat. Die Flußrate betrug 3 ml/min. Die Fraktionen der F_{420} nicht reduzierenden Hydrogenase eluierten bei ca. 0,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, die der F_{420} reduzierenden bei 0,12 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sie wurden mittels Ultrafiltration durch eine Omega Membran mit 30 kDa Ausschlussvolumen (Filtron, Karlstein) unter Eiskühlung bis auf ca. 5 ml ankonzentriert. Um die Salzkonzentration herabzusetzen wurden die Proben 6-fach mit Tris-Puffer verdünnt.

2.2.2.1.4 Anionenaustauschchromatographie mit starken Anionentauschern:

Die abschließende Reinigung wurde mit Anionenaustauschermaterial mit hoher Bindungskapazität durchgeführt. Für kleinere Proteinmengen wurde dazu eine Source Q PE 4,6/100 Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Nachdem die jeweiligen Hydrogenase-Fraktionen aufgetragen waren, wurde mit 10 ml Tris-Puffer gespült und mit 10 ml 0,25 M NaCl-Puffer gewaschen. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0,25-0,45 M NaCl-Puffer über 40 ml eluiert. Um möglichst sauberes Protein zu isolieren, wurden Fraktionen der einzelnen Proteinpeaks über manuelle Bedienung des Fraktionssammlers getrennt. Danach wurde mit 5 ml 2 M NaCl-Puffer und 10 ml 0 M NaCl-Puffer gewaschen. Alternativ wurde die Reinigung mit einer 6 ml Uno Q 6-Säule (BioRad, München) durchgeführt, um größere Mengen Protein auftrennen zu können. Die Säule wurde nach dem Auftragen der Proteinfractionen mit 20 ml 0,24 M NaCl-Puffer gewaschen und die Proteine mit einem linearen Gradienten von 0,24-0,48 M NaCl eluiert.

Die entsprechenden Fraktionen, die Hydrogenase-Aktivität zeigten, wurden in Centricon-30-Mikrokonzentratoren (Amicon, Witten) auf ca. 300 μl ankonzentriert. Die Enzymlösung wurde anschließend in 20 % DMSO haltigen Tris-Puffer aufgenommen und konnte so bis zu einer Woche ohne große Aktivitätsverluste bei 0°C gelagert werden.

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinmengenbestimmung wurde nach der Mikromethode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dazu wurden 0-10 µg Protein in Tris-Puffer gelöst und mit Bio-Rad Protein-Assay-Farbstoff-Reagenz (Bio-Rad, München) im Verhältnis 1:4 versetzt. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen (Ultrospec 1000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Eichung erfolgte mit Rinderserumalbumin V (BSA) in einem linearen Bereich von 0,2 bis 12 µg Protein. Die Proteinproben aus den Reinigungsschritten wurden bis in den entsprechenden Bereich verdünnt.

2.2.2.3 Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität mit Benzylviologen oder F₄₂₀ als Elektronenakzeptor

Der Test wurde in Glasküvetten aus optischem Spezialglas (Schichtdicke 1 cm, Volumen 1,5 ml), die mit einem Gummistopfen gasdicht verschlossen werden konnten, durchgeführt. Durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit H₂ wurden sie anaerobisiert. Das Begasen und Befüllen der Küvetten erfolgte über Kanülen (B. Braun, Melsungen) bzw. Mikroliterspritzen (Unimetrics). In die anaeroben Küvetten mit einer H₂-Atmosphäre von 120 kPa wurden 800 µl Testpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM Benzylviologen) vorgelegt. Die Aktivität wurde bei 37°C gemessen. Dazu wurden durch Zugabe von 0,1 M Natriumdithionit-Lösung reduzierende Bedingungen in der Küvette eingestellt (schwach blaue Farbe) und danach die Enzymlösung hinzugefügt. Die Reduktion des Benzylviologens (Anstieg der Extinktion) wurde bei 578 nm ($\epsilon_{578} = 8,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) aufgezeichnet.

Für den Test mit F₄₂₀ als Elektronenakzeptor wurde in die anaeroben und mit Wasserstoff begasten Küvetten 800 µl Trispuffer vorgelegt. Vor der Messung wurden 48 µM Cofaktor F₄₂₀ (5 µl einer 7,7 mM F₄₂₀-Lösung) zugegeben, so daß die Lösung leicht gelb wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzymlösung gestartet und die Reduktion von F₄₂₀ (Abnahme der Extinktion) wurde bei 405 nm ($\epsilon_{405} = 25,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) aufgezeichnet.

Die Einheit der Aktivität ist definiert als die Oxidation von 1 µmol H₂ pro min

Die Aktivität wurde wie folgt bestimmt:

$$U/\text{ml} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{\text{Vol(Küvette)}}{\epsilon \cdot \text{Vol(Probe)}} \cdot \frac{\text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Schichtdicke (1cm)}}$$

$$\epsilon_{578} (\text{Benzylviologen}) = 8,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{405} (\text{F}_{420}) = 25,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$\Delta E/\Delta t$ = Steigung im linearen Anfangsbereich der Messung pro Zeiteinheit

2.2.2.4 Präparation von EPR- und IR-Proben

Die Vorbereitung der EPR-Proben erfolgte im Anaerobenzelt unter reduzierenden Bedingungen (1-3 % H₂). Nach der Reinigung wurden die Fraktionen auf ca. 300 μl zu einer Konzentration von ca. 50-100 μM ankonzentriert und mit 20 % DMSO (2.2.2.2.1.4) und in Quarzröhrchen (4 mm Außendurchmesser) abgefüllt. Nach dem Ausschleusen wurden die Proben sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und gelagert. Für die Herstellung von IR-Proben wurde gereinigtes Enzym wie für die EPR-Proben auf eine Endkonzentration von 50 – 100 μM gebracht. Hierbei wurde auf Zusatz von 20 % DMSO als Stabilisierungsmittel verzichtet, um mögliche Störungen bei den Messungen zu vermeiden. Die Proben wurden mit Microcon 30 (Amicon) Mikrokonzentratoren mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa auf 100 μl eingengt. Die Proben wurden anaerob in Glasröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.2.4.1 Redoxtitration der [FeS]-Zentren:

Die Redoxtitration wurde in einem Anaerobenzelt mit einer reinen N₂-Atmosphäre durchgeführt, um Einflüsse, die H₂ auf das Redoxpotential haben könnte, zu vermeiden. Um das mittlere Redoxpotential eines Redoxzentrums, in diesem Fall der [FeS]-Zentren zu bestimmen, muss die Enzymlösung mit Redoxmediatoren versetzt werden. Redoxmediatoren sind meist Farbstoffe mit einem definierten Redoxpotential. Sie vermitteln den Redoxzustand z.B. eines [FeS]-Zentrums, das meist in eine Proteinstruktur eingebunden ist, mit dem umgebenden Lösungsmittel. Mit einer Referenzelektrode Ag/AgCl gegen 3 M KCl kann dann das Redoxpotential gemessen werden. Für die Redoxpotentialbestimmung des [3Fe-4S] Clusters wurde die EPR-Probe 1:8 mit 50 mM HEPES pH 7,5 verdünnt und folgende Mediatoren zu einer Endkonzentration von 5 μM zugegeben: 2,6-Dichlorphenolindophenol, Thionin, Menadion, Indigo-Disulphonate, 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinon, Anthraquinone-1,5-Disulphonate Anthraquinone-2-Sulphonate und Safranin. Die Redoxpotentiale wurden stufenweise mit einer 10 mM bzw. einer 100 mM K₃(Fe(CN)₆)-Lösung und einer 1 mM bzw. 10 mM Dithionit-Lösung eingestellt. Dabei wurde

die Probe mit Ferricyanid auf ein Redoxpotential von 230 mV eingestellt und in ca. 50 mV Schritten mit Dithionit-Lösung reduziert (+230 mV, +70 mV, +20 mV, -50 mV, -90 mV, -160 mV, -350 mV). Nachdem sich ein stabiles Redoxpotential eingestellt hatte, wurde eine Probe von 200 µl entnommen, in ein EPR-Röhrchen gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden EPR-spektroskopisch untersucht (2.2.2.5) und die Signalintensität der [Fe-S] Cluster über die Bildung der doppelten Integrale über die Peak-Flächen ermittelt. Die Signalstärke wurde gegen das jeweilige Redoxpotential aufgetragen. Durch eine sigmoide Simulation der Messkurve läßt sich am Wendepunkt der Kurve das mittlere Redoxpotential bestimmen.

2.2.2.5. EPR-Spektroskopie

EPR-Proben wurden an dem EPR-Gerät Bruker ECS 106 EPR (Bruker, Rheinstetten) im X-Band (9 GHz) aufgenommen. Das angelegte Magnetfeld wurde mit einer Frequenz von 100 kHz moduliert und mit einer AEG Magnetfeld-Kontrolleinheit kalibriert. Die Frequenz wurde mit einem HP 5350B Mikrowellenfrequenzzähler gemessen. Die Kühlung erfolgte mit einem Oxford Instruments ESTR-900 Helium gekühlten Kryostaten mit einer ITC-4 Temperatur-Kontrolle. Um Licht-Spektren der jeweiligen Proben aufzunehmen wurden die EPR-Röhrchen in einem Fingerdewar unter Kühlung mit flüssigen N₂ für wenige Minuten mit einer Osram 200 W Lampe bestrahlt. Um Dunkelspektren der Proben zu erhalten wurden die EPR-Röhrchen bei 200 K in einem Ethanol/Trockeneis Gemisch für 30 min im Dunkeln gehalten. Die Messung erfolgte unter Ausschluß jeder möglichen Lichtquelle.

2.2.2.6 FT-IR Spektroskopie

Die FT-IR Spektroskopie wurde am E.C. Slater Institut, Amsterdam, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Albracht in Zusammenarbeit mit Boris Bleijlevens durchgeführt.

Für die Messungen wurden EPR-Proben mit einer Konzentration von 10-20 µM unter einer Argon-Atmosphäre mit 1 % H₂ aufgetaut. Die Probe wurde anaerob in eine gasdichte FT-IR-Zelle überführt, die zuvor mit Argon gespült wurde. Die Zelle bestand aus CaF₂ Platten mit einem 50 µM dicken Teflon-Spacer. Die Messungen wurden an einem Bio-Rad FTS 60A IR-Spektrometer mit einem MCT Detektor durchgeführt. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur

mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen und sind Mittelwerte aus 1500-3000 Aufnahmen. Da Wasserdampf bei den Messungen stören kann, wurde eine Referenzprobe von 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen, die als Hintergrundspektrum abgezogen wurde. Der Abgleich der Basis-Linie wurde mit dem multi-point-Programm (Bio-Rad, München) durchgeführt.

2.2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung der Proteine gemäß ihrer Masse erfolgte nach einer Methode von Laemmli (Laemmli, 1975) in einer vertikalen Gelapparatur (Mini-Protean II, Bio-Rad, München). Die verwendete Acrylamidlösung wurde in Form einer 30 %-igen (w/v) wässrigen Lösung eingesetzt. Das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid betrug jeweils 37,5:1. Das Trenngel setzte sich aus 8-15 % (w/v) Acrylamidlösung, 375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS zusammen. Die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,001 % (v/v) TEMED und 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat. Das Trenngel wurde bis zur gewünschten Höhe in die Apparatur gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel setzte sich aus 4 % (w/v) Acrylamid und 125 mM Tris-HCl pH 6,8 zusammen. Die Polymerisation erfolgte wie beim Trenngel. Die Proben wurden direkt im gleichen Volumen Probenpuffer aufgenommen, 5 min aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Elektrodenpuffer bei einer konstanter Stromstärke von 25 mA. Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel 20-30 min in Färber geschwenkt, anschließend wurde der Hintergrund mit Entfärber freigewaschen.

Als Protein-Massenstandard wurde ein Molekularmassenstandard der Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg (1) bzw. NEB, Bad Schwalbach (2) eingesetzt:

Molekulare Massen der Marker-Proteine in kDa:

(1): 94 / 67 / 43 / 30 / 20,1 / 14,4

(2): 175 / 83 / 62 / 47,5 / 32,5 / 25 / 16,5 / 6,5

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Probenpuffer: 62,25 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerin, 10 % (w/v) DTT, 2 % (w/v) SDS, 0,8 % (w/v) Bromphenolblau

Färber:	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,05 % Croscein Scarlet, 0,8 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 10 % (v/v) Eisessig, 25 % (v/v) Isopropanol
Entfärber:	7 % (v/v) Eisessig, 12 (v/v) Isopropanol, 0,5 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

2.2.2.8 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western-Blot) oder auf PVDF-Membran

Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose erfolgte direkt nach der Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.2.2.2.6) durch das Halbtrockenblotverfahren (Kyhse-Anderson, 1984). Für den Transfer in einer Semi-Dry Blot Apparatur (BioRad, München) wurden die benötigten Filterpapiere (Whatman-3-MM Filterpapier) auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten. Es wurden vier Filterpapiere in Blotpuffer getränkt und auf die Graphitanode gelegt. Darauf wurden die im Blotpuffer befeuchtete Nitrocellulose und das Gel gelegt. Zum Abschluß wurden vier in Blotpuffer getränkte Filterpapiere auf das Gel gelegt und letzte Luftblasen mit einem Glasstab entfernt. Die Apparatur wurde dann mit der Kathodenplatte verschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0.8 mA/cm^2 für 60-90 min. Die auf die Nitrocellulose übertragenen Proteine wurden mit Tinte angefärbt. Die Proteinfärbung mit Tinte dient zur Kontrolle der Vollständigkeit des Proteintransfers auf die Nitrocellulose und zur Abschätzung der Proteinmenge. Sie ist reversibel und wurde in einer modifizierten Form nach Hancock und Tsang (Hancock und Tsang, 1983) durchgeführt. Nach dem Blotvorgang wurde die Nitrocellulose 15 min in der Tintenlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Proteinfärbung dokumentiert und der Größenmarker markiert. Die Nitrocellulose wurde dann 1 min in Entfärbelösung geschwenkt und immundetektiert (2.2.2.2.8).

Blotpuffer:	25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol
Tinte:	0.1 % (v/v) Tinte, (4001 Königsblau, Fa. Pelikan) 1 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 0.2 M NaOH

Zum Ansequenzieren von Protein-Untereinheiten wurden die Gele auf PVDF-Membran (ProBlott Membran, Applied Biosystems, Weiterstadt) transferiert. Die Übertragung der Proteine erfolgte auf die gleiche Weise, die Membran wurde zuvor mit 100 % Methanol angefeuchtet. Die Anfärbung erfolgte anschließend in einer Lösung aus 0,1 % Coomassie Brilliantblau R250, 40 % Methanol und 1 % Essigsäure. Der Hintergrund wurde mit 50 % Methanol freigewaschen und die entsprechende Proteinbande ausgeschnitten. Danach wurden die Streifen in großem Volumen dest. Wasser gewaschen und getrocknet. Die auf PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden im Labor von Roland Schmidt, Universität Osnabrück, ansequenziert.

2.2.2.9 Immunanfärbungen

Die spezifische Proteindetektion erfolgte mit polyklonalen, gegen die große Untereinheit der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase VhuA gerichteten Antiseren aus Kaninchen. Die Nitrocellulose mit den transferierten Proteinen wurde zunächst mit Block-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose 90 min in einer Verdünnung des VhuA Antiserums (1:4000 in TBS-T) geschwenkt. Die Nitrocellulose wurde dann viermal je 15 min mit TBS-T gewaschen.

TBS: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl

TBS-T: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20

Block-Puffer : 5 % (w/v) Milchpulver (fettfrei) in TBS-T

2.2.2.9.1. Immunanfärbung mit alkalischer Phosphatase

Nach dem primären Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der gegen Kaninchen IgG gerichtet und mit alkalischer Phosphatase konjugiert war (BioRad, München). Die Nitrocellulose wurde 1 h in einer Verdünnung des zweiten Antikörper (1:3000 in TBS-T) geschwenkt und anschließend viermal mit TBS-T für je 15 min gewaschen. Im Anschluß wurde die Nitrocellulose kurz in Färbepuffer geschwenkt, mit Färbereagenz bis zur gewünschten

Stärke gefärbt und dann abgestoppt.

Färbepuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

Färbereagenz: 66 µl 10 % NBT in 70 % DMF, 33 µl 5 % BCIP in DMF
(Promega) in 10 ml Färbepuffer

Stopp-Lösung: 1 % NaN₃ in 10 ml Färbepuffer

2.2.2.9.2 Immunanfärbung mit Meerrettich-Peroxidase

Bei dieser Methode wurde die Membran nach der Inkubation der Nitrocellulose mit dem Primärantikörper mit einem Sekundärantikörper-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat gegen Kaninchen IgG behandelt. Die Inkubation erfolgte in einer 1:1000 Verdünnung des Sekundärantikörpers für 90 min. Die Membran wurde anschließend viermal für je 15 min in TBS-T gewaschen. Die Anfärbung erfolgte mit dem ECLTM-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der fusionierten großen Untereinheit VhuF der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus *M.voltae*

3.1.1 Reinigung und biochemische Charakterisierung der VhuF Hydrogenase

Die Fusionsuntereinheit VhuF wurde im Rahmen der Dissertation von Matthias Pfeiffer (Pfeiffer, 1998) hergestellt. Durch die Fusion der großen Untereinheit VhuA mit der kleinen Untereinheit VhuU sollte deren Einfluß auf die Regulation der Promotoren *Pfrc* und *Pvhc* der selenfreien Hydrogenasen gezeigt werden (1.3). Mit Reporterexperimenten in Stämmen mit fusionierter Untereinheit konnte jedoch kein Einfluß auf die Expression der selenfreien Hydrogenasen festgestellt werden. Um die Frage zu klären, welche biochemischen Konsequenzen und welche biologische Bedeutung die Tatsache hat, daß die kleine Untereinheit VhuU unabhängig von der großen Untereinheit VhuA exprimiert wird, wurden weitere biochemische Untersuchungen vorgenommen. Die Fusionsmutante wurde wie unter 2.2.1 beschrieben gereinigt. Das Reinigungsprofil unterschied sich nicht wesentlich von dem der Wildtyp-Hydrogenase Vhu. Die Wildtyp-Hydrogenase eluierte von der hydrophoben Säule bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 640 mM und die Mutante bei 500 mM. Die Elution von der Resource Q-Säule erfolgte bei 220 mM NaCl für den Wildtyp und für die Mutante. Die Reinigung ist in Tab.3.1.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1.1: Reinigung der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase VhuF aus dem Mutantenstamm, der das aus VhuA und VhuU fusionierte Genprodukt VhuF enthält.

Fraktion	Volumen (ml)	Aktivität (U/ml) ¹⁾ BV	Protein (mg/ml)	spez. Aktivität ¹⁾ (U/mg) BV
Zellextrakt	100	8184	7,7	- ²⁾
DEAE-Sepharose	48	4734	1,5	- ²⁾
Phenyl-Sepharose fast flow	32	2092	0,56	3740
Uno Q	3	2646	0,12	21 000

¹⁾ Der Wasserstoffverbrauch mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor (BV) ist in 1U = 1 $\mu\text{mol H}_2/\text{min}$ angegeben.
²⁾ Aufgrund unvollständiger Trennung der Hydrogenasen während dieser Reinigungsschritte konnten keine Angaben über die Aktivität gemacht werden.

Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Untereinheiten der gereinigten Mutante mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.7). Die große Untereinheit der Fusionsmutante zeigte dabei eine deutlich größere apparente Masse von ca. 48 kDa als die große Untereinheit VhuA des Wildtyps (Abb. 3.1.1). Durch Westernblot-Analyse (Abb.3.1.1) mit Antikörpern gegen die große Untereinheit konnte der Größenunterschied zu VhuA verdeutlicht werden.

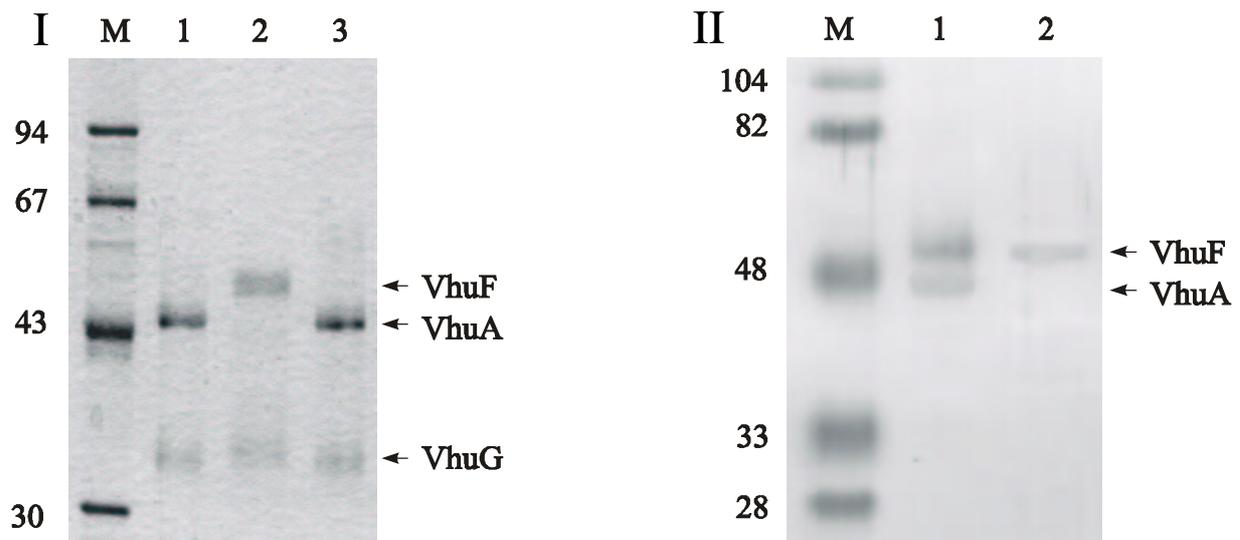


Abb.3.1.1: SDS-PAGE der Reinigung der VhuF Mutante (I) und immunologische Detektion (II).

(I) Gelelektrophoretische Auftrennung der Fusionsmutante. Spur (1) und (3) zeigen zur Kontrolle gereinigte Fraktion der F_{420} reduzierenden Hydrogenase aus Wildtyp, Spur (2) zeigt die Mutante VhuF, (M) Größenmarker in kDa. (II) Immunologische Detektion der großen Untereinheit der Hydrogenasen mit α -VhuA Antikörpern. Spur (1) zeigt eine 1:1 Mischung aus Vhu und VhuF Hydrogenase, Spur (2) zeigt Wildtyp Hydrogenase. Die Immunanfärbung erfolgte mit einem Sekundärantikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt war.

Die Mutante wurde weiterhin auf ihre katalytischen Eigenschaften untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Neben der Bestimmung des k_{kat} , wurden die Michaelis-Menten Kinetiken für H_2 als Substrat und der apparente K_I für CO als kompetitiven Inhibitor ermittelt (Cleland, 1970) (Tab.3.1.2).

Tabelle 3.1.2: Katalytische Konstanten der Fusionsmutante VhuF und des Wildtyp Enzyms Vhu

Enzym	Spez. Aktivität (U/mg) ¹⁾	$k_{\text{kat}}(\text{s}^{-1})$	$K_M H_2(\mu\text{M})$	$K_I CO (\mu\text{M})$
VhuF	21 000	2.9×10^4	25	2.4
Vhu	22 545	3.1×10^4	2.7	0.2

¹⁾Der H_2 Verbrauch wurde mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor gemessen
 1U = $1 \mu\text{mol } H_2/\text{min}$. K_I wurde für CO als kompetitiven Inhibitor gemessen

Dabei zeigte sich, daß sich die spezifischen Aktivitäten und damit auch k_{kat} nicht wesentlich

unterschieden. Die kinetischen Messungen zeigten, daß sich der $K_M(\text{H}_2)$ der Mutante zu Ungunsten des Enzyms um das ca. 10fache erhöht hat. Dieselbe Erhöhung wird auch bei dem K_I -Wert für CO gefunden.

3.1.2 EPR-spektroskopische Eigenschaften der VhuF Hydrogenase

Um festzustellen, ob die Fusion einen Einfluss auf das aktive [NiFe]-Zentrum der Hydrogenase genommen hat, wurde die gereinigte Hydrogenase EPR-spektroskopisch untersucht. Abb.3.1.2 zeigt die Spektren der dunkel adaptierten Proben der Wildtyp-Hydrogenasen (A) und (C) und der Mutante (B). Bei niedrigen Feldstärken sind die g_x und g_y -Werte bei $g = 2,21$ und $g = 2,15$ des rhombischen Ni-C Signals zu sehen. Der g_z -Wert wird durch Radikalsignale bei $g = 2$ überlagert. Das Auftreten von Radikalsignalen hängt von der jeweiligen Präparation und der Konzentration mitgereinigter Flavine (FAD) ab, die im Bereich $g = 2$ im reduzierten Zustand stark absorbieren. Die F_{420} reduzierende Hydrogenase zeigt das Radikalsignal aufgrund der FAD-haltigen dritten Untereinheit im reduzierten Zustand immer (Abb. 3.1.2 (C)).

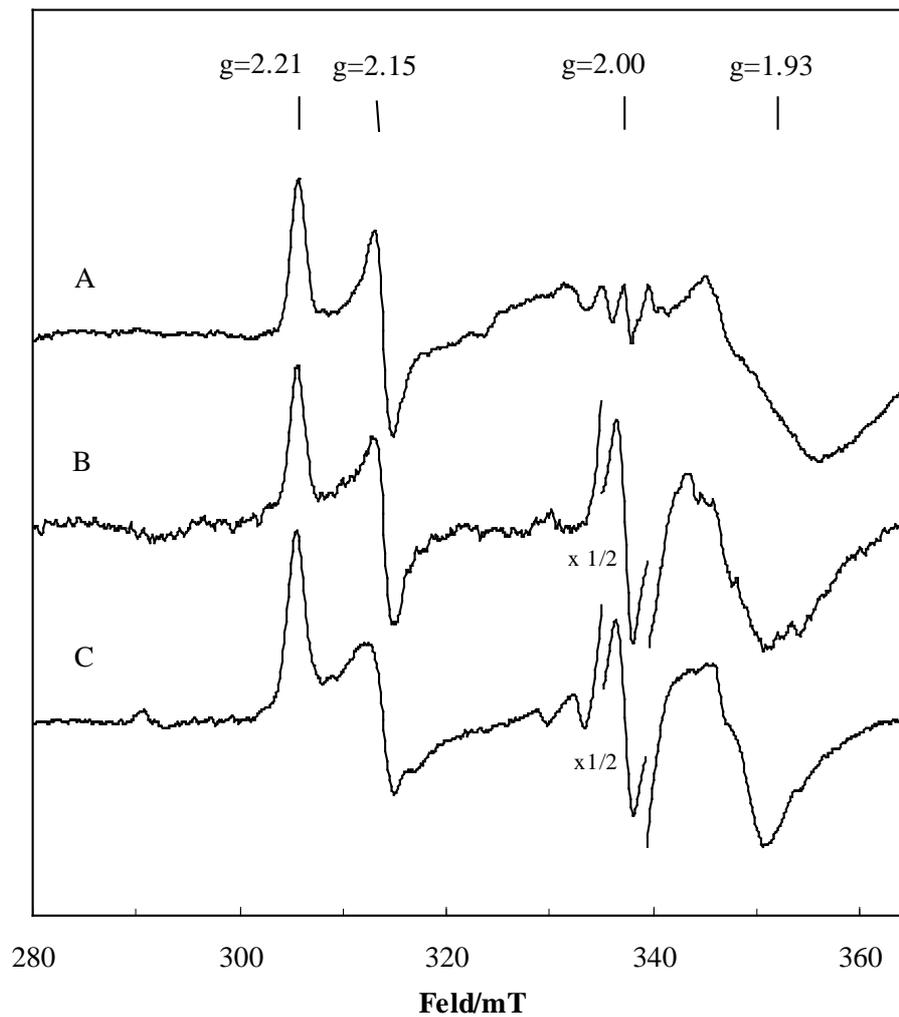


Abb. 3.1.2: EPR-Spektren der Hydrogenasen aus Wildtypzellen (Fru, Vhu) und der Mutante VhuF. Dargestellt sind die Ni-C Spektren der dunkel adaptierten gereinigten Wildtyp Hydrogenasen: (A) F_{420} nicht reduzierende Hydrogenase, Vhu (C) F_{420} reduzierende Hydrogenase, Fru, und der gereinigten Fusionsmutante VhuF (B). Das Radikalsignal in Spektrum (B) und (C) ist jeweils um die Hälfte verkleinert.

Um das g_z -Signal sichtbar zu machen, kann man die Eigenschaft der Hydrogenasen nutzen, unter Bestrahlung mit weißem Licht ein anderes Absorptionsverhalten zu zeigen. Die Veränderungen während der Bestrahlung wirken sich nur auf das Ni-Signal aus, während die Radikal- und [Fe-S]-Signale unbeeinflusst bleiben. Die Probe wurde deshalb unter Kühlung mit flüssigem N_2 5 min mit weißem Licht bestrahlt und das EPR-Spektrum aufgenommen. Durch Bildung von Differenzspektren ist es deshalb möglich, deren Beitrag am Spektrum auszuschließen und nur das durch das freie Elektron des Nickels hervorgerufene Spektrum zu betrachten. Abb.3.1.3 zeigt die Differenzspektren der Hydrogenasen, deren dunkel adaptierte Ni-C Signale in Abb.3.1.2 zu sehen sind.

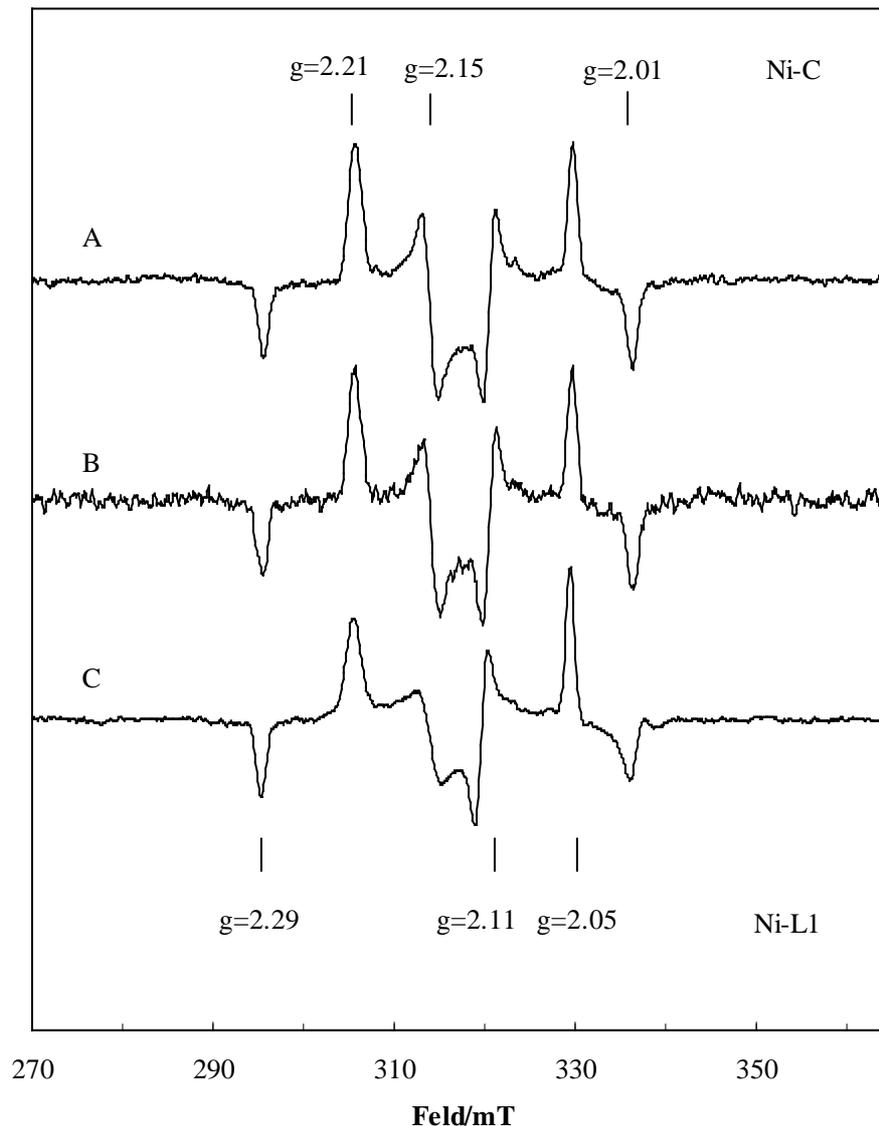


Abb.3.1.3: Differenzspektren der Ni-C – Ni-L Signale

Die g-Werte der jeweiligen Signale Ni-C und Ni-L sind im Spektrum angegeben. (A) F_{420} reduzierende Hydrogenase, Vhu aus Wildtypzellen, (B) Fusionsmutante der F_{420} reduzierenden Hydrogenase, VhuF, (C) F_{420} nicht reduzierende Hydrogenase, Fru.

Im Spektrum sind die jeweiligen g-Werte des dunkel adaptierten Ni-C Signals bei $g_x = 2,21$, $g_y = 2,15$ und $g_z = 2,01$ und des Licht-Signals, Ni-L, bei $g_z = 2,28$, $g_y = 2,11$ und $g_x = 2,05$ markiert.

Anhand der Vergleiche der g-Werte und der Struktur der Signale, konnte kein Unterschied zwischen der Hydrogenase VhuF aus der Mutante und den Wildtyp-Hydrogenasen Vhu und Fru festgestellt werden.

3.1.3 FT-IR-spektroskopische Messung der VhuF-Hydrogenase

Eine weitere Möglichkeit das aktive Zentrum zu untersuchen, besteht mit der FT-IR-Spektroskopie. Hiermit können die Schwingungsfrequenzen der nicht Protein-gebundenen CO und CN⁻-Liganden am Fe-Atom im aktiven Zentrum gemessen werden (Happe et al., 1997), (Pierik et al., 1998b). Hydrogenasen zeigen in einem Wellenzahlenbereich von 2100-1800 cm⁻¹ charakteristische Absorptionen, die nicht von den restlichen Signalen des Proteins überlagert werden. Sie sind somit detektierbar, zeigen aber je nach Hydrogenase und Organismus unterschiedliche Schwingungsfrequenzen für die jeweiligen Liganden (Tab. 3.1.3.).

Unterschiede zwischen den Hydrogenasen aus der Fusionsmutante, VhuF, und dem Wildtyp, Vhu, könnten sich in unterschiedlichen Verschiebungen der Absorptionsbanden zeigen und so einen Hinweis auf Veränderungen im aktiven Zentrum geben.

Die FT-IR-Spektroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Simon Albracht am E.C. Slater Institut in Amsterdam unter der Anleitung von Boris Bleijlevens durchgeführt. Dazu wurden Proben im Ni-C Zustand EPR-spektroskopisch überprüft und anschließend bei Raumtemperatur das IR-Spektrum aufgenommen (2.2.2.6). Nach der Basislinien-Korrektur und Subtraktion des Wasserspektrums wurde für die F₄₂₀ nicht reduzierende Hydrogenase folgendes Spektrum erhalten (Abb. 3.4.2). Die Schwingungsfrequenzen, bei denen die Absorption der CN⁻ und CO Liganden erfolgte und Vergleichswerte anderer Hydrogenasen im Ni-C-Zustand, sind in Tab. 3.1.3 zusammengefasst.

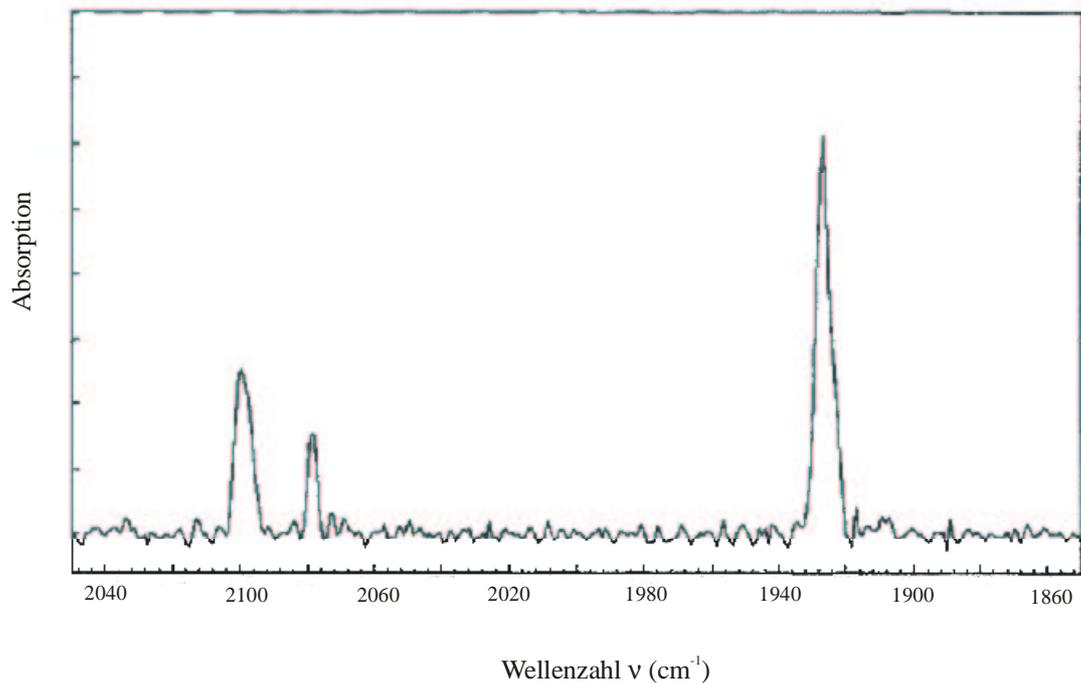


Abb. 3.1.4: FT-IR Spektrum der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae*.

Das Spektrum wurde von gereinigtem Enzym im dunkel adaptierten Zustand, Ni-C, bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Schwingungsfrequenzen für die Absorption der CN⁻ Liganden liegen bei 2099 cm⁻¹ und 2078 cm⁻¹, CO absorbiert bei einer Schwingungsfrequenz von 1927 cm⁻¹. Das Spektrum zeigt einen Durchschnitt von 1500 Aufnahmen.

Das Spektrum zeigt deutlich drei unterschiedliche Banden, die den Valenzschwingungen der Fe-Liganden zugeordnet werden können (Pierik et al., 1999). Die CO-Schwingung liegt im Bereich niedrigerer Wellenzahlen bei 1927 cm⁻¹. Die Valenzschwingungen der CN⁻ Liganden liegen bei 2099 cm⁻¹ und 2078 cm⁻¹. Die beiden Banden kommen dadurch zustande, daß die Liganden symmetrisch und asymmetrisch gegeneinander Schwingen können. Die Absorption der symmetrischen Valenzschwingungen liegt bei etwas höheren Wellenzahlen, 2099 cm⁻¹, die asymmetrische bei 2078 cm⁻¹. Für das Enzym VhuF aus der Mutante wurde ein Spektrum mit gleichen Schwingungsfrequenzen erhalten.

Tab. 3.1.3: Vergleich von Valenzschwingungen der CO und CN⁻-Liganden verschiedener Hydrogenasen mit den in *M. voltae* untersuchten Hydrogenasen im Ni-C Zustand (Pierik et al., 1999).

Hydrogenase	Valenzschwingungen (cm ⁻¹)	
	CO	CN ⁻
<i>M. voltae</i> Vhu	1927	2099/2078
<i>M. voltae</i> VhuF	1927	2101/2080
<i>C. vinosum</i>	1950	2078/2074
<i>D. gigas</i>	1940	2073/2060
<i>A. eutrophus</i> RH	1962	2084/2072

Die Absorptionen der CO- und CN⁻-Liganden der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus dem Wildtyp und der Mutante liegen bei nahezu gleichen Werten. Die Intensitätsverhältnisse der Signale (ca. 1:2) entsprechen denen, die auch bei anderen Hydrogenasen gefunden wurden (Pierik et al., 1998a), (Pierik et al., 1999). Die Schwingungsfrequenz des CO-Liganden sind zu etwas niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Eine Ausnahme ist der große Abstand zwischen den Valenzschwingungen der CN⁻-Liganden. Er beträgt normalerweise ca. 10 cm⁻¹, liegt aber bei den Hydrogenasen aus *M. voltae* bei 21 cm⁻¹.

3.2 Untersuchung der Hydrogenasen aus selenfrei gewachsenen Zellen

3.2.1 Fermentation von *M. voltae* in selenfreiem Medium

Für die Reinigung der selenfreien Hydrogenasen Frc und Vhc aus *M. voltae* wurden die Zellen in 10 l Fermentern in selenfreiem Medium angezogen, um eine größere Zellmasse zu erhalten. Selenfreie Zellen wuchsen im 10 l Maßstab deutlich langsamer als in 100 ml Serumflaschen. Während die Zellen in 100 ml Serumflaschen ca. 48 h benötigten, um die stationäre Phase zu erreichen wuchsen sie im 10 l Maßstab ca. 110 h bis zur stationären Phase. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wurde die Mischgaszufuhr von 0,185 l/min bei Vollmedium auf 0,44 l/min erhöht. Die Histidinkonzentration wurde um 10 % und die Eisensulfatkonzentration wurde um 20 % erhöht. Der Selengehalt dieses Mediums wurde zudem noch über Atomabsorptionsspektroskopie (Atomabsorptionsspektrophotometer Perkin Elmer Zeeman/3030) untersucht. Dazu wurde Medium in verschiedenen Verdünnungen (1:10 bis 1:10 000) auf einer Graphitröhre verdampft und die Absorption bestimmt. Der Selengehalt lag jedesmal unter der Nachweisgrenze von 0,001 µg/ml (29 nM). Um die lange Anlauf-Phase bis zum Anwachsen der Zellen zu verringern, wurden die Fermenter mit 1 l Vorkultur angeimpft statt 0,3-0,5 l bei selenhaltigem Medium. Trotzdem wurde in selenfreiem Medium nur eine OD₅₇₈ von maximal 1,1 erreicht im Gegensatz zu 3,2 bei selenhaltigem Medium. Die Wachstumszeit ließ sich nur unwesentlich von 120 auf 100 h reduzieren.

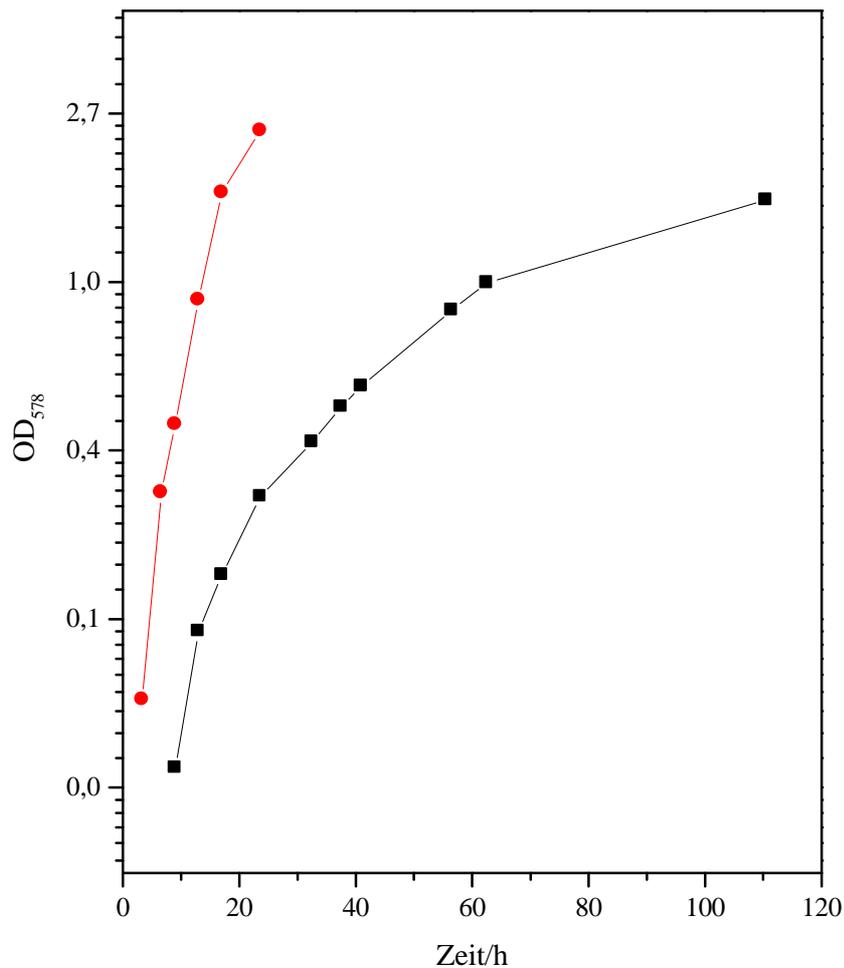


Abb. 3.2.1: Wachstumskurven von *M. voltae* in 10 l Fermentern.

Die Wachstumskurve der selenfrei gewachsenen Zellen ist durch Quadrate gekennzeichnet, die der in selenhaltigen Medium gewachsenen Zellen durch Kreise.

Die Reinigung der Hydrogenasen erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Dabei wurde eine Fraktion erhalten, die Benzylviologen reduzierende Eigenschaften hatte. Fraktionen mit F₄₂₀ reduzierender Aktivität wurden nicht gefunden. Die spezifische Aktivität der Benzylviologen reduzierenden Fraktion betrug 42 U/mg. Die Auftrennung mit SDS-PAGE (2.2.2.7) zeigte zwei Banden mit den apparenten Massen von 48 kDa und 33 kDa. Dies würde zu den berechneten Größen der großen und kleinen Untereinheit der Vhc-Hydrogenase mit jeweils 50 kDa und 33,5 kDa passen. Die entsprechende Bande der großen Untereinheit wurde auf PVDF-Membran übertragen und über Edman-Abbau ansequenziert (R. Schmidt, Universität Osnabrück). Dabei stellte sich jedoch heraus, daß es sich um die große Untereinheit der Vhu-Hydrogenase handelt. Entsprechend zeigte auch ein Western-Blot mit anti-VhuA Antikörpern eine Anfärbung der entsprechenden Bande, allerdings nur bei gereinigten Fraktionen. Im Zellextrakt und Fraktionen der DEAE-Sepharose war die Konzentration zu gering, um das Protein detektieren zu können.

3.3 Untersuchungen zum Elektronentransport in der kleinen Untereinheit der F_{420} reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae*

3.3.1 Ortsgerichtete Mutagenese zur Umwandlung des zentralen [4Fe-4S] Clusters in einen [3Fe-4S] Cluster

Wie in Kap. 1.5 erwähnt verläuft der Elektronentransport in Hydrogenasen vom aktiven Zentrum zu den natürlichen Akzeptoren wie Cytochromen oder F_{420} über die [Fe-S] Cluster der kleinen Untereinheit. Aus Kristallstrukturen gereinigter [NiFe]- und [NiFeSe] Hydrogenasen kann man erkennen, daß sie entlang einer Linie hintereinander angeordnet sind. Bei [NiFe] Hydrogenasen handelt es sich dabei in der Regel um einen proximalen [4Fe-4S] Cluster in nächster Nähe zum aktiven Zentrum gefolgt von einem [3Fe-4S] Cluster und einem distalen [4Fe-4S] Cluster. [NiFeSe] Hydrogenasen enthalten in der Regel drei [4Fe-4S] Cluster, was anhand von Sequenzvergleichen auch für die selenhaltigen Hydrogenasen aus *M. voltae* zutrifft. Wenn der Elektronentransport direkt über die Cluster verläuft, sollte man vermuten, daß die Elektronen einem kontinuierlich ansteigenden Redoxpotential folgen, ähnlich wie in der mitochondrialen Elektronentransportkette. Bei der Hydrogenase aus *D. gigas* wurde für den proximalen Cluster ein Standardreduktionspotential von -340 mV, für den zentralen Cluster -70 mV und für den distalen ein Standardreduktionspotential von -290 mV ermittelt. Der Übergang vom mittleren Cluster auf den distalen Cluster wäre ein thermodynamisch ungünstiger, endogener Schritt. Hierbei stellte sich die Frage inwieweit dieser Cluster daher am Elektronentransport beteiligt ist. Um dies im Fall der F_{420} reduzierenden Hydrogenase zu klären, deren natürlicher Elektronenakzeptor im Gegensatz zur Vhu Hydrogenase zur Verfügung steht, sollte der zentrale [4Fe-4S] Cluster durch ortsgerechte Mutagenese gegen einen [3Fe-4S] Cluster ausgetauscht werden.

Um die Cystein-Reste zu identifizieren, die mögliche Liganden des zentralen [4Fe-4S] Clusters sein können wurde die Sequenz von Fru mit Sequenzen bereits kristallisierter Hydrogenasen aus *D. gigas*, *D. fructosovorans* und der [NiFeSe] Hydrogenase aus *D. baculatum* sowie der [NiFeSe] Hydrogenase aus *M. jannaschii* und der homologen Vhu Hydrogenase verglichen.

[NiFe]	<i>D. gigas</i>	227	N CP KQ-LFNQVN WP VQAGHP C IA- CS	250
[NiFe]	<i>D. fructosovorans</i>	226	N C PLV-LFNQVN WP VQAGHP C LG- CS	249
[NiFeSe]	<i>D. baculatum</i>	245	D CA KRRW NG IN WC VENAV- C IG- CV	268
[NiFeSe]	<i>M. jannaschii</i>	196	L D GRPN V L KEL -- CI K C GA- CS VQ C P	218
[NiFeSe]	<i>M. voltae</i> Vhu	223	G C GAL----- C PSAG V P C RG- C Y	239
[NiFeSe]	<i>M. voltae</i> Fru	194	E C GRPAIDKEI-- CI K C GA- CS VQ C P	216
[NiFeSe]	<i>M. voltae</i> Fru*	194	E A GRPAIDKEI-- PI K C GA- CS VQ C P	216

Abb. 3.3.1: Sequenzvergleich der Liganden des zentralen [Fe-S] Clusters aus verschiedenen Hydrogenasen.

Der Sequenzvergleich zeigt den N-terminalen Ausschnitt der Sequenzen der kleinen Untereinheiten. Die konservierten Cysteinliganden und die entsprechenden Prolinreste der [3Fe-4S] Cluster der [NiFe] Hydrogenasen sind jeweils fett hervorgehoben und grau hinterlegt. Dasselbe gilt für die Cystein Liganden der [4Fe-4S] Cluster der [NiFeSe] Hydrogenasen. In der letzten Reihe ist die mutierte Sequenz der Fru Hydrogenase dargestellt, die ausgetauschten Liganden sind kursiv dargestellt.

Der Sequenzvergleich (Abb.3.3.1) zeigt, daß im Bereich der Liganden des zentralen Clusters fünf mögliche Cysteine in Frage kommen könnten. Die Cystein-Reste 195, 205, 211 und 215 entsprechen der Consensus-Sequenz der [Fe-S]-Liganden anderer Hydrogenasen. Wenn man allerdings den Cystein-Rest 208 mit in Betracht zieht, würde die Anordnung Cys205, 208, 211 und 215 der hochkonservierten Sequenz CxxCxxCxxx C (Albracht, 1994) der Ferredoxine entsprechen und für eine Beteiligung des Cys208 als Ligand des zentralen [Fe-S] Clusters sprechen. Um diesen Sachverhalt zu klären wurde die Struktur der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase anhand der bekannten Kristallstruktur der *D. gigas* Hydrogenase modelliert. Mit Hilfe dieses Modells könnte möglicherweise eine Aussage über die möglichen Liganden des [4Fe-4S] Cluster gemacht werden. Die Struktur wurde mit dem Programm WHAT IF (EMBL, Heidelberg) über „Modeling by Homology“ nachgebildet. Dazu wurde zunächst ein Alignment erstellt, bei der die Anzahl der Aminosäuren beider Sequenzen aufeinander abgeglichen wurde. Die resultierende Struktur des Enzyms ist in Abb. 3.3.2 dargestellt. Die Struktur der modellierten Fru Hydrogenase (blau) wurde dabei über die Struktur der Hydrogenase aus *D. gigas* gelegt. Die Cystein Liganden des zentralen Clusters sind gelb markiert. Die dem Alignment entsprechenden Liganden der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase sind orange markiert, die ausgetauschten Reste rot dargestellt.

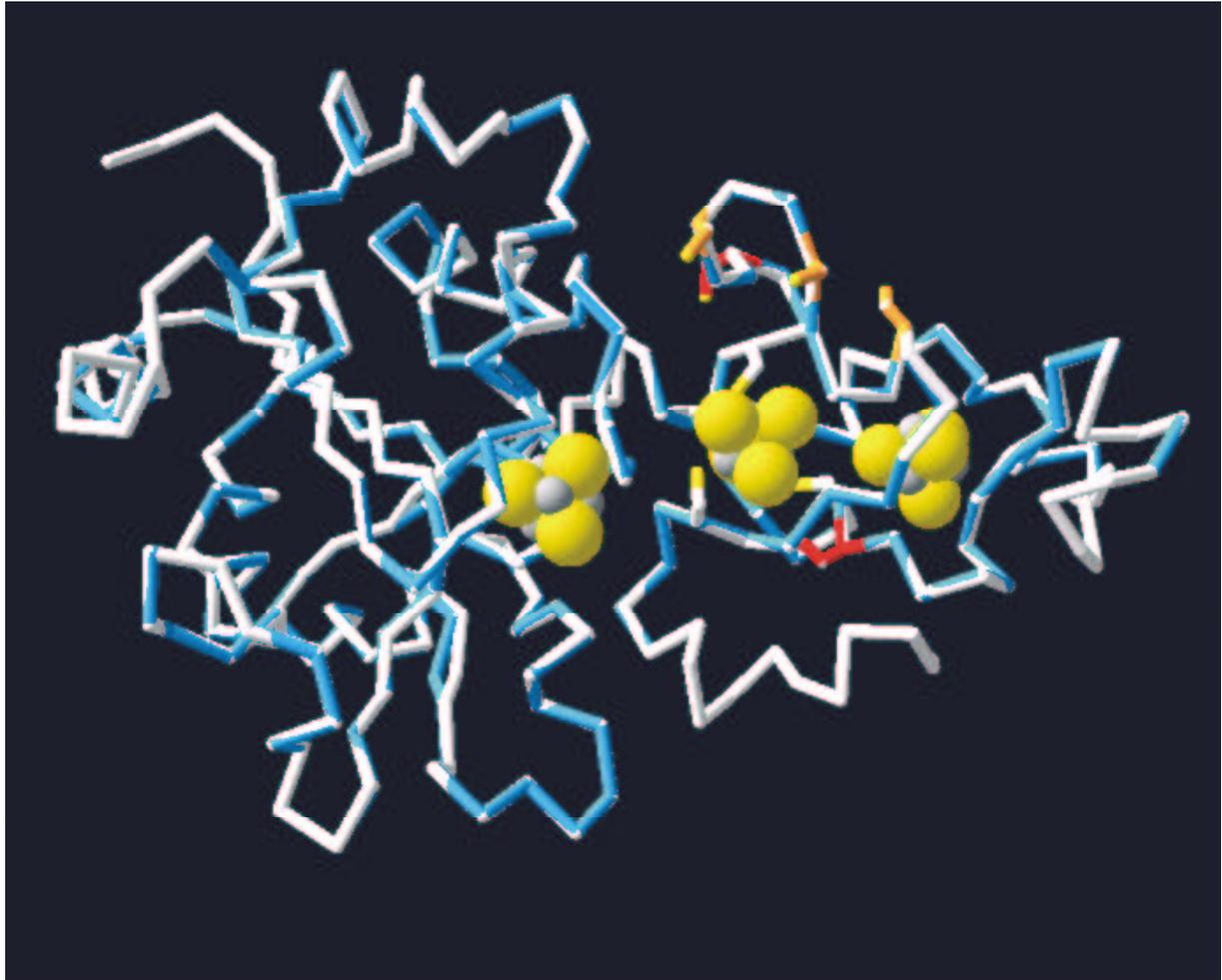


Abb. 3.3.2: Modell der kleinen Untereinheit der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase.

Die kleine Untereinheit FruG wurde über „Modeling by Homology“ mit dem Programm WHAT IF nach der bekannten Kristallstruktur der Hydrogenase aus *D. gigas* nachgebildet. Die Struktur ist blau hervorgehoben, die Vorgabe der kleinen Untereinheit der Hydrogenase aus *D. gigas* weiß. Die Cystein-Liganden des [3Fe-4S] Clusters der *D. gigas* Hydrogenase sind gelb hervorgehoben. Die durch das Alignment bestimmten Cystein-Liganden der FruG-Untereinheit sind orange gekennzeichnet, bzw. die ausgetauschten Reste Cys195 (unterhalb des zentralen [Fe-S] Clusters) und Cys205 sind rot markiert.

Die Qualitätsprüfung des Modells mit dem Programm QUALTY (WHAT IF) ergab, daß das Modell bezüglich der sterischen Wechselwirkungen des Proteinerückrats mit den Seitenketten und der Seitenketten nicht optimal war, aber auch nicht wesentlich verbessert werden konnte. Bindungswinkel (Chi/Psi) und van der Waals Wechselwirkungen unterschieden sich nur unwesentlich vom Original. Das Modell zeigt, daß auf jeden Fall die der Ferredoxin-Consensus-Sequenz entsprechenden Cystein-Reste 205, 208, 211 und 215, die Liganden des zentralen Clusters bilden, weil sie in relativ dichten Abstand zueinander liegen (oberhalb des zentralen Clusters), während der Abstand zu Cys195 (unterhalb des zentralen Clusters, rot) mit 25 Å zu

groß ist. Daher wurde Cys205 in Analogie zu der Sequenz von *D. fructosovorans* und *D. gigas* gegen Pro getauscht. Bei Mutationen von Cys-Liganden des [4Fe-4S]-Cluster des Ferredoxin I aus *Azotobacter vinelandii* bzw eines [2Fe-2S] Clusters aus *Clostridium pasteurianum*, bei denen Cys gegen Ala ausgetauscht wurde, kam es teilweise zu Umlagerungen, bei denen Cystein-Liganden an anderen Stellen der Polypeptidkette die Aufgabe der mutierten Liganden übernahmen (Shen et al., 1995) (Golinelli et al., 1996). Um zu vermeiden, daß unmittelbar benachbarte Cys-Reste einen Ersatz für das durch Prolin getauschte Cys bilden können, wurde auch Cys195 mutiert und gegen Ala ausgetauscht.

Für die Mutagenese wurde zunächst ein Abschnitt des *fru* Gens in den Vektor pSL1180 kloniert. Der Abschnitt wurde so gewählt, daß vor der zu mutierenden Stelle im *fruG*-Gen ein ausreichend großer Sequenzabschnitt vorhanden war, damit die Wahrscheinlichkeit einer Integration in das Genom von *M. voltae* vor dieser Stelle möglichst hoch war (vergl. Abb. 3.3.5). Zudem sollte die Sequenz den Terminator hinter dem *fruB*-Gen enthalten. Genomische DNA aus *M. voltae* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NruI* geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Southern-Blot Analyse (2.1.7) mit einer DIG-markierten Sonde wurde ein 3 kb großer Abschnitt in der genomischen DNA von *M. voltae* identifiziert (Abb.3.3.3). Für die Hybridisierung wurde mit den Primern fruNde und fruNru aus genomischer DNA eine Sonde amplifiziert und mit DIG markiert (2.1.7.2).

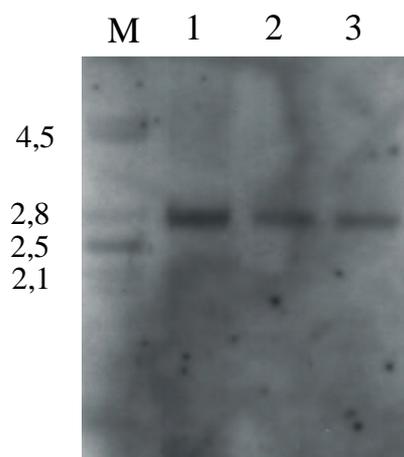


Abb. 3.3.3: Southern-Blot Analyse zur Identifizierung des *NdeI/NruI* Genabschnitts in *fru*.

Zur Abschätzung der Größe des *NdeI/NruI*-Fragments wurde genomische DNA mit letzteren Enzymen geschnitten und mit einer DIG-markierten Sonde aus diesem Bereich hybridisiert. (M) Größenmarker in kb, (1)-(3) Präparationen genomischer DNA aus *M. voltae*, die mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *NruI* behandelt wurden. Der gesuchte Abschnitt liegt unmittelbar oberhalb der 2,8 kb-Bande.

Nachdem der entsprechende Größenabschnitt im Gel über Southern-Blot identifiziert war wurde

der Abschnitt aus dem Gel eluiert und über die Schnittstellen *NdeI* und *HpaI* in den Vektor pSL1180 kloniert. Richtige Klone wurden über Koloniehybridisierung mit der DIG-markierten Sonde identifiziert (2.1.8.). Die ortsgerichtete Mutagenese wurde nach 2.1.9.4 durchgeführt. Als Selektionsprimer wurde ein Primer eingesetzt, der die *ScaI*-Schnittstelle im *bla*-Gen des Vektors zerstört. Aus diesem Grund wurde die *ScaI* Schnittstelle in der MCS des Vektors mit *SpeI* und *MluI* herausgeschnitten. Die 5' Überhänge wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt und ligiert. Die Mutagenese wurde mit den Primern fru2.89Ala, fru 3.02Pro als Mutageneseprimer und Sca->Mlu als Selektionsprimer durchgeführt, die zu der Mutation Cys195Ala und Cys205Pro führen. Alternativ wurden auch Mutagenesen mit dem Primer fru3.02Ala und dem Selektionsprimer PstI->HindIII durchgeführt, bei der Cys205 gegen Ala getauscht wird. Auf diese Weise wurden die unter 2.1.8 dargestellten Plasmide erzeugt. Für die Transformation war noch ein Genabschnitt auf dem Plasmid notwendig, der einen Genaustausch über homologe Rekombination in *fruB* ermöglicht. Dazu wurde mit den Primern fru3.33 und fru3.92, die jeweils Punktmutationen für die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* trugen, ein Genfragment aus *fruB* amplifiziert, mit den *BamHI* und *EcoRI* geschnitten und in den Vektor pFru kloniert. Anschließend wurde die *pac*-Kassette aus dem Plasmid pMipuidA mit *EcoRV* und *SacI* herausgeschnitten. Um eine Selektion auf puromycinhaltigem Medium zu erreichen, muß eine Vervielfältigung des *pac*-Gens ermöglicht werden (Pfeiffer, 1998). Dazu wurden mindestens 200 bp große, heterologe Sequenzen benötigt, die vor und hinter der *pac*-Kassette die Amplifikation während der Replikation im Genom von *M. voltae* gewährleisten sollten. Die Sequenzen wurden deshalb aus λ -DNA mit den Primern Lambda Kpn, Lambda Xba und Lambda Sac (Tab. 2.1.7) mit den jeweiligen Schnittstellenpunktmutationen aus dem λ -Genom amplifiziert. Die Fragmente wurden jeweils mit *KpnI*, *EcoRV* und *SacI*, *XbaI* geschnitten und gleichzeitig mit der *pac*-Kassette in den Vektor pFru(*) kloniert. Das Klonierungsschema ist in Abb.3.3.4 zusammengefaßt. Alle Vektoren wurden mit den jeweiligen Sequenzierungsprimern aus Tab. 2.1.7 kontrolliert. Der Vektor pFru* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *PvuII* und *ApaLI* linearisiert und in *M. voltae* transformiert (2.1.6.2). Da auf diese Weise keine puromycinresistenten Kolonien erhalten wurden, wurde die *pac* Kassette ein weiteres mal vor die schon vorhandene Kassette über die *KpnI* Schnittstelle in den Vektor mit der Mutation C195A, C205P, kloniert. Auf diese Weise konnten schließlich Transformanten erhalten werden. Das Transformationsschema ist in Abb.3.3.5 zusammengefasst.

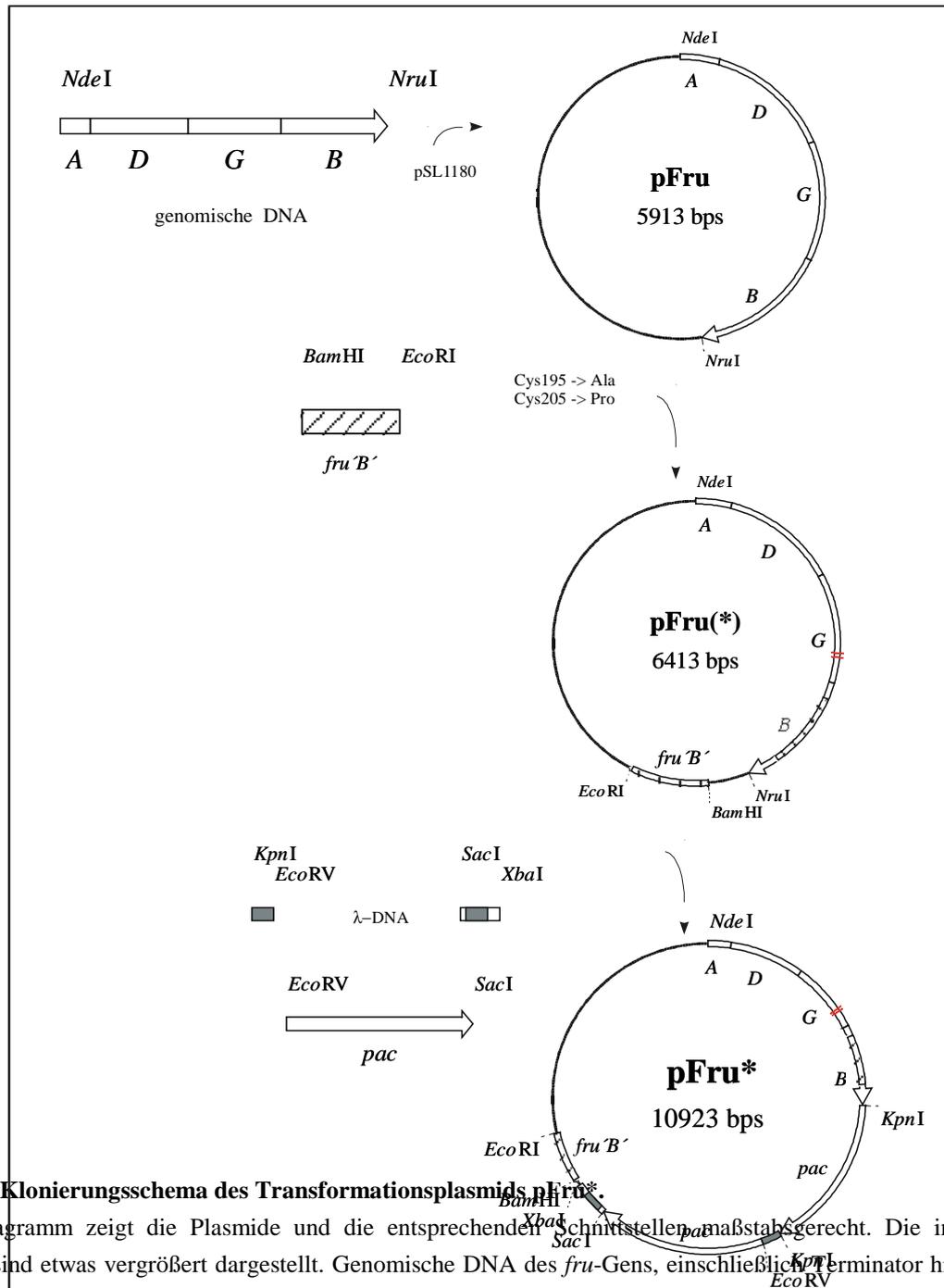


Abb. 3.3.4: Klonierungsschema des Transformationsplasmids pFru*.

Das Flußdiagramm zeigt die Plasmide und die entsprechenden Schnittstellen maßstabsgerecht. Die inserierten Sequenzen sind etwas vergrößert dargestellt. Genomische DNA des *fru*-Gens, einschließlich Terminator hinter dem *fruB*-Gen, wurde über *NdeI* und *NruI* in den Vektor pSL1180 kloniert. Anschließend wurden die Mutationen durchgeführt und ein Abschnitt aus dem *fruB*-Gen inseriert, der später eine Rekombination ermöglichen soll, bei der die *pac*-Gene wieder eliminiert werden (Abb. 3.3.7). Anschließend wurde das *pac*-Gen aus pMipuidA zusammen mit zwei repetitiven Genabschnitten von *λ*-DNA über die Restriktionsschnitte *KpnI* und *XbaI* eingesetzt. Sie sollten eine Amplifikation der *pac*-Kassette im Genom ermöglichen, die zu einer ausreichenden Resistenz gegen Puromycin führt. Sie wurde allerdings erst erhalten, nachdem des *pac*-Gens ein weiteres mal über die *KpnI* Schnittstelle direkt vor das erste *pac*-Gen kloniert wurde (pFru*). Mit diesem Konstrukt wurden puromycinresistente Kolonien erhalten.

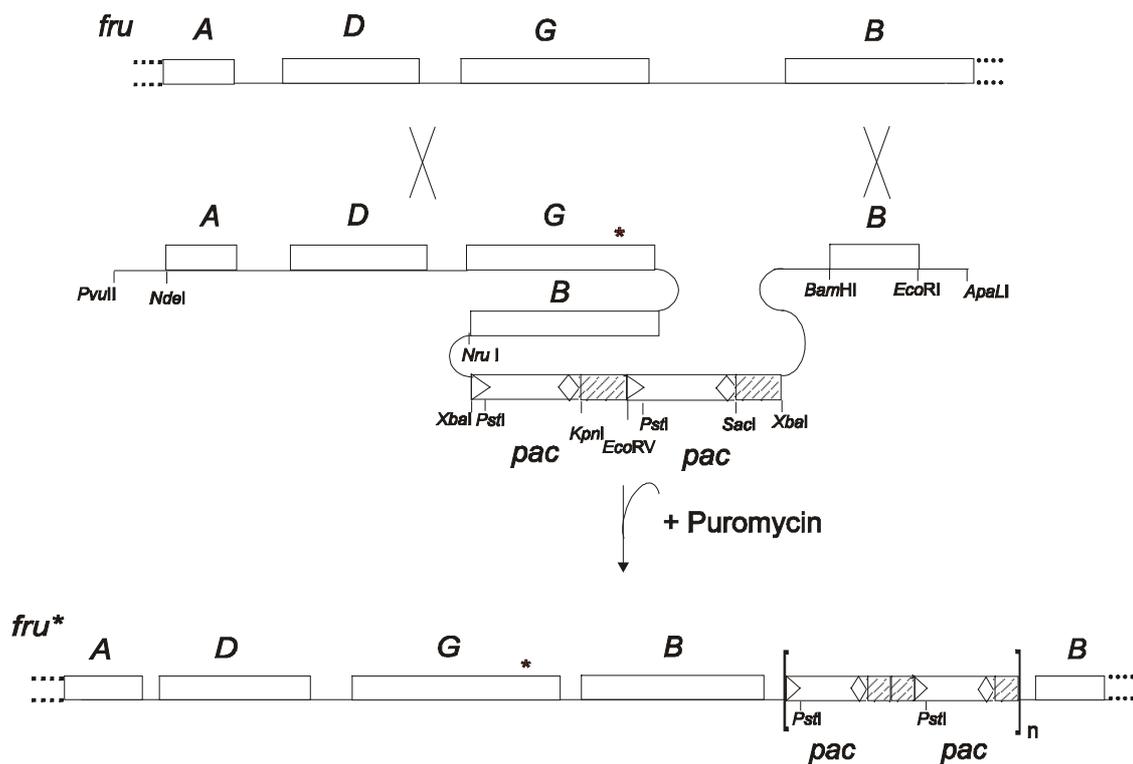


Abb.3.3.5: Integrationsschema des linearisierten pFru* Plasmids in das Genom von *M. volgae*.

Durch zweifache Rekombination über einen Genabschnitt vor der zu mutierenden Stelle in *fruG* und *fruB* (Kreuze) sollte das Fragment integrieren und dabei den Genbereich um *fruG* gegen den Bereich von *fruG* mit der Punktmutation und die *pac* Kassetten eintauschen. Auf diese Weise sollten unter Selektion mit Puromycin Kolonien erhalten werden, die die Basenaustausche im Genom enthalten. Die repetitiven λ -Sequenzen, die die Amplifikation des *pac* Gens im Genom ermöglichen, sind durch schraffierte Kästchen gekennzeichnet. $n \geq 12$.

Die Kontrolle der transformierten Stämme erfolgte über PCR mit den Primern fru2.41ir und fru3.92. Der Genabschnitt mit den Punktmutationen wurde damit amplifiziert und die PCR-Produkte mit dem Primer fru2.89ir sequenziert. Die erfolgreiche Mutation der Hydrogenase FruC195A, C205P (Fru*) konnte bestätigt werden (Abb.3.3.6).

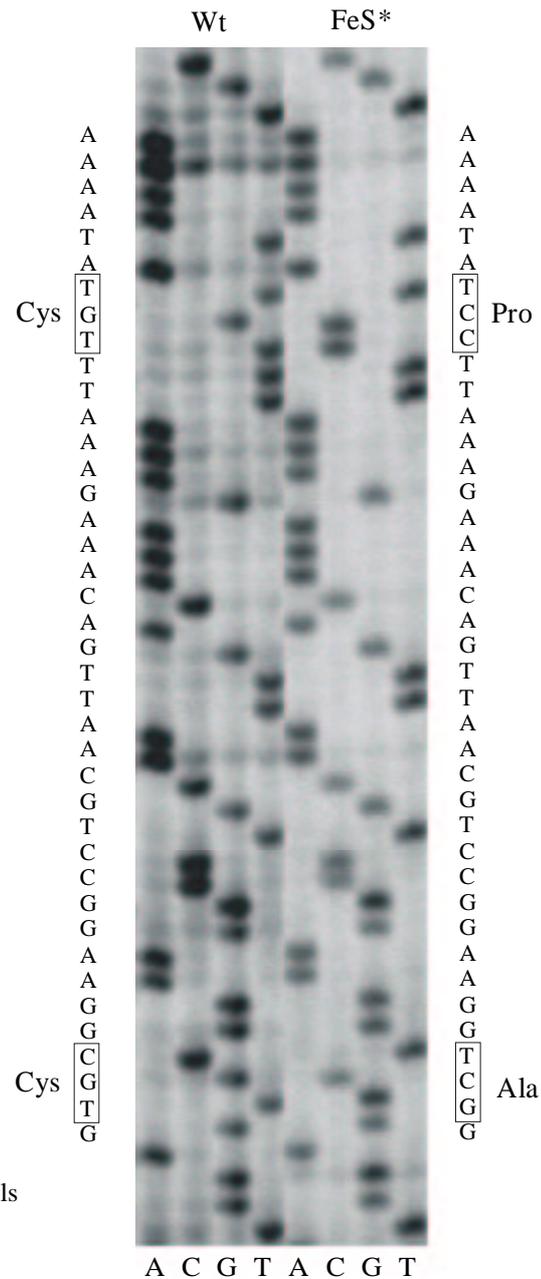


Abb.3.3.6: Sequenz des mutierten Genabschnitts von *fruG*.

Der Bereich in *fruG*, in dem die Mutationen vorgenommen wurden, wurde über PCR amplifiziert und sequenziert. Die ausgetauschten Nukleotide sind jeweils rechts und links der jeweiligen Sequenz hervorgehoben.

Werden die Transformanten in puromycinfreiem Medium angezogen, so kann sich die *pac*-Kassette über homologe Rekombination über den *fruB*-Abschnitt aus dem Genom eliminieren (Abb. 3.3.7). Dies wurde nach ca. 20 Passagen in Puromycin freiem Medium erreicht und konnte über Southern-Blot bestätigt werden (Abb.3.3.8).

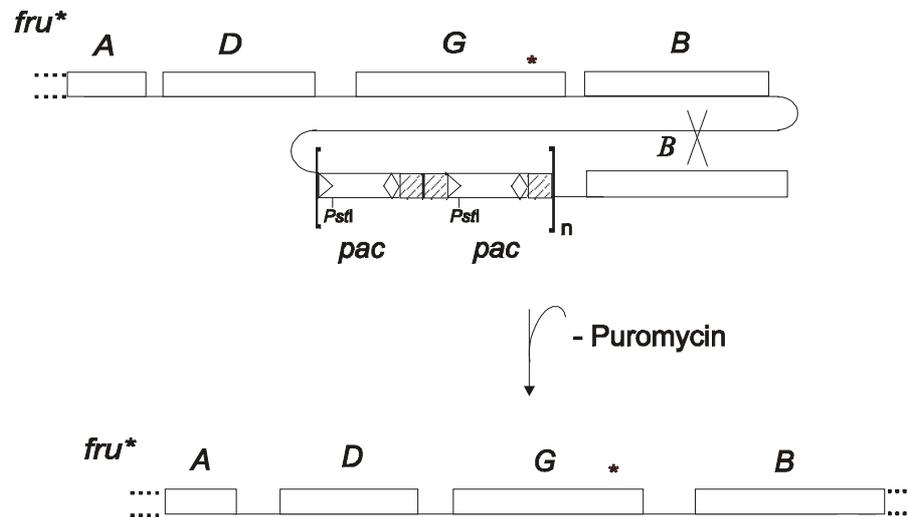


Abb.3.3.7: Deletion der *pac*-Gene in selenfreiem Medium.

In puromycinfreiem Medium ist es möglich, daß durch homologe Rekombination über den *fruB* Abschnitt die *pac* Gene aus dem Genom entfernt werden können.

Dazu wurde mit *PstI* geschnittene genomische DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und mit einer DIG markierten Sonde gegen das *pac* Gen (*XbaI*, *KpnI* - Fragment) hybridisiert. Nach 20 Passagen ist das *pac* Gen im Genom von *M. voltae* über Southern-Blot nicht mehr nachzuweisen.

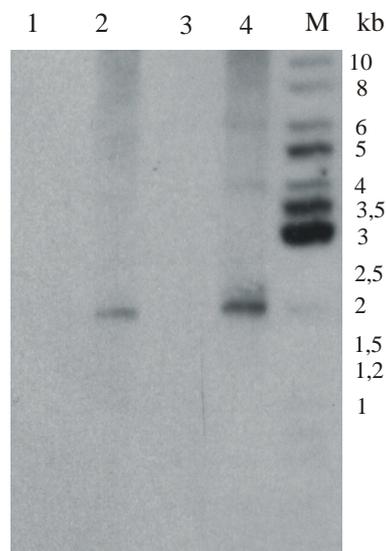


Abb. 3.3.8: Southern-Blot-Analyse der Integration des *pac*-Gens in das Genom von *M. voltae*.

Der Blot zeigt mit *PstI* geschnittene genomische DNA, die mit einem DIG-markierten *XbaI*/*KpnI*-Fragment der *pac*-Kassette hybridisiert wurde. (1) Wildtyp-DNA, (2), (4) genomische DNA aus Fru* mit Puromycin im Medium, (3) genomische DNA aus Fru* nach 20 Passagen in puromycinfreiem Medium. Die Bande bei 1,9 kb entspricht der vervielfältigten *pac*-Kassette im Genom (Bingemann, 1997).

3.2.2 Reinigung der Hydrogenasen aus dem transformierten Stamm Fru*

Aus dem transformierten Stamm wurden die Hydrogenasen wie unter 2.2.1 beschrieben gereinigt. Die Reinigung ist in der folgenden Tabelle (Tab. 3.1) zusammengefasst. Dabei ergab sich für die F₄₂₀ reduzierende Hydrogenase eine spezifische Aktivität von 675 U/mg mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor und nur 28 U/mg für F₄₂₀ als Elektronenakzeptor.

Tab. 3.3.1: Reinigung der Mutante Fru* (C195A, C205P) aus *M. voltae*.

Fraktion	Volumen (ml)	Aktivität (U/ml)		Protein (mg/ml)	spez. Aktivität ¹⁾ (U/mg)	
		F ₄₂₀	BV		F ₄₂₀	BV
Zellextrakt	88		- ²⁾	18,8		- ²⁾
DEAE- Sephrose	100		- ²⁾	2,2		- ²⁾
Phenyl- Sephrose fast flow	30	26,7	510	0,9	27	525
Uno Q	6,3	9	216	0,3	28	675

¹⁾ Der Wasserstoffverbrauch mit Benzylviologen und F₄₂₀ als Elektronenakzeptor ist in 1U = 1 µmol H₂/min angegeben.

²⁾ Aufgrund unvollständiger Trennung der Hydrogenasen während dieser Reinigungsschritte konnten keine Angaben über die Aktivität gemacht werden.

Parallel wurden aus dem Wildtyp-Stamm die Hydrogenasen gereinigt (Tab.3.2). Für die F₄₂₀ reduzierende Hydrogenase wurde eine spezifische Aktivität von 345 U/mg für Benzylviologen und 364 U/mg für F₄₂₀ ermittelt. Im Gegensatz zum Wildtyp hat sich die Aktivität mit dem natürlichen Elektronenakzeptor F₄₂₀ bei der Mutante um das 13fache verringert.

Aus dem Wildtypstamm sowie aus der Mutante wurde außerdem die F₄₂₀ nicht reduzierende Hydrogenase gereinigt. Die Aktivität dieser Hydrogenase mit 29 750 U/mg beim Wildtyp und 33 060 U/mg bei der Mutante unterschied sich nur geringfügig.

Tab. 3.3.2: Reinigung der Hydrogenase Fru aus Wildtyp-Zellen von *M. voltae*.

Fraktion	Volumen (ml)	Aktivität (U/ml)		Protein (mg/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	
		F ₄₂₀	BV		F ₄₂₀	BV
Zellextrakt	76	149	- ²⁾	18,2	8,1	- ²⁾
DEAE-Sepharose	130	112	- ²⁾	2,7	42	- ²⁾
Phenyl-Sepharose fast flow	3	113	251	0,9	110	244
Uno Q	5,5	66,2	60	0,9	364	328

¹⁾ Der Wasserstoffverbrauch mit Benzylviologen und F₄₂₀ als Elektronenakzeptor ist in 1U = 1 µmol H₂/min angegeben.

²⁾ Aufgrund unvollständiger Trennung der Hydrogenasen während dieser Reinigungsschritte konnten keine Angaben über die Aktivität gemacht werden.

Für alle Hydrogenasen wurde zusätzlich noch die Michaelis-Menten-Konstante K_M für H₂ bestimmt. Sie betragen für die Hydrogenasen, gemessen mit dem jeweiligen Elektronenakzeptor für den Wildtyp 3,3 µM (Fru, F₄₂₀), 6,8 µM (Fru, BV) und 2,7 µM (Vhu, BV), für die Mutante, 3,1 µM (Fru*, F₄₂₀), 3,05 µM (Fru*, BV) und 2,7 µM (Vhu, BV). Die Werte liegen alle im selben Bereich. Der K_M -Wert für die Fru Hydrogenase aus Wildtypzellen mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor ist mit 6,8 µM im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Wert der Fru*-Hydrogenase vergleichbar. Die Mutante der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase zeigt keinen signifikanten Unterschied zu der entsprechenden Hydrogenase aus dem Wildtyp. Die Mutation wirkt sich demnach nicht auf die Affinität zu H₂ als Substrat aus, sondern äußert sich hauptsächlich in einer stark verringerten spezifischen Aktivität.

3.3.3 EPR-Spektroskopische Untersuchung der FruC195A, C205P (Fru*) Hydrogenase aus *M. voltae*

Die Umwandlung des [4Fe-4S] Clusters in einen [3Fe-4S] Cluster ließ sich EPR-spektroskopisch anhand der Vergleiche der Spektren oxidierten und reduzierten Proben zeigen. [4Fe-4S] Cluster im liegen *in vivo* meistens im Oxidationszustand $1+/2+$ vor. Es handelt sich dabei um ein gekoppeltes Spin-System, das sich aus den Einzelspins der Fe-Atome ergibt, die in der Regel als high spin Fe vorliegen und durch die Schwefelatome des Clusters getrennt sind. Der resultierende Gesamtspin beträgt für $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ $S = 1/2$ und ist mit EPR-Spektroskopie detektierbar. Da es sich bei diesen Clustern um sehr schnell relaxierende Spin-Systeme handelt sind EPR-Spektren von [4Fe-4S] Clustern im reduzierten Zustand nur bei Temperaturen unter 15 K deutlich zu sehen. Bei höheren Temperaturen verbreitert sich das Signal und verschwindet in der Basislinie. Abb. 3.3.9 I und 3.3.9 II zeigen jeweils die Spektren der reduzierten (2 % H_2) F_{420} reduzierenden Hydrogenase aus dem Wildtyp und der Mutante bei 9 K und unterschiedlichen Mikrowellenleistungen. Die Proben wurden zuvor dunkel adaptiert. Die [Fe-S] Cluster zeigen das für $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster typische Signal bei $g = 1,94$. Abbildung 3.3.9 I repräsentiert dabei die zwei [4Fe-4S] Cluster der mutierten Hydrogenase und Abbildung 3.3.9 II die drei [4Fe-4S] Cluster des Wildtyps. Weiterhin sind im Bereich niedriger Feldstärken die g_x und g_y -Werte des Ni-Signals bei $g_x = 2,23$ und $g_y = 2,19$ zu erkennen. Im Gegensatz zu Spektren, die bei höheren Temperaturen aufgenommen wurden (Abb.3.3.11), zeigen sich hier Aufspaltungen, die auf Wechselwirkungen des Spin $1/2$ Systems des proximalen [4Fe-4S] Clusters mit dem freien Elektron des Nickels beruhen. Da zwischen den Spektren des Wildtyps und der Mutante keine signifikanten Unterschiede bezüglich der g -Werte und der Aufspaltung der Signale zu erkennen sind, kann man davon ausgehen, daß die Integrität des proximalen [4Fe-4S] Clusters erhalten geblieben ist. Prinzipiell lassen sich EPR-Spektren quantifizieren, weil sie im Gegensatz zu UV-Vis Spektren nicht von einem substanzspezifischen Extinktionskoeffizienten abhängen. Durch die doppelte Integralbildung des jeweils spezifischen Signals lassen sich direkt die Stöchiometrien der Metallzentren ermitteln. Da es sich in diesem Fall bei dem Wildtyp und der Mutante nicht um eindeutig abgeglichene Redoxzustände handelt, konnte nur eine Schätzung des Verhältnis von Ni zu [Fe-S]-Clustern vorgenommen werden. Die Bestimmung der doppelten Integrale ergab für die Mutante ein Verhältnis von ca. 1,8 [4Fe-4S] Clustern pro Ni-Zentrum, wenn beim Wildtyp ein Verhältnis von 3:1 zugrunde gelegt wird.

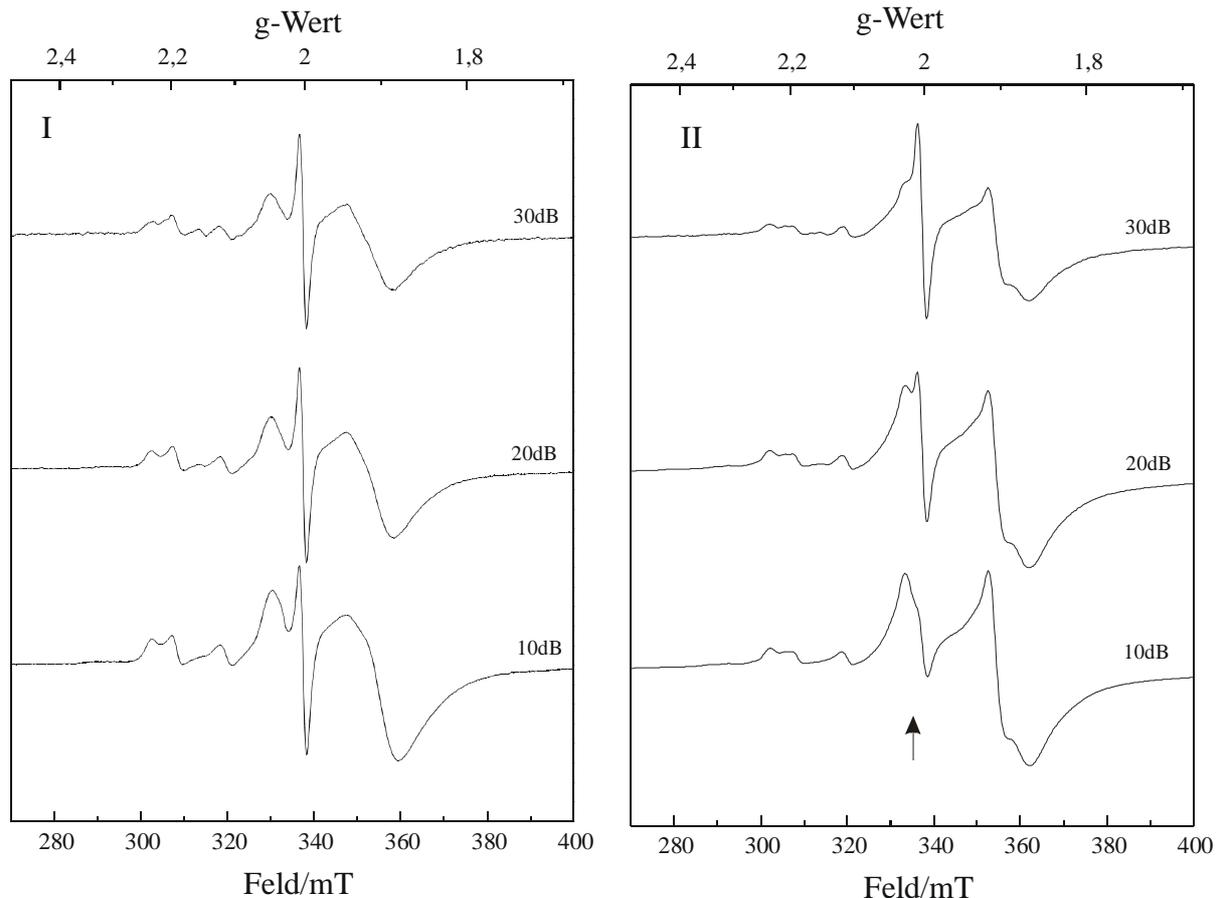


Abb. 3.3.9: EPR-Spektren der F_{420} reduzierenden Hydrogenase aus Mutante (I) und Wildtyp (II) bei 9 K.

Die EPR-Proben der gereinigten Hydrogenasen wurden bei 200 K dunkeladaptiert und bei verschiedenen Mikrowellenleistungen gemessen. 30 dB (0,2 mW), 20 dB (2,0 mW), 10 dB (20,1 mW). Der Pfeil im Spektrum der F_{420} reduzierenden Hydrogenase aus dem Wildtyp (II) zeigt das Radikalsignal, daß sich bei höheren Mikrowellenleistungen im Gegensatz zum Radikalsignal der Spektren der Mutante Fru* (I) absättigen läßt. Sonstige EPR-Bedingungen, Mikrowellenfrequenz: 9,458 GHz, Modulationsamplitude. 1 mT.

[3Fe-4S] Cluster lassen sich eindeutig im oxidierten Zustand nachweisen. Im reduzierten Zustand haben [3Fe-4S]⁰-Cluster einen geradzahigen Spin von $S = 2$ und sind schwierig mit EPR-Spektroskopie detektierbar. Nur in manchen Proteinen läßt sich bei $g = 12$ ein stark verbreitertes Signal beobachten (Teixeira et al., 1989). Im oxidierten Zustand, [3Fe-4S]¹⁺ mit $S = 1/2$, ist ein Signal bei $g = 2,01$ zu sehen. Die Proben der gereinigten Hydrogenasen wurden daher vorsichtig aufgetaut, bei Raumtemperatur an der Luft geschüttelt und wieder in flüssigem N_2 eingefroren. Abb. 3.3.10 zeigt die Spektren der oxidierten Hydrogenasen bei 9 K. Die Ni-C Signale sind verschwunden und im Bereich niedriger Feldstärken sind mehrere Signale zu sehen, die auf Ni-B-Species im sogenannten „ready state“, Ni_r(III), zurückgeführt werden können, mit $g = 2,41$, $g = 2,17$ und $g = 2,01$ (Sorgenfrei et al., 1997). Letzterer g-Wert wird aber im Spektrum der Mutante

durch das prominente Signal des [3Fe-4S] Clusters bei $g = 2,013$ überdeckt.

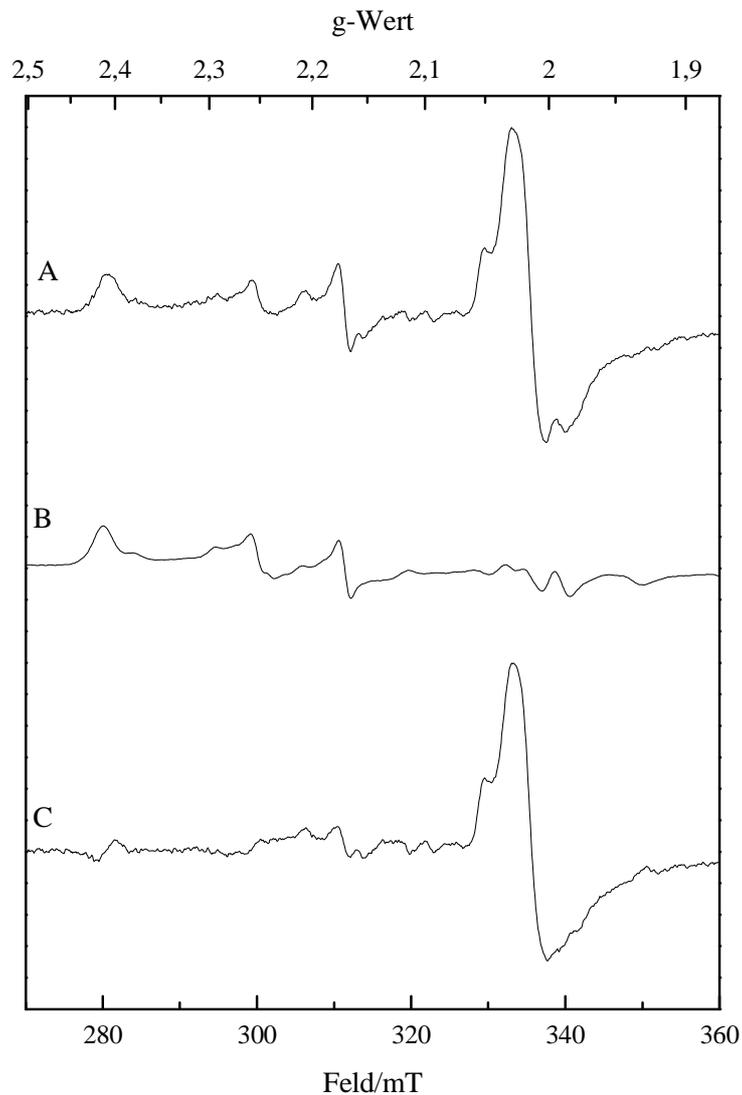


Abb. 3.3.10: EPR-Spektren der oxidierten Hydrogenasen Fru und Fru* bei 9 K.

Die EPR-Proben aus Abb. 3.3.9 I und II wurden an der Luft oxidiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. (A) EPR-Probe der Mutante der F_{420} reduzierenden Hydrogenase Fru*, (B) EPR-Probe der entsprechenden Wildtyp-Hydrogenase, (C) Berechnetes Differenzspektrum aus (A)-(B). EPR-Bedingungen: Mikrowellenfrequenz: 9,456 GHz, Mikrowellenleistung 30 dB (0,2 mW), Modulationsamplitude: 1,5 mT.

Das Signal bei $g = 2,25$ könnte möglicherweise Bestandteil des Nickels im inaktiven Ni-A Zustand, $Ni_u(III)$, sein, dessen g -Werte für die Hydrogenase aus *D. gigas* bei $g = 2,32, 2,23$ und $2,01$ (Fernandez et al., 1986) liegen. Das ausgeprägte Signal bei $g = 2,013$ im Spektrum der mutierten Hydrogenase, Abb. 3.3.10 A, ist dem neu entstandenen $[3Fe-4S]^{1+}$ -Cluster zuzuordnen. Durch Subtraktion des Spektrums der Wildtyp-Hydrogenase Abb.3.3.10 C wird erkennbar, daß die Ursachen, die zu einer Aufspaltung des 3Fe-Signals bei $g = 1,98$ führen nicht Bestandteil des Signals sind. Damit wurde gezeigt, daß durch die Mutation im *fruG*-Gen der zentrale $[4Fe-4S]$ Cluster gegen einen $[3Fe-4S]$ Cluster ausgetauscht wurde.

Um zu zeigen, daß durch die Mutagenese das aktive $[NiFe]$ Zentrum unbeeinflusst geblieben ist, wurden zur Kontrolle EPR-Spektren der reduzierten Hydrogenasen bei 35 K aufgenommen. Bei dieser Temperatur kommt es nicht zu Aufspaltungen des Ni-Signals, die durch die $[Fe-S]$ Cluster hervorgerufen werden. In Abb.3.3.11 ist das Spektrum der F_{420} reduzierenden Hydrogenase aus dem Mutantenstamm (3.3.11 A) und aus Wildtyp-Zellen (3.3.11 B) zu sehen. Beide Enzyme zeigen das für aktive Hydrogenasen charakteristische rhombische Ni-C Signal nach Dunkeladaptation. Sowohl die g -Werte mit $g_x = 2,21$, $g_y = 2,15$, als auch die Linienführung stimmen überein, so daß man davon ausgehen kann, daß am aktiven Zentrum keine Veränderungen aufgetreten sind.

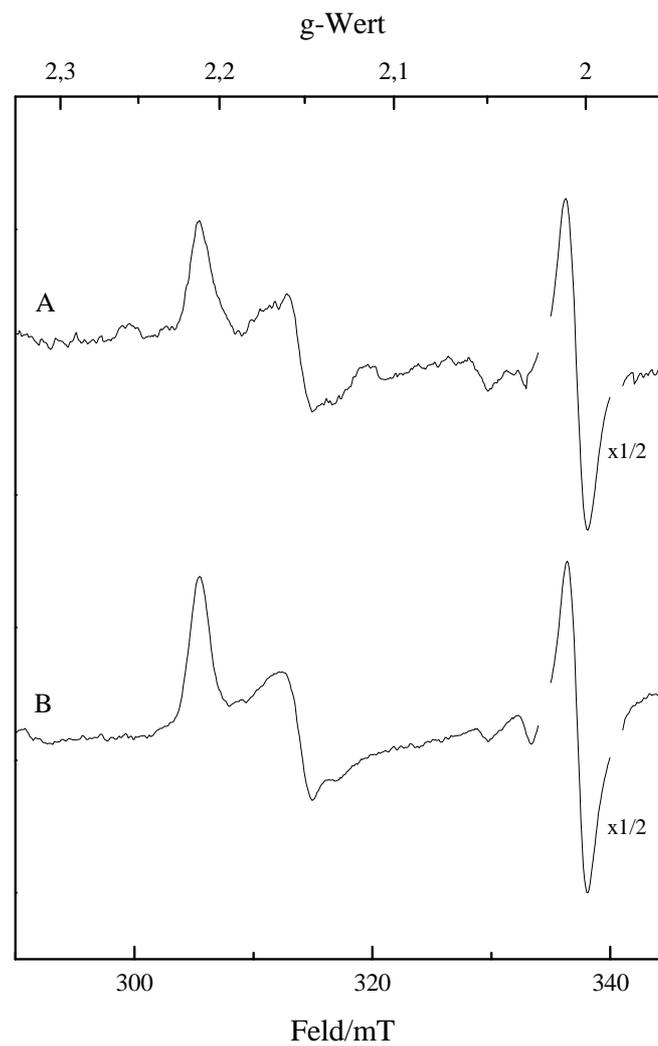


Abb.3.3.11: EPR-Spektren der reduzierten Hydrogenase Fru und Fru* bei 35 K.

Um die Integrität des aktiven Zentrums zu überprüfen wurden die EPR-Spektren der reduzierten und dunkeladaptierten Hydrogenasen bei 35 K aufgenommen. (A) EPR-Probe der mutierten F_{420} reduzierenden Hydrogenase, Fru*, (B) EPR-Probe der entsprechenden Wildtyp Hydrogenase, Fru. EPR-Bedingungen: Mikrowellenfrequenz: 9,459 GHz, Mikrowellenleistung: 20 dB (2,0 mW), Modulationsamplitude: 0,8 mT.

3.3.4 Bestimmung der Redoxpotentiale der [Fe-S] Cluster

Um Rückschlüsse aus dem Aktivitätsverlust ziehen zu können und die Mutante mit den Hydrogenasen anderer Organismen vergleichen zu können, wurde das Redoxpotential der [Fe-S] Cluster bestimmt. Dazu wurden der Enzymlösung verschiedene Mediatorsubstanzen mit definierten Redoxpotentialen zugegeben, die bei der Einstellung des Potentials als Vermittler zwischen dem inneren Potential des Enzyms und dem Lösungsmittel dienen (2.2.4.1). Die Einstellung des Potentials sollte nicht länger als 5 min dauern, da das Protein bei längerem Rühren unter Zugabe der Mediatoren und Oxidation- bzw. Reduktionsmittel stark an Aktivität verliert und das Ni-Zentrum beschädigt wird. Die Messungen wurden deshalb auf je zwei Probennahmen in den jeweiligen Potentialbereichen der [3Fe-4S] Cluster (-50 mV bis +100 mV) und der [4Fe-4S] Cluster (-400 mV bis -250 mV) beschränkt (Cammack et al., 1986), (Rousset et al., 1998). Die Proben wurden EPR-spektroskopisch untersucht. Die Redoxpotentiale wurden anhand der Proben festgelegt, bei denen die Signale der jeweiligen [Fe-S] Cluster am ausgeprägtesten zu sehen waren. Für die [4Fe-4S] Cluster wurde so ein Redoxpotential von -370 mV ermittelt, für den [3Fe-4S] Cluster ein Potential von +60 mV. Das Potential ist durch die Mutation insgesamt um 430 mV angestiegen. Die Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (Tab. 3.3.3).

Tab. 3.3.3: Katalytische Daten und Redoxpotentiale der Hydrogenasen aus Wildtyp-Zellen und aus der Mutante Fru*(C195A, C205P)

	<i>M. voltae</i> Wildtyp	<i>M. voltae</i> Fru* (C195A,C205P)
[Fe-S] Cluster	3 [4Fe4S]	[3Fe4S], 2 [4Fe4S]
Redoxpotential (E_m)	-370 mV	+60 mV [3Fe4S]
Hydrogenase und Elektronenakzeptor	spez. Aktivität (U/mg) ¹⁾ / k_{cat} (s ⁻¹)	
F ₄₂₀ –reduzierende Hydrogenase Fru		
F ₄₂₀	364 / 606	28 / 46
Benzylviologen	345 / 575	540 / 900
F ₄₂₀ –nicht reduzierende Hydrogenase Vhu		
Benzylviologen	29 750 / 3.9 10 ⁴	33 060 / 4.4 10 ⁴

¹⁾H₂-Verbrauch wurde mit F₄₂₀ oder Benzylviologen als Elektronenakzeptor gemessen.
1U = 1μmol H₂/min.

3.3.5 Überprüfung der Hydrogenasekonzentration Vhu in dem Mutantenstamm Fru*

Bei Aktivitätsbestimmungen der mutierten Hydrogenase wurde im Vergleich zum Wildtyp eine 13fach niedrigere Aktivität mit F₄₂₀ als Elektronenakzeptor gemessen. Um festzustellen, ob dieser Aktivitätsverlust teilweise von der nicht mutierten Vhu Hydrogenase ausgeglichen wird, wurde die Konzentration an F₄₂₀-nichtreduzierender Hydrogenase aus Zellextrakt bestimmt. Dazu wurden gleiche Proteinmengen an Zellextrakt aus dem Mutantenstamm Fru* (mit oder ohne Puromycin gewachsen) und Wildtyp-Zellextrakt über denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western-Blot mit anti-VhuA Antikörpern und alkalischer Phosphatase gekoppeltem Zweitantikörper durchgeführt

(2.2.8.1). In Abb. 3.3.12 ist die Tintenanfärbung und die Immunanfärbung der großen Untereinheit der Vhu-Hydrogenase aus den verschiedenen Stämmen zu sehen.

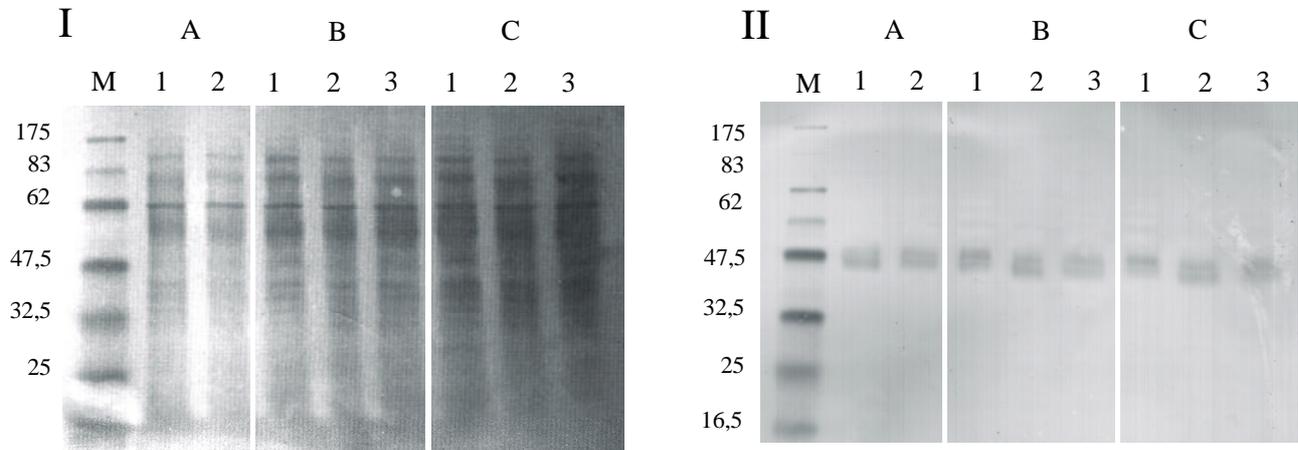


Abb.3.3.12: Western-Blot Analyse der F_{420} nicht reduzierenden Hydrogenase im Mutantenstamm Fru*.

(I) Tintenanfärbung von Zellextrakt. (A) 20µg Gesamtprotein aus Wildtyp-Zellen (1), Fru*-Zellen ohne *pac*-Gen (2); (B) 40 µg Gesamtprotein aus Wildtyp-Zellen (1), Fru* Zellen ohne *pac*-Gen (2), Fru* Zellen mit *pac*-Gen (3); (C) wie (B) mit 60µg Gesamtprotein. (II) Immunanfärbung mit anti-VhuA Antikörper und einem Sekundäntikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war. (M) Größenmarker in kDa.

Bei gleicher Menge an Protein konnte keine Zunahme der Hydrogenasekonzentration von Vhu im Mutantenstamm im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Der Verlust an Hydrogenaseaktivität in Fru* wird demnach nicht durch eine Erhöhung der Vhu-Konzentration ausgeglichen.

4. Diskussion

4.1 Einfluß der fusionierten großen Untereinheit VhuF auf die biochemischen Eigenschaften der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase von *M. voltae*

Das bimetallische primäre Reaktionszentrum der [NiFe] Hydrogenasen ist in der Regel Bestandteil der großen Untereinheit des Enzyms. Die selenhaltige [NiFe] Hydrogenase Vhu aus *M. voltae* unterscheidet sich von den meisten Hydrogenasen dahingehend, daß die große Untereinheit aus zwei unabhängigen Polypeptiden besteht, die beide Liganden des aktiven Zentrums enthalten. Anhand von Sequenz- und Strukturvergleichen lassen sich Cys61 und Cys64 aus dem N-terminal konservierten Sequenzmotiv GxxxxPRGxxxH der großen Untereinheit VhuA als Liganden des aktiven Zentrums identifizieren. Die anderen beiden Liganden, das C-terminal konservierte Cys443 und Sec440, sind auf der VhuU Untereinheit enthalten. Für das chemisch hergestellte Polypeptid VhuU_c, das anstelle von Sec ein Cys enthält konnte gezeigt werden, daß es in der Lage ist, Ni zu binden. Es besitzt aber nicht die katalytische Fähigkeit, Wasserstoff zu spalten und kann daher kein eigenständiges Reaktionszentrum bilden (Pfeiffer et al., 1995). Die Möglichkeit, daß die eigenständige kleine Untereinheit einen Einfluß auf die transkriptionelle Regulation der selenfreien Hydrogenasegruppen *vhc* und *frc* ausübt, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Dies wurde mit Reportergergenversuchen, bei der die Transkription der selenfreien Hydrogenasen in Anwesenheit der Fusionsmutante VhuF gemessen wurde, gezeigt. (Pfeiffer et al., 1998b). Die Fusionsmutante wurde in Analogie zu der homologen VhcA Untereinheit der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase hergestellt, bei der der C-Terminus wie bei den meisten Hydrogenasen Bestandteil der großen Untereinheit ist. Es bleibt daher die Frage, welche Rolle die kleine Untereinheit spielt und ob der Organismus einen Vorteil davon hat, daß die VhuU Untereinheit nicht Bestandteil der großen Untereinheit ist.

Dazu wurde die Mutante biochemisch und spektroskopisch untersucht und mit der entsprechenden Wildtyp-Hydrogenase verglichen. Bei der Reinigung der VhuF-Hydrogenase zeigte die VhuF-Untereinheit eine deutlich größere apparente Masse als die VhuA-Untereinheit des Wildtyps (Abb. 3.1.1). Die spezifische Aktivität unterschied sich mit 21 000 U/mg kaum von der Wildtyp Hydrogenase mit 22 550 U/mg. Um Veränderungen am aktiven Zentrum festzustellen, die die Mutation verursacht hätte, wurde gereinigte Fraktion der Hydrogenase im aktiven Zustand EPR-spektroskopisch untersucht. Beim Vergleich der Ni-C Spektren konnten

keine Abweichungen vom Spektrum der Wildtyp-Hydrogenasen festgestellt werden. Das Spektrum der VhuF-Hydrogenase zeigte das typische rhombische Signal des Ni bei $g_x = 2,21$, $g_y = 2,15$ und $g_z = 2,01$. Das g_z -Signal konnte erst nach Subtraktion des lichtinduzierten Spektrums sichtbar gemacht werden (Abb. 3.1.3). Die g -Werte entsprachen den bereits bekannten Werten der selenhaltigen Hydrogenasen aus *M. voltae* (Sorgenfrei et al., 1997).

Um die Ergebnisse der EPR-Spektroskopie durch Überprüfung des zweiten Metalls, dem Fe im aktiven Zentrums zu ergänzen, wurde die Mutante VhuF und die Wildtyp-Hydrogenase Vhu mittels FT-IR Spektroskopie untersucht. Dabei konnten die Banden für die CO und CN⁻-Liganden detektiert werden. Sie zeigten eine mit dem Oxidationszustand des Nickels abhängige Verschiebung der Signale (1917 cm^{-1} und 1929 cm^{-1}). Beide Hydrogenasen zeigen aber kaum Unterschiede in den Schwingungsfrequenzen. Im Vergleich zu anderen Hydrogenasen eines einheitlichen Redoxzustandes (Ni-C) fand sich eine Verschiebung der CO-Schwingung zu niedrigeren Wellenzahlen (Tab. 3.4.1). Auffallend ist nur, daß der Abstand der Valenzschwingungssignale der CN⁻-Liganden der Vhu und VhuF Hydrogenase mit 21 cm^{-1} fast doppelt so groß ist, als bei den anderen Hydrogenasen. Dies deutet auf geringfügige Unterschiede in der Ligandenanordnung des bimetalischen Zentrums hin, wie sie auch im Vergleich der kristallisierten Hydrogenasen aus *D. gigas* und *D. baculatum* zu erkennen sind.

Aus den spektroskopischen Untersuchungen ergaben sich daher keine erkennbaren Veränderungen am aktiven Zentrum der VhuF-Hydrogenase im Vergleich zum Wildtypenzym. Dies zeigt sich auch daran, daß unter H₂ Sättigung keine nennenswerten Veränderungen der Aktivität festzustellen waren. Bei Messungen der Michaelis-Menten Konstante (K_M) wurde allerdings festgestellt, daß die Mutante mit $25\text{ }\mu\text{M}$ einen nahezu zehnfach höheren Wert hatte als der Wildtyp ($2,7\text{ }\mu\text{M}$). Dies wurde auch für den K_I -Wert bei der Inhibition mit CO festgestellt (Tab. 3.1.2). Durch die Erhöhung des K_M -Wertes sinkt die Affinität zu H₂ und das Enzym kann V_{max} erst bei höheren H₂-Konzentrationen erreichen. Das würde bedeuten, daß die Mutante unter H₂-limitierenden Bedingungen im Gegensatz zum Wildtyp schlechter wachsen könnte, was sich besonders in natürlichen Habitaten auswirken würde, wo ein H₂-Partialdruck von $1\text{-}10\text{ Pa}$ ($10^{-4}\text{-}10^{-5}\text{ bar}$) herrscht (Wolfe, 1971), der um das 10^5 fache niedriger ist als unter Laborbedingungen (1200 hPa). In seinem natürlichen Lebensraum muß der Organismus mit anderen H₂ verbrauchenden Bakterien und Archaea um Wasserstoff konkurrieren (Morgan et al., 1997). Da diese Organismen für H₂ als Substrat ähnliche K_M -Werte aufweisen (Fauque et al., 1988), wäre eine Erhöhung des K_M -Wertes ein selektiver Nachteil für den Organismus. Im Fall der Vhu-Hydrogenase aus *M. voltae* könnte die Zusammensetzung der großen Untereinheit aus zwei

unabhängigen Polypeptiden ein Vorteil sein. Anhand von Strukturvergleichen mit der selenhaltigen Hydrogenase aus *D. baculatum*, bei der die Liganden das aktiven Zentrums Bestandteil einer großen Untereinheit sind, kann man feststellen, daß sich die Mutationen, die zu der Fusion führen am Anfang einer α -Helix befinden würden, die an der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist (Abb.4.1.).

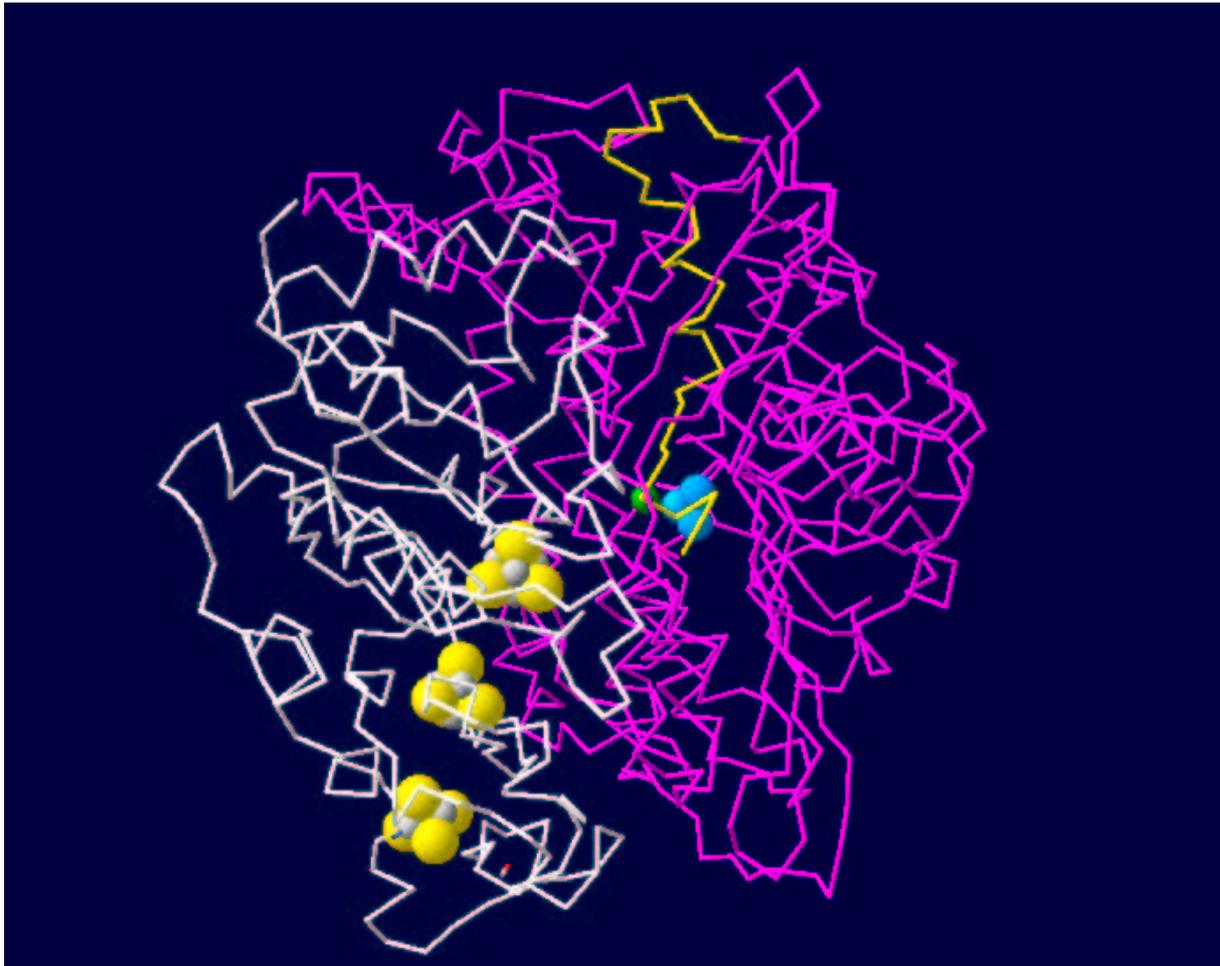


Abb. 4.1: Darstellung der Kristallstruktur der selenhaltigen [NiFe] Hydrogenase aus *D. baculatum*.

Die große Untereinheit mit dem aktiven Zentrum ist in magenta dargestellt. Der C-terminale Teil, der der kleinen Untereinheit VhuU entsprechen würde, ist gelb dargestellt. Die Fusion befindet sich demnach direkt am Übergang der großen zur VhuU-Untereinheit befinden und ist unmittelbar an der Oberfläche lokalisiert. Die kleine Untereinheit aus *M. voltae* enthält zwei Liganden (SeCys, Cys), die zusammen mit zwei Cys-Liganden der großen Untereinheit das bimetallische aktive Zentrum komplexieren (Ni ist grün dargestellt, Fe mit den CO, CN⁻ Liganden blau). Die kleine Untereinheit mit den [Fe-S] Clustern ist weiß dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm SwissProt PDBviewer und den aus der Datenbank (PDB) verfügbaren Daten (Acc.Nr. 1CC1) der Hydrogenase aus *D. baculatum* angefertigt.

Das C-terminale Ende des entsprechenden Teils der kleinen Untereinheit ragt in die große Untereinheit hinein, wo sich das [NiFe] Zentrum befindet. Durch die Mutation kommt es zu

einer Fixierung von VhuU an die große Untereinheit. Deren Bewegungsmöglichkeit ist im Vergleich zum Wildtyp eingeschränkt und kann unter Umständen zu Veränderungen im aktiven Zentrum führen, die bei der Messung von FT-IR und EPR-Proben nicht detektierbar sind. Diese Veränderungen könnten sich in einer Erhöhung des K_M -Wertes bemerkbar machen.

Möglicherweise könnte die Fixierung auch einen Einfluß auf die Prozessierung der großen Untereinheit haben. Bei der Reifung von Hydrogenasen erfolgt der Einbau des bimetallichen Reaktionszentrums bevor die α -Helices des C-Terminus nach einer spezifischen Protolyse der großen Untereinheit in das Protein eingebaut werden (Rossmann et al., 1994), (Maier und Böck, 1996). Durch die Fusion der kleinen Untereinheit ist die Flexibilität des freien C-Terminus der Mutante nicht so hoch wie im Wildtyp. Es könnte so zu sterischen Wechselwirkungen mit den an der Prozessierung und am Ni-Einbau beteiligten Enzyme kommen, die den Einbau des aktiven Zentrums nicht verhindern aber zu geringfügigen Veränderungen führen, die eine Auswirkung auf den K_M -Wert haben.

4.2 Selenfreie Hydrogenasen in *M. voltae*

Die Expression der vier sequenzierten Hydrogenaseengruppen *frc*, *fru*, *vhc* und *vhu* wurde in Abhängigkeit der Selenkonzentration untersucht (Berghöfer et al., 1994). Unter selenlimiterenden Bedingungen wird die Transkription der selenfreien Hydrogenasen *Frc* und *Vhc* induziert. Die selenfreien Hydrogenasen werden durch eine gemeinsame intergene Region transkribiert (Beneke et al., 1995), (Snieszko et al., 1998). Durch Reporterengonstrukte konnten *cis*-Elemente identifiziert werden, die an der negativen Regulation der *vhc* und *frc* Transkription in Gegenwart von Selen beteiligt sind. Eine Beteiligung der selenhaltigen kleinen Untereinheit VhuU an der negativen Regulation dieser Gengruppen konnte ausgeschlossen werden (Pfeiffer et al., 1998b)a. In diesem Zusammenhang wurde versucht eine Mutante herzustellen, bei der das *vhuU*-Gen deletiert wurde. Die Deletion wurde in selenfreiem Medium durchgeführt, damit die Möglichkeit der Expression der selenfreien Hydrogenasen besteht. Unter diesen Bedingungen könnten sie die Funktion der selenhaltigen Hydrogenasen im Energiestoffwechsel übernehmen. Es wurden aber nur Zellen erhalten, die sowohl die *vhuU* Deletion, als auch eine Kopie des intakten Wildtyp-Gens besaßen (Pfeiffer et al., 1998a)b. Ohne die kleinen Untereinheit VhuU kann es nicht zu einer funktionellen Hydrogenase kommen, da sie mit Sec440 und Cys443 zwei Liganden des aktiven Zentrums stellt. Dabei scheint die selenhaltige F_{420} nicht reduzierende Hydrogenase unter den gewählten Laborbedingungen essentiell für die Zelle zu sein. Die

Funktion des Enzyms kann offenbar nicht durch die Expression der selenfreien Isoenzyme ersetzt werden ohne das Wachstum der Zellen erheblich zu verlangsamen. Zur Aufklärung der Funktion der selenfreien Enzyme wurde deshalb versucht, diese aus Zellen, die unter Selen limitierenden Bedingungen gewachsen waren und unter denen eine Expression beobachtet werden konnte, zu reinigen. Bei der Charakterisierung der Hydrogenasen sollte die Funktion des Selens bei der Spaltung des Wasserstoffs untersucht werden und zeigen, welche Unterschiede dadurch in den katalytischen Konstanten zu beobachten wären. Die Anzucht unter Selen limitierenden Bedingungen erwies sich als schwierig, da die Zellen eine mehr als vierfach längere Verdoppelungszeit hatten. Die Hydrogenaseaktivität mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor, die während der Reinigung gemessen werden konnte, war äußerst gering. Mit F₄₂₀ konnte keine Aktivität gemessen werden. Das Protein aus der gereinigten Fraktion, bei der schließlich Benzylviologen reduzierende Aktivität gemessen wurde, wurde ansequenziert. Es stellte sich heraus, daß es sich nicht um die selenfreie Vhc Hydrogenase handelte, sondern um die selenhaltige Vhu-Hydrogenase. Das bedeutet, daß die äußerst geringen Mengen an Selen, die noch im Medium verblieben waren, ausreichten um zu einer Expression der Vhu-Hydrogenase zu führen. Versuche, das Selenocystein der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase gegen Cystein zu tauschen blieben bisher erfolglos (Sorgenfrei, 1995). Bei dieser Mutation wurde das für Selenocystein codierende TGA-Codon in ein Cysteincodon (TGC, TGT) umgewandelt. Außerdem wurden drei weitere Punktmutationen in die für den Einbau des Selenocysteins notwendige Sekundärstruktur der mRNA eingebaut. Es wurden zwar Transformanten mit den erwünschten Mutationen im Genom gefunden. Bei der Reinigung der Hydrogenase stellte sich jedoch heraus, daß immer noch Selenocystein statt Cystein eingebaut wurde. Mit Mutationen, bei denen weitere Basenaustausche in die Sekundärstruktur der mRNA eingeführt wurden, bzw. die eine komplette Deletion dieses Bereichs trugen, konnten in keinem Fall überlebensfähigen Transformanten erhalten werden.

Daraus läßt sich schließen, daß die Zelle für die entsprechenden selenhaltigen Hydrogenasen, die an essentiellen Stoffwechselwegen beteiligt sind, keine Alternativen in schwefelhaltigen Enzymen hat, damit die Zellen unter Laborbedingungen optimal wachsen. Unter selenfreien Bedingungen kann *M. voltae* daher nur sehr eingeschränkt wachsen. In natürlichen Habitaten schwankt die Selenkonzentration relativ stark und kann sogar weniger als 1 nM betragen (Fishbein, 1991). Unter diesen Wachstumsbedingungen ist die Generationsdauer so lang, daß Untersuchungen zur Anpassung an gewisse Stoffwechselsituationen im Labor nur schwer möglich sind.

4.3 Der Austausch des zentralen [4Fe-4S] Clusters der F₄₂₀-reduzierenden Hydrogenase Fru in einen [3Fe-4S] Cluster führt zu einem deutlichen Aktivitätsverlust.

Der Elektronentransport auf einen Akzeptor erfolgt bei Hydrogenasen über die [Fe-S] Cluster der kleinen Untereinheit. Es können dabei unterschiedliche Zusammensetzungen von [2Fe-2S], [3Fe-4S] oder [4Fe-4S] Clustern vorkommen (Cammack, 1992), (Albracht, 1994). [NiFeSe] Hydrogenasen zeichnen sich dadurch aus, daß die Elektronentransportkette nur aus [4Fe-4S] Clustern besteht, während sie bei [NiFe] Hydrogenasen meist aus einem proximalen und distalen [4Fe-4S] Cluster und einem zentral positionierten [3Fe-4S] Cluster besteht. Die Cluster unterscheiden sich wesentlich in ihrem Redoxpotential. Während [4Fe-4S] Cluster ein Redoxpotential im Bereich von -550 mV bis -250 mV haben, liegt das Redoxpotential von [3Fe-4S] Clustern zwischen -130 und +60 mV (Cammack et al., 1985), (Rousset et al., 1998). Die fast lineare Anordnung der Cluster in der kleinen Untereinheit der Hydrogenasen deutet darauf hin, daß der Elektronentransport vom proximalen, über den zentralen zum distalen Cluster erfolgt (Volbeda et al., 1995). Betrachtet man die Redoxpotentiale der einzelnen Cluster, so fällt auf, daß der zentrale Cluster der [NiFe] Hydrogenase aus *D. gigas* mit -70 mV ein deutlich höheres Redoxpotential hat als der proximale (-340 mV) und der distale (-290 mV). Diese Tatsache spricht aus thermodynamischer Sicht nicht für einen Elektronentransport entlang der einzelnen Cluster, da eine Potentialdifferenz von 220 mV überwunden werden muß. Bei Hydrogenasen, die 3 [4Fe-4S] Cluster enthalten besteht ein kaum meßbarer Unterschied zwischen den einzelnen Redoxpotentialen (Teixeira et al., 1990), so daß man auch hier keinen optimalen Elektronentransport wie z.B. in der Atmungskette erwarten sollte. Um die Rolle der [Fe-S] Cluster im Fall von *M. voltae* zu überprüfen, wurde der zentrale [4Fe-4S] Cluster über ortsgerichtete Mutagenese gegen einen [3Fe-4S] Cluster ausgetauscht (3.3). Um die Mutante und den Wildtyp als isogene Stämme vergleichen zu können, wurde das Konstrukt für die homologe Rekombination so gewählt, daß sich die amplifizierte *pac*-Kassette in puromycinfreiem Medium wieder eliminieren konnte (3.3.1). Beim Vergleich der Aktivitäten der Mutante Fru* mit der Wildtyp-Hydrogenase Fru stellte sich heraus, daß die Aktivität mit dem künstlichen Elektronenakzeptor Benzylviologen fast unverändert bei 345 U/mg für den Wildtyp und 540 U/mg für die Mutante lag, während die Aktivität für die Reduktion des natürlichen Akzeptors

F_{420} um mehr als das Zehnfache von 364 U/mg beim Wildtyp auf 28 U/mg bei der Mutante abnahm. Die EPR-spektroskopischen Untersuchungen der aktiven, reduzierten Hydrogenasen zeigten, daß im Ni-C Zustand am aktiven Zentrum keine sichtbaren Veränderungen aufgetreten waren (Abb. 3.11). Die Untersuchung der [4Fe-4S] Cluster im reduzierten Zustand bei Temperaturen von 9 K ergab, daß das Kopplungsverhalten des proximalen [4Fe-4S] Cluster mit dem Ni-Zentrum zwischen Mutante und Wildtyp gleich war (Abb. 3.9 I, II), so daß man davon ausgehen kann, daß die Mutation keinen Einfluß auf das aktive Zentrum und den proximalen Cluster genommen hat. Dies wurde auch anhand der Ni-C Spektren bei 35 K deutlich, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (Abb. 3.10). An den Spektren der reduzierten [Fe-S] Cluster erkennt man weiterhin, daß das Radikalsignal des Flavins im Wildtyp bei hohen Mikrowellenleistungen von 20,1 mW im Gegensatz zur Mutante abgesättigt wird. Dies könnte unter Umständen ein Einfluß des [3Fe-4S] Clusters sein, der einen gewissen Abschirmungseffekt ausübt, so daß es sogar bei einer Mikrowellenleistung von 200 mW nicht zu einer Absättigung des Signals kam (nicht gezeigt). Im oxidierten Zustand bei 9 K ist eindeutig das leicht aufgespaltene Signal des neu entstandenen [3Fe-4S] Cluster bei $g = 2,013$ zu erkennen. Die Bestimmung der Redoxpotentiale zeigte, daß das Potential des neu entstandenen [3Fe-4S] Clusters erwartungsgemäß angestiegen war. Die Potentialdifferenz zwischen dem ursprünglichen [4Fe-4S] Cluster (-370 mV) und dem [3Fe-4S] Cluster ($+60$ mV) beträgt 430 mV. Nach diesem Anstieg des Redoxpotentials ist das Enzym nicht mehr in der Lage, die Elektronen optimal auf den natürlichen Elektronenakzeptor F_{420} zu übertragen. Obwohl Benzylviologen mit einem Redoxpotential von -350 mV einen ähnlichen Wert wie freies F_{420} (-360 mV) hat, wird die Reduktion dieses Elektronenakzeptors nicht beeinträchtigt. Die Aktivität mit Benzylviologen ist im Vergleich zum Wildtyp sogar etwas größer. Dies deutet darauf hin, daß für die Elektronenübertragung auf den künstlichen Akzeptor der zentrale [Fe-S] Cluster nicht von Bedeutung ist, sondern daß die Elektronen höchstwahrscheinlich über den proximalen [4Fe-4S] Cluster übertragen werden. Dies wurde auch für andere Hydrogenasen, wie die $\beta\delta$ -Untereinheit der NAD-gekoppelten [NiFe] Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* H16 gezeigt (Livingston et al., 1987) (Erkens et al., 1996). Sie enthält nur einen [4Fe-4S] Cluster über den der Elektronentransport auf einen künstlichen Akzeptor wie Methylviologen verläuft. Der natürliche Akzeptor konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Der Anstieg der Aktivität mit Benzylviologen könnte dadurch erklärt werden, daß es durch das stark angestiegene Potential des zentralen Clusters zu einem Engpass in der Weiterleitung der Elektronen kommt, so daß der proximale Cluster praktisch nur im reduzierten Zustand vorliegt und auf diese Weise die

Elektronen schneller abgeben kann.

Ein weiterer Versuch, die Rolle des zentralen Clusters zu klären, wurde von Rousset et al. (Rousset et al., 1998) durchgeführt. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde hier der zentrale [3Fe-4S] Cluster der [NiFe] Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans* in einen [4Fe-4S] Cluster umgewandelt. Das Redoxpotential des zentralen Clusters wurde dadurch um 315 mV von +65 mV auf -250 mV gesenkt. Die Potentialdifferenz zwischen dem zentralen und distalen Cluster der Mutante war mit je -250 mV und -380 mV immer noch ungünstig, jedoch nicht so wie bei der Wildtyp Hydrogenase mit +65 mV und -340 mV. Die Auswirkung auf die Enzymaktivität war jedoch gering. Die Aktivität für die Reduktion des künstlichen Elektronenakzeptors Methylviologen verringerte sich sogar um 37 %, ebenso für die Reduktion des natürlichen Elektronenakzeptors Cytochrom c_3 . Allein die Aktivität für die H₂ Produktion stieg um 37 % an. Ein mit der Abnahme des Redoxpotentials von 315 mV erwarteter Anstieg der Aktivität mit Cytochrom c_3 als Elektronenakzeptor konnte nicht beobachtet werden.

Eine Erklärung für den geringen Einfluß des Redoxpotentials der Metallzentren auf den intramolekularen Elektronentransport könnte das Tunneln der Elektronen durch die Proteinmatrix sein (Beratan und Skourtis, 1998). Dabei wird angenommen, daß Elektronentransport über längere Strecken generell über Tunneln verläuft und daß die Elektronentransportrate stark von der Proteinstruktur zwischen den jeweiligen Redoxzentren abhängig ist. So sind Elektronentransportraten entlang kovalenter Bindungen in β -Faltblattstrukturen effizienter als über Wasserstoffbrückenbindungen in α -Helices (Bendall, 1996), (Holm, 1996). Beim Vorgang des Tunnelns geht man davon aus, daß Elektronendonator und -akzeptor in einem Übergangszustand mit gleichen Energien vorliegen. In diesem Zustand ist der Tunneleffekt möglich (Marcus, 1997). Um eine Vorstellung von diesem Effekt zu erhalten benutzt man das Modell des Teilchens im Kasten. Sehr vereinfacht dargestellt geht man davon aus, daß das Teilchen innerhalb des Kastens eine endliche Energie besitzt, bei der die Wellenfunktion (Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Teilchens) von Null verschieden ist. Wenn die Energie der Kastenwände nicht unendlich hoch ist (porös), fällt die Wellenfunktion an der Wand nicht auf Null ab, sondern fängt langsam wieder an zu oszillieren (von Null verschieden). Das bedeutet, daß das Teilchen auch außerhalb des Kastens eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit hat, was nach der klassischen Physik nicht möglich wäre. Das Tunneln hängt proportional von der Quadratwurzel der Masse ab. Je leichter ein Teilchen, desto besser kann es tunneln, was vor allem auf Elektronen zutrifft.

Untersuchungen von Page et al. ergaben, daß die Elektronentransportrate über den Tunneleffekt

entlang von Redoxzentren nicht von den jeweiligen Redoxzuständen abhängig ist (Page et al., 1999). Theoretische Berechnungen zeigen, daß der Elektronentransport in erster Linie vom Abstand der Redoxpartner zueinander abhängig ist. Auch unter Berücksichtigung thermodynamisch ungünstiger Redoxpotentiale, bei denen ein Energieunterschied von 0,4 eV überwunden werden muß (*D. fructosovorans* Wildtyp-Hydrogenase) liegt der berechnete Wert von k_{kat} deutlich über dem experimentell ermittelten Wert. Das würde bedeuten, daß das Redoxpotential der Metallzentren keinen Einfluß auf den intramolekularen Elektronentransport haben. Die Redoxzentren sollten dabei in einem Abstand von maximal 14 Å zueinander liegen, was bei den [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen der Fall ist (Volbeda et al., 1995), (Garcin et al., 1999). Page et al. nehmen an, daß die Unabhängigkeit der Elektronentransportrate daher kommt, daß Oxidoreduktasen wie [NiFe] Hydrogenasen so flexibel aufgebaut sind, daß der Elektronentransportweg im Protein nicht festgelegt ist. Es müssen nur gewisse Parameter wie der Abstand der Redoxzentren und die Packungsdichte des Proteins gegeben sein, um Elektronentransport zu ermöglichen. Diese Annahme wird im Fall des [3Fe-4S] Clusteraustauschs bei der Hydrogenase aus *D. fructosovorans* unterstützt. Obwohl die Potentialdifferenz zwischen den Clustern verringert wurde, kam es nicht zu dem erwarteten Aktivitätsanstieg, so daß man davon ausgehen kann, daß die Proteinstruktur der kleinen Untereinheit der Hydrogenase so „robust“ aufgebaut ist (Page et al., 1999), daß ein Elektronentransport unabhängig von Redoxpotentialen und Art der [Fe-S] Cluster stattfinden kann. Im Fall des Clusteraustauschs in der F₄₂₀-reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae* trifft dies offenbar nicht zu. In Bezug auf Benzylviologen konnten keine Veränderungen bezüglich der Aktivität festgestellt werden, was aber darauf zurückzuführen sein kann, daß die Elektronenübertragung direkt am unveränderten proximalen [4Fe-4S] Cluster stattfinden kann. In Bezug auf F₄₂₀ als natürlichem Elektronenakzeptor wurde eine mehr als zehnfache Abnahme der spezifischen Aktivität und des k_{kat} -Wertes (Tab.3.3.3) von 364 U/mg auf 28 U/mg bzw. von 606 s⁻¹ auf 46 s⁻¹ festgestellt. Anhand der EPR-Spektren konnte aber gezeigt werden, daß das aktive Zentrum und die verbliebenen [4Fe-4S] Cluster nicht von der Mutation betroffen waren, so daß es hierdurch nicht zu einer Beeinträchtigung der Aktivität kommen kann. Die Voraussetzung, daß der Abstand zwischen den Redoxzentren nicht größer als 14 Å sein darf, um das Tunneln zwischen den Clustern zu ermöglichen, ist wahrscheinlich auch erfüllt, da die Struktur, die über Modeling by Homology nach der Kristallstruktur der Hydrogenase aus *D. gigas* erhalten wurde, einen Abstand der Cluster von etwa 10 Å zeigte, der sich nach der Mutation nicht verändert haben sollte. Nach den hier beschriebenen Befunden müßte ein Elektronentransport ähnlich wie

im Wildtyp möglich sein, was jedoch aufgrund des beobachteten Aktivitätsverlustes nicht angenommen werden kann. Die Theorie, daß der Elektronentransport unabhängig von den Redoxpotentialen der einzelnen [Fe-S] Clustern ist, läßt sich daher nicht generell anwenden. Der Aufbau der F₄₂₀-reduzierenden Hydrogenase, sowie der Hydrogenase aus *D. fructosovorans* mit den entsprechenden [Fe-S] Clustern und Redoxpotentialen scheint aufgrund natürlicher Selektion der optimierten Form des jeweiligen Enzym zu entsprechen. Mutationen führen daher tendentiell eher zu Verschlechterungen der Enzymfunktion.

4.4 Ausblick

Mit der Methode der EXAFS-Spektroskopie können weitere Beiträge, die zu einer Aufklärung des Unterschieds zwischen selen- und schwefelhaltigen Hydrogenasen führen, erbracht werden. Mit EXAFS-Experimenten kann das Redoxverhalten des Ni-Zentrums in selenhaltigen [NiFe] Hydrogenasen untersucht werden und man erhält damit einen weiteren Einblick in den Reaktionsmechanismus des aktiven Zentrums. In diesem Zusammenhang könnte die Rolle des Selens im Unterschied zu Schwefel untersucht werden.

Um einen Vergleich zwischen den selenhaltigen und schwefelhaltigen Hydrogenasen aus *M. voltae* ziehen zu können, müsste versucht werden, die Hydrogenasen Vhc und Frc mit Hilfe starker Promotoren homolog zu exprimieren. Dabei wäre es von Vorteil ein Fusionsprotein mit Hämagglutinin (o.ä.) herzustellen, damit die Expression der Hydrogenasen immunologisch detektiert werden kann und die Möglichkeiten für eine anschließende Affinitätsreinigung besteht.

Durch Mutationen wurde der zentrale [4Fe-4S] Clusters der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase gegen einen [3Fe-4S] Cluster ausgetauscht. Die Untersuchungen der Mutante zeigten, daß der Cluster am Elektronentransport auf den natürlichen Akzeptor F₄₂₀ beteiligt sein muß, während er bei der Reduktion von Benzylviologen wahrscheinlich keine Rolle spielt. Um dies zu klären müßte der zentrale Cluster komplett deletiert werden, damit eine Aktivität mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor unabhängig von dem zentralen Cluster festgestellt werden könnte.

5. Zusammenfassung

Der Elektronentransport verläuft bei den meisten [NiFe] Hydrogenasen vom aktiven Zentrum über drei [Fe-S] Cluster auf einen Elektronenakzeptor. Kristallstrukturen verschiedener [NiFe] Hydrogenasen zeigten, daß es sich dabei um einen proximalen, dem aktiven Zentrum benachbarten [4Fe-4S] Cluster handelt, um einen zentralen [4Fe-4S] oder [3Fe-4S] Cluster und einen distalen [4Fe-4S] Cluster. Sie sind hintereinander in einem Abstand von etwa 10 Å angeordnet, so daß ein direkter Elektronentransport von einem Cluster zum nächsten möglich ist. Die Redoxpotentiale, die für die Hydrogenase aus *D. gigas* gemessen wurden zeigten für den mittleren Cluster ein deutlich höheres Potential als für den proximalen und distalen Cluster. Da ein Elektronentransport unter diesen Umständen thermodynamisch ungünstig ist, wurde eine Beteiligung des zentralen Clusters als Bestandteil in einer Redoxkette am intramolekularen Elektronentransport für unwahrscheinlich gehalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des zentralen [4Fe-4S] Clusters der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae* untersucht. Durch Mutationen der Cystein-Liganden wurde der [4Fe-4S] Cluster gegen einen [3Fe-4S] Cluster getauscht. Um die entsprechenden Liganden zu identifizieren wurde vorher über Sequenzvergleiche und Modeling by Homology mit Daten bereits kristallisierter Hydrogenasen eine Struktur bestimmt, mit der die Cystein-Liganden ermittelt werden konnten. Die Mutation wurde EPR-spektroskopisch an der oxidierten Form des Enzyms bewiesen. Die Bestimmung der Redoxpotentiale der [3Fe-S] Cluster zeigten einen Anstieg des Potentials von -370 mV für den [4Fe-4S] Cluster auf +60 mV für den [3Fe-4S] Cluster. Die Aktivität der Hydrogenase zeigte keinen Unterschied mit Benzylviologen als künstlichem Elektronenakzeptor. Mit F₄₂₀ als natürlichem Elektronenakzeptor wurde eine zehnfach geringere Aktivität gemessen, die zeigt, daß der zentrale Cluster der F₄₂₀ reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae* am Elektronentransport beteiligt sein muß und diesen bei Erhöhung des Redoxpotentials limitiert.

Im Gegensatz zu den meisten bekannten Hydrogenasen besteht die großen Untereinheit der selenhaltigen F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus *M. voltae* aus zwei unabhängigen Polypeptiden, die jeweils zwei Liganden des aktiven Zentrums enthalten. Die kleinere Untereinheit VhuU enthält Selen als Liganden des Nickels. Um die biologische Funktion der Trennung der *vhuA* und *vhuU*-Gene zu klären wurde die Fusionsmutante VhuF, bei der die kleine Untereinheit Bestandteil der großen ist, biochemisch und spektroskopisch charakterisiert. Dabei konnte mit Hilfe von EPR- und FT-IR-Spektroskopie gezeigt werden, daß zwischen der Mutante

VhuF und dem Wildtyp kein erkennbarer Unterschied vorhanden war. Biochemische Untersuchungen zeigten, daß sich sowohl der K_M -Wert (H_2) der Mutante als auch der K_I für CO als kompetitiven Inhibitor um eine Größenordnung erhöht hatte. Für die Mutante wäre daher ein Wachstum unter H_2 -limitierenden Bedingungen, wie sie in natürlichen Habitaten normalerweise herrschen, im Vergleich zum Wildtyp erschwert.

Unter selenlimitierenden Bedingungen wurde die Expression der selenfreien Hydrogenasen aus *M. voltae* festgestellt. Um die Eigenschaften von selenhaltigen und schwefelhaltigen Hydrogenasen eines Organismus vergleichen zu können, wurde versucht die Hydrogenasen aus selenfreiem Medium, bei dem eine Expression der selenfreien Hydrogenasen erwartet wurde, zu reinigen. Die Sequenzanalysen des gereinigten Enzyms, das Hydrogenaseaktivität hatte, zeigten jedoch, daß es sich um die selenhaltige F₄₂₀ nicht reduzierende Hydrogenase handelte. Eine ausreichende Expression der selenfreien Hydrogenasen ist unter diesen Bedingungen daher nicht möglich.

6. Literatur

Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Baumer, S., Beifuss, U., and Deppenmeier, U. (1998). Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1, J. Bacteriol. *180*, 2027-32.

Adams, M. W., and Mortenson, L. E. (1984). The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I, J. Biol. Chem. *259*, 7045-55.

Afting, C., Hochheimer, A., and Thauer, R. K. (1998). Function of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F₄₂₀ reduction with H₂, Arch. Microbiol. *169*, 206-10.

Albracht, S. J. P. (1994). Nickel hydrogenases: in search of the active site, Biochim. Biophys. Acta *1188*, 167-204.

Albracht, S. P. (1985). The use of electron-paramagnetic-resonance spectroscopy to establish the properties of nickel and the iron-sulphur cluster in hydrogenase from *Chromatium vinosum*, Biochem. Soc. Trans. *13*, 582-5.

Albracht, S. P., Graf, E. G., and Thauer, R. K. (1982). The EPR properties of nickel in hydrogenase from *Methanobacterium*, FEBS Lett. *140*, 311-3.

Alting-Mees, M. A., and Short, J. M. (1989). pBluescriptII:gene mapping vectors, Nucl Acids Res. *17*, 9494.

Anderson, M. L., and Young, B. D. (1985). Quantitative filter hybridization (Oxford, IRL Press).

Asso, M., Guigliarelli, B., Yagi, T., and Bertrand, P. (1992). EPR and redox properties of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki hydrogenase: comparison with the Ni-Fe enzyme from *Desulfovibrio gigas*, Biochim. Biophys. Acta *1122*, 50-6.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology* (New York, John Wiley & Sons, Inc.).

Bagley, K. A., Van Garderen, C. J., Chen, M., Duin, E. C., Albracht, S. P., and Woodruff, W. H. (1994). Infrared studies on the interaction of carbon monoxide with divalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*, *Biochemistry* 33, 9229-36.

Barondeau, D. P., Roberts, L. M., and Lindahl, P. A. (1994). Stability of the Ni-C state and oxidative titrations of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase monitored by EPR and electronic absorption spectroscopies, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3442-3448.

Bendall, D. S. (1996). *Protein Electron Transfer*, BIOS Scientific.

Beneke, S., Bestgen, H., and Klein, A. (1995). Use of the *Escherichia coli uidA* gene as a reporter in *Methanococcus voltae* for the analysis of the regulatory function of the intergenic region between the operons encoding selenium-free hydrogenases, *Mol. Gen. Genet.* 248, 225-8.

Beratan, D. N., and Skourtis, S. S. (1998). Electron transfer mechanisms, *Curr. Op. Chem. Biol.* 2, 235-243.

Berghöfer, Y., Agha-Amiri, K., and Klein, A. (1994). Selenium is involved in the negative regulation of the expression of selenium-free [NiFe] hydrogenases in *Methanococcus voltae*, *Mol. Gen. Genet.* 242, 369-73.

Bingemann, R. (1997) Charakterisierung der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus *Methanococcus voltae*, Diplomarbeit, Philipps-Universität, Marburg.

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-54.

- Britten, R. J., and Davidson, E. H. (1985). *Hybridisation strategy* (Oxford, IRL Press).
- Brodersen, J., Gottschalk, G., and Deppenmeier, U. (1999). Membrane-bound $F_{420}H_2$ -dependent heterodisulfide reduction in *Methanococcus voltae*, *Arch. Microbiol.* *171*, 115-21.
- Brosius, J. (1989). Superpolylinkers in cloning and expression vectors, *Gene* *8*, 759-777.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., *et al.* (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, *Science* *273*, 1058-73.
- Cammack, R. (1992). Iron-Sulfur Clusters in Enzymes: Themes and Variations, *Adv. Inorg. Chem.* Vol 38 (London).
- Cammack, R., Patil, D. S., and Fernandez, V. M. (1985). Electron-spin-resonance/electron-paramagnetic-resonance spectroscopy of iron-sulphur enzymes, *Biochem. Soc. Trans.* *13*, 572-8.
- Cammack, R., Patil, D. S., Hatchikian, C. E., and Fernández, V. M. (1987). Nickel and iron-sulphur centres in *Desulfovibrio gigas* hydrogenase: ESR spectra, redox properties and interactions, *Biochim. Biophys. Acta* *912*, 98-109.
- Cammack, R., Rao, K. K., Serra, J., and Llama, M. J. (1986). The redox properties of the iron-sulphur cluster in hydrogenase from *Chromatium vinosum*, strain Δ , *Biochimie* *68*, 93-6.
- Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA, *Anal. Biochem.* *201*, 134-9.
- Cleland, W. W. (1970). *The Enzymes*, Vol 2 (New York, Academic Press).
- Coremans, J. M., van der Zwaan, J. W., and Albracht, S. P. (1992). Distinct redox behaviour of prosthetic groups in ready and unready hydrogenase from *Chromatium vinosum*, *Biochim. Biophys. Acta* *1119*, 157-68.

Deng, W. P., and Nickoloff, J. A. (1992). Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site, *Anal. Biochem.* 200, 81-8.

DiMarco, A. A., Bobik, T. A., and Wolfe, R. S. (1990). Unusual coenzymes of methanogenesis, *Annu Rev Biochem* 59, 335-394.

Drapal, N., and Böck, A. (1998). Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation, *Biochemistry* 37, 2941-8.

Eidsness, M. K., Scott, R. A., Prickril, B. C., DerVartanian, D. V., Legall, J., Moura, I., Moura, J. J., and Peck, H. D., Jr. (1989). Evidence for selenocysteine coordination to the active site nickel in the [NiFeSe]hydrogenases from *Desulfovibrio baculatus*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 147-51.

Eirich, L. D., Vogels, G. D., and Wolfe, R. S. (1978). Proposed structure for coenzyme F₄₂₀ from *Methanobacterium.*, *Biochemistry* 17, 4583-93.

Erkens, A., Schneider, K., and Müller, A. (1996). The NAD-linked soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16: detection and characterization of EPR signals deriving from nickel and flavin, *J Bioinorg Chem* 1, 99-100.

Fauque, G., Peck, H. D., Jr., Moura, J. J., Huynh, B. H., Berlier, Y., DerVartanian, D. V., Teixeira, M., Przybyla, A. E., Lespinat, P. A., and Moura, I. (1988). The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*, *FEMS Microbiol. Rev.* 4, 299-344.

Fernandez, V. M., Rao, K. K., Fernandez, M. A., and Cammack, R. (1986). Activation and deactivation of the membrane-bound hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*, Norway strain, *Biochimie* 68, 43-8.

Ferry, J. G. (1997). Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*, *Biofactors* 6, 25-35.

- Fishbein, L. (1991). *Metals and metalloids, and their ions and compounds* (Weinheim, Merian).
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999). The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center, *Structure Fold Des* 7, 557-66.
- Golinelli, M. P., Akin, L. A., Crouse, B. R., Johnson, M. K., and Meyer, J. (1996). Cysteine ligand swapping on a deletable loop of the [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*, *Biochemistry* 35, 8995-9002.
- Guigliarelli, B., More, C., Fournel, A., Asso, M., Hatchikian, E. C., Williams, R., Cammack, R., and Bertrand, P. (1995). Structural organization of the Ni and (4Fe-4S) centers in the active form of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Analysis of the magnetic interactions by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Biochemistry* 34, 4781-90.
- Halboth, S., and Klein, A. (1992). *Methanococcus voltae* harbors four gene clusters potentially encoding two [NiFe] and two [NiFeSe] hydrogenases, each of the cofactor F₄₂₀- reducing or F₄₂₀-non-reducing types, *Mol. Gen. Genet.* 233, 217-24.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* 166, 557-80.
- Hancock, K., and Tsang, V. C. (1983). India ink staining of proteins on nitrocellulose paper, *Anal. Biochem.* 133, 157-62.
- Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P., and Bagley, K. A. (1997). Biological activation of hydrogen [letter], *Nature* 385, 126.
- Hausinger, R. (1997). Metallocenter assembly in nickel-containing enzymes, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2, 279-286.
- He, S. H., Teixeira, M., LeGall, J., Patil, D. S., Moura, I., Moura, J. J., DerVartanian, D. V., Huynh, B. H., and Peck, H. D., Jr. (1989). EPR studies with ⁷⁷Se-enriched (NiFeSe) hydrogenase

of *Desulfovibrio baculatus*. Evidence for a selenium ligand to the active site nickel, J. Biol. Chem. 264, 2678-82.

Higuchi, Y., Yagi, T., and Yasuoka, N. (1997). Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis, Structure 5, 1671-80.

Holm, R. E. (1996). Chem. Rev. 66, 22237-3042.

Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, Anal. Biochem. 114, 193-7.

Jones, W. J., Whitman, W. B., Fields, R. D., and Wolfe, R. S. (1983). Growth and plating efficiency of *Methanococci* on agar media, Appl. Environ. Microbiol. 46, 220-226.

Juszczak, A., Aono, S., and Adams, M. W. (1991). The extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*, contains a novel iron-hydrogenase whose cellular activity is dependent upon tungsten, J. Biol. Chem. 266, 13834-41.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, J. Biochem. Biophys. Meth. 10, 203-209

Klein, A. R., Fernandez, V. M., and Thauer, R. K. (1995). H₂-forming N⁵,N¹⁰-methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase: mechanism of H₂ formation analyzed using hydrogen isotopes, FEBS Lett. 368, 203-6.

Kolodziej, A. F. (1994). The chemistry of nickel-containing enzymes, Prog. Inorg. Chem. 41, 491-597.

Krasna, A. L., and Rittenberg, D. (1954). The mechanism of action of the enzyme hydrogenase, J. Am. Chem. Soc. 76, 3015-3020.

Künel, A., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1998). An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea, *Eur J Biochem* 252, 467-76.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.

Livingston, D. J., Fox, J. A., Orme-Johnson, W. H., and Walsh, C. T. (1987). 8-Hydroxy-5-deazaflavin-reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: 2. Kinetic and hydrogen-transfer studies, *Biochemistry* 26, 4228-37.

Maier, T., and Böck, A. (1996). Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form, *Biochemistry* 35, 10089-93.

Maier, T., and Böck, A. (1996). Nickel incorporation into hydrogenases (New York, VHC Publishers Inc.).

Maier, T., Lottspeich, F., and Böck, A. (1995). GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* 230, 133-8.

Marcus, R. A. (1997). Theory of rates of S_N2 reactions and relation to those of outer-sphere bond rupture electron transfers, *J. Phys. Chem.* 101, 4136-4141.

Maroney, M. J., Colpas, G. J., Bagyinka, N., and Mascharak, P. K. (1991). EXAFS investigation of the Ni site in *Thiocapsa roseopersicina* hydrogenase-evidence for a novel [FeS] cluster, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 3962-3972.

Medina, M., Hatchikian, E. C., and Cammack, R. (1996). Studies of light-induced nickel EPR signals in hydrogenase: comparison of enzymes with and without selenium, *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 227-236.

Menon, A. L., and Robson, R. L. (1994). In vivo and in vitro nickel-dependent processing of the [NiFe] hydrogenase in *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* 176, 291-5.

Menon, N. K., Robbins, J., Der Vartanian, M., Patil, D., Peck, H. D., Jr., Menon, A. L., Robson, R. L., and Przybyla, A. E. (1993). Carboxy-terminal processing of the large subunit of [NiFe] hydrogenases, *FEBS Lett.* *331*, 91-5.

Metcalf, W. W., Zhang, J. K., Apolinario, E., Sowers, K. R., and Wolfe, R. S. (1997). A genetic system for Archaea of the genus *Methanosarcina*: Liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *94*.

Morgan, R. M., Todd, D. P., Nölling, J., and Reeve, J. N. (1997). Hydrogen regulation of growth, growth yields and methane gene transcription in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H, *J. Bacteriol.* *169*, 889-898.

Moura, J. J. G., Teixeira, M., Moura, I., and LeGall, J. (1988). [NiFe]Hydrogenases from Sulfate-Reducing Bacteria: Nickel Catalytic and Regulatory Roles. In *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, J. J. R. Lancaster, ed. (Weinheim, VCH), pp. Kap.1, pp.1-28.

Muth, E., Mörschel, E., and Klein, A. (1987). Purification and characterization of an 8-hydroxy-5-deazaflavin- reducing hydrogenase from the archaebacterium *Methanococcus voltae*, *Eur. J. Biochem.* *169*, 571-7.

Noll, I., Müller, S., and Klein, A. (1999). Transcriptional regulation of genes encoding the selenium-free [NiFe]- hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae* involves positive and negative control elements, *Genetics* *152*, 1335-41.

Nölling, J., Ishii, M., Koch, J., Pihl, T. D., Reeve, J. N., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1995). Characterization of a 45-kDa flavoprotein and evidence for a rubredoxin, two proteins that could participate in electron transport from H₂ to CO₂ in methanogenesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Eur. J. Biochem.* *231*, 628-38.

Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction, *Nature* *402*, 47-52.

Patil, D. S., Moura, J. J., He, S. H., Teixeira, M., Prickril, B. C., DerVartanian, D. V., Peck, H.

D., Jr., LeGall, J., and Huynh, B. H. (1988). EPR-detectable redox centers of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*, *J. Biol. Chem.* *263*, 18732-8.

Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., and Seefeldt, L. C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution *Science* *282*, 1853-8.

Pfeiffer, M. (1998) Biochemische, spektroskopische und genetische Untersuchungen zur Funktion und Struktur der kleinsten, selenhaltigen Untereinheit der F₄₂₀ nicht reduzierenden Hydrogenase aus *Methanococcus voltae*, Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.

Pfeiffer, M., Bestgen, H., Bürger, A., and Klein, A. (1998a). The vhuU gene encoding a small subunit of a selenium-containing [NiFe]- hydrogenase in *Methanococcus voltae* appears to be essential for the cell, *Arch. Microbiol.* *170*, 418-26.

Pfeiffer, M., Bingemann, R., and Klein, A. (1998b). Fusion of two subunits does not impair the function of a [NiFeSe]- hydrogenase in the archaeon *Methanococcus voltae*, *Eur. J. Biochem.* *256*, 447-52.

Pfeiffer, M., Klein, A., Steinert, P., and Schomburg, D. (1995). An all sulfur analogue of the smallest subunit of F₄₂₀-non-reducing hydrogenase from *Methanococcus voltae*--metal binding and structure, *Biofactors* *5*, 157-68.

Pierik, A. J., Hulstein, M., Hagen, W. R., and Albracht, S. P. (1998a). A low-spin iron with CN and CO as intrinsic ligands forms the core of the active site in [Fe]-hydrogenases, *Eur. J. Biochem.* *258*, 572-8.

Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A., and Albracht, S. P. (1999). Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂, *J. Biol. Chem.* *274*, 3331-7.

Pierik, A. J., Schmelz, M., Lenz, O., Friedrich, B., and Albracht, S. P. (1998b). Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*, *FEBS Lett.* *438*, 231-5.

- Przybyla, A. E., Robbins, J., Menon, N., and Peck, H. D., Jr. (1992). Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases, *FEMS Microbiol. Rev.* 8, 109-35.
- Reeve, J. N., and Beckler, G. S. (1990). Conservation of primary structure in prokaryotic hydrogenases, *FEMS Microbiol. Rev.* 7, 419-24.
- Roberts, L. M., and Lindahl, P. A. (1994). Analysis of oxidative titrations of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase; implications for the catalytic mechanism, *Biochemistry* 33, 14339-50.
- Rossmann, R., Maier, T., Lottspeich, F., and Böck, A. (1995). Characterisation of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation, *Eur. J. Biochem.* 227, 545-50.
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F., and Böck, A. (1994). Maturation of the large subunit (HYCE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537, *Eur. J. Biochem.* 220, 377-84.
- Rousset, M., Montet, Y., Guigliarelli, B., Forget, N., Asso, M., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J. C., and Hatchikian, E. C. (1998). [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 11625-30.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5463-7.
- Schneider, K., Erkens, A., and Müller, A. (1996). On the Structure and Function of the Active

Center of the NAD-Linked Hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16, *Naturwissenschaften* 83, 78-81.

Shen, B., Jollie, D. R., Diller, T. C., Stout, C. D., Stephens, P. J., and Burgess, B. K. (1995). Site-directed mutagenesis of *Azotobacter vinelandii* ferredoxin I: cysteine ligation of the [4Fe-4S] cluster with protein rearrangement is preferred over serine ligation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10064-8.

Sitzmann, J., and Klein, A. (1991). Physical and genetic map of the *Methanococcus voltae* chromosome, *Mol. Microbiol.* 5, 505-13.

Snieszko, I., Dobson-Stone, C., and Klein, A. (1998). The *treA* gene of *Bacillus subtilis* is a suitable reporter gene for the archaeon *Methanococcus voltae*, *FEMS Microbiol Lett* 164, 237-42.

Sorgenfrei, O. (1995) Biochemische und EPR-spektroskopische Charakterisierung und gentechnische Veränderung von selenhaltigen Hydrogenasen aus *Methanococcus voltae*, Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.

Sorgenfrei, O., Duin, E. C., Klein, A., and Albracht, S. P. (1997a). Changes in the electronic structure around Ni in oxidized and reduced selenium-containing hydrogenases from *Methanococcus voltae*, *Eur. J. Biochem.* 247, 681-7.

Sorgenfrei, O., Duin, E. C., Klein, A., and Albracht, S. P. J. (1996). Interactions of ^{77}Se and ^{13}CO with nickel in the active site of active F_{420} -nonreducing hydrogenase from *Methanococcus voltae*, *J. Biol. Chem.* 271, 23799-806.

Sorgenfrei, O., Klein, A., and Albracht, S. P. (1993a). Influence of illumination on the electronic interaction between ^{77}Se and nickel in active F_{420} -non-reducing hydrogenase from *Methanococcus voltae*, *FEBS Lett.* 332, 291-7.

Sorgenfrei, O., Linder, D., Karas, M., and Klein, A. (1993b). A novel very small subunit of a selenium containing [NiFe] hydrogenase of *Methanococcus voltae* is postranslationally processed

by cleavage at a defined position, *Eur. J. Biochem.* *213*, 1355-1358.

Sorgenfrei, O., Müller, S., Pfeiffer, M., Sniezko, I., and Klein, A. (1997b). The [NiFe] hydrogenases of *Methanococcus voltae*: genes, enzymes and regulation, *Arch. Microbiol.* *167*, 189-95.

Steigerwald, V. J., Beckler, G. S., and Reeve, J. N. (1990). Conservation of hydrogenase and polyferredoxin structures in the hyperthermophilic archaeobacterium *Methanothermus fervidus*, *J. Bacteriol.* *172*, 4715-8.

Teixeira, M., Moura, I., Fauque, G., Czechowski, M., Berlier, Y., Lespinat, P. A., Le Gall, J., Xavier, A. V., and Moura, J. J. (1986). Redox properties and activity studies on a nickel-containing hydrogenase isolated from a halophilic sulfate reducer *Desulfovibrio salexigens*, *Biochimie* *68*, 75-84.

Teixeira, M., Moura, I., Fauque, G., Dervartanian, D. V., Legall, J., Peck, H. D., Jr., Moura, J. J., and Huynh, B. H. (1990). The iron-sulfur centers of the soluble [NiFeSe] hydrogenase, from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743). EPR and Mossbauer characterization, *Eur. J. Biochem.* *189*, 381-6.

Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A. V., Dervartanian, D. V., Legall, J., Peck, H. D., Jr., Huynh, B. H., and Moura, J. J. (1983). *Desulfovibrio gigas* hydrogenase: redox properties of the nickel and iron-sulfur centers, *Eur. J. Biochem.* *130*, 481-4.

Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A. V., Huynh, B. H., DerVartanian, D. V., Peck, H. D., Jr., LeGall, J., and Moura, J. J. (1985). Electron paramagnetic resonance studies on the mechanism of activation and the catalytic cycle of the nickel-containing hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *J. Biol. Chem.* *260*, 8942-50.

Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A. V., Moura, J. J., LeGall, J., DerVartanian, D. V., Peck, H. D., Jr., and Huynh, B. H. (1989). Redox intermediates of *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hydrogenase generated under hydrogen. Mossbauer and EPR characterization of the metal centers, *J. Biol. Chem.* *264*, 16435-50.

- Thauer, R. (1997). Biodiversity and unity in biochemistry, *Antonie Van Leeuwenhoek* 71, 21-32.
- Thauer, R. K., Klein, A. R., and Hartmann, G. C. (1996). Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: evidence for a purely organic hydrogenation catalyst, *Chem. Rev.* 96, 3021-3042.
- van der Zwaan, J. W., Albracht, S. P., Fontijn, R. D., and Slater, E. C. (1985). Monovalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. Light sensitivity and evidence for direct interaction with hydrogen, *FEBS Lett.* 179, 271-7.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Nature* 373, 580-7.
- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps (1996). Structure of the [NiFe]-hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12989-12996.
- von Büнау, R., Zirngibl, C., Thauer, R. K., and Klein, A. (1991). Hydrogen-forming and coenzyme-F₄₂₀-reducing methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase are genetically distinct enzymes in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Marburg), *Eur. J. Biochem.* 202, 1205-8.
- Voordouw, G. (1992). Evolution of hydrogenase genes, *Adv. Inorg. Chem.* 38, 397-422.
- Wang, C. P., Franco, R., Moura, J. J., Moura, I., and Day, E. P. (1992). The nickel site in active *Desulfovibrio baculatus* [NiFeSe] hydrogenase is diamagnetic. Multifield saturation magnetization measurement of the spin state of Ni(II), *J. Biol. Chem.* 267, 7378-80.
- Wang, G., Benecky, M. J., Huynh, B. H., Cline, J. F., Adams, M. W., Mortenson, L. E., Hoffman, B. M., and Münck, E. (1984). Mössbauer and electron nuclear double resonance study of oxidized bidirectional hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5, *J. Biol. Chem.* 259,

14328-31.

Wasserfallen, A., Huber, K., and Leisinger, T. (1995). Purification and structural characterization of a flavoprotein induced by iron limitation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg, J. Bacteriol. 177, 2436-41.

Weiss, D. S., and Thauer, R. K. (1993). Methanogenesis and the unity of biochemistry, Cell 72, 819-22.

Whitman, W. B., Ankwanda, E., and Wolfe, R. S. (1982). Nutrition and carbon metabolism of *Methanococcus voltae*, J. Bacteriol. 149, 852-63.

Wiltling, R., Schorling, S., Persson, B. C., and Bock, A. (1997). Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion, J. Mol. Biol. 266, 637-41.

Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 87, 4576-9.

Wolfe, R. S. (1971). Microbial formation of methane, Adv. Microb. Physiol. 6, 107-46.

Wu, L.-F., and Mandrand, M. A. (1993). Microbials hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny, FEMS Microbiol. Rev. 104, 243-270.

Yamazaki, S. (1982). A selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*. Identification of the selenium moiety as a selenocysteine residue, J. Biol. Chem. 257, 7926-9.

Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schworer, B., von Büнау, R., Richter, M., Klein, A., and Thauer, R. K. (1992). H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea, Eur. J. Biochem. 208, 511-20.

Zorin, N. A., and Gogotov, I. N. (1982). [Stability of hydrogenase from the purple sulfur bacteria *Thiocapsa roseopersicina*], Biokhimiia 47, 827-33.