Identifizierung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit von Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nils Hamann
aus Hamburg

Marburg/Lahn 2007

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2003 bis März 2007 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter Leitung von PD Dr. Reiner Hedderich durchgeführt. Im Januar 2005 wechselte die Arbeitsgruppe aus der Abteilung Biochemie von Prof. Dr. Rolf Thauer in die im Aufbau befindliche Abteilung Ökophysiologie von Frau Prof. PhD MD Lotte Søgaard-Andersen.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 9.7.2007

Erstgutachter: PD Dr. R. Hedderich
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am: 5.9.2007

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse werden in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Hamann, N., Shokes, J. E., Scott, R. A., Bennati, M. & Hedderich, R. (2007). The C-terminal cysteine-rich CCG domain of subunit B of heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis* binds the active-site [4Fe-4S] cluster. *Biochemistry, eingereicht.*

Hamann, N., Shokes, J. E., Scott, R. A., Kletzin, A. & Hedderich, R. (2007). Evidence for an unusual $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ cluster in the membrane-anchoring subunit SdhE (SdhC) of type E succinate:quinone oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus* P2. *Manuskript in Vorbereitung.*

Ein Teil der während der Promotion erzielten Ergebnisse wurde in folgendem Übersichtsartikel dargestellt:

Hedderich, R., Hamann, N. & Bennati, M. (2005). Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: a new catalytic role for an iron-sulfur cluster. *Biol Chem* **386**, 961-70.

Ergebnisse aus in dieser Dissertation nicht erwähnten Projekten werden in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Hamann, N., Wegener-Feldbrügge, S., Søgaard-Andersen, L. & Hedderich, R. (2007). Global profiling of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus* using DNA microarrays. *Manuskript in Vorbereitung*.

Shi, X., Wegener-Feldbrügge, S., Hamann, N., Huntley, S., Hedderich, R. & Søgaard-Andersen, L. (2007). A system-level analysis of two-component regulatory systems in *Myxococcus xanthus. Manuskript in Vorbereitung*.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **1**

1. Zusammenfassung **2**

2. Einleitung **3**

3. Material und Methoden **17**

3.1. Verwendete Materialien **17**

3.1.1. Chemikalien und Cofaktoren 17

3.1.2. Anaerobenzelte und Gase 17

3.1.3. Säulenmaterialien und Filter 17

3.1.4. Puffer und Lösungen 18

3.1.5. Stämme, Antibiotika, Oligonukleotide und Plasmide 18

3.2. Mikrobiologische Methoden **24**

3.2.1. Kultivierung von *Methanothermobacter marburgensis* 24

3.2.2. Kultivierung von *Methanosarcina barkeri* 25

3.2.3. Kultivierung von *Methanococcus voltae* 25

3.2.4. Kultivierung von *Escherichia coli* 28

3.3. Molekularbiologische Methoden **28**

3.3.1. Präparation genomischer DNA 28

3.3.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA 28

3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 29

3.3.4. Restriktion von DNA 29

3.3.5. Agarose-Gel-Elektrophorese 29

3.3.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 30

3.3.7. Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten 30

3.3.8. Ligation und Klonierung von PCR-Produkten 30

3.3.9. Herstellung Elektroporations-kompetenter *E. coli*-Zellen 31

3.3.10. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation 31

3.3.11. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* 32

3.3.12. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA 32

3.3.13. Liposomen-vermittelte Transformation von *Mc. voltae* 32

3.3.14. Southern-Blot-Analyse 33

3.4. Biochemische und analytische Methoden **34**

3.4.1. Heterologe Produktion von HdrB in *E. coli* 34

3.4.2. Herstellung von Zelllysaten aus *E. coli* 35

3.4.3. Chemische *In-vitro*-Rekonstitution von [Fe-S]-Zentren 35

3.4.4. Säulenchromatographische Reinigung von heterolog produziertem HdrB aus *E. coli* 36

3.4.5. Heterologe Produktion von SdhE in *E. coli* 36

3.4.6. Säulenchromatographische Reinigung von heterolog produziertem SdhE aus *E. coli* . 36
3.4.7. Reinigung von Heterodisulfid-Reduktase aus *Mth. marburgensis* ... 37
3.4.8. Herstellung von Zellextrakten aus *Mc. voltae* ... 39
3.4.9. Partielle Reinigung von HdrB aus *Mc. voltae* ... 39
3.4.10. Bestimmung von Enzymaktivitäten ... 41
3.4.11. Bestimmung der Proteinkonzentration ... 42
3.4.12. Ermittlung der Polypeptidzusammensetzung durch SDS-PAGE ... 42
3.4.13. Western-Blot-Analyse ... 44
3.4.14. Quantitativer Nachweis von Nicht-Häm-Eisen ... 45
3.4.15. Quantitativer Nachweis von Nachweis von säurelabilem Schwefel ... 45
3.4.16. Proteinkristallisations-Experimente ... 46

3.5. Biophysikalische Methoden ... 47

3.5.1. UV/Vis-Spektroskopie ... 47
3.5.2. MALDI-TOF-Massen-Spektrometrie von Polypeptiden ... 47
3.5.3. Peptid-Massen-Fingerprint ... 48
3.5.4. Aufnahme und Auswertung von EPR-Spektren ... 48
3.5.5. EPR-Redoxtitrationen ... 52
3.5.6. ^{57}Fe-ENDOR-Spektroskopie ... 54
3.5.7. Röntgen-Absorptions-Spektroskopie (XAS) und EXAFS ... 54

3.6. Computergestützte Sequenzanalysen ... 56

4. Ergebnisse ... 57

4.1. Heterologe Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* in *Mc. voltae* ... 57

4.1.1. Herstellung eines HdrB-Produktionsstammes ... 58
4.1.2. Partielle Reinigung von heterolog produziertem HdrB ... 61

4.2. Protein-Kristallisationsversuche ... 62

4.3. Heterologe Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* in *E. coli*, Rekonstitution, Reinigung und Charakterisierung ... 63

4.3.1. Produktion, Rekonstitution und Reinigung von HdrB ... 64
4.3.2. Überprüfung der Reinheit von HdrB mittels SDS-PAGE ... 65
4.3.3. Identität und Chemische Analyse von HdrB ... 66
4.3.4. UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften von HdrB ... 67
4.3.5. EPR-spektroskopische Eigenschaften von HdrB ... 69
4.3.6. Einfluss von CoM-SH und CoM-^{33}SH auf das HdrB-EPR-Spektrum ... 70
4.3.7. EPR-Redoxtitrationen von HdrB ... 72
4.3.8. EPR-Untersuchung an ^{57}Fe-angereichertem HdrB ... 74
4.3.9. ^{57}Fe-ENDOR-spektroskopische Eigenschaften von HdrB ... 75
4.3.10. Enzymatische Aktivitätsmessungen von HdrB ... 77
4.3.11. Versuch der heterologen Produktion von HdrC ... 77
4.3.12. Charakterisierung von HdrB-Cystein-zu-Serin-Mutanten ... 77
4.3.13. Röntgen-Absorptions-spektroskopische Messungen (XAS) und EXAFS von HdrB ... 82

4.4. Heterologe Produktion von SdhE aus *S. solfataricus* P2 in *E. coli*, Rekonstitution, Reinigung und Charakterisierung 86
4.4.1. Produktion von SdhE, Rekonstitution und Reinigung 86
4.4.2. Identität und Chemische Analyse von SdhE 88
4.4.3. UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften von SdhE 88
4.4.4. EPR-spektroskopische Eigenschaften von SdhE 90
4.4.5. EPR-Untersuchung an ^{57}Fe-angereichertem SdhE 95
4.4.6. ^{57}Fe-ENDOR-spektroskopische Eigenschaften von SdhE im Vergleich zu HdrB 96
4.4.7. Röntgen-Absorptions-spektroskopische Messungen (XAS) und EXAFS von SdhE 97
5. Diskussion 101
5.1. Untersuchungen an heterolog produziertem HdrB 101
5.2. Untersuchungen an heterolog produziertem SdhE 113
5.3. Vergleich von HdrB und SdhE 119
5.4. Mögliche Funktionen weiterer CCG-Domänen-Proteine 122
5.4.1. CCG-Domänen-Proteine mit möglicher katalytischer Funktion 123
5.4.2. Membranverankerung durch CCG-Domänen-Proteine 131
5.5. Ausblick 132
6. Literaturverzeichnis 134

Abkürzungsverzeichnis

CoB-SH	7-Mercapto-*N*-heptanoyl-*O*-phospho-L-threonin
CoM-^{33}SH	^{33}S-Derivat von 2-Mercaptoethansulfonat
CoM-Hdr	Reaktionsintermediat, das bei der Oxidation von Hdr in Gegenwart von CoM-SH entsteht
CoM-SeH	Selen-Derivat von 2-Mercaptoethansulfonat
CoM-SH	2-Mercaptoethansulfonat
CoM-S-S-CoB	Heterodisulfid aus CoM-SH und CoB-SH
ENDOR	Electron-Nuclear Double Resonance
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
F_{420}	8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin, Faktor F_{420}
$F_{420}H_2$	Reduzierter Faktor F_{420}
Ftr	Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase
Hdr	Heterodisulfid-Reduktase
Mbb.	*Methanobrevibacter*
Mc.	*Methanococcus*
Mcc.	*Methanocaldococcus*
Ms.	*Methanosarcina*
Msp.	*Methanosphaera*
Mth.	*Methanothermobacter*
Mvh	F_{420}-nicht-reduzierende Hydrogenase
NEM	*N*-Ethylmaleinimid
NEM-Ftr	*N*-Ethylmaleinimid-modifizierte Ftr
Sdh	Succinat:Chinon-Oxidoreduktase
Tfr	Thiol:Fumarat-Reduktase
XAS	X-ray Absorption Spectroscopy

1. Zusammenfassung

Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) aus methanogenen Archaea katalysiert die reversible Reduktion des Heterodisulfids (CoM-S-S-CoB) aus Coenzym M (CoM-SH) und Coenzym B (CoB-SH), welches im letzten Schritt der Methanogenese neben Methan gebildet wird. CoM-Hdr ist ein paramagnetisches Intermediat, das durch die Halbreaktion von oxidiertem Enzym mit CoM-SH entsteht. Frühere spektroskopische Untersuchungen an CoM-Hdr deuteten auf das Vorliegen eines ungewöhnlichen [4Fe-4S]$^{3+}$-Clusters im aktiven Zentrum des Enzyms hin, bei dem der Cluster mit CoM-SH als Ligand vorliegt. Bislang war nicht sicher, von welcher Hdr-Untereinheit das katalytische Zentrum gebunden wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Untereinheit HdrB des HdrABC-Holoenzyms aus *Methanothermobacter marburgensis* den [4Fe-4S]-Cluster des katalytischen Zentrums trägt. Dazu wurde die Produktion von HdrB in *E. coli* optimiert und das [4Fe-4S]-Zentrum in Zellextrakten mit HdrB chemisch *in vitro* rekonstituiert. Das im Durochinon-oxidierten Zustand erhaltene rhombische EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 war dem von CoM-Hdr sehr ähnlich. Oxidation von HdrB in Gegenwart von CoM-^{33}SH, verbreiterte sich das Signal, was die direkte Bindung von CoM-SH an das [Fe-S]-Zentrum zeigte. EPR-Redoxtitrationen ergaben eine Mittelpunktspotential-Verschiebung des Clusters um etwa -55 mV auf 175 mV ± 10 mV in Anwesenheit von CoM-SH. ENDOR-Spektroskopie mit ^{57}Fe-angereichertem HdrB machte deutlich, dass in Abwesenheit von Substrat oxidiertes HdrB ein [4Fe-4S]-Zentrum enthielt, welches eine zu CoM-Hdr sehr ähnliche elektronische Struktur aufwies. HdrB besitzt zwei in der Pfam-Datenbank als CCG-Domäne annotierte Sequenzmotive mit jeweils fünf Cysteinyl-Resten ($CX_{31-39}CCX_{35-36}CXXC$). Mutagenese-Studien führten zur Identifizierung der vier Cysteinat-Liganden des [4Fe-4S]-Zentrums. Diese waren ausschließlich in der C-terminalen CCG-Domäne von HdrB lokalisiert. XAS-Spektroskopie identifizierte in Hdr eine isolierte Zink-Stelle mit $S_3(N/O)_1$-Koordination, die ebenfalls in HdrB lokalisiert war. Auf Grundlage der erhaltenen Daten wurde ein neues Modell für den Katalyse-Zyklus von Hdr vorgeschlagen. Mit der Identifizierung von HdrB als katalytische Untereinheit von Hdr konnte erstmals die Funktion eines CCG-Domänen-Proteins gezeigt werden. Untersuchungen an Untereinheit SdhE von Succinat:Chinon-Oxidoreduktase vom Typ E aus *Sulfolobus solfataricus* gaben Hinweise auf das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums bei einem weiteren CCG-Domänen-Protein mit offensichtlich anderen Funktionen und Eigenschaften als das in HdrB. Der mögliche evolutionäre Zusammenhang wird diskutiert.

2. Einleitung

Als Methanogene werden Organismen bezeichnet, die die Bildung von Methan (Methanogenese) zur Gewinnung von Energie nutzen. Diese Mikroorganismen gehören phylogenetisch in die Domäne der Archaea (Woese et al., 1990) und sind obligate Methan-Produzenten. Innerhalb der Archaea bilden diese Organismen im Stamm der Euryarchaeota eine monophyletische, stark diversifizierte Gruppe. Methanogene finden sich in den fünf Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales*, *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* (Boone et al., 1993; Brochier et al., 2004; Whitman et al., 2001).

Methanoarchaea spielen in diversen anaeroben Habitaten, wie zum Beispiel in Süßwassersedimenten sowie im Verdauungstrakt von Wiederkäuern oder Termiten, eine wichtige Rolle beim Abbau von organischem Material. In Nahrungsnetzen anaerober Habitate werden diverse organische Verbindungen durch die Aktivitäten von fermentierenden und acetogenen Mikroorganismen zu Wasserstoff, Kohlendioxid, Formiat, Methanol, Methylaminen und Acetat als wichtigste Zwischenprodukte umgesetzt. Diese Verbindungen stellen Substrate für weitere trophische Gruppen von Mikroorganismen dar. Wenn Sulfat, oxidierte Metalle und Nitrat als terminale Elektronenakzeptoren nicht vorliegen, werden aus den genannten Verbindungen bevorzugt Methan beziehungsweise Methan und Kohlendioxid durch methanogene Archaea gebildet (Schmitz et al., 2006; Stams, 1994). In unterseeischen Ökosystemen, wo am Meeresboden geochemisch produziertes Kohlendioxid und molekularer Wasserstoff aus geothermalen Öffnungen austreten, stehen Methanogene als Primärproduzenten an der Spitze eines Nahrungsnetzes. Das gebildete Methan wird dann von methylotrophen Symbionten mariner Invertebraten verwertet (Hedderich & Whitman, 2006). Somit spielen Methanogene eine entscheidende Rolle im globalen Kohlenstoff-Kreislauf und bei der Bildung des Treibhausgases Methan (Conrad, 1996).

Die Methanogenese ist eine anaerobe Atmung und dient der Energiegewinnung. Abhängig von den Substraten lassen sich drei Arten der Methanbildung unterscheiden. (1) H_2, Formiat und Alkohole (außer Methanol) sind Elektronendonoren für die Methanbildung über den CO_2-reduzierenden Stoffwechselweg. (2) Für Methanol und methylierte C_1-Verbindungen wird der methylotrophe Stoffwechselweg verwendet. (3) Die C_2-Verbindung Acetat wird im acetoklastischen Stoffwechselweg umgesetzt. Hydrogenotrophe Methanogene sind auf die Substrate Wasserstoff/Kohlendioxid und Formiat beschränkt und gehören den Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanococcales*,

Methanomicrobiales und *Methanopyrales* an. Methylotrophe Methanogene sind bis auf die Gattung *Methanosphaera* (*Methanobacteriales*) in der Ordnung *Methanosarcinales* zu finden, für die zwei Familien (*Methanosarcinaceae* und *Methanosaetaceae*) beschrieben sind. Der Gattung *Methanosarcina* (*Methanosarcinaceae*) gehören die metabolisch vielseitigsten Methanogenen an. Deren Vertreter können den methylotrophen, den acetoklastischen und zum Teil auch den CO_2-reduzierenden Stoffwechselweg nutzen (Hedderich & Whitman, 2006; Thauer, 1998). In der Gattung *Methanosaeta* (*Methanosaetaceae*) sind im Gegensatz dazu ausschließlich obligat-acetoklastische Methanogene zu finden (Smith & Ingram-Smith, 2007). Mit Ausnahme einiger Vertreter der Ordnung *Methanosarcinales* sind alle Methanogenen in der Lage molekularen Wasserstoff als Elektronenquelle für die Reduktion der Substrate zu Methan zu nutzen (Whitman et al., 2006). Der Wasserstoff wird durch verschiedene Hydrogenasen im Stoffwechsel methanogener Archaea genutzt (Hedderich, 2004; Shima & Thauer, 2007). Die an der Methanogenese beteiligten Enzymsysteme sind zum Teil membrangebunden und an elektrochemische Ionengradienten gekoppelt (Deppenmeier et al., 1996).

In den unterschiedlichen Arten der Methanogenese spielen zwei Thiol-Conenzyme eine wichtige Rolle: Coenzym M (CoM-SH; 2-Mercaptoethansulfonat) und Coenzym B (CoB-SH; 7-Mercapto-*N*-heptanoyl-*O*-phospho-L-threonin). Der in den ersten Schritten der Methanogenese auf die Stufe der Methylgruppe reduzierte Kohlenstoff wird auf Coenzym M übertragen (Shima et al., 2002). Das resultierende Methyl-Coenzym M (CH_3-S-CoM) stellt ein zentrales Intermediat der Methanogenese dar (ABBILDUNG 1). Der Methylthioether CH_3-S-CoM reagiert mit Coenzym B als Elektronendonor. Die von der löslichen Methyl-Coenzym M Reduktase (Mcr) katalysierte Reaktion führt zur Bildung von Methan und des gemischten Disulfids (oder Heterodisulfid) aus CoM-SH und CoB-SH (CoM-S-S-CoB) (Ermler, 2005; Gönrich et al., 2004; Thauer, 1998). Das gebildete Heterodisulfid ist für die Energiekonservierung von zentraler Bedeutung. Die Reduktion des Heterodisulfids zur Regeneration der Thiol-Coenzyme CoM-SH und CoB-SH ist an die Bildung eines elektrochemischen Ionengradienten gekoppelt (Deppenmeier, 2004). Damit stellt das Heterodisulfid den terminalen Elektronenakzeptor in den Atmungsketten von Methanogenen dar. Dieser Prozess wird Disulfid-Atmung genannt (Hedderich et al., 1999).

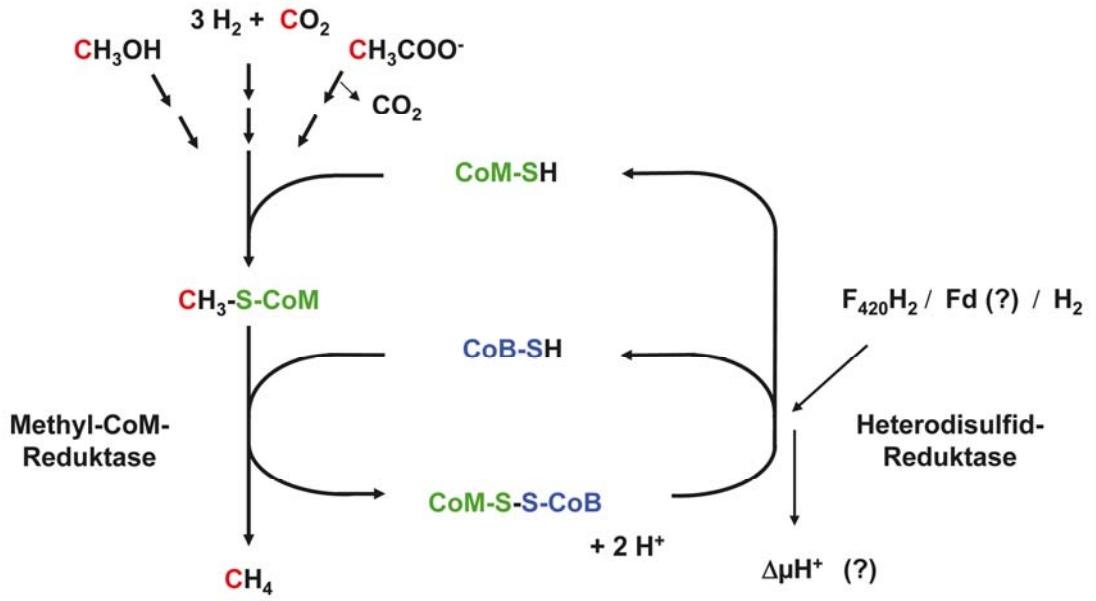

ABBILDUNG 1: Vereinfachtes Schema der Methanogenese ausgehend von den Substraten H_2/CO_2, Methanol oder Acetat. Methyl-Coenzym M (CH_3-S-CoM) stellt dabei ein zentrales Intermediat dar. Die Reduktion des Heterodisulfids (CoM-S-S-CoB) geschieht abhängig vom Substrat mit H_2 oder reduziertem Coenzym F_{420} ($F_{420}H_2$) als Elektronendonoren. Die direkte Reduktion des Heterodisulfids mittels reduziertem Ferredoxin (Fd) im Acetat-Stoffwechsel mariner *Methanosarcina*-Spezies wurde bis jetzt nicht experimentell belegt.

Das Standard-Redoxpotential des Heterodisulfids wurde kürzlich bestimmt und liegt bei $E^{\circ\prime}$ = -143 mV (Tietze et al., 2003). Die Reduktion von CoM-S-S-CoB wird von Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) katalysiert (ABBILDUNG 2).

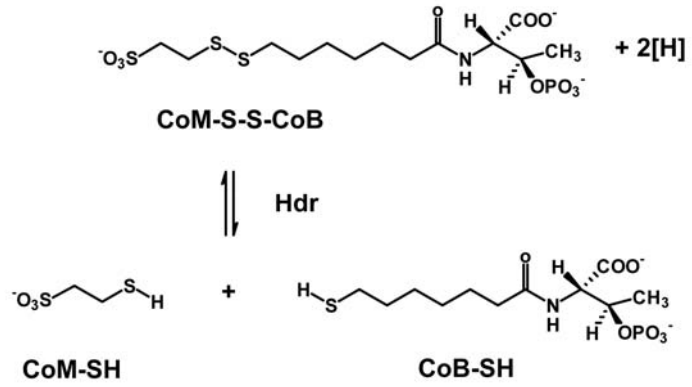

ABBILDUNG 2: Schema der von Heterodisulfid-Reduktase katalysierten Reaktion und Struktur des Heterodisulfids (CoM-S-S-CoB), Coenzym M (CoM-SH; 2-Mercaptoethansulfonat) und Coenzym B (CoB-SH; 7-Mercapto-*N*-heptanoyl-*O*-phospho-L-threonin).
$E^{\circ\prime}$ = -143 mV (Tietze et al., 2003)**;** für 2[H] = $1H_2$ bei 10^5 Pa errechnet sich daraus $\Delta G^{\circ\prime}$ = -53 kJ/mol.

Der direkte Elektronendonor dieser Reaktion kann H_2 (Gleichung 1) oder F_{420} (8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin) in seiner reduzierten Form ($F_{420}H_2$) (Gleichung 2) sein und hängt dabei vom Wachstumssubstrat ab (Hedderich et al., 1999).

$$H_2 + \text{CoM-S-S-CoB} \rightarrow \text{CoM-SH} + \text{CoB-SH}$$
$$(\Delta G^{\circ\prime} = -53 \text{ kJ/mol}) \quad (1)$$

$$F_{420}H_2 + \text{CoM-S-S-CoB} \rightarrow F_{420} + \text{CoM-SH} + \text{CoB-SH}$$
$$(\Delta G^{\circ\prime} = -42 \text{ kJ/mol}) \quad (2)$$

In *Methanosarcina*-Spezies fällt beim Wachstum auf Acetat oder Methanol reduziertes Ferredoxin an. Dieses kann vermutlich als Elektronendonor der Heterodisulfid-Reduktion dienen, indem die Ech-Hydrogenase molekularen Wasserstoff als Intermediat bildet, der dann, wie in Gleichung 1 gezeigt, genutzt wird (Hedderich & Whitman, 2006). In *Methanosarcina acetivorans* fehlt die Ech-Hydrogenase (Galagan et al., 2002), jedoch gibt es Hinweise, dass im Acetat-Stoffwechsel ein zu Rnf aus Bacteria verwandter Komplex membrangebundenes Methanophenazin mittels Ferredoxin reduziert. Durch den Membrankomplex könnte auch hier ein elektrochemischer Ionen-Gradient aufgebaut werden (Li et al., 2006).

Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea

Die Charakterisierung von Heterodisulfid-Reduktase aus verschiedenen Gruppen methanogener Archaea führte zur Identifizierung von zwei unterschiedlichen Typen von Hdr. Das erstmals aus *Methanosarcina barkeri* isolierte Enzym ist ein membrangebundenes Protein, welches aus den beiden Untereinheiten HdrE (23 kDa) und HdrD (46 kDa) aufgebaut ist (Heiden et al., 1994; Künkel et al., 1997). Ein ähnlicher Komplex wurde aus *Methanosarcina thermophila* gereinigt (Simianu et al., 1998). HdrE ist ein integrales Membranprotein mit fünf vorhergesagten Transmembran-Helices und enthält Häm als prosthetische Gruppe. Diese Untereinheit besitzt typische Eigenschaften von Cytochromen des *b*-Typs, wie sie Bestandteile vieler bakterieller und archaeeller Oxidoreduktasen sind und fungiert als Membrananker des Enzyms. Die Untereinheit HdrD ist ein hydrophiles cytoplasmatisches Protein und enthält zwei Bindemotive für [4Fe-4S]-Zentren und zwei weitere Cystein-reiche Motive (ABBILDUNG 3).

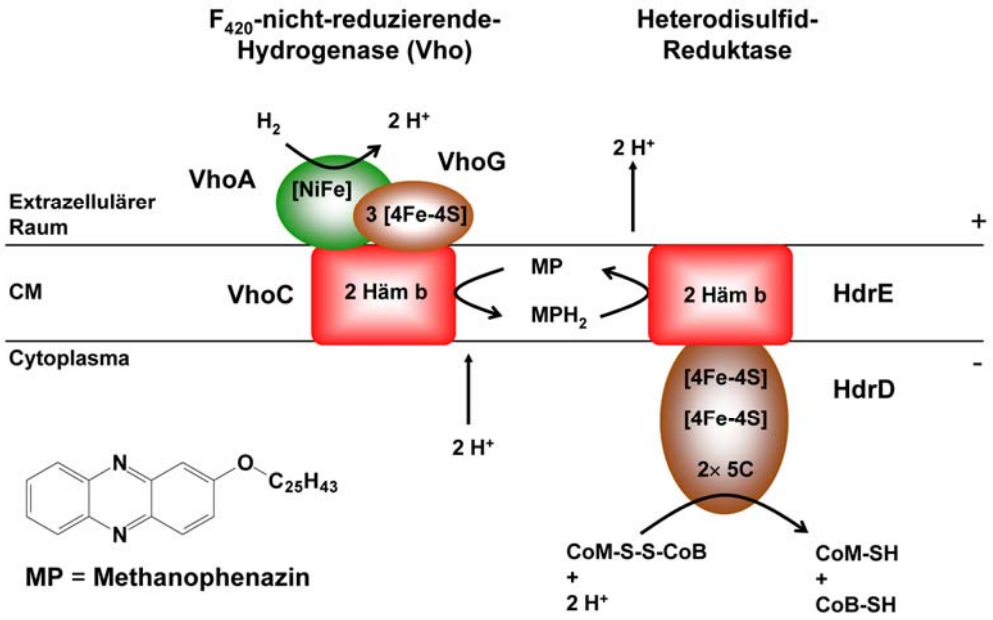

ABBILDUNG 3: Schema der membrangebundenen Elektronentransportkette in *Methanosarcina*-Spezies bei Wachstum auf H_2/CO_2. Die durch Oxidation von molekularem Wasserstoff gewonnenen Reduktionsäquivalente werden durch die periplasmatische F_{420}-nicht-reduzierende Hydrogenase (Vho) auf Methanophenazin übertragen, welches in reduzierter Form als Elektronendonor für die Reduktion des Heterodisulfids (CoM-S-S-CoB) dient. Abkürzungen: CM, cytoplasmatische Membran; MP, oxidiertes Methanophenazin; MPH_2 reduziertes Methanophenazin; [NiFe], katalytisches Zentrum der Hydrogenase; [4Fe-4S], [4Fe-4S]-Zentrum; Häm b, *b*-Typ-Cytochrom; 2× 5C, Sequenzmotiv aus zweimal fünf Cysteinyl-Resten (5C).

Hdr vom *Methanosarcina barkeri*-Typ fungiert als terminale Reduktase in einer Elektronentransportkette mit H_2 oder $F_{420}H_2$ als Elektronendonor (Deppenmeier, 2004). Dient H_2 als Substrat, wird dieses durch eine membrangebundene Hydrogenase (Vho oder Vht) aktiviert, wobei die katalytischen Untereinheiten des Enzyms auf der extracytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind. Auch hier fungiert ein *b*-Typ-Cytochrom als Membrananker. Das Enzym katalysiert die Reduktion von Methanophenazin, einem hydrophoben 2-Hydroxyphenazin-Derivat in *Methanosarcina*-Spezies (Abken et al., 1998). In dieser Atmungskette wird Energie über einen Redox-Schleifen-Mechanismus konserviert. Für die Reduktion mit H_2 wurde eine Stöchiometrie von drei bis vier Protonen pro Heterodisulfid ermittelt (Deppenmeier et al., 1999; Ide et al., 1999). Methanophenazin wird zudem von dem Membrankomplex $F_{420}H_2$-Dehydrogenase reduziert. $F_{420}H_2$-Dehydrogenase ist eine Protonenpumpe und baut einen elektrochemischen Ionengradienten auf. Bei der Oxidation von $F_{420}H_2$ freiwerdende Reduktionsäquivalente werden auf Methanophenazin übertragen, welches in seiner reduzierten Form als Elektronendonor für die ebenfalls membrangebundene Hdr dient (Deppenmeier, 2004; Deppenmeier et al., 1999).

Ein zweiter Typ von Hdr wird durch das erstmals aus *Methanothermobacter marburgensis* isolierte lösliche Enzym repräsentiert (Hedderich et al., 1990). Weitere Enzyme dieses Typs wurden unter anderem aus *Methanosphaera stadtmanae* und *Methanobrevibacter arboriphilus* gereingt (Hamann, 2003; Reiß, 2002). *Methanothermobacter marburgensis*-Hdr besteht aus den drei Untereinheiten HdrA (72,2 kDa), HdrB (33,5 kDa) und HdrC (21,8 kDa). HdrA trägt ein FAD-Bindemotiv und vier Bindemotive für [4Fe-4S]-Zentren ($CX_2CX_2CX_3C(P)$), welche paarweise angeordnet sind. Zwischen den beiden N-terminalen [4Fe-4S]-Clustern findet sich eine kurze Sequenzfolge (VX_2CATID) mit Sequenzähnlichkeit zu der Region von Pyridin-Nukleotid-abhängiger Thioredoxin-Reduktase, welche ein Redox-aktives Disulfid enhält (VX_2CATCD) (Hedderich et al., 1994). Bei HdrA aus *Methanocaldococcus jannaschii* handelt es sich um ein Selenoprotein, wo der entsprechende Sequenzbereich (TDDCALUI) ein Selenocystein (U) enthält (Wilting et al., 1997). Zwischen den beiden [4Fe-4S]-Cluster-Paaren befindet sich ein Motiv ($CX_{11-13}CX_3CC$) mit vier hoch konservierten Cysteinyl-Resten (4C). Deren Funktion ist derzeit unbekannt. HdrC besitzt zwei klassische Bindemotive für [4Fe-4S]-Cluster ($CX_2CX_2CX_3C(P)$). HdrB trägt keines der klassischen Bindemotive für [Fe-S]-Zentren. Jedoch konnte auf Sequenzebene ein Cystein-reiches Motiv identifiziert werden. Dieses aus fünf Cystein-Resten (5C) bestehende Sequenzmotiv kommt in HdrB in zwei Kopien vor (Hedderich et al., 1990; Hedderich et al., 1994). In der Pfam-Datenbank wurde das Motiv als CCG-Domäne (Zugangsnummer PF02754) annotiert (Bateman et al., 2004). In dem aus bis zu fünf Cysteinyl-Resten bestehenden Sequenzmotiv ($CX_{31-39}CCX_{35-36}CXXC$) folgt dem Tandem-Cystein (CC) oft ein Glycin (G). Dieses führte zur Benennung als CCG-Domäne. Die Funktion der aus bis zu fünf Cysteinyl-Resten bestehenden CCG-Domäne ist bislang unbekannt.

Der heterotrimere Hdr-Subkomplex (HdrABC) bildet mit der F_{420}-nicht-reduzierenden Hydrogenase (Mvh) den sogenannten H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplex (Setzke et al., 1994; Stojanowic et al., 2003). Dieser kann unter alkalischen Bedingungen (pH 9,0) in die beiden Subkomplexe dissoziiert werden. Der heterotrimere Mvh-Subkomplex besteht aus den Untereinheiten MvhA (51 kDa), MvhG (41 kDa) und MvhD (17 kDa). Die „große“ Untereinheit MvhA mit dem aktiven Zentrum und die „kleine“ Untereinheit MvhG bilden das Hydrogenase-Grundmodul, welches alle [NiFe]-Hydrogenasen besitzen (Vignais et al., 2001). MvhD bindet ein [2Fe-2S]-Zentrum und kommt nur in Mvh vor. Es wird angenommen, dass diese Untereinheit

Reduktionsäquivalente für Hdr liefert. Zudem sind in einigen Genomen (*Methanosarcina ssp.*, *Archaeoglobus fulgidus* u.a.) putative MvhD-HdrA-Fusionen codiert (Stojanowic et al., 2003). H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplex katalysiert die Reduktion des Heterodisulfids mit molekularem Wasserstoff (ABBILDUNG 4).

Durch physiologische Untersuchungen und der Genomstudie an *Methanosphaera stadtmanae* wird gefordert, dass der aus der löslichen Fraktion gereinigte H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplex an der Energiekonservierung beteiligt sein muss (Fricke et al., 2006).

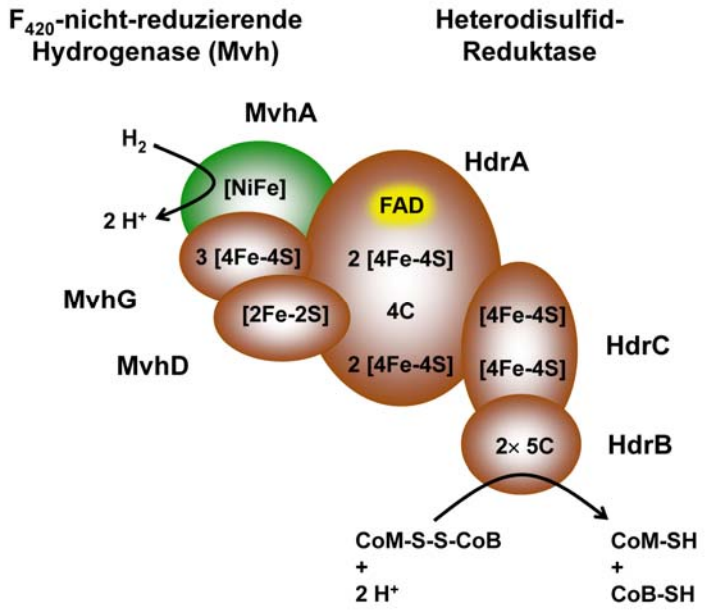

ABBILDUNG 4: Aufbau des H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplexes aus *Mth. marburgensis*. Der Komplex aus F_{420}-nicht-reduzierender Hydrogenase (Mvh) und Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) katalysiert die Reduktion des Heterodisulfids mit molekularem Wasserstoff. Abkürzungen: [NiFe], katalytisches Zentrum der Hydrogenase; [4Fe-4S], [4Fe-4S]-Zentrum; [2Fe-2S], [2Fe-2S]-Zentrum; FAD, Flavinadenindinukleotid; 4C, Sequenzmotiv aus vier Cysteinyl-Resten; 2× 5C, Sequenzmotiv aus zweimal fünf Cysteinyl-Resten.

Ein Sequenzvergleich zwischen Hdr aus *Ms. barkeri* und Hdr aus *Mth. marburgensis* zeigte Sequenzverwandtschaft zwischen HdrC mit dem aminoterminalen Teil von HdrD und zwischen HdrB und dem carboxyterminalen Teil von HdrD. Danach handelt es sich bei HdrD um ein hypothetisches Fusionsprotein aus HdrC und HdrB. Der C-terminale Bereich von HdrD trägt wie HdrB ein aus zweimal fünf Cysteinyl-Resten bestehendes Sequenzmotiv bzw. zwei Kopien der CCG-Domäne (Künkel et al., 1997). Hdr vom *Ms. barkeri*-Typ enthält keine Untereinheit mit Sequenzverwandtschaft zu HdrA aus *M. marburgensis*. Umgekehrt enthält das

Mth. marburgensis-Enzym keine Untereinheit mit Sequenzverwandtschaft zu dem *b*-Typ-Cytochrom HdrE.

Ein zu Hdr verwandtes Enzym ist Thiol:Fumarat-Reduktase (Tfr). Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Fumarat mit CoM-SH und CoB-SH als Elektronendonoren, wobei neben Succinat CoM-S-S-CoB gebildet wird (Bobik & Wolfe, 1989). Tfr aus *Mth. marburgensis* besteht aus den zwei Untereinheiten TfrA und TfrB. TfrA besitzt ein FAD-Bindemotiv und Sequenzähnlichkeit zur Untereinheit FrdA von Chinol:Fumarat-Reduktase. Es wird deshalb angenommen, dass TfrA die Rolle der Fumarat-Reduktion übernimmt. TfrB enthält Bindemotive für ein [2Fe-2S]-Zentrum und zwei [4Fe-4S]-Zentren. Der C-terminale Teil zeigt hohe Sequenzähnlichkeit zu HdrD aus *Ms. barkeri* sowie HdrC und HdrB aus *Mth. marburgensis*. Auch wurden hier zwei Kopien der aus fünf Cysteinyl-Resten bestehenden CCG-Domäne gefunden (Heim et al., 1998). Deshalb wurde angenommen, dass die Untereinheiten HdrCB und HdrD das aktive Zentrum der Heterodisulfid-Reduktion, bzw. im Falle von TfrB der Oxidation der beiden Thiol-Coenzyme, tragen. Da für diese Untereinheiten außer [Fe-S]-Zentren keine weiteren Cofaktoren nachgewiesen werden konnten, wurde deshalb postuliert, dass die konservierten CCG-Domänen ein oder zwei zusätzliche [Fe-S]-Zentren binden könnten (Künkel et al., 1997). Demnach würde Hdr nicht zur Familie der Pyridinnukleotid:Disulfid-Oxidoreduktasen gehören. Bei letzteren fließen die Elektronen vom NAD(P)H über den Flavin-Cofaktor zum redox-aktiven Disulfid, welches dann das Disulfid-Substrat reduziert. Hier treten ausschließlich Zwei-Elektronen-Transfer-Reaktionen auf (Argyrou & Blanchard, 2004; Williams et al., 2000; Williams, 1995). Im Gegensatz dazu katalysiert Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase (Ftr) aus Plastiden und Cyanobakterien die Disulfid-Reduktion in zwei Ein-Elektronen-Schritten, wobei ein [4Fe-4S]-Zentrum und ein redox-aktives Disulfid beteiligt sind (Staples et al., 1998; Walters et al., 2005; Walters & Johnson, 2004). Ftr und Hdr besitzen jedoch keine Sequenzverwandtschaft.

Struktur, Eigenschaften und Funktion von [Fe-S]-Zentren

Wie bereits erwähnt, gibt es verschiedene Typen von Protein-gebundenen [Fe-S]-Zentren. Im folgenden Abschnitt wird eine kurze Übersicht über die einfachsten und für diese Arbeit relevanten Typen von [Fe-S]-Zentren gegeben, deren Strukturen schematisch in ABBILDUNG 5 dargestellt sind.

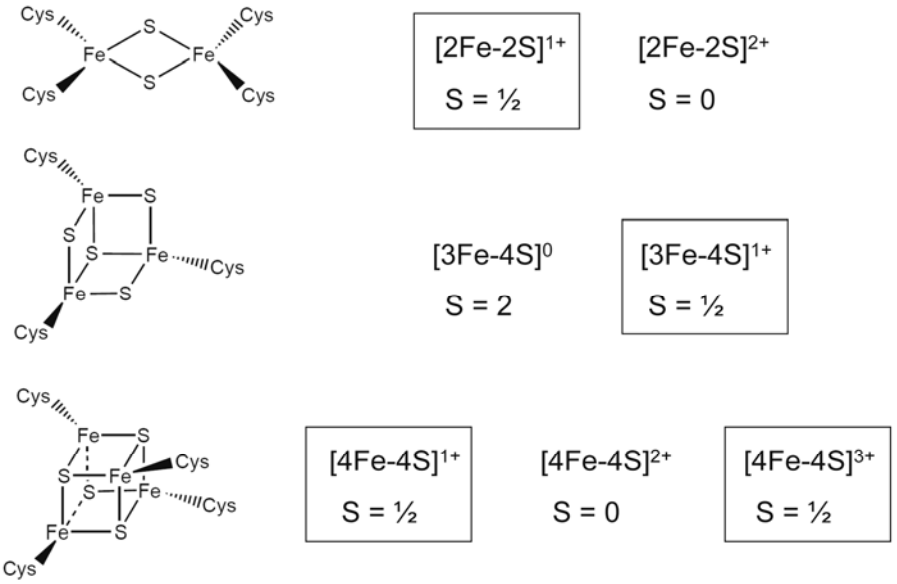

ABBILDUNG 5: Strukturen von [Fe-S]-Zentren. Schematische Darstellung der Koordination von Eisen und Schwefel in den einfachsten Typen von Protein-gebundenen [Fe-S]-Zentren (links) (Kiley & Beinert, 2003). Die wichtigsten Gesamtladungs- und Spin-Zustände der Cluster und das EPR-Verhalten in bestimmten Redoxzuständen (rechts). EPR-aktive Spezies sind mit einem Rahmen versehen.

Neben dem nicht gezeigten Rubredoxin-Typ, bei dem ein Eisenatom von vier Cysteinat-Resten aus der Proteinkette koordiniert wird, ist das [2Fe-2S]-Zentrum der einfachste Cluster-Typ. Hier ligieren vier Cysteinat-Reste zwei Eisen-Atome, die über zwei Schwefelbrücken verbunden sind. Beim [3Fe-4S]-Zentrum sind drei Cysteinat-Reste an der Ligation von drei Eisen-Atomen beteiligt, die über drei μ_2-S und ein μ_3-S verbunden sind. Beim [4Fe-4S]-Zentrum tragen vier über μ_3-S verbundene Eisenatome jeweils einen Cysteinat-Liganden. Die Eisenatome können in der Fe^{2+}- und Fe^{3+}-Form oder durch Delokalisierung von Elektronen formal als $Fe^{2,5+}/Fe^{2,5+}$-Paar vorliegen (Beinert et al., 1997).

Auch wenn die einfachen Typen von Protein-gebundenen [Fe-S]-Zentren spontan *in vitro* gebildet werden können, sind die benötigten Konzentrationen an freiem $Fe^{2+,3+}$ und S^{2-} unter physiologischen Bedingungen toxisch. Heute ist bekannt, dass *in vivo* generelle und spezielle Enzymsysteme an der [Fe-S]-Cluster-Biosynthese beteiligt sind, die Fe und S in nicht-toxischen Formen bereitstellen und den effizienten Einbau sowie Reparatur gewährleisten (Johnson et al., 2005). Die drei wichtigsten Systeme sind ISC, NIF und SUF. Die drei Systeme haben gemeinsam, dass S und Fe aus den Speicherformen mobilisiert und an sogenannten Scaffold-Proteinen assembliert werden. Letztere dienen als Gerüst für den

Zusammenbau von [Fe-S]-Zentren, von wo diese auf das Apoprotein posttranslational übertragen werden. Auf die Biosynthese von [Fe-S]-Zentren kann hier nicht näher eingegangen werden. Zu dem Thema liegen ausführliche Übersichtsartikel vor (Fontecave et al., 2005; Johnson et al., 2005; Lill et al., 2006; Lill & Mühlenhoff, 2006).

Es wird angenommen, dass [Fe-S]-Proteine sehr ursprüngliche Proteine sind (Beinert, 2000) und diese Relikte aus den Anfängen des Lebens darstellen (Huber & Wächtershäuser, 1998). [Fe-S]-Zentren sind in der Regel sauerstoffempfindlich (Imlay, 2006). Reinigung und Analyse von [Fe-S]-Proteinen erfolgen deshalb in der Regel unter anaeroben Bedingungen z.B. in Anaerobenzelten.

Wegen der unterschiedlichen Spin-Eigenschaften von [Fe-S]-Zentren in den verschiedenen Redoxzuständen, ist Elektronen-paramagnetische-Resonanz- oder EPR-Spektroskopie neben anderen vornehmlich spektroskopischen Methoden hervorragend geeignet, um [Fe-S]-Proteine zu untersuchen. Neben der Tatsache, dass die verschiedenen [Fe-S]-Cluster-Typen nur in bestimmten Redox-Zuständen EPR-aktiv sind, d.h. ein EPR-Signal liefern, geben EPR-Spektroskopie und abgeleitete Methoden Hinweise auf den Cluster-Typ und Oxidations-Zustand (Hagen, 2006).

Die biologischen Funktionen von [Fe-S]-Proteinen sind trotz der relativ einfachen Struktur der Cluster sehr vielseitig: Neben Elektronen-Transport, Strukturgebung, Eisen/Schwefel-Speicherung und Regulation der Genexpression können [Fe-S]-Zentren, wie im Fall von Heterodisulfid-Reduktase, auch eine katalytische Rolle und Substrat-Bindungs-/Aktivierungs-Funktionen besitzen (Johnson et al., 2005).

Untersuchungen zum Katalysemechanismus von Heterodisulfid-Reduktase

Untersuchungen zum Katalysemechanismus von Hdr wurden parallel an dem Enzym aus *Ms. barkeri* und *Mth. marburgensis* durchgeführt. Mit beiden Enzymen wurden sehr ähnliche Ergebnisse erhalten, was sehr stark auf einen konservierten Katalysemechanismus hindeutet (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Bei diesen Untersuchungen wurde in erster Linie die Oxidation der beiden Thiole zum Heterodisulfid betrachtet. Dabei zeigte sich, dass Hdr im oxidierten Zustand EPR inaktiv ist. Durch Zugabe von Coenzym M in Abwesenheit von Coenzym B wurde ein EPR-Signal mit bis dahin nicht beschriebenen *g*-Werten erhalten. Hierbei handelt es sich um ein rhombisches Signal mit g_{zyx} = 2,013, 1,991 und 1,938 im Fall von *Mth. marburgensis*. Redoxtitrationen des Enzyms in Anwesenheit von CoM-SH zeigten, dass diese paramagnetische Spezies mit

einem Mittelpunktpotential von -185 mV zu einer diamagnetischen Form reduziert werden kann (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Experimente mit ^{57}Fe-angereichertem Enzym ergaben, dass diese paramagnetische Spezies Eisen enthält. VTMCD-spektroskopische Messungen (Magnetischer Circular-Dichroismus bei variabler Temperatur) deuteten auf das Vorliegen eines ungewöhnlichen [4Fe-4S]-Zentrums hin (Duin et al., 2002). Experimente mit CoM-^{33}SH und CoM-SeH zeigten eindeutig, dass CoM-SH an ein [Fe-S]-Zentrum gebunden vorliegen muss (Duin et al., 2003). Die direkte Interaktion von CoM-SH mit einem Eisenatom eines ungewöhnlichen [4Fe-4S]-Zentrums wurde auch in einer weiteren Studie mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) bestätigt. Hier wurde Hdr mit CoM-SeH behandelt. Die Ergebnisse deuteten auf eine Se-Fe-Interaktion hin (Shokes et al., 2005). Für Hdr wurde ein Katalysemechanismus formuliert. Hierbei spielt der [Fe-S]-Cluster im aktiven Zentrum eine zentrale Rolle. Dieser übernimmt den Elektronentransfer zum Heterodisulfid in zwei aufeinanderfolgenden Ein-Elektronen-Transferschritten. In einem anfänglichen Ein-Elektronen-Reduktionsschritt kommt es zur Bildung von CoB-SH und formal zu einem CoM-SH-Thiylradikal. Letzteres wird stabilisiert durch Koordination an den [4Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum. Dieses Reaktionsintermediat (CoM-Hdr) wird auch erhalten, wenn das Enzym mit CoM-SH in Gegenwart eines Elektronenakzeptors inkubiert wird. In einem zweiten Ein-Elektronen-Transferschritt kommt es zur Freisetzung von CoM-SH (Duin et al., 2002). Mit ^{57}Fe angereicherte CoM-Hdr wurde auch mittels gepulster Elektronen-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie (ENDOR) bei 9 und 94 GHz untersucht. Demnach ist die paramagnetische Spezies in CoM-Hdr ein $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Zentrum mit ungewöhnlich großer isotroper ^{57}Fe-Hyperfeinkopplung und einer komplexen Interaktion des Substrats mit dem Eisen-Schwefel-Zentrum (Bennati et al., 2004). Der in beiden Hdr-Typen konservierte Katalysemechanismus lässt auf die Lokalisierung des aktiven Zentrums in den konservierten Untereinheiten HdrD bzw. HdrCB schließen. Hdr zeigt keine Sequenzverwandtschaft zu bisher bekannten Disulfid-Oxidoreduktasen. Auch dieses war ein Argument dafür, dass die vorher angesprochenen konservierten CCG-Domänen mit zweimal fünf Cysteinresten an der Ligation des [4Fe-4S]-Clusters im aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt sein könnten (Duin et al., 2002). Bislang liegen jedoch keine direkten Hinweise für die Lokalisation und Koordination dieses Clusters vor.

Zahlreiche Genome codieren für Proteine mit Sequenzähnlichkeit zu Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea

Eine Vielzahl an Genomen verschiedener Bacteria und Archaea codieren für Proteine mit Sequenzverwandtschaft zur vorgeschlagenen katalytischen Untereinheit von Hdr: HdrB beziehungsweise HdrD. Auch enthalten diese Proteine ein oder zwei Kopien der oben beschriebenen CCG-Domäne. In einigen Fällen sind nicht alle Cysteinyl-Reste konserviert.

Aus dem Sulfat-reduzierenden Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* konnte der Hme- Komplex mit zu Hdr verwandten Untereinheiten gereinigt werden (Mander et al., 2002). Im phylogenetischen Stammbaum zweigt die Ordnung *Archaeoglobales* höher als einige methanogene Ordnungen ab. Es gibt zudem Hinweise, dass diese Archaea von methanogenen Vorfahren abstammen und die Fähigkeit zur Methanogenese verloren haben (Brochier et al., 2004). Der sogenannte Hme-Komplex aus *A. fulgidus* ist zu weiteren Komplexen verwandt, die aus Vertretern der δ-Proteobacteria gereinigt wurden, welche ebenfalls dissimilatorische Sulfat-Reduktion betreiben können (Matias et al., 2005). Bei den zu HdrD verwandten Untereinheiten dieser Komplexe sind auch jeweils zwei CCG-Domänen vorhanden. Meist sind jedoch nur vier oder fünf Cysteinyl-Reste in der C-terminalen CCG-Domäne konserviert.

Das physiologische Substrat von Hme und verwandten Komplexen ist bisher unbekannt. Auf Grund der genetischen Organisation in einigen Organismen wird eine Kopplung mit Enzymen der Sulfat-Reduktion angenommen. Wegen der Sequenzverwandtschaft zu Hdr wird ein Disulfid als Elektronen-Überträger zwischen diesen Komplexen postuliert (Matias et al., 2005).

Darüber hinaus wurde in Succinat:Chinon-Oxidoreduktase (Sdh) aus *Sulfolobus*- und *Acidianus*-Spezies, die zu der archaeellen Domäne Crenarchaeota gehören, ein Protein mit Sequenzverwandtschaft zu HdrB gefunden (Janssen et al., 1997; Schäfer et al., 2002). Sdh besteht generell aus drei bis vier Untereinheiten. Das hydrophile Flavoprotein (SdhA) ist Ort der reversiblen Oxidation von Succinat zu Fumarat. Die Eisen-Schwefel-Untereinheit (SdhB) dient dem Elektronen-Transfer. Sdh wird anhand des Membranankers klassifiziert. Dieser besteht aus ein oder zwei hydrophoben Proteinen und kann keine, eine oder zwei Häm-Gruppen des *b*-Typs enthalten (Lancaster, 2003; Lemos et al., 2002). Die oben genannte Succinat-Dehydrogenase aus *Sulfolobus*-Spezies besitzt keinen der klassischen Membrananker (Schäfer et al., 2002). Es wird vermutet, dass die mit HdrB

verwandte Untereinheit SdhC als monotopischer Membrananker fungiert. Da diese Untereinheit keine Sequenzverwandtschaft zu anderen SdhC-Untereinheiten besitzt, wurde eine Umbenennung in SdhE vorgeschlagen (Lancaster & Kröger, 2000; Lemos et al., 2002). Das zu HdrB sequenzverwandte Protein SdhE besitzt ebenfalls zwei Kopien der CCG-Domäne, bei denen alle 10 Cysteine konserviert sind. Experimentell wurde gezeigt, dass in *Escherichia coli* heterolog produziertes SdhC (SdhE) aus *Sulfolobus tokodaii* eine Zink-Stelle besitzt und ein [2Fe-2S]-Zentrum binden kann (Iwasaki et al., 2002; Li et al., 2003).

Die rasant steigende Zahl von vollständigen Genomsequenzen, aber auch Metagenom-Projekte zeigen eine weite Verbreitung von Genen, die für CCG-Domänen-Proteine mit Sequenzverwandtschaft zu HdrB bzw. HdrD, aber auch für Proteine mit Sequenzverwandtschaft zu anderen Hdr- und Mvh-Untereinheiten codieren. Diese finden sich in fast allen Gruppen der Bacteria und Archaea. Für keines dieser Proteine wurde bisher die Funktion bestimmt.

Ziele und Strategie der vorliegenden Arbeit

Bislang liegen keine Daten zur Struktur von Heterodisulfid-Reduktase auf atomarer Ebene vor. Um weitere Hinweise zum Katalysemechanismus von Heterodisulfid-Reduktase zu erhalten, war es zwingend erforderlich, das katalytisch-aktive Zentrum von Heterodisulfid-Reduktase zu identifizieren und zu charakterisieren. HdrC bzw. der N-terminale Bereich von HdrD besitzen zwei Bindemotive für gewöhnliche [4Fe-4S]-Zentren. Es wurde vermutet, dass HdrB bzw. der C-terminale Bereich von HdrD über die Cystein-reichen CCG-Domänen das postulierte katalytische [4Fe-4S]-Zentrum binden könnte. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, experimentelle Hinweise für das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums in HdrB zu erhalten. Da HdrB im Gegensatz zu HdrD keine weiteren bekannten Bindemotive für Cofaktoren besitzt, wurde dieses Protein für diese Untersuchungen gewählt. Die heterologe Produktion von HdrB mit dem postulierten [4Fe-4S]-Zentrum in *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* war nicht gelungen (Hamann, 2003; Heim, 1998; Madadi-Kahkesh et al., 2001). Die heterologe Produktion von HdrB lieferte jedoch rötlich-braun gefärbtes Protein. Verschiedene spektroskopische Untersuchungen deuteten auf das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums hin (Madadi-Kahkesh et al., 2001), das auch in SdhE gefunden wurde (siehe oben). Da dieser Cluster-Typ im HdrABC-Subkomplex nicht nachgewiesen werden konnte, könnte es sich bei

diesem [2Fe-2S]-Zentrum um ein bei der heterologen Produktion entstehendes Artefakt handeln. Jedoch zeigten diese Experimente, dass HdrB zumindest Eisen und Schwefel in Form eines Clusters binden kann.

In einer früheren Arbeit wurde auch versucht, die Untereinheiten des HdrABC-Subkomplexes zu trennen. Dieses war nicht möglich, ohne die [Fe-S]-Zentren zu zerstören. Die nachfolgende chemische Rekonstitution der [Fe-S]-Zentren *in vitro* war zudem nicht erfolgreich (Madadi-Kahkesh, 2001).

Die Biosynthese von [Fe-S]-Zentren in Archaea wurde bislang nicht untersucht (Lill & Mühlenhoff, 2005). Deshalb wurde versucht, HdrB aus *Mth. marburgensis* heterolog in dem methanogenen Archaeon *Methanococcus voltae* zu produzieren, da dieser Organismus den gleichen Hdr-Typ besitzt und eventuell über erforderliche spezifische Komponenten verfügen könnte.

Außerdem bestand die Möglichkeit, dass der Biosynthese-Apparat für [Fe-S]-Zentren bei der heterologen Produktion in *E. coli* überlastet war. Deshalb wurde bei der Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* in *E. coli* die Gendosis der *isc*-Gene durch Coexpression des *isc*-Operons erhöht (Takahashi & Nakamura, 1999). Diese Strategie war bereits bei anderen [Fe-S]-Proteinen erfolgreich (Kriek et al., 2003; Nakamura et al., 1999).

Zusätzlich sollte versucht werden, das postulierte [4Fe-4S]-Zentrum durch chemische Rekonstitution *in vitro* mit rekombinantem HdrB zu erzeugen. Dieses würde HdrB als katalytische Untereinheit identifizieren und die Charakterisierung des katalytischen Zentrums getrennt von anderen Untereinheiten ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

3.1.1. Chemikalien und Cofaktoren

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) sind in dieser Arbeit nicht grundsätzlich kenntlich gemacht. Die verwendeten Standard-Chemikalien und Lösungsmittel stammten von Merck Biosciences (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Sie besaßen den Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder „für biochemische Zwecke“.

Coenzym M (2-Mercaptoethansulfonsäure) wurde als Natriumsalz von Merck Biosciences (Darmstadt) bezogen. **^{33}S-markiertes Coenzym M (CoM-^{33}SH)** wurde von Carsten Bauer (ETH Zürich, Schweiz) synthetisiert und stand wie das **Seleno-Derivat von CoM-SH (CoM-SeH)** aus einer anderen Studie zur Verfügung (Duin et al., 2003). **Coenzym B (7-Mercapto-*N*-heptanoyl-*O*-phospho-L-threonin)** wurde durch Reduktion des symmetrischen Disulfids CoB-S-S-CoB (Noll et al., 1987) mit $NaBH_4$ hergestellt (Ellermann et al., 1988). Das **Heterodisulfid CoM-S-S-CoB** wurde wie ebenfalls bei Ellermann *et al.* beschrieben synthetisiert. Die Synthesen wurden von Herrn Jürgen Koch (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) durchgeführt.

3.1.2. Anaerobenzelte und Gase

Arbeiten unter Sauerstoffausschluss wurden in Anaerobenzelten (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA) durchgeführt. Diese enthielten, soweit nicht anders angegeben, eine Atmosphäre aus N_2/H_2 (95%/5%). Sauerstoff wurde kontinuierlich durch Reduktion mit H_2 an einem Katalysator (R-020/13, BASF, Ludwigshafen) entfernt. Dabei entstandenes H_2O wurde der Zeltatmosphäre mittels Silica Gel Orange (Roth, Karlsruhe) entzogen.

Folgende Reinstgase und Gasgemische wurden von der Firma Air Liquide (Düsseldorf) bezogen: H_2 (5.0); N_2 (4.6); N_2 (4.0)/H_2 (4.6) [95%/5%]; H_2 (3.0)/CO_2 (4.5) [80%/20%]; N_2 (5.0)/CO_2 (4.5)/H_2 (3.0) [75%/20%/5%]; H_2S (2.0); He (5.0); He flüssig; N_2 flüssig.

3.1.3. Säulenmaterialien und Filter

Die verwendeten FPLC-Säulenmaterialien waren Produkte der Firma GE Healthcare (München). Das keramische Hydroxyapatit-Material lieferte Bio-Rad

Laboratories (München). Membranfilter verschiedener Porendurchmesser und Ultrafiltrationseinheiten wurden von Millipore (Schwalbach) bezogen.

3.1.4. Puffer und Lösungen

Für Puffer und Lösungen wurde vollentsalztes Wasser mittels der Entsalzungsanlage Elgastat Maxima UF (Elga, Ransbach-Baumbach) hergestellt. Für Proteinreinigungen und Enzym-Messungen wurden Puffer filtriert (3.1.3), anschließend unter N_2-Begasung aufgekocht und in Glasflaschen (Schott, Mainz) abgefüllt. Zur vollständigen Anaerobisierung wurden die Flüssigkeiten über Nacht im Anaerobenzelt (3.1.2) gerührt. Der Basispuffer (Puffer A) enthielt 50 mM Tris-HCl bei pH 7,6. Sofern nicht anders angegeben, wurde dem Puffer 2 mM Dithiothreitol als Reduktionsmittel zugesetzt (Cleland, 1964; Getz et al., 1999). Enthielt ein Puffer kein Dithiothreitol, wurde er für mindestens 48 h im Zelt gerührt. Die Zusammensetzung anderer Puffer wird in den jeweiligen Abschnitten angegeben.

3.1.5. Stämme, Antibiotika, Oligonukleotide und Plasmide

Verwendete Mikroorganismen und Stämme

Archaea

Methanothermobacter marburgensis (DSMZ 2133)
Methanococcus voltae Stamm PS (DSMZ 1537)
Methanosarcina barkeri Stamm Fusaro (DSM 804)

Bacteria

Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind in TABELLE 1 zusammengefasst. Die zur Zwischen-Klonierung erzeugten Stämme wurden nicht extra aufgeführt (vgl. 3.3.8).

TABELLE 1: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme.

***E. coli*-Stamm**	**Genotyp**	**Referenz/Quelle**
TOP10	F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lac X74 recA1 deoR araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*	Invitrogen, (Groningen, Niederlande)
DH5α	*SupE44* Δ*lacU169* (Φ80*lacZ*Δ*M15*) *hsdR*17 *recA1 end*A1 *gyrA96 thi*-1 *relA1*	Invitrogen, (Groningen, Niederlande)
XL1 Blue	*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI*^{q}*ZΔM15 Tn10* (Tet^R)]	Stratagene, (Amsterdam, Niederlande)
BL21 (DE3)	F⁻ *ompT hsdS* (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)	Novagen, (VWR, Darmstadt)
BL21 (DE3)-pCodonPlus	F⁻ ompT hsdS(r_B^- m_B^-) dcm^+ Tet^R gal λ(DE3) endA Hte [*argU ileY leuW* Cam^R]	Stratagene, (Amsterdam, Niederlande)
BL21 (DE3)-pCodonPlus-pRKISC	BL21 (DE3)-pCodonPlus mit pRKISC	Diese Arbeit
BL21 (DE3)-pCodonPlus-pRKISC-pET-24b-*hdrB*	BL21 (DE3)-pCodonPlus-pRKISC mit pET-24-*hdrB*	Diese Arbeit
BL21 (DE3)-pCodonPlus-pRKISC-pET-24b-*sdhE*	BL21 (DE3)-pCodonPlus-pRKISC mit pET-24-*sdhE*	Diese Arbeit

Antibiotika

Die für *E. coli* verwendeten Antibiotika-Lösungen wurden sterilfiltriert (0,22 µm) und 1000-fach konzentriert bei -20°C gelagert (TABELLE 2).

Anaerobe Antibiotika-Stammlösungen wurden 100-fach konzentriert in mit 20 mL sterilem anaeroben H_2O befüllten Serumflaschen (100 mL) mit gasdichten Butylkautschuk-Stopfen (MAGV, Rabenau) angesetzt. Das eingewogene Antibiotikum wurde in 30 mL H_2O gelöst und mittels Einwegspritze, Sterilfilter (0,22 µm) und Kanüle in die Serumflasche mit 20 mL H_2O sterilfiltriert. Durchgasung mit H_2/CO_2 (80%/20%) für mindestens 10 min führte zur Anaerobisierung. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

TABELLE 2: Verwendete Antibiotika. Die Antibiotika wurden in der Regel als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Vancomycin und Puromycin wurden anaerob 100-fach konzentriert angesetzt.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin-Natriumsalz	70% (v/v) Ethanol	150 µg/mL	Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	70% (v/v) Ethanol	50 µg/mL	Merck Biosciences (Darmstadt)
Kanamycin-Disulfat	H_2O	100 µg/mL	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Puromycin	H_2O	10 µg/mL	ICN Biomedicals (Eschwege)
Tetracyclin-HCl	70% (v/v) Ethanol	15 µg/mL	Merck Biosciences (Darmstadt)
Vancomycin	H_2O	100 µg/mL	ICN Biomedicals (Eschwege)

Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific (Ulm) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen (TABELLE 3).

TABELLE 3: Verwendete synthetische Oligonukleotide. Die Sequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code für Nukleotide angeben. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind in der Sequenz unterstrichen. Mutationen sind fett gedruckt.

Oligonukleotid	Sequenz	Beschreibung
M13-24F	5′-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3′	Sequenzier-Primer
M13-24R	5′-TAGCTCACTCATTAGGCACCCCAG-3′	Sequenzier-Primer
T7 (prom)	5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′	Sequenzier-Primer
T7 term	5′-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3′	Sequenzier-Primer
hisA-END-5′	5′-<u>GGATCC</u>CTACAGGACGCAATAAATACAG-3′	PCR-Primer, *Bam*HI
hisA-END-3′	5′-<u>GGATCC</u>GTAACCATAAGATGCGATGAATC-3′	PCR-Primer, *Bam*HI
hisA-Sonde-fwd	5′-ATGGTGAAACTGATGTATATTATACC-3′	PCR-Primer
hisA-Sonde-rev	5′-TGCTATAATCGGTATATTTAAGTTATC-3′	PCR-Primer

Fortsetzung TABELLE 3 auf folgender Seite

Fortsetzung TABELLE 3

HdrB_Mm_A	5′-ATATATACATATGGAAATCGCATACTTTTTAGG-3′	PCR-Primer, *Nde*I
HdrB_Mm_B	5′-TTCAACTAGTTCTGAGAGTTTGTCAAGTCC-3′	PCR-Primer, *Spe*I
HdrB_Mm_C	5′-AATACCCCTGGTGCTGG**GG**AGC**T**GGATGCTCCTT CCATGTCCTTC-3′	PCR-Primer
HdrB_Mm_D	5′-CAGACATCATGACCGAGT**CC**AACGGA**A**GCTTCGG TTCACTCTTCGAG-3′	PCR-Primer
HdrB_Mm_E	5′-TCAGAACTAGTTGAAAAGCCCCTCAACCTC-3′	PCR-Primer, *Spe*I
HdrB_Mm_F	5′-GTGCGGCCGCTTAACCGCTTCCAGGTGCCGA-3′	PCR-Primer, *Not*I
HdrB_Mm_G	5′-ACCGC**T**GC**T**CATCATCTTGTCCTTGTATTC-3′	PCR-Primer
HdrB_Mm_J	5′-GAGTGCGGCCGCTTAACCGCTTCCAGGTGCCAGG CGGTCGAGTTCCTCGAGCTTTTCAAGGC**T**CTCGTCG ACGC**T**TACCTGGTGGGCGTCAAC-3′	PCR-Primer
HdrB_Mm_K	5′-ATGTCGAATTCCTCGCCGAACTTGTCCTTTATCTC CATCTGACCAACGTCAAACTGGAGGTGGC**T**GAATG GGC**T**GACGTTTACTATTGCGTCAAC-3′	PCR-Primer, *Eco*RI
HdrB_Mm_L	5′-GATATACATATGGAAATCGCATACTTTTTAGGA**A** GTATCATGAACAACAGGTACCC-3′	PCR-Primer, *Nde*I
HdrB_Mm_M	5′-CTCAGAACTAGTTGAAAAGCCCCTCAACCTCAAC GTTGCAGTGCACTACGGA**A**GCCACTTCCTCAAACCA AGCG-3′	PCR-Primer, *Spe*I
HdrB_Mm_N	5′-CACCACCGGCACCGCAGC**T**CATCATCTTGTCCTTG -3′	PCR-Primer
HdrB_Mm_O	5′-CACCACCGGCACCGC**T**GCACATCATCTTGTCCTTG -3′	PCR-Primer
HdrB_Mm_P	5’-ATGTCGAATTCCTCGCCGAACTTGTCCTTTATCTC CATCTGACCAACGTCAAACTGGAGGTGGCAGAATG GGC**T**GACGTTTACTATTGCGTCAAC-3′	PCR-Primer, *Eco*RI
HdrB_Mm_Q	5′-ATGTCGAATTCCTCGCCGAACTTGTCCTTTATCTC CATCTGACCAACGTCAAACTGGAGGTGGC**T**GAATG GGCAGACGTTTACTATTGCGTCAAC-3′	PCR-Primer, *Eco*RI
HdrC_Mm_A	5′-CATATGACCCTACTGCAGAGAGAAG-3′	PCR-Primer, *Nde*I
HdrC_Mm_B	5′-GAGCTCTTATTCAAGTTCACCTGTTTCCC-3′	PCR-Primer, *Xho*I
SdhE_Ssolf_fwd	5′-CATATGAAAATAGCTTATTATCCTGGATG-3′	PCR-Primer, *Nde*I
SdhE_Ssolf_rev	5′-GCGGCCGCTCATATCACTCCCTTACTTCGTAGTA C-3′	PCR-Primer, *Not*I

Plasmide

In dieser Arbeit verwendete Plasmide sind in TABELLE 4 aufgelistet.

TABELLE 4: Verwendete Plasmide. Alle aufgeführten Plasmide lassen sich in *Escherichia coli* klonieren. Bei einigen Vektoren handelt es sich zusätzlich um integrative Shuttle-Vektoren für *Methanococcus voltae*.

Vektor-Bezeichnung	Funktion/Eigenschaften	Referenz
pCRII-TOPO	Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen, Kan^R	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pCR2.1-TOPO	Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen, Kan^R	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pBluescript II KS+	Klonierung von PCR-Produkten, Amp^R	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
pNPAC	pSL1180-Derivat, Amp^R, Pur^R	(Sun & Klein, 2004)
pNH4	pNPAC mit ,*hisA*-, p-hmvA- und *hdrB*-Insert, Amp^R, Pur^R	(Hamann, 2003)
pNH5	Wie pNH4 mit pBluescript II KS+-Rückgrat, Amp^R, Pur^R	Diese Arbeit
pNH6	pNH4 mit *hisA'*-Insert in der *Bam*HI-Stelle, Amp^R, Pur^R	Diese Arbeit
pRKISC	Coexpression von *isc*-Genen, Tet^R	(Nakamura et al., 1999)
pCodonPlus (RIL)	*argU* (AGA/AGG), *ileY* (AUA), *leuW* (CUA), Cam^R	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
pET-24b(+)	Expressionsvektor (T7-Promotor), Kan^R	Novagen, (VWR, Darmstadt)
pET-24-*hdrB*	pET-24b(+) mit *hdrB*-Insert aus *Mth. marburgensis*, Kan^R	Dr. Gerd Mander (MPI, Marburg)
pET-24-*hdrB*(CXS)	pET-24-*hdrB* mit Mutation in *hdrB* zur Produktion von HdrB mit Cys-zu-Ser-Austausch an Position X	Diese Arbeit
pRSFDuet-1	Expressionsvektor (T7-Promotor), Kan^R	Novagen, (VWR, Darmstadt)
pRSFDuet-HdrC	pRSFDuet-1 mit *hdrC*-Insert (MCS2) aus *Mth. marburgensis*, Kan^R	Diese Arbeit
pET-24-*sdhE*	pET-24b(+) mit *sdhE*-Insert aus *S. solfataricus* P2, Kan^R	Diese Arbeit

Konstruktion von Plasmiden

pNH5: Das pSL1180-Rückgrat von pNH4 wurde mittels *Bam*HI/*Hind*III entfernt und durch pBluescript II KS+ nach *Bam*HI- und *Hind*III-Restriktion als Rückgrat ersetzt.

pNH6: Ein 734 bp-Fragment aus dem 3′-Region des *hisA*-Gens (*hisA*′) wurde mittels der Oligonukleotide hisA-END-5′ und hisA-END-3′ (TABELLE 3) amplifiziert und in die *Bam*HI-Stelle von pNH4 integriert.

pET24-*hdrB*: Das *hdrB*-Gen aus *Mth. marburgensis* (GeneBank-Zugangsnummer X81133) wurde mittels der Primer HdrB_Mm_A und HdrB_Mm_F (TABELLE 3) amplifiziert und über die *Nde*I- und *Not*I-Stelle in pET-24b(+) integriert.

pET-24-*hdrB*(CXS): Nach dem in TABELLE 5 gezeigten Schema wurden mittels PCR Basenaustausche in *hdrB*-PCR-Fragmenten vorgenommen. Die entsprechenden Bereiche im Vektor pET-24-*hdrB* wurden dann über die angegebenen Restriktions-Stellen durch die mutierten Fragmente ersetzt.

pRSFDuet-*hdrC*: Das *hdrC*-Gen aus *Mth. marburgensis* (GeneBank-Zugangsnummer X81133) wurde mittels der Primer HdrC_Mm_A und HdrC_Mm_B (TABELLE 3) amplifiziert und über die *Nde*I- und *Xho*I-Stelle in pRSFDuet-1 integriert.

pET-24-*sdhE*: Das *sdhE*-Gen aus *Sulfolobus solfataricus* P2 (SSO_2358; www.tigr.org) wurde über die Schnittstellen *Nde*I/*Not*I in pET-24b(+) kloniert. Dazu wurden die Primer sdhE_Ssolf_fwd und SdhE_Ssolf_rev verwendet (TABELLE 3).

TABELLE 5: Primer-Kombinationen[a] und Restriktions-Schnittstellen zur Erzeugung mutierter *hdrB*-Sequenzen in pET-24-*hdrB*.

pET-24-*hdrB*(CXS) Mutation in HdrB	PCR 1		PCR 2		Verwendete Enzyme
	Primer 1	Primer 2	Primer 1	Primer 2	
C9S[b]	L	B	-	-	*Nde*I/*Spe*I
C41S,C42S	A	C	PCR 1	B	*Nde*I/*Spe*I
C78S,C81S	D	B	A	PCR 1	*Nde*I/*Spe*I
C153S	M	F	-	-	*Spe*I/*Not*I
C193S,C194S	E	G	PCR 1	F	*Spe*I/*Not*I
C231S,C234S	E	K	-	-	*Spe*I/*Eco*RI
C193S	E	N	PCR 1	F	*Spe*I/*Not*I
C194S	E	O	PCR 1	F	*Spe*I/*Not*I
C231S	E	P	-	-	*Spe*I/*Eco*RI
C234S	E	Q	-	-	*Spe*I/*Eco*RI
C284S,C287S	E	J	-	-	*Spe*I/*Not*I

[a] Sequenzen der Primer sind in TABELLE 3 zu finden.
[b] Die Nummern zeigen die Position der resultierenden Cystein-zu-Serin-Mutationen in HdrB aus *Mth. marburgensis* an.

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung von *Methanothermobacter marburgensis*

Methanothermobacter marburgensis (DSMZ 2133) (Wasserfallen et al., 2000) wurde unter strikt anaeroben Bedingungen gezogen. Dem Mineralsalzmedium (TABELLE 6) wurde H_2/CO_2 als Energie- und Kohlenstoffquelle kontinuierlich zugeführt (Schönheit et al., 1980). H_2S diente als Schwefelquelle und zum Anaerobisieren des Mediums. Die Kulturen wurden in 14 L Glasfermentern (Eigenbau, Feinmechanische Werkstatt MPI, Marburg) gezogen, die je 10 L Medium enthielten. Die Gase $H_2/CO_2/H_2S$ (80%/20%/0,1%) wurden mit einer Flussrate von 1000 mL/min zugeführt (vgl. 3.1.2). Das Medium wurde bei 65°C mit 1000 Upm gerührt. Nach Entfärbung des Redox-Indikators Resazurin wurde mit 100-300 mL Vorkultur in Abhängigkeit von der optischen Dichte des Inokulums angeimpft. Bei Erreichen von $\Delta OD_{578} = 4$ wurde die Kultur während weiterer

Begasung auf 4°C abgekühlt. Danach wurden die Zellen mit einer Durchflusszentrifuge (Heraeus Contifuge 17RS, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) abzentrifugiert und unter Stickstoffatmosphäre bei -80°C gelagert.

TABELLE 6: Zusammensetzung des Mediums (10 L) für *Methanothermobacter marburgensis*. Die Einzelkomponenten wurden aerob in vollentsalztem Wasser (Elgastat Maxima UF, Elga, Ransbach-Baumbach) gelöst. Das Medium wurde dann im zusammengesetzten Fermenter im Großautoklaven (MMM, Mörfelden-Walldorf) sterilisiert.

Komponenten	Menge für 1 L Medium	Endkonzentration
NH_4Cl	27,5 g	65 mM
KH_2PO_4	90,0 g	50 mM
Na_2CO_3	33,0 g	30 mM
Resazurin (2 g/L)	0,5 mL	20 µM
Spurenelemente-Lösung[a]	10 mL	
H_2O	ad 10 L	

[a] Spurenelement-Lösung: 30 g Titriplex I (Nitrilotriessigsäure) in 800 mL H_2O mit 10 N NaOH bis zum Lösen titrieren; 40 g $MgCl_2 \times 6H_2O$; 10 g $FeCl_2 \times 4H_2O$; 200 mg $CoCl_2 \times 6H_2O$; 200 mg $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$; 1,2 g $NiCl_2 \times 6H_2O$; H_2O ad 1 L

3.2.2. Kultivierung von *Methanosarcina barkeri*

Die Kultivierung von *Ms. barkeri* Stamm Fusaro (DSMZ 804) mit Methanol als Energie- und Kohlenstoffquelle erfolgte nach den Angaben von Karrasch et al. (Karrasch et al., 1989). Die Zellen wurden in 10 L-Fermentern (Schott, Mainz) kultiviert, die je 8 L Medium enthielten und bei einer optischen Dichte von $\Delta OD_{578} = 3$ geerntet. Die Zellernte erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 4°C mit leichtem Überdruck (N_2) in einer Durchflusszentrifuge (Heraeus Contifuge 17RS, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Die so erhaltene Feuchtzellmasse wurde unter Stickstoffatmosphäre bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Jürgen Koch (MPI, Marburg) zur Verfügung gestellt.

3.2.3. Kultivierung von *Methanococcus voltae*

Mit *Methanococcus voltae* wurde strikt anaerob in 100 mL Serumflaschen mit 10 mL Medium unter H_2/CO_2-Gasphase (80%/20%) bei 37°C und leichtem Schütteln (≤120 Upm) gezogen (Jones et al., 1983; Whitman et al., 1982). Die Zusammensetzung des

Mediums ist in der TABELLE 7 angegeben (Leheste, 1996). Die angegebenen Komponenten wurden zusammengegeben und auf 1 L mit H_2O aufgefüllt. Ein Wasserkocher wurde vorher mit 1 L H_2O ausgekocht. Dann wurde das angesetzte Medium unter N_2-Begasung aufgekocht und in eine 2 L-Glasflasche (Schott, Mainz) abgefüllt. In die Flasche wurden $NaHCO_3$, Cystein-HCl und für Festmedium Agar vorgelegt. Die Flasche wurde mit einem Naturkautschuk-Stopfen (Deutsch & Neumann, Berlin) verschlossen, mit H_2/CO_2 (80%/20%) für 10 min durchgast und mit $0{,}5 \times 10^5$ Pa Überdruck versehen. Dann wurde für 20 min bei 121°C und $2{,}0 \times 10^5$ Pa autoklaviert. Für Festmedium wurde 1,2% (w/v) Bacto Agar (BD Biosciences, Heidelberg) zugesetzt (Jones et al., 1983). Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurden steril Na_2S und bei Bedarf Antibiotika zugegeben. Alternativ wurden alle autoklavierbaren Medienkomponenten im Anaerobenzelt zusammengegeben, in Serumflaschen aliquotiert und mit Butylkautschuk-Stopfen (MAGV, Rabenau) versiegelt autoklaviert. Anschließend wurde die Gasphase gegen H_2/CO_2 ausgetauscht. Medien enthielten 100 µg/mL Vancomycin (siehe 3.1.5), um Kontaminationen durch gram-positive Bacteria zu vermeiden.

Für die Kultivierung im 10 L-Maßstab wurden die gleichen Fermenter wie unter 3.2.1 beschrieben verwendet. Die Gase $H_2/CO_2/H_2S$ (80%/20%/0,1%) wurden mit einer Flussrate von 1000 mL/min zugeführt. Das Aminosäure-Medium wurde jedoch bei 37°C mit 300 Upm gerührt. Geerntet wurde in der späten exponentiellen Phase bei einer optischen Dichte von $\Delta OD_{578} = 1{,}1$ (Heraeus Contifuge 17RS, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Die Lagerung der Zellen erfolgte unter N_2 bei -80°C.

TABELLE 7: Medium für *Methanococcus voltae*.

Komponenten	Menge für 1 L Medium
NaCl	20,0 g
Natriumacetat	1,25 g
$MgCl_2 \times 6H_2O$	2,8 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	3,5 g
KCl	0,34 g
NH_4Cl	0,25 g
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	0,2 g
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,22 g
Lösung B[a]	20 mL
Vitamin-Lösung (1000-fach)[b]	1 mL
Aminosäure-Lösung 1[c] / 2[d] / 3[e] / 4[f]	je 10 mL
L-Histidinmonohydrochlorid [g]	0,15 g
$FeSO_4$-Lösung (4 mg/mL)[k]	1 mL
20 mM $NaSeO_3$ (2000-fach)[k]	0,5 mL
Resazurin	0,1 g
H_2O	**ad 1 L**
$NaHCO_3$[h]	3 g
Cystein-HCl[h]	1 g
Bacto Agar (BD)[h]	12 g
Na_2S (100-fach, 2,5%)[j,k]	1 mL
Vancomycin (100-fach, 10 mg/mL)[j, k]	10 mL
Puromycin (100-fach, 1 mg/mL)[k,l]	10 mL

[a] Lösung B (50-fach): 750 mg Nitriloessigsäure; 250 mg $MnSO_4 \times 2\ H_2O$; 50 mg $CoCl \times 6H_2O$;50 mg $ZnSO_4 \times 7H_2O$; 5 mg H_3BO_3; 4,5 mg $CuSO_4 \times 5H_2O$; 4,1 mg $AlCl_3 \times 6H_2O$; 5 mg $NaMoO_4 \times 2H_2O$; 45,8 mg $NiCl_2 \times 6H_2O$, Lagerung autoklaviert bei 4°C

[b] Vitamin-Lösung (1000-fach): 20 mg Biotin; 20 mg Folsäure; 100 mg Pyridoxal-HCl; 50 mgThiamin-HCl $\times 2H_2O$; 50 mg Riboflavin; Nicotinsäure 50 mg; 500 mg Ca-D(+)-panthothenat; 5 mg Vitamin B_{12} (Cobalamin); 50 mg DL-Liponsäure; H_2O ad 1 L; Lagerung sterilfiltriert lichtgeschützt, 4°C

[c] Aminosäure-Lösung 1: Asp, Asn, Gln, Glu, Met; alle 0,5 g/50 mL, in H_2O pH 7,0

[d] Aminosäure-Lösung 2: Ile, Leu, Val, Ala, Gly, alle 0,5 g/50 mL, in H_2O mit NaOH auf pH 7,0

[e] Aminosäure-Lösung 3: Arg, Lys, Ser, Thr, alle 0,5 g/50 mL, in H_2O pH 7,0

[f] Aminosäure-Lösung 4: Pro, Phe, Thr, Trp, alle 0,5 g/50 mL, Trp 1,25 g/50 mL, in H_2O mit NaOH auf pH 11,0

[g] Zugabe für Histidin-auxotrophe Stämme

[h] vorgelegt in die Glasflasche für das Medium

[j] Zugabe nach dem Autoklavieren des Mediums

[k] Diese Komponenten wurden anaerob angesetzt.

[l] Abhängig vom Stamm

3.2.4. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die verwendeten Stämme von *E. coli* wurden, soweit nicht anders angegeben, **aerob nach Standardmethoden** (Sambrook & Russell, 2000) auf StandardI-Vollmedium (Merck Biosciences, Darmstadt) bei 37°C gezogen. Das Medium (StdI) enthielt nach dem Lösen in H_2O pro Liter 15 g Pepton, 3 g Hefeextrakt, 6 g NaCl und 1 g D-(+)-Glucose. Festmedien enthielten zusätzlich 1,5% (w/v) Difco Agar (BD, Heidelberg). Antibiotika (3.1.5) wurden nach dem Abkühlen im Wasserbad auf etwa 50°C zugegeben. Zur Konservierung von Stämmen wurden Zellsuspensionen mit 10% (v/v) Glycerol in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die **anaerobe Kultivierung** von *E. coli* wurde ein modifiziertes Medium nach Pollock *et al.* verwendet (Pollock et al., 2002). Als Eisenquelle wurden 200 µM Eisen-Citrat zugegeben. L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat wurde mit einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. 0,2% Resazurin diente als Redoxindikator. Zellen wurden in mit Naturkautschuk-Stopfen (Deutsch & Neumann, Berlin) verschlossenen Schraubflaschen (Schott, Mainz) auf einem Rührwerk gezogen.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Präparation genomischer DNA

Genomische DNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen (Sambrook & Russell, 2000). Alternativ wurde das MasterPure DNA Purification Kit von Epicentre (Biozym, Hess. Oldendorf) nach Herstellerangaben verwendet. Genomische DNA wurde bei 4°C gelagert. Für Kolonie-PCR kam das Pierce Lyse-N-Go-Reagenz (Perbio Science, Bonn) nach Herstellerangaben zum Einsatz.

3.3.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurde photometrisch mit dem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab, Erlangen) oder UV-Micro-Küvetten (Brand, Wertheim) und Ultrospec 2100 UV/Visible Spectrophotometer (GE Healthcare, München) mit den entsprechenden Programm-Modulen nach Anleitung der Hersteller bestimmt. Die Messungen beruhten auf der Absorption von Nukleinsäure. $\Delta A_{260} = 1$ bei 10 mm Schichtdicke entspricht 50 µg/mL doppelsträngiger DNA (Sambrook & Russell, 2000).

3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden aus genomischer und Plasmid-DNA mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde der Eppendorf MasterMix (2,5×) (VWR, Darmstadt) oder Pfu Ultra II (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) nach Herstellerangaben verwendet. DNA-Oligonukleotide wurde nach Standard-Methoden abgeleitet (Sambrook & Russell, 2000), nach Angaben der Hersteller (Thermo Fisher Scientific, Ulm; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in HPLC-Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. PCR-Reaktionen wurden bei Bedarf mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid auf einem Gradientencycler (Eppendorf Mastercycler Epgradient, Wesseling-Berzdorf) optimiert. Zur Analyse oder Präparation von PCR-Produkten wurden die Ansätze mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 3.3.5).

3.3.4. Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen New England Biolabs (Frankfurt a. M.) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Waren die Puffer unterschiedlicher Enzyme nicht kompatibel, wurde seriell mit dazwischen liegender DNA-Aufreinigung (3.3.7) gearbeitet. Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten wurden die Ansätze mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 3.3.5).

3.3.5. Agarose-Gel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden zur Längenbestimmung in Agarose-Gelen elektrophoretisch bei 120 V aufgetrennt (Sambrook & Russell, 2000). Es standen verschiedene Gel-Apparaturen zur Verfügung (Eigenbau, Werkstatt MPI, Marburg). Die Gele enthielten abhängig von der Fragmentlänge 1-3% (w/v) Agarose (PeqGold Universal, Peqlab, Erlangen) und 0,0001% Ethidium-Bromid in 1× TBE-Puffer (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die DNA-Proben wurden zum Beladen des Gels mit 1× DNA Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Als Längenstandard diente die Hyperladder I oder IV (Bioline, Lückenwalde). Die Gele wurden über ein Gel-Dokumentationssystem (UVP BioDoc-It, VWR international, Langenfeld) mit CCD-Kamera auf einem UV-Durchlichtschirm (302 oder 365 nm) fotografiert.

3.3.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

PCR-Produkte und DNA-Fragmente wurden bei 365 nm auf einem UV-Durchlichtschirm (Herolab UVT-20 LE, Wiesloch) aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mittels Silica-Matrix-Technologie über das Zymo DNA Gel Recovery Kit nach den Angaben des Herstellers. Eluiert wurde mit 10 µL HPLC-Wasser.

Zur Aufreinigung von bis zu 2000 µg linearer DNA-Fragmente wurde eine neues Gelextraktions-Protokoll mittels Anionen-Austauscher Chromatographie entwickelt. Dazu wurde ein Nucleobond PC 2000 Kit (Macherey & Nagel, Düren) verwendet. 500 µg Plasmid-DNA (3.3.11) wurden restringiert (3.3.4) und in einem Agarose-Gel mit einer Ladetasche über die gesamte Gel-Breite elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.5). Das gewünschte Fragment wurde ausgeschnitten und in einem 50 mL-Plastikgefäß in 10 mL 4,5 M Guanidinthiocyanat bei 50°C aufgelöst. Die Lösung wurde im Verhältnis 1:4 mit Puffer NX (125 mM Tris/H_3PO_4; 19% Ethanol; 0,19% Triton-X (pH 6,3)) gemischt und auf eine mit 20 mL Puffer N2 (100 mM Tris/H_3PO_4; 15% Ethanol; 0,19% Triton-X; 900 mM KCl (pH 6,3)) äquilibrierte Nucleobond AX 2000 Säule gegeben. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 35 mL Puffer N3 (100 mM Tris/H_3PO_4; 15% Ethanol; 1150 mM KCl (pH 6,3)). Eluiert wurde mit 25 mL Puffer N5 (100 mM Tris/H_3PO_4; 15% Ethanol; 1000 mM KCl (pH 8,5)). Die DNA wurde durch Zugabe von 18 mL 2-Propanol und Zentrifugation bei 4.700 Upm für 60 min bei 4°C in einer Heraeus Multifuge 1 S-R (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) gefällt. Nach einem Waschschritt mit 70% Ethanol wurde die DNA in HPLC Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

3.3.7. Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

PCR-Produkte und DNA-Fragmente wurden bei Bedarf mittels Zymo DNA Clean & Concentrator-5 Kits (HISS Diagnostics, Freiburg) aufgereinigt und konzentriert. Eluiert wurde mit 10 µL HPLC-Wasser.

3.3.8. Ligation und Klonierung von PCR-Produkten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit entsprechenden Enzymen restringiert (3.3.4) und aufgereinigt (3.3.6 oder 3.3.7). 10 µL Vektor-DNA wurden anschließend mit 1,2 µL Puffer und 0,8 µL antarktischer Phosphatase (NEB, Frankfurt a. M.) nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte in 20 µL-Ansätzen mit

2 µL Puffer und 1 µL T4 Ligase (1 U/µL) von Fermentas (St. Leon-Rot) für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde *E. coli* damit transformiert (3.3.10). Für die Zwischenklonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, Niederlande) nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.9. Herstellung Elektroporations-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung Elektroporations-kompetenter Zellen wurde *E. coli* in 1 L StdI-Medium (siehe 3.2.4) bis zu einer ΔOD_{600} von 0,6 bis 0,8 gezogen. Dann wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und bei 4°C mittels Zentrifuge (Sorvall RC 5B Plus mit Rotor SLA-3000, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) bei 5.000 Upm für 10 min abgeerntet. Die Zellen wurden dann in 500 mL sterilem H_2O bei 4°C resuspendiert und erneut pelletiert. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Nach einem Waschschritt mit 10% Glycerol wurden die Zellen im doppelten Volumen des Zellpellets resuspendiert und in 50 µL-Aliquots bei -80°C gelagert.

3.3.10. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Ligationsansätze oder Plasmid-DNA wurden für 15 min auf Membran-Filtern (VSWP02500, siehe 3.1.3) gegen vollentsalztes Wasser dialysiert und mittels Elektroporation in hierfür kompetent gemachte *E. coli*-Zellen eingebracht (siehe 3.3.9). Dazu wurden 50 µL Zellen auf Eis mit der zu transformierenden DNA versetzt und in Elektroporations-Küvetten (Bio-Rad Laboratories, München) mit 1 mm Schichtdicke mittels GenePulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, München) bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 µF elektroporiert. Sofort wurde 1 mL steriles SOC-Medium (2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$; 20 mM Glucose) zugegeben. Die Zellen wurden dann bei 37° für 1 h auf einem Roller inkubiert, anschließend auf selektiven Agarplatten mit Antibiotika (siehe 3.1.5) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Für Blau-Weiß-Tests wurde 1 L Fest-Medium ohne Glukose mit 3 mL X-Gal-Stammlösung (100 mg 5-Brom-4-chlor-indolyl-β-D-galaktopyranosid in 10 mL Dimethylformamid; Lagerung -20°C) versetzt und lichtgeschützt aufgehoben.

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

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Plasmid-Kit (Qiagen, Hilden) oder das Zymo Zyppy Plasmid Mini Kit (HISS Diagnostics, Freiburg) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Für größere Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) oder das Nucleobond PC 2000 Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Die Lagerung von Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

3.3.12. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Sequenzierungen doppelsträngiger Plasmid-DNA wurden nach der Didesoxykettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) mit dem ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Ein 20 µL-Ansatz enthielt 2 µL BigDye-Reagenz, 3 µL 5× Puffer, 1 µL Primer mit 5 pmol/µL (siehe TABELLE 3), 300-500 ng DNA und HPLC-Wasser. Die Reaktion wurde in dünnwandigen 0,2 mL-PCR-Gefäßen mit folgendem Programm durchgeführt: Schritt1: 96°C, 1 min; Schritt 2: 96°C, 10 s; Schritt 3: 60°C 4 min (25× Schritt 2+3, dann 4°C). Die DNA wurde anschließend mit 10 µL 125 mM EDTA, 9 µL 3 M Natrium-Acetat (pH 4,8), 80 µL HPLC-Wasser und 400 µL 96% Ethanol bei Raumtemperatur gefällt. Es folgten zwei Waschschritte mit 70% Ethanol. Die DNA wurde dann in 20 µL ABI Hi-Di Formamid bei 50°C für 10 min schüttelnd gelöst und auf einem automatischen Sequenziergerät (ABI 3130 Genetic Analyzer) analysiert, welches mit einem 36 cm-Kapillar-Array ausgerüstet war. Es wurde das POP-7 Polymer verwendet. Das System wurde von der ABI Foundation Data Collection Software v3.0 gesteuert. Für den Sequenzierlauf wurde das Modul RapidSeq36_POP7_1 mit Parametern des Herstellers und für die Daten-Analyse das Protokoll 3130POP7_BDTv3-KB-Denovo_v5.2 verwendet. Die prozessierten Daten wurden dann weiter manuell analysiert (3.6).

3.3.13. Liposomen-vermittelte Transformation von *Mc. voltae*

Methanococcus voltae lässt sich nach einer für *Methanosarcina*-Spezies entwickelten Methode transformieren (Metcalf et al., 1997). Die Arbeiten wurden in einem Anaerobenzelt mit einer $N_2/CO_2/H_2$ (75%/20%/5%) Atmosphäre durchgeführt (3.1.2). Zu transformierende DNA (zirkulär 2,5 µg, siehe 3.3.11; linear 100 µg, vgl. 3.3.6) wurde

lyophilisiert und durch Lagern im Anaerobenzelt für drei Tage anaerobisiert. Die anaerobe DNA wurde in 22,5 µL 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,0; steril; anaerob) gelöst und mit 2,5 µL Lipofektionsreagenz (Escort, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 10 min inkubiert. Escort ist ein 1:1 (v/v) Gemisch aus dem kationischen Lipid *N*-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-*N*,*N*,*N*-trimethylammonium-chlorid (DOTAP) und Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE) in MES-gepufferter Kochsalzlösung bei pH 6,2. *Mc. voltae*-Zellen (siehe 3.2.3) wurden aus 0,5 mL Kultur mit einer ΔOD_{600} von 0,5 pelletiert und in 0,5 mL isotoner Saccharose-Lösung (0,68 M in 20 mM HEPES; pH 7,4; steril; anaerob) resuspendiert. Die DNA-Lösung mit Escort-Reagenz wurde zugegeben und nach einer Inkubationszeit von 1,5 h bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit einer Spritze in 10 mL Medium (siehe 3.2.3) ohne Antibiotika gegeben. Nach 4 h bei 37°C und 120 Upm wurden die Kulturen anaerob in 15 mL-Röhrchen bei 4°C geerntet und in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert. Das *pac*-Gen in den Konstrukten vermittelte Puromycin-Resistenz. Die Agar-Platten mit Histidin und Puromycin (siehe 3.2.3) wurden drei Tage vor der Transformation in Petrischalen mit Nocken (Greiner Bio-One, Frickenhausen) anaerob vorbereitet. Die Platten wurden in Anaerobentöpfen (Eigenbau, Feinmechanische Werkstatt MPI, Marburg) mit $1{,}4 \times 10^5$ Pa Überdruck H_2/CO_2 und 1,6% (v/v) H_2S (3.1.2) bei 37°C inkubiert. Das Wachstum von Transformanden wurde über den abfallenden Druck verfolgt. Vor dem Öffnen im Anaerobenzelt wurden die Anaerobentöpfe zum Entfernen von H_2S mit H_2/CO_2 durchgast. Kolonien wurden von den Platten mit sterilen 1 mL-Spritzen gepickt und über Kanülen in 10 mL Aminosäure-Medium resuspendiert. Die Kulturen wurden bei 37°C kultiviert und nach Gasaustausch bei 4°C gelagert.

3.3.14. Southern-Blot-Analyse

Zum Transfer von restringierter DNA (3.3.4) in Agarose-Gelen (3.3.5) auf eine positiv geladene Hybond-N-Nylonmembran (GE Healthcare, München) wurde die Methode des alkalischen Kapillartransfers genutzt (Chomczynski, 1992). Die Sonde wurde unter Verwendung von Digoxygenin-dUTP und PCR (3.3.3) mit geeigneten Primern (TABELLE 3) nach dem „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ von Roche Diagnostics (Mannheim) hergestellt und verwendet. Benötigte Puffer, Reagenzien und der gegen Digoxygenin gerichtete Antikörper mit alkalischer Phosphatase wurden von Roche

Diagnostics bezogen. Detektiert wurde mittels ECF-Reagenz (GE Healthcare, München) auf einem Typhoon Trio oder Storm 860 (GE Healthcare, München).

3.4. Biochemische und analytische Methoden

3.4.1. Heterologe Produktion von HdrB in *E. coli*

Zur heterologen Produktion von HdrB wurde das *hdrB*-Gen aus *Methanothermobacter marburgensis* (GeneBank-Zugangsnummer X81133) in den Vektor pET-24b(+) kloniert. Der Expressions-Stamm *E. coli* BL21 (DE3)-pCodonPlus wurde nacheinander mit den Plasmiden pRKISC und pET-24b-*hdrB* transformiert. Die Zusammensetzung des Expressions-Mediums ist in (TABELLE 8) beschrieben.

TABELLE 8: Medium zur heterologen Produktion von HdrB in *E. coli*.

Komponenten	Menge	Endkonzentration
Casaminosäuren (Bacto)[a]	20,0 g	
Hefeextrakt (Fluka)[a]	15,0 g	
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	2,0 g	
K_2HPO_4	1,0 g	
NaCl	8,0 g	
H_2O	ad 1 L	
0,54 M Fe-Lösung[b, c]	0,1 mL	54 µM
1 M L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat[c]	1 mL	1 mM
50% (v/v) Glukose[c]	5 mL	0,25%
1000× Kanamycin-Sulfat[c, d]	1 mL	100 µg/mL
1000× Chloramphenicol[c, d]	1 mL	50 µg/mL
1000× Tetracyclin-HCl[c, d]	1 mL	15 µg/mL

[a] Geringer Eisen-Gehalt
[b] 0,54 M Fe-Lösung (36 mg elementares Eisen (Pulver) in 750 µL 36% HCl bei 80°C für 12 h lösen, dann Zugabe von 450 µL H_2O.
[c] Zugabe steril nach dem Autoklavieren.
[d] Vergleiche Abschnitt 3.1.5

Für die T7-abhängige Expression (Studier et al., 1990) von *hdrB* wurde der Produktionsstamm in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit 1 L Medium auf einem Magnetrührwerk bei 1000 Upm und 37°C bis zu einer optischen Dichte von ΔOD_{600} = 1,2

gezogen und mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Dann wurde die Kultur bei 25°C für weitere 24 h auf dem Magnetrührwerk und 24 h stehend inkubiert. Die Zellen wurden aufgeschüttelt und bei 5.000 Upm und 4°C (Sorvall RC 5B Plus mit Rotor im GS-3-Rotor, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) geerntet und bei -80°C gelagert. Die Produktion wurde über SDS-PAGE mit Proben vor und nach Induktion überprüft.

Für die **Produktion von mit ^{57}Fe-markiertem HdrB** wurden 30 mg ^{57}Fe (96% Anreicherung, Chemotrade, Düsseldorf) in 600 µL 36% HCl bei 80°C für 12 h gelöst und anschließend 450 µL H_2O zugegeben. Die so erhaltene 0,54 M ^{57}Fe-Lösung wurde dem Medium (3.4.1) und dem Rekonstitutionsansatz (3.4.3) entsprechend zugegeben.

3.4.2. Herstellung von Zelllysaten aus *E. coli*

Bei der Herstellung von zellfreiem Extrakt wurden alle Arbeitsschritte im Anaerobenzelt (siehe 3.1.2) bei 18°C durchgeführt. Abzentrifugierte Zellen (3.4.1) mit einer Feuchtzellmasse von 4 g wurden in 20 mL Puffer A (3.1.4) resuspendiert und in eine Serumflasche mit Gummistopfen gefüllt. Die Zellen wurden durch drei Passagen bei 110 Mpa mit einem FrenchPress Hochdruck-Homogenisator und anaerober Standard-Zelle (G.Heinemann Labortechnik, Schwäbisch Gmünd) aufgeschlossen. Es folgte optional die chemische Rekonstitution von [Fe-S]-Zentren *in vitro* (3.4.3) und ein Zentrifugationsschritt für 1 h bei $52.000 \times g$ und 4°C (Sorvall Pro 80 mit T-647.5-Rotor, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold).

3.4.3. Chemische *In-vitro*-Rekonstitution von [Fe-S]-Zentren

Für die chemische Rekonstitution des [Fe-S]-Zentrums in HdrB wurde ein modifiziertes Protokoll nach (Tong et al., 2003) verwendet. Alle Schritte wurden im Anaerobenzelt durchgeführt (3.1.2). *E. coli*-Lysat wurde in eine 120 mL Glasflasche gegeben und mit Puffer A (3.1.4) auf 50 mL aufgefüllt. Dazu kamen 50 mL eines anaeroben Puffers mit 100 mM Tris-HCl bei pH 8,5. Anschließend wurden 7 mM Dithiothreitol, 2 mM Cystein-HCl, 0,54 mM $Fe(II)Cl_2 \times 4H_2O$ und 2 mM Na_2S zugegeben. Der Ansatz wurde in einer verschlossenen Flasche für 12 Stunden bei 25°C gerührt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 h bei $52.000 \times g$ und 4°C (Sorvall Pro 80 mit T-647.5-Rotor, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold).

3.4.4. Säulenchromatographische Reinigung von heterolog produziertem HdrB aus *E. coli*

Der Zentrifugationsüberstand (3.4.3) wurde in einem Verhältnis von 1:3 mit Puffer A verdünnt und auf eine mit Puffer A (3.1.4) äquilibrierte Q-Sepharose-HiLoad-Säule (2,6 cm × 20 cm; GE Healthcare, München) aufgetragen. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 8 mL/min durch einem NaCl-Stufengradienten von: 50 mL 0 M, 130 mL 0,26 M, 80 mL 0,28 M, 80 mL 0,48 M, 80 mL 0,52 M, 50 mL 1,00 M, 90 mL 0 M. HdrB-Fraktionen eluierten mit 0,48 M NaCl in Puffer A. Fraktionen, welche HdrB enthielten, wurden vereinigt, mit Puffer A ohne Dithiothreitol gewaschen und ankonzentriert (Amicon 8600, YM-Membran, 10 kDa Ausschlussgrenze).

Um besonders reines HdrB herzustellen, wurde die Probe in Puffer auf 1 M Ammoniumsulfat eingestellt und auf eine äquilibrierte Phenylsepharose-Säule (2,6 cm × 20 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem absteigenden Stufengradienten von 50 mL 1 M, 50 mL 0,8 M, 50 mL 0,6 M, 50 mL 0,4 M, 50 mL 0,3 M, 50 mL 0,2 M, 50 mL 0,1 M und 100 mL 0 M Ammoniumsulfat. Die Elution von HdrB erfolgte mit einer Flussrate von 5 mL/min bei 0 M Ammoniumsulfat. HdrB wurde mittels Ultrafiltration (YM-Membran, Ausschlussgröße 10 kDa) ankonzentriert und dabei in Puffer A umgepuffert.

3.4.5. Heterologe Produktion von SdhE in *E. coli*

Für die heterologe Produktion von SdhE in *E. coli* wurde das Plasmid pET-24-*sdhE* (3.1.5) verwendet und wie unter 3.4.1, 3.4.2 und 3.4.3 verfahren. Es folgte die Reinigung wie im nächsten Abschnitt beschrieben (3.4.6).

3.4.6. Säulenchromatographische Reinigung von heterolog produziertem SdhE aus *E. coli*

Der Zentrifugationsüberstand (3.4.5) wurde in einem Verhältnis von 1:3 mit Puffer A (3.1.4) verdünnt und auf eine mit Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose-HiLoad-Säule (2,6 cm × 20 cm; GE Healthcare, München) aufgetragen. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 8 mL/min durch einem NaCl-

Stufengradienten von: 50 mL 0 M, 60 mL 0,1 M, 60 mL 0,2 M, 60 mL 0,24 M, 60 mL 0,28 M, 60 mL 0,32 M, 40 mL 1,0 M, 80 mL 0 M. SdhE-Fraktionen eluierten mit 0,2 M NaCl in Puffer A. Fraktionen, welche SdhE enthielten, wurden vereinigt, mit Puffer A (ohne Dithiothreitol) gewaschen und ankonzentriert (Amicon 8600, 10 kDa Ausschlussgrenze). SdhE nach Rekonstitution konnte nicht mehr an Q-Sepharose binden und eluierte im Durchlauf. Dieser wurde ebenfalls ankonzentriert und mit Puffer A (ohne Dithiothreitol) gewaschen.

3.4.7. Reinigung von Heterodisulfid-Reduktase aus *Mth. marburgensis*

Herstellung von Zellextrakten aus *Mth. marburgensis*

50 g Feuchtzellen aus *Mth. marburgensis* wurden in 100 mL 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) suspendiert und mittels Ultraschall (Branson Sonifer B 15) in einem Anaerobenzelt (3.1.2) aufgeschlossen. Hierbei wurden die resuspendierten Zellen in einem mit Eis gekühlten Rosettengefäß dreimal acht Minuten mit einer Ausgangsleistung von 80 Watt beschallt (Stufe 6; 50% Intensität; Intervallbeschallung). Die so erhaltenen Zellextrakte wurden anaerob in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen überführt und zur Entfernung von Zelltrümmern 30 min bei 15.000 × *g* zentrifugiert (Sorvall Pro 80 mit T-647.5-Rotor, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Zur vollständigen Entfernung der Membranen wurde der Überstand für weitere 45 min bei 94.000 × *g* abzentrifugiert (4°C). Das Pellet wurde verworfen, der Überstand wurde zu weiteren säulenchromatographischen Aufreinigung verwendet.

Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose fast flow

Der Überstand wurde in einem Verhältnis von 1:2 mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) verdünnt und auf eine DEAE-Sepharose fast flow-Säule (5,0 cm × 20 cm) aufgetragen. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 8 mL/min mit einem NaCl-Stufengradienten: 100 mL 0 M, 170 mL 0,28 M; 280 mL 0,4 M; 150 mL 1,0 M und 100 mL 2 M. Die Fraktion mit Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität eluierte mit 0,4 M NaCl in 50 mM Tris/HCl pH 7,6. Die Hdr-haltige Fraktion wurde mittels Ultrafiltration über eine YM-Membran (Ausschlussvolumen 100 kDa) entsalzt.

Chromatographie an Source 30 Q bei pH 7,6

Zur weiteren Reinigung von Heterodisulfid-Reduktase wurde die DEAE-Fraktion auf eine Source 30 Q-Säule (5,0 cm × 20 cm) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 10 mL/min mit einem NaCl-Stufengradienten: 160 mL 0,32 M; 320 mL 0,36 M; 320 mL 0,4 M und 320 mL 0,44 M. Die Fraktion mit der Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität eluierte mit 0,4 M NaCl in 50 mM Tris/HCl (pH 7,6). Die Hdr-haltige Fraktion wurde mittels Ultrafiltration entsalzt und ankonzentriert.

Hydrophobe Chromatographie an Source 15 Phenyl

Die Source 30 Q-Fraktion aus dem vorherigen Reinigungsschritt wurde auf eine Ammonium-Sulfat-Konzentration von 1 M eingestellt und auf eine mit 1 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) äquilibrierte Source 15 Phenyl-Säule (2,6 cm × 20 cm) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 5 mL/min mit einem abfallenden $(NH_4)_2SO_4$-Stufengradienten: 40 mL 0,8 M; 90 mL 0,6 M; 70 mL 0,4 M und 80 mL 0,0 M. Es wurden drei Fraktionen mit Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität eluiert (mit 0,6 M, 0,4 M und 0,0 M $(NH_4)_2SO_4$), die sich in ihrem Reinheitsgrad unterschieden. Sie wurden mittels Ultrafiltration entsalzt. Hierzu wurde Puffer A verwendet.

Chromatographie an Source 30 Q bei pH 9

Zur Trennung des H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplexes in zwei Subkomplexe (F_{420}-nichtreduzierende Hydrogenase und Heterodisulfid-Reduktase) wurden die drei Fraktionen der Source 15 Phenyl-Säule zunächst mit 25 mM Tris/HCl (pH 9) bis zu einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/mL verdünnt, 20 min im anaeroben Zelt inkubiert und auf eine mit 25 mM Tris/HCl (pH 9) äquilibrierte Source 30 Q-Säule (5,0 cm × 20 cm) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 10 mL/min mit einem NaCl-Stufengradienten von 0 M-0,48 M NaCl in 25 mM Tris/HCl (pH 9) (150 mL 0,4 M; 250 mL 0,44 M; 200 mL 0,48 M). Heterodisulfid-Reduktase eluierte mit 0,44 M NaCl und F_{420}-nichtreduzierende Hydrogenase mit 0,4 M NaCl. Die Fraktionen mit Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration entsalzt und gegen 30 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) umgepuffert.

Chromatographie an Hydroxyapatit

Die Source 30 Q-Fraktionen wurden im letzten Reinigungsschritt auf eine mit 30 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) äquilibrierte Hydroxyapatit-Säule (1,6 cm × 20 cm) aufgetragen und das Protein mit einer Flussrate von 5 mL/min und mit einem Kaliumphosphat-Stufengradienten eluiert: 30 mL 0 mM; 50 mL 50 mM Kaliumphosphat; 60 mL 100 mM Kaliumphosphat; 60 mL 250 mM Kaliumphosphat; 50 mL 500 mM Kaliumphosphat. Die Fraktion mit Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität eluierte mit 100-250 mM Kaliumphosphat und wurde mittels Ultrafiltration ankonzentriert und nach dem Umpuffern in 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) unter N_2-Atmosphäre bei 4°C gelagert.

3.4.8. Herstellung von Zellextrakten aus *Mc. voltae*

Mc. voltae wurde im 10 L–Fermenter kultiviert und in einer Durchflusszentrifuge anaerob abgeerntet (3.2.3). Alle folgenden Schritte wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Zum Zell-Aufschluss wurden 20 g Feuchtzellmasse in 100 mL 50 mM Tris/HCl (pH 8,5) mit 2 mM Dithiothreitol auf Eis suspendiert. Als Protease-Inhibitoren wurden Pepstatin (2 µg/mL), Leupeptin (2 µg/mL) und Pefa bloc (100 µg/mL) zugegeben. Nach Inkubation auf einem Rührwerk für 10 min wurde 4 × 5 min mit Ultraschall aufgeschlossen (vgl. 3.4.7). Nach einem Zentrifugationsschritt bei 120.000 × *g* für 30 min bei 4°C wurde der Überstand für die Reinigung von HdrB verwendet (3.4.9).

3.4.9. Partielle Reinigung von HdrB aus *Mc. voltae*

Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sepharose fast flow

Der Überstand wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) verdünnt und auf eine DEAE-Sepharose fast flow-Säule (5,0 cm × 20 cm) aufgetragen. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 8 mL/min mit einem NaCl-Stufengradienten: 100 mL 0 M, 80 mL 0,32 M; 80 mL 0,34 M; 80 mL 0,36 M; 80 mL 0,40 M; 80 mL 0,44 M; und 100 mL 0,5 M. HdrB wurde mittels Western-Blot-Analyse detektiert. Ebenfalls wurde parallel die Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität nach allen Chromatographie-Schritten bestimmt. Die Fraktion mit HdrB eluierte mit 0,32 M NaCl in 50 mM Tris/HCl (pH 7,6).

Chromatographie an Q-Sepharose-HiLoad

Zur weiteren Reinigung von HdrB wurde die DEAE-Fraktion auf eine äquilibrierte Q-Sepharose-HiLoad-Säule (2,6 cm × 20 cm; GE Healthcare, München) aufgetragen. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 8 mL/min durch einem NaCl-Stufengradienten von: 50 mL 0 M, 130 mL 0,26 M, 80 mL 0,28 M, 80 mL 0,48 M, 80 mL 0,52 M, 50 mL 1,00 M, 90 mL 0 M. HdrB-Fraktionen eluierten mit 0,48 M NaCl in Puffer A. Fraktionen, welche HdrB enthielten, wurden vereinigt und ankonzentriert (Amicon 8600, YM-Membran, 10 kDa Ausschlussgrenze).

Chromatographie an Source 30 Q

Die entsalzte HdrB-Fraktion wurde auf eine Source 30 Q-Säule (5,0 cm × 20 cm) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 10 mL/min mit einem NaCl-Stufengradienten: 50 mL 0 M; 60 mL 0,20 M; 60 mL 0,24 M; 60 mL 0,28 M; 60 mL 0,30 M; 60 mL 0,32 M; 60 mL 0,34 M; 60 mL 0,36 M; 60 mL 0,38 M; 60 mL 0,40 M; 60 mL 0,42 M; 60 mL 0,44 M; 60 mL 0,46 M; 60 mL 0,48 M und 60 mL 0,50 M. Die HdrB-Fraktion eluierten mit 0,28 M NaCl in Puffer A und wurde ankonzentriert. Anschließend erfolgte eine Rechromatographie am gleichen Säulenmaterial. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 10 mL/min mit einem NaCl-Stufengradienten: 50 mL 0 M; 60 mL 0,20 M; 160 mL 0,22 M; 100 mL 0,24 M; 150 mL 0,26 M; 120 mL 0,28 M; 100 mL 0,30 M; 100 mL 0,32 M; 100 mL 0,34 M und 100 mL 0,36 M. Die HdrB-Fraktionen eluierte wieder mit 0,28 M NaCl in Puffer A und wurde ankonzentriert.

Gelfiltrations-Chromatographie an Superdex 200

Die nach der Chromatographie an Source 30 Q erhaltene Probe mit HdrB und Hdr-Aktivität wurde im letzten Reinigungsschritt auf eine mit 0,1 M NaCl in Puffer A äquilibrierte Superdex 200-Säule (2,6 cm × 60 cm) aufgetragen. Die Elution bei einer Flussrate von 1 mL/min mit demselben Puffer ergab Peaks nach 216 (I), 250 (II) und 272 (III) mL (Peakmaximum). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse überprüft. Peak II enthielt Hdr-Haupt-Aktivität und kein HdrB. Bei Peak III verhielt es sich umgekehrt.

3.4.10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Messung der Enzymaktivitäten wurde photometrisch in mit Gummistopfen (5 × 9 × 20, Deutsch & Neumann, Berlin) verschließbaren Küvetten von Hellma (Müllheim/Baden) mit einer Schichtdicke von 1 cm und 1,5 mL Volumen durchgeführt. Die Küvetten wurden durch mehrfaches Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert. Die Komponenten des Tests wurden als anaerobe Lösungen mit Hilfe von Hamilton-Spritzen (Bonaduz, Schweiz) zugegeben. Extinktionsmessungen bei 578 nm und bei 65°C im Falle von Hdr aus *Mth. marburgensis* bzw. bei 37°C im Falle von Hdr aus *Ms. barkeri* wurden mit einem Eppendorf-Spektrallinienphotometer (Modell 1101 M) durchgeführt.

Bestimmung der Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität mit reduziertem Benzylviologen als artifiziellem Elektronendonor

$$2\ BV_{red}^{+\bullet} + CoM\text{-}S\text{-}S\text{-}CoB + 2\ H^{+} \xrightarrow{Hdr} HS\text{-}CoB + HS\text{-}CoM + 2\ BV_{ox}^{++}$$

BV: Benzylviologen

Die Aktivität wurde unter N_2-Atmosphäre (120 kPa) bei 65°C bestimmt. Der 0,8 mL Testansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl (pH 7,6); 2 mM Benzylviologen (Watt & Burns, 1975); 0,6 mM Heterodisulfid und ca. 10-100 µg Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet. Der Test basierte auf Bestimmung der Absorptionsänderung des Benzylviologens (ε_{578} = 8,6 $mM^{-1} \times cm^{-1}$).

Bestimmung der Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität mit CoM-SH und CoB-SH und Methylenblau als artifiziellem Elektronenakzeptor

$$MB_{ox} + HS\text{-}CoM + HS\text{-}CoB \xrightarrow{Hdr} CoM\text{-}S\text{-}S\text{-}CoB + MB_{red}^{2-} + 2\ H^{+}$$

MB: Methylenblau

Die Heterodisulfid-Reduktion ist reversibel. In der Rückreaktion werden CoM-SH und CoB-SH in das Heterodisulfid umgewandelt, als Elektronenakzeptor im Testansatz diente Methylenblau (ε_{578} = 11,5 $mM^{-1} \times cm^{-1}$). Die Bestimmung der Aktivität erfolgte unter N_2-Atmosphäre (120 kPa) bei 65°C. Der 0,8 mL Standardansatz enthielt: 50 mM

Tris/HCl (pH 7,6); 2 mM Methylenblau, 0,6 mM CoM-SH, 0,6 mM CoB-SH und ca. 10-100 µg Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet.

Bestimmung der Aktivität von F_{420}-nichtreduzierender Hydrogenase mit Benzylviologen als artifizieller Elektronendonor

$$2\ BV^{++}_{ox} + H_2 \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} 2\ BV^{+\bullet}_{red} + 2\ H^+$$

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte unter H_2-Atmosphäre (120 kPa) bei 65°C. Der 0,8 mL Standardansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl (pH 7,6); 2 mM Benzylviologen und ca. 10 µg Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Enzym gestartet. Der Test basierte auf Bestimmung der Absorptionsänderung des Benzylviologens (ε_{578} = 8,6 $M^{-1} \times cm^{-1}$).

3.4.11. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit dem Bio-Rad-Mikroassay durchgeführt (Bio-Rad Laboratories, München). Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brillantblau R-250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Protein (Bradford, 1976). Der 1 mL Testansatz enthielt 0-8 µg Rinderserumalbumin als Standard (Perbio Science, Bonn) oder die Probe sowie 0,2 mL Proteinfarbstoffreagenz. Die Messungen wurden mit einem Ultrospec 2100 pro Spektrophotometer (GE Healthcare, München) durchgeführt. Das Programm „Standard-Kurve“ bestimmte aus den gemessenen Standards eine Kalibrierkurve mittels linearer Regression.

3.4.12. Ermittlung der Polypeptidzusammensetzung durch SDS-PAGE

Proteine wurden mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen analysiert (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung der 14%igen Gele (6,5 cm × 9 cm × 0,075 cm) ist in TABELLE 9 beschrieben.

Es wurde eine Mini Protean II-Apparatur (Bio-Rad Laboratories, München) verwendet. Die 40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37:1) wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben mit SDS-

Probenpuffer (63 mM Tris/HCl (pH 6,8); 2% (w/v) SDS, 10% (w/v) Glycerin, 16 mM Dithiothreitol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) 1:2 verdünnt. Der Tris/Glycin-Elektrodenpuffer (pH 8,8) bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Den Proben wurde 26 mM Dithiothreitol zugesetzt. Dann wurden sie für 5 min bei 98°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Wenn die Lauffront das Sammelgel erreicht hatte, wurde die Spannung von 140 V auf 200 V erhöht. Bei Erreichen des unteren Gel-Randes durch den Bromphenolmarker, wurde die Elektrophorese beendet.

TABELLE 9: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele. Es sind die Volumina für je zwei Gele angegeben.

Komponenten	**Trenngel (14%ig)**	**Sammelgel (4%ig)**
Tris/HCl	2,5 mL (1,5 M, pH 8,8)	0,5 mL (0,5 M, pH 6,8)
40% Acrylamid-Lösung (Acrylamid/Bisacrylamid 37:1)	3,5 mL	0,2 mL
H_2O	ad 10 mL	ad 2 mL
N, *N*, *N´*, *N´*-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	7 µL	6 µL
10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	60 µL	12 µL

Zum Sichtbarmachen der Polypeptide wurden die Gele bei Raumtemperatur 1-14 h in einer Lösung aus 0,05 (w/v) Serva Blue R (Coomassie R 250), 0,05% (w/v) Crocein Scarlet 7B und 0,5% (w/v) $CuSO_4$ in Wasser/Isopropanol/Eisessig (65:25:10) gefärbt. Die Entfärbung des nicht proteingebundenen Farbstoffs erfolgte in einer Mischlösung aus Wasser/Isopropanol/Essigsäure (81:12:7), die 0,5 % (w/v) $CuSO_4$ enthielt. Zur Hintergrundentfärbung wurden die Gele für ca. 5 h in eine wässrige Lösung mit 12% Isopropanol und 7% Eisessig gelegt. Nach Wässern wurden die Gele gescannt und anschließend getrocknet (GelDryer SE1160, Thermo Scientific, München).

Um das diffuse Laufverhalten von Polypeptiden nach Oxidation von Thiolgruppen zu verhindern und eine schärfere Trennung zu erreichen, wurden durch **Alkylierung von Cystein-Resten** die Bildung von Disulfid-Brücken verhindert. Der Probenpuffer enthielt 400 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 1% SDS. In diesem wurden die Proben 1:2 verdünnt. Den

Proben wurde 26 mM Dithiothreitol zugesetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min gekocht. Eine 20%ige (w/v) Iodacetamid-Lösung wurde 1:11 in der Probe verdünnt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben auf ein Gel aufgetragen.

3.4.13. Western-Blot-Analyse

Für Western-Blot-Analysen wurden Proteine aus ungefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelen durch Elektroblotting in einer Semi-Dry-Transfer-Zelle (Modell Trans-Blot SD, Bio-Rad Laboratories, München) auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran BA85, 0,45 µm; Whatman, Dassel) übertragen. Die Puffer des diskontinuierliches Systems sind in TABELLE 10 aufgelistet. Auf die Anode (+ Pol) wurden acht Lagen eines dünnen Filterpapiers (GB002; Whatman, Dassel) gelegt, welches zuvor in Puffer für die Membranseite getränkt wurde. Darauf kam die Membran. Auf diese wurde das ungefärbte SDS-Gel gelegt. Es folgten acht Lagen des dünnen Filterpapiers, welche in Puffer für die Gelseite getränkt waren. Vor dem Aufsetzen der Kathode (- Pol) wurden eventuell vorhandene Luftblasen durch eine Rollwalze entfernt. Der Elektrotransfer wurde bei einem konstanten Strom von 0,8 mA pro cm^2 Membranfläche über eine Dauer von 1,5 h durchgeführt.

TABELLE 10: Transferpuffer für Western-Blots.

Anoden-Puffer für die Membranseite (+)	Kathoden-Puffer für die Gelseite (-)
Tris 25 mM	Tris 50 mM
Glycin 192 mM	Glycin 384 mM
SDS 0,01% (w/v)	SDS 0,2% (w/v)
Methanol 25% (v/v)	Methanol 10% (v/v)

Nach dem Elektro-Transfer wurde die Membran zum Absättigen über Nacht in PBS^T-Puffer (8 mM Na_2HPO_4, 2 mM NaH_2PO_4, 70 mM NaCl, 0,05% (v/v) TWEEN 20), der 5% (w/v) handelsübliches Magermilchpulver enthielt, unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Der Erst-Antikörper (α-HdrABC) stand aus einer anderen Studie zur Verfügung (Stojanowic et al., 2003). Er wurde 1:5.000 verdünnt in PBS^T-Puffer mit 2,5% (w/v) Magermilchpulver auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h. Nach mehrmaligem Waschen (dreimal 5 min) mit PBS^T-Puffer wurde Zweit-

Antikörper (α-Kaninchen-IgG vom Schaf als Alkalische Phosphatase-Konjugat, Amersham Biosciences, Freiburg) 1:10.000 verdünnt in PBS^T-Puffer mit 2,5% Milchpulver auf die Membran gegeben und 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal gewaschen. Vor der Detektion wurde für 10 min in 0,1 M Tris/HCl (pH 9,5) inkubiert. Detektiert wurde mittels ECF-Reagenz (GE Healthcare, München) auf einem Typhoon Trio oder Storm 860-Fluoreszenzscanner (GE Healthcare, München).

3.4.14. Quantitativer Nachweis von Nicht-Häm-Eisen

Nicht-Häm-Eisen wurde durch Inkubation des Proteins in salzsaurer Kaliumpermanganat-Lösung freigesetzt, mit Ascorbinsäure zu Fe^{2+} reduziert und anschließend als Ferrospektral-Komplex nachgewiesen (Fish, 1988).

0,5 mL Probe (nach Behandlung mit Chelex 100, Bio-Rad, München) oder Standard (0,1 — 2 µg Eisen) wurde mit 0,2 mL Lösung A versetzt und für 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 40 µL Lösung B und diese Mischung wurde für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm bestimmt. Als Standard diente eine $FeCl_3$-Lösung (Titrisol, Merck Biosciences, Darmstadt).

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

Lösung B: Die wässrige Lösung enthielt 6,5 mM Ferrospectral (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonat)-1,2,4-Tiazin, Dinatriumsalz), 13,1 mM Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin), 2 M Ascorbinsäure sowie 5 M Ammoniumacetat.

3.4.15. Quantitativer Nachweis von Nachweis von säurelabilem Schwefel

Eisen-Schwefel-Zentren wurden mit Schwefelsäure hydrolysiert, freigesetztes Sulfid als Zinksulfid gebunden und durch *N,N'*-Dimethyl-*p*-phenylendiamin in Anwesenheit von Fe^{3+}-Ionen zu Methylenblau umgesetzt. Methylenblau konnte aufgrund seines Absorptionsmaximums bei 670 nm photometrisch bestimmt werden. Als Standard diente eine Na_2S-Lösung (modifizierte Methode nach Cline (Cline, 1969)).

Es wurde 0,1 mL Lösung A vorgelegt und danach 0,1 mL Probe oder Standard (0 – 25 nmol S^{2-}), 0,1 mL Lösung B und 10 µL Lösung C zugegeben. Der Reaktionsansatz

wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit Wasser auf 1 mL aufgefüllt und die Extinktion bei 670 nm bestimmt.

Lösung A: 2% Zinkacetat in Wasser

Lösung B: 0,2% *N,N'*-Dimethyl-*p*-phenylendiamindiammoniumchlorid in 3,75 M H_2SO_4

Lösung C: $NH_4Fe(III)(SO_4)_2$ x 12 H_2O, 10% in Wasser

3.4.16. Proteinkristallisations-Experimente

Für Kristallisationsversuche wurde Heterodisulfid-Reduktase aus verschiedenen Methanogenen gereinigt oder stand aus anderen Versuchen zur Verfügung (*Mth. marburgensis, Ms. barkeri, Ms. thermophila*). Nach Größenausschluss-Chromatographie an Superdex 200 wurden die braun gefärbten Fraktionen vereinigt und auf 10 oder 20 mg/mL ankonzentriert. Alle Kristallisationsexperimente wurden im Anaerobenzelt (siehe 3.1.2) bei 8°C als miniaturisierte Dampfdiffusions-Experimente nach der Methode des sitzenden Tropfens durchgeführt (Davies & Segal, 1971).

Mit elektronisch-programmierbaren Mikropipetten (Rainin 1-Kanal 10 µL, 8-Kanal 10 µL und 12-Kanal 200 µL, Rainin, Mettler Toledo, Giessen) wurden die zum Großteil kommerziell erworbenen Kristallisationspuffer in die Proteinkristallisations-Mikroplatten im 96-Well-Format (CCP) (Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) pipettiert. ABBILDUNG 6 zeigt schematisch eine CCP.

Die Lösungen aus den verwendeten Screening-Kits (JenaScreen 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10, Jenabioscience, Jena; Structure Screen 1 + 2, Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA; Crystool I (Dr. B. Mamat, MPI Frankfurt), http://www-structure.llnl.gov/crystool, (Segelke, 2001)) wurden mittels 12-Kanalpipette aus den Vorratsgefäßen auf die CCPs verteilt. Je 60 µL des Kristallisationspuffers wurden dabei in das große Reservoir der CCP überführt. Mit einer Einkanalpipette wurde je 1 µL Proteinlösung in das kleine Reservoir pipettiert. Mit der 8-Kanal-Pipette wurden dann die Proteinlösung mit Puffer 1:2 verdünnt. Die Kammern wurden mit klarer Klebefolie versiegelt. Somit war die Kontrolle auf Kristallbildung mittels Binokular (Zeiss, Göttingen) möglich. Mit dieser Methode konnten etwa 600 Bedingungen parallel getestet werden.

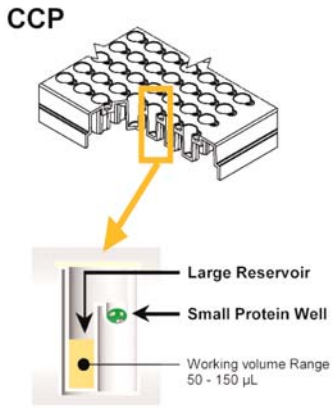

ABBILDUNG 6: Die Corning Kristallographieplatte (CCP) hat Platz für 96 Dampfdiffusions-Kristallisations-Experimente. Jede Kammer besteht aus einem großen Reservoir für den Kristallisationspuffer oder „Mutterlauge" (mother liquor) und einem kleinen Reservoir, um den Proteintropfen zu halten. Um Dampfdiffusion und spätere Betrachtung unter dem Binokular zu ermöglichen, wird die Platte mit durchsichtiger Klebefolie versiegelt (Villasenor et al., 2002).

3.5. Biophysikalische Methoden

3.5.1. UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden mit einem Diodenarray-Photometer (Modell Specord S10, Zeiss, Jena) bei Raumtemperatur aufgenommen. Dazu wurden im Anaerobenzelt Quarzküvetten mit Proteinproben befüllt und mit Butylgummistopfen verschlossen. Die Spektren wurden außerhalb des Anaerobenzeltes aufgenommen. Zur Reduktion der Proben wurde anaerobe Natrium-Dithionit-Lösung ($Na_2S_2O_4$) (10 mM), zur Oxidation Durochinon (2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzochinon) (10 mM) oder Sauerstoff (Luft) verwendet.

3.5.2. MALDI-TOF-Massen-Spektrometrie von Polypeptiden

Die Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen wurde mittels MALDI-TOF-MS (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **T**ime **O**f **F**light **M**ass **S**pectrometry) vorgenommen. Die Beschleunigungsspannung des Massen-Spektrometers (Voyager DE-RP, Applied Biosystems, Weiterstadt) betrug 25.000 V, die Gitterspannung lag bei 90%. Die Delay-Zeit betrug 600 ns. Als Matrix diente eine gesättigte Sinapinsäure-Lösung in Acetonitril/H_2O/Trifluoressigsäure (67/33/0,1; v/v/v). Diese wurde mit der zu bestimmenden Probe verdünnt.

3.5.3. Peptid-Massen-Fingerprint

Um die Identität von Proteinen zu bestimmen, wurden von Herrn Jörg Kahnt (Max-Planck-Institut, Marburg) Peptid-Massen-Fingerprints durchgeführt. Protein wurde dazu entweder im Gel oder in Lösung mit Trypsin (Promega, Mannheim) verdaut. Die Massen der erhaltenen Peptid-Fragmente wurden mit einem Massen-Spektrometer (Ultraflex 1, Bruker, Bremen) bestimmt. Nach Anlegen bestimmter Qualitätskriterien wurde das Protein durch den Vergleich der gemessenen Massen mit bekannten Sequenzen identifiziert (http://www.expasy.org/tools/#proteome).

3.5.4. Aufnahme und Auswertung von EPR-Spektren

Grundlagen der EPR-Spektroskopie

Bei spektroskopischen Messungen werden Energiedifferenzen zwischen Atom- oder Molekülzuständen gemessen. In einem EPR-Experiment stammen die Energiedifferenzen von der Wechselwirkung ungepaarter Elektronen mit einem Magnetfeld B_0, welches von außen an die Probe angelegt wird (Hagen, 2006). Diese Wechselwirkung beruht darauf, dass der Elektronenspin (Drehimpuls $m_s = +½$ oder $-½$) ein magnetisches Moment μ_e besitzt. Dieses Moment richtet sich im Magnetfeld entweder parallel (höhere Energie) oder antiparallel (niedrigere Energie) zum äußeren Magnetfeld aus. Diese Aufspaltung wird auch als Elektronen-Zeeman-Aufspaltung bezeichnet (ABBILDUNG 7).

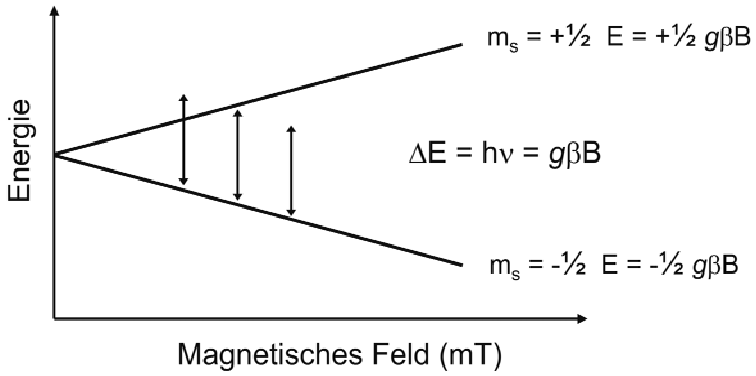

ABBILDUNG 7: Abhängigkeit der Energiedifferenz der beiden Spinzustände m_s = +/-½ eines Elektrons von der Magnetfeldstärke des äußeren Feldes. Die drei vertikalen Pfeile stehen für die Energie, die mit dem Mikrowellen-Quantum assoziiert ist und verdeutlichen, dass es genau einen Wert für das magnetische Feld gibt, an dem die Absorption der Mikrowellen stattfinden kann.

Die Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen ist direkt proportional zu der Stärke des magnetischen Feldes:

$$E = -\mu B \qquad \mu = \pm \tfrac{1}{2} g\beta \tag{3}$$

$$\Delta E = 2\mu B = g\beta B \tag{4}$$

wobei E die Energie (in Joule), B die Magnetfeldstärke (in Tesla), g ein Proportionalitätsfaktor, dessen Wert direkt proportional zum magnetischen Moment μ ist, und β das Bohrmagneton (Joule/Tesla) darstellt.

Werden Mikrowellen mit geeigneter Frequenz (≅ geeigneter Energie) eingestrahlt, so kommt es zur Absorption. Diese tritt dann auf, wenn die Energie der Mikrowellen der Differenz der Energiezustände entspricht und es dadurch zur Umkehr der Orientierung des Spins im magnetischen Feld kommt:

$$h\nu = g\beta B \qquad g = 0{,}7145 \frac{\nu[MHz]}{B[Gauss]} \tag{5}$$

wobei h das Plancksche Wirkungsquantum ($6{,}6 \times 10^{-34}$ J × s) und ν die Mikrowellenfrequenz (in Hz) ist. Der g-Wert ist spezifisch für die jeweilige Probe, für ein freies Elektron (Radikal) ergibt sich:

$$g = g_e = 2{,}0023 \tag{6}$$

Bei EPR-Messungen wird allerdings nicht die Mikrowellenfrequenz, sondern die Magnetfeldstärke variiert. Weiter wird nicht das Absorptionsspektrum sondern dessen erste Ableitung gemessen, um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Bei einer „realen“ Probe kommt zu dem magnetischen Moment des Elektrons μ_e noch ein magnetisches Orbitalmoment μ_o. Dieses wird vom Orbital des Elektrons, dem Kern und von der Symmetrie des Moleküls beeinflusst. Durch die Kopplung beider Systeme entsteht das gesamte magnetische Moment ($\mu_{ges} = \mu_e + \mu_o$) des Systems (Spin-Bahn Kopplung). Aus (3) ergibt sich dadurch eine Verschiebung der g-Werte und damit aus (4) eine Verschiebung der Resonanzfrequenz. Somit führt das magnetische Orbitalmoment zu einer Abweichung von $g = 2{,}0023$.

Das magnetische Moment μ stellt einen Vektor dar. μ_e koppelt nur mit dem Anteil von μ_o, der parallel zum äußeren Magnetfeld steht. Ein Spin mit kugelsymmetrischer Umgebung zeigt ein isotropes EPR-Signal, da der Betrag von μ_o in jeder Richtung gleich ist. Ist die magnetische Umgebung des Paramagneten axialsymmetrisch, so wird ein

axiales, anisotropes EPR-Signal detektiert. Hat μ_o in alle drei Raumrichtungen einen unterschiedlichen Betrag, so erhält man ein rhombisches Signal. Beispiele für solche Spektren sind in ABBILDUNG 8 gezeigt.

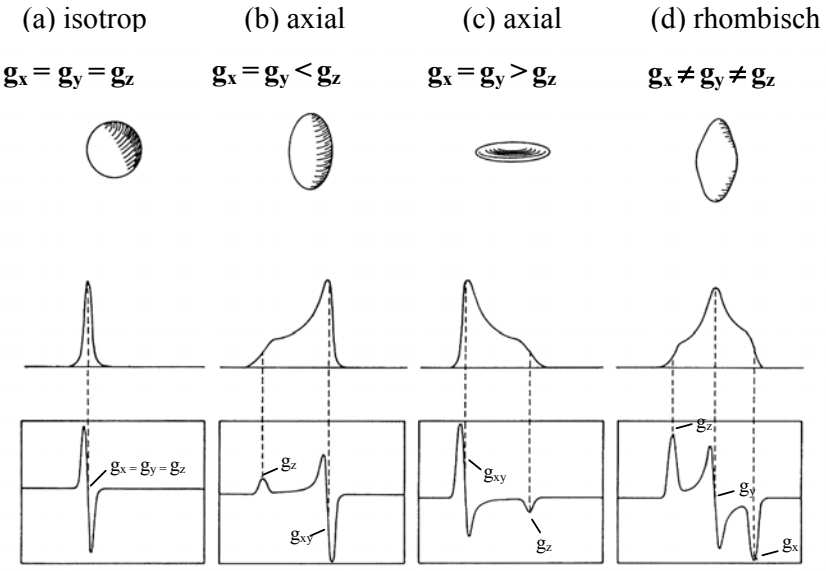

ABBILDUNG 8: Grundlegende EPR-Spektren von S=1/2 Paramagneten. a-d zeigen von oben nach unten den Spektraltyp, die *g*-Anisotropie, sowie die idealisierten Spektren, zunächst in der Absorptionsform und dann in der 1. Ableitung des Spektrums (Palmer, 2000).

Eine weitere Beeinflussung des magnetischen Momentes kann durch magnetisch aktive Kerne verursacht werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des ^{33}S-Nukleus untersucht. Dieser Kern hat einen Kernspin von $S = {}^3/_2$. Dieser Einfluss ruft, wenn er mit dem Elektronenspin interagiert, entweder eine Hyperfeinauflösung des Signals oder eine Verbreiterung des Spektrums (Linienbreite) hervor. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass sich das magnetische Moment des Kerns im äußeren Magnetfeld B ausrichtet und sich das Magnetfeld des Kern B_K entweder zum äußeren Magnetfeld addiert oder subtrahiert (Atkins, 1996)

Vorbereitung der EPR-Proben

Die EPR-Probenröhrchen bestanden aus hochreinem Quarzglas (99,99%) mit einem Innendurchmesser von 3 mm bei einer Wandstärke von 0,5 mm. Die Anaerobisierung der Röhrchen und des Verschlussmaterials erfolgte durch Lagerung im Anaerobenzelt unter N_2/H_2 (95%/5%). Standardmäßig wurde für die Oxidation von Proben Durochinon (2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzochinon) in 80% Ethanol und für die Reduktion

Natrium-Dithionit ($Na_2S_2O_4$) verwendet. Röhrchen wurden mit 300 µL Probe befüllt und mittels eines 3 cm langen Latexschlauchs mit einem Plastikstab verschlossen. Die Röhrchen wurden außerhalb des Zeltes in flüssigem Stickstoff (77 K) eingefroren, wonach der Latexschlauch zum Druckausgleich eingeschnitten wurde. Bei Lagerung der Proben in flüssigem Stickstoff veränderten sich die EPR-Signale in Ihrer Art und Intensität nicht.

Aufnahme von EPR-Spektren

EPR-Spektren wurden bei 9,4568 GHz (X-Band) in einem Bruker EMX-6/1 EPR-Spektrometer, bestehend aus einer EMX 1/3 Konsole, einer 041 X6 Brücke mit eingebautem ER-0410-116 Frequenzzähler, einem ER-070 Magneten und einem ER-4102 Hohlraumresonator (Standard-Cavity), bei einer Feld-Modulationsfrequenz von 100 kHz aufgezeichnet. Die Mikrowellenleistung betrug 20 mW bei einer Modulationsamplitude von 10,68 G. Die Kühlung der Proben erfolgte in einem Helium-Flusssystem in einem Kryostaten mit einem Temperatursensor (ESR 900 Cryostat, Oxford Instruments, Wiesbaden). Dabei wurde Software von Bruker genutzt.

Interpretation und Auswertung von EPR-Spektren

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem WIN-EPR Programm von Bruker sowie mit von Simon Albracht (Swammerdam Institut, Universität Amsterdam, Niederlande) entwickelten, nicht kommerziellen Programmen. Die Grundlagen der Quantifizierung und Simulation von EPR-Daten sind von Albracht und Beinert beschrieben worden (Beinert & Albracht, 1982). Simulationen von EPR-Spektren wurden von Dr. Antonio Pierik durchgeführt.

Zur Bestimmung der Spinkonzentration wurde neben den Proben immer ein Standard gemessen. Dieser Standard setzte sich aus 10 mM $CuSO_4 \times 5H_2O$, 2 M $NaClO_4$ und 10 mM HCl zusammen. Dieser Standard wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Probe gemessen. Die Fläche unter dem Signal ist proportional zur Konzentration an Spin, daher erfolgt die Quantifizierung der Spinkonzentration über die normierten Doppelintegrale (I_N) der gemessene Spektren. Die Berechnungen wurden mit den von S. Albracht oder Bruker entwickelten Programmen durchgeführt. Das normierte Doppelintegral I_N berechnet sich unter Einbeziehung der Geräte- und Probeneigenschaften nach der von Aasa *et al.* erstellten Gleichung 8 (Aasa et al., 1975). Die Spinkonzentration ergibt sich daraus nach der Gleichung 7.

$$C_P = \frac{I_N(\text{Probe}) \times C_S}{I_N(\text{Standard})} \qquad (7)$$

$$I_N = \frac{I_0 \times d^2 \times T \times 10^{\frac{dB}{20}}}{g_p^{av} \times f \times a} \qquad (8)$$

C_P	Spinkonzentration der Probe	dB	Mikrowellenenergie
C_S	Spinkonzentration des Standards	f	Röhrchenfaktor
I_N	Normiertes Doppelintegral	a	Verstärkungsfaktor
I_0	Gemessene Intensität	d	Abstand der Start- und End-
T	Temperatur in K		Messpunkte (in Gauss)

g_p^{av} $^2/_3\,[^1/_3\,(g_x^2 + g_y^2 + g_z^2)]^{1/2} + (g_x + g_y + g_z)/9$

Messung der Temperaturabhängigkeit von EPR-Signalen

Die Temperaturabhängigkeit einer Probe wurde ermittelt, indem die entsprechende Probe bei nicht-sättigenden Bedingungen und unterschiedlichen Temperaturen gemessen wurde. Die Signalintensität verändert sich mit der Temperatur, somit kann die normalisierte Intensität gegen die Temperatur aufgetragen werden, und man erhält ein für den Ursprung des Signals charakteristisches Temperaturverhalten. Die Intensität des Signals wurde durch die Formel $I_N = \frac{I \times T \times 10^{\frac{dB}{20}}}{gain}$ (mit I_N = normalisierte Intensität, I = gemessene Intensität, T = Temperatur, dB = Mikrowellenenergie, $gain$ = Verstärkungsfaktor) normalisiert.

3.5.5. EPR-Redoxtitrationen

Alle EPR-Redoxtitrationen wurden in einem Anaerobenzelt (3.1.2) in Dithiothreitol-freiem 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) durchgeführt. Als Redoxmediatoren wurden folgende Farbstoffe in einer Endkonzentration von 20 µM verwendet: 1,4-Benzochinon ($E°'$ = +274 mV), 1,2-Naphtochinon-4-sulfonat ($E°'$ = +215 mV), 1,2-Naphtochinon ($E°'$ = +134 mV), 1,4-Naphtochinon ($E°'$ = +69 mV), Thionin ($E°'$ = +64 mV), Methylenblau ($E°'$ = +11 mV), Durochinon ($E°'$ = +50 mV), Indigodisulfonat ($E°'$ = -125 mV), 2-Hydroxy-1,4-naphtochinon ($E°'$ = -145 mV), Anthrachinon-1,5-disulfonat ($E°'$ = -170 mV), Phenosafranin ($E°'$ = -252 mV), Anthrachinon-2-sulfonat ($E°'$ = -255 mV), Safranin O ($E°'$ = -289 mV), Neutralrot ($E°'$ = -325 mV), Benzylviologen ($E°'$ = -360 mV), Methylviologen ($E°'$ = -446 mV), je nach zu

untersuchenden Potentialbereich (Dr. E. Duin, persönliche Mitteilung). Als Elektrode diente eine Ag/AgCl-Elektrode (InLab®501 Combination Redox Electrode, Mettler-Toledo, Gießen). Zur Umwandlung des gemessenen Redoxpotentials in das Potential gegen die Wasserstoffelektrode (NHE, normal hydrogen electrode) wurde ein Wert von +207 mV bei 25°C zu den gemessen Werten addiert. Die Elektrode wurde in ein Glasgefäß mit zwei weiteren Öffnungen zur Zugabe und Entnahme von Lösungen über einen durchbohrten Gummistopfen fixiert. Als Reduktionsmittel diente eine frisch hergestellte Natrium-Dithionit-Lösung (10 mM und 100 mM Stammlösungen), als Oxidationsmittel diente eine Ferricyanid-Lösung ($K_3[Fe(III)(CN)_6]$; 15 mM und 150 mM Stammlösungen). Zur Herstellung der Proben für die Redoxtitration in oxidativer Richtung wurden die Redoxmediatoren, das Protein und das Substrat vorgelegt und zunächst mit Natrium-Dithionit das niedrigste Potential eingestellt und das Potential anschließend durch Zugabe von Ferricyanid-Lösung stufenweise erhöht. Für die Titrationen in reduktive Richtung wurde entsprechend erst ein Potential im Bereich von 0 mV eingestellt und das Potential anschließend durch Zugabe von Natrium-Dithionit sukzessiv verringert. Nach Einstellung eines konstanten Potentials wurden je 300 µL Probe entnommen und in zuvor anaerobisierte EPR-Röhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung darin aufbewahrt. Die Aufnahme der EPR-Spektren erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben. Zur Auswertung wurden die Signalintensitäten gegen das Potential aufgetragen. In Microsoft EXCEL 2000 wurde mittels der Nernst-Gleichung (Gleichung (9)) eine Kurve (n = 1) an die gemessenen Datenpunkte mittels Solver-Funktion gefittet und das Mittelpunktpotential bestimmt. Bei der Auswertung war Dr. Antonio Pierik behilflich.

$$E = E° + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c(\text{ox})}{c(\text{red})} \tag{9}$$

E gemessenes bzw. eingestelltes Potential

$E°$ Mittelpunktspotential (gleiche Konzentration c der oxidierten (ox) und der reduzierten(red) Spezies)

R allgemeine Gaskonstante, $R = 8{,}314\ \text{J} \times \text{K}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$

T absolute Temperatur in K

F Farraday-Konstante, $F = 96485{,}34\ \text{C} \times \text{mol}^{-1}$

n Zahl der übertragenen Elektronen

3.5.6. ^{57}Fe-ENDOR-Spektroskopie

ENDOR-Spektroskopie ist eine EPR-verwandte Methode. Hier wird der EPR-Übergang gesättigt und ein zweites Signal eingestrahlt, das den NMR-Frequenzbereich eines vorhandenen Isotops (^{57}Fe) durchläuft, was eine Hyperfeinaufspaltung der EPR-Linien verursacht. Diese kann nicht direkt aufgelöst werden. Durch Bestrahlung der Probe auf spezifischen NMR-Frequenzen wird die Sättigung des EPR-Signals wieder aufgehoben, was zum ENDOR-Signal führt (Lippard & Berg, 1995). Da man die Resonanzbedingung sowohl für die Elektronenspins als auch für die Kernspins erfüllt, spricht man von Doppelresonanz, genauer von Elektronen-Kern-Doppelresonanz (ENDOR, Electron Nuclear Double Resonance). Durch die Verwendung von gepulster ENDOR-Spektroskopie können Überlagerungsprobleme vermindert werden, was zu einer höheren Auflösung führt.

Für ENDOR-Messungen wurden mit ^{57}Fe angereicherte Proteine produziert (vgl. 3.4.1 und 3.4.3) und auf eine Konzentration von mindestens 1 mM ankonzentriert. Die Spektren wurden mit einem kommerziellen Bruker ELEXSYS E580 gepulstem X-Band-Spektrometer mit Oxford Helium-Fluss-Cryostat bei 5 K aufgenommen. ^{57}Fe-Davies-ENDOR-Spektren wurden mit der Standard-Sequenz π_{prep}-RF-π_{det}/2-τ-π_{det} unter Verwendung selektiver Mikrowellen-Pulse bei der Detektion (π_{det} = 200 ns) und harter Darstellungspulse (π_{prep} = 50 ns) aufgenommen, um überlappende Protonen-Hyperfeinkopplungen zu unterdrücken (Bennati et al., 2004). Die RF-Pulslänge wurde auf 8 µs eingestellt um dem großen *g*-Verstärkungsfaktor $\gamma_{enh} \approx A_{iso}/2\nu_L$ Rechnung zu tragen. Ein Radiofrequenz-Verstärker (Dressler) erlaubte eine Puls-Leistung von etwa 1 kW zwischen 5 und 40 MHz mit einer Linearität von 1-2 dB. Die Aufnahmedauer variierte zwischen 3 und 12 h, abhängig von der spektralen Position der EPR-Linie. ^{57}Fe-Davies-ENDOR-Spektren wurden von Frau PD Dr. Marina Bennati (Institut für Physikalische und Theoretische Chemie und Zentrum für Biomolekulare Magnetresonanz, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main) aufgenommen und ausgewertet.

3.5.7. Röntgen-Absorptions-Spektroskopie (XAS) und EXAFS

Durch die Absorption von Röntgenstrahlen können die 1s-(K-Kante) oder die 2s,2p-Elektronen (L-Kante) eines Elements in unbesetzte lokalisierte Orbitale oder durch höherenergetische Röntgenphotonen ins Kontinuum angeregt werden. Mit

Synchrotonstrahlungsquellen lassen sich heute Röntgenstrahlen ausreichender Energie erzeugen, um Röntgenabsorptionsspektren aufzuzeichnen (Lippard & Berg, 1995). Ein Absorptionsspektrum wird dabei in drei Bereiche eingeteilt: Der Bereich vor der Kante, den kantennahen sogenannten XANES-Bereich (X-ray Absorption Near Edge Structure), sowie den kantenfernen, sogenannten EXAFS-Bereich (Extended X-ray Absorption Fine Structure). In der XANES findet man hauptsächlich Bindungswinkel in der Materie wieder, während in der EXAFS hauptsächlich Abstände und thermische Bewegung zu finden sind. Das Energiespektrum der Röntgenabsorption wird durch Rückstreuung von Nachbaratomen moduliert. Dadurch entsteht eine Feinstruktur welche eine Bestimmung der Koordinierungsgeometrie bei Metallen aus der EXAFS erlaubt.

Die Messungen und Analysen wurden von Prof. Robert A. Scott und Mitarbeitern (Fachbereich Chemie und Zentrum für Metalloenzym-Studien, Universität Georgia, Athens, USA) durchgeführt. Hierfür wurde gereinigte Heterodisulfid-Reduktase aus *Mth. marburgensis* (vgl. 3.4.7), HdrB (vgl. 3.4.4) und SdhE (vgl. 3.4.6) verwendet. Alle Proben wurden unter N_2-Atmosphäre hergestellt. Alle Materialien wurden in 10 mM EDTA-Lösung autoklaviert und staubfrei gelagert. Alle Puffer wurden mit Chelex 100 Kationen-Austauscher-Material (Bio-Rad, München) behandelt. CoM-Hdr wurde durch die Oxidation von 13 mg Heterodisulfid-Reduktase in 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) mit 2 mM Durochinon ($E°'$ = +50 mV) und anschließender Zugabe von 0,5 mM CoM-SH in einem Volumen von 1 mL hergestellt. Diese und andere Heterodisulfid-Reduktase-Proben wurden mit Puffer (Chelex-behandelt) auf 4,5 mL verdünnt und auf 0,1 mL ankonzentriert (Amicon Ultra-4, 100 kDa Ausschlussgröße). Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Im letzten Schritt wurde Ethylenglykol in einer Endkonzentration von 20% zugegeben. Somit wurde eine CoM-Hdr-Konzentration von 0,8 mM erreicht. HdrB und SdhE wurden ebenfalls so hergestellt, jedoch wurde das Protein mit 10 kDa Ausschlussgröße auf 2 mM Endkonzentration gebracht. Die Proben wurden in Polycarbonat-Küvetten (24 mm × 3 mm × 2 mm) mit 24 mm × 3 mm-Fenster aus Röntgenstrahl-durchlässiger Mylar-Folie (0.001") gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zn-Röntgenabsorptions-Spektren wurden an der Beamline 9-3 des Synchroton-Strahlen-Labors Stanford mit dem SPEAR3 Ring bei 80-100 mA (3,0 GeV) aufgenommen. Der vertikale Fokussierspiegel wurde auf einen 13-keV-Ausschluß für die harmonische Abweisung eingestellt. Der Si[220]-basierte Monochromator mit vertikaler Blende erzeugte einen 1 mm × 4 mm-Strahl auf die auf 10 K gekühlte Probe in einem Helium-

Fluss-Cryostat. Ein Canberra-30-Elemente-Festphasen-Röntgenstrahl-Detektor (mit intrinsischem Ge) mit einem Z-1 (Cu) Fluoreszenz-Filter und Soller-Blende wurde verwendet, um Fluoreszenz-Anregungsspektren aufzunehmen. Die interne Energie wurde mit zwei N_2-gefüllten mit Zn-Folie getrennten Ionisationskammern hinter der Probe kalibriert. Zwei bis fünf Spektren von je 21 min Dauer wurden für jede Probe aufgenommen und gemittelt.

Die Daten wurden mit dem Programmpaket EXAFSPAK suite (www.ssrl.slac.stanford.edu/exafspak.html) reduziert und analysiert. Die XAS-Daten wurden kalibriert, indem der erste Wendepunkt der Zink-Folien-Kante als 9660,7 eV definiert wurde. Die *k*-Skalierung wurde auf E_0 = 9670 eV definiert. Zur Extraktion der EXAFS wurde mit einem Gauss-Verteilungs-Modell des Streuungshintergrunds die Vorkante abgezogen und Drei-Regionen-Spline-Kurven benutzt. Die Details der Fourier-Transformation sind in den Legenden der Abbildungen im Ergebnisteil angegeben.

3.6. Computergestützte Sequenzanalysen

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Programmpaket Vektor NTI Suite 10 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) bearbeitet. Für Sequenzsuchen wurde das **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool (BLAST) auf dem NCBI-Server (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) (Altschul et al., 1997) und andere Datenbanken im Internet verwendet (Field et al., 2005). Zur Analyse der Domänenstruktur von Proteinen wurde das Programm SMART (**S**imple **M**odular **A**rchitecture Research **T**ool) (http://smart.embl-heidelberg.de/) (Letunic et al., 2006; Schultz et al., 1998) oder die InterPro bzw. Pfam-Datenbank (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam) (Finn et al., 2006; Mulder et al., 2007) genutzt. Transmembran-Helices von Proteinen wurden mit dem TMHMM-Server v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0) vorhergesagt. Rad-Projektionen (Helical Wheel Projections) wurden mit dem Programm WinPep 3.1 erzeugt (Hennig, 1999). Die Codon-Häufigkeit von Sequenzen wurde mit dem **G**raphical **C**odon **U**sage **A**nalyser (http://gcua.schoedl.de/) bestimmt (Fuhrmann et al., 2004).

4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit von Heterodisulfid-Reduktase aus *Methanothermobacter marburgensis*. Im ersten Teil dieses Kapitels wird die Herstellung eines *Methanococcus voltae*-Stammes, der HdrB aus *Mth. marburgensis* heterolog produziert und die partielle Reinigung von HdrB aus diesem Stamm beschrieben. Zudem wird kurz auf Kristallisationsversuche von Hdr eingegangen. Der zweite Teil beschreibt die heterologe Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* in *Escherichia coli*, chemische Rekonstitution des [4Fe-4S]-Zentrums von HdrB *in vitro* und Reinigung des Proteins. Es folgt die Charakterisierung des [4Fe-4S]-Zentrums von HdrB. Im dritten Teil wird auf die heterologe Produktion von SdhE (früher SdhC) aus *Sulfolobus solfataricus* P2 in *E. coli*, chemische Rekonstitution des [4Fe-4S]-Zentrums, Reinigung und Charakterisierung des Proteins eingegangen, welches als Vergleichssystem für spektroskopische Untersuchungen an HdrB diente.

4.1. Heterologe Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* in *Mc. voltae*

Heterodisulfid-Reduktase aus *Mth. marburgensis* besteht aus drei Untereinheiten HdrA, HdrB und HdrC. HdrB besitzt ein Cystein-reiches Sequenzmotiv, welches aus zwei CCG-Domänen mit je fünf Cysteinyl-Resten besteht (Hedderich et al., 1999). Bisherige spektroskopische Untersuchungen an Hdr zeigten, dass es sich bei dem katalytisch aktiven Zentrum um ein ungewöhnliches [4Fe-4S]-Zentrum handelt (Duin et al., 2002). Es wurde vorgeschlagen, dass Cysteinyl-Reste aus einer oder beiden CCG-Domänen an der Ligation des [Fe-S]-Clusters im aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt sind (Hedderich et al., 2005). HdrB aus *Mth. marburgensis* besitzt im Gegensatz zu HdrD keine weiteren klassischen Bindemotive für Cofaktoren. Deshalb wurde dieses Protein für weitere Untersuchungen gewählt. *Methanococcus voltae* wurde als Expressionswirt verwendet, da dieser zu *Mth. marburgensis* relativ nah verwandte Organismus ebenfalls mögliche Komponenten für die Biosynthese des gesuchten [4Fe-4S]-Zentrums besitzen könnte bzw. die Bedingungen bei der Produktion der physiologischen Situation in *Mth. marburgensis* näher kämen. Zudem ist dieser Organismus genetisch zugänglich, so dass auf einen

Selektionsmarker und einige der wenigen bekannten genetischen Elemente zurückgegriffen werden konnte.

4.1.1. Herstellung eines HdrB-Produktionsstammes

Um HdrB aus *Mth. marburgensis* heterolog in *Mc. voltae* zu produzieren, wurde der Vektor pNH6 konstruiert (vgl. 3.1.5). Er basiert auf dem Plasmid pNPAC (Sun & Klein, 2004), bei dem ein 3′-Fragment (633 bp) des *hisA*-Gens (*′hisA*) aus *Mc. voltae* vor der *Npac*-Kassette integriert wurde. Die *Npac*-Kassette besteht aus dem Promotor des S-Layer-Proteins (P*sl*), dem *pac*-Gen und dem *mcr*-Terminator (T*mcr*). Das *pac*-Gen, das aus *Streptomyces alboniger* stammt, diente als Selektionsmarker. Die Codon-Usage wurde für *Mc. voltae* optimiert (Gernhardt et al., 1990). Hinter die *Npac*-Kassette wurde der Promotor des *hmv*-Gens (P*hmv*) aus *Mc. voltae* (Heinicke et al., 2004), fusioniert mit dem *hdrB*-Gen aus *Mth. marburgensis,* integriert. Dieses Konstrukt entsprach pNH4 (3.1.5; TABELLE 4). Anschließend wurde aus dem 5′-Bereich des *hisA*-Gens (*hisA′*) von *Mc. voltae* ein 734 bp-Fragment amplifiziert (*hisA′*). Das *hisA′*-Fragment wurde dann in die *Bam*HI-Stelle von pNH4 ligiert. Es entstand das Plasmid pNH6 (ABBILDUNG 9, *A*). Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurde der Vektor pNH6 vor der Transformation mit *Hind*III und *Pvu*I linearisiert (ABBILDUNG 9, *B*). Zur Aufreinigung einer ausreichenden Menge DNA (100 µg/Ansatz) aus einem Agarose-Gel wurde ein neues Gelextraktions-Protokoll unter Verwendung von Anionen-Austauscher-Säulen entwickelt, mit dem bis zu 2 mg DNA aus einem Gel aufgereinigt werden konnten (siehe 3.3.6). *′hisA* und *hisA′* dienten der Integration durch homologe Rekombination in die entsprechenden Bereiche des *Mc. voltae*-Genoms (ABBILDUNG 9, *B*). Dieses führte zur Inaktivierung des *hisA*-Gens und somit zu Histidin-auxotrophen Transformanden. Das Medium für die Transformation und Kultivierung enthielt deshalb L-Histidin. Als Selektionsmarker wurde die durch die *Npac*-Kassette vermittelte Puromycin-Resistenz verwendet. Alle Schritte wurden in einem Anaerobenzelt mit $N_2/CO_2/H_2$-Atmospäre durchgeführt. Dort wurden die Transformationsansätze plattiert. Die Platten wurden in Anaerobentöpfen unter $H_2/CO_2/H_2S$ bei 37°C inkubiert. Druckabfall im Anaerobentopf zeigte das Wachstum von Kolonien an. Einzelkolonien wurden im Anaerobenzelt in Flüssigmedium überführt. Angewachsene Kulturen wurden mittels Southern-Blot-Analyse auf die richtige Integration des pNH6-Fragments ins Genom von *Mc. voltae* überprüft (ABBILDUNG 10).

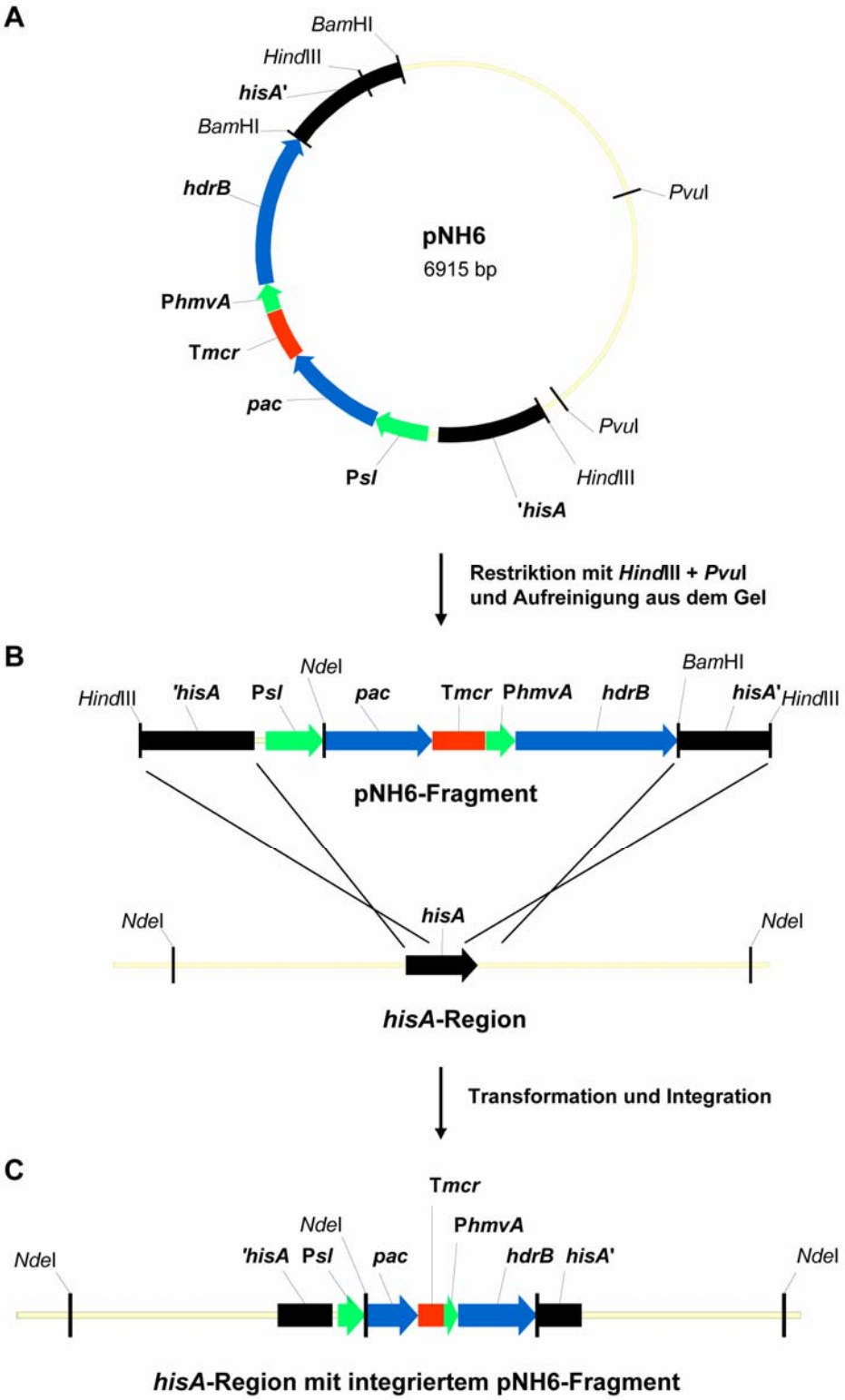

ABBILDUNG 9: Schema der Konstruktion eines *Mth. marburgensis*-HdrB produzierenden *Mc. voltae*-Stammes. *A*, Plasmid pNH6; *B*, Lineares pNH6-Fragment, das das *pac*-Gen als Selektionsmarker und das *hdrB*-Gen aus *Mth. marburgensis* enthält; *C*, Genombereich von *Methanococcus voltae* nach Integration des pNH6-Fragments in das *hisA*-Gen. Weitere Details können dem Text entnommen werden.

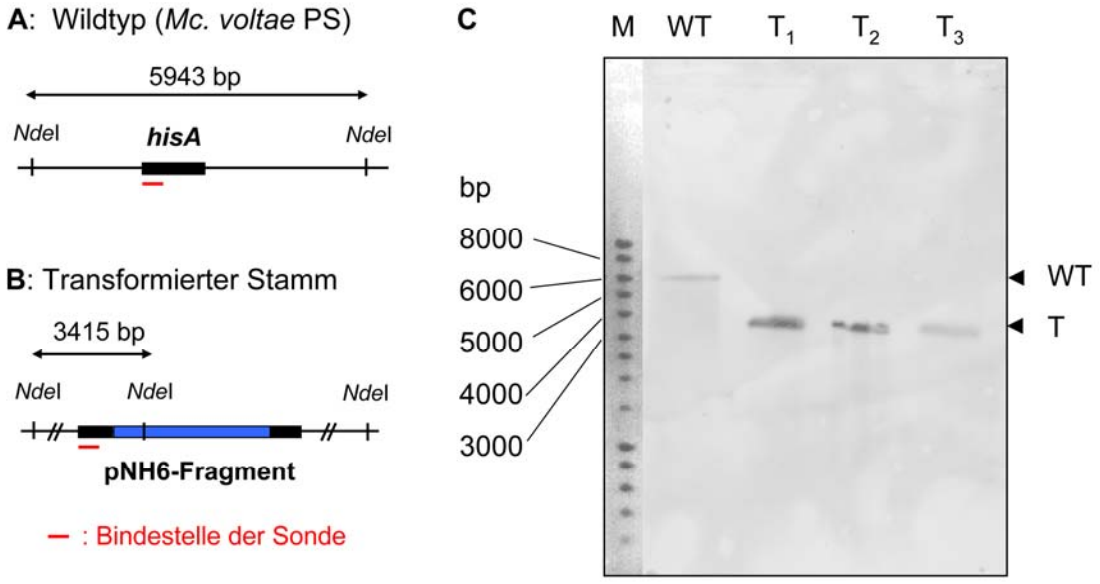

ABBILDUNG 10: Southern-Blot-Analyse zur Überprüfung der Integration des pNH6-Fragments in das *hisA*-Gen von *Methanococcus voltae* PS. *A*, und *B*, Vergleich der unterschiedlichen Restriktionsmuster mit dem verwendeten Enzym für Wildtyp (WT) und Transformanden (T). Die erwarteten Fragmentgrößen in bp sind darüber angegeben. Die Bindestelle der Sonde ist mit einem roten Balken markiert. *C*, Bild des Membran-Scans nach Hybridisierung und Detektion mittels α-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugats. Als Längenstandard (M) wurde die Hyperladder I (Bioline) verwendet. Die Spuren enthielten daneben restringierte DNA vom Wildtyp (WT) oder von Transformanden (T_N). Die Pfeile zeigen die detektierten Fragmente.

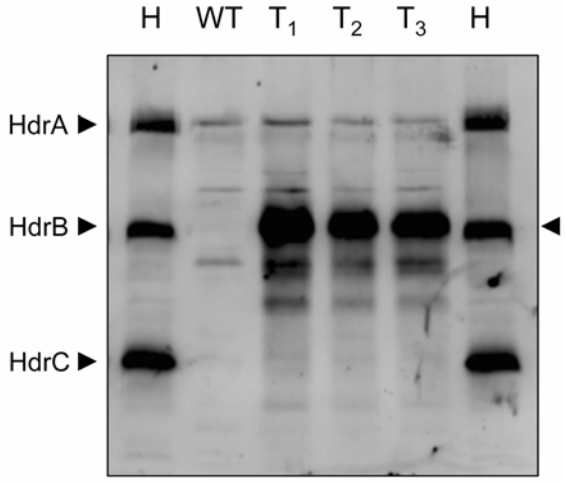

ABBILDUNG 11: Western-Blot-Analyse von *Methanococcus voltae* PS und Transformanden. Als Standard wurde 100 ng gereinigte Hdr aus *Mth. marburgensis* aufgetragen (H). Für die anderen Proben wurde 1 mL Kultur abzentrifugiert und in 100 µL-SDS-Ladepuffer aufgenommen. Davon wurden 10 µL pro Spur aufgetragen. Die Analyse zeigte, dass mit dem Antiserum gegen HdrABC aus *Mth. marburgensis* das heterologe HdrB in den Transformanden (T_N), nicht aber im Wildtyp (WT) von *Mc. voltae* detektiert werden konnte. Beim Wildtyp zeigten sich leichte Kreuzreaktionen mit drei Banden.

Positive Transformanden wurden zudem mittels Western-Blot-Analyse auf Produktion von *Mth. marburgensis*-HdrB untersucht (ABBILDUNG 11). Der Vergleich mit dem *Mc. voltae*-Wildtyp zeigte, dass mit dem HdrABC-Antiserum nur das heterologe *Mth. marburgensis*-HdrB-Protein detektiert werden konnte.

4.1.2. Partielle Reinigung von heterolog produziertem HdrB

Nach Southern-Blot- und Western-Blot-Analyse wurde ein positiver Klon in einem 10 L-Fermenter kultiviert (siehe 3.2.3). Aus der Feuchtzellmasse (20 g) wurde dann versucht, rekombinantes HdrB zu reinigen. Die Reinigung wurde mittels der Messung der Hdr-Aktivität, SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse verfolgt. Es zeigte sich, dass das Hdr-Holoenzym (HdrABC) aus *Mc. voltae* mit dem heterologen HdrB von den verwendeten Ionenaustauscher-Säulen co-eluierte. Erst eine Gelfiltration (Superdex 200) lieferte drei unterscheidbare Peaks. Die Hdr-Aktivität korrelierte dabei nicht mit dem HdrB-Signal in der Western-Blot-Analyse (ABBILDUNG 12, *B*). SDS-PAGE zeigte, dass HdrB nur partiell gereinigt war (ABBILDUNG 12, *A*). Zudem waren die Mengen an HdrB insgesamt viel zu gering, um die geplanten spektroskopischen Analysen durchführen zu können. Hier werden z.T. Konzentrationen von 1 mM Protein benötigt. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

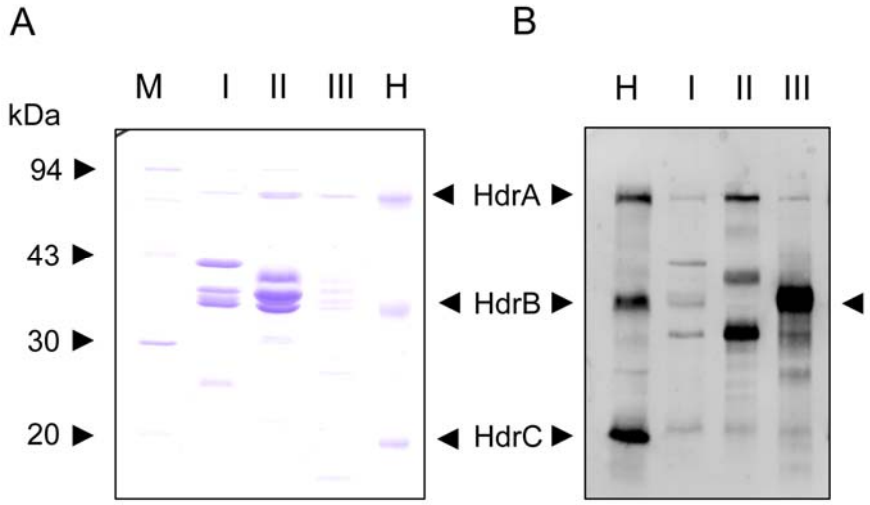

ABBILDUNG 12: SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse von partiell gereinigtem heterologen HdrB. *A*, SDS-PAGE nach Gilfiltration (Superdex 200). M, LMW-Marker (GE Healthcare); I – III, Fraktionen nach Gelfiltration; Spur H, gereinigte Hdr aus *M. marburgensis*. *B*, Western-Blot-Analyse mit Antiserum gegen *Mth. marburgensis*-HdrABC; Spur H, gereinigte Hdr aus *M. marburgensis*; Spur I – III, Fraktionen nach Gelfiltration. HdrB eluierte in Fraktion III. Fraktion II enthielt die Hdr- Hauptaktivität und zeigte kein HdrB-Signal.

4.2. Protein-Kristallisationsversuche

Um Informationen zur Lokalisation und Aufbau des katalytischen Zentrums von Heterodisulfid-Reduktase zu erhalten, wurden parallel Protein-Kristallisationsversuche durchgeführt.

Bislang wurden Kristallisationsversuche mit Hdr aus *Mth. marburgensis*, *Ms. barkeri* (Madadi-Kahkesh, 2001), *Msp. stadtmanae* (Reiß, 2002) und *Mbb. arboriphilus* (Hamann, 2003) durchgeführt. Hier wurde hauptsächlich die Methode des hängenden Tropfens (Hanging drop) verwendet. Für *Mth. marburgensis und Mbb. arboriphilus* wurden kürzlich auch miniaturisierte Dampfdiffusionsexperimente im 96-Well-Format bei 18°C durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde dieses Format ebenfalls gewählt. Für die Kristallisationsexperimente wurde Hdr aus *Mth. marburgensis*, *Ms. barkeri* und *Ms. thermophila* gereinigt. Dazu wurden die im Abschnitt 3.4.16 beschriebenen Proteinkristallisations-Mikroplatten im 96-Well-Format verwendet. Bei diesen Experimenten wurde bei einer Umgebungstemperatur von 10°C im Anaerobenzelt gearbeitet. Neben kommerziellen Puffern wurden auch Lösungen verwendet, die von Dr. Ulrich Ermler (MPI für Biophysik, Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurden.

Unter den getesteten Bedingungen wurden keine Protein-Kristalle erhalten. Es zeigte sich jedoch eine starke Neigung zu Präzipitation des Proteins. Dieses könnte mit der sehr trockenen Zeltatmosphäre zusammenhängen, da hier durch Orange-Gel kontinuierlich Wasser entzogen wird. Da die Volumina der pipettierten Protein-Lösung sehr gering waren, wurde das Volumen von 1 µL auf 2 µL erhöht. Auch dieses brachte keine Verbesserung. Es wurde zudem versucht, die Feuchtigkeit im Zelt zu regulieren. Ein Hygrometer wurde zur Überwachung eingesetzt. Bei der Krsitallisation sollte mit homogenen Lösungen gearbeitet werden. Enzyme von *Methanothermobacter*-Typ enthielten of Spuren von F_{420}-nicht-reduzierender Hydrogenase als Verunreinigung. Für die Versuche mit Enzymen des *Methanosarcina*-Typs wurde die Detergenz-Konzentration auf 2 mM reduziert, weil dieses vermutlich auch präzipitierte.

4.3. Heterologe Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* in *E. coli*, Rekonstitution, Reinigung und Charakterisierung

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass HdrB, welches heterolog in *B. subtilis* produziert wurde, vermutlich ein [2Fe-2S]-Zentrum enthielt (Heim, 1998; Madadi-Kahkesh, 2001). Da dieser Cluster-Typ im Hdr-Holoenzym nicht nachgewiesen werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass es sich um ein Artefakt bei der heterologen Produktion handeln könnte. Es bestand die Möglichkeit, dass durch die starke Überproduktion von HdrB die Biosynthese-Maschinerie für [Fe-S]-Zentren überlastet war. Aus diesem Grund wurde *hdrB* mit dem *isc*-Operon aus *E. coli* coexprimiert. Die *isc*-Gene codieren für Komponenten der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese-Maschinerie. Diese Strategie wurde bereits erfolgreich für die heterologe Produktion von Eisen-Schwefel-Proteinen verwendet (Kriek et al., 2003; Nakamura et al., 1999). Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass ebenfalls vermutlich ein [2Fe-2S]-Zentrum in HdrB inseriert wurde (Hamann, 2003).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden weitere Bedingungen getestet, unter denen zu HdrB verwandte Proteine aus *E. coli* induziert werden könnten, die evtl. gleiche Biosynthese-Wege wie HdrB benötigen würden. Dazu gehört die anaerobe Gycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase. Die Untereinheit GlpC besitzt wie HdrB zwei CCG-Domänen. Über die mögliche Funktion der Cysteinyl-Reste ist jedoch nichts bekannt (Cole et al., 1988). Aus diesem Grund wurde u.a. versucht, *E. coli* anaerob auf Glycerol zu ziehen. HdrB zeigte eine leicht bräunliche Färbung und UV/Vis-Spektren deuteten auf [2Fe-2S]-Zentren hin. Die Reduktion mit Natrium-Dithionit führte zu einem fast vollständigen irreversiblen Verlust der Absorption, wie es auch bei früheren Versuchen gefunden wurde.

Bei der anaeroben Produktion von HdrB wurden zudem ein von Pollock *et al*. beschriebenes Medium und Bedingungen verwendet (Pollock et al., 2002). Mit diesem Protokoll verbesserte sich die Löslichkeit von HdrB signifikant. Wurde dem Medium zusätzlich 100 µM Eisen-Citrat, 1 mM L-Cystein und 0,5% Glukose zugegeben, so zeigte sich bei gleicher Proteinkonzentration eine wesentlich intensivere tiefbraune Farbe im Vergleich zu den oben beschriebenen Ansätzen. Jedoch zeigten mit Natrium-Dithionit reduzierte Proben ebenfalls keine definierten EPR-Signale. Das für CoM-Hdr charakteristische rhombische EPR-Signal war bei in Anwesenheit von CoM-SH oxidierten HdrB-Proben nicht detektierbar.

4.3.1. Produktion, Rekonstitution und Reinigung von HdrB

Durch Variation der Produktionsbedingungen von HdrB ließ sich kein [Fe-S]-Zentrum erzeugen, das das zu erwartende rhombische EPR-Signal nach Oxidation in Gegenwart von CoM-SH zeigte, wie es sich unter diesen Bedingungen bei beiden Hdr-Typen induzieren ließ. Aus diesem Grund wurde versucht, das vermeintliche [4Fe-4S]-Zentrum in HdrB chemisch *in vitro* zu rekonstituieren.

Die unter 3.4.1 beschriebenen Bedingungen lieferten die höchste Ausbeute an löslichem HdrB. Für die heterologe Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* in *E. coli* wurde der Stamm BL21(DE3)-pCodonPlus (RIL) verwendet, der das Plasmid pRKISC enthielt. Dieses war nicht essentiell, verbesserte jedoch die Ausbeute an HdrB. Der Stamm wurde nachfolgend mit dem Expressions-Plasmid pET-24-*hdrB* transformiert. Ein reiches gepuffertes Medium (Moore et al., 1993) erhöhte die Ausbeute an löslichem HdrB deutlich. Durch Verwendung von Komponenten mit geringem Eisengehalt konnte später unter den gleichen Bedingungen mit ^{57}Fe angereichertes HdrB hergestellt werden. Dem Medium wurde zusätzlich 54 µM Eisen(II)-Chlorid, 1 mM L-Cystein und 0,5% Glukose zugegeben. Die Kultivierung erfolgte aerob bei 37°C auf einem Magnetrührer. Die Induktion erfolgte bei ΔOD_{600} = 1,2. Nach Induktion wurde der Ansatz bei 25°C für 24 h auf dem Magnetrührer weiter inkubiert. Dann erfolgte die stehende Inkubation für weitere 24 h. Die Produktion von HdrB wurde mittels SDS-PAGE überprüft (ABBILDUNG 13). Die Zellen wurden geerntet und das bräunliche Pellet bei -80°C gelagert.

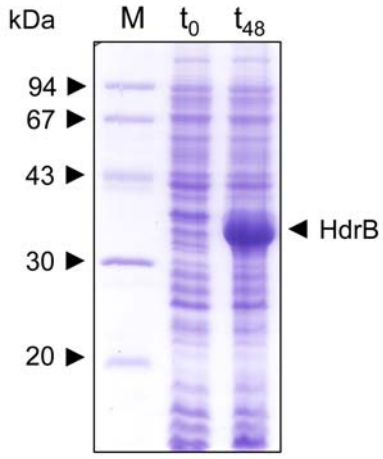

Abbildung 13: SDS-PAGE-Analyse der heterologen Produktion von HdrB in *E. coli*. M, LMW-Marker (GE Healthcare) als Massen-Standard; Spur t_0, Kultur vor Induktion mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid; Spur t_{48}: 48 h nach Induktion. Es wurde 1 mL Kultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min gekocht. 10 µL wurden pro Spur aufgetragen.

Frühere Rekonstitutions-Versuche mit HdrB waren bis dahin nicht erfolgreich (persönliche Mitteilung, Dr. Gerd Mander). Für die Rekonstitution von HdrB wurde ein Protokoll nach Tong *et al.* verwendet, bei dem Zelllysat eingesetzt wird (Tong, et al., 2003). Anfänglich wurde Zelllysat von *E. coli* nach anaerober heterologer Produktion von HdrB (siehe oben) mit Zelllysat von *Mth. marburgensis* gemischt. Letzteres könnte evtl. benötigte Komponenten beinhalten, die die Bildung des gesuchten [Fe-S]-Zentrums begünstigen könnten.

Die Reinigung von HdrB und alle weiteren Schritte erfolgten unter anaeroben Bedingungen, um den erwarteten [4Fe-4S]-Cluster vor einer möglichen Schädigung durch Sauerstoff zu schützen. HdrB wurde aus dem Überstand der Zentrifugation des Zelllysats bei 52.000 × *g* mittels Anionenaustausch- und z.T. hydrophober Interaktions-Chromatographie gereinigt. Ohne Rekonstitution gereinigtes HdrB hatte eine intensive braune Farbe, was auf erhöhten Eisen-Schwefel-Gehalt hindeutete. Wie die Analyse zeigte, wurde vermutlich wieder ein [2Fe-2S]-Cluster eingebaut (siehe unten). Nach chemischer Rekonstitution von HdrB *in vitro* in *E. coli*-Zelllysat mit $Fe(II)Cl_2$, Na_2S, Dithiothreitol (DTT) und L-Cystein wurde das Protein wie oben beschrieben gereinigt und dann weiter analysiert. Es zeigte sich, dass dieser Ansatz das erwartete EPR-Signal lieferte (siehe 4.3.5). Weitere Versuche zeigten, dass die Zumischung von *Mth. marburgensis*-Zelllysat nicht essentiell war.

4.3.2. Überprüfung der Reinheit von HdrB mittels SDS-PAGE

Die Reinheit von HdrB wurde mittels SDS-PAGE überprüft (ABBILDUNG 14). Es zeigte sich, dass sich das Protein aus *E. coli* leicht isolieren ließ. Die aus der Sequenz berechnete Masse von HdrB war mit der apparenten Masse konsistent. Durch die Optimierung der Produktionsbedingungen konnte eine Ausbeute von über 80 mg HdrB pro Liter Medium erreicht werden.

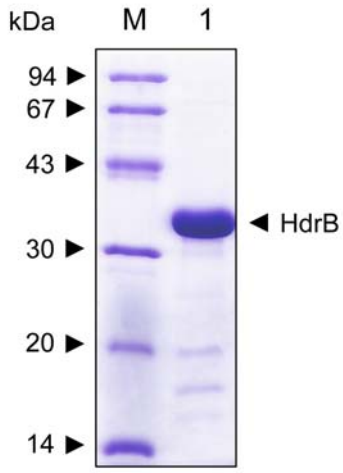

ABBILDUNG 14: SDS-PAGE mit gereinigtem HdrB. M, LMW-Marker (GE Healthcare) als Massenstandard; Spur 1, 20 µg gereinigtes *M. marburgensis*-HdrB, heterolog produziert in *E. coli.*

4.3.3. Identität und Chemische Analyse von HdrB

HdrB ließ sich in *E. coli* nach Induktion der *hdrB*-Expression mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse nachweisen. Um sicher zu gehen, dass unter den gewählten Expressionsbedingungen kein *E. coli*-Protein überproduziert und gereinigt wurde, musste die Identität des isolierten Proteins bestimmt werden. Eine Western-Blot-Analyse zeigte, dass es sich bei dem gereinigten Protein um HdrB aus *Mth. marburgensis* handelte (ABBILDUNG 15).

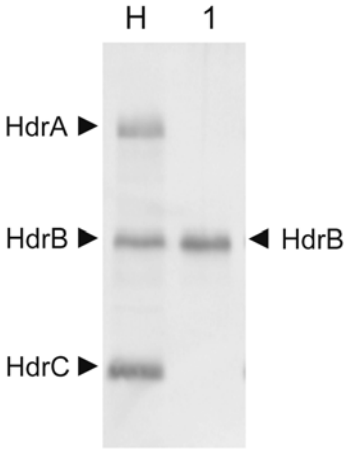

ABBILDUNG 15: Western-Blot-Analyse mit gereinigtem heterolog produziertem HdrB. Spur H; 20 ng gereinigter HdrABC-Komplex aus *Mth. marburgensis*; Spur 1, 20 ng *Mth. marburgensis*-HdrB produziert in *E. coli*. Es wurde Antiserum gegen *Mth. marburgensis*-HdrABC verwendet.

Die Masse des gereinigten Proteins wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Sie betrug 33,5 kDa und stimmte mit der aus der Aminosäuresequenz berechneten HdrB-Masse von 33,46 kDa überein. Eine Peptid-Massen-Fingerprint-Analyse, die von Herrn Jörg Kahnt (MPI, Marburg) durchgeführt wurde, bestätigte das Ergebnis. Die Sequenzabdeckung (Coverage) betrug 25%.

Die chemische Analyse von gereinigtem HdrB nach Rekonstitution ergab, dass gereinigtes HdrB 2,5 mol Eisen und 2,3 mol säurelabilen Schwefel enthielt. Dieses deutete auf einen substöchiometrischen Einbau von Eisen und Schwefel hin.

4.3.4. UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften von HdrB

Die Analyse von HdrB ohne Rekonstitution zeigte ein UV/Vis-Spektrum, dessen Profil ähnlich wie bei früheren Untersuchungen aussah. Es zeigten sich charakteristische Maxima bei 330 und 417 nm. Zudem waren breite Schultern bei 460 und 570 nm sichtbar (ABBILDUNG 16, *A*). Das Absorptionsspektrum ließ das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums vermuten (Orme-Johnson & Orme-Johnson, 1982). Reduktion mit Natrium-Dithionit führte zu einem Verlust der Absorption, was auf eine Zerstörung der [Fe-S]-Zentren hindeutete. Der Großteil der Absorption ging bereits in den ersten Minuten nach Zugabe von einem Überschuss Natrium-Dithionit verloren. Insgesamt waren die spektroskopischen Eigenschaften von HdrB sehr ähnlich zu denen von heterolog produziertem SdhE (früher SdhC), für welches das Vorliegen eines labilen [2Fe-2S]-Zentrums gezeigt wurde (Iwasaki, et al., 2002). Nachfolgende Oxidation von reduziertem HdrB führte nicht zu dem ursprünglichen Spektrum (ABBILDUNG 16, *A*). Die Reduktion war damit nicht reversibel.

Nach chemischer Rekonstitution unter den oben beschriebenen Bedingungen (4.3.1) zeigte HdrB deutlich veränderte UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften. Das gereinigte Protein besaß ein breites Absorptionsmaximum um 400 nm (ABBILDUNG 16, *B*). Dieses deutete auf das vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums hin (Orme-Johnson & Orme-Johnson, 1982). UV/Vis-Spektroskopie zeigte, dass das vorliegende [Fe-S]-Zentrum stabil war. Reduktion mit Natrium-Dithionit führte zu einer reversiblen Abnahme der Absorption. Die Probe konnte anschließend mit Durochinon wieder oxidiert werden, wobei die Absorption etwas höher als bei der anfänglich unbehandelten Probe lag (ABBILDUNG 16, *B*).

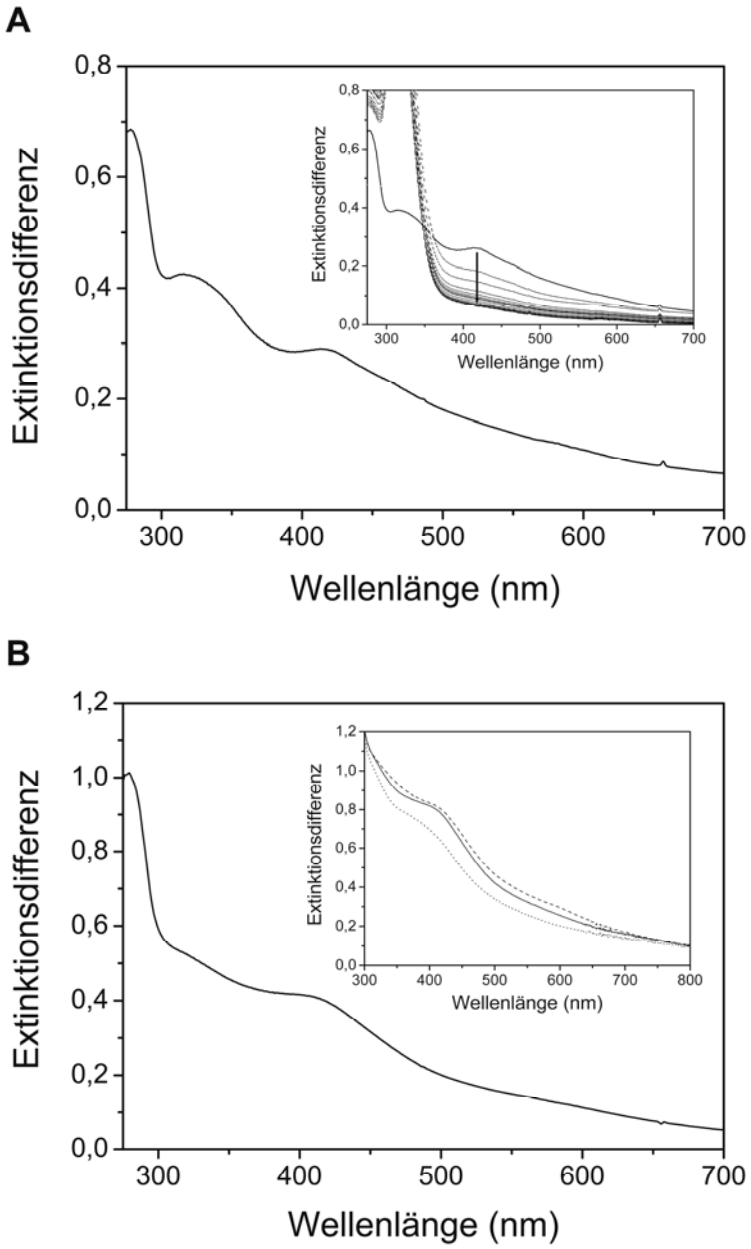

ABBILDUNG 16: UV/Vis-spektroskopische Analyse von *Mth. marburgensis*-HdrB. *A*, Spektrum von gereinigtem HdrB (0,7 mg Protein/mL) aus Zellextrakten ohne Rekonstitution. *B*, Spektrum von HdrB (1 mg Protein/mL) gereinigt nach *in vitro* Rekonstitution. Das Inset in Abbildung *A* zeigt Spektren von HdrB ohne Rekonstitution (durchgezogene Linie) nach Zugabe von einem Überschuss Natrium-Dithionit zu verschieden Zeitpunkten (0 – 60 min) (gestrichelte Linien). Die Absorption ging irreversibel verloren. Dithionit verursacht ein Maximum im Bereich um 320 nm. Das Inset in Abbildung *B* zeigt Spektren von rekonstituiertem HdrB (2 mg Protein/mL): HdrB im Zustand „wie gereinigt" (durchgezogene Linie), die selbe Probe nach Reduktion mit 0,1 mM Natrium-Dithionit (gepunktete Linie) und das Natrium-Dithionit-reduzierte Protein nach Reoxidation mit 0,2 mM Durochinon (gestrichelte Linie). Bei allen Messungen befand sich das Protein in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6).

4.3.5. EPR-spektroskopische Eigenschaften von HdrB

Auch nach Änderung der Produktionsbedingungen zeigten die HdrB-Proben ohne Rekonstitution ein undefiniertes EPR-Spektrum mit sehr geringer Intensität (ABBILDUNG 17, *A*). Die Analyse von heterolog produziertem HdrB nach Rekonstitution zeigte ein rhombisches Signal mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 (ABBILDUNG 17, *B*). Das Spektrum war dem Signal des in Anwesenheit CoM-SH oxidierten HdrABC-Komplexes (CoM-Hdr) mit g_{zyx} = 2,013, 1,991 und 1,938 sehr ähnlich (ABBILDUNG 17, *C*). Im Gegensatz zu CoM-Hdr war das rhombische HdrB-Signal bereits nach Oxidation ohne Zugabe externer Thiole sichtbar. Zur Vorbereitung wurden alle Proben sorgfältig mit Thiol-freiem Puffer gewaschen, so dass es sich um eine intrinsische Eigenschaft von HdrB handeln musste, das Signal nach Oxidation zu generieren.

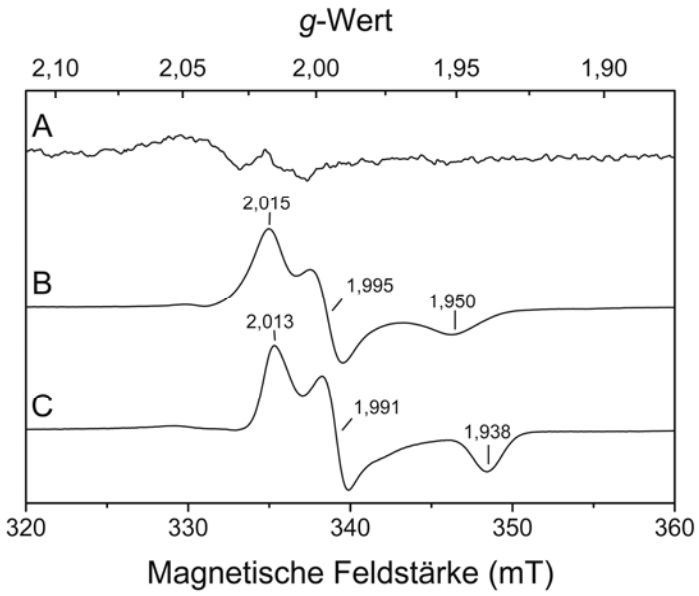

ABBILDUNG 17: EPR-spektroskopische Eigenschaften von HdrB. *A*, HdrB (350 µM) vor Rekonstitution (10-fach vergrößert). *B*, HdrB (100 µM) nach Rekonstitution. HdrB wurde mit 2 mM Durochinon oxidiert. *C*, EPR Spektrum von CoM-Hdr zum Vergleich. HdrABC (40 µM) wurde mit 2 mM Durochinon in Gegenwart von 1 mM CoM-SH oxidiert. EPR-Bedingungen: Temperatur, 20 K; Mikrowellenleistung, 2,007 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT.

Das rhombische HdrB-Signal war von 10 bis 45 K ohne Signalverbreiterung detektierbar. Bei höheren Temperaturen (gemessen bis 80 K) zeigte das Signal eine starke Signalverbreiterung. Damit war das Temperaturverhalten sehr ähnlich zu CoM-Hdr (Madadi-Kahkesh, 2001). Die Spinkonzentration betrug nur ungefähr 25% der Proteinkonzentration. Dieses steht in Einklang mit dem niedrigen Eisen- und säurelabilem

Schwefel-Gehalt von gereinigtem HdrB (vgl. 4.3.3). Das sprach für die Tatsache, dass HdrB nicht vollständig rekonstituiert war.

Oxidation mit 1 mM Kaliumferricyanid ($K_3[Fe(III)(CN)_6]$) oder Luftsauerstoff für 12 h bei 4°C führte zum vollständigen Verlust des EPR-Signals von HdrB (Daten nicht gezeigt).

Mit Natrium-Dithionit reduzierte HdrB-Proben zeigten ohne Rekonstitution ein undefiniertes EPR-Signal. Nach Rekonstitution konnte in reduzierten Proben ein EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,055, 1,977 und 1,842 detektiert werden, dessen Intensität von Präparation zu Präparation leicht variierte. Das Signal konnte bei Temperaturen bis 50 K gemessen werden. Bei höheren Temperaturen trat eine Signalverbreiterung auf. Das Signal war bei Temperaturen über 80 K aufgrund der Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar. Aus den *g*-Werten und dem Temperaturverhalten wurde auf ein [2Fe-2S]-Zentrum geschlossen. Da dieser Cluster-Typ in nativer Hdr nicht detektiert werden konnte, wird von einem Artefakt ausgegangen, das bei der Rekonstitution gebildet wird oder bei der heterologen Produktion in *E. coli* entsteht und durch die Rekonstitution stabilisiert wird (vgl. 4.3.7).

4.3.6. Einfluss von CoM-SH und CoM-^{33}SH auf das HdrB-EPR-Spektrum

HdrABC zeigt das oben angesprochene rhombische EPR-Signal nur, wenn der Komplex in Anwesenheit von CoM-SH oxidiert wird. Bei HdrB war ein sehr ähnliches rhombisches Signal bereits nach Oxidation detektierbar. Wie bereits angesprochen musste es sich um eine intrinsische Eigenschaft von HdrB handeln, weil die Proben durch gründliches Waschen mit Thiol-freiem Puffer von Thiolen wie Dithiothreitol oder Cystein aus dem Rekonstitutionsansatz bzw. Reinigungspuffer befreit wurden. Wie in ABBILDUNG 18 dargestellt, hatte die Zugabe von CoM-SH zu Durochinon-oxidiertem HdrB keinen Einfluss, wenn man das Spektrum mit dem in ABBILDUNG 17 vergleicht. In beiden Fällen wurde ein EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 detektiert.

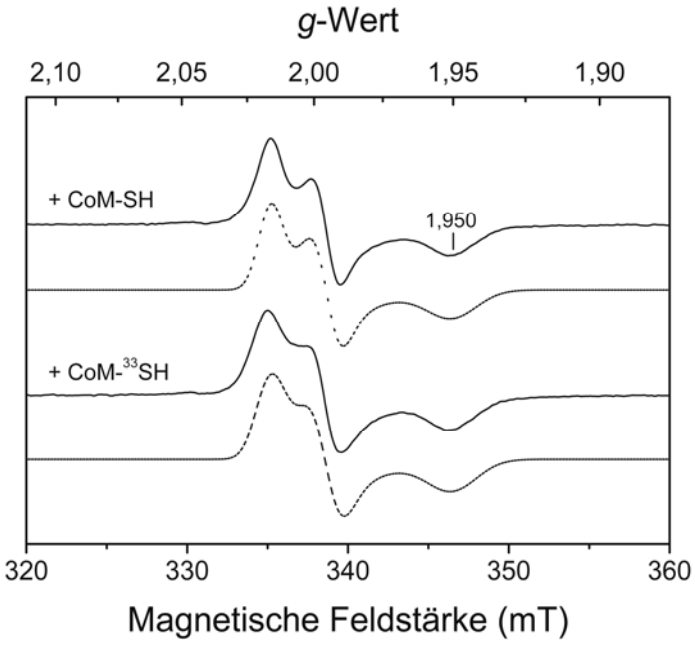

ABBILDUNG 18: EPR-spektroskopische Eigenschaften von rekonstituiertem HdrB nach Behandlung mit CoM-SH oder CoM-^{33}SH. HdrB (100 µM) wurde mit 5 mM Natrium-Dithionit reduziert. Natrium-Dithionit wurde durch Ultrafiltration (10 kDa-Ausschluss) entfernt. Nachfolgend wurde die Probe in Gegenwart von 2 mM CoM-SH (obere durchgezogene Linie) oder CoM-^{33}SH (untere durchgezogene Linie) oxidiert. Die ^{33}S-Anreicherung von CoM-^{33}SH lag bei über 99%. EPR-Bedingungen: Temperatur, 20 K; Mikrowellenleistung, 2,007 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT. Die nicht-durchgezogenen Linien darunter zeigen die entsprechenden Simulationen. Simulationsparameter: g_{zyx} = 2,0147, 1,9949, 1,9503; W_{zyx} = 3,00, 1,60, 1,50 mT; (^{33}S, I = $^3/_2$) A_{zyx} = 4,00, 3,60, 0,00 mT.

Bei der Zugabe von CoM-^{33}SH zeigte sich jedoch eine anisotrope Verbreiterung des EPR-Signals. Dieses wurde bereits beim HdrABC-Holoenzym gefunden, wenn die Probe in Anwesenheit von CoM-^{33}SH oxidiert wurde. Die anisotrope Verbreiterung beruht auf einer Hyperfeinkopplung des ^{33}S-Kerns mit einem Kernspin von S = $^3/_2$ mit dem paramagnetischen [Fe-S]-Zentrum. Die erhaltenen EPR-Spektren ließen sich simulieren. Diese Daten belegen, dass CoM-SH mit dem an HdrB gebundenen [Fe-S]-Zentrum direkt interagiert.

4.3.7. EPR-Redoxtitrationen von HdrB

Das EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 war nur in oxidiertem HdrB detektierbar. Reduktion mit Natrium-Dithionit führte zu einem Verlust des Signals. Um rekonstituiertes HdrB weiter zu charakterisieren, wurden Farbstoff-vermittelte Redoxtitrationen in Gegenwart von Redoxmediatoren durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Intensität des EPR-Signals bei verschiedenen Redoxpotentialen bestimmt. Diese können in einem Cocktail aus Redoxmediatoren auf definierte Werte eingestellt werden. Die normalisierten Signal-Intensitäten werden dann graphisch aufgetragen und das Mittelpunktpotential – z.B. des [Fe-S]-Zentrums – aus der erhaltenen Kurve durch das Anlegen einer simulierten Nernst-Kurve bestimmt.

Wurde die Redoxtitration in Abwesenheit von CoM-SH durchgeführt, begann die Bildung der Elektronen-paramagnetischen Resonanz bei Potentialen über -200 mV und war stabil bei Potentialen bis zu 0 mV. Die Titration war vollständig reversibel. Bildung und Verlust der Resonanz beruhten auf einem Ein-Elektronen-Redoxprozess mit einem Mittelpunktpotential von -120 mV ± 10 mV (ABBILDUNG 19, *A*). Wenn die Titrationen in Gegenwart von 1 mM CoM-SH durchgeführt wurden, verschob sich das Mittelpunktpotential zu einem negativeren Wert von -175 mV ± 10 mV (ABBILDUNG 18, *B*).

In ABBILDUNG 19 sind beispielhaft EPR-Spektren aus der Redoxtitration von HdrB in Anwesenheit von CoM-SH gezeigt. Das bei -70 mV gemessene Spektrum (ABBILDUNG 19, *A*) zeigt das typische HdrB-Spektrum, das auch bei Oxidation mit Durochinon erhalten wurde (vgl. ABBILDUNG 17, *B* und 18). Mit Natrium-Dithionit reduzierte HdrB-Proben zeigten wie die Proben in der Redoxtitration bei niedrigen Potentialen unter -250 mV ein rhombisches Signal mit g_{zyx} = 2,055, 1,977, 1,842 (ABBILDUNG 20, *B*). Das Signal ließ sich simulieren. Die Intensität des Signals variierte von Präparation zu Präparation. Das Temperaturverhalten des Signals war mit dem des Natrium-Dithionit-reduzierten HdrB nach Rekonstitution identisch. Wie unter 4.3.5 beschrieben, wird vom Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums ausgegangen.

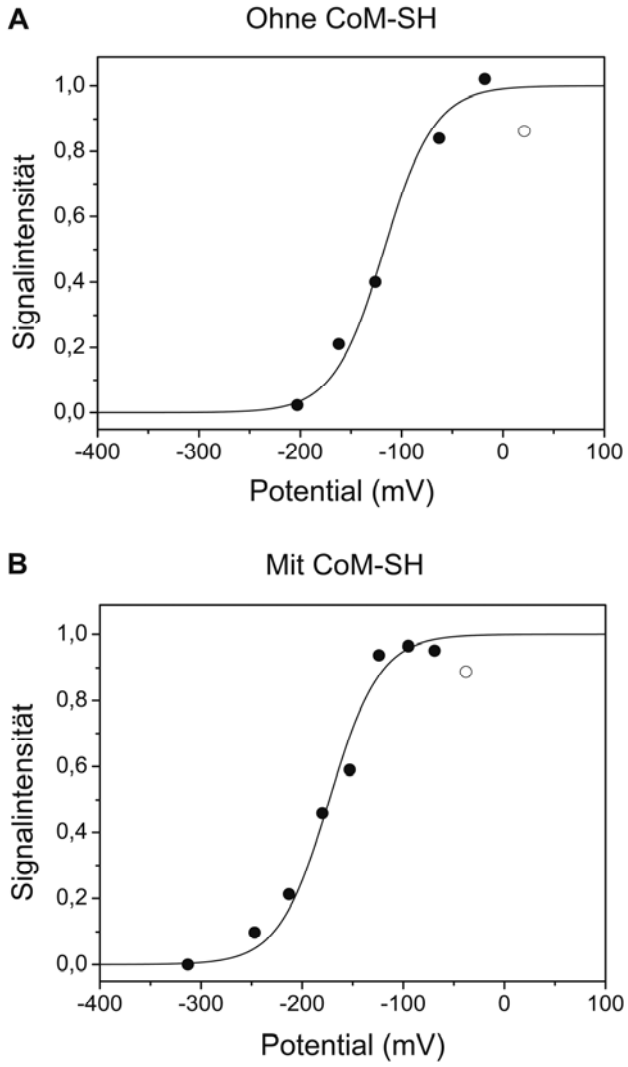

ABBILDUNG 19: EPR-Redoxtitration von HdrB. *A*, Redoxtitration in Abwesenheit von CoM-SH; *B*, Redoxtitration in Anwesenheit von CoM-SH. *A* und *B*, HdrB (60 µM) wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) mit Redoxmediatoren versetzt. Die Redoxtitrationen wurden wie im Ergebnisteil beschrieben durchgeführt (3.5.5). EPR-Bedingungen: Temperatur, 20 K; Mikrowellenleistung, 2,007 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT. Für die Datenpunkte wurde die Amplitude des Signals bei g = 1,950 bestimmt, da bei niedrigen Potentialen Radikal-Signale der Farbstoffe im Bereich g = 2,0 überlappten. Die maximale Spinkonzentration war 0,25 pro Proteinmolekül. Die durchgezogenen Linien sind Nernstkurven (n = 1) mit E_m = -175 mV (in Anwesenheit von CoM-SH) und E_m = -120 mV (in Abwesenheit von CoM-SH). Bei Potentialen über 0 mV und längerer Inkubationszeit wurde teilweise eine Schädigung der [Fe-S]-Zentren beobachtet. Die als offene Kreise dargestellten Datenpunkte wurden deshalb für die Nernst-Kurven nicht verwendet.

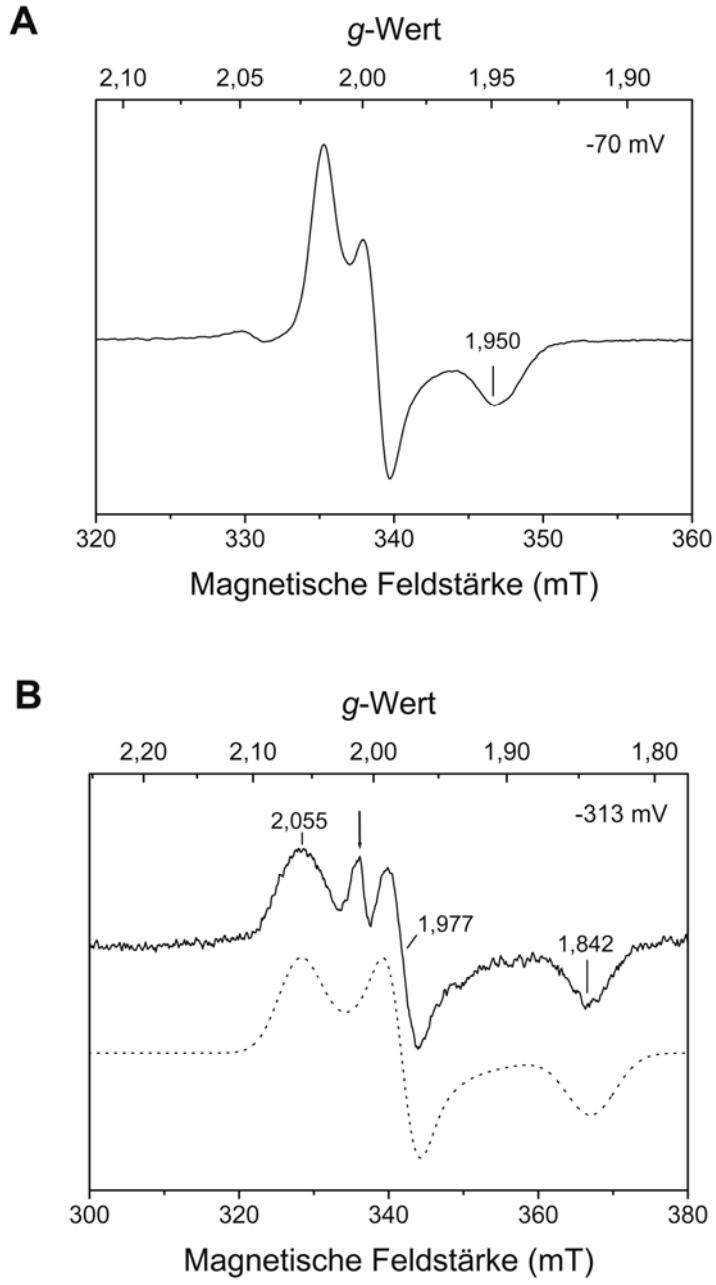

ABBILDUNG 20: EPR-Spektren aus den Redoxtitrationen von HdrB in Gegenwart von CoM-SH. *A*, EPR-Spektrum bei -70 mV. *B*, EPR-Spektrum bei -313 mV. Der Pfeil in zeigt ein Radikal-Signal, das von den eingesetzten Redoxfarbstoffen stammt. Die gepunktete Linie zeigt die Simulation des EPR-Spektrums. Die Simulationsparameter für *B*: g_{zyx} = 2,0550, 1,9770, 1,8416; W_{zyx} = 5,70, 4,00, 6,50 mT. Die EPR-Parameter sind in ABBILDUNG 17 angegeben.

4.3.8. EPR-Untersuchung an ^{57}Fe-angereichertem HdrB

Oxidiertes HdrB zeigte ein EPR-Signal, das auf das Vorliegen eines $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Zentrums hindeutete. Für weitere Untersuchungen wurde mit ^{57}Fe angereichertes HdrB hergestellt. Dazu wurde bereits während der Optimierung der Bedingungen für die

heterologe Produktion und Rekonstitution von HdrB darauf geachtet, dass die Protokolle geeignet waren, mit ^{57}Fe angereichertes HdrB herzustellen. Das stabile ^{57}Fe-Isotop ist in elementarer hoch-angereicherter Form kommerziell erhältlich. Für die Produktion wurde das Medium so modifiziert, dass laut Herstelleranalyse Eisen-arme Komponenten eingesetzt werden konnten.

EPR-spektroskopische Untersuchungen an ^{57}Fe angereichertem HdrB zeigten einen signifikanten Anstieg der Linienbreite (ABBILDUNG 21). Der Anstieg der Linienbreite beruht hierbei auf nicht-aufgelösten Hyperfeinkopplungen mit dem Kernspin des ^{57}Fe ($I = ½$), wie es auch für ^{57}Fe-angereicherte CoM-Hdr gefunden wurde (Madadi-Kahkesh, et al., 2001). Das Signal basierte damit zumindest partiell auf Eisen und bestätigte das Vorliegen eines [Fe-S]-Zentrums.

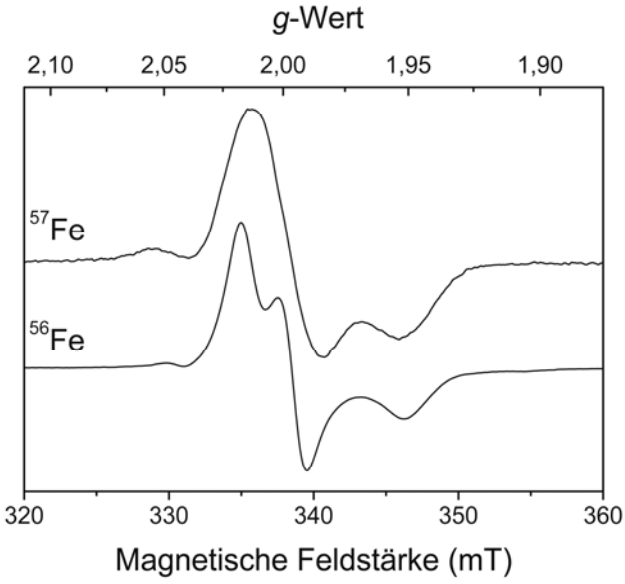

ABBILDUNG 21: EPR-spektroskopische Eigenschaften von mit ^{57}Fe angereichertem HdrB. HdrB (100 µM) wurde mit 2 mM Durochinon oxidiert. Es sind die Spektren für ^{57}Fe-angereichtes HdrB und HdrB mit der natürlichen Isotopenverteilung von Eisen gezeigt, wobei hier das ^{56}Fe-Isotop dominiert. EPR-Bedingungen: Temperatur, 20 K; Mikrowellenleistung, 2,007 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT.

4.3.9. ^{57}Fe-ENDOR-spektroskopische Eigenschaften von HdrB

Um den in HdrB vorliegenden Cluster-Typ zu bestimmen, wurde mit ^{57}Fe-angereichertes HdrB hergestellt um es mittels gepulster ^{57}Fe-ENDOR-Spektroskopie zu untersuchen. Die Messungen und Auswertungen wurden von Frau Dr. Marina Bennati (Universität, Frankfurt) durchgeführt. ABBILDUNG 22 zeigt ENDOR-Spektren, die bei den

bekannten Orientierungen des *g*-Tensors in der EPR-Linie aufgenommen wurden. Zum Vergleich sind die ^{57}Fe-Spektren von CoM-Hdr gezeigt. Eisenresonanzen von [Fe-S]-Zentren sind in der Regel durch Doublets charakterisiert, die bei dem halben Wert der orientierungsabhängigen Hyperfeinaufspaltung *A* zentriert sind und bei der doppelten ^{57}Fe-Larmor-Frequenz (ν_L = 0,48 MHz bei 3500 G) entsprechend $\nu_{\pm} \approx |A/2 \pm \nu_L|$ aufspalten. In den Spektren von HdrB und CoM-Hdr wurden mehrere ähnliche Resonanz-Regionen gefunden. Das Inset in ABBILDUNG 22 zeigt bei näherer Betrachtung eine weitere paramagnetische Spezies (*d*), die zusätzlich zu den ENDOR-Spektren von HdrB beitrug.

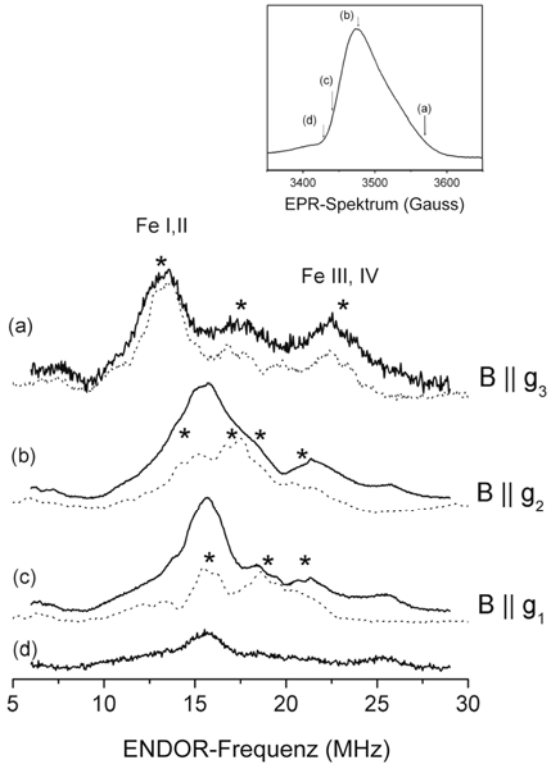

ABBILDUNG 22: ^{57}Fe-Davies-ENDOR-Spektren. Durchgezogene Linien repräsentieren die Spektren von HdrB, die an verschiedenen Positionen der EPR-Linie entsprechend (*a*) B || g_3, (*b*) B ||g_2, (*c*) B || g_1 und (*d*) außerhalb des EPR-Spektrums von HdrB gemessen wurden. Das Inset beschreibt die ausgewählten Felder (B) in der EPR-Linie. Die ^{57}Fe–Spektren von CoM-Hdr werden als gestrichelte Linie zum Vergleich dargestellt (Bennati et al., 2004). Sichtbare ^{57}Fe-Doublets, die vorher den CoM-Hdr-Resonanzen zugewiesen wurden, sind eingezeichnet (Bennati et al., 2004). HdrB (1 mM) wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) mit einer Glycerol-Endkonzentration von 10% anaerob angesetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

An dieser Stelle (d) wurde ein Referenz-ENDOR-Spektrum außerhalb der EPR-Linie aufgenommen und zeigte zwei schwache Resonanzen bei 16 und 26 MHz (ABBILDUNG 22 (d)). Diese Spezies könnte die Ursache für die große Intensität der ENDOR-Spektren bei 16 MHz sein, die bei CoM-Hdr nicht detektiert wurde. Trotz dieses Unterschieds zeigen die Daten, dass die am stärksten ausgeprägten Doublets der CoM-Hdr-ENDOR-Spektren

in den HdrB-Spektren konserviert sind. Besonders hervorzuheben sind die Ähnlichkeiten bei B || g_3, wo die Spektren von HdrB und CoM-Hdr kaum unterscheidbar waren. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass HdrB ein [4Fe-4S]-Zentrum mit einer zu CoM-Hdr sehr ähnlichen elektronischen Struktur besitzt.

4.3.10. Enzymatische Aktivitätsmessungen von HdrB

Um zu prüfen, ob HdrB Hdr-Aktivität besaß, wurden die für Hdr gebräuchlichen Enzym-Tests verwendet. Zum einen wurde die Reduktion des Heterodisulfids (CoM-S-S-CoB) an die Oxidation von reduziertem Benzylviologen gekoppelt, zum anderen wurde die Oxidation der Thiol-Coenzyme CoM-SH und CoB-SH zu CoM-S-S-CoB mit der Reduktion von Methylenblau verfolgt (Hedderich et al., 1990). Rekonstituiertes und gereinigtes HdrB katalysierte keine der beiden Reaktionen. Möglicherweise ist die Untereinheit HdrC mit ihren zwei [4Fe-4S]-Zentren notwendig, damit das zweite Thiol-Substrat CoB-SH binden kann oder die Konformation von isoliertem HdrB ist für CoB-SH nicht zugänglich. Um dieses zu überprüfen wurde versucht, HdrC auch heterolog zu produzieren (siehe 4.3.11).

4.3.11. Versuch der heterologen Produktion von HdrC

Um die enzymatische Aktivität von HdrB messen zu können wurde versucht, HdrC aus *Mth. marburgensis* in *E. coli* heterolog zu produzieren und HdrCB zu rekonstituieren. Dazu wurde das *hdrC*-Gen in pRSFDuet-1 kloniert. Die Produktion erfolgte wie für HdrB beschrieben (3.4.1). Es zeigte sich, dass HdrC unter den gewählten Bedingungen nicht löslich war (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis wurde bereits in früheren Arbeiten erhalten (Heim, 1998). Auch die Rekonstitution von HdrC, wie für HdrB beschrieben, in Zelllysat bzw. Zelllysat-Gemischen, die HdrB und HdrC enthielten, führte nicht zu löslichem HdrC-Protein.

4.3.12. Charakterisierung von HdrB-Cystein-zu-Serin-Mutanten

Nachdem die zuvor beschriebenen Untersuchungen deutlich auf das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums in HdrB hindeuteten, interessierte die Funktion der Cysteinyl-Reste in HdrB. HdrB aus *Mth. marburgensis* besitzt insgesamt zwölf Cysteinyl-Reste. Zehn davon sind in den beiden CCG-Domänen ($CX_{31-39}CCX_{35-36}CXXC$) mit jeweils fünf

Cysteinyl-Resten angeordnet. Die Aminosäuresequenz von HdrB beinhaltet zudem zwei Cysteine an den Positionen 283 und 287, die in zu HdrB homologen Proteinen nicht vorkommen. Sie befinden sich im C-terminalen Bereich des Proteins. Um herauszufinden, welche Cysteinyl-Reste an der Ligation des [4Fe-4S]-Zentrums in HdrB beteiligt sind, wurden die Cysteinyl-Reste in HdrB gegen Serin ausgetauscht. Dazu wurden Basenaustausche in pET-24-*hdrB* vorgenommen, die entweder zu Cystein-zu-Serin-Mutationen von einzelnen Cysteinyl-Resten oder Paaren von Cysteinyl-Resten (CC oder CXXC) führten (ABBILDUNG 23).

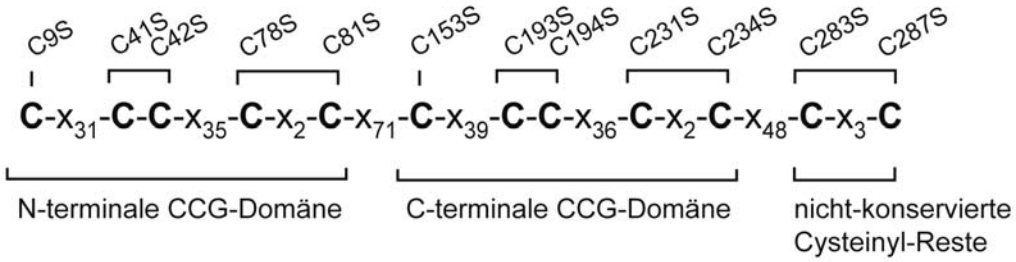

ABBILDUNG 23: Schematische Übersicht der Cysteine in der Aminosäuresequenz von HdrB. Es zeigt sich eine Anordnung von je fünf Cysteinyl-Resten pro CCG-Domäne und zwei Cysteinyl-Resten im C-terminalen Bereich, die in zu HdrB homologen Proteinen nicht konserviert sind. Über der Sequenz sind die Positionen der Cysteinyl-Reste in der Sequenz von HdrB aus *Mth. marburgensis* angegeben. Alle Cysteine wurden gegen Serin ausgetauscht. Wie durch die Klammern über der Sequenz angedeutet, wurden Cysteine einzeln oder in Paaren mutiert.

Mit den erzeugten Konstrukten wurde *E. coli* BL21(DE3)-pCodonPlus-pRKISC wie mit pET24-*hdrB* transformiert. Für Expression, Rekonstitution und Reinigung der insgesamt elf Mutanten wurden die für HdrB optimierten Bedingungen verwendet. Es zeigte sich, dass alle HdrB-Mutanten löslich waren. Die C193S/C194S- und C231S/C234S-Doppelmutanten enthielten im Vergleich zum Wildtyp einen niedrigerem [Fe-S]-Cluster-Gehalt, was UV/Vis-Spektren andeuteten.

Die Charakterisierung der gereinigten Proteine mittels EPR-Spektroskopie zeigte, dass HdrB mit Mutationen in der N-terminalen CCG-Domäne (C9S, C41S/C42S oder C78S/C81S) ein EPR-Spektrum wie bei Wildtyp-HdrB (g_{zyx} = 2.015, 1,995, 1,950) besaßen (ABBILDUNG 24). Die Spin-Konzentrationen der mit Durochinon oxidierten Proben waren dabei sehr ähnlich.

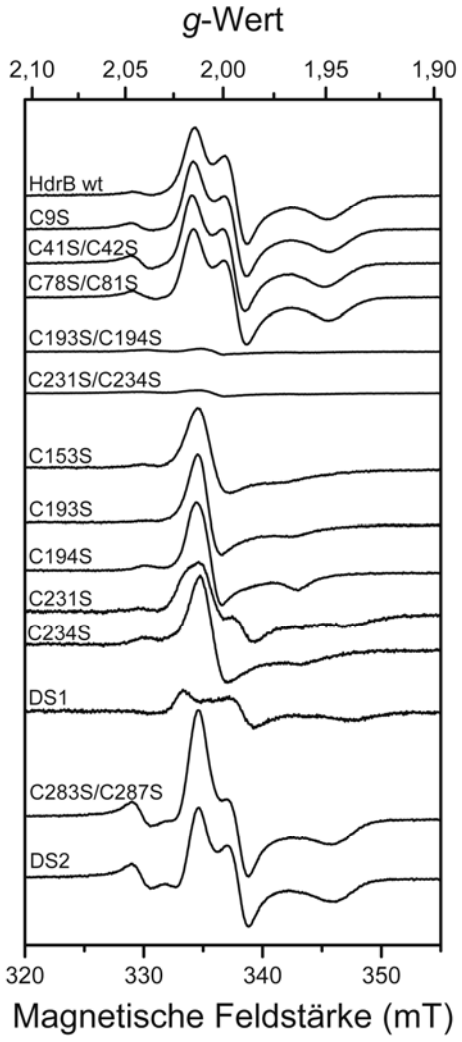

ABBILDUNG 24: EPR-Spektroskopische Untersuchung von oxidiertem Wildtyp-HdrB und Mutanten. Gezeigt sind EPR-Spektren. Für EPR-Bedingungen siehe ABBILDUNG 17. Das mit DS1 markierte Spektrum ist ein Differenzspektrum, das durch Subtraktion des Spektrums der C234S-Mutante (60% der Intensität) von der C231S-Mutante erhalten wurde. DS2 bezeichnet ein Differenzspektrum, das sich durch Subtraktion der Spektren von C153S-Mutante (33% der Intensität)und C283S/C287S-Mutante ergab.

Im Gegensatz dazu zeigten Cystein-zu-Serin-Mutationen in der C-terminalen CCG-Domäne von HdrB drastische Effekte auf die EPR-Signale der oxidierten Proteine. HdrB mit der Mutation C153S zeigte ein axiales EPR-Spektrum mit *g*-Werten bei 2,005 und 1,964. Die Doppelmutanten (C193S/C194S und C231/C234S) zeigten ein undefiniertes Signal wesentlich geringerer Intensität im Bereich $g = 2$. Da aus diesen Ergebnissen noch nicht geschlossen werden konnte, welche der fünf Cysteinyl-Reste in der C-terminalen CCG-Domäne das [4Fe-4S]-Zentrum ligieren, wurden zusätzlich Einzelmutationen der paarweise angeordneten Cysteine (CC oder CXXC) erzeugt.

Die Mutanten C193S, C194S und C234S zeigten im Durochinon-oxidierten Zustand ein EPR-Signal mit *g*-Werten bei 2,005 und 1,964 wie die bereits vorhandene Mutante C153S. Das Signal konnte bis zu Temperaturen von 100 K ohne Verbreiterung gemessen werden. Dabei war die Resonanz bei 40 K optimal ausgeprägt. Die ABBILDUNG 25 zeigt die Temperatur-Abhängigkeit der Mutante C153S stellvertretend für die anderen Mutanten mit diesem Signal.

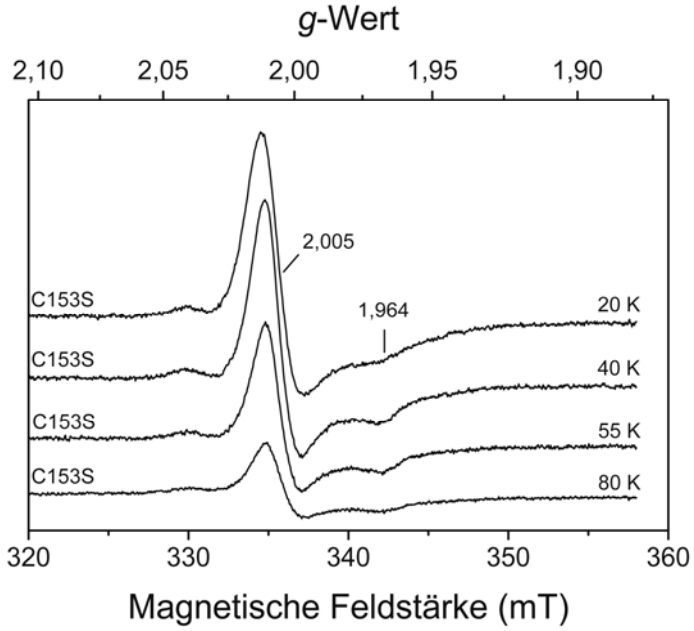

Abbildung 25: EPR-Spektren der HdrB-Mutante C153S bei verschiedenen Temperaturen. Für EPR-Bedingungen siehe ABBILDUNG 17.

Das EPR-Spektrum der Mutante C231S ist eine Überlagerung von zwei Spektren, was durch die Messung bei verschiedenen Temperaturen deutlich wurde. Bei Temperaturen über 55 K konnte nur das Signal mit $g_{xy,z}$ = 2,005 und 1,964 detektiert werden, das bereits bei den Mutanten C153S, C193S, C194S und C234S gemessen werden konnte. Das durch Subtraktion des Spektrums der C234S-Mutante von dem der C231S-Mutante erhaltene Differenzspektrum zeigte ein rhombisches Signal, welches ähnlich zu dem von Wildtyp-HdrB war. Das Differenzspektrum besaß jedoch leicht verschobene *g*-Werte (g_{zyx} = 2,021, 1,991 und 1,939). Es ist in ABBILDUNG 24 als DS1 gekennzeichnet. Die Spin-Konzentration war etwa 40% vom Wildtyp-HdrB.

EPR-Spektren von HdrB, mit Mutationen in den nicht-konservierten Cysteinyl-Resten (C283S/C287S), zeigten ein Signal wie beim Wildtyp-HdrB mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950. Zusätzlich war in der Region um g = 2,01 ein weiteres Signal sichtbar, was auf

eine Überlagerung zweier Spektren hindeutete. Das Signal war bei Temperaturen bis 100 K detektierbar und in diesem Temperaturbereich identisch zu den Spektren der Mutanten C153S, C193S, C194S und C234S. Wurde von dem Spektrum der C283S/C287S-Mutante das Spektrum der C153S-Mutante (auf 33% der Intensität reduziert) abgezogen, war das erhaltenen Differenzspektrum zum EPR-Signal des Wildtyps identisch (DS2 in Abbildung 24). Wildtyp-HdrB und die Mutanten zeigten bei niedrigeren Feldstärken um $g = 2{,}045$ zusätzliche Signale, bei denen die Intensität variierte. Diese Signale wurden auch bei CoM-Hdr (HdrABC-Holoenzym in Anwesenheit von CoM-SH oxidiert) detektiert, wobei die Intensität ebenfalls von Präparation zu Präparation variierte. Der Ursprung dieses Signals ist bislang unbekannt.

Die Anwesenheit von 1 mM CoM-SH in den Proben der verschiedenen HdrB-Mutanten hatte keinen Einfluss auf die EPR-Signale der oxidierten Proben. Mit Natrium-Dithionit reduzierte Proben von rekonstituiertem HdrB zeigten ein rhombisches EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,055, 1,977 und 1,842, was auf das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums hindeutet (vgl. 4.3.7). Das Signal war ebenfalls bei HdrB-Mutanten sichtbar, bei denen Cysteinyl-Reste in der N-terminalen CCG-Domäne mutiert wurden und bei HdrB, bei dem die nicht-konservierten Cysteine ausgetauscht wurden (C283S/C287S). HdrB mit Mutationen in der C-terminalen CCG-Domäne zeigte bei Einzel- und Doppelmutationen im reduzierten Zustand keine definierten EPR-Signale. Die EPR-Spektren ähnelten den Signalen, die mit HdrB ohne Rekonstitution nach Reduktion mit Natrium-Dithionit erhalten wurden. TABELLE 11 gibt eine Übersicht über die erhaltenen EPR-Signale des HdrB-Wildtyp-Proteins im Vergleich zu Cystein-zu-Serin-Mutanten.

TABELLE 11: Übersicht über erhaltene EPR-Signale von HdrB-Mutanten.[a]

HdrB-Probe	*g*-Werte[b] Durochinon-oxidierte Probe	*g*-Werte[b,c] Dithionit-reduzierte Probe
HdrB(Wildtyp)	2,015, 1,995, 1,950	2,055, 1,977 und 1,842
HdrB(C9S)	2,015, 1,995, 1,950	2,055, 1,977 und 1,842
HdrB(C41S,C42S)	2,015, 1,995, 1,950	2,055, 1,977 und 1,842
HdrB(C78S,C81S)	2,015, 1,995, 1,950	2,055, 1,977 und 1,842
HdrB(C153S)	2,005, 1,964	undefiniertes Signal
HdrB(C193S)	2,005, 1,964	undefiniertes Signal
HdrB(C194S)	2,005, 1,964	undefiniertes Signal
HdrB(C193S,C194S)	undefiniertes Signal	undefiniertes Signal
HdrB(C231S)	2,021, 1,991, 1,939[d] (2,005, 1,964)	undefiniertes Signal
HdrB(C234S)	2,005, 1,964	undefiniertes Signal
HdrB(C231S,C234S)	undefiniertes Signal	undefiniertes Signal
HdrB(C283S,C287S)	2,015, 1,995, 1,950[d] (2,005, 1,964)	2,055, 1,977 und 1,842

[a] Siehe auch ABBILDUNG 23 für Übersicht der Cysteine in der Aminosäuresequenz von HdrB.
[b] *g*-Werte des Haupt-Signals. Vergleiche ABBILDUNG 24 und Text.
[c] Im reduzierten Zustand erhaltene EPR-Signale besaßen im Vergleich zum oxidierten Zustand eine deutlich niedrigere Signal-Intensität. *g*-Werte und Temperaturverhalten deuten auf $[2Fe\text{-}2S]^{1+}$-Zentren hin.
[d] Aus Differenzspektrum ermittelt (siehe Text).

4.3.13. Röntgen-Absorptions-spektroskopische Messungen (XAS) und EXAFS von HdrB

Die bis hier beschriebenen Untersuchungen zeigten das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums in HdrB. Für die Ligation eines [4Fe-4S]-Zentrums werden in der Regel vier Cystein-Reste benötigt. Diese stammen wie oben gezeigt aus der C-terminalen CCG-Domäne von HdrB. Der fünfte Cysteinyl-Rest der C-terminalen CCG-Domäne hatte zudem auch einen Einfluss auf die Eigenschaften des Clusters. Damit stellte sich die Frage nach der Funktion der N-terminalen CCG-Domäne. Frühere Metallanalysen des HdrABC-Komplexes aus *Mth. marburgensis* mittels induktiv-gekoppelter Plasma-Atom-Emmisions-Spektrometrie hatten ergeben, dass ein erhöhter Zink-Gehalt vorlag (R. Hedderich, persönliche Mitteilung). Für das zu HdrB homologe Protein SdhE (früher SdhC) wurde gezeigt, dass es eine Zink-Stelle besitzt (Iwasaki, et al., 2002). Deshalb bestand auch für

HdrB die Möglichkeit für das Vorliegen einer Zink-Stelle, an deren Ligation Cysteinyl-Reste aus der N-terminalen CCG-Domäne von HdrB beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund wurde rekonstituiertes HdrB wie im Teil MATERIAL UND METHODEN unter 3.5.7 beschrieben für Messungen mittels Röntgenabsorptions-Spektroskopie (XAS) vorbereitet. Zum Vergleich wurde eine Probe des HdrABC-Komplexes mit Durochinon versetzt und eine identische Probe mit Durochinon in Anwesenheit von CoM-SH oxidiert. Die XAS-Messungen und Auswertungen wurden von Prof. Robert A. Scott und Mitarbeitern (Universität von Georgia, Athens, USA) durchgeführt.

Die ABBILDUNG 26, *A* vergleicht die Zn-K-Kanten-XAS-Daten für HdrB mit dem Durochinon-oxidierten HdrABC-Komplex in Abwesenheit und Anwesenheit von CoM-SH. Kante, EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) und Fourier-Transformation von HdrB und HdrABC waren praktisch identisch. Dieses bestätigte, dass die in HdrB gefundene Zink-Stelle auch im nativen Hdr-Komplex vorlag. Die Zugabe von CoM-SH hatte einen nur sehr geringen Einfluss auf die räumliche Struktur der Zn-Stelle. Die Position (ca. 2,3 Å) des Maximums in der Phasen-korrigierten Fourier-Transformation (ABBILDUNG 26, *B*) deutete auf eine vornehmlich Schwefel-basierte Koordination des Zinks hin. Bei Kurven-Anpassungs-Analysen (TABELLE 12) lag die beste Übereinstimmung mit einer $ZnS_3(N/O)_1$-Koordination vor. Das Zink-Atom wird demnach von drei Schwefel- und einem Stickstoff- bzw. Sauerstoff-Liganden koordiniert. Letztere lassen sich mit dieser Methode nicht unmittelbar unterscheiden. Neben Cysteinyl-Resten als S-Liganden kommen die Imidazol-Seitenketten von Histidin als N-Liganden und Glutamyl- bzw. Asparagyl-Resten als O-Liganden in Frage. Ein Sequenzvergleich von HdrB und homologen CCG-Domänen-Proteinen ergab einen hoch konservierten Histidin-Rest an Position 121 der HdrB-Sequenz. Die Imidazol-Seitenkette könnte einen N-Liganden für die Zink-Stelle bereitstellen.

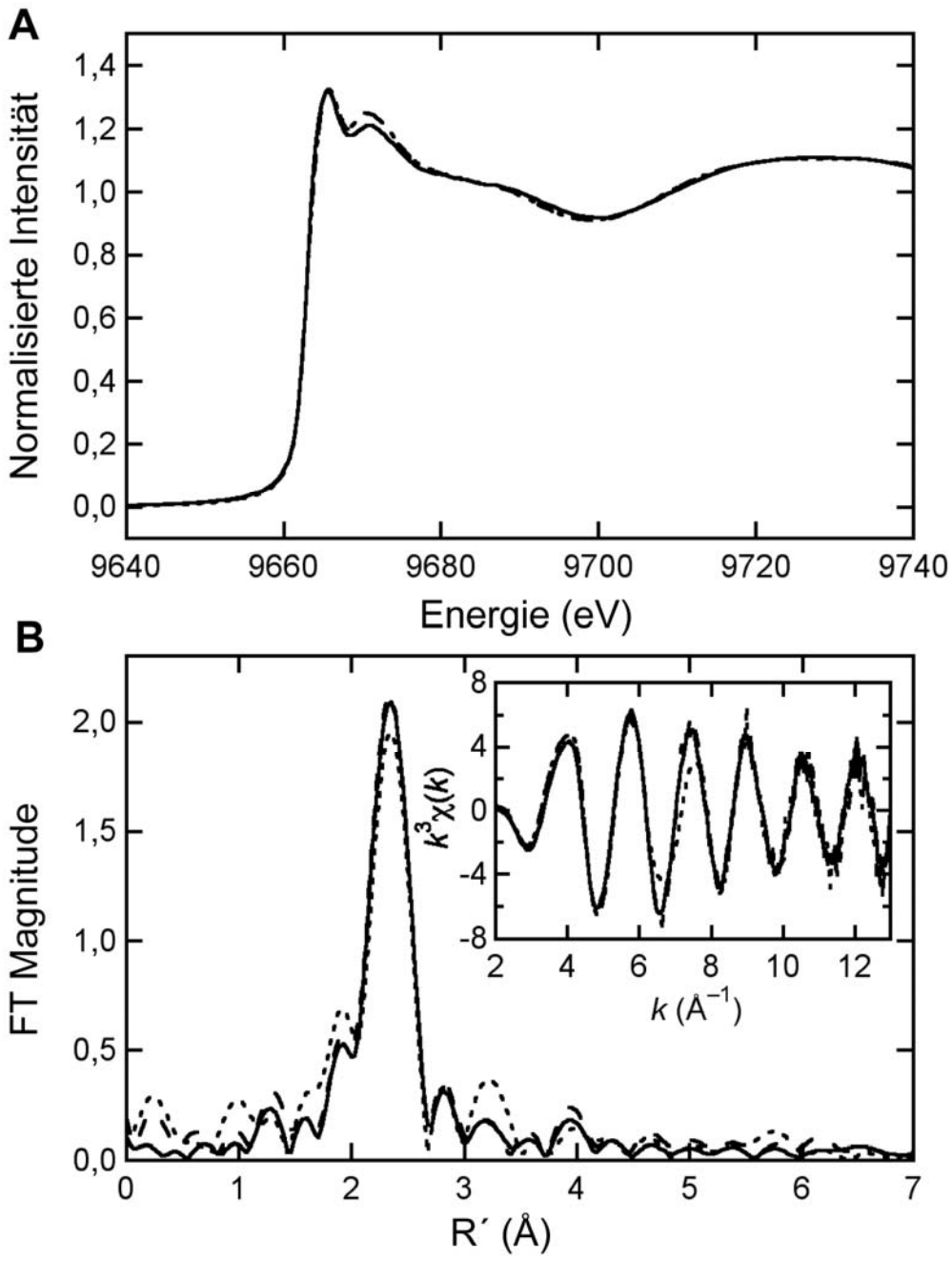

ABBILDUNG 26: Zn-XAS-Spektren und EXAFS. *A*, Zn-K-Kanten-Spektren. *B*, Fourier-Transformation (FT) (k^3-gewichtet, k = 2,0 – 13,0 Å^{-1}) von HdrB (durchgezogene Linie), Durochinon-oxidierte HdrABC (lang-gestrichelte Linie) und Durochinon-oxidierte HdrABC in Gegenwart von CoM-SH (kurz-gestrichelte Linie). R′= apparente Distanz; Inset, k^3-gewichtete EXAFS.

TABELLE 12: Ergebnisse der Kurven-Anpassung für Zn-EXAFS.[a]

Probe **Dateiname (*k*-Bereich)** **$\Delta k^3\chi$**	**Fit**	**Schale**	**R_{as}** **(Å)**	**σ_{as}^2** **$(Å)^2$**	**ΔE_0** **(eV)**	**f'**[b]	**BVS**[c]
HdrB	1	Zn-S_4	2,32	0,0055	-5,10	0,057	2,15
ZHRBA (2-13 $Å^{-1}$)	2	Zn-S_5	2,32	0,0071	-5,31	0,062	2,69
$\Delta k^3\chi$ = 12,68	3	Zn-S_6	2,32	0,0086	-5,41	0,073	3,22
	4	Zn-S_3	2,32	0,0032	-6,30	0,041	2,11
		Zn-N_1	2,03	0,0013			
	5	Zn-S_2	2,34	0,0012	-4,36	0,048	1,90
		Zn-N_2	2,08	0,0032			
	6	Zn-S_1	2,36	-0,0015	0,43	0,059	1,60
		Zn-N_3	2,14	0,0023			
HdrABC, Durochinon-oxidiert	7	Zn-S_4	2,32	0,0055	-5,92	0,073	2,15
EHO0A (2-13 $Å^{-1}$)	8	Zn-S_5	2,31	0,0070	-6,19	0,074	2,76
$\Delta k^3\chi$ = 12,91	9	Zn-S_6	2,31	0,0086	-6,28	0,080	3,31
	10	Zn-S_3	2,32	0,0031	-6,66	0,059	2,11
		Zn-N_1	2,03	0,0005			
	11	Zn-S_2	2,33	0,0010	-4,85	0,064	1,95
		Zn-N_2	2,07	0,0025			
	12	Zn-S_1	2,36	-0,0017	0,88	0,078	1,67
		Zn-N_3	2,12	0,0021			
HdrABC, Durochinon-oxidiert + CoM-SH	13	Zn-S_4	2,32	0,0062	-5,63	0,091	2,15
EHOSA (2-13 $Å^{-1}$)	14	Zn-S_5	2,31	0,0080	-6,01	0,094	2,76
$\Delta k^3\chi$ = 13,01	15	Zn-S_6	2,31	0,0097	-6,36	0,099	3,31
	16	Zn-S_3	2,31	0,0037	-6,94	0,070	2,20
		Zn-N_1	2,00	0,0004			
	17	Zn-S_2	2,32	0,0015	-5,80	0,071	2,05
		Zn-N_2	2,04	0,0037			
	18	Zn-S_1	2,35	-0,0015	-1,51	0,079	1,74
		Zn-N_3	2,10	0,0040			

[a] Fit bezeichnet die Anpassung. Unter Schale wird das Absorber-Rückstreuer-Paar für die theoretische Phase und Amplitude bei Einzelrückstreuung angegeben. Die tiefergestellten Zahlen geben die Anzahl der Rückstreuer pro Absorber an. R_{as} ist der Absorber-Rückstreuer-Abstand, σ_{as}^2 gibt die mittlere quadratische Abweichung von R_{as} an und ΔE_0 ist der Wert der Verschiebung von E_0 aus der theoretischen Rückstreuungs-Funktion.

[b] f' ist ein normalisierter Fehler (Chi-quadriert):

$$f' = \frac{\left\{ \sum_i \left[k^3 \left(\chi_i^{obs} - \chi_i^{calc} \right) \right]^2 / N \right\}^{1/2}}{\left[\left(k^3 \chi^{obs} \right)_{max} - \left(k^3 \chi^{obs} \right)_{min} \right]}$$

[c] BVS = $\Sigma\exp[(r_0-r)/0{,}37]$, r_0(Zn(II)-N) = 1,776 Å, r_0(Zn(II)-S) = 2,09 Å.

[d] Die Zahlen in eckigen Klammern sind darauf festgelegt, entweder vielfache des obigen Werts (σ_{as}^2) zu sein oder einen konstanten Abstand vom obigen Wert (R_{as}, ΔE_0) zu besitzen.

4.4. Heterologe Produktion von SdhE aus *S. solfataricus* P2 in *E. coli*, Rekonstitution, Reinigung und Charakterisierung

Aus *Acidianus ambivalens* und nah verwandten Spezies der archaeellen Ordnung *Sulfolobales* wurde ein neuer Typ von Succinat:Chinon-Oxidoreduktase (Sdh) gereinigt. Dieser als Typ E klassifizierte Sdh-Komplex enthält ein zu HdrB homologes Protein, das als SdhE (früher SdhC) bezeichnet wird. Die Untereinheiten SdhC und SdhD der klassischen Sdh fehlen in diesem Komplex. Letztere bilden sonst die Membrandomäne von Sdh. Diese Rolle wird bei Sdh aus *Sulfolobus*-Spezies vermutlich von SdhE und SdhF übernommen. Bei SdhE handelt sich um den putativen Membrananker des SdhABEF-Komplexes. SdhF ist vermutlich ebenfalls an der Membranverankerung beteiligt (Lemos et al., 2002). Für heterolog in *E. coli* produziertes SdhE wurde das Vorliegen eines labilen [2Fe-2S]-Zentrums gezeigt, das ähnliche Eigenschaften besaß, wie anfänglich für HdrB ohne Rekonstitution erhalten (Iwasaki et al., 2002; Li et al., 2003). SdhE enthält wie HdrB zehn konservierte Cysteinyl-Reste in zwei CCG-Domänen. Deshalb wurde vermutet, dass das beschriebene [2Fe-2S]-Zentrum ebenfalls ein Artefakt sein könnte, das bei der heterologen Produktion auftritt. Um zu überprüfen, ob SdhE mit seinen zwei CCG-Domänen ein [4Fe-4S]-Zentrum koordinieren kann, wurde versucht, SdhE unter den für HdrB gefundenen Bedingungen zu produzieren und auf das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums zu untersuchen. SdhE könnte dann als Vergleichssystem dienen.

4.4.1. Produktion von SdhE, Rekonstitution und Reinigung

Für die heterologe Produktion von SdhE (SdhC) wurde das *sdhE*-Gen aus *Sulfolobus solfataricus* P2 in den Expressionsvektor pET-24b(+) integriert. Mit dem resultierenden Konstrukt pET-24-*sdhE* wurde anschließend der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-pCodonPlus-pRKISC transformiert. Für die Produktion von SdhE wurden ansonsten die gleichen Bedingungen wie für HdrB verwendet (siehe 3.4.5). Mittels SDS-PAGE wurde die Produktion von SdhE in *E. coli* überprüft. Auch hier wurde nach Induktion eine starke Überproduktion von SdhE erreicht (ABBILDUNG 27).

Die Kombination des optimierten Mediums mit zusätzlichem $Fe(II)Cl_2$, L-Cystein und Glukose, die Induktion bei $\Delta OD = 1,2$ und die Produktion bei 25°C für 24 h mit eingeschaltetem Rührwerk sowie weitere stehende Inkubation für 24 h ergab nach der Zellernte ein tiefbraun gefärbtes Zellpellet. Der Aufschluss erfolgte wie alle weiteren

Schritte unter anaeroben Bedingungen. Das erhaltene Zelllysat wurde entweder direkt zur Reinigung von SdhE oder zur Rekonstitution des [Fe-S]-Zentrums und anschließender Reinigung von SdhE verwendet.

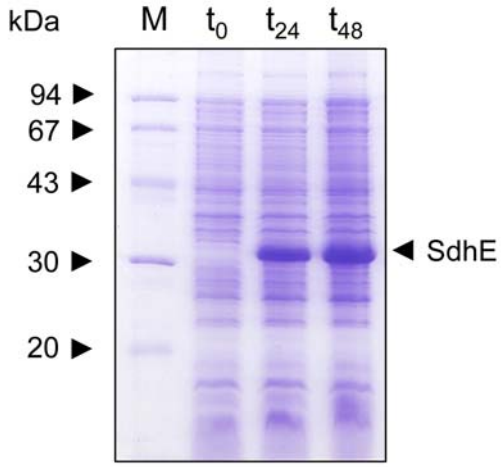

ABBILDUNG 27: Überprüfung der Produktion von SdhE mittels SDS-PAGE. M, LMW-Marker (GE Healthcare) als Massen-Standard; Spur t_0, Kultur vor Induktion mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid; Spur t_{24}: 24 h nach Induktion; Spur t_{48}: 48 h nach Induktion vor Ernte. Es wurde 1 mL Kultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL SDS-Probenpuffer resuspendiert. Nach dem Kochen für 5 min wurden 10 µL pro Spur aufgetragen.

Ohne Rekonstitution ließ sich SdhE ähnlich wie HdrB mittels Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose reinigen. Allerdings eluierte SdhE bereits bei einer Natrium-Chlorid-Konzentration von 0,20 M (HdrB eluierte mit 0,48 M) als bräunlich gefärbte Fraktion. Zudem befand sich ein gewisser Anteil von SdhE im Durchfluss. Nach Rekonstitution konnte SdhE nicht mehr an die Anionenaustauscher-Säule gebunden werden und befand sich vollständig im Durchfluss. Die Rekonstitution führte damit zu einer signifikanten Änderung der chromatographischen Eigenschaften von SdhE. SdhE-haltige Fraktionen wurden mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa mittels Ultrafiltration ankonzentriert. Zudem zeigte sich, dass SdhE mit einer berechneten Masse von 32,1 kDa auch mittels Membranen ankonzentriert werden konnte, die eine Ausschlussgröße von 30 oder 50 kDa besaßen. Demnach könnte das Protein in dimerer oder oligomerer Form vorliegen. Gereinigtes SdhE besaß nach Rekonstitution eine tiefbraune Farbe. Die SdhE-Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (ABBILDUNG 28).

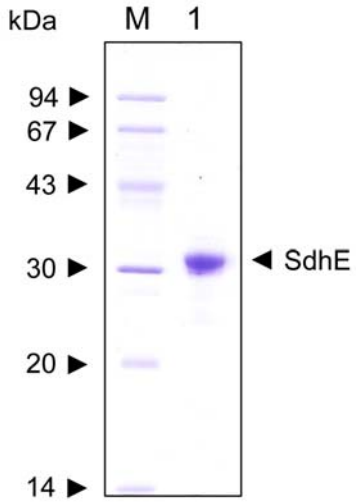

ABBILDUNG 28: Überprüfung der Reinheit von SdhE mittels SDS-PAGE. SdhE wurde mit einer molekularen Ausschlussgröße von 30 kDa per Ultrafiltration aus dem Durchfluss der Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose ankonzentriert. Spur 1 enthält 10 µg heterolog produziertes *S. solfataricus*-SdhE. Die Spur M enthält den LMW-Marker (GE Healthcare) als Massen-Standard.

4.4.2. Identität und Chemische Analyse von SdhE

Das gereinigte Protein wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht. Die ermittelte Masse von 31,9 kDa stimmte mit der aus der Aminosäuresequenz berechneten Masse von 32,1 kDa im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Eine Peptid-Massen-Fingerprint-Analyse, die von Herrn Jörg Kahnt (MPI, Marburg) durchgeführt wurde, identifizierte das Protein als SdhE aus *S. solfataricus* P2. Die Sequenzabdeckung (Coverage) betrug 30%.

Eine chemische Analyse von rekonstituiertem SdhE ergab einen Eisengehalt von 3,7 mol. Der Gehalt an säurelabilem Schwefel lag bei 5,4 mol pro mol des gereinigten Proteins.

4.4.3. UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften von SdhE

Heterolog produziertes gereinigtes SdhE aus *S. solfataricus* P2 wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie analysiert. Dabei wurden Proben ohne und mit Rekonstitution verglichen. Es zeigte sich bei SdhE ohne Rekonstitution ein Spektrum, dass auf das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums hinwies. Ein nahezu identisches Spektrum wurde für ebenfalls in *E. coli* heterolog produziertes SdhE (SdhC) aus *S. tokodaii* Stamm 7 erhalten. Zudem ähnelte dieses Spektrum dem von rekombinantem HdrB aus *Mth. marburgensis*

ohne Rekonstitution. Es zeigten sich Maxima bei 330 und 420 nm. Zudem waren breite Schultern bei 460 und 570 nm erkennbar. Die Reduktion von frisch produziertem SdhE mit Natrium-Dithionit führte zu einer irreversiblen Zerstörung des vorliegenden [Fe-S]-Zentrums innerhalb einer Stunde. Durch anaerobe Lagerung unter Stickstoff bei 4°C kam es ebenfalls nach etwa sieben Tagen zu einem fast vollständigen Verlust der Absorption und einer Zerstörung der [Fe-S]-Zentren (ABBILDUNG 29, *A*).

Rekonstituiertes SdhE zeigte im Gegensatz dazu ein für [4Fe-4S]-Zentren typisches Absorptionsspektrum mit einem breiten Maximum bei 420 nm und einer breiten Schulter um 310 bis 380 nm. Das vorliegende [Fe-S]-Zentrum ließ sich mit Natrium-Dithionit reduzieren und reversibel oxidieren, wobei eine Absorption erreicht wurde, die leicht über der Absorption des gereinigten SdhE-Proteins lag (ABBILDUNG 29, *B*). Dieses deutete auf das Vorliegen eines stabilen Clusters hin, bei dem es sich um ein [4Fe-4S]-Zentrum handeln könnte.

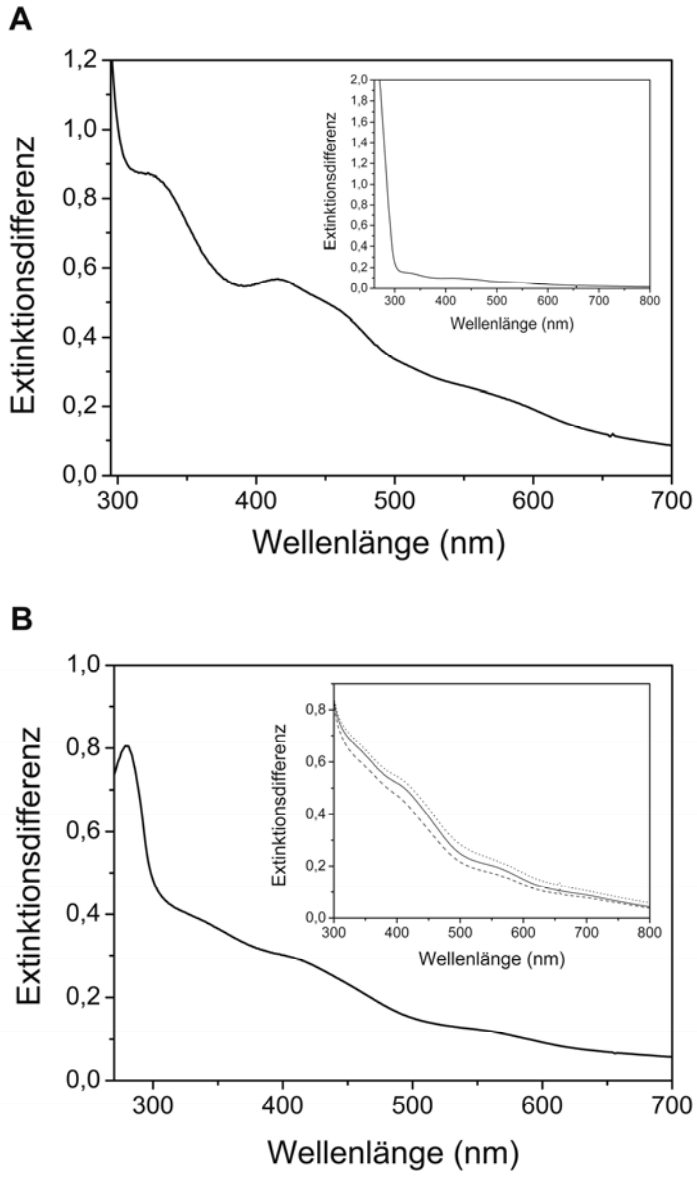

ABBILDUNG 29: UV/Vis-spektroskopische Analyse von *S. solfataricus*-SdhE. *A*, Spektrum von gereinigtem SdhE (2,5 mg Protein/mL) aus Zellextrakten ohne Rekonstitution. Das Inset zeigt die Probe nach 7 Tagen Lagerung unter Stickstoff bei 4°C. Zur Verdeutlichung der Extinktionsabnahme bei für [Fe-S]-Zentren relevanten Wellenlängen wurde auch ein Teil der Absorption des Proteins mit nicht-linearen Messbereich gezeigt. *B*, Spektrum von SdhE (0,8 mg Protein/mL) gereinigt nach *In-vitro*-Rekonstitution. Das Inset in Abbildung *B* zeigt Spektren von rekonstituiertem SdhE nach 7 Tagen Lagerung unter Stickstoff bei 4°C (durchgezogene Linie), derselben Probe nach Reduktion mit 0,1 mM Natrium-Dithionit (gestrichelte Linie) und Reoxidation mit Luftsauerstoff (gepunktete Linie). Bei allen Messungen befand sich die Probe in 50 mM Tris/HCl (pH 7,6).

4.4.4. EPR-spektroskopische Eigenschaften von SdhE

Rekombinantes SdhE aus *S. solfataricus* P2 wurde mittels EPR-Spektroskopie untersucht. Dazu wurden EPR-Spektren von SdhE vor und nach Rekonstitution analysiert. Interessanterweise zeigte SdhE auch ohne Rekonstitution ein Signal, dass dem des Proteins

nach Rekonstitution sehr ähnlich war. Allerdings war die Intensität wesentlich geringer. In beiden Fällen lieferte SdhE in Thiol-freiem Puffer ein rhombisches EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 (ABBILDUNG 30). Im Unterschied dazu konnte bei HdrB erst ein EPR-Signal detektiert werden, wenn das Protein oxidiert vorlag.

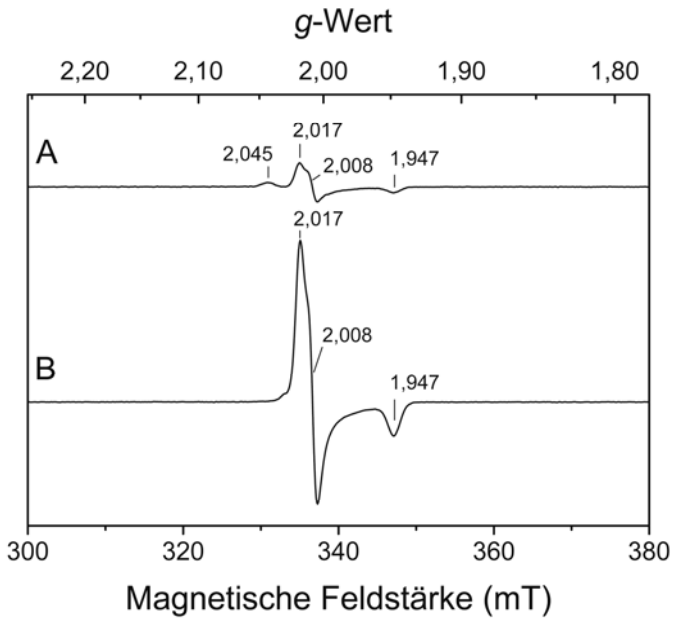

ABBILDUNG 30: EPR-spektroskopische Eigenschaften von SdhE. *A*, SdhE (100 µM) vor Rekonstitution. *B*, SdhE (100 µM) nach Rekonstitution. Beide Proben wurden anaerob in Anwesenheit von 2 mM Dithiothreitol gereinigt. Anschließend wurden die Proben mittels Ultrafiltration in 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) ohne Dithiothreitol umgepuffert. EPR-Bedingungen: Temperatur, 20 K; Mikrowellenleistung, 0,201 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT.

Das für SdhE erhaltene EPR-Signal (g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947) war dem von HdrB (g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950) sehr ähnlich (vgl. 4.3.5). Letzteres wurde jedoch erst nach Durochinon-Oxidation erhaltenen. Das SdhE-EPR-Signal konnte bei Temperaturen von 10 K bis 173 K detektiert werden. Die Spinkonzentration von SdhE nach Rekonstitution lag bei 50-70%.

In der Probe ohne Rekonstitution war in einigen Präparationen ein zusätzliches Signal in der Region um g = 2,045 detektierbar (ABBILDUNG 30, *B*). Hierbei könnte es sich um ein Signal handeln, das von Resten eines [2Fe-2S]-Zentrums verursacht wird, die mit Bezug auf die UV/Vis-spektroskopische Analyse (vgl. 4.4.3) zum Zeitpunkt der Probenvorbereitung möglicherweise noch zum Teil vorhanden waren. Bei Proben ohne Rekonstitution wurde eine Spinkonzentration erhalten, die unter 10% der Probe nach Rekonstitution lag.

Nachdem die mit anaerobem Puffer gewaschenen SdhE-Proben bereits ein EPR-Signal zeigten, wurde eine mit 2 mM Natrium-Dithionit ($E°'$ = -511 mV; (Watt & Burns, 1975)) reduzierte SdhE-Probe mittels EPR-Spektroskopie untersucht. Bei SdhE ohne Rekonstitution zeigte die Probe ein Spektrum sehr geringer Intensität, das trotz Reduktion mögliche Anteile des Signals mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 enthielt (ABBILDUNG 31). Da die Uv-vis-spektroskopischen Analysen von SdhE ohne Rekonstitution auf das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums hindeuteten, könnten die weiteren Komponenten von substöchiometrisch vorhandenen [2Fe-2S]-Zentren stammen, die durch Reduktion nicht vollständig zerstört wurden. Insgesamt waren die Signalintensitäten sehr gering.

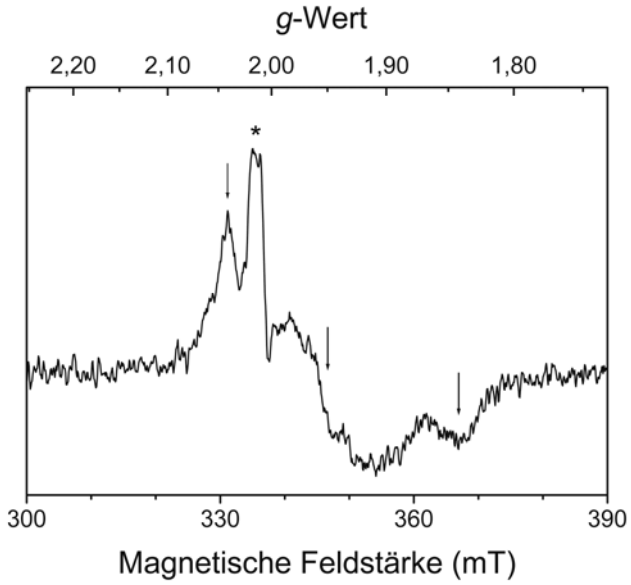

ABBILDUNG 31: EPR-spektroskopische Eigenschaften von SdhE ohne Rekonstitution nach Reduktion. SdhE (100 µM) wurde mit 2 mM Natrium-Dithionit versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mögliche Anteile des Signals mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 sind mit einem Stern und Komponenten, die auf einen [2Fe-2S]-Cluster hindeuten, sind mit Pfeilen markiert. EPR-Bedingungen: Temperatur, 20 K; Mikrowellenleistung, 0,201 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT.

Bei Proben mit rekonstituiertem SdhE zeigte sich nach Reduktion mit Natrium-Dithionit bei Temperaturen im Bereich von 10 bis 80 K ein komplexeres Spektrum, das vermutlich eine Überlagerung aus dem Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 und einem weiteren Signal war (ABBILDUNG 32). Letzteres war bei Temperaturen > 85 K nicht mehr sichtbar. Vom Temperaturverhalten könnte es sich hier um ein [2Fe-2S]-Zentrum handeln, welche bei Temperaturen < 77 K detektierbar sind (Orme-Johnson & Orme-Johnson, 1982). Bei Temperaturen > 85 K bis 130 K blieb das Signal g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 ohne Verbreiterung erhalten.

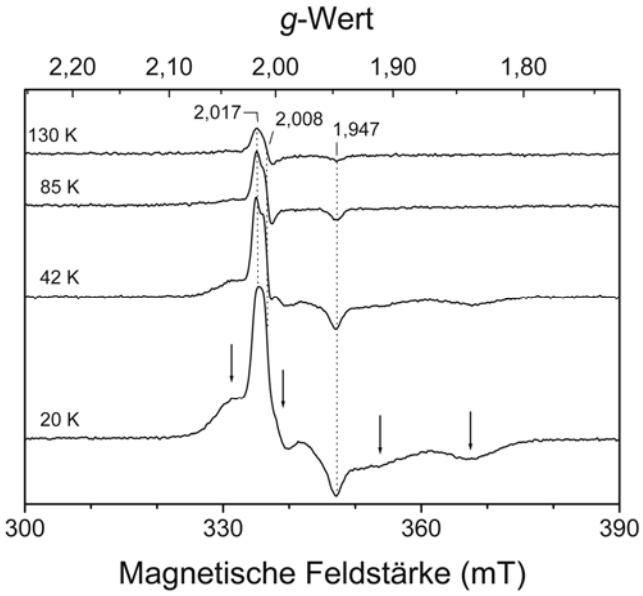

ABBILDUNG 32: EPR-spektroskopische Eigenschaften von rekonstituiertem SdhE nach Reduktion. SdhE (100 µM) wurde mit 2 mM Natrium-Dithionit reduziert. Gezeigt sind Messungen bei verschiedenen Temperaturen. Die Pfeile geben Komponenten des Spektrums an, die bei höheren Temperaturen verschwanden. Die *g*-Werte deuten an, dass es sich um Reste von [2Fe-2S]-Zentren handeln könnte. EPR-Bedingungen: Mikrowellenleistung, 0,201 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT. Gezeigt sind Spektren bei verschiedenen Temperaturen.

Bei weiteren Analysen zeigte sich bei einigen Proben, dass sich die unter dem Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 liegende Spezies nicht detektieren ließ, wenn die Probe mit 5 mM Natrium-Dithionit für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das gleiche Ergebnis wurde immer erhalten, wenn zu rekonstituiertem SdhE festes Natrium-Dithionit gegeben und die Probe sofort eingefroren wurde. Auch zeigte sich, dass es sich bei der zusätzlichen Spezies um einen [2Fe-2S]-Cluster handeln könnte, der bei Reduktion zerfiel. Anscheinend reichten bei der Probe, deren Spektren in ABBILDUNG 32 gezeigt sind, die Konzentration des Natrium-Dithionits und die Inkubationszeit zum vollständigen Abbau des Clusters nicht aus. Das rhombische CoM-Hdr- und HdrB-ähnliche Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 blieb in allen Fällen erhalten.

Als nächstes wurde rekonstituiertes SdhE nach Oxidation mit Durochinon ($E°'$ = +50 mV; (Dawson et al., 1987)) mittels EPR-Spektroskopie untersucht. Hier zeigte sich, dass das bereits beschriebene Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 detektiert werden konnte. Jedoch gab es eine weitere Komponente in der Region um g = 1,995 in dem Spektrum, die von einer anderen paramagnetischen Spezies stammte. Wie bei der Natrium-Dithionit-reduzierten Probe, wurde dieses durch Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen deutlich. Die zusätzliche Komponente war bei Temperaturen über 50 K

nicht mehr detektierbar, wobei das Haupt-Signal (g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947) bei höheren Temperaturen noch detektiert werden konnte (siehe oben). Anfangs wurde vermutet, dass die zusätzliche Komponente von einem Chinon-Radikal stammen könnte. Diese Spezies wurde auch bei EPR-Redoxtitrationen in Anwesenheit von anderen Chinonen als Redoxmediatoren detektiert. Das Signal trat jedoch auch bei Behandlung der Probe mit dem Nicht-Chinon-Oxidationsmittel Thionin auf. In manchen nur mit anaerobem Puffer gewaschenen Proben war auch ohne Zugabe von Chinonen die zusätzliche Spezies detektierbar. Bei hohen Redoxpotentialen, wie nach Sauerstoff-Oxidation, trat die zusätzliche Komponente nicht auf. Das Temperaturverhalten spricht gegen ein Chinon-Radikal-Signal. Zudem liegt das Signal der zusätzlichen Spezies im Bereich von $g < 2$. Dieses ist ein weiteres Argument gegen ein Radikal.

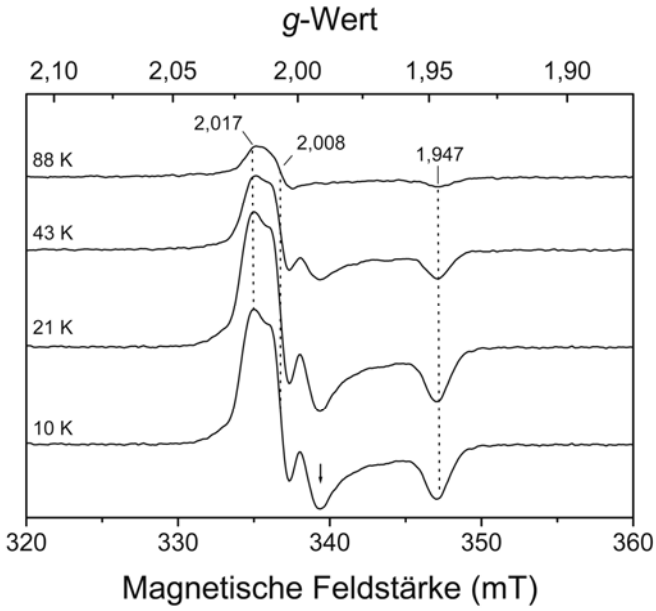

ABBILDUNG 33: EPR-spektroskopische Eigenschaften von rekonstituiertem SdhE nach Durochinon-Oxidation. SdhE (100 µM) wurde mit 2 mM Durochinon versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Pfeil zeigt auf ein Signal, das zu einer weiteren unbekannten Spezies gehört, die ein anderes Temperaturverhalten als das Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 zeigt. EPR-Bedingungen: Mikrowellenleistung, 0,201 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT. Gezeigt sind Spektren bei verschiedenen Temperaturen.

Anschließend wurde SdhE nach Oxidation mit Kaliumferricyanid ($K_3[Fe(III)(CN)_6]$) ($E°'$ = +420 mV; (Dawson et al., 1987)) mittels EPR-Spektroskopie untersucht. Hier zeigte sich, dass des EPR-Signal verschwand (ABBILDUNG 34, *A*). Nach Oxidation mit Sauerstoff (Luft) ($E°'$ = +820 mV; (Thauer et al., 1977)) über Nacht war das Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 dagegen noch detektierbar (ABBILDUNG 34, *B*).

Dieses deutete darauf hin, dass das [Fe-S]-Zentrum nicht durch das hohe Redoxpotential von Kaliumferricyanid, sondern wahrscheinlicher durch die Komplexierung von Eisenatomen aus dem Cluster zerstört wurde. Sauerstoff-Oxidation mit einem deutlich höheren Mittelpunktspotential erlaubte weiterhin die Detektion des Signals. Bei HdrB kam es bei beiden genannten Bedingungen zu einem Verlust des EPR-Signals.

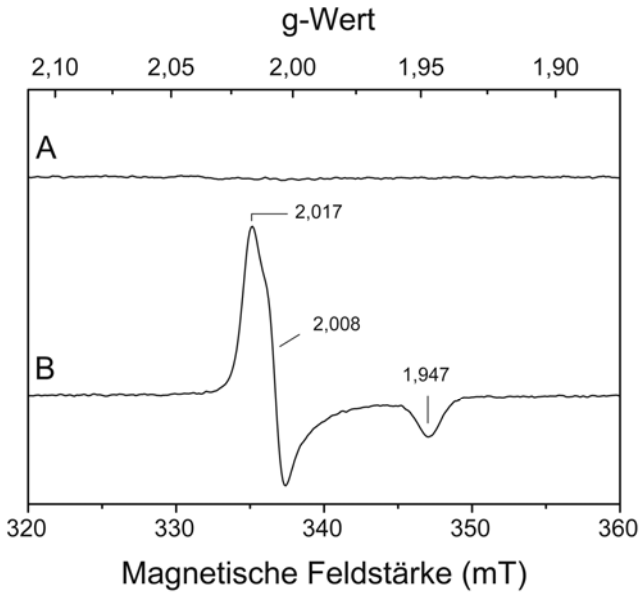

ABBILDUNG 34: Stabilität des rekonstituierte [Fe-S]-Clusters in SdhE gegenüber Kaliumferricyanid und Sauerstoff. *A*, SdhE (100 µM) wurde anaerob mit 1 mM Kaliumferricyanid ($K_3[Fe(III)(CN)_6]$) versetzt. *B*, SdhE (100 µM) wurde mit Sauerstoff (Luft) bei 4°C für 12 h oxidiert. EPR-Bedingungen: Mikrowellenleistung, 0,201 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT.

Bei SdhE war das rhombische EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 in Natrium-Dithionit-reduzierten und Durochinon-oxidierten Proben detektierbar. EPR-Redoxtitrationen im Bereich von etwa -450 mV bis +100 mV (gegen die Standard-Wasserstoff-Elektrode) bestätigten, dass das EPR-Signal über einen weiten Potential-Bereich ohne Verlust an Intensität messbar war. Dieses zeigte, dass sich die paramagnetische Spezies im physiologischen Bereich nicht reduzieren ließ. Es wurde der unter 3.5.5 im Abschnitt MATERIAL UND METHODEN beschriebene Versuchsaufbau verwendet.

4.4.5. EPR-Untersuchung an ^{57}Fe-angereichertem SdhE

Da SdhE als Modell für vergleichende spektroskopische Untersuchungen an HdrB dienen sollte, wurde das Protein ebenfalls mit ^{57}Fe angereichert produziert und

rekonstituiert. ^{57}Fe-angereichertes SdhE zeigte ebenfalls das rhombische EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947. Beim Vergleich mit SdhE, das Fe mit der natürlichen Isotopenverteilung und damit hauptsächlich ^{56}Fe enthielt, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Linienbreite (ABBILDUNG 35). Die Signalverbreiterung zeigte, dass das EPR-Signal zumindest partiell auf Eisen basierte, was damit das Vorliegen eines [Fe-S]-Zentrums bestätigte.

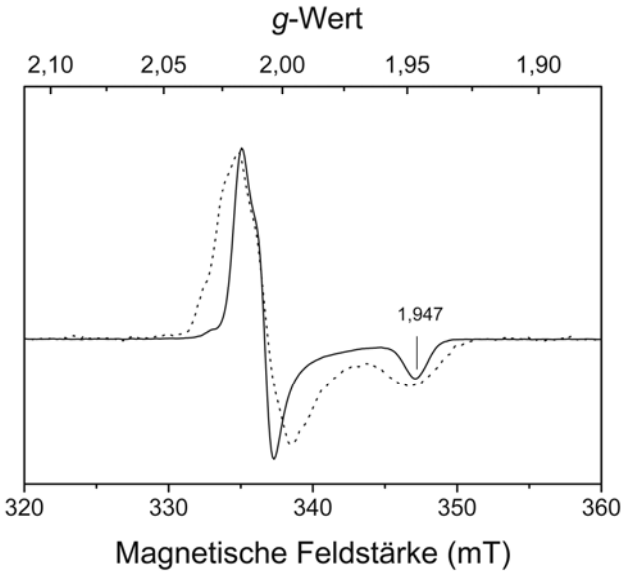

ABBILDUNG 35: EPR-spektroskopische Eigenschaften von ^{57}Fe-angereichertem SdhE. SdhE (100 µM) wurde nach der Reinigung mit anaeroben 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) ohne Dithiothreitol gewaschen. Gezeigt sind die Spektren für SdhE mit der natürlichen Isotopenverteilung von Eisen, wobei hier das ^{56}Fe-Isotop dominiert (durchgezogene Linie) und ^{57}Fe-angereichtes SdhE (unterbrochene Linie). EPR-Bedingungen: Temperatur, 20 K; Mikrowellenleistung, 0,201 mW; Mikrowellenfrequenz, 9,458 GHz; Modulationsamplitude, 0,6 mT.

4.4.6. ^{57}Fe-ENDOR-spektroskopische Eigenschaften von SdhE im Vergleich zu HdrB

Mit ^{57}Fe angereichertes SdhE ließ sich mittels Ultrafiltration auf > 30 mg/mL ankonzentrieren. Damit bestand die Möglichkeit mit SdhE ENDOR-Studien durchzuführen. Die Messungen und notwendigen Simulationen der ENDOR-Spektren wurden von Frau Dr. Marina Bennati durchgeführt. ABBILDUNG 36 zeigt die erhaltenen ^{57}Fe-Davies-ENDOR-Spektren im Vergleich zu denen von ^{57}Fe-HdrB.

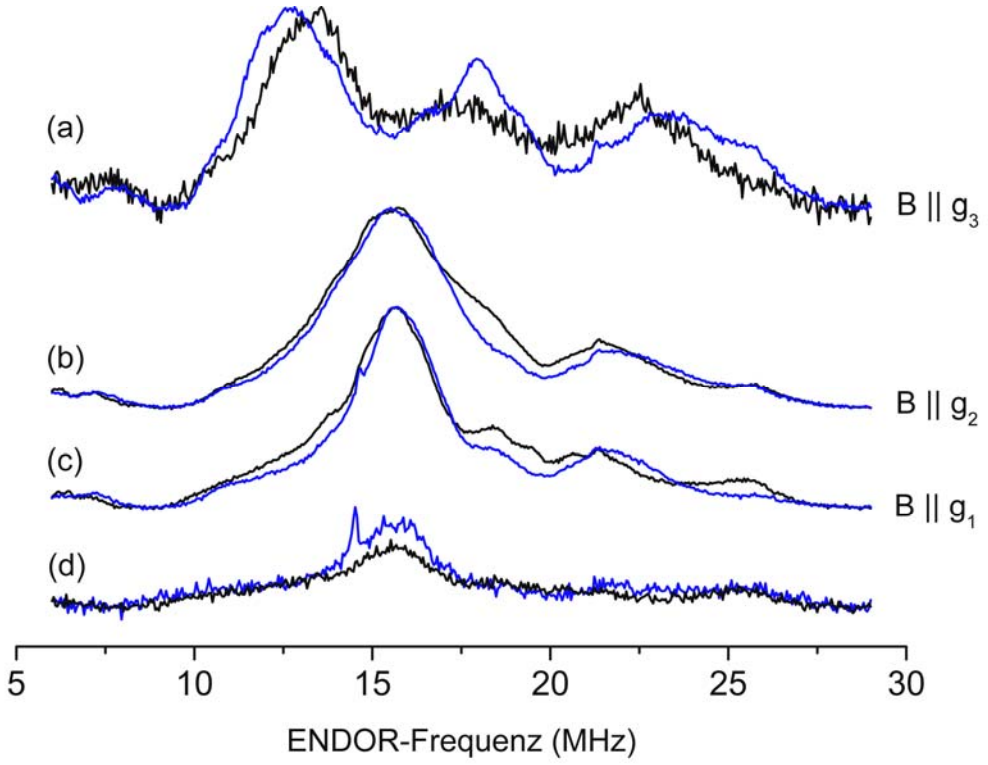

ABBILDUNG 36: ^{57}Fe-Davies-ENDOR-Spektren. Schwarze Linien repräsentieren Spektren, die an verschiedenen Positionen der EPR-Linie entsprechend (*a*) B || g_3, (*b*) B ||g_2, (*c*) B || g_1 und (*d*) außerhalb des EPR-Spektrums von HdrB gemessen wurden (vgl. 4.3.9) und entsprechend bei SdhE verwendet wurden. Die erhaltenen Spektren von SdhE sind mit blauen Linien dargestellt. SdhE (1 mM) wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) mit einer Glycerol-Endkonzentration von 10% anaerob angesetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Die ^{57}Fe-Doublets konnten für SdhE bislang nicht eindeutig zugewiesen werden. Jedoch sind die für SdhE und HdrB erhaltenen Spektren extrem ähnlich, was auch hier zusammen mit den anderen experimentellen Daten für ein [4Fe-4S]-Zentrum spricht. Die weitere Analyse der ENDOR-Daten in Kombination mit Daten aus Mössbauer-spektroskopischen Messungen, die parallel auch an HdrB-Proben durchgeführt wurden, wird weitere Informationen zur Struktur des vorliegenden [Fe-S]-Zentrums liefern. Die Auswertung der Mess-Daten war zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.

4.4.7. Röntgen-Absorptions-spektroskopische Messungen (XAS) und EXAFS von SdhE

Nachdem die für SdhE aus *S. solfataricus* gewonnen Daten auf das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums in SdhE hindeuteten, wurde vermutet, dass es sich bei dem zuvor

charakterisierten [2Fe-2S]-Zentrum in dem orthologen SdhE-Protein aus *S. tokodaii* Stamm 7 (Iwasaki et al., 2002) um ein Artefakt bei der heterologen Produktion in *E. coli* handelte. Für dieses Protein wurde ebenfalls das Vorliegen einer isolierten Zinkstelle beschrieben. Um auszuschließen, dass SdhE ohne Rekonstitution des [Fe-S]-Zentrums das Zink in artifizieller Weise gebunden hatte, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. A. Scott und Mitarbeitern Messungen mittels Röntgenabsorptions-Spektroskopie (XAS) an heterolog produziertem SdhE aus *S. solfataricus* nach Rekonstitution durchgeführt. Experimentelle Details sind im Teil MATERIAL UND METHODEN unter 3.5.7 beschrieben.

In ABBILDUNG 37 sind die Daten gezeigt, die für die Zn-Röntgenabsorption an der K-Kante für SdhE erhalten wurden. Dargestellt sind Kante, EXAFS und Fourier Transformation. Die Ergebnisse zeigen zweifelsfrei das Vorliegen einer isolierten Zinkstelle in rekonstituiertem SdhE. Das Ergebnis der Auswertung der Röntgenabsorptions-Spektren zeigte eine vornehmlich Schwefel-basierte Koordination des Zinks. Die Kurven-Anpassungs-Analysen (TABELLE 13) ergaben die höchste Übereinstimmung bei einer $ZnS_3(N/O)_1$-Koordination. Damit wurde gezeigt, dass die Zink-Stelle auch in SdhE konserviert ist. Die Daten zeigten eine starke Übereinstimmung mit denen von HdrB und HdrABC aus *Mth. marburgensis.* Da bei SdhE aus *S. solfataricus* P2 Cysteinyl-Reste nur in den beiden CCG-Domänen vorkommen, müssen diese die Schwefel-Liganden liefern und an der Zink-Koordination beteiligt sein. Der leichte Rückstreuer (N/O) könnte nach den Daten von einem Histidin-Imidazol stammen. Der Sequenzvergleich von SdhE aus verschiedenen Organismen mit HdrB aus *Mth. marburgensis* sowie HdrD aus *Ms. barkeri* zeigte ebenfalls einen konservierten Histidin-Rest an Position 121 von SdhE aus *S. solfataricus* P2 (www.tigr.org) als möglichen Kandidaten für den (N/O)-Liganden.

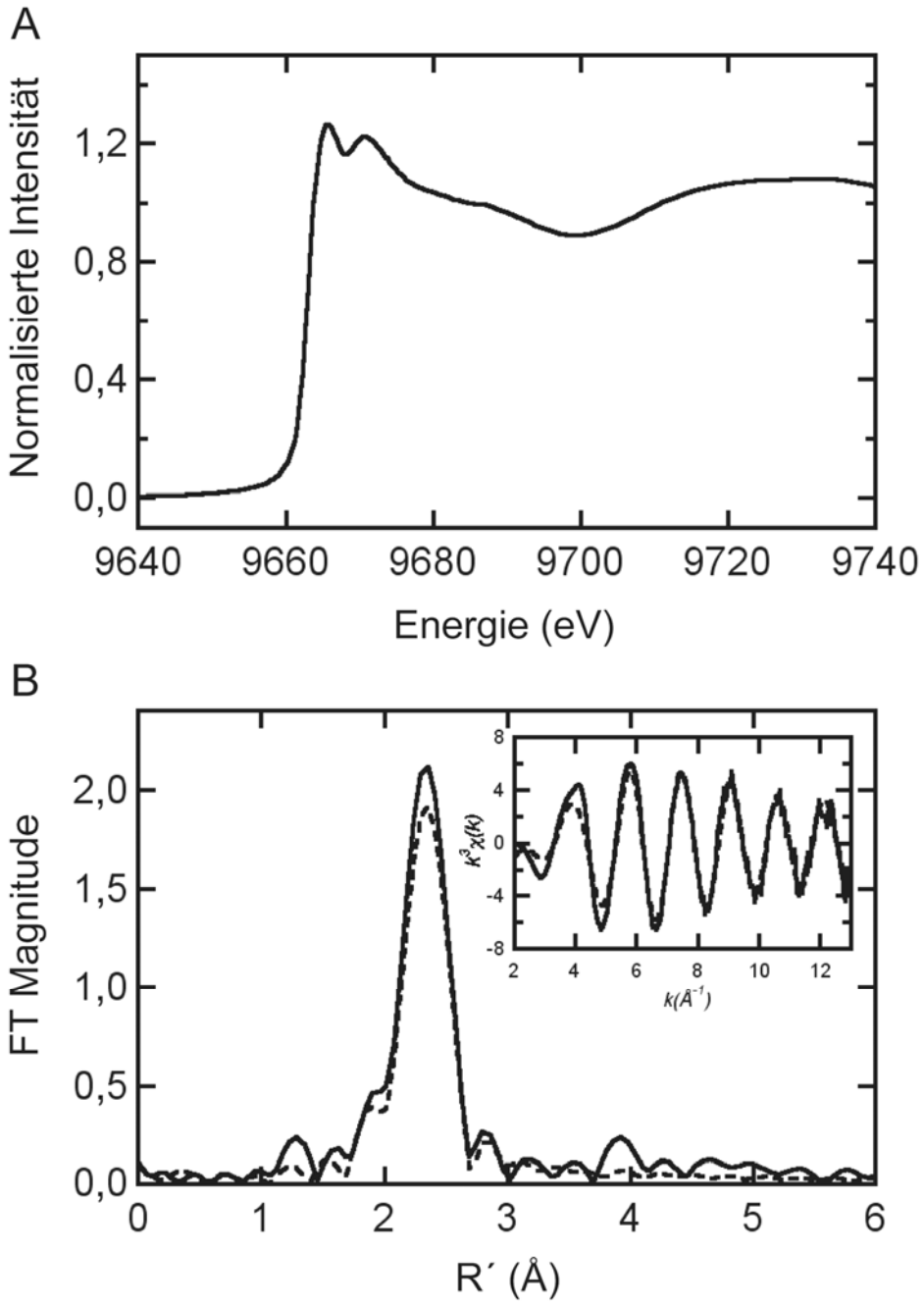

ABBILDUNG 37: Zn K-Kanten XAS von SdhE. *A*, Zn K-Kanten-Spektrum. *B*, Fourier-Transformation (FT) (k^3-gewichtet, k = 2,0 – 13,0 Å^{-1}) von SdhE (durchgezogene Linie) und Simulation des besten Fits (Kurven-Anpassung) aus TABELLE 13, Fit 7 (gestrichelte Linie). R′ = apparente Distanz; das Inset in *B* zeigt die k^3-gewichtete EXAFS.

TABELLE 13: Kurven-Anpassungs-Ergebnisse für Zn-EXAFS.[a]

Probe **Dateiname (*k*-Bereich)** **$\Delta k^3\chi$**	**Fit**	**Schale**	**R_{as}** **(Å)**	**σ_{as}^2** **(Å)^2**	**ΔE_0** **(eV)**	**f'**[b]	**BVS**[c]
SdhE	1	Zn-S_3	2,32	0,0033	0,221	0,097	1,61
ZSD0A (2-13 Å^{-1})	2	Zn-S_4	2,32	0,0050	1,591	0,076	2,15
$\Delta k^3\chi$ = 12,52	3	Zn-S_5	2,32	0,0065	1,273	0,065	2,69
	4	Zn-S_6	2,32	0,0079	0,957	0,061	3,22
	5	Zn-S_1	2,37	-0,0023	8,627	0,081	1,47
		Zn-O_3	2,11	[0,0025]			
	6	Zn-S_2	2,34	0,0005	3,756	0,072	1,78
		Zn-O_2	2,06	[0,0025]			
	7	Zn-S_3	2,34	0,0025	2,763	0,063	1,93
		Zn-O_1		[0,0025]			

[a] Fit bezeichnet die Anpassung. Unter Schale wird das Absorber-Rückstreuer-Paar für die theoretische Phase und Amplitude bei Einzelrückstreuung angegeben. Die tiefergestellten Zahlen geben die Anzahl der Rückstreuer pro Absorber an. R_{as} ist der Absorber-Rückstreuer-Abstand, σ_{as}^2 gibt die mittlere quadratische Abweichung von R_{as} an und ΔE_0 ist der Wert der Verschiebung von E_0 aus der theoretischen Rückstreuungs-Funktion.

[b] f' ist ein normalisierter Fehler (Chi-quadriert):

$$f' = \frac{\left\{ \sum_i \left[k^3 \left(\chi_i^{obs} - \chi_i^{calc} \right) \right]^2 / N \right\}^{1/2}}{\left[\left(k^3 \chi^{obs} \right)_{max} - \left(k^3 \chi^{obs} \right)_{min} \right]}$$

[c] BVS=$\Sigma\exp[(r_o-R_{as})/B]$, B=0.37, r_0(Zn(II)-S)= 2.09, r_0(Zn(II)-O)= 1.704 (Brown & Altermatt, 1985)

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert erstmals direkte Hinweise darauf, dass die Untereinheit HdrB von Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea das katalytisch-aktive [Fe-S]-Zentrum bindet. Dazu wurde HdrB heterolog in *E. coli* produziert und das [Fe-S]-Zentrum chemisch *in vitro* rekonstituiert. HdrB, das auf diese Weise hergestellt wurde, besaß eine paramagnetische Spezies mit spektroskopischen und strukturellen Eigenschaften sehr ähnlich zu CoM-Hdr, wobei es sich bei letzterem um ein paramagnetisches Reaktionsintermediat aus dem Katalyse-Zyklus von Hdr handelt. Dieses kann durch Oxidation des HdrABC-Holoenzyms in Gegenwart von CoM-SH als einzigem Substrat erzeugt werden. In früheren Arbeiten wurde vorgeschlagen, dass es sich bei der paramagnetischen Spezies von CoM-Hdr um ein $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Zentrum handelt, bei dem CoM-SH als fünfter Ligand an ein Eisenatom des Clusters gebunden vorliegt (Hedderich, et al., 2005).

5.1. Untersuchungen an heterolog produziertem HdrB

Nach der biochemischen Charakterisierung und Sequenzanalyse der beiden in der *Einleitung* beschrieben Typen von Hdr wurde deutlich, dass sich der Mechanismus der Reduktion des Heterodisulfids von den Pyridin-Nukleotid-abhängigen Disulfid-Reduktasen unterscheiden muss, da *Ms. barkeri*-Hdr keinen Flavin-Cofaktor besitzt. Eine frühere Arbeit gab Hinweise darauf, dass die Disulfid-Reduktion durch Hdr vom *Mth. marburgensis*- und *Ms. barkeri*-Typ über einen konservierten Mechanismus katalysiert wird (Madadi-Kahkesh, 2001). Die Sequenzanalyse der beiden Hdr-Typen zeigte, dass nur HdrD bzw. HdrC und HdrB in Hdr konserviert sind. Zudem sind die genannten Untereinheiten homolog zur Untereinheit TfrB von Thiol:Fumarat-Reduktase (Tfr) aus methanogenen Archaea. TfrB enthält vermutlich das katalytische Zentrum zur Oxidation von CoM-SH und CoB-SH zu CoM-S-S-CoB. Es wurde vorgeschlagen, dass TfrA aufgrund der Homologie zur Untereinheit SdhA von Succinat:Chinon-Oxidoreduktase die Fumarat-Reduktion katalysiert (Heim et al., 1998). Wie oben bereits angesprochen, deuten die bisherigen Daten auf einen [4Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum von Hdr hin (Duin et al., 2002). HdrC und der N-terminale Bereich von HdrD besitzen jeweils zwei klassische Bindemotive für [4Fe-4S]-Zentren ($CX_2CX_2CX_3C$). Es wurde vorgeschlagen, dass Cysteinyl-Reste aus den beiden CCG-Domänen von HdrB bzw. dem C-terminalen Bereich

von HdrD daran beteiligt sind, den [4Fe-4S]-Cluster mit seinen ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften zu koordinieren. Um experimentelle Hinweise dafür zu erhalten, dass HdrB das katalytische [Fe-S]-Zentrum trägt, wurde HdrB schon in früheren Arbeiten heterolog produziert. Bei HdrB, welches in *E. coli* produziert wurde, konnte das Vorliegen eines [Fe-S]-Zentrums nicht gezeigt werden. Vermutlich wurde hier nur HdrB-Apoenzym gebildet (Heim, 1998). Die Produktion in *B. subtilis* ergab rötlich-braunes HdrB. Die Analyse deutete darauf hin, dass von heterolog produziertem HdrB ein [2Fe-2S]-Zentrum gebunden wurde. Für das Hdr-Holoenzym gab es jedoch keine spektroskopischen Hinweise für das Vorliegen dieses Cluster-Typs. Deshalb wurde angenommen, dass unter den gewählten Bedingungen der falsche Cluster-Typ in HdrB inseriert wurde und es sich somit um ein experimentelles Artefakt handelte (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Jedoch zeigten diese Experimente, dass HdrB grundsätzlich ein [Fe-S]-Zentrum binden kann. Da die Produktion von HdrB in *E. coli* nicht zum Einbau von [Fe-S]-Zentren geführt hatte, wurde vermutet, dass der Einbau der [Fe-S]-Zentren ein limitierender Schritt sein könnte. T7-Polymerase-abhängige Expressions-Systeme führen zur starken Überproduktion von Protein, was die [Fe-S]-Cluster-Synthesemaschinerie überlasten könnte. Deshalb wurde neben dem Plasmid zur Coexpression von tRNA-Genen und dem Expressionsvektor ein drittes Plasmid verwendet. Das Plasmid pRKISC ermöglichte die Coexpression des *isc*-Gen-Clusters (Nakamura et al., 1999). Die *isc*-Genprodukte sind an der Biosynthese von [Fe-S]-Zentren in *E. coli* beteiligt (Zheng et al., 1998). Diese Versuche zeigten, dass das erhaltene HdrB auch hier geringe Mengen eines vermutlichen [2Fe-2S]-Zentrums gebunden hatte (Hamann, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht Bedingungen zu finden, die die Insertion des gesuchten Cluster-Typs erlaubten. Hdr stammt aus strikt anaeroben Archaea. In Gegenwart von Sauerstoff wird gereinigte Hdr relativ schnell inaktiviert (Hedderich, 1990). Es wäre möglich, dass gebildete [4Fe-4S]-Zentren im Cytoplasma von *E. coli* nicht stabil sind und relativ schnell wieder zerfallen. Zudem kommt das zu HdrB-verwandte CCG-Domänen Protein GlpC im anaeroben Stoffwechsel von *E. coli* vor (Cole et al., 1988), das ebenfalls das gesuchte [4Fe-4S]-Zentrum enthalten könnte. Deshalb wurde überlegt, dass anaerobe Bedingungen für die Biosynthese dieses Clusters hilfreich sein könnten. HdrB wurde deshalb in *E. coli* anaerob bei respiratorischem Stoffwechsel produziert. Dazu wurde ein in der Literatur beschriebenes Medium und Protokoll verwendet (Pollock et al., 2002). Das erhaltene HdrB zeigte im Gegensatz zu aerob produziertem Protein bei gleicher Konzentration eine tiefbraune Farbe. Analysen ergaben,

dass auch hier nicht das gesuchte [4Fe-4S]-Zentrum eingebaut wurde (vgl. 4.3.4 und 4.3.5).

Eine weitere Strategie war deshalb, einen Expressions-Wirt zu verwenden, bei dem die Bedingungen der Produktion von HdrB aus *Mth. marburgensis* näher an die physiologische Situation von *Mth. marburgensis* kämen. Für *Methanococcus voltae* waren genetische Werkzeuge vorhanden, die die Konstruktion eines Stammes erlaubten, der HdrB heterolog produzierte. Allerdings war die Reinigung von HdrB sehr schwierig. Die Ausbeute an HdrB reichte nicht, um weitere spektroskopische Analysen durchführen zu können.

Während in den letzen Jahren relativ viele Details der Biosynthese von [Fe-S]-Zentren in Bacteria und Eukarya aufgeklärt wurden (Johnson et al., 2005; Lill et al., 2006), ist zur Situation in Archaea praktisch nichts bekannt (Lill & Mühlenhoff, 2005). In archaeellen Genomen sind jedoch einige Komponenten des bakteriellen SUF-Systems codiert (Takahashi & Tokumoto, 2002; Tokumoto et al., 2004). Weitaus länger weiß man, dass sich bestimmte [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-Zentren *in vitro* durch Zugabe von S^{2-} und $Fe^{2+/3+}$ zum Apoenzym unter reduzierenden Bedingungen rekonstituieren lassen (Malkin & Rabinowitz, 1966; Merchant & Dreyfuss, 1998). Für gereinigtes HdrB war die Rekonstitution *in vitro* bisher nicht erfolgreich (Dr. Gerd Mander, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurde deshalb versucht, in *E. coli* Zelllysat, welches heterolog produziertes HdrB enthielt, das [Fe-S]-Zentrum zu rekonstituieren (Tong et al., 2003). Zunächst wurde Zelllysat von *Mth. marburgensis* zugemischt. *Mth. marburgensis*-Lysat müsste benötigte spezifische Komponenten enthalten, die in Kombination mit zugegebenem Fe^{2+}, Sulfid, L-Cystein und Dithiothreitol den Cluster in HdrB rekonstituieren könnten. Dieser Ansatz war erfolgreich. Rekonstituiertes HdrB zeigte nach Oxidation eine rhombisches EPR-Spektrum mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950, das dem Signal von CoM-Hdr mit g_{zyx} = 2,013, 1,991 und 1,938 sehr ähnlich war. In folgenden Experimenten zeigte sich zudem, dass die Rekonstitution von HdrB auch ohne Zelllysat von *Mth. marburgensis* funktionierte. Durch die Optimierung der Bedingungen für Produktion und Rekonstitution von HdrB stand genügend Protein für spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung. Damit war es in dieser Arbeit erstmals möglich, HdrB isoliert von anderen [Fe-S]-Cluster tragenden Untereinheiten zu untersuchen.

Während das HdrABC-Holoenzym in der oxidierten Form EPR-inaktiv ist, wenn kein CoM-SH vorliegt, zeigte rekonstituiertes HdrB das charakteristische EPR-Signal bereits nach Oxidation mit Durochinon, wenn weder CoM-SH noch andere Thiole

anwesend waren. Frühere Untersuchungen mit HdrABC-Holoenzym hatten gezeigt, dass zu CoM-Hdr ähnliche EPR-Signale erzeugt werden, wenn das Enzym in Gegenwart von CoB-SH oder anderen Thiolen wie z.B. Mercaptoethanol oder Cystein oxidiert wurde, welche kein physiologisches Substrat von Hdr sind (Madadi-Kahkesh, 2001). Die von CoB-SH und Nicht-Substrat-Thiolen induzierten paramagnetischen Spezies hatten Mittelpunktspotentiale, die mindestens 150 mV positiver waren als das von CoM-Hdr (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Weil das Mittelpunktpotential von CoM-Hdr (-185 ± 10 mV) nahe bei dem des Heterodisulfids (-143 mV; (Tietze et al., 2003)) liegt, wurde dieses als Hinweis genommen, dass unter physiologischen Bedingungen eher CoM-S^- als CoB-S^- an den [Fe-S]-Cluster im aktiven Zentrum von Hdr bindet. Zudem geht das EPR-Signal verloren, wenn CoM-Hdr mit CoB-SH titriert wird (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Deshalb könnte die Bildung einer paramagnetischen Spezies nach Oxidation in Gegenwart von CoB-SH oder eines Nicht-Substrat-Thiols durch eine artifizielle Nebenreaktion bei hohen Redoxpotentialen verursacht werden.

Obwohl das EPR-Spektrum von oxidiertem HdrB sich in Gegenwart von CoM-SH nicht änderte, zeigten zwei weitere Experimente, dass CoM-SH an das in HdrB vorliegende [Fe-S]-Zentrum bindet: (1) Wurde CoM-^{33}SH verwendet, zeigte sich eine anisotrope Signalverbreiterung. (2) Das Mittelpunktpotential der paramagnetischen Spezies mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 erhöhte sich um +55 mV, wenn die Redoxtitration in Gegenwart von CoM-SH durchgeführt wurde. Das in Gegenwart von CoM-SH erhaltene Mittelpuktspotential von HdrB lag mit -175 ± 10 mV nahe dem für CoM-Hdr bestimmten Mittelpunktpotential von -185 ± 10 mV (Madadi-Kahkesh et al., 2001).

Für das HdrABC-Holoenzym wurde eine maximale Spinkonzentration von 1 mol Spin pro mol Heterotrimer beim CoM-Hdr-Signal (g_{zyx} = 2,013, 1,991 und 1,938) erhalten. Rekombinantes HdrB besaß für das EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 eine Spinkonzentration von nur 0,25 Spin pro Molekül. Vermutlich war für HdrB die Rekonstitution nicht vollständig, was auch bei anderen [Fe-S]-Proteinen auftrat (Merchant & Dreyfuss, 1998). Dieses ist mit dem substöchiometrischen Gehalt von Eisen und Säure-labilem Schwefel in HdrB konsistent.

In früheren EPR-spektroskopischen Untersuchungen mit CoM-^{33}SH und Selen-Röntgenabsorptions-spektroskopischen Messungen mit CoM-SeH, dem Selen-Derivat von CoM-SH, wurde gezeigt, dass CoM-S^- an ein Eisenatom des [Fe-S]-Zentrums bindet (Duin et al., 2003; Shokes et al., 2005). Allerdings ist nicht klar, ob CoM-S^- als Ligand an ein

bestimmtes Eisenatom bindet und den Cysteinliganden ersetzt, oder ob ein fünffach koordiniertes Eisenatom vorliegt. Die aus den ENDOR-Messungen an CoM-Hdr (Bennati et al., 2004; Hedderich et al., 2005) und oxidiertem HdrB ohne Substrat ermittelten ^{57}Fe-Kopplungen sind sehr ähnlich. Auch konnte keine große Anisotropie bei den ^{57}Fe-Hyperfeinkopplungen gefunden werden, wie sie für das fünffach koordinierte Eisenatom in alkylierter Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase (NEM-Ftr) ermittelt wurde (Jameson et al., 2003). Deshalb muss angenommen werden, dass in diesem Fall einer der vier Cystein-Liganden durch CoM-SH ersetzt wird. Dieses wird durch Untersuchungen an HdrB-Mutanten unterstützt, die weiter unten diskutiert werden.

Die *In-vitro*-Rekonstitution von HdrB führte neben dem eigentlichen [4Fe-4S]-Zentrum zur Bildung eines stabilen [2Fe-2S]-Zentrums, das in Natrium-Dithionit-reduzierten Proben mittels EPR-Spektroskopie, aber auch in EPR-Redoxtitrationen bei Potentialen unter -250 mV detektiert werden konnte (ABBILDUNG 20). Da dieses Signal niemals in Proben des HdrABC-Holoenzyms detektiert wurde (Madadi-Kahkesh et al., 2001), wird von einem Artefakt bei der Rekonstitution ausgegangen. Bei heterolog produziertem nicht-rekonstituiertem HdrB konnten ebenfalls Hinweise für das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums erhalten werden, allerdings handelte es sich hier um einen Cluster, der bei Reduktion mit Natrium-Dithionit zerfiel und kein EPR-Signal lieferte. EPR- und ENDOR-Spektroskopie lieferten für rekonstituiertes HdrB in oxidierter Form außerdem Hinweise für das Vorliegen einer weiteren paramagnetischen Spezies, bei der es sich um ein $[3Fe\text{-}4S]^{+}$-Zentrum handeln könnte. Bei unphysiologisch hohen Redoxpotentialen zeigten auch HdrABC bzw. CoM-Hdr ein EPR-Signal im Bereich g = 2,02, welches ebenfalls von einem $[3Fe\text{-}4S]^{+}$-Zentrum verursacht werden könnte (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Dieser Cluster wird als ein Abbauprodukt eines [4Fe-4S]-Zentrums interpretiert. Katalytische [4Fe-4S]-Zentren können ein labiles viertes Eisenatom besitzen. Bei Aconitase konnte dieses genutzt werden, um die Eisenatome des Clusters selektiv zu markieren (Werst et al., 1990).

In der Sequenz von HdrB sind insgesamt 12 Cysteine vorhanden. Zehn dieser Cysteine sind in zwei sogenannten CCG-Domänen mit je fünf Cysteinyl-Resten ($CX_{31\text{-}39}CCX_{35\text{-}36}CXXC$) angeordnet (vgl. Abschnitt 4.3.12, ABBILDUNG 23). Die verbleibenden zwei Cysteinyl-Reste (C283 und C287) sind nur in HdrB aus *Mth. marburgensis* vorhanden und in HdrB-Sequenzen von anderen Methanogenen, wie z.B. *Methanocaldococcus jannaschii* oder *Methanosphaera stadtmanae* (www.tigr.org), nicht konserviert. Die Analyse der HdrB-Mutanten zeigte eindeutig, dass die Cysteinyl-

Reste für die Koordinierung des [Fe-S]-Clusters im aktiven Zentrum ausschließlich aus der C-terminalen CCG-Domäne stammen. Mutationen von Cystein zu Serin in der N-terminalen CCG-Domäne hatten keinen Einfluss auf die Form oder Intensität des EPR-Signals mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 in oxidiertem HdrB (vgl. 4.3.5). Im Gegensatz dazu hatten die Mutationen in der C-terminalen CCG-Domäne einen starken Einfluss auf die Bildung des Clusters bzw. die EPR-spektroskopischen Eigenschaften. Wurden hier zwei Cysteine gleichzeitig mutiert (C193S/C194S oder C231S/C234S), konnte kein EPR-Signal detektiert werden, was darauf hindeutet, dass der Cluster nicht mehr eingebaut werden konnte. Bei den Einzelmutanten sah es so aus, dass vier von den fünf Mutanten ein [Fe-S]-Zentren mit stark veränderten EPR-spektroskopischen Eigenschaften trugen. Die Durochinon-oxidierten Mutanten C153S, C193S, C194S und C234S besaßen sehr ähnliche EPR-Eigenschaften mit den *g*-Werten 2,005 und 1,964. Das Signal konnte ohne Verbreiterung bis zu Temperaturen von 100 K gemessen werden. Um welchen Cluster-Typ es sich handelt ist unbekannt. Das Temperaturverhalten spricht gegen einen konventionelles $[3Fe\text{-}4S]^+$-Zentrum, welche grundsätzlich nur bei niedrigen Temperaturen detektiert werden können (Beinert & Thomson, 1983). Dennoch kann ein ungewöhnliches $[3Fe\text{-}4S]^+$-Zentrum nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit bei den Serin-Mutanten wäre ein Cluster, bei dem an die Stelle eines Cysteinats ein Serinat- (Brereton et al., 1999) oder Lösungsmittel-Ligand (OH^- oder H_2O) getreten wäre. Außerdem könnten auch Aminosäurereste an anderen Positionen der Peptidkette als Liganden eingesprungen sein. Die Zugabe von CoM-SH führte auch bei Cystein-zu-Serin-Mutationen in HdrB zu keiner Änderung des EPR-Spektrums. Die Mutante C231S zeigte zwei Haupt-EPR-Signale. Zum einen war das für die anderen Einzelmutanten in der C-terminalen CCG-Domäne erhaltene Signal detektierbar, zum anderen war ein zweites rhombisches Signal mit g_{zyx} = 2,021, 1,991 und 1,939 vorhanden. Die Temperaturabhängigkeit und *g*-Wert-Anisotropie dieses Signals waren dem von Wildtyp-HdrB (g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950) und CoM-Hdr (g_{zyx} = 2,013, 1,991 und 1,938) sehr ähnlich. Im Vergleich zum Wildtyp lag die Signalintensität bei dieser Mutante bei etwa 40%, was eine Destabilisierung des Clusters in dieser Mutante anzeigt. Die Mutante C231S trug demnach ein [Fe-S]-Zentrum mit elektronischen und strukturellen Eigenschaften, die denen des Wild-Typs ähnelten. Auf Grundlage der durch Mutagenese erhaltenen Ergebnisse wird vorgeschlagen, dass das katalytische [4Fe-4S]-Zentrum in HdrB von den Cysteinyl-Resten C153, C193, C194 und C234 koordiniert wird. Der Zusammenbau des Cluster war in der C231S-Mutante möglich, auch wenn die Effizienz etwas reduziert war. Dieses zeigt, dass C231 nicht direkt an der

Ligation des Clusters beteiligt ist. C231 könnte eine stabilisierende Rolle haben oder als Redox-aktiver Cysteinyl-Rest im katalytischen Zyklus eine Rolle spielen. Hier wäre denkbar, dass dieser Cysteinyl-Rest als Cysteinat das Disulfid-Substrat CoM-S-S-CoB nukleophil angreift, wobei CoB-SH freigesetzt wird und ein gemischtes Disulfid zwischen C231 und CoM-SH entsteht. Das [Fe-S]-Zentrum könnte dann dieses Disulfid in einem Ein-Elektronen-Schritt reduzieren und somit CoM-Hdr als Intermediat bilden, wie es weiter unten diskutiert wird. In einer früheren Arbeit wurden Inhibierungsexperimente an Hdr durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Hdr-Aktivität aus *Ms. barkeri* im reduzierten Zustand mit 100 µM Iodacetamid, 400 µM N-Ethylmaleinimid (NEM) und 300 µM 1,3-Propansulton zu 50% und im oxidierten Zustand zu 19% inhibiert wurde. *M. marburgensis*-Hdr ließ sich dagegen nur schlecht inhibieren. Eventuell war das aktive Zentrum für die Substanzen nicht zugänglich. Die Identifizierung von Redox-aktiven Cysteinen durch Radioaktiv-Markierung mit [^{14}C]-Iodacetamid in Hdr aus *Ms. barkeri* war ebenfalls nicht eindeutig. Hier wurden vier Peptide identifiziert, die Cysteine aus beiden CCG-Domänen enthielten. Bei Peptiden mit zwei Cysteinyl-Resten konnte nicht unterschieden werden, welcher Rest alkyliert war. Diese Untersuchungen schließen jedoch das Vorliegen von Redox-aktiven Cysteinyl-Resten nicht aus (Madadi-Kahkesh, 2001).

Die ENDOR-Daten deuten darauf hin, dass in Durochinon-oxidiertem HdrB ein [4Fe-4S]-Zentrum gebunden vorliegt, das in Bezug auf die elektronischen Eigenschaften von CoM-Hdr, einem Katalyse-Intermediat des HdrABC-Holoenzyms, sehr ähnlich ist. Beim Holoenzym kann die Oxidation des Clusters jedoch bei Potentialen bis zu +150 mV nicht erreicht werden, wodurch er EPR-inaktiv bleibt. Bei noch höheren Potentialen wird der Cluster zerstört. Nur wenn CoM-SH zugeben wird, kann die Oxidation das Clusters bei physiologischen Potentialen stattfinden. CoM-SH verschiebt damit das Mittelpunktpotential des Clusters zu negativeren Werten (-185 mV). Mit CoB-SH oder Nicht-Substrat-Thiolen ist diese Verschiebung deutlich geringer. In Anwesenheit von CoB-SH liegt das Mittelpunktpotential bei -30 mV (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Bei HdrB ist das Mittelpunktpotential intrinsisch zu negativeren Werten verschoben (-120 mV). Durch die fehlenden Untereinheiten HdrA und HdrC könnten leichte räumliche Veränderungen dieses bewirken. Allerdings bewirkt die Zugabe von CoM-SH auch hier eine Verschiebung zu negativeren Werten (-175 mV), die auch für CoM-Hdr gemessen wurden. Welcher Mechanismus hinter der Potential-Verschiebung durch CoM-SH steht ist unbekannt. Die Experimente in früheren Arbeiten mit CoM-^{33}SH und CoM-SeH hatten jedoch gezeigt, dass CoM-SH an eine bestimmte Eisenstelle des Clusters bindet (Duin et

al., 2003; Shokes et al., 2005). Zudem könnte die Interaktion der großen negativ geladenen Sulfonat-Gruppe von CoM-SH zu Wechselwirkungen an mehreren Stellen führen (Bennati et al., 2004).

Die Mutagenese-Studien und ENDOR-Daten von HdrB unterstützen ein Model, wonach eine Eisenstelle des [4Fe-4S]-Clusters im aktiven Zentrum von Hdr vier statt der bisher angenommenen fünf Schwefel-Liganden koordiniert wird. Dabei ersetzt CoM-S^- einen Cysteinat-Liganden einer Eisen-Stelle des [4Fe-4S]-Zentrums. Dieses könnte die relativ geringe Anisotropie von CoM-Hdr im Vergleich zu anderen $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Sytemen erklären. TABELLE 14 zeigt diesen Vergleich.

TABELLE 14: Isotrope ^{57}Fe-Hyperfein-Kopplungen von CoM-Hdr (Bennati et al., 2004) von CoM-Hdr im Vergleich zu einem $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Cluster in einem Modell-System aus einer Einzel-Kristall-ENDOR-Studie (Rius & Lamotte, 1989), einem HiPIP-Protein (Kappl et al., 1999) und dem $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Cluster-Intermediat in NEM-Ftr (Jameson et al., 2003).[a]

Fe-Stelle	a_{iso} (MHz)			
	Modell-System	**HiPIP-Protein**	**NEM-Ftr**[b]	**CoM-Hdr**
1	17,4	21,6	22	29
2	19,8	21,6	27	33,3
3	-32,7	-33	-37	-39,2
4	-33,5	-33	-37	-43,4

[a] Die Tabelle wurde von Dr. Marina Bennati übernommen (Hedderich, et al., 2005).
[b] Die Daten für NEM-Ftr wurden aus Mössbauer-Daten extrahiert.

Mit dem Hdr-Holoenzym konnten Mössbauer-spektroskopische Messungen nicht durchgeführt werden, weil die hohe Anzahl an [4Fe-4S]-Clustern die Auswertung unmöglich machen würde. Bei dieser Methode sind im Gegensatz zu EPR-Spektroskopie, wo nur paramagnetische Zentren detektiert werden, alle Eisenatome „sichtbar“. Jedoch konnten an HdrB Mössbauer-spektroskopische Messungen durchgeführt werden. Die derzeit Laufende Auswertung der Daten könnte zusätzliche Informationen zur elektronischen Struktur des [4Fe-4S]-Zentrums und damit weitere Hinweise für das vorgeschlagene Modell liefern.

Die besonderen elektronischen und spektroskopischen Eigenschaften des Clusters im aktiven Zentrum könnten auf die ungewöhnliche Tandem-Cystein-Koordination durch C193 und C194 zurückzuführen sein (vgl. ABBILDUNG 23). Tandem-Koordination von

[4Fe-4S]-Zentren konnte auch bei zwei anderen Enzymen beobachtet werden, für die Daten zur Struktur auf atomarer Ebene vorliegen: Der Cluster N2 in der Untereinheit Nqo6 aus Komplex I der Atmungskette in *Thermus thermophilus* (Sazanov & Hinchliffe, 2006) und APS-Reduktase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Chartron et al., 2006). In Untereinheit Nqo6 von Komplex I und APS-Reduktase treten, induziert durch das Substrat, Konformationsänderungen auf. Es wurde vorgeschlagen, dass die dynamische Konformationsänderung mit der Tandem-Cystein-Ligation der [4Fe-4S]-Zentren zusammenhängt, weil räumliche Spannungen durch die Tandem-Ligation auftreten (Chartron et al., 2006). Möglicherweise führt der Austausch eines Cystein-Liganden des Clusters im aktiven Zentrum von Hdr gegen CoM-S^- zu einer veränderten Cluster-Geometrie, wodurch sich das Mittelpunktspotential zu dem von CoM-Hdr verschiebt. Die elektronischen Eigenschaften von [Fe-S]-Zentren hängen stark von der Proteinumgebung ab (Beinert et al., 1997). Durch das Fehlen anderer Untereinheiten bei isoliertem HdrB, könnte dieser Zustand artifiziell stabilisiert sein, wodurch die Zugabe von CoM-SH nur einen kleinen Effekt hat, der sich zwar im Potentialunterschied, nicht aber in den *g*-Werten ausdrückt, wenn man oxidiertes HdrB in An- und Abwesenheit mit CoM-Hdr vergleicht.

Die EPR-spektroskopischen Analysen der HdrB-Mutanten im reduzierten Zustand zeigten zudem, dass die C-terminale CCG-Domäne von HdrB auch für die Ausbildung des artifiziellen [2Fe-2S]-Zentrums verantwortlich ist. Wie bereits weiter oben angesprochen wird dieses als Artefakt der Rekonstitution angesehen, könnte jedoch auch ein Biosynthese-Intermediat oder Abbauprodukt des [4Fe-4S]-Zentrums sein (Beinert et al., 1997).

Mutation der beiden nicht-konservierten Cystein-Reste in HdrB (C283S/C289S) führte zu einer leicht reduzierten Intensität des EPR-Signals mit g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950. Die durch die Mutationen verursachten leichten Konformationsänderungen könnten das [4Fe-4S]-Zentrum destabilisiert haben. Da die Reste C283 und C287 nicht in HdrB-Untereinheiten aus anderen Methanogenen konserviert sind, erscheint es unwahrscheinlich, dass diese Reste als Liganden des Clusters fungieren.

Da die Cys-zu-Ser-Mutationen in HdrB keinen Einfluss auf das EPR-Signal im oxidierten Zustand zeigten, kann ausgeschlossen werden, dass die N-terminale CCG-Domäne einen zusätzlichen [Fe-S]-Cluster bindet. Dieser müsste zudem absolut identische EPR-Eigenschaften wie das von der C-terminalen CCG-Domäne gebundene [4Fe-4S]-Zentrum besitzen. Auch wurde bei CoM-Hdr niemals eine Spinkonzentration von über 1 mol pro mol Enzym gemessen (Madadi-Kahkesh et al., 2001). Zink-K-Schalen-

Röntgenabsorptions-Spektroskopie (XAS) zeigte hingegen das Vorhandensein einer isolierten Zink-Stelle im HdrABC-Holoenzym. Mit Messungen an gereinigtem HdrB konnte gezeigt werden, dass diese Zinkstelle in HdrB lokalisiert ist. Für HdrABC und HdrB war die Koordinations-Umgebung des Zinks identisch. In beiden Fällen wurden drei Schwefel-Liganden und ein Stickstoff- oder Sauerstoff-Ligand ermittelt, was einer $S_3(N/O)_1$-Koordinierung entspricht. Die leichten Rückstreuer Stickstoff und Sauerstoff lassen sich bei dieser Methode nicht eindeutig unterscheiden (Vallee & Auld, 1990). Da die konservierten Cysteinyl-Reste aus der C-terminalen Domäne an der Koordination des [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt sind, wird vorgeschlagen, dass mindestens zwei Cysteinyl-Reste aus der N-terminalen CCG-Domäne an der Bindung des Zinks beteiligt sind. Die EXAFS-Daten lieferten zudem Hinweise, dass es sich bei dem N/O-Liganden um den Imidazol-Rest eines Histidins handeln könnte (Daten nicht gezeigt). In einem Sequenzvergleich von CCG-Domänen-Proteinen konnte His121 in HdrB aus *Mth. marburgensis* als Kandidat identifiziert werden. Da isoliertes HdrB selbst keine enzymatische Aktivität zeigt, und Hdr für Methanogene essentiell ist, wurde von einer Mutagenese vorerst abgesehen.

Bei den bislang charakterisierten Zink-Stellen werden katalytische, co-katalytische, strukturelle und Protein-verbindende Zink-Stellen unterschieden. Katalytische Zink-Stellen sind direkt an der Bildung oder Auflösung kovalenter Bindungen beteiligt. In Multi-Zink/Metall-Enzymen wirken die co-katalytischen Zink-Stellen zusammen, indem sie direkt oder indirekt die Konformation im aktiven Zentrum beeinflussen. Strukturelle Zink-Atome sind für die Erhaltung der Tertiär-Struktur eines Proteins analog zu Disulfid-Brücken wichtig. Protein-verbindende Zink-Stellen werden durch Liganden auf der Oberfläche von zwei Proteinen bereitgestellt. Als häufigste Liganden kommen die Aminosäuren His, Glu, Asp und Cys vor (Auld, 2001). In Methanol:Coenzym M-Methyltransferase (Mta) aus methanogenen Archaea agiert die Zink-Stelle in Untereinheit MtaA als Lewis-Säure und aktiviert CoM-SH für den nukleophilen Angriff auf das zweite Substrat, welches eine Methylgruppe trägt (Gencic et al., 2001; Krüer et al., 2002). Ein weiteres CoM-SH-abhängiges Enzym ist Epoxyalkan:Coenzym M-Transferase aus Bacteria (Boyd & Ensign, 2005). Hier wird ebenfalls CoM-SH Zn-abhängig aktiviert, um in diesem Fall den Epoxid-Ring des Substrats zu öffnen (Boyd & Ensign, 2005; Ensign & Allen, 2003). Interessant ist, dass diese Enzyme CoM-SH als Substrat nutzen, jedoch eine Zink-Koordinierung besitzen, die sich deutlich von der in Hdr unterscheidet. Zudem zeigten XAS-Messungen in dieser Arbeit, dass sich die Zink-Koordination von Hdr in

Anwesenheit von CoM-SH praktisch nicht ändert. Vorläufige XAS-Messungen mit CoM-SeH zeigten ebenfalls keine direkte Zn-Se-Interaktion, jedoch müssten diese Messungen wiederholt werden, da sich die Signale mit der Probenorientierung änderten, was auf eine inhomogene Probe hindeutet. In den letzten Jahren gab es Hinweise, dass Zink-Stellen mit mehreren Cys-Liganden nicht unbedingt strukturelle Zink-Stellen sein müssen (Penner-Hahn, 2007). Das Protein Ada aus *E. coli*, eine DNA-6-*O*-methylguanin:[Protein]-L-cystein-*S*-methyltransferase, ist ein Beispiel für ein Enzym, bei dem die Zn-Stelle an einem Alkyl-Transfer beteiligt ist und vier Cystein-Schwefel-Liganden besitzt (He et al., 2005). Hier wird ein Cystein-Rest aktiviert, so dass er als Cysteinat eine Methylgruppe nukleophil angreifen kann. XAS-Messungen an HdrB zeigten eine vorwiegende $S_3(N/O)_1$-Koordinierung. Es wäre durchaus denkbar, dass die Funktion der Zink-Stelle in Hdr bzw. HdrB die Aktivierung des Cysteinyl-Restes C231 in der C-terminalen CCG-Domäne ist. Jedoch könnten hier auch Aminosäure-Seitenketten beteiligt sein. In diesem Fall hätte die Zink-Stelle eine strukturelle Funktion. Wie die Mutagenese-Studien mit HdrB zeigten, ist Cysteinyl-Rest C231 vermutlich nicht an der Ligation des katalytischen [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt und könnte dann wie oben diskutiert das Substrat CoM-S-S-CoB nukleophil angreifen. Disulfide werden im Allgemeinen über nukleophile Substitutions-Reaktionen gespalten (Duin et al., 2002). Dabei würde CoB-SH freigesetzt und ein gemischtes Disulfid aus C231 und CoM-SH entstehen. Der Cluster könnte über ein eine Eisenstelle ligierende Cysteinat das gemischte Disulfid (Cys231-S-S-CoM) angreifen und dabei zum Austausch des ursprünglich [Fe-S]-Cluster gebundenen Cysteinat-Liganden durch CoM-S^- führen. Nach Protonierung von C231 würde dieses der Situation im Reaktionsintermediat CoM-Hdr entsprechen. Demnach würde nicht wie bei NEM-Ftr ein $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Zentrum mit fünffach-koordinierter Eisenstelle, sondern eine vierfach-koordinierte Eisenstelle des [Fe-S]-Clusters in CoM-Hdr vorliegen. Dieses könnte die bereits angesprochene geringere Anisotropie von CoM-Hdr (Bennati et al., 2004) im Vergleich zu NEM-Ftr und anderen $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Systemen erklären (Hedderich et al., 2005). Begünstigt durch die besondere Tandem-Ligation des Clusters könnte dann ein Ein-Elektronen-Transferschritt zum Ablösen des CoM-S^- vom Eisen führen und durch die dynamische Struktur des [Fe-S]-Clusters die Bindung des ursprünglichen Cysteinat-Liganden zur Folge haben. In ABBILDUNG 38 ist der postulierte Katalysemechanismus von Hdr dargestellt.

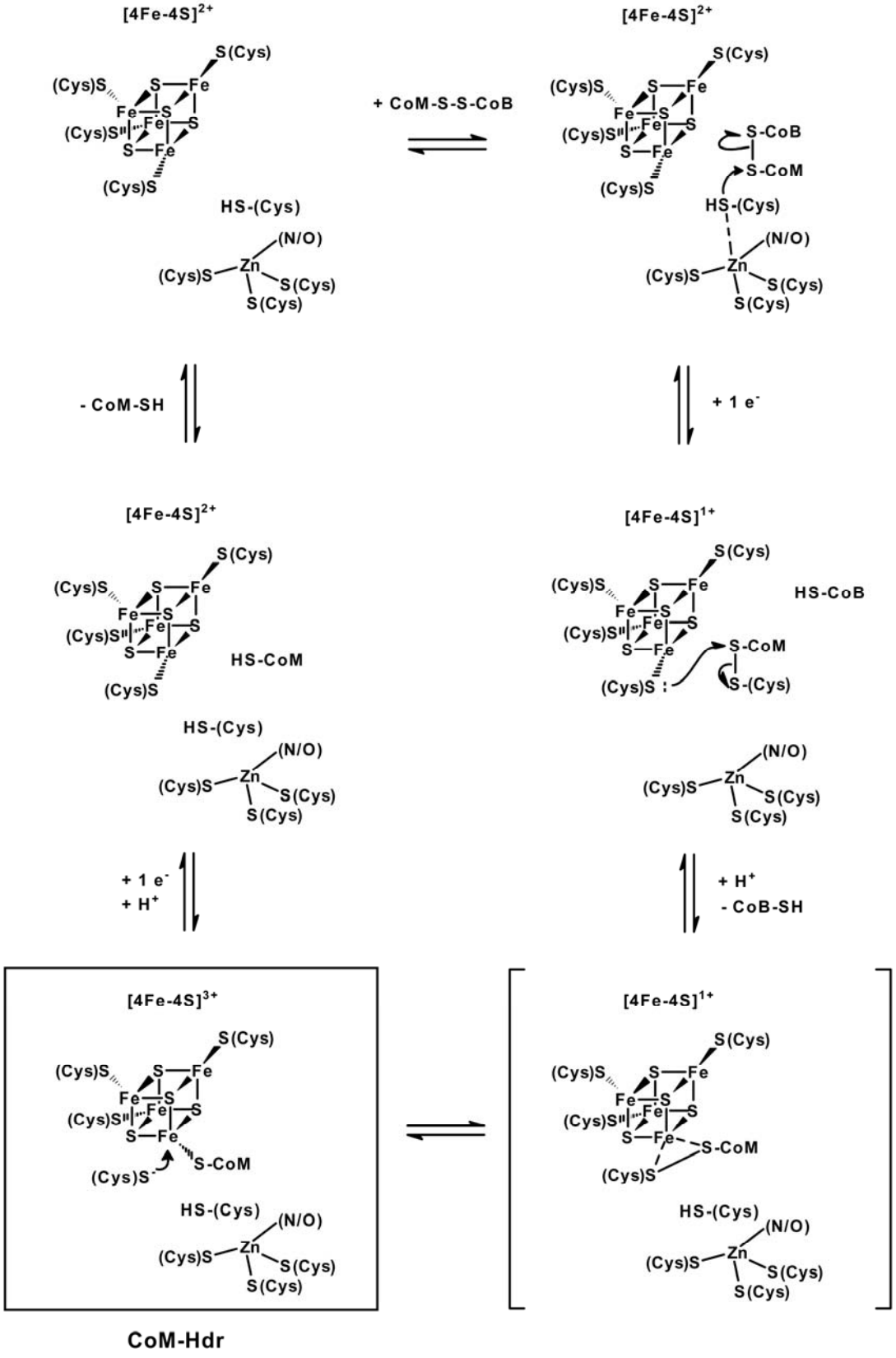

ABBILDUNG 38: Postulierter Katalysemechanismus von Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea.

5.2. Untersuchungen an heterolog produziertem SdhE

Nachdem die Arbeiten an HdrB aus *Mth. marburgensis* gezeigt hatten, dass die C-terminale CCG-Domäne ein [4Fe-4S]-Zentrum mit ungewöhnlichen Eigenschaften bindet, war es interessant, SdhE (früher SdhC) zu untersuchen. SdhE ist ein zu HdrB homologes Protein, welches in Succinat:Chinon-Oxidoreduktase (Sdh) vorkommt (Lemos et al., 2002). Sdh katalysiert die Zwei-Elektronen-Oxidation von Succinat zu Fumarat (Succinat → Fumarat + $2H^+$ + $2e^-$) gekoppelt mit der Zwei-Elektronen-Reduktion von Chinonen zu den entsprechenden Chinolen (Chinon + $2H^+$ + $2e^-$ → Chinol). Das Standard-Mittelpunktspotential des Succinat/Fumarat-Paares liegt bei $E°'$ = +33 mV (Thauer et al., 1977). Die Reaktion ist leicht reversibel und dadurch kann Sdh im aeroben und anaeroben Stoffwechsel Funktionen sowohl als Succinat:Chinon-Oxidoreduktase (Komplex II) als auch Chinol:Fumarat-Oxidoreduktase übernehmen.

Der Prototyp von Sdh ist aus vier Untereinheiten SdhABCD zusammengesetzt. Die cytoplasmatische Domäne, bestehend aus SdhA und SdhB, ist Ort der Succinat-Oxidation bzw. Fumarat-Reduktion. SdhA katalysiert diese Reaktion mittels des kovalent gebundenen Cofaktors Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Die Elektronen werden dann vom FAD über die SdhB-Untereinheit mit Hilfe der linear angeordneten $[2Fe\text{-}2S]^{1+,2+}$-, $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$- und $[3Fe\text{-}4S]^{0,+1}$-Zentren, bezeichnet als S1, S2 und S3, an die Membrandomäne weitergeleitet. Diese besteht aus den integralen Membranproteinen SdhC und SdhD, die an der Reduktion/Oxidation der in der Membran gelösten Chinone/Chinole beteiligt sind. Sdh wird anhand der Membrandomäne klassifiziert (Lancaster & Kröger, 2000; Lemos et al., 2002). Bei Typ A liefern die beiden Untereinheiten Liganden für zwei Häm-Gruppen. Bei Typ B sind ebenfalls zwei Häm-Gruppen gebunden, jedoch sind die Untereinheiten SdhC und SdhD zu einem Protein (SdhC) fusioniert. Typ C besitzt wie Typ A zwei hydrophobe Untereinheiten, allerdings wird nur eine Häm-Gruppe gebunden. Bei Typ D binden die zwei Membranuntereinheiten kein Häm. Sdh vom Typ E besitzt eine Membrandomäne, die aus den Untereinheiten SdhE und SdhF besteht, welche nicht homolog zu den Membranuntereinheiten SdhC und SdhD der Typen A-D sind. Deshalb wurde für diese eine neue Nomenklatur vorgeschlagen. Es wird angenommen, dass SdhE und SdhF ebenfalls als Membrananker dienen. SdhE (früher SdhC) besitzt wie HdrB zwei CCG-Domänen mit zweimal fünf Cysteinyl-Resten. Mit dem Programm TMHMM v 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) lassen sich in der SdhE-Sequenz keine signifikanten Transmembran-Helices identifizieren. Das Protein hat überwiegend

hydrophilen Charakter. SdhF (früher SdhD) ist ein ebenfalls hydrophiles Protein. Der genaue Mechanismus der Membranverankerung ist unklar, jedoch wurde postuliert, dass amphipathisch Helices von SdhE und SdhF hierbei beteiligt sind (Lemos et al., 2002). Analog zu SdhC und SdhD aus Sdh-Komplexen vom Typ A-D wird für SdhE und SdhF aus Typ E gefordert, dass diese Untereinheiten an der Chinon/Chinol Reduktion/Oxidation beteiligt sind (Lemos et al., 2002). Ein weiteres Merkmal von Sdh vom Typ E ist, dass die Untereinheit SdhB statt des $[3Fe\text{-}4S]^{0,+1}$-Zentrums (S3) einen $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$-Cluster (S3) bindet (Gomes et al., 1999).

Succinat-Dehydrogenase vom Typ E wurde bis jetzt nur aus der archaeellen Subdomäne Crenarchaeota gereinigt (Gomes et al., 1999; Iwasaki et al., 1995; Moll & Schafer, 1991). In einigen archaeellen Genomen liegen die Gene als *sdhABEF* geclustert vor (Crenarchaeota: *Acidianus ambivalens*, *Sulfolobus tokodaii*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus* P2; Euryarchaeota: *Picrophilus torridus*). Das Gen *sdhF* kommt nur in diesem Gencluster vor. Dieses spricht für eine spezifische, aber nicht essentielle Funktion, da einige Genome für Sdh vom Typ E codieren, wo *sdhF* fehlt. Die Gene *sdhABE* wurden auch in Genomen hauptsächlich bakterieller Genera wie z.B. *Aquifex*, *Campylobacter*, *Chlorobium*, *Geobacter*, *Synechocystis, Wolinella* identifiziert (www.tigr.org).

Für heterolog produziertes SdhE aus *Sulfolobus tokodaii* wurde gezeigt, dass das so produzierte Protein ein [2Fe-2S]-Zentrum (Zentrum C) enthielt, dass nach Natrium-Dithionit-Reduktion zerfiel (Iwasaki et al., 2002). Da die beschriebenen Eigenschaften von SdhE denen von in dieser Arbeit produziertem HdrB ohne Rekonstitution ähnelten, wurde das für HdrB optimierte Protokoll zur heterologen Produktion in *E. coli* und *In-vitro*-Rekonstitution des [4Fe-4S]-Zentrums (siehe oben) für SdhE aus *S. solfataricus* P2 verwendet. SdhE veränderte durch die Rekonstitution seine chromatographischen Eigenschaften signifikant. Nach Rekonstitution konnte SdhE nicht mehr an das Anionen-Austauscher-Material (Q-Sepharose) binden. Das Protein wurde aus dem Durchfluss isoliert. UV/Vis-spektroskopische Messungen deuteten auf das Vorliegen eines stabilen [4Fe-4S]-Zentrums nach Rekonstitution hin.

EPR-spektroskopische Untersuchungen an heterolog produziertem SdhE nach Rekonstitution ergaben ein rhombisches Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947, welches den Signalen von CoM-Hdr (g_{zyx} = 2,013, 1,991 und 1,938) und Durochinon-oxidiertem HdrB nach Rekonstitution (g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950) sehr ähnlich war. Bei rekonstituiertem SdhE konnten Spinkonzentrationen von bis zu 70% erreicht werden.

Dieses war ein erster Hinweis, dass das CCG-Domänen-Protein SdhE wie HdrB einen ungewöhnlichen [4Fe-4S]-Cluster bindet. Es wird hier die Bezeichnung S4 in Anlehnung an die Standard-Nomenklatur für Sdh vorgeschlagen (siehe oben).

Interessanterweise konnte das EPR-Signal bei SdhE bereits nach dem Waschen mit anaerobem Puffer detektiert werden. Wie sich weiter zeigte, konnte in SdhE ohne Rekonstitution dieses Signal auch detektiert werden, wobei es hier deutlich schwächer war und Komponenten einer anderen Spezies unter dem Signal lagen. Damit wurde deutlich, das *E. coli* das vermutete [4Fe-4S]-Zentrum (S4) zumindest substöchiometrisch herstellen kann.

Weitere EPR-spektroskopische Messungen an rekonstituiertem SdhE zeigten zudem, das das Signal mit $g_{zyx} = 2{,}017$, 2,008 und 1,947 auch unter definierten Bedingungen wie nach Reduktion mit Natrium-Dithionit ($E°'$ = -511 mV; (Watt & Burns, 1975) oder Oxidation mit Durochinon ($E°'$ = +50 mV; (Dawson et al., 1987)) detektieren ließ. EPR-Redoxtitrationen zeigten ebenfalls, dass das EPR-Signal über einen weiten Potentialbereich detektierbar ist. Demnach kann die paramagnetische Spezies in SdhE im physiologischen Redox-Bereich nicht reduziert werden. Dieses spricht für eine strukturelle Rolle des möglichen [4Fe-4S]-Zentrums in SdhE.

Messungen bei verschieden Temperaturen zeigten, dass weitere paramagnetische Spezies unter dem rhombischen Haupt-Signal lagen. Vermutlich handelte es sich wie bei HdrB um stabile [Fe-S]-Zentren, die bei der Rekonstitution als Artefakt entstanden waren. Die Zugabe von einem Überschuss an Natrium-Dithionit zu SdhE führte zum Verschwinden der substöchiometrischen Anteile des [2Fe-2S]-Zentrums. Das EPR-Signal mit $g_{zyx} = 2{,}017$, 2,008 und 1,947 war bei gemessenen Temperaturen von 9 K bis 173 K detektierbar. Da im Fall von CoM-Hdr davon ausgegangen wird, dass die paramagnetische Spezies in der oxidierten Form vorliegt.

EPR-Messungen an ^{57}Fe-angereichertem SdhE zeigten eine Verbreiterung des EPR-Signals (g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947). Der Anstieg der Linienbreite beruht hierbei auf nicht aufgelösten Hyperfeinkopplungen mit dem Kernspin von ^{57}Fe (I = ½). Damit ist das Signal Eisen-basiert. Dieses untermauert die Annahme, dass es sich bei der paramagnetischen Spezies um ein [Fe-S]-Zentrum handelt.

Mit ^{57}Fe-angereichertem SdhE durchgeführte ENDOR-spektroskopische Messungen ergaben zudem das Vorliegen einer Spezies mit sehr ähnlichen elektronischen und strukturellen Eigenschaften wie von HdrB. Auch wenn die ^{57}Fe-Doublets noch nicht eindeutig zugewiesen werden konnten, ist dieses ein weiteres starkes Argument für das

Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums (S4) im Falle von SdhE. Möglicherweise sind die gleichen Cysteinyl-Reste aus der C-terminalen CCG-Domäne an der Ligation des Clusters beteiligt wie bei HdrB (siehe oben).

Das in dieser Arbeit erhaltene EPR-Signal von SdhE mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 war auch im Spektrum von gereinigtem SdhABEF-Komplex nach Reduktion mit Succinat detektiert worden (Iwasaki et al., 2002; Iwasaki et al., 1995). Beim Succinat-reduzierten SdhACEF-Komplex wurde ein komplexes Spektrum erhalten, welches wahrscheinlich eine Überlagerung der Signale des [4Fe-4S]-Zentrums (S4) in SdhE und des $[2Fe\text{-}2S]^{1+}$-Zentrums (S1) in SdhB ist. Die klassischen $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$-Cluster (S2 und S3) in SdhB sind unter diesen Bedingungen nicht detektierbar (Schäfer et al., 2002). Bisher wurde angenommen, dass die Signale von dem [2Fe-2S]-Zentrum in SdhB (S1) und SdhE (Zentrum C) stammten. Das in dieser Arbeit für isoliertes SdhE gefundene EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 erlaubte damit eine neue Interpretation der für Succinat-reduzierte Sdh vom Typ E beschriebenen Spektren. Es zeigt zudem, dass der von SdhE gebundene ungewöhnliche [4Fe-4S]-Cluster (S4) durch Zugabe des Substrats Succinat nicht reduziert werden kann, was für eine strukturelle Rolle des Clusters spricht. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass der physiologische Elektronenakzeptor Caldariellachinon ($E°'$ = +103 mV; (Anemüller & Schäfer, 1990)) nicht von dem [4Fe-4S]-Cluster (S4) in SdhE, sondern vom dem an die Membran-Domäne grenzenden [4Fe-4S]-Zentrum (S3) in SdhB reduziert wird. Chinol:Fumarat-Oxidoreduktase (Sdh vom Typ D) aus *E. coli* besitzt ebenfalls keine Häm-Gruppen in der Membrandomäne (Iverson et al., 1999). Hier finden sich jedoch entsprechend den Häm-Gruppen Chinon-Bindestellen in SdhC. Die Elektronen für die Reduktion des Chinons an der zum Cytoplasma orientierten Chinon-Bindestelle liefert der angrenzende [3Fe-4S]-Cluster (S3) in SdhB. Es konnte gezeigt werden, dass gereinigte Sdh von Typ E Caldariellachinon bindet (Lemos et al., 2001). Somit könnte analog der bei Sdh vom Typ E vorhandene [4Fe-4S]-Cluster (S3) Caldariellachinon direkt reduzieren.

Für SdhE aus *S. tokodaii* konnte das Vorliegen einer isolierten Zink-Stelle mit $S_3(N/O)_1$-Koordinierung gezeigt werden. Dort wurde heterolog produziertes SdhE ohne Rekonstitution verwendet, bei dem ein labiles [2Fe-2S]-Zentrum gebunden vorliegt (Iwasaki et al., 2002). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass SdhE ohne Rekonstitution des [Fe-S]-Clusters das Zink in artifizieller Weise gebunden hatte, wurden XAS-Messungen an heterolog produziertem SdhE nach Rekonstitution durchgeführt. Auch hier wurde eine Zink-Stelle mit $S_3(N/O)_1$-Koordinierung erhalten. Demnach könnten die

Cysteinyl-Reste aus den CCG-Domänen auch bei SdhE an der Koordinierung der Zink-Stelle und des [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt sein.

Wie bereits angesprochen, wurde für heterolog produziertes SdhE aus *Sulfolobus tokodaii* gezeigt, dass das so produzierte Protein einen [2Fe-2S]-Cluster (Zentrum C) enthielt (Iwasaki et al., 2002). Das gezeigte UV/Vis-Spektrum war praktisch mit dem von in dieser Arbeit produziertem SdhE aus *Sulfolobus solfataricus* P2 ohne Rekonstitution identisch. Ebenso zerfiel das [2Fe-2S]-Zentrum (Zentrum C) von heterolog produziertem SdhE irreversibel nach Reduktion mittels Natrium-Dithionit (Iwasaki et al., 2002). In unbehandelten Proben des heterolog produzierten SdhE aus *S. tokodaii* (ohne Rekonstitution) wurde ein rhombisches EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,015, 2,00 und 1,947 sehr geringer Intensität gemessen (Iwasaki et al., 2002), welches dem in dieser Arbeit für SdhE nach Rekonstitution gefundenen EPR-Signal (g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947) sehr ähnlich ist. Für den g_y-Wert wurden in der Originalarbeit nur zwei Nachkommastellen angegeben. Das Signal war dort ebenfalls in mit Kaliumferricyanid ($K_3[Fe(III)(CN)_6]$) oxidierten Proben nicht detektierbar. Die EPR-Daten führten zu der Interpretation, dass es sich bei der paramagnetischen Spezies um ein [2Fe-2S]-Zentrum handelt. Weitere Messungen mittels UV/Vis-, Resonanz-Raman- und Circular-Dichroismus-Spektroskopie bestätigten das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums (Zentrum C) in SdhE (Iwasaki et al., 2002).

Das in dieser Arbeit heterolog produzierte und rekonstituierte SdhE wurde mit $K_3[Fe(III)(CN)_6]$ ($E°'$ = +420 mV; (Dawson et al., 1987)) oxidiert und lieferte ebenfalls kein EPR-Signal. Nach Oxidation mit Sauerstoff (Luft) ($E°'$ = +820 mV; (Thauer et al., 1977)) über Nacht war das Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 jedoch detektierbar. Dieses deutete darauf hin, dass das [Fe-S]-Zentrum nicht aufgrund des sehr positiven Redoxpotentials von Kaliumferricyanid, sondern wahrscheinlicher durch die Komplexierung von Eisenatomen aus dem Cluster zerstört wurde, da Sauerstoff-Oxidation mit einem deutlich höheren Redoxpotential weiterhin die Detektion des Signals erlaubte. [2Fe-2S]-Cluster sind nur im reduzierten Zustand paramagnetisch und mittels EPR-Spektroskopie detektierbar. Die Daten aus dieser Arbeit sprechen für eine oxidierte Spezies. Somit wurde das von Iwasaki *et al.* gezeigte EPR-Signal (Iwasaki et al., 2002) vermutlich von einem stabilen substöchiometrischen [4Fe-4S]-Zentrum verursacht.

Verschiedene spektroskopische Methoden hatten das Vorliegen eines [2Fe-2S]-Zentrums in unbehandeltem SdhE gezeigt (Iwasaki et al., 2002). Das in der Präparation hauptsächlich vorhandene [2Fe-2S]-Zentrum wurde vermutlich durch Behandlung mit einem Überschuss an Natrium-Dithionit zerstört und lieferte deshalb kein EPR-Signal.

XAS-Messungen zeigten, dass der reduktive Cluster-Abbau Fe^{2+} in wässrige Lösung entließ. Deshalb wurde das Vorliegen des [2Fe-2S]-Clusters als sekundäre Eisenquelle für die Biosynthese und/oder Reparatur von Eisen-bindenden Proteinen interpretiert (Li et al., 2003). Es ist fraglich, ob diese Interpretation aufrecht erhalten werden kann.

Für SdhE wurde zudem diskutiert, dass die Cysteinyl-Reste der CCG-Domäne eine Redox-Kaskade mit Sulfhydryl-Radikalen bilden könnten, die zur Reduktion von Caldariellachinon ($E°'$ = +103 mV; (Anemüller & Schäfer, 1990), dem physiologischen Elektronenakzeptor, führt (Schäfer et al., 2002). Für das Vorliegen eines Thiyl-Radikals (Iwasaki et al., 2002) gab es in dieser Arbeit keine Hinweise. Ebenso erscheint die Beteiligung der Cystein-Reste aus den CCG-Domänen in einer Thiol-Kaskade wie in Thioredoxin-gekoppelter Arsenat-Reduktase unwahrscheinlich (Messens & Silver, 2006; Messens et al., 2004). Aufgrund der Hinweise für das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Zentrums und einer Zink-Stelle in SdhE ist auch die Hypothese, dass die Cysteinyl-Reste Fettsäure-Reste zur Membranverankerung tragen könnten wenig plausibel (Iwasaki et al., 1995). In einem anderen Modell wurde davon ausgegangen, dass SdhE als monotopischer Membrananker fungieren könnte, indem die Proteinkette mit ihren Aminosäureresten amphipathische Helices bildet. Somit könnte eine hydrophobe Oberfläche von SdhE die Interaktion mit der Membran ermöglichen (Lemos et al., 2001). Dieses erscheint plausibler. Da sich die chromatographischen Eigenschaften bei Vorliegen des vermuteten [4Fe-4S]-Zentrums änderten und die paramagnetische Spezies im physiologischen Redox-Bereich nicht reduziert werden konnte, kann von einer strukturellen Rolle des Clusters ausgegangen werden. Es wäre denkbar, dass durch das [4Fe-4S]-Zentrum (S4) die räumliche Struktur von SdhE stabilisiert wird und die amphipathischen Helices von SdhE so angeordnet werden, dass die hydrophoben Bereiche für die Interaktion mit der Membran entsprechend orientiert sind. Die Cysteinyl-Reste der CCG-Domänen liegen zwischen den vorhergesagten amphipathischen Helices (Lemos et al., 2002). In einigen Fällen besaß gereinigte Sdh von Typ E nur geringe Succinat:Chinon-Oxidoreduktase-Aktivität (Schäfer et al., 2002). In diesen Fällen war auch der neue Cluster S4 schlecht detektierbar. Möglicherweise war dieser bei der Reinigung zerfallen und spielt eine Rolle für die Konformation der Chinon-Bindestelle(n). Die Zink-Stelle in SdhE könnte ebenfalls strukturelle Aufgaben besitzen. Das monotopische Membranprotein Elektronen-Transfer-Flavoprotein:Chinon-Oxidoreduktase bindet FAD und ein [4Fe-4S]-Zentrum, dessen Rolle im Elektronen-Transport analog zu SdhE nicht geklärt ist (Zhang et al., 2006).

5.3. Vergleich von HdrB und SdhE

Die Sequenzidentität von HdrB aus *Mth. marburgensis* (302 Aminosäurereste) und SdhE aus *S. solfataricus* P2 (290 Aminosäurereste) beträgt 30%. Die Sequenzähnlichkeit liegt bei 45%. SdhE und HdrB zeigten vor und nach Rekonstitution sehr ähnliche UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften. EPR-Spektroskopische Messungen ergaben für Durochinon-oxidiertes HdrB und SdhE in einem weiten Potentialbereich sehr ähnliche rhombische EPR-Signale (g_{zyx} = 2,015, 1,995 und 1,950 bzw. g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947). ENDOR-Spektroskopie zeigte das Vorliegen eines [4Fe-4S]-Clusters in HdrB. Die sehr ähnlichen elektronischen Eigenschaften von SdhE lassen hier den selben Cluster-Typ vermuten. XAS-Messungen ergaben für HdrB und SdhE eine isolierte Zink-Stelle mit nahezu identischer $S_3(N/O)_1$-Koordinierung. Neben diesen Gemeinsamkeiten zeigten die beiden CCG-Domänen-Proteine auch Unterschiede. SdhE änderte im Gegensatz zu HdrB nach Rekonstitution seine chromatographischen Eigenschaften signifikant.

Auch zeigte das EPR-Signal von SdhE mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 verändertes Mittelpunktpotential des Clusters. Das EPR-Signal von SdhE konnte bei sehr niedrigen Redoxpotentialen in Natrium-Dithionit-reduzierten Proben genauso wie nach Sauerstoff-Oxidation detektiert werden. Das von HdrB gebundene [4Fe-4S]-Zentrum besitzt ein Mittelpunktspotential, das in Gegenwart von CoM-SH bei -175 ± 10 mV liegt. In Sauerstoff-oxidierten Proben war das Signal nicht detektierbar. Der weite Potentialbereich, in dem das EPR-Signal mit g_{zyx} = 2,017, 2,008 und 1,947 von SdhE gemessen werden konnte, spricht gegen eine Elektronen-Transfer-Funktion. Zudem wich das EPR-Temperaturverhalten von dem ab, welches bei CoM-Hdr, HdrB und paramagnetischen Spezies in verwandten Komplexen gefundenen wurde (siehe unten). *Sulfolobus*-Spezies sind thermophile Aerobier, die in heißen Schwefelquellen vorkommen (Huber & Prangishvili, 2006). Auch wenn in diesen Habitaten weniger Sauerstoff als in mesophilen Bereichen gelöst vorliegen kann, so könnte die Sauerstoff-Toleranz des Clusters eine Anpassung an den Lebensraum darstellen. Im Gegensatz dazu konnte für HdrB nach Sauerstoff-Oxidation kein EPR-Signal detektiert werden, was auf einen Zerfall des Clusters hindeutet. Da von einer $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Spezies ausgegangen wird, ist eine weiter Oxidation schwer vorstellbar. Jedoch wurde nicht untersucht, ob die Sauerstoff-Oxidation reversibel ist. HdrB stammt aus strikt anaeroben methanogenen Archaea. Für isolierte Hdr konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Enzym Sauerstoff-labil ist, und die Aktivität bei Sauerstoff-Exposition verloren geht (Hedderich, 1990).

SdhE ist in Bezug auf HdrB interessant, weil zum einen für SdhE ein neuer Mechanismus der Membranverankerung vorgeschlagen wurde, bei dem SdhE als monotopischer Membrananker fungiert (Lemos et al., 2001). Für HdrB wurde kürzlich ein Modell vorgeschlagen, wonach HdrB ein integrales Membranprotein ist und den H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplex zum Zwecke der Energiekonservierung an die cytoplasmatische Membran bindet (Fricke et al., 2006). Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass Hdr-Aktivität bei milden Aufschlussverfahren zu einem großen Teil Membran-assoziiert vorliegt (Dybas & Konisky, 1992; Setzke et al., 1994). Thiol:Fumarat-Oxidoreduktase aus methanogenen Archaea wurde ebenfalls aus der löslichen Fraktion gereinigt (Heim et al., 1998). Inwieweit eine Membranassoziation von Tfr vorliegt, ist nicht bekannt. Auch im Fall von Hdr könnte ein SdhE-ähnlicher Mechanismus der Membran-Verankerung genutzt werden, wie er für weitere Enzyme mit HdrB-Homologen Untereinheiten, die CCG-Domänen besitzen, vorgeschlagen wurde (siehe 5.4.2). Hdr lässt sich aus der löslichen Fraktion reinigen, wohingegen Sdh von Typ E mit Detergenzien solubilisiert werden muss. Die reduzierte Anzahl vorhergesagter amphipathischer Helices bei HdrB im Vergleich zu SdhE (Lemos et al., 2002), könnten die schwächere Membranassoziierung von Hdr erklären. Bislang ist die Rolle von HdrA außer dem vorgeschlagenen Elektronentransport vom Hydrogenase-Subkomplex zu HdrC als Elektronen-Transfer-Untereinheit, die Elektronen zur Reduktion des katalytischen [4Fe-4S]-Clusters in HdrB liefert, völlig unbekannt (Stojanowic et al., 2003). Somit könnte auch HdrA über einen neuartigen Mechanismus an der Membranverankerung des H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplexes beteiligt sein. HdrA besitzt neben vier [4Fe-4S]-Zentren ein Bindemotiv für Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Bei dem Regulator-Protein NifL findet eine Membranassoziation statt, wenn FAD reduziert wird (Klopprogge et al., 2002). Die Untereinheit HdrA fehlt bei Hdr vom *Ms. barkeri*-Typ, wo die Membranverankerung offensichtlich vom *b*-Typ-Cytochrom HdrE übernommen wird, die wiederum in Hdr vom *Mth. marburgensis*-Typ fehlt.

Zudem ist der mögliche phylogenetische Zusammenhang zwischen Sdh vom Typ E, Tfr und Hdr interessant. Wie das Schema in ABBILDUNG 39 zeigt, besitzen Hdr, Sdh, und Tfr Untereinheiten mit Sequenzverwandtschaft, was den modularen Aufbau widerspiegelt.

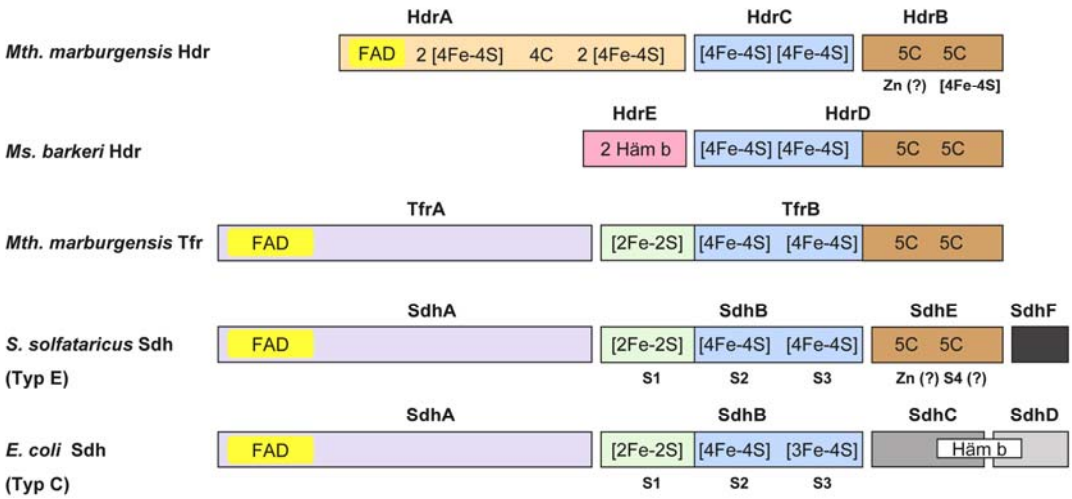

ABBILDUNG 39: Schematischer Sequenzergleich von Heterodisulfid-Reduktase (Hdr), Thiol:Fumarat-Reduktase (Tfr) und Succinat:Chinon-Oxidoreduktase (Sdh) vom Typ E und C. [4Fe-4S], [4Fe-4S]-Zentrum; [2Fe-2S], [2Fe-2S]-Zentrum; [3Fe-4S], [3Fe-4S]-Zentrum; FAD, Flavinadenin-dinukleotid; 4C, Sequenzmotiv aus vier Cysteinyl-Resten; 5C, CCG-Domäne (Sequenzmotiv aus zweimal fünf Cysteinyl-Resten); Häm *b*, Häm-Gruppe vom *b*-Typ; S1-S3, [Fe-S]-Zentren von Sdh. Für HdrB wurde gezeigt, dass die C-terminale CCG-Domäne (5C) einen ungewöhnlichen [4Fe-4S]-Cluster bindet. Es wird vorgeschlagen, dass die C-terminale CCG-Domäne (5C) von SdhE einen ähnlichen [4Fe-4S]-Cluster (S4) bindet. Die N-terminale CCG-Domäne könnte an der Koordinierung der Zink-Stelle beteiligt sein. Sequenzverwandte Bereiche sind in gleicher Farbe dargestellt.

Nimmt man an, dass ursprüngliche Lebensformen einen von Eisen und Schwefel dominierten Stoffwechsel besaßen, so wäre denkbar, dass Thiol-Reduktion und Disulfid-Oxidation katalysiert durch Protein-gebundene [Fe-S]-Zentren eine wichtige Rolle spielten, wie es bei der heutigen Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) und Thiol:Fumarat-Reduktase (Tfr) der Fall ist. Ein HdrC-Vorläufer könnte im Katabolismus Elektronen von Hydrogenasen und Dehydrogenasen zu einem CCG-Domänen-Protein mit Disulfid-Reduktase-Aktivität transportiert haben. Das gleiche Modul könnt dann zur Oxidation der Thiole gedient haben, wobei die Elektronen über ein [2Fe-2S]-Ferredoxin an den Vorläufer von TfrA gelangten, um Fumarat zu Succinat im Anabolismus zu reduzieren. Aus dem Vorläufer von löslicher Ftr könnte ein Membran-assoziierter Komplex entstanden sein, der statt der Thiole Membran-gebundene Elektronen-Überträger (z.B. Chinole) oxidierte und die Elektronen zur Fumarat-Reduktion nutzte. Später als ein organotropher Stoffwechsel möglich war, wurde die entgegengesetzte Reaktion genutzt, um die Reduktionsäquivalente aus der Succinat-Oxidation auf den Membrangelösten Chinon-Pool zu übertragen. Diese entspricht Sdh vom Typ E. Durch Austausch der Membrandomäne gegen SdhCD mit zwei Häm-Gruppen, die vom einem Vier-Helix-Bündel gebundenen werden, entstand Sdh vom

Typ A. Das dem Cluster S3 entsprechende [4Fe-4S]-Zentrum wurde durch Verlust eines Cysteinyl-Restes zu einem [3Fe-4S]-Cluster, den man heute in Sdh der Typen A – D findet. Verlust von einer oder beiden Häm-Gruppen und Fusion der Membranproteine SdhC und SdhD führte zusätzlich zu den heute bekannten Sdh-Typen B, C und D. Auf der anderen Seite gingen aus dem ursprünglichen Disulfid-Reduktase-Modul durch Assoziation mit Hydrogenase und HdrA bzw. dem *b*-Typ-Cytochrom als Elektronen liefernde Module die heutigen Heterodisulfid-Reduktase-Typen hervor. Genom- und Metagenom-Studien liefern auf Sequenzebene weitere interessante Kombinationen von HdrB-Homologen und Komponenten mit funktioneller Diversität (Erkel, 2004; Erkel et al., 2006; Moreira et al., 2004). Heute findet man in zahlreichen phylogenetischen Gruppen Hdr-Homologe und Proteinkomplexe, bei denen die Funktion der CCG-Domänen bislang unbekannt ist. Ausgewählte Beispiele werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.4. Mögliche Funktionen weiterer CCG-Domänen-Proteine

Zahlreiche archaeelle und bakterielle Genome kodieren für CCG-Domänen-Proteine (Hedderich et al., 2005). In Eukarya wurden bislang keine Beispiele für CCG-Domänen-Proteine gefunden. Durch die rapide steigende Anzahl von sequenzierten Genomen (www.tigr.org; www.jgi.doe.gov; www.genomesonline.org) und Metagenomprojekten (Rusch et al., 2007; Venter et al., 2004) lagen zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit 1399 Einträge für CCG-Domänen-Proteine in der Pfam-Datenbank (Zugangsnummer PF02754) vor (Mulder et al., 2007). Eine Beschränkung auf phylogenetische Gruppen innerhalb der Bacteria und Archaea ist nicht erkennbar. Im Gegensatz zu Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea sind die genauen Funktionen der CCG-Domänen-Proteine nicht bekannt. In einigen Organismen gibt der genomische Kontext Hinweise zur möglichen Funktion von CCG-Domänen-Proteinen. Es wird postuliert, dass CCG-Domänen-Proteine außerhalb der methanogenen Archaea entweder in Anlehnung an HdrB/HdrD katalytische Funktionen besitzen, oder aber wie SdhE primär der Membranverankerung dienen und die Verbindung zu in der Membran gelösten Elektronenüberträgern herstellen.

5.4.1. CCG-Domänen-Proteine mit möglicher katalytischer Funktion

Hdr-ähnliche Proteine im Schwefel-Katabolismus

Aus Sulfat-reduzierenden Mikroorganismen wurden Membran-gebundene Proteinkomplexe gereinigt und charakterisiert, die zu HdrD aus *Methanosarcina*-Spezies homologe Untereinheiten enthalten (Hedderich et al., 2005; Matias et al., 2005). Es handelt sich um den Hme-Komplex aus *Archaeoglobus*-Spezies (Mander et al., 2002; Mander et al., 2004) und den zu Hme homologen Dsr-Komplex aus *Desulfovibrio desulfuricans* (Pires et al., 2006) sowie Tmc-Komplex aus *Desulfovibrio vulgaris* (Pereira et al., 2006). Die Analyse der Genomsequenzen von Sulfatreduzierern (Drei Bacteria: *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Heidelberg et al., 2004), *Desulfovibrio desulfuricans* G20 (www.jgi.doe.gov) und *Desulfotalea psychrophila* (Rabus et al., 2004); ein Archaeon: *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997)) zeigte, dass zu HdrE und HdrD homologe Untereinheiten in diesen Membran-gebundenen Komplexen konserviert sind. Es wird angenommen, dass diese Komplexe an der dissimilatorischen Sulfatreduktion beteiligt sind (Pereira, et al., 2006). Weitere funktionell verwandte Komplexe wurden auf Gen-Ebene in *Desulfovibrio*-Spezies identifiziert. Die Komplexe Hmc (Matias et al., 2002; Rossi et al., 1993) und TPII-c_3 (Valente et al., 2001) enthalten jeweils eine zu HdrE und HdrD homologe Untereinheit. Weitere hier nicht angesprochene Komplexe enthalten keine CCG-Domänen, jedoch zu anderen Hdr-Untereinheiten sequenzverwandte Proteine (z.B. HdrA) (Matias et al., 2005).

In allen untersuchten Organismen, die Sulfit (SO_3^{2-}) zu Sulfid (HS^-) reduzieren können, wurde auch dissimilatorische Sulfit-Reduktase nachgewiesen (Stahl et al., 2002). Das Enzym kommt ebenfalls in Schwefel-oxidierenden Bakterien wie *Thiobacillus denitrificans* und *Allochromatium vinosum* vor, wo es in die oxidative Richtung arbeitet, indem es die Oxidation von Sulfid zu Sulfit katalysiert (Pott & Dahl, 1998). Dissimilatorische Sulfit-Reduktase ist ein Tetramer und besteht aus zwei α–Untereinheiten (DsrA) und zwei β-Untereinheiten (DsrB). An der Sechs-Elektronen-Reduktion von Sulfit zu Sulfid ist ein mit einem [4Fe-4S]-Zentrum verbundenes Siro(häm)amid beteiligt. Der physiologische Elektronen-Donor (bzw. Akzeptor) ist unbekannt. Der $DsrA_2B_2$-Komplex aus *Desulfovibrio*-Spezies enthält zwei weitere als γ-Untereinheit (DsrC) bezeichnete Proteine. DsrC ist hier nur leicht mit dem Dsr-Tetramer assoziiert (Steuber et al., 1995). Gereinigte Sulfit-Reduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* enthält kein DsrC, jedoch wird es im Genom kodiert (Dahl et al., 1993). Die Funktion von DsrC ist bislang unbekannt. Die

Röntgen-Struktur wurde jedoch kürzlich gelöst und gab Hinweise für ein Redox-aktives Disulfid (Mander et al., 2005). Die für DsrA, DsrB und DsrC codierenden Gene liegen in *Allochromatium vinosum* mit weiteren offenen Leserahmen im *dsr*-Gen-Cluster (*dsrABEFHCMKLJOPNRS*) vor (Dahl et al., 2005). Eine vergleichende Genomanalyse führte zur Eingrenzung eines Sets an Genen (*dsrABCNMKJOP*), das in allen identifizierten Organismen vorkommt (Sander et al., 2006). Die Analysen von Deletionsmutanten der einzelnen *dsrMKJOP*-Gene zeigten, dass diese akkumulierten Schwefel nicht oxidieren konnten, was ein zusätzlicher Hinweis für die funktionelle Verknüpfung mit Sulfit-Reduktase ist, die von *dsrABC* codiert wird (Sander et al., 2006). Sequenzvergleiche zeigten, dass DsrN an der Biosynthese des Siro(häm)amids aus Sirohäm beteiligt sein könnte (Dahl et al., 2005). Die Gene *dsrMKJOP* kodieren für Untereinheiten, die homolog zu den oben genannten aus *Archaeoglobus*- und *Desulfovibrio*-Spezies gereinigten Komplexen (Hme, Dsr, Tmc) sind. Dieses ist ein weiteres Argument dafür, dass diese Komplexe an der dissimilatorischen Sulfatreduktion beteiligt sind. TABELLE 15 gibt Beispiele für verwandte Komplexe mit zu HdrE und HdrD homologen Untereinheiten.

TABELLE 15: Beispiele für HdrE- und HdrD-Homologe aus Membran-Komplexen von Sulfatreduzierern bzw. Schwefeloxidierern. Sofern Genomsequenzen vorliegen sind die Nummern der offenen Leserahmen (ORF) angegeben.

Komplex **Organismus**	**HdrE-Homolog** **(ORF)**	**HdrD-Homolog** **(ORF)**	**Referenz**
DsrMKJOP	DsrM	DsrK	(Dahl et al., 2005)
Allochromatium vinosum	-	-	
DsrMKJOP	DsrM	DsrK	(Dahl et al., 2005)
Chlorobium tepidum TLS	(CT_2244)	(CT_2243)	
DsrMKJOP	DsrM	DsrK	(Pires et al., 2006)
Desulfovibrio desulfuricans	-	-	
HmeABCDE	HmeC	HmeD	(Mander et al., 2002)
Archaeoglobus fulgidus	(AF_0501)	(AF_0502)	
HmeCD	HmeC	HmeD	(Mander et al., 2004)
Archaeoglobus profundus	-	-	
HmcABCDEF	HmcE (Orf5)	HmcF (Orf6)	(Rossi et al., 1993)
Desulfovibrio vulgaris Hildenborough	(DVU_0532)	(DVU_0531)	
TmcABCD	TmcC	TmcB	(Pereira et al., 2006)
Desulfovibrio vulgaris Hildenborough	(DVU_0265)	(DVU_0264)	

Zu den gereinigten Komplexen Hme, Dsr und Tmc liegen EPR-spektroskopische Daten vor. Sie enthalten zu HdrD homologe Untereinheiten. Aus *Archaeoglobus profundus* wurde zudem ein löslicher zu H_2:Heterodisulfid-Oxidoreduktase aus *Mth. marburgensis* homologer Komplex (Mvh:Hdl) gereinigt und charakterisiert (Mander et al., 2004), der dementsprechend eine zu HdrB homologe Untereinheit enthält. Ein Vergleich von *g*-Werten der oxidierten Proteinkomplexe, die CCG-Domänen-Untereinheiten besitzen, ist in TABELLE 16 gezeigt. Die aus den rhombischen EPR-Spektren ermittelten *g*-Werte sind sehr ähnlich zu den für CoM-Hdr erhaltenen Werten. Dieses legt nahe, dass in diesen Komplexen ebenfalls ein ungewöhnlicher $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$-Cluster vorliegt. Die paramagnetische Spezies wird bei diesen Komplexen im Gegensatz zu Hdr bereits nach Oxidation ohne Substratzugabe gebildet, was auch bei isoliertem HdrB der Fall ist. Die paramagnetischen Spezies zeigten ein ähnliches Temperaturverhalten wie CoM-Hdr. Das Mittelpunktspotential der paramagnetischen Spezies wurde nur für Hme aus *Archaeoglobus fulgidus* bestimmt und liegt hier bei +90 mV (Mander et al., 2002). Da die physiologischen Substrate der Komplexe Hme, Dsr und Tmc nicht bekannt sind, stellt sich die Frage, ob die Mittelpunktspotentiale nach Zugabe zu negativeren Werten ebenfalls verschoben werden, wie es für isoliertes HdrB in dieser Arbeit gefunden wurde.

TABELLE 16: Vergleich von *g*-Werten gereinigter Proteinkomplexe mit CCG-Domänen-Untereinheit im oxidierten Zustand.

Proteinkomplex	Organismus	g_{zyx}-Werte	Referenz
HdrABC[a]	*Mth. marburgensis*	2,013, 1,991, 1,938	(Madadi-Kahkesh et al., 2001)
HdrDE[a]	*Ms. barkeri*	2,018, 1,996, 1,954	(Madadi-Kahkesh et al., 2001)
HmeACDE	*Archaeoglobus fulgidus*	2,031, 1,994, 1,951	(Mander et al., 2002)
HmeCD	*Archaeoglobus profundus*	2,031, 1,995, 1,948	(Mander et al., 2004)
Mvh:Hdl	*Archaeoglobus profundus*	2,014, 1,939, 1,895	(Mander et al., 2004)
DsrMKJOP	*Desulfovibrio desulfuricans*	2,027, 1,994, 1,943	(Pires et al., 2006)
TmcABCD	*Desulfovibrio vulgaris*	2,023, 1,988, 1,938	(Pereira et al., 2006)

[a] Durochinon-oxidiert in Anwesenheit von CoM-SH (CoM-Hdr)

Hdr besitzt eine sehr hohe Substratspezifität. Die Homodisulfide von CoM-SH und CoB-SH, Cystin und oxidiertes Glutathion werden von Hdr nicht umgesetzt (Hedderich, 1990). Die Thiol-Coenzyme CoM-SH und CoB-SH aus methanogenen

Archaea liegen in Sulfat-reduzierenden Organismen nicht vor. CoM-SH wird wie oben angesprochen nur in wenigen bekannten Fällen von bakteriellen Spezies im Epoxyalkan-Stoffwechsel verwendet (Ensign & Allen, 2003). Aus diesem Grund müssen von den genannten Komplexen andere Substrate verwendet werden. Möglicherweise sind andere Thiole oder Protein-gebundene Redox-aktive Disulfide das Substrat von katalytischen CCG-Domänen-Proteinen aus Sulfatreduzierern wie z.B. DsrC.

Anhand eines vorgeschlagenen Modells soll die mögliche Rolle des zu HdrD homologen CCG-Domänen-Proteins HmeD aus dem HmeABCDE-Komplex von *Archaeoglobus fulgidus* verdeutlicht werden (Mander, 2002). Der Hme-Komplex ist Teil der Atmungskette bei Wachstum von *Archaeoglobus fulgidus* auf Laktat. Diese ist in ABBILDUNG 40 als vereinfachtes Schema gezeigt. *Archaeoglobus fulgidus* kann Laktat vollständig zu CO_2 oxidieren. Dabei anfallende Reduktionsäquivalente werden von Laktat-Dehydrogenase und $F_{420}H_2$:Menachinon-Oxidoreduktase auf den Membran-gelösten Menachinon-Pool übertragen, wobei Energie konserviert wird. Reduziertes Menachinon wird vom zu HdrE homologen *b*-Typ-Cytochrom HmeC oxidiert. Die Elektronen werden über zwei klassische $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$-Zentren im zu HdrC homologen Bereich an den über die C-terminale CCG-Domäne gebundenen [4Fe-4S]-Cluster transportiert und zur Reduktion von DsrC als mögliches Thiol-Substrat verwendet. Die Struktur von DsrC aus *A. fulgidus* zeigt ein mögliches Redox-aktives Disulfid (Mander et al., 2005; Weiss et al., 2004). Die Reduktion könnte über einen ähnlichen Mechanismus wie bei Hdr erfolgen. DsrC könnte dann die Elektronen an Sulfit-Reduktase liefern. Mit Hilfe der Röntgenstruktur von Sulfit-Reduktase, an der gearbeitet wird (Dr. Ulrich Ermler, persönliche Mitteilung), könnte eine mögliche Wechselwirkung mit DsrC über Modellierung Hinweise liefern. *In vitro* konnte dieses bis jetzt nicht gezeigt werden (Mander, 2002). Jedoch wäre auch ein alternativer Elektronenfluss von einem der klassischen $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$-Zentren über unbekannte Komponenten oder direkt zu den Enzymen der Sulfatreduktion möglich, wobei die CCG-Domänen dann nur ein Rudiment wären. Es wurde zudem vorgeschlagen, dass der Hme-Komplex über das *c*-Typ-Cytochrom HmeE mit Komponenten im Periplasma in Verbindung stehen könnte.

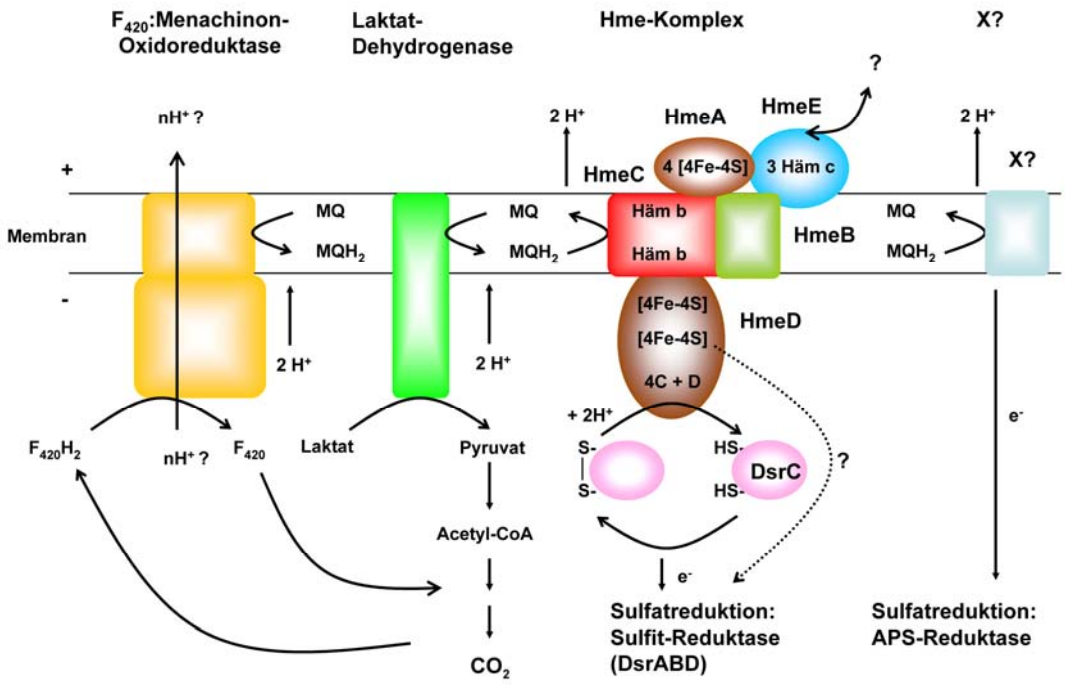

ABBILDUNG 40: Vorgeschlagenes Modell zur Atmungskette aus *A. fulgidus* bei Wachstum auf Laktat. Verwendete Abkürzungen: $F_{420}H_2$, reduziertes Coenzym F_{420}; MQ, modifiziertes Menachinon; MQH_2, reduziertes Menachinon; R-S-S-R, postuliertes Disulfid; R-SH, postuliertes Thiol. 4C + D, C-terminale CCG-Domäne, die vermutlich einen ungewöhnlichen [4Fe-4S]-Cluster bindet. ATPase ist nicht gezeigt. Weitere Erläuterungen im Text. Modifiziert nach (Mander, 2002).

Ein Sequenzvergleich von HdrD, HmeD, HmcF, TmcB und DsrK ist in ABBILDUNG 41 gezeigt. Die Cysteinyl-Reste der Bindemotive für klassische [4Fe-4S]$^{1+,2+}$-Zentren ($CX_2CX_2CX_3C(P)$) im HdrC entsprechenden N-terminalen Bereich sind in allen Proteinen konserviert (grüne Sterne). Die Cysteinyl-Reste in der N-terminalen (schwarze Sterne) und C-terminalen (rote Sterne) CCG-Domäne sind nur in HdrD aus *Ms. barkeri* vollständig konserviert. Zur besseren Erkennbarkeit sind Cysteine und entsprechende Aminosäuren zusätzlich gelb hinterlegt worden. Wegen des Fehlens einiger der konservierten Cysteinyl-Reste in der N-terminalen CCG-Domäne wird in der Literatur angegeben, dass nur eine CCG-Domäne (5C) vorliegt. In der Regel liegt die N-terminale Domäne jedoch auch vor, nur dass die Cysteinyl-Reste hier nur zum Teil konserviert sind. Oft sind hier die Cysteine gegen Aspartat oder Serin ausgetauscht. Diese sind potentielle Metall-Liganden. Zudem ist der in HdrD identifizierte Histidin-Rest (schwarzes Symbol #) in allen Proteinen konserviert. Dieses wirft die Frage auf, ob diese Proteine ebenfalls eine Zink-Stelle binden können, wie es in dieser Arbeit für SdhE und HdrB gezeigt wurde (vgl. 4.4.7) und für die N-terminale CCG-Domäne unter Beteiligung dieses Histidin-Restes (His121 in HdrB und SdhE) vorgeschlagen wird.

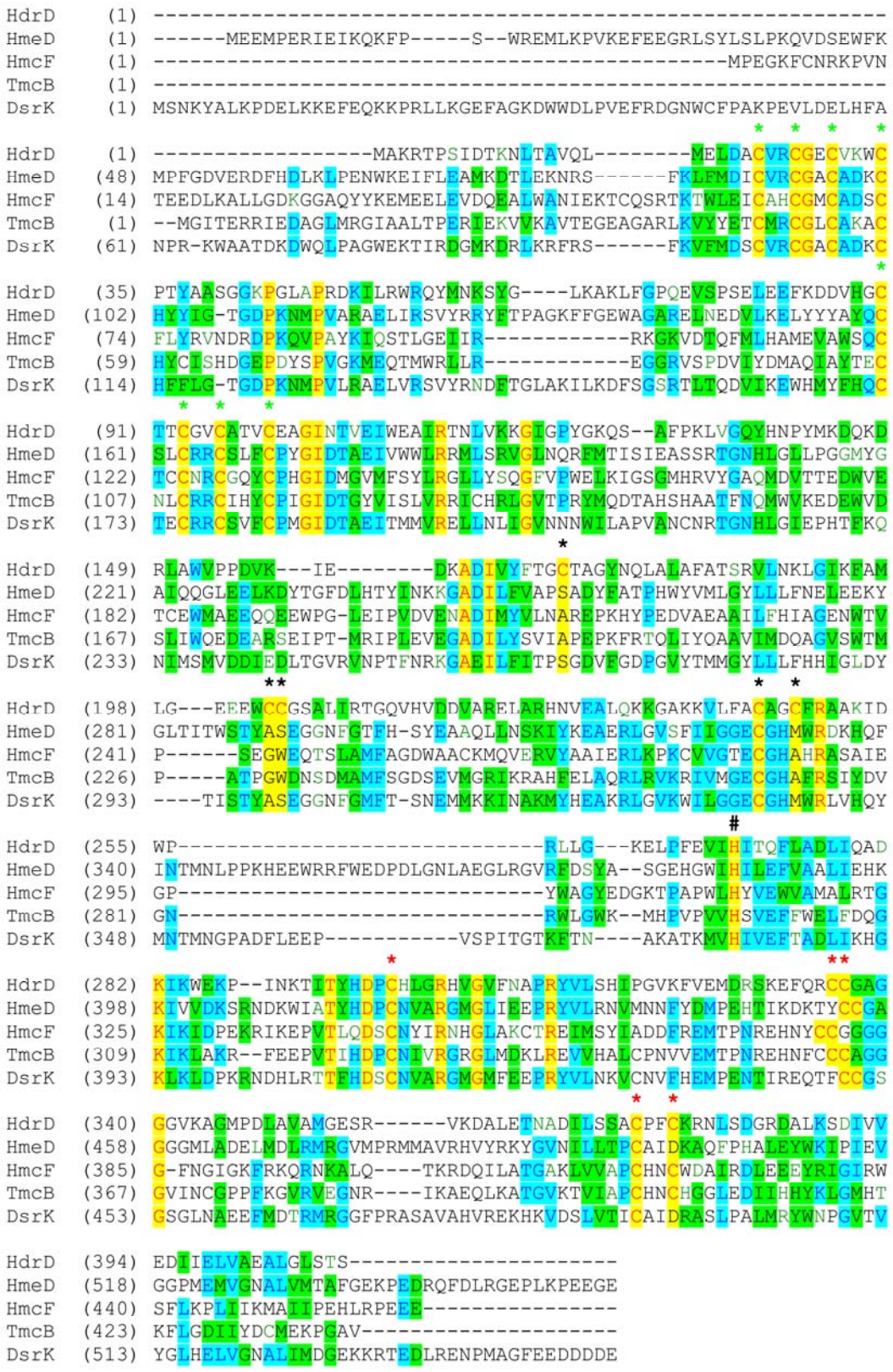

ABBILDUNG 41: Sequenz-Vergleich von CCG-Domänen-Proteinen. HdrD (*Ms. barkeri* Fusaro), HmeD (*A.. fulgidus*), HmcF (*D. vulgaris* Hildenborough), TmcB (*D. vulgaris* Hildenborough) und DsrK (*C. tepidum* TLS). Siehe auch TABELLE 15. Weitere Erklärungen im Text.

In der C-terminalen CCG-Domäne ist bei HmeD und DsrK zudem ein Cystein gegen Aspartat ausgetauscht (4C + D). Dieser Rest kann ebenfalls an der Koordinierung von [Fe-S]-Zentren beteiligt sein, wie es z.B. bei einigen SdhB-Untereinheiten der Sdh-Typen A und C der Fall ist (Lemos et al., 2002). Die Koordinierung des ungewöhnlichen [4Fe-4S]-Zentrums ist vermutlich eine konservierte Eigenschaft der C-terminalen CCG-Domäne.

Möglicher funktioneller Ersatz von Etf:Chinon-Oxidoreduktase

Bei einer weiteren Gruppe von CCG-Domänen-Proteinen mit möglicher katalytischer Funktion handelt es sich um putative Fusion aus HdrE und HdrD. Ein Beispiel ist MXAN_0286 aus dem δ-Proteobakterium *Myxococcus xanthus* DK1622 (Goldman et al., 2006). Im N-terminalen Bereich, der Sequenzähnlichkeit zu HdrE zeigt, lassen sich ebenfalls fünf Transmembran-Helices voraussagen. Vermutlich werden auch zwei Häm-Gruppen gebunden. Möglicherweise hieran beteiligte Histidin-Reste sind konserviert. Das Protein MXAN_0286 könnte so mit dem Membran-gebundenen Chinon-Pool verbunden sein. Der zu HdrC homologe zentrale Sequenzabschnitt zeigt zwei Bindemotive für klassische $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$-Zentren ($CX_2CX_2CX_3CP$), die potenziell am Elektronentransfer beteiligt sind. Der C-terminale Teil trägt zwei CCG-Domänen. Bei der N-terminalen CCG-Domäne ist ein Cys gegen ein Asn ausgetauscht ($CX_{34}CNX_{35}CX_2C$). In der C-terminalen CCG-Domäne sind fünf Cysteinyl-Reste konserviert ($CX_{35}CCX_{66}CX_2C$). Auffällig ist hier der relativ große Abstand von 66 Aminosäureresten zwischen den CC- und CX_2C-Motiven. Diese Besonderheit von MXAN_0286 könnte eine strukturelle Anpassung an das mögliche Substrat sein. Das für MXAN_0286 codierende Gen liegt nicht geclustert vor. Somit lassen sich keine Voraussagen zur Funktion machen. Das Gen Rv0338c aus *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998) codiert ebenfalls für eine putative HdrED-Fusion, die im C-terminalen Bereich eine Prolin-reiche Extension besitzt. Auch dieses könnte eine Anpassung an eventuell interagierende Proteine sein.

Weitere putative HdrED-Fusionen mit CCG-Domänen lassen sich in bakteriellen und archaeellen Genomen finden. Eine Genunterbrechungsmutante der putativen *hdrED*-Fusion in *ywjF* aus *Bacillus subtilis* besaß keinen veränderten Phänotyp unter den getesteten Bedingungen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Gen mit einem weiteren für eine Acyl-CoA-Dehydrogenase codierenden Gen (*acdA*) cotranskribiert wird.

Es wurde postuliert, dass die Elektronen aus der Oxidation von Acyl-CoA-Derivaten zu Enoyl-CoA-Derivaten über YwjF auf den Chinon-Pool übertragen werden könnten (Mander, 1999). Der möglicherweise auch hier von der C-terminalen CCG-Domäne koordinierte [4Fe-4S]-Cluster könnte Elektronen von AcdA aufnehmen und an der notwendigen Umschaltung von Zwei-Elektronen- auf Ein-Elektronen-Transfer beteiligt sein. Die Elektronen könnten dann weiter über die klassischen $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$-Zentren im zu HdrC homologen Bereich von YwjF zum zu HdrE homologen *b*-Typ-Cytochrom transportiert werden, von dem sie auf den Menachinon-Pool in der Membran übertragen werden. Es wäre auch denkbar, dass die Elektronen direkt von AcdA auf einen $[4Fe\text{-}4S]^{1+,2+}$-Cluster übertragen werden und der von der C-terminalen CCG-Domäne koordinierte [4Fe-4S]-Cluster nur rudimentär vorhanden ist. Damit könnte das Protein YwjF die Funktion des Elektronen-Transfer-Flavoproteins (Etf) (Crane & Beinert, 1956) und Etf:Chinon-Oxidoreduktase (Frerman, 1987) übernehmen. Das Genom von *Bacillus subtilis* codiert für beide Untereinheiten des Etf. Deshalb wäre auch eine Interaktion von YwjF und Etf denkbar. In diesem Fall würde YwjF als Etf:Chinon-Oxidoreduktase fungieren.

Die Beteiligung von HdrED-Fusionen an β-Oxidations-Reaktionen wurde bislang nicht gezeigt. In *Geobacter metallireducens* liegen zwei putative HdrED-Fusionen (*oxr*) mit Genen geclustert vor, die u.a. für putative Acyl-CoA-/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (*acd*), Enoyl-CoA-Hydratase (*ech*), Thiolase (*act*), Electron-Transfer-Flavoprotein (α- and β-Untereinheit von Etf, codiert von *etfAB*) codieren (Wischgoll et al., 2005). In der β-Oxidation übernimmt Etf Elektronen von Acyl-CoA-Dehydrogenasen, wobei letztere Doppelbindungen in den Acyl-Thioester von gesättigten Fettsäuren einfügen. Etf wird gewöhnlich von einer Membran-gebundenen Etf:Chinon-Oxidoreduktase reoxidiert (Frerman, 1987). Diese fehlt im Genom von *Geobacter metallireducens.* Es scheint, dass konventionelle Etf:Chinon-Oxidoreduktasen von putativen HdrED-Fusionen funktionell ersetzt werden, die auch in anderen Genomen mit EtfA/B-Untereinheiten assoziiert vorliegen wie z.B. SYN_2638 aus *Synthrophus aciditrophicus* SYN_2638 (McInerney et al., 2007). Ein hypothetisches Modell ist in ABBILDUNG 42 gezeigt.

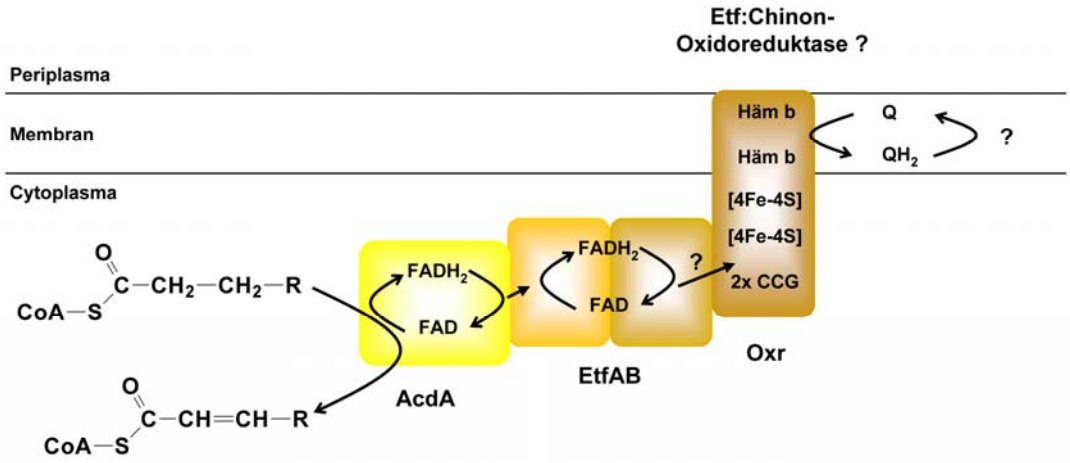

ABBILDUNG 42: Mögliche Funktion von putativen HdrED-Fusionen als Etf:Chinon-Oxidoreduktase. Der zu HdrE homologe Teil der putativen HdrED-Fusion (Oxr), ein *b*-Typ-Cytochrom, dient als Membrananker. Die cytoplasmatische Domäne trägt zwei klassische [4Fe-4S]-Zentren und zwei CCG-Domänen. Die C-terminale CCG-Domäne könnte wie in HdrB einen katalytischen [4Fe-4S]-Cluster binden. Die Acyl-CoA-Dehydrogenase AcdA oxidiert Acyl-CoA-Derivate zu Enoyl-CoA-Derivaten und koppelt dieses an die Reduktion von FAD zu $FADH_2$. Es findet ein Elektronen-Transfer zum Elektronen-Transport-Flavoprotein (EtfAB) statt. Von hier könnten die Elektronen über Oxr auf Chinon übertragen werden.

5.4.2. Membranverankerung durch CCG-Domänen-Proteine

Wie bereits angesprochen, wurde für Sdh vom Typ E vorgeschlagen, dass das CCG-Domänen-Protein SdhE als monotopischer Membran-Anker fungiert (Gomes, et al., 1999). Monotopische Proteine durchspannen die Membran im Gegensatz zu bitopischen und polytopischen Membranproteinen nicht vollständig, sondern sind auf einer Seite der Membran in dieser verankert (Blobel, 1980). Mittlerweile sind eine Reihe von Beispielen monotopischer Membranproteine bekannt (Bernstein et al., 2000; Chen et al., 1999; Johnson et al., 1998; Spencer et al., 1999). Als Mechanismus der Membranverankerung wird angenommen, dass hydrophobe Bereiche von amphipathischen Helices mit dem hydrophoben Kern der Membran interagieren, wobei positiv geladene Seitenketten der Helices in den Furchen der zur Membran parallel ausgerichteten Helices mit anionischen Lipiden über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren können. Die korrekte Faltung der α-Helices wird dabei nur in Gegenwart der anionischen Lipide erreicht (Bernstein et al., 2000).

Für die CCG-Domänen-Proteine SdhE, GlpC aus anaerober Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (Cole et al., 1988) und GlcF aus Glycolat-Oxidase (Pellicer et al., 1996) bzw. die Komplexe, in denen sie vorkommen, konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden,

dass diese Membran-gebunden sind. Bei GlpC und GlcF aus *E. coli* wird wie für SdhE angenommen, dass sie als Membrananker und bei der Interaktion mit dem Chinon-Pool eine Rolle spielen. Es handelt es sich um putative HdrCB Fusionen bzw. HdrD-Homologe mit zwei CCG-Domänen im C-terminalen Bereich. EPR-spektroskopische Daten liegen zu diesen Proteinen nicht vor. Bei CCG-Domänen-Proteinen ließen sich in Sequenzanalysen mit dem TMHMM-Agorithmus (v. 2.0) keine Membran-durchspannenden Elemente identifizieren (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/). Jedoch ergab die Darstellung der Sequenz mit dem Programm WinPep 2.0 (Hennig, 1999) mindestens drei amphipathische α-Helices, die nach dem oben angesprochenen Mechanismus bei der Verankerung in der Membran eine Rolle spielen könnten (Lemos et al., 2002). Für SdhE, GlpC und GlcF wird dieses als Hauptfunktion vermutet.

5.5. Ausblick

Produktion von isoliertem HdrB führte zur Identifizierung der katalytischen Untereinheit von Hdr, die einen [4Fe-4S]-Cluster trägt. Die laufende Auswertung von ENDOR- und Mössbauer-Studien werden weitere Hinweise auf die elektronische Struktur und Ligandierung des ungewöhnlichen Clusters geben. Zur weiteren Charakterisierung der Zink-Stelle von Hdr und Identifizierung der Liganden könnte das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zur heterologen Produktion von HdrB in *E. coli* genutzt werden. Die erzeugten Cys-zu-Ser-Mutanten sind hierfür weniger geeignet, da Serinat-Reste potenziell einen O-Liganden für das Zink bereitstellen könnten. Die Verwendung von Cys-zu-Ala-Mutanten erscheint sinnvoller. So mutiertes HdrB könnte mittels induktiv-gekoppelter Plasma-Atom-Emmisions-Spektrometrie auf den Zink-Gehalt untersucht werden. Mutanten, die kein oder weniger Zink binden, könnten dann mittels XAS-Messungen mit dem Wildtyp-HdrB verglichen werden.

Mittlerweile sind einige methanogene Archaea für genetische Arbeiten zugänglich. Im Falle von *Methanococcus voltae* zeigte sich jedoch, dass sich sowohl Hdr als auch rekombinantes HdrB relativ schlecht reinigen lassen. Deshalb sollten eher *Methanosarcina*-Spezies für *In-vivo*-Studien genutzt werden. Später wäre hier auch die heterologe Produktion des HdrABC-Komplexes aus *Mth. marburgensis* möglich, was Mutagenese-Studien ermöglichen könnte.Eine weitere wichtige Frage zu Hdr ist, ob und wie Hdr vom *Mth. marburgensis*-Typ an der Energiekonservierung beteiligt ist. Wie bereits erwähnt wird aus Genomanalyse und physiologische Untersuchungen an *Msp.*

stadtmanae eine Rolle in der Energiekonservierung gefordert. Es wurde ein Modell vorgeschlagen, wonach HdrB als integrales Membranprotein an der Protonentranslokation beteiligt sein könnte (Fricke et al., 2006). Hieran könnte auch HdrA beteiligt sein. Bei HdrA aus dem Hdr-Komplex vom *Mth. marburgensis*-Typ ist unklar, ob neben dem Elektronentransfer von der mit Hdr komplexierten F_{420}-nicht-reduzierenden Hydrogenase (Mvh) zu HdrC weitere Funktionen vorliegen. Es gibt Hinweise, dass HdrA einen Redox-aktiven Cysteinyl-Rest bzw. Disulfid trägt (Fomenko et al., 2007). Zudem ist in HdrA aus *Methanococcus*-Spezies ein Cystein gegen Selenocystein ausgetauscht (Wilting et al., 1997). Es wäre möglich, dass es sich bei HdrA um eine rudimentäre Untereinheit handelt, bei der die ursprüngliche Funktion verlorengegangen ist und diese nur noch am Elektronen-Transfer beteiligt ist. Wenn auch bei Methanogenen schwierig, könnten Mutagenese-Studien auf diese Fragen Antworten liefern.

Weiterhin ist auch die Funktion von Hdr-homologen CCG-Domänen-Proteinen in Sulfatreduzierern und bislang nicht gereinigten und charakterisierten putativen Proteinkomplexen aus Archaea und Bacteria sehr interessant. Neben der für SdhE vorgeschlagenen Funktion bei Membranverankerung und Interaktion mit dem Chinon-Pool in der Membran, könnten viele CCG-Domänen-Proteine auch katalytische Funktionen wie HdrB bzw. HdrD besitzen.

6. Literaturverzeichnis

Aasa, R., Vanngard, T. & Dunford, H. B. (1975). EPR studies on compound I of horseradish peroxidase. *Biochim Biophys Acta* **391**, 259-64.

Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U. & 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.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.

Anemüller, S. & Schäfer, G. (1990). Cytochrome aa_3 from *Sulfolobus acidocaldarius*. A single-subunit, quinol-oxidizing archaebacterial terminal oxidase. *Eur J Biochem* **191**, 297-305.

Argyrou, A. & Blanchard, J. S. (2004). Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**, 89-142.

Atkins, P. W. (1996). *The elements of physicalchemistry*, 2 edn. Oxford: Oxford university press.

Auld, D. S. (2001). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **14**, 271-313.

Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C. & Eddy, S. R. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**, D138-41.

Beinert, H. (2000). Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* **5**, 2-15.

Beinert, H. & Albracht, S. P. (1982). New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **683**, 245-77.

Beinert, H., Holm, R. H. & Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-9.

Beinert, H. & Thomson, A. J. (1983). Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. *Arch Biochem Biophys* **222**, 333-61.

Bennati, M., Weiden, N., Dinse, K. P. & Hedderich, R. (2004). ^{57}Fe ENDOR spectroscopy on the iron-sulfur cluster involved in substrate reduction of heterodisulfide reductase. *J Am Chem Soc* **126**, 8378-9.

Bernstein, L. S., Grillo, A. A., Loranger, S. S. & Linder, M. E. (2000). RGS4 binds to membranes through an amphipathic α-helix. *J Biol Chem* **275**, 18520-6.

Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1496-500.

Bobik, T. A. & Wolfe, R. S. (1989). An unusual thiol-driven fumarate reductase in *Methanobacterium* with the production of the heterodisulfide of coenzyme M and *N*-(7-mercaptoheptanoyl)threonine-*O*-3-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 18714-18718.

Boone, D. R., Whitman, W. B. & Rouvière, P. (1993). Diversity and Taxonomy of Methanogens. In *Methanogenesis*, pp. 35-80. Edited by J. G. Ferry. New York & London: Chapman & Hall.

Boyd, J. M. & Ensign, S. A. (2005). Evidence for a metal-thiolate intermediate in alkyl group transfer from epoxypropane to coenzyme M and cooperative metal ion binding in epoxyalkane:CoM transferase. *Biochemistry* **44**, 13151-62.

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.

Brereton, P. S., Duderstadt, R. E., Staples, C. R., Johnson, M. K. & Adams, M. W. (1999). Effect of serinate ligation at each of the iron sites of the [4Fe-4S] cluster of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin on the redox, spectroscopic, and biological properties. *Biochemistry* **38**, 10594-605.

Brochier, C., Forterre, P. & Gribaldo, S. (2004). Archaeal phylogeny based on proteins of the transcription and translation machineries: tackling the *Methanopyrus kandleri* paradox. *Genome Biology* **5**, R17.1-12.

Brown, I. D. & Altermatt, D. (1985). Bond-valence parameters obtained from a systematic analysis of the inorganic crystal-structure database. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* **41**, 244-247.

Chartron, J., Carroll, K. S., Shiau, C., Gao, H., Leary, J. A., Bertozzi, C. R. & Stout, C. D. (2006). Substrate recognition, protein dynamics, and iron-sulfur cluster in *Pseudomonas aeruginosa* adenosine 5'-phosphosulfate reductase. *J Mol Biol* **364**, 152-69.

Chen, C., Seow, K. T., Guo, K., Yaw, L. P. & Lin, S. C. (1999). The membrane association domain of RGS16 contains unique amphipathic features that are conserved in RGS4 and RGS5. *J Biol Chem* **274**, 19799-806.

Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* **201**, 134-9.

Cleland, W. W. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **3**, 480-2.

Cline, J. D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**, 454-458.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-44.

Cole, S. T., Eiglmeier, K., Ahmed, S., Honore, N., Elmes, L., Anderson, W. F. & Weiner, J. H. (1988). Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships of the *glpABC* operon encoding the anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **170**, 2448-56.

Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H_2, CO, CH_4, OCS, N_2O, and NO). *Microbiol Rev* **60**, 609-40.

Crane, F. L. & Beinert, H. (1956). On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of coenzyme A. II. The electron-transferring flavoprotein. *J Biol Chem* **218**, 717-31.

Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A. S., Schulte, A., Sander, J., Lubbe, Y., Deuster, O. & Brune, D. C. (2005). Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *J Bacteriol* **187**, 1392-404.

Dahl, C., Kredich, N. M., Deutzmann, R. & Trüper, H. G. (1993). Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes. *J Gen Microbiol* **139**, 1817-28.

Davies, D. R. & Segal, D. M. (1971). Protein crystallization: micro techniques involving vapor diffusion. *Methods in Enzymology* **22**.

Dawson, R. M. C., Elliot, D. C., Elliot, W. H. & Jones, K. M. (1987). *Data for biochemical research*, Third edn. Oxford: Oxford University Press.

Deppenmeier, U. (2004). The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 55-64.

Deppenmeier, U., Lienard, T. & Gottschalk, G. (1999). Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett* **457**, 291-7.

Deppenmeier, U., Müller, V. & Gottschalk, G. (1996). Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Archives of Microbiology* **165**, 149-163.

Duin, E. C., Bauer, C., Jaun, B. & Hedderich, R. (2003). Coenzyme M binds to a [4Fe-4S] cluster in the active site of heterodisulfide reductase as deduced from EPR studies with the [^{33}S]coenzyme M-treated enzyme. *FEBS Lett* **538**, 81-4.

Duin, E. C., Madadi-Kahkesh, S., Hedderich, R., Clay, M. D. & Johnson, M. K. (2002). Heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis* contains an active-site [4Fe-4S] cluster that is directly involved in mediating heterodisulfide reduction. *FEBS Lett* **512**, 263-8.

Dybas, M. & Konisky, J. (1992). Energy transduction in the methanogen *Methanococcus voltae* is based on a sodium current. *J Bacteriol* **174**, 5575-83.

Ellermann, J., Hedderich, R., Böcher, R. & Thauer, R. K. (1988). The final step in methane formation. Investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur J Biochem* **172**, 669-77.

Ensign, S. A. & Allen, J. R. (2003). Aliphatic epoxide carboxylation. *Annu Rev Biochem* **72**, 55-76.

Erkel, C. (2004). Partielle Rekonstruktion des Genoms eines Vertreters des 'Rice Cluster I', einer bisher nicht in Reinkultur befindlichen Entwicklungslinie methanogener Archaea. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.

Erkel, C., Kube, M., Reinhardt, R. & Liesack, W. (2006). Genome of Rice Cluster I archaea: the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science* **313**, 370-2.

Ermler, U. (2005). On the mechanism of methyl-coenzyme M reductase. *Dalton Trans*, 3451-8.

Field, D., Feil, E. J. & Wilson, G. A. (2005). Databases and software for the comparison of prokaryotic genomes. *Microbiology* **151**, 2125-32.

Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. & Bateman, A. (2006). Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* **34**, D247-51.

Fish, W. W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. In *Methods in Enzymology*, pp. 357-364. Edited by J. F. Riordan & B. L. Vallee. New York: Academic Press Inc.

Fomenko, D. E., Xing, W., Adair, B. M., Thomas, D. J. & Gladyshev, V. N. (2007). High-throughput identification of catalytic redox-active cysteine residues. *Science* **315**, 387-9.

Fontecave, M., Choudens, S. O., Py, B. & Barras, F. (2005). Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J Biol Inorg Chem* **10**, 713-21.

Frerman, F. E. (1987). Reaction of electron-transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase with the mitochondrial respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **893**, 161-9.

Fricke, W. F., Seedorf, H., Henne, A., Krüer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G. & Thauer, R. K. (2006). The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H_2 for methane formation and ATP synthesis. *J Bacteriol* **188**, 642-58.

Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schodl, T., Heitzer, M. & Hegemann, P. (2004). Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* **55**, 869-81.

Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-Thomann, N., DeArellano, K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W., Zimmer, A., Barber, R. D., Cann, I., Graham, D. E., Grahame, D. A., Guss, A. M., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, H. C., Krzycki, J. A., Leigh, J. A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J. N., Smith, K., Springer, T. A., Umayam, L. A., White, O., White, R. H., Conway de Macario, E., Ferry, J. G., Jarrell, K. F., Jing, H., Macario, A. J., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K. R., Swanson, R. V., Zinder, S. H., Lander, E., Metcalf, W. W. & Birren, B. (2002). The genome of *Methanosarcina acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res* **12**, 532-42.

Gencic, S., LeClerc, G. M., Gorlatova, N., Peariso, K., Penner-Hahn, J. E. & Grahame, D. A. (2001). Zinc-thiolate intermediate in catalysis of methyl group transfer in *Methanosarcina barkeri*. *Biochemistry* **40**, 13068-78.

Gernhardt, P., Possot, O., Foglino, M., Sibold, L. & Klein, A. (1990). Construction of an integration vector for use in the archaebacterium *Methanococcus voltae* and expression of a eubacterial resistance gene. *Mol Gen Genet* **221**, 273-9.

Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. & Selvin, P. R. (1999). A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem* **273**, 73-80.

Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D., Slater, S. C., Durkin, A. S., Eisen, J. A., Ronning, C. M., Barbazuk, W. B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H. S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S. A., Vaudin, M., Wiegand, R. & Kaplan, H. B. (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15200-5.

Gomes, C. M., Lemos, R. S., Teixeira, M., Kletzin, A., Huber, H., Stetter, K. O., Schafer, G. & Anemuller, S. (1999). The unusual iron sulfur composition of the *Acidianus ambivalens* succinate dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 134-41.

Gönrich, M., Mahlert, F., Duin, E. C., Bauer, C., Jaun, B. & Thauer, R. K. (2004). Probing the reactivity of Ni in the active site of methyl-coenzyme M reductase with substrate analogues. *J Biol Inorg Chem* **9**, 691-705.

Hagen, W. R. (2006). EPR spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems. *Dalton Trans*, 4415-34.

Hamann, N. (2003). Untersuchungen zu Heterodisulfid-Reduktase und Hydrogenasen aus *Methanobrevibacter arboriphilus* und heterologe Produktion der Untereinheit B von Heterodisulfid-Reduktase aus *Methanothermobacter marburgensis*. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg.

He, C., Hus, J. C., Sun, L. J., Zhou, P., Norman, D. P., Dotsch, V., Wei, H., Gross, J. D., Lane, W. S., Wagner, G. & Verdine, G. L. (2005). A methylation-dependent electrostatic switch controls DNA repair and transcriptional activation by *E. coli* Ada. *Mol Cell* **20**, 117-29.

Hedderich, R. (1990). Reinigung und Charakterisierung von Heterodisulfid-Reduktase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Inaugural-Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.

Hedderich, R. (2004). Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 65-75.

Hedderich, R., Berkessel, A. & Thauer, R. K. (1990). Purification and properties of heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur J Biochem* **193**, 255-61.

Hedderich, R., Hamann, N. & Bennati, M. (2005). Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: a new catalytic role for an iron-sulfur cluster. *Biol Chem* **386**, 961-70.

Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M. & Stetter, K. O. (1999). Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiology Reviews* **22**, 353-381.

Hedderich, R., Koch, J., Linder, D. & Thauer, R. K. (1994). The heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* contains sequence motifs characteristic of pyridine-nucleotide-dependent thioredoxin reductases. *Eur J Biochem* **225**, 253-61.

Hedderich, R. & Whitman, W. B. (2006). Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. In *The Prokaryotes*, pp. 1050-1079. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

Heidelberg, J. F., Seshadri, R., Haveman, S. A., Hemme, C. L., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Eisen, J. A., Ward, N., Methe, B., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Nelson, W. C., Sullivan, S. A., Fouts, D., Haft, D. H., Selengut, J., Peterson, J. D., Davidsen, T. M., Zafar, N., Zhou, L., Radune, D., Dimitrov, G., Hance, M., Tran, K., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T. R., Feldblyum, T. V., Wall, J. D., Voordouw, G. & Fraser, C. M. (2004). The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nat Biotechnol* **22**, 554-9.

Heiden, S., Hedderich, R., Setzke, E. & Thauer, R. K. (1994). Purification of a two-subunit cytochrome-*b*-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem* **221**, 855-61.

Heim, S. (1998). Biochemische und molekularbiologiche Untersuchungen an Thiol:Fumarat-Reduktase (Hdr) aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.

Heim, S., Künkel, A., Thauer, R. K. & Hedderich, R. (1998). Thiol:fumarate reductase (Tfr) from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Identification of the catalytic sites for fumarate reduction and thiol oxidation. *Eur J Biochem* **253**, 292-9.

Heinicke, I., Müller, J., Pittelkow, M. & Klein, A. (2004). Mutational analysis of genes encoding chromatin proteins in the archaeon *Methanococcus voltae* indicates their involvement in the regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics* **272**, 76-87.

Hennig, L. (1999). WinGene/WinPep: User-friendly software for the analysis of amino acid sequences. *BioTechniques* **26**, 1170-1172.

Huber, C. & Wächtershäuser, G. (1998). Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of life. *Science* **281**, 670-2.

Huber, H. & Prangishvili, D. (2006). *Sulfolobales*. In *The Prokaryotes*, pp. 23-51. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

Ide, T., Baumer, S. & Deppenmeier, U. (1999). Energy conservation by the H_2:heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Gö1: identification of two proton-translocating segments. *J Bacteriol* **181**, 4076-80.

Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* **59**, 1073-82.

Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. & Rees, D. C. (1999). Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* **284**, 1961-6.

Iwasaki, T., Kounosu, A., Aoshima, M., Ohmori, D., Imai, T., Urushiyama, A., Cosper, N. J. & Scott, R. A. (2002). Novel [2Fe-2S]-type redox center C in SdhC of archaeal respiratory complex II from *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *J Biol Chem* **277**, 39642-8.

Iwasaki, T., Wakagi, T. & Oshima, T. (1995). Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. III. The archaeal novel respiratory complex II (succinate:caldariellaquinone oxidoreductase complex) inherently lacks heme group. *J Biol Chem* **270**, 30902-8.

Jameson, G. N. L., Walters, E. M., Manieri, W., Schurmann, P., Johnson, M. K. & Huynh, B. H. (2003). Spectroscopic evidence for site specific chemistry at a unique iron site of the [4Fe-4S] cluster in ferredoxin:thioredoxin reductase. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 1146-1147.

Janssen, S., Schäfer, G., Anemüller, S. & Moll, R. (1997). A succinate dehydrogenase with novel structure and properties from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*: genetic and biophysical characterization. *Journal of Bacteriology* **179**, 5560-9.

Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu Rev Biochem* **74**, 247-81.

Johnson, J. E., Rao, N. M., Hui, S. W. & Cornell, R. B. (1998). Conformation and lipid binding properties of four peptides derived from the membrane-binding domain of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase. *Biochemistry* **37**, 9509-19.

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

Kappl, R., Ciurli, S., Luchinat, C. & Hüttermann, J. (1999). Probing structural and electronic properties of the oxidized $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ cluster of *Ectothiorhodospira halophila* iso-II high-potential iron-sulfur protein by ENDOR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 1925-1935.

Karrasch, M., Bott, M. & Thauer, R. K. (1989). Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanoracina barkeri*. *Archives of Microbiology* **151**, 137-142.

Kiley, P. J. & Beinert, H. (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**, 181-5.

Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C. I., McNeil, L. K., Badger, J. H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J. D., Weidman, J. F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M. D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B. P., Sykes, S. M., Sadow, P. W., D'Andrea, K. P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S. A., Mason, T. M., Olsen, G. J., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R. & Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 364-70.

Klopprogge, K., Grabbe, R., Hoppert, M. & Schmitz, R. A. (2002). Membrane association of Klebsiella pneumoniae NifL is affected by molecular oxygen and combined nitrogen. *Arch Microbiol* **177**, 223-34.

Kriek, M., Peters, L., Takahashi, Y. & Roach, P. L. (2003). Effect of iron-sulfur cluster assembly proteins on the expression of *Escherichia coli* lipoic acid synthase. *Protein Expr Purif* **28**, 241-5.

Krüer, M., Haumann, M., Meyer-Klaucke, W., Thauer, R. K. & Dau, H. (2002). The role of zinc in the methylation of the coenzyme M thiol group in methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem* **269**, 2117-23.

Künkel, A., Vaupel, M., Heim, S., Thauer, R. K. & Hedderich, R. (1997). Heterodisulfide reductase from methanol-grown cells of *Methanosarcina barkeri* is not a flavoenzyme. *Eur J Biochem* **244**, 226-34.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

Lancaster, C. R. (2003). *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase and its comparison to *E. coli* succinate:quinone reductase. *FEBS Lett* **555**, 21-8.

Lancaster, C. R. & Kröger, A. (2000). Succinate:quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta* **1459**, 422-31.

Leheste, J.-R. (1996). Differentielle Proteinsynthese nach Selenentzug bei *Methanococcus voltae*. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg.

Lemos, R. S., Fernandes, A. S., Pereira, M. M., Gomes, C. M. & Teixeira, M. (2002). Quinol:fumarate oxidoreductases and succinate:quinone oxidoreductases: phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. *Biochim Biophys Acta* **1553**, 158-70.

Lemos, R. S., Gomes, C. M. & Teixeira, M. (2001). *Acidianus ambivalens* complex II typifies a novel family of succinate dehydrogenases. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 141-50.

Letunic, I., Copley, R. R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J. & Bork, P. (2006). SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* **34**, D257-60.

Li, Q., Li, L., Rejtar, T., Lessner, D. J., Karger, B. L. & Ferry, J. G. (2006). Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J Bacteriol* **188**, 702-10.

Li, Z., Shokes, J. E., Kounosu, A., Imai, T., Iwasaki, T. & Scott, R. A. (2003). X-ray absorption spectroscopic analysis of reductive [2Fe-2S] cluster degradation in hyperthermophilic archaeal succinate:caldariellaquinone oxidoreductase subunits. *Biochemistry* **42**, 15003-8.

Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsasser, H. P., Hausmann, A., Netz, D. J., Pierik, A. J., Stehling, O., Urzica, E. & Muhlenhoff, U. (2006). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 652-67.

Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **30**, 133-41.

Lill, R. & Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 457-86.

Lippard, S. J. & Berg, J. M. (1995). *Bioanorganische Chemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

Madadi-Kahkesh, S. (2001). Zum Katalysemechanismus der Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.

Madadi-Kahkesh, S., Duin, E. C., Heim, S., Albracht, S. P., Johnson, M. K. & Hedderich, R. (2001). A paramagnetic species with unique EPR characteristics in the active site of heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **268**, 2566-77.

Malkin, R. & Rabinowitz, J. C. (1966). The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **23**, 822-7.

Mander, G. J. (1999). Untersuchungen zu Heterodisulfid-Reduktase-ähnlichen Proteinen aus nicht-methanogenen Mikroorganismen. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg.

Mander, G. J. (2002). Membrangebundener Elektronentransport in Sulfat-reduzierenden Archaea. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.

Mander, G. J., Duin, E. C., Linder, D., Stetter, K. O. & Hedderich, R. (2002). Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **269**, 1895-904.

Mander, G. J., Pierik, A. J., Huber, H. & Hedderich, R. (2004). Two distinct heterodisulfide reductase-like enzymes in the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus profundus*. *Eur J Biochem* **271**, 1106-16.

Mander, G. J., Weiss, M. S., Hedderich, R., Kahnt, J., Ermler, U. & Warkentin, E. (2005). X-ray structure of the gamma-subunit of a dissimilatory sulfite reductase: fixed and flexible C-terminal arms. *FEBS Lett* **579**, 4600-4.

Matias, P. M., Coelho, A. V., Valente, F. M., Placido, D., LeGall, J., Xavier, A. V., Pereira, I. A. & Carrondo, M. A. (2002). Sulfate respiration in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Structure of the 16-heme cytochrome *c* HmcA at 2.5-Å resolution and a view of its role in transmembrane electron transfer. *J Biol Chem* **277**, 47907-16.

Matias, P. M., Pereira, I. A., Soares, C. M. & Carrondo, M. A. (2005). Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Prog Biophys Mol Biol* **89**, 292-329.

McInerney, M. J., Rohlin, L., Mouttaki, H., Kim, U., Krupp, R. S., Rios-Hernandez, L., Sieber, J., Struchtemeyer, C. G., Bhattacharyya, A., Campbell, J. W. & Gunsalus, R. P. (2007). The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7600-5.

Merchant, S. & Dreyfuss, B. W. (1998). Posttranslational assembly of photosynthetic metalloproteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 25-51.

Messens, J. & Silver, S. (2006). Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol* **362**, 1-17.

Messens, J., Van Molle, I., Vanhaesebrouck, P., Limbourg, M., Van Belle, K., Wahni, K., Martins, J. C., Loris, R. & Wyns, L. (2004). How thioredoxin can reduce a buried disulphide bond. *J Mol Biol* **339**, 527-37.

Metcalf, W. W., Zhang, J. K., Apolinario, E., Sowers, K. R. & 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**, 2626-31.

Moll, R. & Schafer, G. (1991). Purification and characterisation of an archaebacterial succinate dehydrogenase complex from the plasma membrane of the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem* **201**, 593-600.

Moore, J. T., Uppal, A., Maley, F. & Maley, G. F. (1993). Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein Expr Purif* **4**, 160-3.

Moreira, D., Rodriguez-Valera, F. & Lopez-Garcia, P. (2004). Analysis of a genome fragment of a deep-sea uncultivated Group II euryarchaeote containing 16S rDNA, a spectinomycin-like operon and several energy metabolism genes. *Environ Microbiol* **6**, 959-69.

Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Buillard, V., Cerutti, L., Copley, R., Courcelle, E., Das, U., Daugherty, L., Dibley, M., Finn, R., Fleischmann, W., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Hunter, S., Kahn, D., Kanapin, A., Kejariwal, A., Labarga, A., Langendijk-Genevaux, P. S., Lonsdale, D., Lopez, R., Letunic, I., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., Mistry, J., Mitchell, A., Nikolskaya, A. N., Orchard, S., Orengo, C., Petryszak, R., Selengut, J. D., Sigrist, C. J., Thomas, P. D., Valentin, F., Wilson, D., Wu, C. H. & Yeats, C. (2007). New developments in the InterPro database. *Nucleic Acids Res* **35**, D224-8.

Nakamura, M., Saeki, K. & Takahashi, Y. (1999). Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster. *J Biochem (Tokyo)* **126**, 10-8.

Noll, K. M., Donnelly, M. I. & Wolfe, R. S. (1987). Synthesis of 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate and its activity in the methylcoenzyme M methylreductase system. *J Biol Chem* **262**, 513-5.

Orme-Johnson, W. H. & Orme-Johnson, N. R. (1982). Iron-sulfur proteins: the problem of determining the cluster type. In *Iron-Sulfur Proteins*, pp. 67-96. Edited by T. G. Spiro. New York: John Wiley & Sons.

Palmer, G. (2000). Physical methods in bioinorganic chemistry. In *Physical methods in bioinorganic chemistry.*, pp. 121-185. Edited by L. Q. Suasalito: University science books.

Pellicer, M. T., Badia, J., Aguilar, J. & Baldoma, L. (1996). *glc* locus of *Escherichia coli*: characterization of genes encoding the subunits of glycolate oxidase and the *glc* regulator protein. *J Bacteriol* **178**, 2051-9.

Penner-Hahn, J. (2007). Zinc-promoted alkyl transfer: a new role for zinc. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 166-71.

Pereira, P. M., Teixeira, M., Xavier, A. V., Louro, R. O. & Pereira, I. A. (2006). The Tmc complex from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is involved in transmembrane electron transfer from periplasmic hydrogen oxidation. *Biochemistry* **45**, 10359-67.

Pires, R. H., Venceslau, S. S., Morais, F., Teixeira, M., Xavier, A. V. & Pereira, I. A. (2006). Characterization of the *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 DsrMKJOP complex: a membrane-bound redox complex involved in the sulfate respiratory pathway. *Biochemistry* **45**, 249-62.

Pollock, V. V., Conover, R. C., Johnson, M. K. & Barber, M. J. (2002). Bacterial expression of the molybdenum domain of assimilatory nitrate reductase: production of both the functional molybdenum-containing domain and the nonfunctional tungsten analog. *Arch Biochem Biophys* **403**, 237-48.

Pott, A. S. & Dahl, C. (1998). Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr l*ocus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* **144 (Pt 7)**, 1881-94.

Rabus, R., Ruepp, A., Frickey, T., Rattei, T., Fartmann, B., Stark, M., Bauer, M., Zibat, A., Lombardot, T., Becker, I., Amann, J., Gellner, K., Teeling, H., Leuschner, W. D., Glockner, F. O., Lupas, A. N., Amann, R. & Klenk, H. P. (2004). The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanently cold arctic sediments. *Environ Microbiol* **6**, 887-902.

Reiß, R. (2002). Zum Verständnis des Energiestoffwechsels von *Methanosphaera stadtmanae*: Reinigung und Chrakterisierung von Heterodisulfid-Reduktase und Hydrogenase. Marburg: Philipps-Universität.

Rius, G. & Lamotte, B. (1989). Single-crystal ENDOR study of a ^{57}Fe-enriched iron-sulfur $[4Fe\text{-}4S]^{3+}$ cluster. *Journal of the American Chemical Society* **111**, 2464-2469.

Rossi, M., Pollock, W. B., Reij, M. W., Keon, R. G., Fu, R. & Voordouw, G. (1993). The *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. vulgaris Hildenborough encodes a potential transmembrane redox protein complex. *J Bacteriol* **175**, 4699-711.

Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J. A., Hoffman, J. M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J. E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J. F., Utterback, T., Rogers, Y. H., Falcon, L. I., Souza, V., Bonilla-Rosso, G., Eguiarte, L. E., Karl, D. M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M. R., Strausberg, R. L., Nealson, K., Friedman, R., Frazier, M. & Venter, J. C. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* **5**, e77.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2000). *Molecular cloning, a laboratory manual*, 3nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sander, J., Engels-Schwarzlose, S. & Dahl, C. (2006). Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes. *Arch Microbiol* **186**, 357-66.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-7.

Sazanov, L. A. & Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430-6.

Schäfer, G., Anemüller, S. & Moll, R. (2002). Archaeal complex II: 'classical' and 'non-classical' succinate:quinone reductases with unusual features. *Biochim Biophys Acta* **1553**, 57-73.

Schmitz, R. A., Daniel, R., Deppenmeier, U. & Gottschalk, G. (2006). The anaerobic way of life. In *The Prokaryotes*, pp. 86-101. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

Schönheit, P., Moll, J. & Thauer, R. K. (1980). Growth parameters (K_S, μ_{max}, Y_S) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **127**, 59-65.

Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-64.

Segelke, B. W. (2001). Efficiency analysis of sampling protocols used in protein crystallization screening. *Journal of Crystal Growth* **232**, 553-562.

Setzke, E., Hedderich, R., Heiden, S. & Thauer, R. K. (1994). H_2:heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Composition and properties. *Eur J Biochem* **220**, 139-48.

Shima, S. & Thauer, R. K. (2007). A third type of hydrogenase catalyzing H_2 activation. *Chem Rec* **7**, 37-46.

Shima, S., Warkentin, E., Thauer, R. K. & Ermler, U. (2002). Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *J Biosci Bioeng* **93**, 519-30.

Shokes, J. E., Duin, E. C., Bauer, C., Jaun, B., Hedderich, R., Koch, J. & Scott, R. A. (2005). Direct interaction of coenzyme M with the active-site Fe-S cluster of heterodisulfide reductase. *FEBS Lett* **579**, 1741-4.

Simianu, M., Murakami, E., Brewer, J. M. & Ragsdale, S. W. (1998). Purification and properties of the heme- and iron-sulfur-containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry* **37**, 10027-39.

Smith, K. S. & Ingram-Smith, C. (2007). *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol* **15**, 150-5.

Spencer, A. G., Thuresson, E., Otto, J. C., Song, I., Smith, T., DeWitt, D. L., Garavito, R. M. & Smith, W. L. (1999). The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis. *J Biol Chem* **274**, 32936-42.

Stahl, D. A., Fishbain, S., Klein, M., Baker, B. J. & Wagner, M. (2002). Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 189-95.

Stams, A. J. (1994). Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 271-294.

Staples, C. R., Gaymard, E., Stritt-Etter, A. L., Telser, J., Hoffman, B. M., Schurmann, P., Knaff, D. B. & Johnson, M. K. (1998). Role of the [4Fe-4S] cluster in mediating disulfide reduction in spinach ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochemistry* **37**, 4612-20.

Steuber, J., Arendsen, A. F., Hagen, W. R. & Kroneck, P. M. (1995). Molecular properties of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (Essex) and comparison with the enzyme from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur J Biochem* **233**, 873-9.

Stojanowic, A., Mander, G. J., Duin, E. C. & Hedderich, R. (2003). Physiological role of the F_{420}-non-reducing hydrogenase (Mvh) from *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch Microbiol* **180**, 194-203.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.

Sun, J. & Klein, A. (2004). A LysR-type regulator is involved in the negative regulation of genes encoding selenium-free hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol* **52**, 563-71.

Takahashi, Y. & Nakamura, M. (1999). Functional assignment of the ORF2-*iscS*-*iscU*-*iscA*-*hscB*-*hscA*-*fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **126**, 917-26.

Takahashi, Y. & Tokumoto, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**, 28380-3.

Thauer, R. K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* **144 (Pt 9)**, 2377-406.

Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**, 100-80.

Tietze, M., Beuchle, A., Lamla, I., Orth, N., Dehler, M., Greiner, G. & Beifuss, U. (2003). Redox potentials of methanophenazine and CoB-S-S-CoM, factors involved in electron transport in methanogenic archaea. *Chembiochem* **4**, 333-5.

Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K. & Takahashi, Y. (2004). Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*. *J Biochem (Tokyo)* **136**, 199-209.

Tong, W. H., Jameson, G. N., Huynh, B. H. & Rouault, T. A. (2003). Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9762-7.

Valente, F. M., Saraiva, L. M., LeGall, J., Xavier, A. V., Teixeira, M. & Pereira, I. A. (2001). A membrane-bound cytochrome c_3: a type II cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Chembiochem* **2**, 895-905.

Vallee, B. L. & Auld, D. S. (1990). Active-site zinc ligands and activated H_2O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 220-4.

Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D. Y., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H. & Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.

Vignais, P. M., Billoud, B. & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 455-501.

Villasenor, A., Sha, M., Thana, P. & Browner, M. (2002). Fast drops: a high-throughput approach for setting up protein crystal screens. *Biotechniques* **32**, 184, 186, 188-9.

Walters, E. M., Garcia-Serres, R., Jameson, G. N., Glauser, D. A., Bourquin, F., Manieri, W., Schurmann, P., Johnson, M. K. & Huynh, B. H. (2005). Spectroscopic characterization of site-specific [4Fe-4S] cluster chemistry in ferredoxin:thioredoxin reductase: implications for the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc* **127**, 9612-24.

Walters, E. M. & Johnson, M. K. (2004). Ferredoxin:thioredoxin reductase: disulfide reduction catalyzed via novel site-specific [4Fe-4S] cluster chemistry. *Photosynth Res* **79**, 249-64.

Wasserfallen, A., Nolling, J., Pfister, P., Reeve, J. & Conway de Macario, E. (2000). Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and M*ethanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 1**, 43-53.

Watt, G. D. & Burns, A. (1975). The thermochemical chracterization of sodium dithionite, flavin mononucleotide, flavin-adenine dinucleotide and methyl and benzyl viologen as low-potential reductants for biological systems. *Biochem. J.* **152**, 33-37.

Weiss, M. S., Mander, G., Hedderich, R., Diederichs, K., Ermler, U. & Warkentin, E. (2004). Determination of a novel structure by a combination of long-wavelength sulfur phasing and radiation-damage-induced phasing. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **60**, 686-695.

Werst, M. M., Kennedy, M. C., Houseman, A. L., Beinert, H. & Hoffman, B. M. (1990). Characterization of the $[4Fe\text{-}4S]^{+}$ cluster at the active site of aconitase by ^{57}Fe, ^{33}S, and ^{14}N electron nuclear double resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 10533-40.

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

Whitman, W. B., Boone, D. R., Koga, Y. & Keswani, J. (2001). Taxonomy of methanogenic archaea. In *Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 211-218. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.

Whitman, W. B., Bowen, T. L. & Boone, D. R. (2006). The methanogenic bacteria. In *The Prokaryotes*, pp. 165–207. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.

Williams, C. H., Arscott, L. D., Muller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K. & Schirmer, R. H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur J Biochem* **267**, 6110-7.

Williams, C. H., Jr. (1995). Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Faseb J* **9**, 1267-76.

Wilting, R., Schorling, S., Persson, B. C. & 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.

Wischgoll, S., Heintz, D., Peters, F., Erxleben, A., Sarnighausen, E., Reski, R., Van Dorsselaer, A. & Boll, M. (2005). Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol Microbiol* **58**, 1238-52.

Woese, C. R., Kandler, O. & 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.

Zhang, J., Frerman, F. E. & Kim, J. J. (2006). Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16212-7.

Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. & Dean, D. R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **273**, 13264-72.

Danksagung

Meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Reiner Hedderich danke ich besonders für seine ständige Erreichbarkeit und Hilfsbereitschaft, die spannenden Projekte, die Methodenvielfalt, die ermöglichte Teilnahme an Konferenzen und eine sehr erfahrungsreiche Zeit.

Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer danke ich für die in vielerlei Hinsicht großzügige Unterstützung meiner Arbeit, hilfreiche Ratschläge und die Einladungen zu den Seminaren in Hirschegg.

Frau Prof. PhD MD Lotte Søgaard-Andersen danke ich für die Erlebnisse beim Aufbau ihrer neuen Abteilung, mit *Myxococcus*-DNA-Microarrays und anderen Methoden arbeiten zu können und eine neue Sicht für viele Dinge.

Frau PD Dr. Marina Bennati und ihrer Mitarbeiterin Frau Dr. Melanie Hertel danke ich für die Kooperation und Durchführung von ENDOR- und einigen EPR-Messungen. Dr. Eckard Bill danke ich für die Kooperation und Durchführung von Mössbauer-Messungen. Dr. Antonio Pierik danke ich für die Hilfe bei EPR-Simulationen und hilfreiche Tipps, Dr. Takahashi für die Zusendung des Plasmids pRKISC und Dr. Arnulf Kletzin für genomische DNA von *Sulfolobus solfataricus* P2. Ebenso danke ich Dr. Isabell Heinicke für die Kooperation beim *Methanococcus voltae*-Projekt.

Ich möchte mich ebenfalls bei den Mitgliedern meiner Prüfungskommission für die Übernahme der Gutachten und bei Herrn Prof. W. Buckel für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des MPI Marburg für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Besonders erwähnen für konkrete Hilfe oder Ratschläge möchte ich Jörg Kahnt, Jürgen Koch, Carina Mengel, Dr. Basem Soboh, Dr. Lucia Forzi, Dr. Gerd Mander, Dr. Sigrun Wegener-Feldbrügge, Dr. Manfred Irmler, Dr. Penelope Higgs, Dr. Astrid Brandis-Heep, Reinhard Böcher, Frank Müller, Meike Ammon, Sebastian Weis und Kryssia Aguiluz. Ich danke Dr. Henning Seedorf für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke den Arbeitsgruppen Buckel, Bremer und Selmer an der Philipps-Universität Marburg für freundschaftliche Beziehungen und Austausch.

An dieser Stelle sei auch der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gedankt, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde.

Ulrike Theisen und Silke Falk danke ich für die nette Zeit in der DoktorandInnen-Vertretung des MPI Marburg.

Am Ende möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht und mich stets mit Rat und Tat unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Nils Hamann
Geburtstag:	21.12.1977
Geburtsort:	Hamburg
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

Juli 1984 – Juli 1988	Grundschule (Dellstedt/Wrohm)
August 1988 – Juni 1997	Gymnasium (Heide)
Juni 1997	Abitur

Zivildienst

Juli 1997 – Juli 1998	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz (Heide), Weiterbeschäftigung bis September 1998

Studium

Oktober 1998 – August 2003	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg mit der Fächerkombination Mikrobiologie, Genetik, Virologie und Biochemie
Oktober 2000	Vordiplom
November 2002 – August 2003	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg) in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Reiner Hedderich in der Abteilung Biochemie von Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer.
August 2003	Diplom
Seit September 2003	Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Reiner Hedderich

Praktika

Februar 1996	Praktikum am Forschungs- und Technologiezentrum Westküste der Christian-Albrechts Universität Kiel (Büsum)
Juli - Oktober 2001	Industriepraktikum bei der Firma Qiagen (Hilden) im Kompetenzzentrum „Array & Detection“
April - Mai 2002	Praktikum in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Reiner Hedderich am MPI für terrestrische Mikrobiologie (Marburg)

Erklärung

Hiermit versichere ich, Nils Hamann, dass ich die vorliegende Dissertation „Identifizierung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit von Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea“ selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.

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

Marburg, den _____

_____
(Nils Hamann)

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die vorliegende Dissertation

„Identifizierung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit von Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea“

in Bibliotheken allgemein zugänglich gemacht wird. Dazu gehört, dass sie

- von der Bibliothek der Einrichtung, in der ich meine Arbeit angefertigt habe, zur Benutzung in ihren Räumen bereitgehalten wird;
- in konventionellen und maschinenlesbaren Katalogen, Verzeichnissen und Datenbanken verzeichnet wird;
- der Universitätsbibliothek für die lokale Nutzung und für Fernleihzwecke zur Verfügung steht;
- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke genutzt werden kann.

Marburg, den_____

_____ (Nils Hamann)

_____ (PD Dr. Reiner Hedderich)