

***In vitro* Biosynthese von komplexen Fe-S-Cluster-Cofaktoren  
der Fe-Mo-Nitrogenase und der [NiFe]-Hydrogenase**

**H A B I L I T A T I O N S S C H R I F T**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium habilitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
**Dr. rer. nat. Basem Soboh**  
geb. am 16.09.1974 in Palästina/Gaza

Gutachter:

1. **Professor Dr. Dietrich Nies**
2. **Professor Dr. Rudolf Thauer**
3. **Professor Dr. Thomas Happe**

**Halle (Saale), den 21.03.2016**

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>Vorwort</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Eisen-Schwefel-Proteine im Überblick</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Vielfalt von FeS-Clustern</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Die Reifung der Eisen-Schwefel Proteine</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4. Eigenschaften und Funktionen der Eisen-Schwefel-Proteine</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Die Nitrogenase</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. Die Nitrogenase und die biologische Stickstoff-Fixierung</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2. Fe-Mo-Cofaktor und P-Cluster der Nitrogenase</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3. Das nif-Operon und die Biosynthese des Fe-Mo-Cofaktors im Überblick</b> ....	<b>15</b>
<b>2.4. In vitro Biosynthese des Fe-Mo-Cofaktors</b> .....	<b>17</b>
2.4.1. Rolle der NifUS Proteine bei der Bildung des FeS-Clusters.....	19
2.4.2. NifB und die Synthese des NifB-Cofaktors.....	20
2.4.3. NifEN ist die zentrale Synthesepattform des Fe-Mo-Cofaktors.....	21
2.4.4. Der Weg des Molybdän in das MoFe-Protein.....	22
2.4.5. Das Homocitrat-Synthase NifV-Protein.....	24
2.4.6. Die Metallcluster-Trägerproteine NifX und NafY.....	24
<b>3. Die Hydrogenase</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Die Hydrogenasen und der Wasserstoff- Metabolismus</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2. Klassifikation der Hydrogenasen</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3. Einteilung der [NiFe]-Hydrogenasen</b> .....	<b>30</b>
3.3.1. Hydrogenasen in <i>E. coli</i> .....	32
<b>3.4. Reifung von [NiFe]-Hydrogenasen</b> .....	<b>35</b>
3.4.1. Synthese der Cyanidliganden.....	36
3.4.2. Der HypCD-Komplex, ein Gerüstkomplex zur Ligandensynthese.....	38
3.4.3. Die Synthese des Carbonylliganden.....	39
3.4.4. Der Nickeleinbau in [NiFe]-Hydrogenasen.....	41
3.4.5. Endoproteolytische Spaltung.....	43
3.4.6. In vitro Reifungssystem für [NiFe]-Hydrogenase.....	45
<b>4. Zusammenfassung und Perspektiven</b> .....	<b>47</b>
<b>5. Literatur</b> .....	<b>49</b>
<b>6. Anhang</b> .....	<b>63</b>
<b>6.1. Verzeichnis der für diese Arbeit relevanten eigenen Veröffentlichungen</b> ..	<b>63</b>
<b>6.2. Verzeichnis aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen des Verfassers</b> ..	<b>64</b>
<b>6.3 Lebenslauf</b> .....	<b>66</b>
<b>6.4 Danksagung</b> .....	<b>68</b>

## Vorwort

Fe-S-haltigen Metalloproteine übernehmen ein breites Spektrum an Aufgaben in der Zelle. Sie sind an Redoxprozessen, Regulation der Genexpression und am Aufbau- und Abbau organischer Verbindungen beteiligt. In diversen Metalloproteinen bilden Fe-S-Cluster einen Teil des aktiven Zentrums und spielen eine entscheidende Rolle bei enzymatischen Reaktionen. Interessanterweise sind komplexe Fe-S-Cofaktoren immer dann an enzymatischen Prozessen essentiell beteiligt, wenn es sich um besonders schwierige, lebensnotwendige Reaktionsabläufe wie Photosynthese, Atmung oder N<sub>2</sub>-Fixierung handelt.

Eine der großen Herausforderungen der Metalloproteine-Forschung ist es, die Biosynthese und die Reifungsprozesse dieser Proteine zu verstehen. Antworten zur Frage, wie die Synthese und der Zusammenbau von einigen Metallcofaktoren erfolgt, können neue Anwendungen in der Umweltforschung und der Medizin zugänglich machen. Wie können wir z.B. die Natur für die Erzeugung von Biokatalysatoren mit optimaler Selektivität und Aktivität imitieren oder Krankheiten beim Menschen, die auf einer Störung der Biosynthese von Fe-S-Proteine beruhen, aufklären? Das Verständnis des Reifungsprozesses von einigen Metalloprotein kann auch einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von antikanzerogenen, antibakteriellen und antiviralen Wirkstoffen leisten.

Schon während der Diplom- und Promotionszeiten habe ich mich mit der mikrobiellen Biochemie und Stoffwechselprozessen, in denen Metalloproteine mit ungewöhnlichen Cofaktoren eine zentrale Rolle spielen, beschäftigt. Die native anaerobe Reinigung membrangebundener Hydrogenasen und CO-Dehydrogenasen, verknüpft mit enzymologischen und biophysikalischen Analysen, führten mich zu meiner ersten Post-doc-Tätigkeit im Labor von Prof. Ludden an der „University of California-Berkeley“. Ich arbeitete an der Biosynthese des größten und komplexesten bisher bekannten biologischen Metallclusters, dem einzigartigen Eisen-Molybdän-Cofaktor (Fe-Mo-Co) der Mo-Nitrogenase. Dort konnte die komplette Rekonstitution des Fe-Mo-Co Biosynthesewegs *in vitro* unter ausschließlicher Verwendung von gereinigten Komponenten etabliert werden. Für die Fortführung des Forschungsfelds wollte ich die erlernten anaeroben Techniken und Methoden zur *in vitro* Synthese des Fe-Mo-Cofaktors auf [NiFe]-Hydrogenase übertragen. Inzwischen ist es mir am Institut für Biologie/Mikrobiologie in Halle gelungen, ein *in vitro* System zur Analyse der Reifung der [NiFe]-Hydrogenase zu etablieren. Damit besitzen wir ein Werkzeug, um die vollständige Cofaktorsynthesemaschinerie in ihrem zeitlichen Regime kontrollieren zu können. Dies wird dabei helfen, die komplette Biogenese des aktiven Zentrums der Hydrogenase aufzuklären. Damit wird ein Beitrag zum Verständnis des Aufbaus weiterer in aktiven Zentren von Enzymen vorkommenden Metallcluster geleistet.

Das erste Kapitel der vorliegenden Arbeit führt grundlegend in die Thematik ein. Es wird ein Überblick über die Eigenschaften, Funktionen und die Reifung der Eisen-Schwefel-haltigen Metalloproteine gegeben. Im zweiten Kapitel werden die Biosynthese des Fe-Mo-Cofaktors und die Funktionen der beteiligten Proteine detailliert besprochen. Das dritte Kapitel beschäftigt sich mit dem aktuellen Projekt in Halle, der Reifung von [NiFe]-Hydrogenase. Das vierte Kapitel gibt abschließend eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowie einen kurzen Ausblick und Perspektiven auf weiteren Forschungsbedarf.

## 1. Einleitung

### 1.1. Eisen-Schwefel-Proteine im Überblick

Eisen-Schwefel-Cluster sind anorganische Cofaktoren zahlreicher Proteine. Sie gehören zu der verbreitetsten und mannigfaltigsten Klasse prosthetischer Gruppen in Proteinen (1) und sind vermutlich die ältesten in der Natur vorkommenden Biokatalysatoren (2). Erstmals wurden sie in photosynthetischen Organismen (3) und stickstofffixierenden Bakterien entdeckt (4). Inzwischen wurden sie in allen möglichen Lebensformen von Archaeobakterien über Pilze und Pflanzen bis hin zu Säugetieren gefunden (5-8).

Eisen-Schwefel-Proteine sind an vielen zentralen biologischen Prozessen beteiligt. Die erste bekannt gewordene Funktion von Fe-S-Proteinen ist ihre Beteiligung an Redoxprozessen und die Katalyse von enzymatischen Reaktionen (1,9). In diversen Metalloproteinen bilden sie einen Teil des aktiven Zentrums. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression und der Aktivierung von komplexen, lebensnotwendigen Reaktionsabläufen, wie Photosynthese, Atmung oder  $N_2$ -Fixierung. (siehe Abschnitt 1.3).

### 1.2. Vielfalt von FeS-Clustern

Die Zusammensetzung und Struktur der Fe-S-Cluster ist vielfältig. Allen gemeinsam ist die Verbrückung von einem oder mehreren Eisenatomen durch Schwefelatome (10). Aufgrund der Identifizierung von immer komplexeren Fe-S-Cluster-Formen ist die Klassifizierung der Cluster zunehmend schwieriger geworden. Basierend auf der Zusammensetzung und den koordinierenden Liganden können die Fe-S-Cluster in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Struktur verschiedener Fe-S-Clustertypen, die Proteine, in denen sie hauptsächlich vorkommen und die charakteristischen Liganden, durch die das Cluster an das Proteinerückgrat gebunden wird oder freie Koordinationsstellen besetzt werden. Die Strukturen der entsprechenden Fe-S-Cofaktoren sind in Abb. 1 dargestellt.

Fe-S-Cluster sind an das Proteingerüst gebunden. In der Regel werden die Eisenionen über Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten an das Protein koordiniert. Es können aber auch die Seitenketten von Histidin, Serin, Aspartat oder Arginin die Koordination übernehmen. Der Rubredoxin-Typ (Abb.1A) ist der einfachste Fe-S-Clustertyp. Er weist nur ein zentrales Eisenion auf, welches von vier Cysteinyliganden koordiniert wird. Er besitzt keinen säurelabilen Schwefel, wird aber trotzdem den Fe-S-Proteinen zugerechnet. In biologischen Systemen sind Fe-S-Cluster meist aus rhombischen  $[2Fe-2S]$ - oder kubischen  $[4Fe-4S]$ -Einheiten aufgebaut (1,11). Das  $[2Fe-2S]$ -Cluster in Ferredoxinen (Abb.1B) wird durch vier Cysteine an das Proteinerückgrat gebunden. Die Rieske-Proteine besitzen auch ein  $[2Fe-2S]$ -Cluster, bei dem eines der beiden Eisen-Zentren von zwei Cysteinen, das andere mit zwei

Histidinen verknüpft ist. (Abb. 1C) (12). Beim [3Fe-4S]-Clustertyp ist das Zentrum nur durch drei Cysteinliganden an das Protein gebunden (Abb. 1D). (1,11). Bei der Aconitase sind nur drei der vier Eisenatome eines [4Fe-4S]-Clusters vom Protein koordiniert, das vierte dient der Substratbindung (13). Die [4Fe-4S]-Cluster (Abb 1E) werden nach ihrem Redoxpotential in zwei Klassen unterteilt. So besitzt der Ferredoxin-Typ ein niedriges Potential mit negativem Wert, während die High-potential-Fe-S-Proteine (HiPIP) über ein hohes Redoxpotential mit positivem Wert verfügen (14).

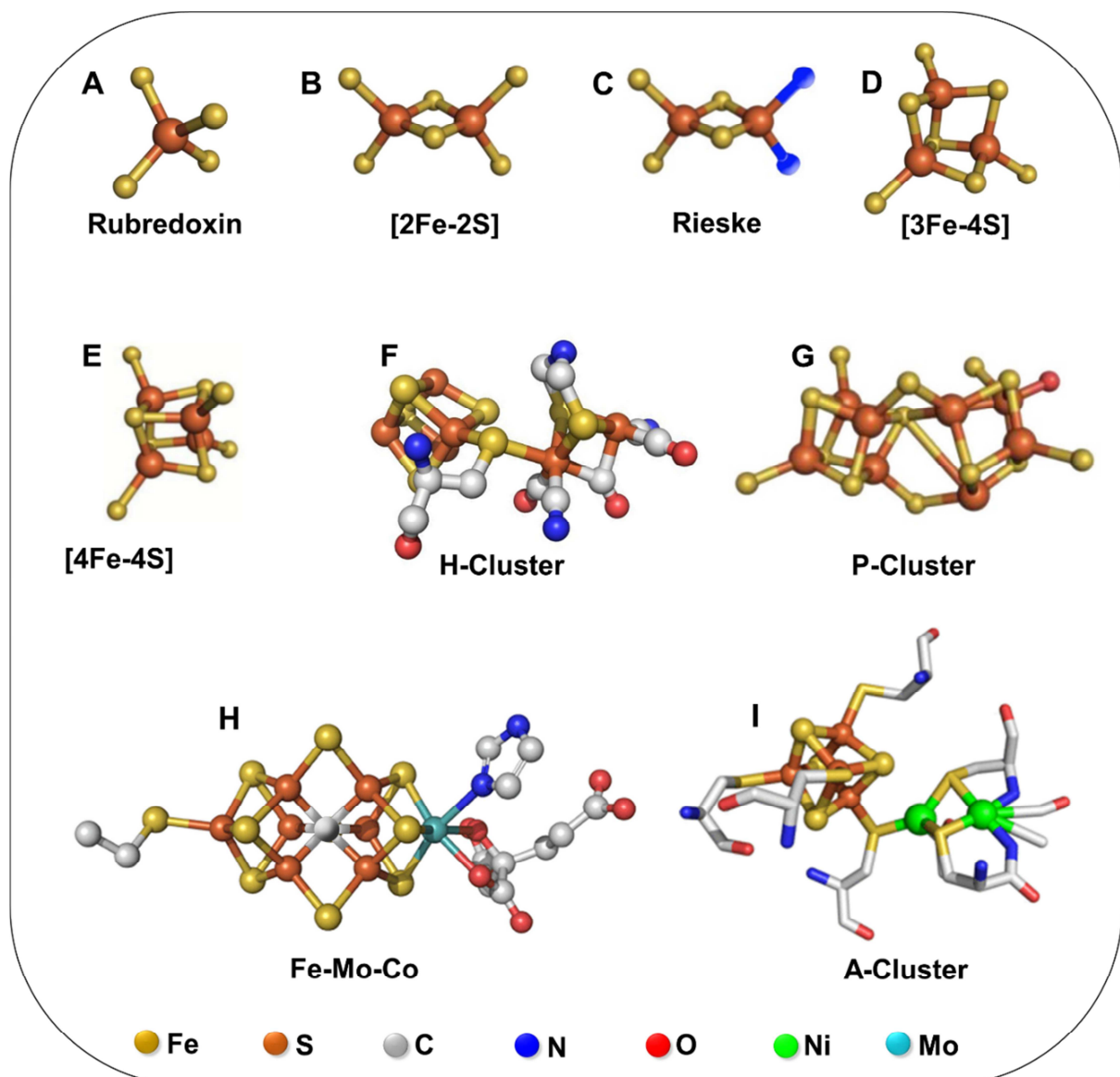
Komplexere Cluster können durch Kombination bzw. Modifikationen der einfachen Fe-S-Cluster aufgebaut werden. Das H-Cluster in Fe-Hydrogenasen (Abb. 1F) entsteht durch Verbrückung eines [4Fe-4S]-Clusters über ein Schwefelatom mit einem weiteren [2Fe-2S]-Cluster, der wiederum von CO- und CN<sup>-</sup>-Liganden koordiniert wird (15,16). Das P-Cluster in Nitrogenasen verfügt über ein [8Fe-7S]-Cluster, das als Dimeres von zwei [4Fe-3S]-Clustern angesehen wird. Die zwei Cluster sind über ein hexakoordiniertes Schwefelatom verbunden (Abb.1G). Das komplette Cluster ist über sechs Cysteinliganden mit dem Protein verknüpft (17,18). Der einzigartige Eisen-Molybdän-Cofaktor (Fe-Mo-Co) der Nitrogenase setzt sich aus sieben Eisen-, neun Schwefelatom, Homocitrat als Ligand des Molybdänatoms und ein durch sechs Eisenatomen hexakoordiniertes Kohlenstoffatom zusammen (Abb.1 H). Der Fe-Mo-Co ist nur durch einen Cys- und einen His-Rest mit dem Protein verbunden (19).

**Tabelle 1. Klassifizierung von Fe-S-Clustern in Proteinen.**

Cluster	Protein	Liganden
[Fe] <sup>3+/2+</sup>	Rubredoxine	4 Cys
[2Fe-2S] <sup>2+/1+</sup>	Ferredoxine	4 Cys
[2Fe-2S] <sup>2+/1+</sup>	Rieske-Proteine	2 Cys, 2 His
[3Fe-4S] <sup>1+/0</sup>	Ferredoxine	3 Cys
[4Fe-4S] <sup>2+/1+</sup>	Ferredoxine	4 Cys
[4Fe-4S] <sup>3+/2+</sup>	HiPIP	4 Cys
H-Cluster	Hydrogenase	4 Cys, COx/(CN-)y
P-Cluster	Nitrogenase	6 Cys, 1 Ser
Fe-Mo-Cofaktor	Mo-Nitrogenase	1 Cys, 1 His, Homocitrat
A-Cluster	Acetyl-CoA-Synthase	6 Cys
C-Cluster	CO-Dehydrogenase	5 Cys, 1 His

In acetogenen Bakterien wird die Acetatbildung durch einen Enzymkomplex (bifunktionelles Protein) aus CO-Dehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthase katalysiert (20). Das A-Cluster der Acetyl-CoA Synthase aus *Moorella thermoacetica* besteht aus einem [4Fe-4S]-Cluster, das mit einem bimetallicen Zentrum verbunden ist (Abb. 1 I). Das Metallzentrum enthält ein Nickelatom in distaler Position (Ni<sup>d</sup>) zum Fe-S-Cluster. Das zweite Metall in der

proximalen Position des [4Fe-4S]-Clusters wurde als Zink in der geschlossenen Form (21) und als zweites Nickel ( $\text{Ni}^{\text{P}}$ ) in der offenen aktiven Konformation der Acetyl-CoA-Synthase beschrieben. Das proximale Nickel ( $\text{Ni}^{\text{P}}$ ) ist über eine Cystein-Seitenkette mit dem [4Fe4S]-Cluster und mit dem distalen Nickel ( $\text{Ni}^{\text{d}}$ ) verbrückt (22,23). Das C-Cluster der CO-Dehydrogenase aus *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* konnte als Fe-[Ni-3Fe-4S]-Cluster identifiziert werden (24). Das C-Cluster katalysiert die Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu CO. Das A-Cluster synthetisiert Acetyl-CoA aus CO, Coenzym A und einer Methylgruppe. Das CO stammt aus der Reduktion von  $\text{CO}_2$  durch das C-Cluster und wandert innerhalb eines hydrophoben Kanals zum A-Cluster (25).



**Abbildung 1. Koordination und Struktur verschiedener Fe-S-Cluster.** (A) Rubredoxin (PDB-Code 4RXN)(26), (B) [2Fe-2S]-Cluster (PDB-Code 3AV8)(27), (C) Rieske (PDB-Code 2NUK)( Kolling (28) (D) [3Fe-4S] (PDB-Code 1FDX) (29), (E) [4Fe-4S] (PDB-Code 1IQZ) (30), (F) H-Cluster (PDB-Code 1FEH) (31), (G) P-Cluster (PDB-Code 2MIN) (17), (H) Fe-Mo-Cluster (PDB-Code 1MIO) (19). (I) A-Cluster der Acetyl-CoA Synthase aus *M. thermoacetica* (16).

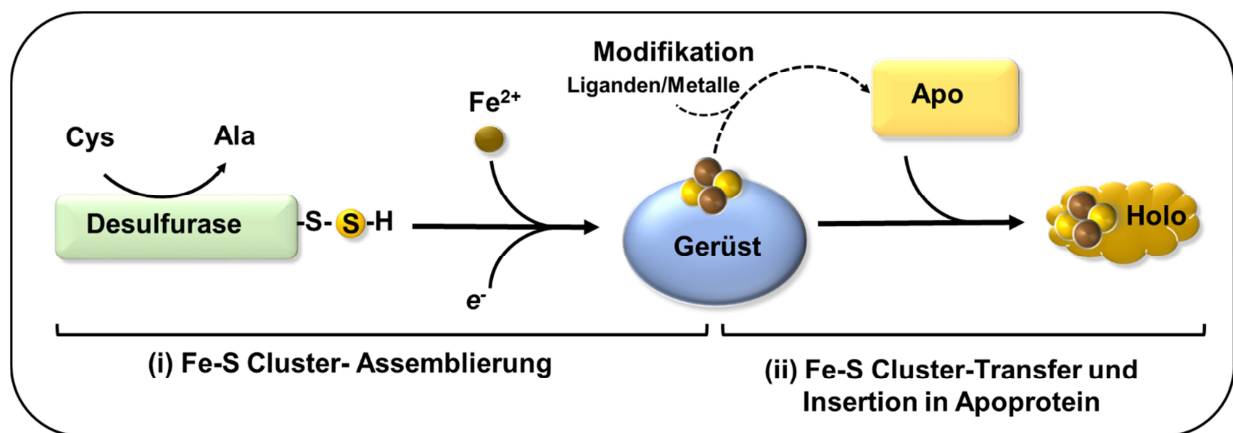
### 1.3. Die Reifung der Eisen-Schwefel Proteine

Einige der Fe-S-Cluster können unter reduktiven Bedingungen aus Eisen- und Sulfidionen durch chemische Rekonstitution *in vitro* in Apoproteine eingebaut werden. (5). Andere Proteine oder weitere unterstützende Komponenten sind hierzu nicht erforderlich. Allerdings ist dieser Vorgang nur unter sauerstofffreien Bedingungen möglich und benötigt unphysiologisch hohe Eisen- und Sulfidkonzentrationen. In ihrer freien Form würden beide Elemente, insbesondere bei den erforderlichen Konzentrationen, zelltoxisch wirken. Ende der 90er Jahre wurde jedoch klar, dass die Biosynthese eines Fe-S-Clusters und dessen Einbau in ein Apoprotein nicht spontan abläuft, sondern das Resultat eines genau kontrollierten und koordinierten Prozesses unter Beteiligung zahlreicher Proteinkomponenten ist (32). Bakterielle und eukaryotische Zellen verfügen über einen recht ähnlichen Biosyntheseapparat für Fe-S-Proteine. Der Reifungsmechanismus der Fe-S-Proteine scheint in der Natur weit verbreitet zu sein, da in allen drei Domänen homologe Proteine vorhanden sind (33). Für die Fe-S-Cluster-Biosynthese in Bakterien gibt es drei separate Systeme: das NIF- („*nitrogen fixation*“) (34,35), das ISC- („*iron-sulfur-cluster*“) (36), und das SUF- („*sulfur formation*“) System (37-40). In manchen Organismen wie *Escherichia coli* kommen beide, das ISC- und das SUF-System vor, wohingegen andere nur ein System nutzen. Das NIF-System (kodiert durch das *nif*-Operon) ist speziell für den Aufbau des Fe-Mo-Cofaktors in Mo-Nitrogenasen ausgelegt (41). Die Synthese der Fe-S-Cluster-enthaltenden Proteine wird hingegen vorwiegend vom ISC- und vom SUF-System (kodiert durch das *isc*- und *suf*-Operon) übernommen. Während das ISC-System für die allgemeine Bildung von Fe-S-Proteinen in zahlreichen Prokaryoten unter normalen Wachstumsbedingungen verantwortlich ist, werden die Komponenten des *suf*-Operons bei oxidativem Stress oder unter Eisenmangelbedingungen exprimiert. Beide Systeme enthalten eine Cystein-Desulfurase, SufS bzw. IscS (37,42), ein Gerüst-Protein wie SufA und IscU (43) und mehrere für das jeweilige System spezifische Proteine.

Im Laufe der Evolution haben sich, im Rahmen der Endosymbiose, zwei der drei bakteriellen Synthesemaschinerien zum ISC-System der Mitochondrien und dem SUF-System der Plastiden entwickelt. Die meisten der eukaryotischen ISC- und SUF-Komponenten der Synthesemaschinerien ähneln in ihrer Primärstruktur sehr denen der bakteriellen Proteine. Zusätzlich wurden zwei weitere eukaryotische Synthesemaschinerien entdeckt, deren Funktionen zwar von der mitochondrialen ISC-Maschinerie abhängig sind, die aber ausschließlich an der Reifung zytosolischer und nukleärer Fe-S Proteine beteiligt sind. Diese sind die ISC-Exportmaschinerie und die zytosolische Fe-S-Protein-Assemblierungsmaschinerie (CIA = cytosolic iron-sulfur protein assembly) (8,44-46).



Die Biogenese von Fe-S-Proteinen scheint in allen bekannten Systemen den gleichen biosynthetischen Prinzipien zu folgen und kann im Wesentlichen in zwei Hauptschritte unterteilt werden: (i) die Assemblierung eines Fe-S-Clusters auf einem Gerüstprotein und (ii) der anschließende Transfer und die Insertion in Apoproteine (Abb. 2) (47). Der erste Schritt beginnt mit der Freisetzung eines Schwefelatoms aus Cystein durch die Pyridoxalphosphat-(PLP) abhängige Cysteindesulfurase (35). Der Schwefel wird vorübergehend als Persulfid an einen konservierten Cysteinrest des Proteins gebunden. Nach Bereitstellung des Eisens in einer gebundenen Form und Lieferung der Reduktionsäquivalente für die Reduktion von  $S^0$  (Zustand im Cystein) zu  $S^{2-}$  (Zustand im Fe-S-Cluster) erfolgt auf einem Gerüstprotein die Synthese eines [2Fe-2S]-Clusters, das auch zu einem [4Fe-4S]-Cluster dimerisieren kann (48,49). Mit Hilfe von speziellen Protein-Chaperonen erfolgt der Transfer und anschließend die Insertion des assemblierten Fe-S-Clusters vom Gerüstprotein zu Apoproteinen (43). Einfache Fe-S-Cluster auf einem Gerüstprotein werden öfter zu höher kondensierten oder modifizierten Clustern transformiert, bevor sie in die entsprechenden Apoproteine inseriert werden. Die Modifikationen der Cluster infolge der Bindung von zusätzlichen Liganden verleihen den Proteinen neue katalytische Eigenschaften (18), Dies ist auch bei der Biosynthese der Cofaktoren von Nitrogenasen und Hydrogenasen der Fall, die das Hauptthema der vorliegenden Arbeit bildet.



**Abbildung 2. Prinzip der Fe-S-Proteinbiogenese.** Die Biogenese von Fe-S-Proteinen kann in zwei Stufen unterteilt werden: (i) die Assemblierung eines Fe-S-Clusters auf einem Gerüstprotein und (ii) der Transfer und die Insertion in Apoproteine. (1) Bereitstellung des Schwefels durch die Pyridoxalphosphat-abhängige Cysteindesulfurase, die Cystein zu Alanin umsetzt. (2) Bereitstellung des Eisens in einer gebundenen Form und Lieferung der Reduktionsäquivalente für die Reduktion von  $S^0$  (Zustand im Cystein) zu  $S^{2-}$  (Zustand im Fe-S-Cluster). (3) Cluster-Assemblierung auf ein Gerüstprotein (4) Transfer und anschließend die Insertion des neu assemblierten Fe-S-Clusters in Apoproteinen. Modifiziert nach (47).

#### 1.4. Eigenschaften und Funktionen der Eisen-Schwefel Proteine

Die Vielfalt der Fe-S-Cluster und deren Fähigkeit in verschiedenen Proteinumgebungen Elektronen zu delokalisieren, ermöglichen den Fe-S-Proteinen diverse Aufgaben und

teilweise überraschende Funktionen in der Zelle zu übernehmen. Sie sind an Aminosäurebiosynthese, Ribosomenrecycling, Cofaktor-Biogenese, DNA-Synthese, Regulation der Genexpression und Enzymaktivität beteiligt (50,51). Weitere strukturelle und sensorische Funktionen sowie die reduktive Spaltung von S-Adenosylmethionin wurden ebenfalls beschrieben (5-8,39,52,53). Ein Überblick zu den Eigenschaften und Funktionen von Fe-S-Clustern in verschiedenen Proteinen wird im Folgenden gegeben.

#### 1.4.1. Beteiligung an Redoxprozessen

Die bekannteste Funktion von Fe-S-Proteinen ist ihre Beteiligung an Redoxprozessen, wo sie auch als erstes entdeckt wurden. Die Funktion beruht auf der Fähigkeit des Eisens zwischen der reduzierten ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und der oxidierten Form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zu wechseln. Damit können Fe-S-Cluster verschiedene Redoxzustände einnehmen und die Fe-S-Proteine vor allem als Elektronentransporter fungieren (5,7,11). In der Regel besitzen Fe-S-Cluster ein niedriges Redoxpotential, jedoch hängt das Redoxpotential von der die Cluster umgebenden Proteinmatrix und ihrer Zugänglichkeit für das Lösungsmittel ab. Dadurch kann das Redoxpotential innerhalb einer großen Spanne - typischerweise zwischen  $-500$  mV und  $+300$  mV - speziell auf die jeweilige Reaktion abgestimmt werden (54). Ferredoxine sind eine der größten Klassen von mobilen biologischen Elektronenüberträgern und stellen die am weitesten verbreiteten redoxaktiven Fe-S-Proteine dar. Sie fungieren z. B. in der Photosynthese und der Elektronentransportkette als Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren. Weitere Beispiele sind die Hydrogenasen und die an der Atmungskette beteiligten Proteinkomplexe. Erwähnenswert ist die Anordnung der Redox-Zentren im hydrophilen Arm des Komplex I aus *Thermus thermophilus*. Die Elektronen fließen durch acht [Fe-S]-Cluster ausgehend vom initialen Zweielektronenakzeptor FMN zu Ubichinon in einem Elektronentransportweg von ca.  $140 \text{ \AA}$  (55). Das Zusammenspiel von Fe-S-Proteinen und anderen Elektronenüberträgern ist ein grundlegender Prozess, der die schrittweise Übertragung und temporäre Speicherung von Elektronen ermöglicht. Die meisten Fe-S-Proteine übertragen nur ein Elektron auf den jeweiligen Akzeptor. Allerdings ist für einige biologische Funktionen ein Zweielektronentransfer essentiell, wie z. B. in der Atmungskette und dem P-Cluster der Nitrogenase. In der Atmungskette können zwei Elektronen von NADH zuerst auf FAD/FMN bzw. Ubichinon und von dort sequentiell über Fe-S- und Häm-haltige Redoxzentren auf den Ein-Elektronenakzeptor Cytochrom c übertragen werden (55). Im Rieske-Protein ist eines der beiden Eisenatome des [2Fe-2S]-Clusters mit zwei Histidinseitenketten anstelle von Cysteinseitenketten koordiniert. Durch Koordination an der Imidazol-Seitenkette der Histidine resultiert ein Säure-Base-Gleichgewicht und ermöglicht damit einen gekoppelten Protonen- und Elektronentransfer (28). Die strukturelle

Veränderung des P-Clusters in seiner oxidierten Form ermöglicht ebenfalls den gekoppelten Elektronen- und Protonentransfer (17).

#### **1.4.2. Beteiligung von Fe-S-Clustern an der Katalyse von enzymatischen Reaktionen**

In diversen Metalloproteinen bilden Fe-S-Cluster einen Teil des aktiven Zentrums und sind an Substratbindung und Aktivierung vieler Redox- und Nichtredoxenzyme beteiligt (56). Interessanterweise sind Metallatome des Fe-S-Clusters immer dann an katalytischen oder enzymatischen Prozessen essentiell beteiligt, wenn es sich um besonders schwierige, lebensnotwendige Reaktionsabläufe handelt, wie z. B. der Photosynthese, der Atmung oder der  $N_2$ -Fixierung. Ein klassisches Beispiel für die Beteiligung von Fe-S-Clustern an enzymatischen Reaktionen ist die Aconitase. Das Enzym katalysiert die Isomerisierung des Citrats zu Isocitrat durch eine Verschiebung der Hydroxygruppe innerhalb des Substrats. Im Enzym bildet das Fe-S-Cluster einen Teil des aktiven Zentrums, indem nur drei Eisenatome eines [4Fe-4S]-Clusters von drei Cysteinen koordiniert sind. Das vierte Eisenatom wird vom Substrat koordiniert und wirkt als Lewis-Säure. Die Aktivität dieses Enzyms wird durch einen Wechsel zwischen der Cuban-[4Fe-4S]-Struktur und der cuboidalen [3Fe-4S]-Struktur reguliert (13,56). Weitere Beispiele für eine direkte Beteiligung von Fe-S-Clustern an katalytischen Prozessen sind die Radikal-S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Enzyme (57), die Biotinsynthasen (58) und die Pyruvat-Formiat-Lyasen (59). In der SAM-Proteinfamilie wird das SAM über die  $\alpha$ -Amino- und die  $\alpha$ -Carboxylatgruppe an das Eisenatom des Clusters gebunden, was zu einer reduktiven, homolytischen Spaltung der C-S-Bindung zu Adenosylradikal und Methionin führt. Das Produkt Adenosylradikal dient dann als Ausgangsmaterial zahlreicher radikalischer Reaktionen, wie die Biosynthese und den Abbau von DNA, Cofaktoren, Vitaminen und Antibiotika (57). Ein weiteres besonderes Fe-S-Cluster existiert in der Sulfit-Reduktase und der Nitrit-Reduktase, die die Reduktion von Sulfit zu Sulfid bzw. Nitrit zu Ammoniak katalysieren. In diesen Enzymen ist ein Eisenatom des [4Fe-4S]-Clusters über einen Cystein-Thiolat-Liganden mit einer Sirohäm-Gruppe verbunden. Die Bindung dieses zusätzlichen Liganden verleiht diesen Fe-S-Proteinen neue Substratbindungs- und Katalyseeigenschaften (60).

#### **1.4.3. Regulation der Genexpression**

Die Fähigkeit verschiedener Fe-S-Cluster unterschiedliche Redoxzustände anzunehmen, ermöglicht den Zellen sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Als Reaktion auf die Änderungen der Umweltbedingungen können Fe-S-Proteine als Sensoren und Regulatoren auf Transkriptions- und Translationsebene eingreifen. Die Fe-S-Zentren registrieren z. B. die Gegenwart von Sauerstoff (z. B. FNR), Fe-S-Clustern (z. B. IscR) sowie von Stickstoffmonoxid und Superoxid (z. B. SoxR), wobei das Fe-S-Cluster zerfällt (wie im

Fall von FNR und IscR) oder oxidiert wird (wie z. B. bei SoxR) (61,62). Dieser veränderte Zustand der Regulatorproteine dient dann als Signal für die Transkription. Die folgenden Beispiele zeigen wie Fe-S-Cluster als Sensoren oder Regulatoren auf umweltbedingte Stimuli reagieren. Im SoxR/SoxS-System von *E. coli* dient das Fe-S-Cluster als Sensor für Superoxid. SoxR enthält ein [2Fe-2S]-Cluster, das unter normalen aeroben Bedingungen in reduzierter Form vorliegt, das SoxR-Protein ist inaktiv. In Anwesenheit des Radikalanions  $O_2^-$  wird das Cluster oxidiert, was zur Aktivierung von SoxR führt, das als Transkriptionsaktivator für *soxS*-Gen fungiert. SoxS löst wiederum eine komplexe Reaktion aus, die zur Synthese von Proteinen zum Schutz gegen oxidativen Stress führt. Somit können diverse Stressfaktoren detektiert und eine Reaktion des Organismus ausgelöst werden (61-63). Im Falle des FNR- (Fumarat-Nitrat-Reductase-Aktivator)-Proteins wird das Fe-S-Cluster zerstört. FNR aus *E. coli* kontrolliert die Expression von zahlreichen Genen, die für das anaerobe Wachstum wichtig sind (64). Das Umschalten vom aktivierten zum inaktivierten Zustand basiert auf der Anwesenheit oder Abwesenheit des  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Clusters in FNR. Unter anaeroben Bedingungen liegt FNR als Dimer mit einem  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster pro Untereinheit vor. Diese Form ist aktiv, kann an DNA binden und dabei die Transkription regulieren. Unter aeroben Bedingungen liegt FNR überwiegend als Monomer vor, das kein Fe-S-Cluster bzw. ein  $[2Fe-2S]^{2+}$ -Cluster enthält. In dieser Form ist es inaktiv und bindet nicht an DNA. Der Transkriptionsrepressor IscR aus *E. coli* ist ein Beispiel für ein Fe-S-Cluster-Sensorprotein. Wenn IscR ein [2Fe-2S]-Cluster besitzt, agiert er als Repressor des *isc*-Operons. Bei erhöhtem Fe-S-Cluster-Bedarf (z. B. unter Sauerstoffstress-Bedingungen) spielt IscR eine wichtige regulatorische Rolle bei der Neusynthese bzw. Reparatur von Fe-S-Clustern (65).

#### 1.4.4. Strukturstabilisierende Funktion

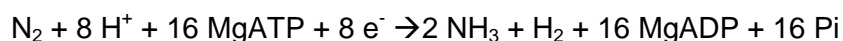
In einigen Proteinen dienen Metalle und redoxinaktive Fe-S-Cluster zur Stabilisierung von Proteinen durch Komplexbildung mit geeigneten Seitenketten. In DNA-Reparaturenzymen hat ein redoxinaktiver [4Fe-4S]-Cluster des MutY und der Endonuklease III eine ausschließlich strukturelle Funktion (66,67). Bei der Erkennung und Reparatur von geschädigter DNA kontrolliert das Cluster die Struktur des Proteinloops und bringt es in die gewünschte Konformation (68). Außerdem führt der Verlust des Fe-S-Clusters eines Fe-S-Cluster-haltigen Proteins, z. B. während der Protein-Reinigung, bei Aminosäureaustausch, durch Lösungsmittelleffekte oder Änderung der Zusammensetzung der Protein-Umgebung, oft zur Destabilisierung bzw. zur Präzipitation des Proteins. Eine Rekonstitution des Proteins mit [Fe-S]-Clustern hat oft eine Stabilisierung des Proteins zur Folge (69).

## 2. Die Nitrogenase

### 2.1. Die Nitrogenase und biologische Stickstoff-Fixierung

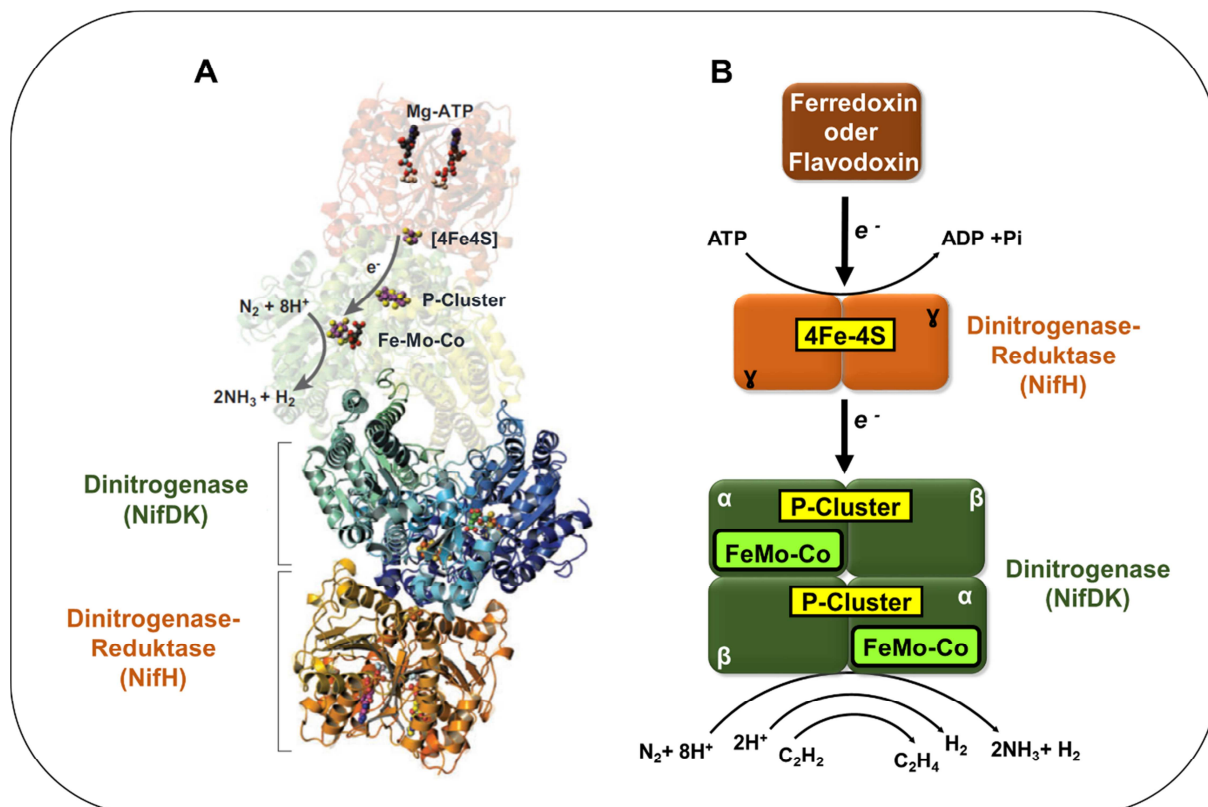
Ein fundamentaler biochemischer Prozess in der Natur ist die Stickstoff-Fixierung. Die Bindung, Aktivierung und die biologische Reduktion von  $N_2$  zu Ammoniak kann als einer der bedeutsamsten enzymkatalysierten Lebensprozesse angesehen werden (70). Die drei Hauptreaktionsfolgen des biologischen Stickstoffkreislaufes, die verschiedene Transformationen anorganischer Stickstoffverbindungen umfassen, sind die  $N_2$ -Fixierung ( $N_2 \rightarrow NH_3$ ), die Nitrifikation ( $NH_3 \rightarrow NO_3^-$ ) und die Denitrifikation ( $NO_3^- \rightarrow N_2$ ). Bei der  $N_2$ -Fixierung wird  $N_2$  zu  $NH_3$  reduziert, das anschließend über die Glutamin-Synthetase und Glutamat-Synthase in Aminosäuren inkorporiert wird. Beim Abbau von Biomasse wird  $NH_3$  wieder frei, das als Substrat für nitrifizierende Bakterien dient. Deren Produkt  $NO_3^-$  wird wiederum von denitrifizierenden Bakterien zu  $N_2$  veratmet, wodurch sich der N-Kreislauf schließt (71). Etwa die Hälfte des globalen N-Umsatzes kann auf biologische Aktivität zurückgeführt werden. Die durch die stabile Dreifachbindung ( $N \equiv N$ ) bedingte Reaktionsträgheit erfordert die  $NH_3$ -Synthese nach dem Haber-Bosch-Verfahren eine hohe Energiezufuhr und einen hohen Druck. Im Gegensatz dazu läuft die biologische  $N_2$ -Fixierung unter milden Bedingungen, bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck ab (72).

Zur  $N_2$ -Fixierung sind in der Natur ausschließlich diazotrophe Prokaryonten befähigt. Diese sind in der Lage, das Enzymsystem Nitrogenase zu bilden, welches den atmosphärischen Stickstoff gemäß der folgenden Reaktionsgleichung zu Ammoniak umsetzen kann. Für die Fixierung eines Moleküls  $N_2$  werden insgesamt 16 Moleküle ATP benötigt.



Die Nitrogenase-Enzymkomplexe bestehen aus zwei verschiedenen Metalloproteinen, der Nitrogenase (Komponente I oder MoFe-Protein) und der Dinitrogenase-Reduktase (Komponente II oder Fe-Protein) (Abb. 3) (73). Die Nitrogenase-Reduktase, auch Fe-Protein genannt, ist ein  $\gamma$ -Homodimer aus zwei NifH-Proteinen, an deren Grenzfläche ein  $[4Fe-4S]$ -Cluster gebunden ist (74). Weiterhin kann das NifH-Protein Mg-ATP binden und hydrolysieren (19). Die Nitrogenase ist ein  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer und wird aus je zwei NifD ( $\alpha$ )- und zwei NifK ( $\beta$ )-Proteinen gebildet. Innerhalb jeder  $\alpha$ -Untereinheit wird ein Eisen-Molybdän-Cofaktor (Fe-Mo-Co) koordiniert (75,76). An der Grenzfläche zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit liegt ein weiteres  $[8Fe-7S]$ -Zentrum, das P-Cluster (Abb. 3) (19,77,78). Das Fe-Protein wird durch Elektronen von Ferredoxin reduziert. Durch eine Konformationsänderung unter ATP-Hydrolyse werden die Elektronen vom  $[4Fe-4S]$ -Cluster des Fe-Proteins auf das P-Cluster des MoFe-Proteins übertragen (74). Nach jedem Elektronentransfer assoziieren und dissoziieren die beiden Komponenten. Danach werden

die Elektronen vom P-Cluster auf Fe-Mo-Co weitergeleitet, wo die Reduktion von  $N_2$  stattfindet (Abb. 3) (79,80). Obwohl nur sechs Elektronen für die Reduktion von  $N_2$  zu  $NH_3$  notwendig sind, werden obligatorisch zwei weitere Elektronen für die Erzeugung von  $H_2$  gebraucht (81). Die Nitrogenase-Aktivität ist nicht auf die  $N_2$ -Reduktion beschränkt. Das Enzymsystem kann auch andere Substrate, wie Protonen, Hydrazin ( $N_2H_4$ ) oder Acetylen ( $C_2H_2$ ) reduzieren (82-84). Praktisch und von besonderer Bedeutung für den Aktivitätsnachweis der Nitrogenase im Labor ist die Reduktion von Acetylen zu Ethylen ( $C_2H_4$ ), da sich beide Reaktanten gaschromatographisch gut nachweisen lassen.



**Abbildung 3. Struktur des Nitrogenase-Enzymkomplexes.** (A) Die relativen Positionen des Mg-ATPs und des Fe-S-Clusters des Nitrogenase-Enzymkomplexes zusammen mit dem Elektronen-Transferweg zum aktiven Zentrum sind in der oberen Hälfte der Kristallstruktur gezeigt, NifH ist orange und die NifDK-Komponenten sind in blau und grün gezeigt (77). (B) Schematische Darstellung der Enzymkomponenten der Nitrogenase. Elektronen werden von Ferredoxin oder Flavodoxin auf das [4Fe-4S]-Cluster der homodimeren Dinitrogenase-Reduktase (NifH) übertragen. Die Elektronen werden auf das P-Cluster unter ATP-Hydrolyse weitergeleitet und im weiteren Verlauf auf den Fe-Mo-Co der Dinitrogenase (NifDK) übertragen.

Einige diazotrophe Bakterien können neben der konventionellen Mo-Nitrogenase auch **alternative Mo-unabhängige Nitrogenasen** synthetisieren (85,86). Eine Nitrogenase-Variante, die V-Nitrogenase, enthält im Cofaktor Vanadium (FeV-Cofaktor) anstelle des Molybdäns (87-90). Eine dritte Variante ist die Fe-Nitrogenase. Sie enthält Eisen als einziges Metall (Fe-Fe-Cofactor) (91). Während die Mo-Nitrogenase in allen  $N_2$ -fixierenden Bakterien

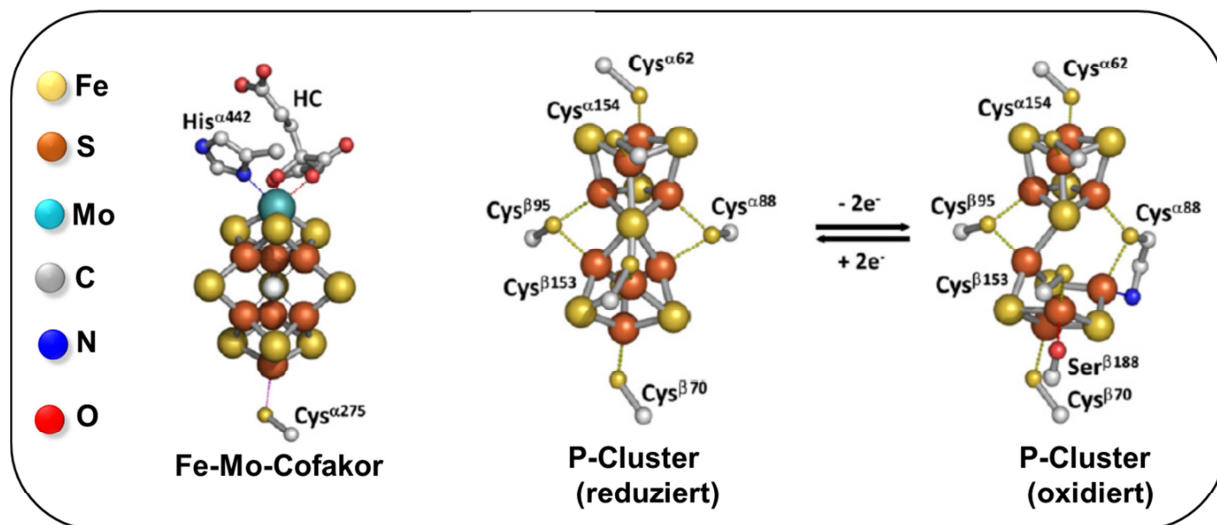
vorkommt, sind nur wenige Organismen in der Lage, die V- bzw. Fe-Nitrogenase zu synthetisieren. *Azotobacter vinelandii* z. B. kann alle drei Nitrogenase-Systeme bilden, *Rhodobacter capsulatus* hingegen synthetisiert neben der Mo-Nitrogenase nur die Fe-Nitrogenase (92). Die Expression der alternativen Nitrogenasen wird durch die Verfügbarkeit von Molybdän und Vanadium reguliert. Die für V-haltige Nitrogenase kodierenden *vnf*-Gene, werden nur in Abwesenheit von Molybdän exprimiert und die Bildung der Fe-Nitrogenase erfolgt nur bei simultanem Molybdän- und Vanadiummangel (93). Die alternativen Nitrogenasen sind für die Zellen ein lebensnotwendiges Reservesystem. In Abwesenheit von Molybdän können die alternativen Nitrogenasen das Wachstum mit N<sub>2</sub> als einziger Stickstoffquelle sicherstellen. Wie die konventionelle Mo-Nitrogenase bestehen die alternativen Nitrogenase-Systeme auch aus einer Dinitrogenase-Reduktase und einer Dinitrogenase-Komponente. Untersuchungen zur katalytischen Reaktivität der Nitrogenasen zeigen, dass die alternativen Nitrogenasen eine deutlich geringere Aktivität der N<sub>2</sub>-Fixierung als Mo-Nitrogenase besitzen (85). Dies zeigt, dass das Nitrogenase-System mit Molybdän effektiver funktioniert, jedoch für die N<sub>2</sub>-Fixierung das Molybdän nicht essentiell ist. Außerdem produzieren die alternativen Nitrogenasen vergleichsweise große Mengen an H<sub>2</sub>. Im Hinblick auf die „Biologische Wasserstoffgewinnung“ sind die alternativen Nitrogenasen deswegen als Katalysatoren interessanter. Allerdings ist die ATP-Abhängigkeit bei den alternativen Nitrogenasen ähnlich wie bei den Mo-Nitrogenasen.

## 2.2. Fe-Mo-Cofaktor und P-Cluster der Nitrogenase

Der einzigartige Eisen-Molybdän-Cofaktor der Mo-Nitrogenase besteht aus sieben Eisenatomen, neun Schwefelatomen, einem Molybdänatom, Homocitrat und einem durch sechs Eisenatome hexakoordiniertes Kohlenstoffatom (Abb. 4). Fe-Mo-Co aus *A. vinelandii* ist nur über ein Fe- und ein Mo-Atom an das Protein gebunden ( $\alpha$ -Cys<sup>275</sup> und His<sup>442</sup>) (Abb. 4) (77). Der Cofaktor kann durch Extraktion mit dem organischen Lösungsmittel N-Methyl-Formamid nach Denaturierung des NifDK Proteins isoliert werden. Die Möglichkeit der Isolierung des Fe-Mo-Co spielt eine wichtige Rolle für die Analyse des Fe-Mo-Co-Biosyntheseprozesses und der Insertion des Cofaktors in die Apo-Dinitrogenase (siehe unten) (75).

Ein weiteres komplexes Metallcluster der Nitrogenase, das sogenannte P-Cluster, besteht aus acht Eisen- und sieben Schwefelatomen. Das [8Fe-7S]-P-Cluster kann als Dimer von zwei [4Fe-3S]-Clusterfragmenten aufgefasst werden, die über ein hexakoordiniertes Schwefelatom verbunden sind. Das P-Cluster ist an beide Untereinheiten des MoFe-Proteins symmetrisch durch je drei Cysteinreste der  $\alpha$ -Untereinheit (Cys<sup>62</sup>, Cys<sup>88</sup> und Cys<sup>154</sup>) und drei Cysteinreste der  $\beta$ -Untereinheit (Cys<sup>670</sup>, Cys<sup>695</sup> und Cys<sup>653</sup>) gebunden (Abb. 4)

(17,19,94). Das P-Cluster durchläuft eine redox-abhängige Strukturänderung, die mit der Übertragung von Protonen und Elektronen gekoppelt ist (17). Im reduzierten Zustand besteht das Cluster aus zwei [4Fe-3S]-Clustern, die durch ein zentrales, hexakoordiniertes Schwefelatom und durch zwei Cysteinreste miteinander verbrückt sind (Abb. 4). In der oxidierten Form vollzieht sich eine interessante Strukturumlagerung des P-Clusters (95). Dabei entfernen sich zwei der von der  $\beta$ -Untereinheit gebundenen Fe-Zentren vom zentralen Schwefelzentrum, sodass ein geschlossenes [4Fe-4S]- und ein offenes [4Fe-3S]-Cluster entstehen (Abb. 4) (17).



**Abbildung 4. Kristallstruktur des Fe-Mo-Cofaktors und des P-Clusters der Mo-Nitrogenase aus *A. vinelandii*** HC = Homocitrat. (PDB Code 3MIN und 1M1N). Abb. übernommen von Hu, *et al* (95).

### 2.3. Das *nif*-Operon und die Biosynthese des Fe-Mo-Cofaktors im Überblick

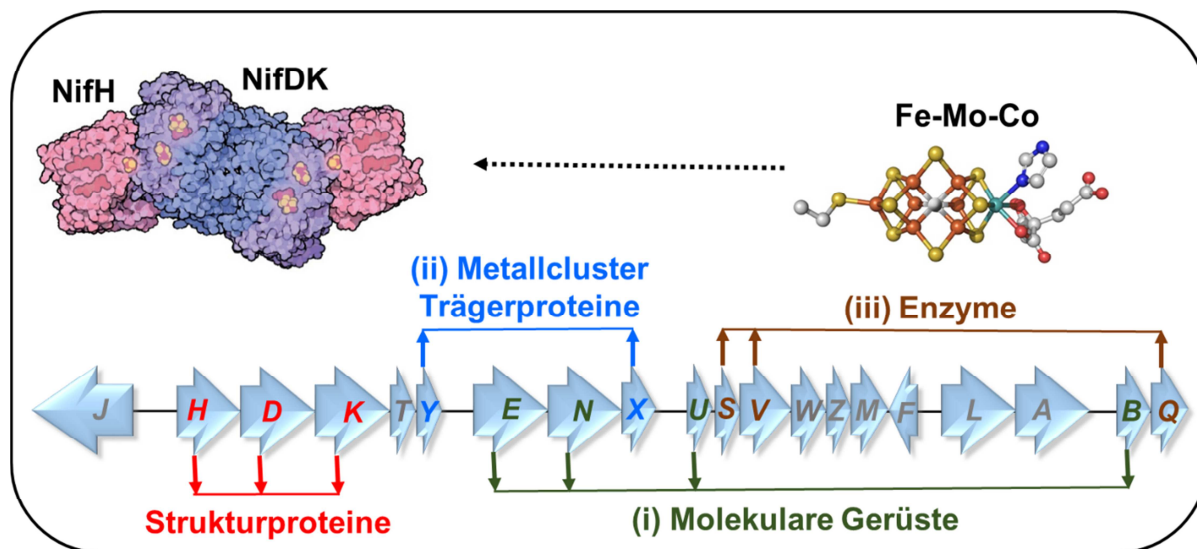
Die erste genetische und biochemische Analyse der  $N_2$ -Fixierung wurde an *Klebsiella pneumoniae* durchgeführt. Das *K. pneumoniae nif*-Cluster besteht aus 20 *nif*-Genen, *nifJHDKTYENXUSVWZMFLABQ*, die in einer einzigen 23 kb-Genregion und in mehreren Transkriptionseinheiten vorliegen (Abb. 5) (96-98). Die genetische Organisation des *nif*-Genclusters von *K. pneumoniae* ist einfacher als in anderen diazotrophen Organismen. Die Anzahl der *nif*-Gene kann in anderen diazotrophen Organismen wie *A. vinelandii* variieren, Jedoch sind die Strukturgene der Nitrogenase und die an der Cofaktor-Biosynthese beteiligten Proteine hochkonserviert. Die Genprodukte lassen sich in verschiedene Klassen einteilen:

- (i) Strukturproteine der Nitrogenase-Komponenten (NifH, NifD, NifK),
- (ii) die Nif-Regulatoren NifL und NifA, die ein Aktivator/Antiaktivator-Regulationssystem bilden, das die Expression der übrigen *nif*-Gene mit der Verfügbarkeit von Ammonium



und Sauerstoff unter geeigneten physiologischen und ökologischen Bedingungen koordiniert (99).

- (iii) mindestens 12 Proteine für Fe-Mo-Co-Biosynthese und die Reifung der Nitrogenase (100). Zusätzliche Genprodukte wie die Flavodoxin (NifF) und die Pyruvat-Flavodoxin-Oxidoreduktase (NifJ) werden für die Versorgung der Nitrogenase mit Elektronen benötigt (101).



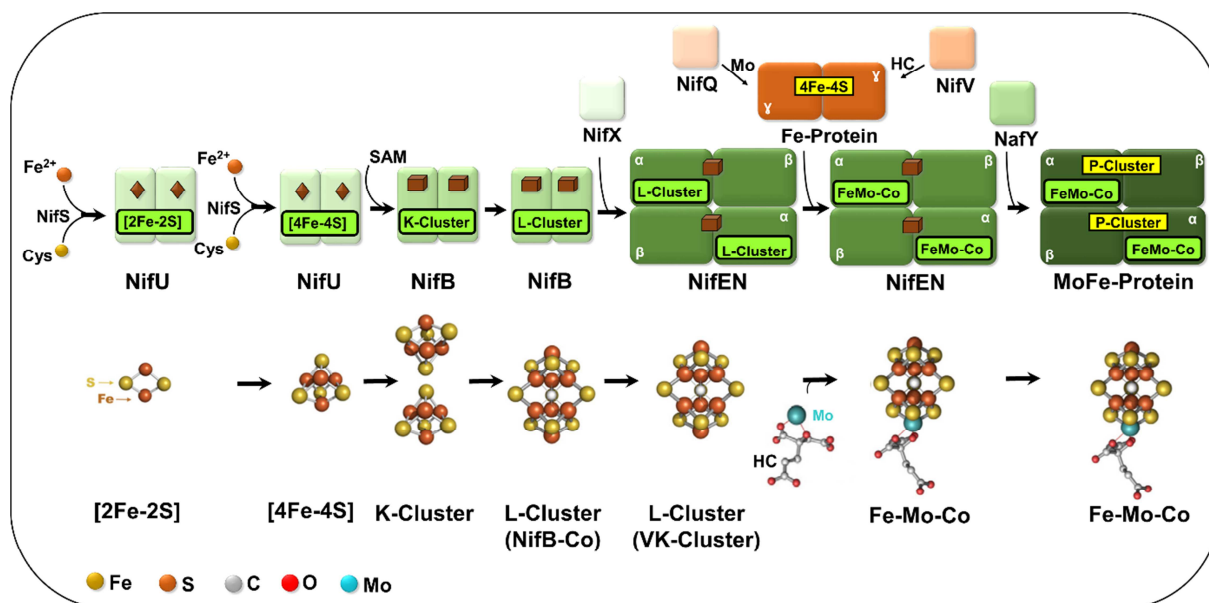
**Abbildung 5.** Die genetische Organisation des *nif*-Operons von *K. pneumoniae*. Die Funktion der Gene ist farbkodiert.

Die Produkte der Strukturgene (NifD und NifK) scheinen für die Fe-Mo-Co-Biosynthese nicht erforderlich zu sein. Die an der Fe-Mo-Co-Biosynthese beteiligten Proteine können nach ihrer Funktion in drei Klassen unterteilt werden:

- (i) **molekulare Gerüste** (NifU, NifB und NifEN), an denen Fe-Mo-Co schrittweise zusammengebaut wird,
- (ii) **Metallcluster-Trägerproteine** (NifX und NafY), die ein Fe-Mo-Co-Intermediat tragen und zum nächsten Gerüstprotein im Biosyntheseweg weiterleiten und
- (iii) **die Enzyme** (NifS, NifQ und NifV), die Schwefel, Molybdän und Homocitrat als Substrate für die Cofaktor-Synthese liefern (102).

Abb. 6 zeigt am Beispiel des obligat aeroben Bodenbakteriums *A. vinelandii* eine schematische Zusammenfassung eines aktuellen Modells für die Fe-Mo-Co-Biosynthese und die Insertion in Apo-Nitrogenase (95,103-108). Unter Beteiligung von Cystein und Eisen wird zunächst durch die koordinierte Aktivität der Cystein-Desulfurylase NifS und NifU ein einfaches [2Fe-2S]-Cluster synthetisiert. Das [2Fe-2S]-Cluster wird über Dimerisierung in ein [4Fe-4S]-Cluster transformiert, welches als metabolisches Substrat für die Synthese des NifB-Cofaktors (NifB-Co oder L-Cluster genannt) dient (109), dabei wird unter Beteiligung vom NifB das [4Fe-4S]-Cluster zu einem Fe-S core (NifB-Co) in einer SAM-abhängigen

Reaktion assembliert (110). NifB-Co wird anschließend unter Beteiligung von NifX auf NifEN übertragen, wo Molybdän und Homocitrat inkorporiert werden (111). Der Transfer des Molybdäns wird von NifQ katalysiert, während Homocitrat von der Homocitrat-Synthase NifV bereitgestellt wird (112-114). Zusätzlich konnte die Beteiligung von NifH an diesem Prozess gezeigt werden. Schließlich erfolgt im letzten Schritt der Fe-Mo-Co-Biosynthese die Übertragung des vollständig assemblierten Fe-Mo-Co von NifEN durch NafY-Protein auf Apo-NifDK (115).



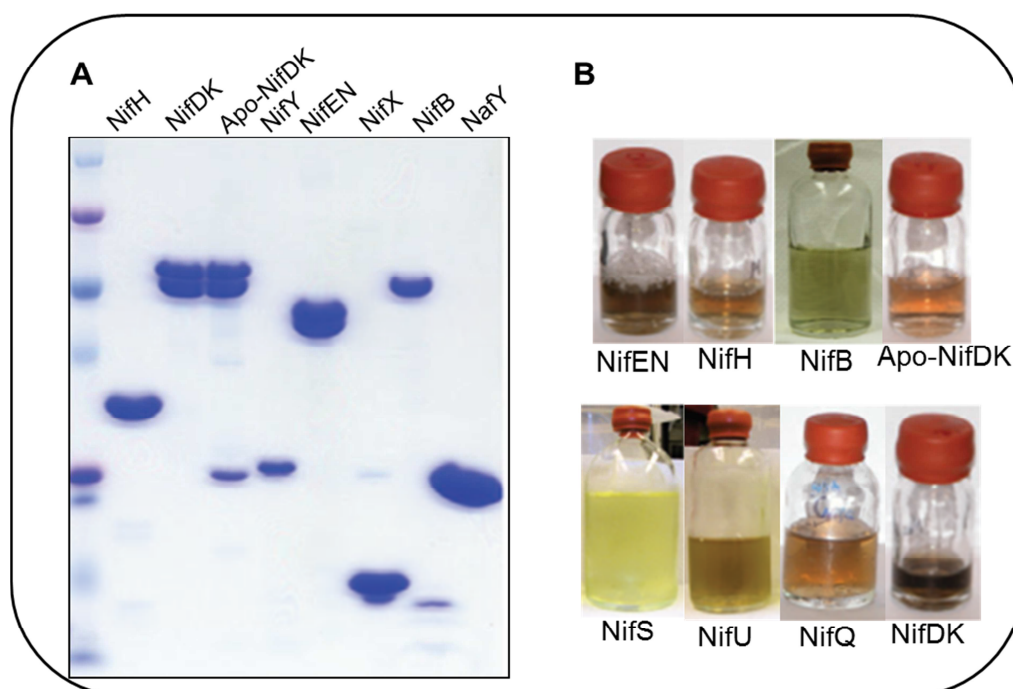
**Abbildung 6. Schematisches Modell der Eisen-Molybdän-Cofaktor-Biosynthese.** Zunächst wird im Zusammenspiel von NifS mit NifU ein [2Fe-2S]- bzw. [4Fe-4S]-Cluster synthetisiert. Unter Beteiligung der Proteine NifB, NifEN, NifH, NifQ und NifV erfolgt die Synthese des vollständigen Fe-Mo-Co auf NifEN. Im letzten Schritt wird mit Hilfe des NafY Proteins Fe-Mo-Co auf die  $\alpha$ -Untereinheit (NifD) der Dinitrogenase übertragen. Modifiziert nach (95,102,107).

#### 2.4. *In vitro* Biosynthese des Fe-Mo-Cofaktors und die Funktionen der beteiligten Proteine

Die detaillierte Aufklärung des Fe-Mo-Co-Biosyntheseweges wies völlig neue Wege in der präparativen Clusterchemie und erbrachte neue Erkenntnisse zum Biosyntheseprozess. Diese Erkenntnisse können dazu dienen, Fe-Mo-Co-ähnliche Cluster herzustellen, die in der Lage sind N<sub>2</sub> in NH<sub>3</sub> umzuwandeln. Ein entscheidender Durchbruch zur Identifizierung der an der Fe-Mo-Co-Biosynthese beteiligten Proteine gelang der Arbeitsgruppe Ludden mit der Etablierung eines *in vitro* Biosynthesesystems. In ersten Experimenten wurde eine geeignete Auswahl von zwei verschiedenen zellfreien Extrakten von Mutanten, die hinsichtlich unterschiedlicher Proteine der Cofaktorbiosynthese defekt waren, verwendet. Während beide Stämme nur Cofaktor-freies Apo-Protein bildeten, lag nach Vereinigung der Extrakte die komplette Cofaktorsynthesemaschinerie vor. Infolgedessen konnte das Nitrogenase-System

aktiviert werden. Dieses System wurde dann als Aktivitätstest bei der Anreicherung und Reinigung weiterer Nif-Proteine und Fe-Mo-Co-Intermediaten entlang des Reifungswegs der Nitrogenase eingesetzt. Ein weiterer Durchbruch gelang der Arbeitsgruppe mit der Isolation des Fe-Mo-Co. Die Nitrogenase-Aktivität konnte durch Insertion des isolierten Fe-Mo-Co in die Apo-Nitrogenase wiederhergestellt werden. Dieses Verfahren dient als Standard-Assay zur Qualitätskontrolle der beteiligten Proteine (75,76).

Über viele Jahre wurden in verschiedenen Laboratorien alle an der Synthese der Nitrogenase-Cofaktoren beteiligten Proteine in ihrer aktiven Form gereinigt. Viele dieser Proteine tragen Fe-S-Cluster oder andere Cofaktoren wie Pyridoxalphosphat (PLP) (Abb. 7). Die Isolation der Nif-Proteine und Fe-Mo-Co-Intermediate ermöglicht die komplette Nachstellung des Fe-Mo-Co Biosynthesewegs *in vitro* unter ausschließlicher Verwendung von gereinigten Komponenten. Es zeigte sich, dass die Genprodukte NifB, NifEN und NifH notwendig und ausreichend sind für die Fe-Mo-Co-Biosynthese aus Eisen, Schwefel, Molybdän, Homocitrat, Mg-ATP und einem Reduktionsmittel (106). Weitere nif-Genprodukte wie Nif-U, S, V, Q, W, Z, X, Y sind zwar nicht zwingend für diesen Prozess erforderlich, ihre Anwesenheit führt jedoch zur Maximierung der Cofaktorbiosyntheserate. Diese Proteine können *in vitro* durch Zugabe von geeigneten chemischen Substraten ersetzt werden. Im Folgenden sollen die Funktionen der an der Cofaktorbiosynthese beteiligten Proteine sowie ihrer Rolle in verschiedenen Schritten entlang des Reifungswegs näher beschrieben werden



**Abbildung 7. Die bunte Welt der Nitrogenase.** Viele Nif-Proteine tragen [Fe-S]-Cluster oder andere Cofaktoren wie Pyridoxalphosphat (PLP), die für ihre Funktionen essentiell sind (A) SDS-PAGE-Analyse von gereinigten Nif-Proteinen. (B) Anaerobe Präparationen verschiedener gereinigter Nif-Proteine. Modifiziert nach (102).

### 2.4.1. Rolle der NifUS-Proteine bei der Bildung des Fe-S-Clusters

Eine Reihe eleganter biochemischer und genetischer Analysen in den Laboren von Dean und Johnson führten zur Entdeckung des ersten Fe-S-Cluster-Biosynthesystems, das spezifisch für die Bildung und Bereitstellung der Fe-S-Cluster für Nif-Proteine ausgelegt ist. Die Deletion des *nifS*-Gens führte nur zu einer Verminderung der Nitrogenase-Aktivität und war unter den Bedingungen der Stickstofffixierung nicht letal für *A. vinelandii* (116). Dies ließ vermuten, dass mindestens ein weiteres System zur Bildung von Fe-S-Clustern existieren muss. Tatsächlich wurden zwei weitere bakterielle Systeme (ISC und SUF) entdeckt (117).

Durch die koordinierte Aktivität der NifS- und NifU-Proteine und unter Beteiligung von Cystein und Eisen konnte gezeigt werden, dass zunächst ein einfaches [2Fe-2S]-Cluster synthetisiert und dann durch Dimerisierung in ein [4Fe-4S]-Cluster transformiert wird. Das [4Fe-4S]-Cluster dient als metabolisches Substrat für die Synthese des Fe-Mo-Co und des P-Clusters der Nitrogenase (117).

NifS ist eine Pyridoxalphosphat-abhängige Cystein-Desulfurase, welche die Bildung von L-Alanin und elementarem Schwefel aus Cystein katalysiert. Der Schwefel wird intermediär als Persulfid an einen aktivierten Cysteinrest<sup>325</sup> von NifS gebunden (35). Die Entdeckung eines enzymgebundenen Persulfid-Intermediats, das aus Cystein hervorgeht, war grundlegend für die Aufklärung der Fe-S-Cluster-Assemblierung in biologischen Systemen.

Das 33-kDa Homodimer-NifU-Protein enthält pro Untereinheit ein permanenten [2Fe-2S]-Cluster und dient als Gerüst-Protein für die Synthese der Fe-S-Cluster (118). Die NifU-Struktur kann in drei Domänen unterteilt werden: In den *N*- und *C*-terminalen Domänen werden transiente Fe-S-Cluster für den Transfer zu anderen Nif-Proteinen assembliert. In der mittleren Domäne befinden sich vier essentielle Cysteine, welche ein redox-aktives permanentes [2Fe-2S]-Cluster binden (35). Dieses Cluster ist an die Übergabe des transienten Clusters an weitere Nif-Proteine beteiligt (43,119).

Es wurde gezeigt, dass NifS und NifU aus *K. pneumoniae* einen Komplex bilden, wobei NifS den Schwefel auf NifU überträgt. Durch Zugabe von Eisen wurde ein [2Fe-2S]- bzw [4Fe-4S]-Cluster am NifU-Protein gebildet. Die Rolle des NifUS-Komplexes für die Reifung des NifH-Proteins und des P-Clusters konnte mittels *in vitro* Experimenten deutlich gezeigt werden. Die Übertragung eines [4Fe-4S]-Clusters von einem NifUS-Komplex auf ein Apo-NifH führte zur Rekonstitution der Dinitrogenase-Reduktase-Aktivität (103). Die Isolation einer P-Cluster-freien Apo-NifDK-Variante aus einem *nifUS*-Deletionshintergrund bestätigt die Rolle des NifUS-Komplexes bei der Reifung des P-Clusters (116).

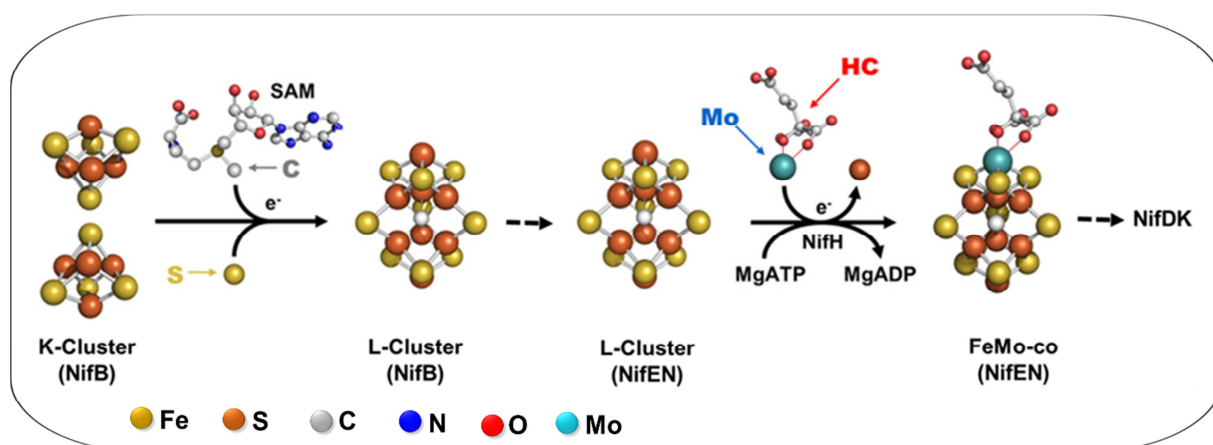
### 2.4.2. NifB und die Synthese des NifB-Cofaktors

Das homodimere NifB-Protein katalysiert die Synthese eines Fe-S-Cluster-haltigen NifB-Cofaktors (NifB-Co). Die genaue Struktur des NifB-Co ist zwar nicht bekannt, weist aber bereits die Grundstruktur von Fe-Mo-Co auf. Spektroskopische Studien zeigen, dass das erst kürzlich identifizierte hexakoordinierte zentrale Kohlenstoffatom schon in NifB-Co vorhanden ist. Jedoch enthält NifB-Co weder Molybdän noch Homocitrat (120).

NifB-Co stellt das Fe-S-Grundgerüst sowohl für die Biosynthese des Fe-Mo-Cofaktors als auch für die Biosynthese der alternativen Cofaktoren (Fe-V-Co und Fe-Fe-Co) zur Verfügung. Im Gegensatz zu anderen Genen, die in allen drei Nitrogenase-Systemen eigenständig sind, scheint das *nifB*-Gen für alle Nitrogenase-Systeme essentiell zu sein (110,121).

Primärsequenzanalyse zeigt, dass die N-terminale Domäne von NifB Ähnlichkeit zu Radikal-S-Adenosylmethionin (SAM)-Proteinen aufweist (122) und phylogenetisch betrachtet der Klasse der Radikal-SAM-Reifungsproteine der [Fe-Fe]-Hydrogenasen HydE und HydG nahesteht (123).

Aktuelle Studien im Ribbe-Labor zeigen, dass NifB eine Transformation von zwei [4Fe-4S]-Cluster (K-Cluster) zu einem [8Fe-9S]-Cluster (L-Cluster) in einem SAM-abhängigen Prozess unter der Einführung eines Schwefelatoms und eines Kohlenstoffatoms katalysiert. Anschließend wird das L-Cluster zu Fe-Mo-Co in einer NifH-vermittelten Insertion von Molybdän und Homocitrat (HC) innerhalb NifEN transformiert (Abb.8) (95,108).



**Abbildung 8 .Transformation zweier [4Fe-4S]-Cluster (K-Cluster) zu Fe-Mo-Co.** In einem SAM-abhängigen Prozess katalysiert NifB die Umwandlung von zwei [4Fe-4S]-Clustern zu einem L-Cluster. In Anwesenheit von NifH, Molybdän, Homocitrat, Mg-ATP und einem Reduktionsmittel erfolgt die Transformation des L-Clusters zu Fe-Mo-Co auf NifEN. Abb. übernommen von Hu, *et al* (95).

Die Transformation des NifB-Co zu Fe-Mo-Co wurde mittels eines NifB-Co-abhängigen Fe-Mo-Co-Synthese-Assays gezeigt. Fe-Mo-Co kann aus  $^{55}\text{Fe}$ - und  $^{35}\text{S}$ - markiertem NifB-Co in

Anwesenheit von NifEN, NifH, Molybdän, Homocitrat, Mg-ATP und einem Reduktionsmittel synthetisiert werden. Die Nitrogenase-Aktivität kann durch das Einfügen des *in vitro* synthetisierten Fe-Mo-Co ins Apo-NifDK wiederhergestellt werden. Die Menge des synthetisierten Fe-Mo-Co aus NifB-Co kann anschließend durch die Acetylen-reduzierende Aktivität der Nitrogenase bestimmt werden (106,110).

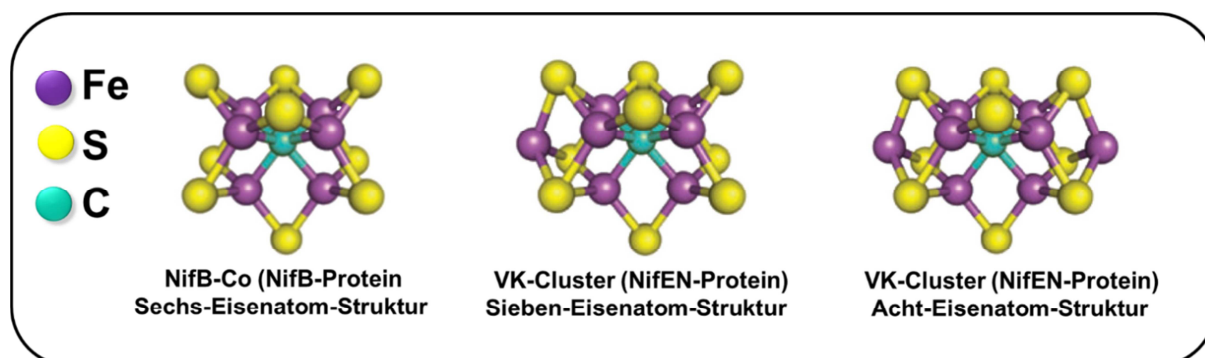
Interessanterweise kann die katalytische Eigenschaft der Nitrogenase durch das Einfügen des NifB-Co anstelle des Fe-Mo-Co im Apo-NifDK manipuliert werden. Eine ATP-abhängige Protonenreduktionsaktivität der rekonstituierten Nitrogenase (NifDK-NifB-Co) kann wieder hergestellt werden. Jedoch war die Nitrogenase nicht in der Lage  $N_2$  zu  $NH_3$  zu reduzieren (124). Weitere biochemische und biophysikalische Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften von NifDK-NifB-Co würden nicht nur einen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der  $N_2$ -Bindung und  $H_2$ -Produktion der Nitrogenase liefern, sondern auch dabei helfen, eine gezielte Synthese von robusten und hochkomplexen Metallclustern mit optimaler Selektivität und Aktivität durch z. B. Metallspezien-Austausch zu etablieren (125).

### 2.4.3. NifEN ist die zentrale Synthesepattform des Fe-Mo-Co

NifEN ist ein 200-kDa  $\alpha_2\beta_2$  heterotetramerer Proteinkomplex, der zwei identische [4Fe-4S]-Cluster pro NifEN-Tetramer enthält (126). Die [4Fe-4S]-Cluster des NifEN-Proteins könnten eine für die Cofaktor-Biosynthese notwendige Redoxfunktion übernehmen, da ein Ferredoxin codierendes *fdxB*-Gen in einem gemeinsamen Operon mit *nifE* und *nifN* liegt (127). Da die Gensequenzen von *nifE* und *nifN* eine hohe Ähnlichkeit zu denen von *nifD* bzw. *nifK* aufweisen, wurde für NifEN und NifDK ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung vorgeschlagen (128). Es wurde daher postuliert, dass NifEN als Synthesepattform des Fe-Mo-Cofaktors fungiert, da die Produkte der Strukturgene (NifD und NifK) für die Zusammenfügung der einzelnen Bestandteile des Fe-Mo-Co nicht erforderlich sind (129).

Die Funktion des NifEN-Proteinkomplexes ist essentiell für die Fe-Mo-Co-Biosynthese. Mindestens drei Reaktionen des Fe-Mo-Co-Biosyntheseweges finden innerhalb des NifEN-Komplexes statt: (i) Transformation des NifB-Co (L-Cluster) zum VK-Cluster (NifEN-gebundenen Fe-Mo-Co-Vorläufer), (ii) der Einbau von Molybdän und (iii) der Einbau von Homocitrat. Die Transformation des NifB-Co zum VK-Cluster konnte durch den Einbau von zusätzlichem  $^{55}Fe$  in NifB-Co während Fe-Mo-Co-Biosynthese gezeigt werden (110,120). Obwohl das VK-Cluster, wie NifB-Co weder Molybdän noch Homocitrat enthält, zeigt das VK-Cluster im Gegensatz zu NifB-Co ein EPR-Signal im reduzierten und oxidierten Zustand (105,111). Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS)-Daten belegen auch Unterschiede zwischen dem isolierten NifB-Co und dem VK-Cluster und unterstützen die Annahme einer Sechs-Eisenatom-Struktur für NifB-Co und mindestens einer Sieben- oder

Acht-Eisenatom-Struktur sowohl für die isolierten VK-Cluster als auch für die NifEN-gebundenes VK-Cluster (Abb. 9) (120,130).



**Abbildung 9. Modell für die chemische Transformation vom NifB-Co zum VK-Cluster durch den Einbau von zusätzlichem Eisen während Fe-Mo-Co-Biosynthese.** NifB-Co weist die Grundstruktur des Fe-Mo-Co auf und enthält schon das erst kürzlich identifizierte hexakoordinierte zentrale Kohlenstoffatom (grün gezeigt). EXAFS-Daten begünstigen eine Sechs-Eisenatom-Struktur für NifB-Co und mindestens einer Sieben- oder Acht-Eisenatom-Struktur für das VK-Cluster des NifEN-Komplexes (102).

Die zweite Reaktion, die innerhalb NifEN stattfindet, ist der Einbau von Molybdän oder einem Mo-haltigen Fragment in das VK-Cluster. EXAFS-Analysen zeigen, dass Molybdän in NifEN ein Teil eines [Mo-3Fe-4S]-Clusters ist. Der isolierte Mo-haltige-NifEN-Komplex kann die Synthese des Fe-Mo-Co *in vitro* als Mo-Donor in Anwesenheit von NifH und Mg-ATP unterstützen. Die Rolle des NifH-Proteins für die Mo-Prozessierung als Eintrittsstelle für Mo in den Biosyntheseweg und damit als Mo-Insertase ins NifEN, wurde in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Zum einen konnte der Einbau von  $^{99}\text{Mo}$  in NifH und in NifEN während der *in vitro* Fe-Mo-Co-Biosynthese-Reaktion gezeigt werden (131). Zum anderen konnte Mo-gebundenes NifH-Protein, das aus Reaktionsansätzen der *in vitro* Fe-Mo-Co-Biosynthese isoliert wurde, mittels EXAFS-Analyse nachgewiesen werden (114).

Die dritte Reaktion, in der NifEN als Synthesepattform fungiert, ist der Einbau von Homocitrat in den Fe-Mo-Co-Vorläufer, das VK-Cluster. Für die Einfügung von Homocitrat als terminalen Schritt in der Fe-Mo-Co-Synthese sind NifEN, NifH und Molybdän erforderlich (131). An welcher Stelle genau Homocitrat in den Biosyntheseweg eintritt, ist jedoch weiterhin unbekannt.

#### 2.4.4. Der Weg des Molybdäns in das MoFe-Protein

Folgender Abschnitt gibt einen Überblick über die Proteine, die an der Molybdänaufnahme, Homöostase, Speicherung, Regulation und an der Fe-Mo-Co-Biosynthese beteiligt sind.

#### 2.4.4.1. Mo-Transport und Mo-Homöostase

Für die Aufnahme des bioverfügbaren Molybdäns, überwiegend als Molybdat ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ), stehen verschiedene Transportsysteme zur Verfügung (132). Der hochaffine ModABC-Transporter, der zur ABC (ATP-binding cassette)-Transporterfamilie gehört, besteht aus drei Proteinkomponenten: ModA, ModB und ModC. Durch die Bindung von Molybdat an das periplasmatische Bindeprotein ModA kommt es zu einer Konformationsänderung, so dass Molybdat in der Bindetasche festgehalten wird. Das homodimere Membranprotein ModB bildet einen Tunnel für den Molybdat-Transfer und kann mit den beiden anderen Komponenten ModA und ModC interagieren. Durch Interaktion mit ModA erfährt ModB eine Konformationsänderung, die zur ATP-Hydrolyse durch ModC und zum Transport von Molybdat über die Membran führt (133). Bei geringen Sulfatkonzentration ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) kann Molybdat aufgrund der strukturellen Verwandtschaft auch über den Sulfat-Transporter aufgenommen werden. Weiterhin kann ein Molybdattransport über einen niederaffinen und unspezifischen Ionentransport erfolgen (134).

Einige Bakterien synthetisieren kleine Mo-Bindeproteine, sogenannte Molbindine, deren Untereinheiten aus etwa 70 Aminosäuren bestehen (135). In *A. vinelandii* wird Molybdat nach dem Transport in die Zelle zunächst an Molbindin (ModG) gebunden, bevor es gezielt an Proteine der Cofaktorbiosynthese weitergeleitet wird (136). ModG könnte daher als Molybdat-Puffer fungieren. Außerdem wurde eine regulatorische Funktion der Molbindin im Mo-Metabolismus beschrieben (91,137). Für langfristige Speicherung von Molybdat synthetisiert *A. vinelandii* ein Molybdat-Speicherprotein (MoSto), das bis zu 100 Molekülen Molybdat pro Hexamer binden kann (138).

#### 2.4.4.2. Rolle des NifQ-Proteins an der Mo-Prozessierung

Die Beteiligung des NifQ-Proteins an der Prozessierung und dem Einbau von Molybdän in Fe-Mo-Co scheint spezifisch zu sein (139). Eine nifQ-Deletionsmutante ist nicht in der Lage, eine aktive Mo-abhängige Nitrogenase zu bilden. Die Ausschaltung dieses Gens hat jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der alternativen (Mo-unabhängigen) Nitrogenasesysteme. Ein nifQ-Gendefekt kann durch eine Kultivierung in Gegenwart von relativ hohen Mengen Molybdän und Cystein, als Schwefel-Quelle für Fe-S-Cluster, kompensiert werden (139,140). Die Aminosäuresequenz des NifQ-Proteins ist einzigartig und zeigt keine Ähnlichkeit zu der anderer Proteine wie z. B. Mo-Bindeproteine oder Mo-Speicherproteine (141). Der C-Terminus der NifQ-Proteinsequenz weist eine hochkonservierte Cx4Cx2Cx5C-Domäne auf. Für diese Domäne wird eine Funktion als Koordinationsstelle für ein [Fe-S]-Cluster oder ein Mo-haltiges Fe-S-Cluster vorgeschlagen (103). Das aus *A. vinelandii* isolierte NifQ-Protein hat eine molekulare Masse von 25-kDa und enthält ein redoxaktives [3Fe-4S]-Cluster. Das



Protein zeigt im reduzierten Zustand ein EPR-Signal, das dem des synthetischen hergestellten [Mo<sub>3</sub>Fe-4S]-Clusters sehr ähnlich ist (132,142). NifQ kann die Synthese des Fe-Mo-Co *in vitro* als Mo-Donator in Anwesenheit von NifEN und NifH effizient unterstützen, was seine Rolle als physiologischer Mo-Donor bestätigt (142). Da das Element Molybdän von den Zellen in Form von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> oder MoO<sub>3</sub> (OH)<sup>1-</sup>-Ionen aufgenommen wird, müssen mindestens drei chemische Transformationsschritte durchlaufen werden bevor Mo-Ion in Fe-Mo-Co eingebaut wird. Diese sind: (i) eine Änderung der Ligandensphäre (Ersetzung der O-Liganden durch S-Liganden) (143), (ii) die Reduktion des Molybdäns von Mo<sup>VI</sup> zu Mo<sup>IV</sup>, da im Fe-Mo-Co die Oxidationsstufe Mo<sup>IV</sup> vorliegt und (iii) die Inkorporation des Molybdäns in ein [Fe-S]-Cluster (132). In diesem Zusammenhang wurde eine attraktive Hypothese für die Rolle des NifQ als spezifischen Molybdän-Donor für die NifEN-NifH-Proteine in der Fe-Mo-Co-Biosynthese formuliert. Demnach katalysiert NifQ die Insertion von Molybdän in ein [3Fe-4S]-Cluster, gefolgt von einer reduktiven Freisetzung von Mo<sup>IV</sup> aus dem [Mo<sub>3</sub>Fe-4S]-Cluster. Abschließend wird nach dieser Hypothese das Molybdän zu den NifH-NifEN-Proteine weitergeleitet (132,142).

#### 2.4.5. Das Homocitrat-Synthase NifV-Protein

Die Homocitrat-Synthase NifV ist ein homodimeres Protein und katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA und  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Homocitrat (144). Eine *nifV*-Deletion in *K. pneumoniae* bewirkt, dass das Homocitrat des Fe-Mo-Co durch Citrat ersetzt wird, was zur Akkumulierung eines Mo-Fe-Proteins mit veränderten katalytischen Eigenschaften führt (145). Diese *nifV*-Deletionmutante ist in der Lage, Protonen und Acetylen effektiver zu reduzieren als der Wildtyp, jedoch kann sie Stickstoff (N<sub>2</sub>) nicht mehr reduzieren (113,146). Durch Zugabe von Homocitrat zum Wachstumsmedium kann der Effekt der *nifV*-Deletion aufgehoben werden (112,113,147). Der Ersatz des Homocitrats durch ähnliche organische Verbindungen in einem *in vitro* Fe-Mo-Co-Synthesystem führt zu einer drastischen Abnahme in der N<sub>2</sub>-Reduktionsfähigkeit (148). Dies weist auf eine mögliche Beteiligung des Homocitrats an der Substratbindung hin. Die genaue Rolle von Homocitrat an der Katalyse bleibt jedoch unklar. *In vitro* <sup>99</sup>Mo-Radiomarkierungsexperiment zeigt, dass die Anwesenheit von NifEN, NifH und Mo für den Einbau des Homocitrats essentiell sind (131). Es bleibt noch zu klären, wie die Fe-Mo-Co-Synthesemaschinerie zwischen Homocitrat und anderen organischen Säuren in der Zelle unterscheidet.

#### 2.4.6. Die Metallcluster-Träger-Proteine NifX und NafY

NifX und NafY sind Mitglieder der Nitrogenase-Cofaktor-bindenden Proteinfamilie. Dieser Familie können auch NifY, die C-terminale Domäne von NifB sowie die VnfX- und VnfY-

Proteine der Vanadium-Nitrogenase zugeordnet werden (115,149). Diese Proteine haben gemeinsame biochemische Eigenschaften. Sie besitzen eine konservierte Aminosäuresequenz für die Bindung der Fe-Mo-Co-Intermediate entlang des Reifungswegs. Das NifX-Protein ist das kleinste Mitglied der Familie und besteht aus einer einzigen Domäne. Die NifB-, NifY- und NafY-Proteine bestehen aus einer C-terminalen, NifX-ähnlichen Domäne und einer N-terminalen Domäne mit unterschiedlichen Funktionen. NifX ist ein 17-kDa monomeres Protein und bindet ein Metall-Cluster pro Monomer. NifX bindet an die Fe-Mo-Co-Vorstufen NifB-Co und VK-Cluster des NifEN-Gerüstproteins. Es wird daher vermutet, dass NifX diese relativ labilen Metallcluster-Intermediate stabilisiert, wodurch die Cofaktor-biosynthese gewährleistet wird (111,150). Die funktionelle Charakterisierung des NafY-Proteins zeigt, auf welchem Weg Fe-Mo-Co nach seiner Synthese in das Apo-MoFe-Protein gelangt. Das NafY-Protein fungiert als Chaperon-Insertase für die Einführung des Fe-Mo-Co ins Apo-NifDK. NafY ist ein 26-kDa Protein und besteht aus zwei Domänen, die getrennt exprimiert und gereinigt werden können. Die 12-kDa N-terminale Domäne ist für die Bindung an Apo-NifDK erforderlich, während die 14-kDa C-terminalen NifX-ähnliche Domäne für die Bindung des Fe-Mo-Co zuständig ist (151). Das Fe-Mo-Co-gebundene NafY bindet an die Apo-NifDK und bewirkt eine Konformation, die die Inkorporation des Cofaktors begünstigt (Insertase-Funktion) (152). Nach dem Einbau des Cofaktors in Apo-NifDK dissoziiert das NafY-Protein als Dimer von der Holo-Dinitrogenase ab (151).

### 3. Die Hydrogenase

#### 3.1. Die Hydrogenasen und der Wasserstoff-Metabolismus

Hydrogenasen sind komplexe Metalloenzyme, welche die reversible heterolytische Spaltung von molekularem Wasserstoff ( $H_2$ ) katalysieren (153,154). Die Richtung der Reaktion hängt vom Potenzial der Redoxpartner ab. Man unterscheidet üblicherweise zwischen Wasserstoff bildenden (Protonen reduzierenden) und Wasserstoff spaltenden (Wasserstoff oxidierenden) Enzymen, den sogenannten „Aufnahme“-Hydrogenasen.

In zahlreichen Organismen erfüllen Hydrogenasen im Wasserstoff-Metabolismus wichtige Funktionen im Energiehaushalt. Aufgrund des für biologische Verhältnisse niedrigen Normalpotentials des Protonen/ $H_2$ -Paares ( $2H^+/H_2$ ,  $E^0 = -420$  mV) ist  $H_2$  zur Reduktion der meisten Komponenten der Atmungskette sowie fast aller bekannten biologischen Elektronenakzeptoren wie z. B.  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  oder  $Fe^{3+}$  thermodynamisch in der Lage (155).

Einerseits können viele Mikroorganismen wie z. B. *E. coli*, Knallgasbakterien, und Pseudomonaden  $H_2$  als Elektronendonator zur Bereitstellung von Stoffwechselenergie nutzen. Dabei wird die aus der Oxidation von Wasserstoff resultierende freie Enthalpie in Form von Reduktionsäquivalenten gespeichert oder alternativ in Form energiereicher Elektronen in die Atmungskette weitergeleitet. Der über die Cytoplasmamembran aufgebaute Protonengradient erzeugt eine protonenmotorische Kraft. Diese treibt die ATP-Synthasen an. Das so generierte ATP ermöglicht wiederum eine Vielzahl von biologischen Prozessen(156).

Andererseits können viele obligat oder fakultativ anaerobe Organismen Wasserstoff produzieren. Die anfallenden Reduktionsäquivalente, die meist infolge fermentativer Stoffwechselprozesse und Vergärung von organischen Makromolekülen entstehen, werden durch Hydrogenasen zur Erhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts entsorgt, wobei überschüssige Reduktionsäquivalente auf Protonen als alleinige Elektronenakzeptoren übertragen werden. Beispiele hierfür sind Arten der Gattungen *Clostridien* und *Thermotoga*. Einige Organismen besitzen sowohl Aufnahme- als auch Bildungs-Hydrogenasen und sind somit zum Energie-Recycling befähigt (157).

#### 3.2. Klassifikation der Hydrogenasen

Obwohl allen Hydrogenasen gemeinsam ist, dass sie die chemisch denkbar einfachste Reaktion katalysieren, handelt es sich bei ihnen um eine eher heterogene Klasse von Enzymen. Hydrogenasen unterscheiden sich hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten, der molekularen Massen, der Cofaktoren, der Spezifität gegenüber

unterschiedlichen physiologischen Elektronendonatoren und -akzeptoren, der spezifischen Aktivitäten und der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff erheblich (158-161). Die Klassifikation der Hydrogenasen kann z. B. anhand ihrer zellulären Lokalisation oder der von ihnen genutzten Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren erfolgen. Jedoch ist die Klassifizierung der Hydrogenasen nach dem Metallgehalt im aktiven Zentrum in struktureller und mechanistischer Hinsicht am Aussagekräftigsten. Folglich werden Hydrogenasen entsprechend dem Aufbau ihrer aktiven Zentren in drei phylogenetisch unabhängigen Klassen eingeteilt (157,162,163). Diese Klassen sind [Fe]-Hydrogenasen (164,165), [FeFe]-Hydrogenasen (31,166,167) und [NiFe]-Hydrogenasen (159,168-170).

### 3.2.1. [Fe]-Hydrogenasen

Die Klasse der [Fe]-Hydrogenasen, ehemals „Eisen-freie“ und später [Fe-S]-Cluster-freie Hydrogenasen, werden auch als  $H_2$ -bildende Methylentetrahydromethanopterin-dehydrogenase (Hmd) bezeichnet. Ihre Vertreter wurden in einer Reihe von methanogenen Archaea entdeckt und charakterisiert (171). Die Enzyme katalysieren im Zuge der Methanogenese einen Hydrid-Transfer von  $H_2$  auf einen gebundenen Cofaktor, wobei durch die Oxidation von  $H_2$  gleichzeitig Methenyltetrahydromethanopterin (Methenyl- $H_4MPT^+$ ) zu Methylentetrahydromethanopterin (Methylen- $H_4MPT$ ) und  $H^+$  reduziert wird (157,172,173).

Dieser Prozess ist Teil der wasserstoffabhängigen  $CO_2$ -Reduktion zu Methan und dient der Eliminierung überschüssiger Reduktionsäquivalente. Die Hmd ist lichtsensitiv und wird durch CO und  $CN^-$  reversibel inhibiert. Anders als [FeFe]- und [NiFe]-Hydrogenasen ist Hmd nicht in der Lage, die  $H_2$ -abhängige Reduktion von typischen redoxaktiven Farbstoffen bzw. die Nutzung dieser als Donatoren zur Protonenreduktion zu katalysieren (174). Die Kristallstruktur der [Fe]-Hydrogenase konnte mittlerweile mit und ohne Cofaktor aufgeklärt werden (164,175). Das homodimere Enzym enthält einen einzigartigen Eisen-Guanylylpyridinol-Cofaktor (FeGP), der über einen Cysteinrest mit der Proteinmatrix kovalent gebunden ist. Das Eisenatom des Cofaktors ist mit zwei CO-Liganden und einem Guanylylpyridinol-Derivat über eine Acyl-Gruppe und über ein  $sp^2$ -hybridisiertes Stickstoffatom koordiniert (Abb. 10) (164,176).

### 3.2.2. [FeFe]-Hydrogenasen

Die [FeFe]-Hydrogenasen finden sich hauptsächlich in anaeroben Prokaryoten. Sie sind auch die einzigen Hydrogenasen, die in manchen niederen Eukaryoten wie z. B. Grünalgen, Trichomonaden, anaeroben Pilzen und Ciliaten gefunden wurden (162,163). Physiologisch gesehen besteht diese Gruppe von Enzymen hauptsächlich aus Wasserstoff-bildenden Hydrogenasen. Die [FeFe]-Hydrogenasen weisen die höchste Aktivität mit einer einzigartigen

katalytischen Effizienz auf. Ihre primäre Funktion ist die Entfernung von überschüssigen Reduktionsäquivalenten durch  $H_2$ -Bildung. Im Gegensatz zu [NiFe]-Hydrogenasen werden [FeFe]-Hydrogenasen durch CO und  $O_2$  irreversibel inaktiviert.

Die Kristallstrukturen der [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* (31) und *Desulfovibrio desulfuricans* (177) lassen Kanäle für Protonen bzw. für Wasserstoff erkennen, die von der Oberfläche des Enzyms zum aktiven Zentrum führen. Im aktiven Zentrum ist ein H-Cluster gebunden (Abb. 10). Dieser setzt sich aus 6 Eisenatomen zusammen, von denen 4 in einem [4Fe-4S]-Cluster arrangiert sind. Die beiden übrigen Eisenatome bilden ein binukleares Zentrum, das über einen Cysteinrest mit dem [4Fe-4S]-Zentrum verbunden ist. Beide Eisenatome tragen jeweils einen Kohlenmonoxid- und einen Cyanid-Liganden (178). Außerdem sind sie über ein drittes CO-Molekül und eine Dithiolat-Brücke eines Di(Thiomethyl)-Amin miteinander verbunden (31,179).

Das zum [4Fe-4S]-Cluster distale Eisenatom stellt die  $H_2$ -Bindestelle dar. Es ist im Gegensatz zum proximalen Eisen nicht redoxaktiv und verbleibt während des Reaktionszyklus im Low-Spin-Fe(II)-Zustand (15). An dieses distale Eisen bindet auch extrinsisches CO, das die [FeFe]-Hydrogenase inhibiert. Überwiegend handelt es sich bei [FeFe]-Hydrogenasen um monomere cytoplasmatische Enzyme. Allerdings wurden auch dimere, trimere und tetramere Strukturen beschrieben. Die Hydrogenasen von *C. pasteurianum*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Desulfovibrio fructosovorans* und *Thermotoga maritima* enthalten zusätzlich zum [4Fe-4S]-Cluster des H-Clusters bis zu drei [4Fe-4S]-Cluster und ein [2Fe-2S]-Cluster. Diese dienen dem Elektronentransport vom Ferredoxin zum aktiven Zentrum (180-182).

Die Reifung von [FeFe]-Hydrogenasen wird durch drei akzessorische Proteine (HydE, HydF und HydG) vollzogen (183). HydE und HydG sind Radikal-SAM-Enzyme, welche die Cyanid- und die Carbonyl-Liganden aus Tyrosin bereitstellen (184-187). HydF ist ein Fe-S-Protein mit GTPase-Aktivität. Es wurde als Gerüstprotein für den Zusammenbau des [FeFe]-Zentrums und die anschließende Übertragung auf das Hydrogenase-Apoprotein identifiziert (188).

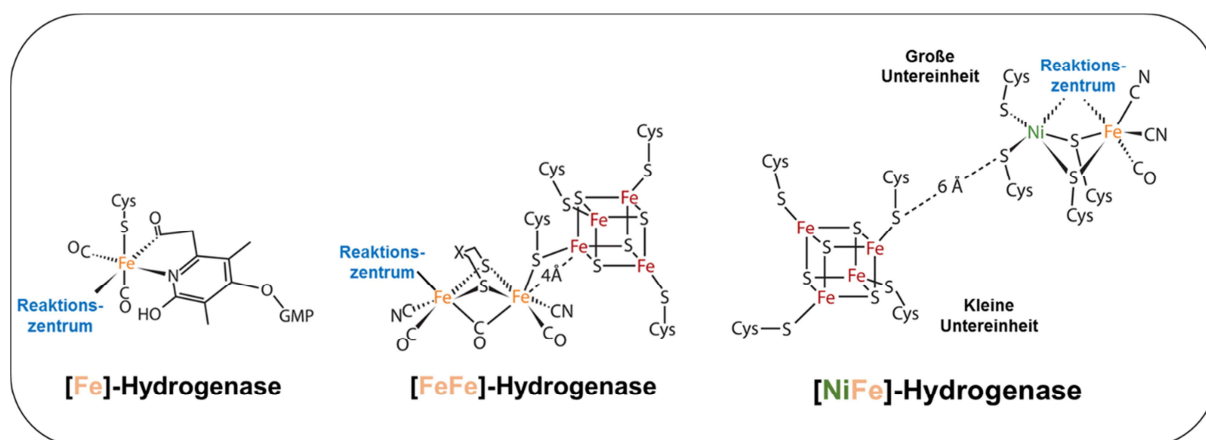
### 3.2.3. [NiFe]-Hydrogenasen

Die vielfältigste und die am weitesten verbreitete Hydrogenase-Klasse ist die der [NiFe]-Hydrogenasen. Sie wurde zuerst in methanogenen Archaea und verschiedenen  $H_2$ -oxidierenden Bakteriengruppen gefunden (171). Im Allgemeinen bestehen [NiFe]-Hydrogenasen aus mindestens zwei hoch konservierten Untereinheiten, einer etwa 40- bis 68-kDa großen Untereinheit und einer kleinen Untereinheit mit molekularen Massen von etwa 15- bis 40-kDa. Während die große Untereinheit das bimetallische Zentrum tief im Molekülinneren einschließt, sind an der kleinen Untereinheit bis zu drei [Fe-S]-Zentren koordiniert (189).

Die meisten Enzyme enthalten oft weitere nicht konservierte Untereinheiten, die mit dem jeweiligen physiologischen Elektronendonator bzw. -akzeptor multimere Komplexe mit diversen Funktionen bilden. Das aktive Zentrum ist über einen hydrophoben Gaskanal sowie vermutete Protonentransferwege mit der Proteinoberfläche verbunden (190).

Das binukleare aktive Zentrum besteht aus den zwei namensgebenden Übergangsmetallen, einem Nickel- und einem Eisenatom, die über vier Cystein-Thiolate an das Protein gebunden sind. Das Nickelatom ist über vier Cysteine quadratisch-pyramidal koordiniert. Zwei dieser Cysteine koordinieren ausschließlich das Nickelatom. Zwei Cystein-Reste dienen als Brückenliganden zwischen Nickel und Eisen. Das oktaedrisch gebundene Eisenatom koordiniert drei diatomare Liganden, zwei Cyanide ( $\text{CN}^-$ ) und einen Carbonylliganden CO (Abb. 10) (178,191). In einigen Organismen wie z. B. bei *Methanococcus voltae* ist das Nickel-koordinierende Cystein durch ein Selenocystein ersetzt. Die [NiFeSe]-Hydrogenasen weisen eine höhere Aktivität und Resistenz gegenüber der Inaktivierung von Sauerstoff im Vergleich zu den [NiFe]-Hydrogenasen auf (192).

Die kleine Untereinheit dient dem Elektronentransfer zwischen katalytischem Zentrum und der Proteinoberfläche durch die [Fe-S]-Cluster. Drei linear angeordnete [Fe-S]-Cluster der kleinen Untereinheit werden bezüglich ihrer Anordnung zum aktiven Zentrum als proximal, medial und distal bezeichnet. Das proximale Cluster liegt nur 6 Å vom [NiFe]-Zentrum entfernt (Abb. 10) und ist für die Hydrogenaseaktivität essentiell. Die große Untereinheit allein hat keine Hydrogenaseaktivität (193). In der Regel sind die proximale und distale [Fe-S]-Cluster Kubane-[4Fe-4S], während das mediale Cluster als ein [3Fe-4S]-Cluster vorliegt. Es sind jedoch auch modifizierte [3Fe-4S]- und [4Fe-3S]-Cluster identifiziert worden. In  $\text{O}_2$ -toleranten Hydrogenasen wird das proximale [4Fe-4S]-Cluster durch ein einzigartiges [4Fe-3S]-Cluster ersetzt.



**Abbildung 10. Schematische Darstellung der aktiven Zentren und [Fe-S]-Cluster der Hydrogenase-Klassen.** Einteilung der Hydrogenasen nach dem Aufbau ihrer aktiven Zentren in drei phylogenetisch nicht miteinander verwandte Klassen. GMP steht für den Guaninmonophosphat-Rest. Reaktionszentrum stellt den Ort dar, an dem  $\text{H}_2$  umgesetzt wird. Abbildung übernommen von Thauer, *et al* (157).

### 3.3. Einteilung der [NiFe]-Hydrogenasen

Vertreter der [NiFe]-Hydrogenasen zeigen bemerkenswerte Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten und den physiologischen Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren, der spezifischen Aktivitäten, der H<sub>2</sub>-Affinität und der katalytischen Effizienz sowie der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff.

Die Eigenschaften einer bestimmten [NiFe]-Hydrogenase korrelieren meistens mit den Erfordernissen, die sich aus dem Habitat und der Lebensweise des Herkunftsorganismus ergeben. Beispielsweise weisen Hydrogenasen aus aeroben H<sub>2</sub>-Oxidierern die höchste O<sub>2</sub>-Toleranz und die niedrigsten Km-Werte auf, da H<sub>2</sub> nur in Spuren vorhanden ist. Aufgrund dieser Diversität können die [NiFe]-Hydrogenasen in Übereinstimmung mit den phylogenetischen Analysen der konservierten Sequenzelemente der Nickel-bindenden Regionen in fünf voneinander abzugrenzende Gruppen eingeteilt werden (Tabelle 2) (163,194).

**Gruppe 1** beinhaltet die membrangebundenen, energiekonservierenden Enzyme, welche die Oxidation von H<sub>2</sub> an eine anaerobe oder aerobe Atmungskette koppeln. Die durch H<sub>2</sub>-Oxidation regenerierten Elektronen werden auf terminale Elektronenakzeptoren (z. B. O<sub>2</sub>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NO<sup>3-</sup> oder Fumarat) übertragen. Der Export des reifen Enzyms vom Cytoplasma durch die Membran oder in den periplasmatischen Raum erfolgt überwiegend mittels eines **Twin-Arginin-Translokations (Tat)-Systems** (195). Vertreter dieser Gruppe sind *E. coli* Hydrogenase 1 (Hya) und Hydrogenase 2 (Hyb) und die regulatorischen Hydrogenasen aus *Cupriavidus* (Hox). Zu dieser Gruppe gehören auch die [NiFeSe]-Hydrogenasen von Sulfat-reduzierenden Bakterien, von denen mehrere Kristallstrukturen vorliegen (168,169,189).

**Gruppe 2** umfasst zwei Subklassen cytoplasmatischer Hydrogenasen: Die cyanobakteriellen H<sub>2</sub>-aufnehmenden Hydrogenasen, die in N<sub>2</sub>-fixierenden Cyanobakterien den durch Nitrogenaseaktivität gebildeten molekularen Wasserstoff recyceln und die sensorischen Hydrogenasen, die durch ihre H<sub>2</sub>-Wahrnehmung die Produktion von H<sub>2</sub>-aufnehmenden Hydrogenasen auf Transkriptionsebene kontrollieren.

**Gruppe 3** fasst die heteromultimeren, cytoplasmatischen Hydrogenasen zusammen. Die Hydrogenasen dieser Gruppe beinhalten vier Subklassen, die mit verschiedenen löslichen Cosubstraten (wie NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> oder F420) interagieren. Nach diesen erfolgt die Untergruppierung in Tabelle 2 (3a - d). Viele Mitglieder dieser Gruppe werden in Archaeen gefunden, wo sie zentrale H<sub>2</sub>-abhängige Schritte katalysieren (157). Enzyme dieser Gruppe funktionieren bidirektional, wobei die Reaktionsrichtung öfter in Abhängigkeit des zellulären NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>-Spiegels reguliert wird (196). In phototrophen Prokaryoten korrelieren die H<sub>2</sub>-Bildungsraten mit der Zunahme des NADPH-Spiegels. Die NAD(P)H-abhängigen

Hydrogenasen aus *Pyrococcus furiosus* sind in der Lage, sowohl die H<sub>2</sub>-Bildung als auch die H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion des elementaren Schwefels (S<sup>0</sup>) zu H<sub>2</sub>S zu katalysieren.

**Tabelle 2. Einteilung der [NiFe]-Hydrogenasen nach phylogenetischer Analyse der konservierten Sequenzelemente der Nickel-bindenden Regionen (163,194).**

Gr.	Bezeichnung und Charakteristika	Funktion	Große Untereinheit
1	membran-assoziierte aufnehmende Hydrogenasen	Mobilisierung energiereicher Elektronen für die Atmungskette	HyaB, HybC, HoxG, HubL, HynL, VhtA, VhoA, HydA, HubAB, MbhL
2	a cyanobakterielle aufnehmende Hydrogenasen	Energierectycling	HubL, MbhL
	b H <sub>2</sub> -sensorische Hydrogenasen	Transkriptionsregulation metabolischer Hydrogenasen	HubV, HaxC
3	a F <sub>420</sub> -reduzierende Hydrogenasen	Generierung von REQ* in Form von F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> (Methanogenese)	FrhA, FruA, FrcA
	b bifunktionale NAD(P)-gekoppelte Hydrogenasen	Hauptsächlich H <sub>2</sub> -Bildung zur Entsorgung überschüssiger REQ	ShyA, Hyd $\alpha$ , HyhL, HydA
	c Methylviologen-reduzierende Hydrogenasen	Generierung von REQ* für Hetero-Disulfid-Reduktase (Methanogenese)	MvhA, VhcA, VhuA, MvhL
	d NAD(P)-reduzierende, bidirektionale Hydrogenasen	Generierung von REQ*, sowie Erhaltung des Redoxgleichgewichts	HoxH
4	membran-assoziierte Ech-Hydrogenasen	Energiekonservierung	EchE, HycE, EhaO, EhbN, HyfG, CooH
5	hochaffine aufnehmende Hydrogenasen	Verwertung von H <sub>2</sub> aus der Atmosphäre	HhyL

REQ\* steht für Reduktionsäquivalente

**Gruppe 4** fasst die Mitglieder der membran-gebundenen energiekonservierenden Ech-Hydrogenasen (*energy converting hydrogenase*) zusammen. Die [NiFe]-Zentrum-tragende Untereinheit ist zum Cytoplasma orientiert. Diese Hydrogenasen sind ebenfalls *in vivo* bidirektional. Die heteromultimeren Enzyme dieser Gruppe sind an unterschiedlichsten Stoffwechselprozessen beteiligt. Vertreter dieser Gruppe sind an die anaerobe Oxidation von

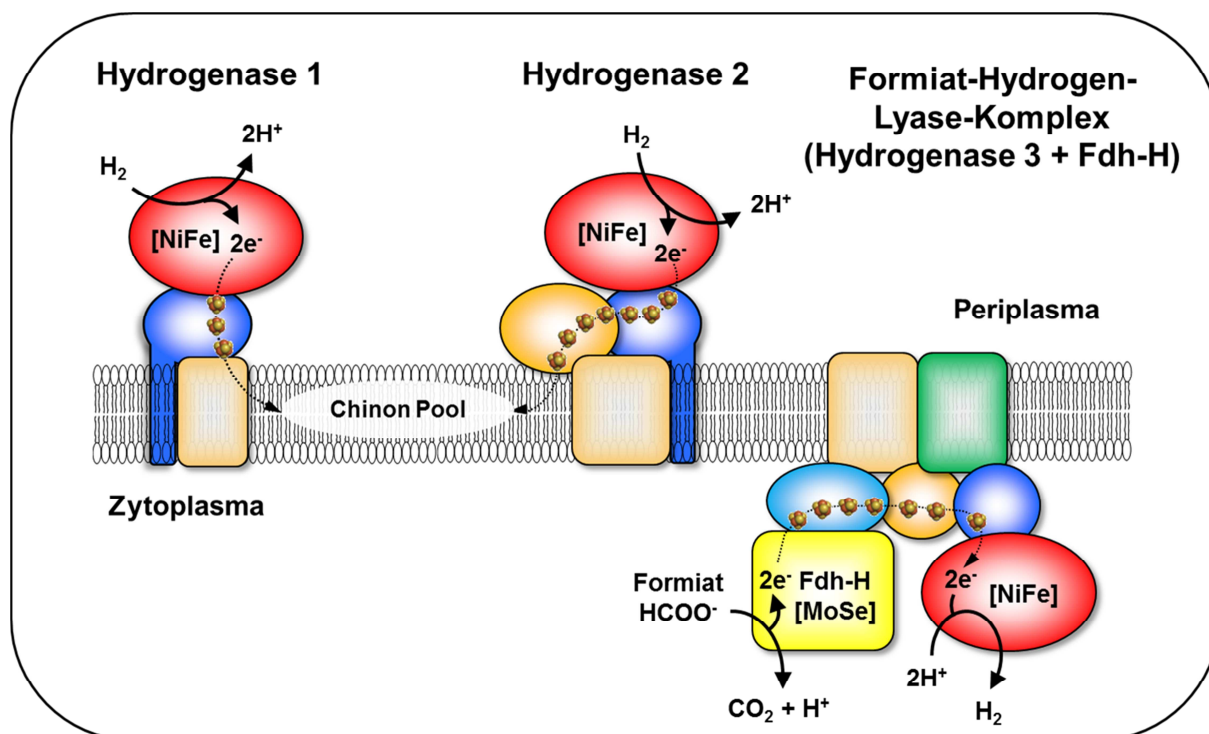


C1-Komponenten gekoppelt. Sie können überschüssige Reduktionsäquivalente aus der Oxidation von C1-Verbindungen (wie CO oder Formiat) in Form von H<sub>2</sub> beseitigen (197). Die Ech-Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* katalysiert die Reduktion von Ferredoxin mit H<sub>2</sub>. Diese endergone Reaktion wird durch revertierten Elektronentransport und Kopplung mit Protonen-/Ionen-Translokation ermöglicht (157). Reduziertes Ferredoxin steht als Elektronendonator verschiedener Oxidoreduktasen zur Verfügung, die Reduktionsäquivalente mit niedrigem Redoxpotenzial benötigen (198). Ein weiterer Vertreter ist die Hydrogenase 3 aus *E. coli* (Hyc), eine Komponente des Formiat-Hydrogenlyase Komplexes. Sie katalysiert eine Teilreaktion des Formiat-Abbaus zu H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> (197). Die MBH-Hydrogenase aus *Pyrococcus furiosus* katalysiert die H<sub>2</sub>-Bildung aus reduziertem Ferredoxin, wobei durch die Protonentranslokation über die Membran eine Energiekonservierung in Form von ATP stattfindet. Die physiologische Rolle der MBH-Hydrogenase ähnelt stark der Funktion der Hydrogenasen aus *Rhodospirillum rubrum* und *C. hydrogenoformans* bei der Umsetzung von CO zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> (199,200).

**Gruppe 5** beinhaltet Mitglieder der hochaffinen [NiFe]-Hydrogenasen. Diese Klasse der Hydrogenasen kommt vorrangig in Stämmen der Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria und Chloroflexi vor (194,201). Die lösliche hochaffine Hydrogenase aus *Streptomyces spp* weist eine sehr hohe Affinität zu H<sub>2</sub> auf, sodass sie, im Gegensatz zu allen anderen Hydrogenasen, H<sub>2</sub> aus der Atmosphäre verwerten kann (202).

### 3.3.1. Hydrogenasen in *E. coli*

*E. coli* synthetisiert drei aktive membranständige [NiFe]-Hydrogenasen. Die Hydrogenase-1 (Hya) und Hydrogenase-2 (Hyb) sind H<sub>2</sub>-oxidierende Enzyme mit einem im Periplasma lokalisierten katalytischen Zentrum (203). Die Hydrogenase-3 (Hyc) ist ein H<sub>2</sub>-produzierendes Enzym, dessen aktives Zentrum im Cytoplasma lokalisiert ist (Abb.11). Die Wasserstoffspaltung durch die Hydrogenasen-1 und -2 dient einerseits dem Aufbau einer protonenmotorischen Kraft (*pmf*, **proton motive force**) an der Cytoplasmamembran und andererseits der Bereitstellung von Elektronen für den Chinon-Pool. Die Hydrogenase 3 bildet zusammen mit der Formiatdehydrogenase-H (FDH-H) den Formiat-Hydrogen-Lyase-Komplex (FHL), der während der gemischten Säuregärung Formiat zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> disproportioniert (204). Diese Reaktion dient der Entsorgung von Elektronen über interne Elektronenakzeptoren und der Regulation des intrazellulären pH-Wertes.



**Abbildung 11. Schematische Darstellung von Aufbau und Lokalisation der drei [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli*.** Hydrogenase-1 und -2 sind wasserstoffoxidierende Enzyme, deren aktive Zentren auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Die Hydrogenase-3 reduziert Protonen zu  $H_2$  und bildet zusammen mit der Formiatdehydrogenase-H (FDH-H) den FHL-Komplex auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Die großen und kleinen Untereinheiten der Hydrogenasen sind rot bzw. blau dargestellt. Die gelb-orangenen Kugeln stellen Eisen-Schwefel-Cluster in den Elektronen-transferierenden Untereinheiten der Hydrogenasen dar. Modifiziert nach Forzi, *et al* (205).

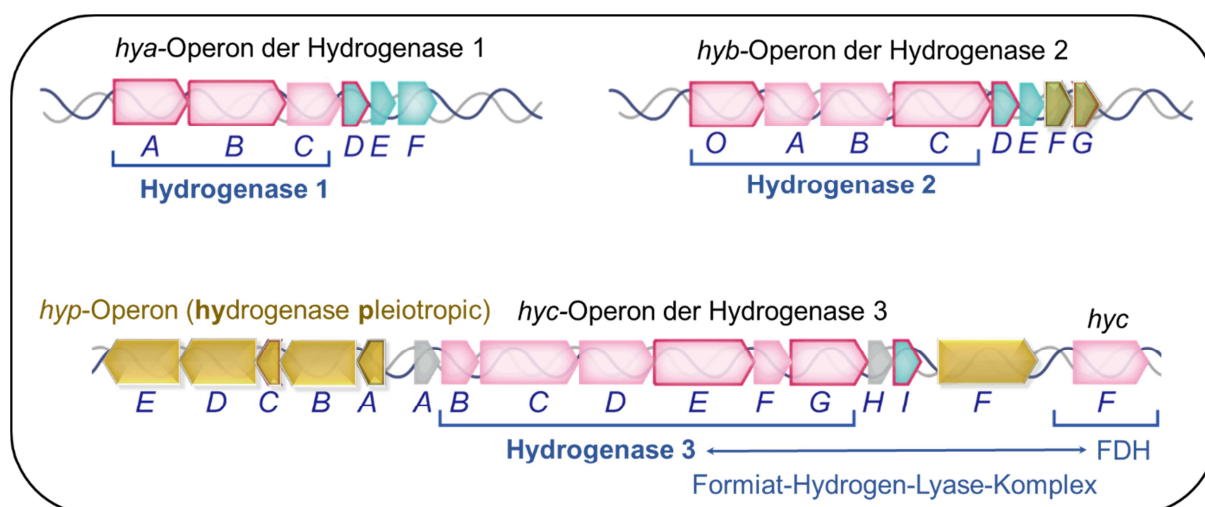
### 3.3.1.1. Genetische Organisation der Hydrogenase-Operone in *E. coli*

Die Hydrogenasen in *E. coli* werden durch die Operone *hya*, *hyb* und *hyc* kodiert (206-208), wobei die alphabetische Reihenfolge die numerische Benennung der Enzyme als Hydrogenase 1, 2 und 3 widerspiegelt (Abb.12). Eine vierte Hydrogenase, welche aufgrund von Sequenzähnlichkeit zur Hydrogenase-3 im *E. coli*-Genom entdeckt wurde (209), wird durch das *hyf*-Operon kodiert. Diese Hydrogenase konnte bisher nicht als aktiver Enzymkomplex nachgewiesen werden (210). Die Operone beinhalten neben jenen Genen, die für Strukturkomponenten der jeweiligen Hydrogenasen kodieren, auch Gene, deren Produkte für die Elektronenweiterleitung innerhalb verschiedener Komplexe zuständig sind. Für die Biosynthese der [NiFe]-Zentren und die Reifung aller drei Hydrogenasen ist noch ein weiteres *hyp*-Operon (**h**ydrogenase **p**leitropic) vonnöten. Das *hyp*-Operon ist in allen Organismen, die [NiFe]-Hydrogenasen besitzen, hoch konserviert. Das *hyp*-Operon in *E. coli* ist dem *hyc*-Operon vorgeschaltet und beinhaltet fünf *hyp*-Gene (*hypABCDE*). Ein zusätzliches *hypF*-Gen liegt ca. 13 kb stromaufwärts des *hyp*-Operons (Abb. 12) (211). Die Funktionen der einzelnen Hyp-Proteine während der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli* sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3. Übersicht über die Funktion der akzessorischen Genprodukte bei der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli*.**

Protein	Funktion
<b>HypA</b>	Nickelinsertion in HycE, Paralog: HybF für Nickelinsertion in HyaB und HybC
<b>HypB</b>	Verbesserung der Kinetik während der Nickelinsertion, GTPase
<b>HypC</b>	Übertragung der Fe(CN) <sub>2</sub> CO-Gruppe auf HycE, Paralog: HybG
<b>HypD</b>	Proteininteraktion mit HypC und HybG, Vorassemblierung der CN <sup>-</sup> und CO Liganden
<b>HypE</b>	ATP-abhängige Dehydratisierung des Carbamoylrestes
<b>HypF</b>	Carbamoylphosphat abhängige ATP-Hydrolyse, Transfer des Carbamoylrestes von Carbamoylphosphat auf HypE

Des Weiteren beinhaltet jedes der drei Hydrogenase-Operone die Gene *hyaD*, *hybD* und *hycl*, die eine wichtige Rolle bei der proteolytischen Reifung der Vorstufe der großen Untereinheit der jeweiligen Hydrogenase spielen. Darauf wird noch im Abschnitt 3.3.5. genauer eingegangen.



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der genetischen Organisation der Hydrogenase-Operone, sowie der akzessorischen *hyp*-Gene der Hydrogenasen von *E. coli* (204,206,212,213).**

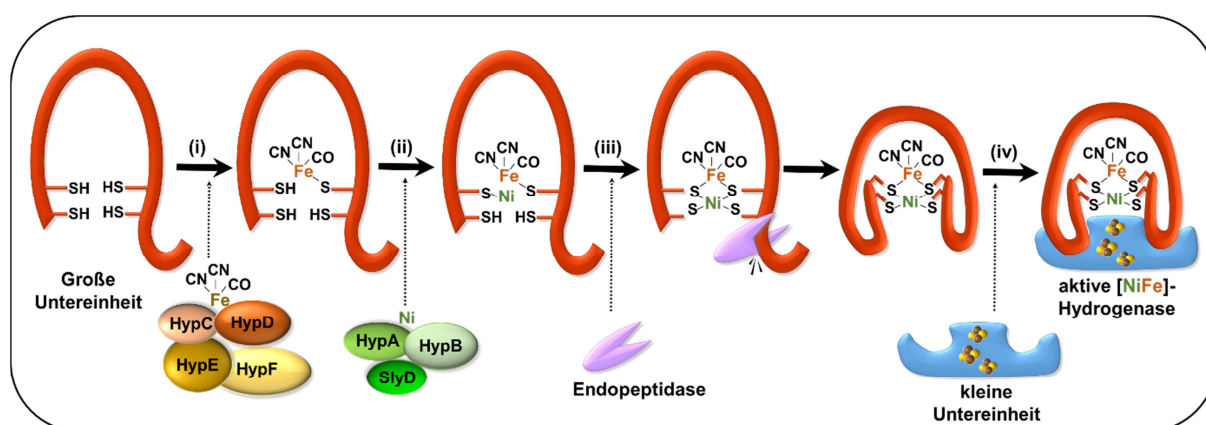
Mutationen in den *hyp*-Genen führen zum Verlust der Hydrogenaseaktivität (214). Während Mutationen in *hypB*, *hypD*, *hypE* oder *hypF* die Synthese der [NiFe]-Zentren aller drei Hydrogenasen blockieren, bewirkt die Inaktivierung der Gene *hypA* und *hypC* spezifisch nur den Verlust der Aktivität der Hydrogenase 3 (214). Der Grund dafür ist, dass das Operon der Hydrogenase 2 (Hyb) homologe Proteine für HypA und HypC kodiert, nämlich HybF und

HybG (207), welche die entsprechenden Funktionen in der Reifung der Hydrogenase-1 und -2 übernehmen können (215,216).

### 3.4. Reifung von [NiFe]-Hydrogenasen

Die Synthese und der Einbau des Metallzentrums der [NiFe]-Hydrogenasen ist ein komplexer Prozess, an dem eine Reihe von Reifungsproteinen beteiligt sind (205,217). Auf dem Wege zum Holoenzym unterliegt das Apoenzym einer komplexen Kaskade posttranslationaler Modifikationen. Basierend auf Erkenntnissen aus verschiedenen Modellorganismen konnte ein detailliertes Modell der Reifung erstellt werden. Die vier Hauptschritte dieses Modells sind in Abb. 13 dargestellt und sollen nachfolgend detailliert beschrieben werden:

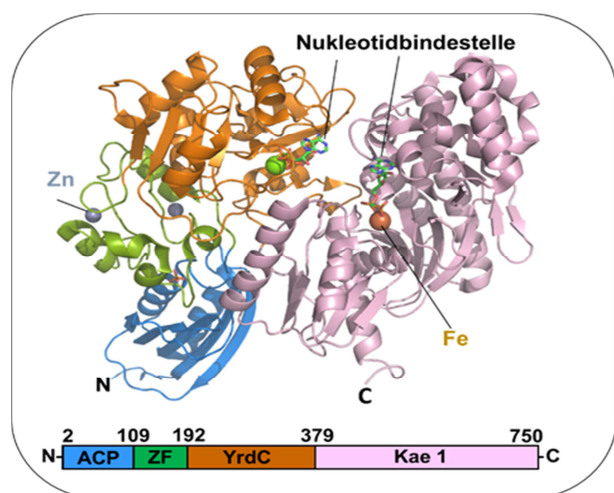
- (i) Die Biosynthese und der Einbau des prosthetischen  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Clusters in die große Untereinheit durch HypCDEF.
- (ii) Die Aktivitäten der Reifungsproteine HypB, HypA (HybF) und einer Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (SlyD) fördern den Nickel-Einbau in die große Untereinheit der Hydrogenasen.
- (iii) Proteolytische Prozessierung des C-Terminus der großen Untereinheit durch eine Hydrogenase-spezifische Endopeptidase bewirkt eine Konformationsänderung.
- (iv) Abschließende Bildung einer aktiven Hydrogenase durch Dimerisierung der großen Untereinheit mit der kleinen Untereinheit.



**Abbildung 13. Reifungsschema der großen Untereinheiten von [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli*.** (i) Die Biosynthese und der Einbau des prosthetischen  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Teils durch HypCDEF. (ii) Die Aktivitäten der Reifungsproteine HypB, HypA (HybF) und einer Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (SlyD) fördern den Nickel-Einbau (iii) Proteolytische Prozessierung des C-Terminus der großen Untereinheit durch eine Hydrogenase spezifische Endopeptidase bewirkt eine Konformationsänderung (iv) Abschließende Bildung einer aktiven Hydrogenase durch Dimerisierung der großen Untereinheit mit der kleinen Untereinheit.

### 3.4.1. Synthese der Cyanidliganden

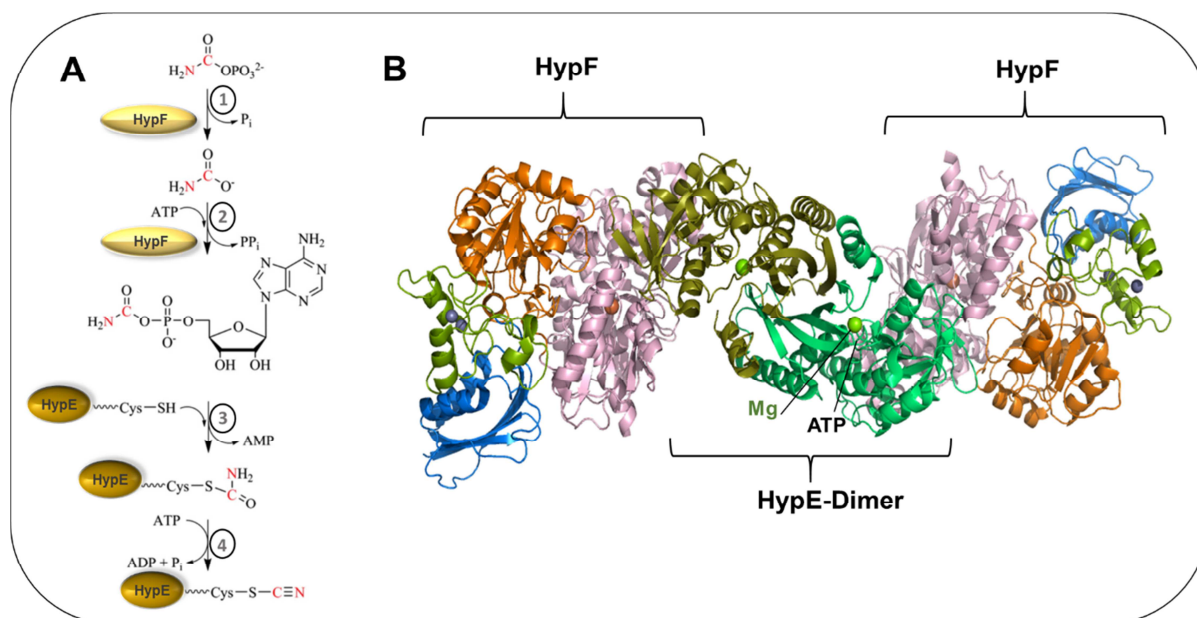
Aminosäuresequenzanalysen des HypF-Proteins lieferten die ersten Hinweise darauf, wie die Cyanidliganden der Hydrogenase synthetisiert werden können (218,219). Das HypF-Protein katalysiert die Spaltung des Carbamoylphosphats (CP) und die Übertragung von dessen Carbamoylgruppe auf einen C-terminalen Cysteinrest des HypE-Proteins (220,221). Das 82-kDa HypF-Protein ist das größte akzessorische Protein mit einem domänenartigen Aufbau. Es konnten vier Domänen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine Acylphosphatase- (ACP)-, eine Zink-Finger-, eine YrdC-ähnliche- und eine Kae1-ähnliche Domäne (Abb.14). Die Acylphosphatase-Domäne am N-Terminus des HypF-Proteins (A.S. 1-91) hydrolysiert die Carbamoylphosphat zu Carbamat und Phosphat. Die Zink-Finger-Domäne (A.S. 109 -191) enthält zwei Zink-Finger-Motive (ZF). Die Kristallstruktur zeigt, dass vier konservierte Cysteine pro Zink-Finger-Motiv ein Zinkatom koordinieren (Abb. 14). Diese Domäne ähnelt der ZF-Domäne des Chaperons DnaJ (222), welche für die spezifische Erkennung und Bindung anderer Proteine zuständig ist. Daher wird vermutet, dass die ZF-Domäne am Transport von CP-Intermediaten innerhalb der HypF-Domäne und an der Interaktion mit anderen Hyp-Proteinen beteiligt ist. Die dritte Domäne (A.S.192-378) wurde als eine YrdC-ähnliche Domäne identifiziert. Innerhalb der YrdC-Domäne liegt eine lange mit positiven Aminosäuren ausgekleidete Vertiefung zur Bindung der Carbamoylphosphat-Intermediate (Carbamoyladenylat) vor. Die vierte Domäne (A.S. 379 -750) ist eine „universelle“ Kae1-Domäne (**k**inase-**a**ssociated **e**ndopeptidase **1**). Die Kae1-Domäne beinhaltet ein Carbamoyltransferase-Motiv, das wahrscheinlich an der ATP-abhängigen Übertragung des Carbamoylrestes auf die SH-Gruppe des C-terminalen Cysteins von HypE beteiligt ist (219). Mittels Kristallstruktur-Analysen wurden zwei potentielle Nukleotidbindestellen in YrdC- und Kae1-Domänen identifiziert. Während Modifikationen beider Regionen durch einzelne Aminosäureaustausche jeweils zu Defiziten in der Hydrogenaseaktivität führten, blieb die Carbamoylphosphat-Phosphatase-Aktivität der ACP-Domäne unbeeinflusst (221). Dies zeigt, dass ATP nicht für die Spaltung des



**Abbildung 14. Die Kristall- und die Domänen-Struktur des HypF-proteins.** Die einzelnen Domänen sind farblich voneinander abgesetzt. ACP: Acylphosphatase-Domäne; ZF: Zink-Finger-Domäne; YrdC: YrdC-ähnliche-Domäne. Die Kae1-Domäne beinhaltet ein Carbamoyltransferase-Motiv. Die Zahlen über den Domänen geben die Aminosäure-Positionen des jeweiligen Anfangs und Endes der Sequenzen an (HypF: PDB-Code 3VTH).

Carbamoylphosphates sondern für dessen Übertragung auf das HypE-Protein benötigt wird. Alle drei Reaktionszentren der HypF-Domänen sind durch geschlossene Kanäle miteinander verbunden, so dass das instabile Carbamat und dessen Intermediat-Derivat innerhalb dieser Kanäle weitergeleitet werden.

Der Reaktionsmechanismus der Synthese von Thiocyanat aus CP ist in Abb. 15 A dargestellt. Zunächst (1) erfolgt die Spaltung des Carbamoylphosphates durch die Acylphosphatase-Domäne des HypF. Dann (2) folgt die ATP-abhängige Bildung des Carbamoyladenylat-Intermediats und (3) die Übertragung seiner Carbamoylgruppe auf die Thiolgruppe des C-terminalen Cysteins von HypE (220,221,223-225). Anschließend (4) wird das resultierende Thiocarbamat in einer zweiten ATP-abhängigen Reaktion durch die enzymatische Aktivität von HypE zum Thiocyanat dehydratisiert (220,225,226). Das resultierende Thiocyanat ist durch eine flexible Schleife am Ende des HypE gebunden. Die Flexibilität der Schleife ermöglicht HypE die Interaktion sowohl mit der Kael-Domäne des HypF als auch mit dem HypCD-Komplex, wo die Assemblierung des  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Teils stattfindet (siehe unten) (227). Radioaktive  $^{14}\text{C}$ -Markierungsexperimente zeigten, dass das an HypE kovalent gebundene Thiocyanat auf den HypCD-Komplex übertragen wird (226). Die Bildung eines HypFE-Heterotetramer-Komplexes (Abb 15 B) führt zur Biosynthese von zwei Thiocyanatmolekülen aus zwei Molekülen Carbamoylphosphat und erklärt möglicherweise die Entstehung des CN-Liganden im  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Cofaktor (227).



**Abbildung 15. (A) Der Reaktionsmechanismus der Synthese von Thiocyanat aus Carbamoylphosphat.** (1) Spaltung des Carbamoylphosphats (2) ATP-abhängige Bildung des Carbamoyladenylats (3) Übertragung der Carbamoylgruppe auf die Thiolgruppe des C-terminalen Cysteins von HypE (4) das resultierende Thiocarbamat wird in einer ATP-abhängigen Reaktion zum Thiocyanat dehydratisiert (227). **(B)** Die Kristallstruktur des HypFE Heterotetramers aus *Thermococcus kodakaraensis* (HypFE Tetramer: PDB-Code 3VTI).

### 3.4.2. Der HypCD-Komplex: ein Gerüstkomplex zur Ligandensynthese

Die Synthese des Eisenzentrums (Fe mit zwei CN und einem CO-Liganden) wird mittels der koordinierten Aktivität der Proteine HypC, HypD, HypE und HypF katalysiert. Dabei stellt der Core-Komplex HypCD eine Art Gerüstkomplex zur Liganden-Synthese und Assemblierung dar (226,228-230).

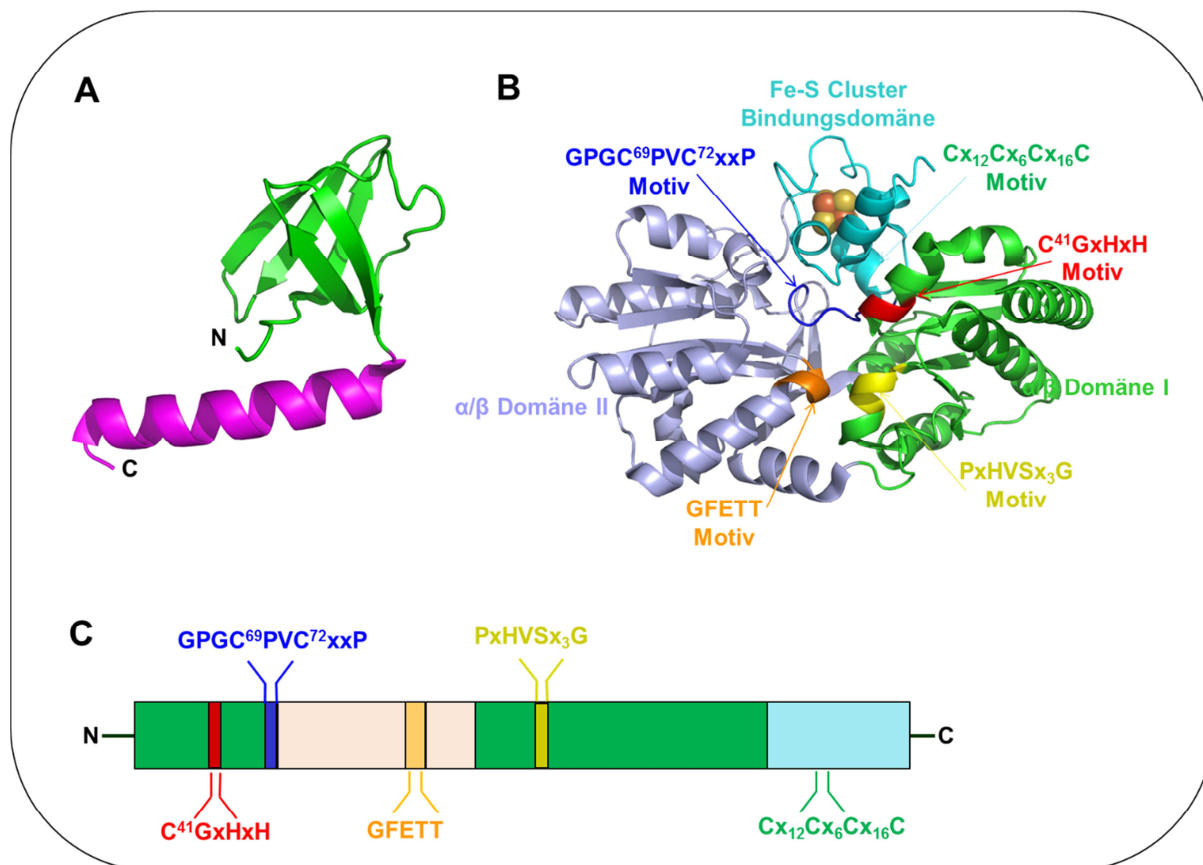
Die HypC-Proteinfamilie besteht aus 75 bis 108 Aminosäuren. In einigen Mikroorganismen existieren HypC-orthologe Proteine. Bei *E. coli* übernimmt z. B. ein zweites HypC-Ortholog (HybG) die entsprechende Funktion für die Reifung der Hydrogenasen-1 und -2, während HypC auf die Reifung der Hydrogenase 3 spezialisiert ist (215,228). Die Kristallstruktur des HypC aus *Thermococcus kodakaraensis* ist in Abb. 16 A dargestellt. Ein Schlüsselmerkmal aller HypC-Proteinfamilien ist die Existenz eines hochkonservierten Cysteinrests in Position 2 sowie eines kurzen flexiblen  $\beta$ -Strang-Bereichs in der N-terminalen Domäne (231,232). Viele Aminosäurenreste in der  $\beta$ -Strang-Domäne sind hochkonserviert und stellen wahrscheinlich eine *Docking*-Oberfläche für die Interaktion mit HypD und anderen Proteinen dar.

HypD ist ein monomeres Protein mit einer molekularen Masse von 40-kDa. Die Kristallstruktur des HypD von *T. kodakaraensis* ist in Abb. 16 B dargestellt (231). Das Protein besteht aus drei Domänen: Eine  $\alpha/\beta$ -Domäne I (grün), eine  $\alpha/\beta$ -Domäne II (graublau) und eine [Fe-S]-Cluster-Bindedomäne (blau). Diese drei Domänen bilden mutmaßlich ein aktives Zentrum in der Mitte des Moleküls (Abb. 16 B). Die Sequenz des HypD-Proteins mit Hervorhebung der konservierten Aminosäurereste und Motive, die in allen HypD-Proteinen gefunden wurden, ist in Abb. 16 C dargestellt. Das Cx14Cx6Cx16C-Motiv im C-terminalen Bereich koordiniert ein [4Fe-4S]-Cluster. Die Motive GFETT und PXHVS werden für die Interaktion mit HypC benötigt. Die beiden Motive CGXH- und GPGCPVC koordinieren wahrscheinlich zwei zusätzliche, labile Eisenionen. Diese Eisenionen konnten in den isolierten HypCDE- bzw. HybG-HypDE-Komplexen identifiziert werden (228,229). Die beiden Cysteine im Motiv GPGCPVC sind charakteristisch für Thiol-Redox-Proteine und für Metallbindende Proteine (231,233). Aus der Kristallstruktur des HypD aus *T. kodakaraensis* ist zu erkennen, dass die zwei Cysteinreste Cys69 und Cys72 der GPGCPVC-Sequenz eine Disulfidbrücke bilden können. In *E. coli* sind die Cysteinyreste 41, 69 und 72 essentiell für die Maturase-Aktivität von HypD. Für die Koordination des Eisens der  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe wird Cys41 des HypD, zusammen mit der Cys2 des HypC-Proteins benötigt (217,229,234,235).

Der Übertragungsmechanismus des von HypE-gebundenen Thiocyanats und der Einbaumechanismus des CO-Liganden sowie die Rolle die HypD dabei spielt, sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch postuliert, dass zwei Elektronen für eine nukleophile Übertragung von HypE-gebundenem Thiocyanat auf HypCD benötigt werden. Außerdem sind noch zwei weitere Elektronen zur Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu CO erforderlich, sofern  $\text{CO}_2$  die

Quelle für CO ist. In diesem Zusammenhang kann HypD als möglicher Kandidat für eine Beteiligung an Reduktionsreaktionen in Betracht gezogen werden, da es als einziges Reifungsprotein ein [4Fe-4S]-Cluster mit außergewöhnlich niedrigem Redoxpotential besitzt (226,228,229,236).

Die Bestimmung der Kristallstrukturen des HypCDE-Komplexes aus *T. kodakaraensis* zeigten auf, dass die Elektronen von zwei freien Thiolgruppen von HypD freigesetzt werden. Die Regeneration der Disulfidbrücken könnte über ein Ferredoxin durch das [4Fe-4S]-Cluster in HypD erfolgen (231,233).



**Abbildung 16. Schematische Darstellung des HypC- und HypD-Proteins aus *T. kodakaraensis*.** (A) Kristallstruktur des HypC-Proteins (231) (B) Kristallstruktur des HypD-Proteins. Die zwei  $\alpha/\beta$ -Domänen I und II, sowie die [Fe-S]-Cluster-Bindungsdomäne sind hier grün, graublau und blau gezeigt. Die konservierten Motive sind jeweils durch unterschiedliche Farben hervorgehoben. (C) Sequenz des HypD-Proteins mit Hervorhebung der konservierten Aminosäurereste und Motive. (HypC: PDB-Code 2Z1C (231); HypD: PDB-Code 2Z1F(231).

### 3.4.3. Die Synthese des Carbonylliganden

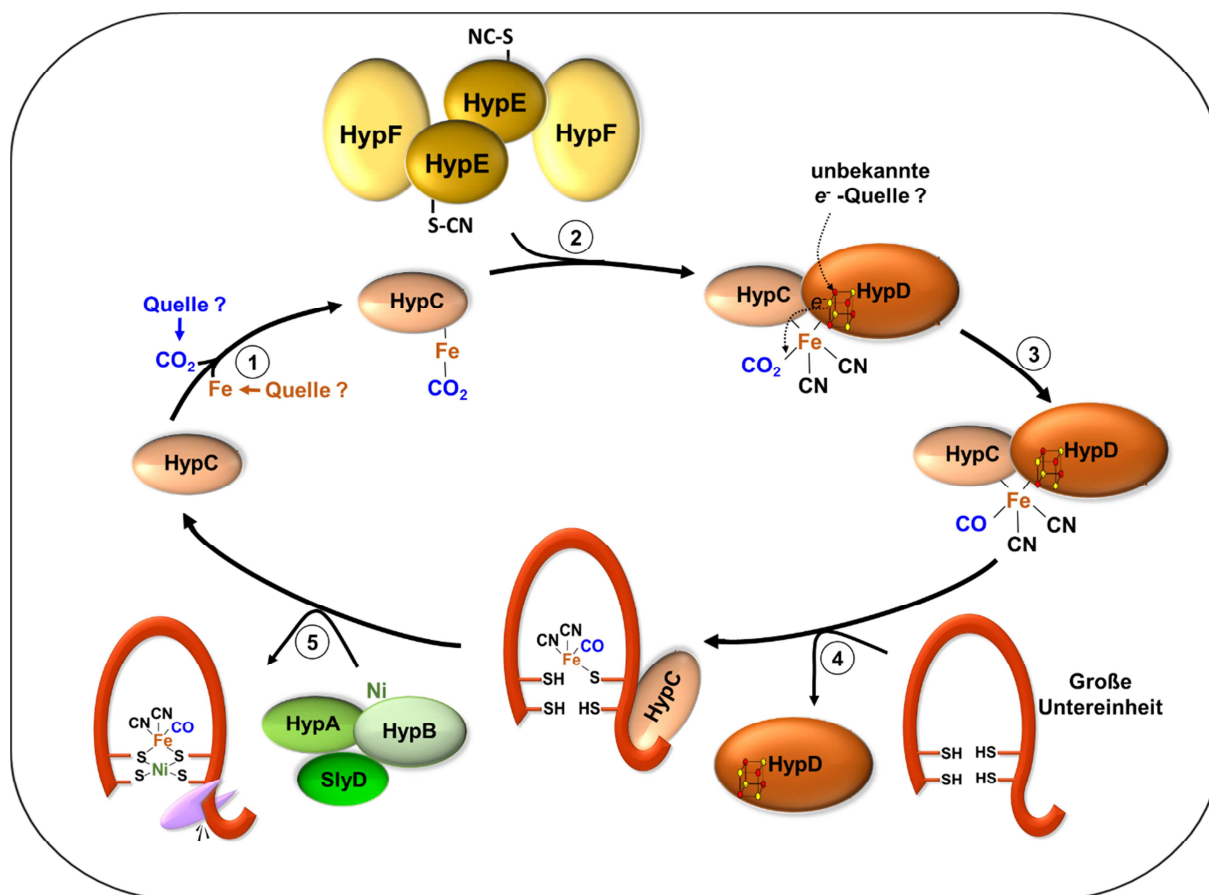
Die Quelle und der Syntheseweg des Carbonylliganden des [NiFe]-Zentrums ist noch nicht abschließend geklärt. Mittels Markierungsexperimenten konnten Carbamoylphosphat und CO<sub>2</sub> als Quellen für CO ausgeschlossen werden (237). Eine spezifische Markierung des Carbonylliganden durch extern zugegebenes gasförmiges <sup>13</sup>C-Kohlenmonoxid zur *E. coli*



Wachstumskultur zeigt, dass CO von den Zellen aufgenommen und direkt im [NiFe]-Zentrum eingebaut werden kann (237,238). Aktuelle Befunde legen nahe, dass metabolisch erzeugte CO<sub>2</sub>-Moleküle eine mögliche Vorstufe für CO sein könnten (228,229,234).

Die spektroskopische Analyse des anaerob gereinigten HypCDE- und seines homologen HybG-HypDE-Komplexes zeigt, dass der Komplex den Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teil des Cofaktors koordiniert und zusätzlich CO<sub>2</sub> bindet (228,229). Dabei kann isoliertes HypD-Protein allein das Gerüst für den Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teil bilden und HypC (bzw. das homologe HybG) koordiniert ein Fe-gebundenes CO<sub>2</sub> (228,234). Die Koordination dieser Liganden korreliert stark mit der Anwesenheit von zwei labilen Fe-Ionen zusätzlich zu dem [4Fe-4S]-Cluster im HypD-Protein (234). Der Austausch der hoch konservierten Aminosäuren (Cys2 in HypC und HybG) oder Cys41, Cys69, Cys72 in HypD, führt zum Verlust der Fe(CN)<sub>2</sub>CO- und Fe-CO<sub>2</sub> Liganden. Die biochemischen und spektroskopischen Analysen zeigen, dass eine funktionelle Kopplung zwischen dem Eisenatom, CO, CN<sup>-</sup> und CO<sub>2</sub> vorhanden ist und deuten darauf hin, dass die HypC-Protein-Familie sowohl CO<sub>2</sub> für die CO-Liganden-Biosynthese zur Verfügung stellt, als auch das Fe-Atom für den Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teils des Cofaktors liefert (228,239).

Eine Arbeitshypothese zur Synthese und Einbau des Carbonylliganden wird durch Abb. 17 illustriert. (1) CO<sub>2</sub> aus Pyruvat, Formiat oder eines anderen Ursprungs wird über ein Fe-Atom an HypC gebunden. (2) Anschließend entsteht ein HypCD-Komplex, wobei das CO<sub>2</sub> über ein Fe-Ion gemeinsam an HypC und HypD gebunden wird. Gleichzeitig katalysiert das HypEF-Tetramer die Übertragung von zwei Cyanidliganden auf den HypCD-Komplex. (3) Das CO<sub>2</sub> wird zu CO reduziert. Die benötigten Elektronen werden vermutlich über das [4Fe-4S]-Cluster des HypD bereitgestellt (231,233). (4) Nach dem Transfer des Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teils durch den HypC-HypD Komplex bleibt HypC an der großen Untereinheit der Hydrogenase gebunden während HypD dissoziiert. (5) Erst nach der Nickel-Insertion und vor der Prozessierung des C-Terminus der großen Untereinheit, erfolgt die Abtrennung des HypC-Proteins, das im Anschluss wieder zur Bindung der CO<sub>2</sub>-Liganden zur Verfügung steht.



**Abbildung 17: Arbeitsmodell zur Synthese und Einbau des Carbonylliganden.** (1) CO<sub>2</sub> wird durch ein Fe an HypC gebunden (239). (2) Während CO<sub>2</sub> von HypC über ein gemeinsames Fe-Ion an den HypCD-Komplex gebunden wird, katalysiert das HypEF tetramer die Übertragung von zwei Cyanidliganden auf den HypCD-Komplex (229). (3) Die benötigten Elektronen für die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CO werden vermutlich über das [4Fe-4S]-Cluster des HypD bereitgestellt. (4) Nach dem Transfer des Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teils durch den HypCD-Komplex bleibt nur HypC an die große Untereinheit der Hydrogenase gebunden. (5) Erst nach Nickel-Insertion und vor der Prozessierung des C-Terminus der großen Untereinheit, erfolgt die Abtrennung des HypC-Proteins, das wieder bereit zur CO<sub>2</sub>-Liganden Bindung ist.

### 3.4.4. Der Nickeleinbau in [NiFe]-Hydrogenasen

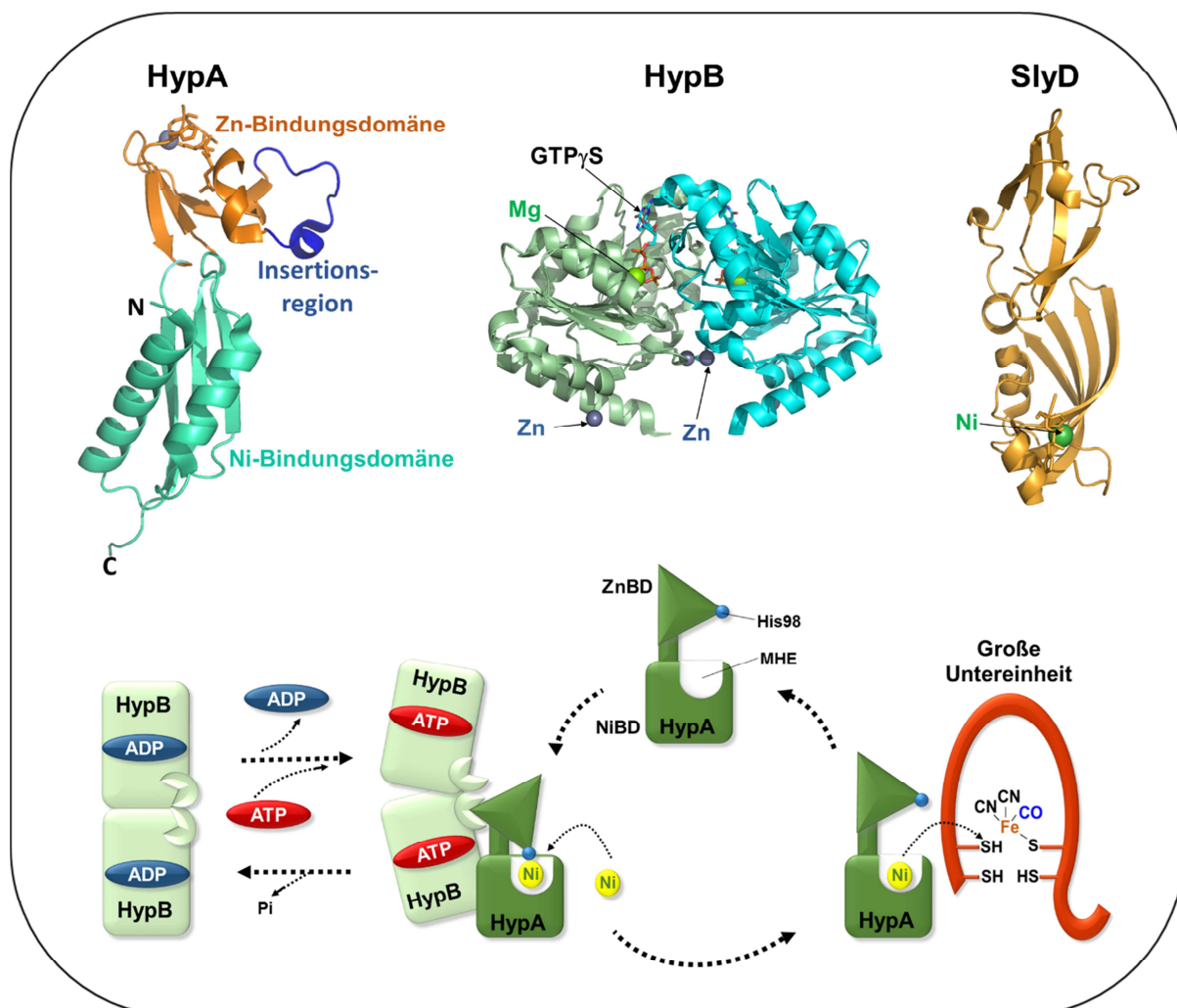
Die Untersuchungen an verschiedenen *hyp*- und Nickeltransport-Mutanten haben gezeigt, dass das Einfügen des Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teils in die große Untereinheit der Hydrogenase vor dem Nickel-Einbau stattfindet. Bei diesen Mutanten konnte, insbesondere bei Nickelmangel, eine Akkumulation von einer nickelfreien großen Untereinheit in einem Komplex mit HypC beobachtet werden. Die Aktivitäten der Reifungsproteine HypB, HypA (HypF) und einer Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (SlyD) in *E. coli* fördern den Nickel-Einbau in die große Untereinheit der Hydrogenase (217). Die Tatsache, dass die Funktion aller drei Proteine durch die Gabe hoher Nickelkonzentrationen im Wachstumsmedium kompensiert und die Hydrogenasenaktivität wiederhergestellt wird, deutet darauf hin, dass diese Proteine eine kinetische Funktion und eine spezifische Zuführung des Metalls in die Hydrogenase,

insbesondere bei Nickelmangel, ausüben. Aktuelle Struktur- und Interaktionsstudien mit HypA und HypB aus *T. kodakaraensis* ermöglichten neue Einblicke in die Bedeutung der Metallbindung dieser Proteine (siehe unten) (240,241). Das Metallochaperon HypA erfüllt die Funktion eines Gerüstproteins für den Nিকেleinbau. HypA wurde als Zn-Protein charakterisiert, das Nickel mit geringer Affinität (mikromolare Konzentration) bindet und an die große Untereinheit der Hydrogenase weiterleitet. Das monomere HypA-Protein hat zwei Metallbindestellen, eine Zn-Bindungsdomäne (ZnBD), welche sich in einer Zinkfinger-ähnlichen Domäne befindet und einer Ni-Bindungsdomäne (NIBD) mit einer  $\alpha\beta$ -Organisation (Abb 18) (240,241). Die NIBD enthält ein hoch konserviertes MHE-Motiv, das für Ni-Bindung wichtig ist. Nickel wird durch konservierte Glu- und His-Reste in der Ni-bindenden Domäne koordiniert. Zink wird von vier Cys in der Zinkfinger-Domäne koordiniert und spielt eine strukturelle Rolle beim Nickel-Transfer. Eine funktionelle Kopplung der beiden Domänen innerhalb des HypA-Proteins wurde durch die beobachtete Mobilität in der Zn-Bindungsdomäne in Gegenwart von Nickel unterstützt (242).

Das HypB-Protein ist essentiell für den effizienten Einbau von Nickel und damit für die Aktivität aller drei Hydrogenasen in *E. coli*. Ähnlich wie HypA hat auch HypB eine Zink- und eine Nickelbindestelle (Abb 18) (242-244). Das Protein bindet außerdem GTP/ATP und besitzt eine dimerisationsabhängige GTPase/ATPase-Aktivität (245,246). Eine ähnliche GTPase-Aktivität ist für den Nickel-Einbau in CO-DH und Urease bekannt (247). Einige HypB Proteine besitzen eine Histidin-reiche Region an ihrem N-Terminus, die als Reservoir für Nickelionen dienen kann (248). In *E. coli* besitzt das HypB-Protein keine charakteristische Poly-Histidin-Region. Allerdings ist ein zusätzliches Protein, SlyD, für die Speicherung von Metall-Ionen und für die Unterstützung der GTPase-Aktivität von HypB erforderlich (Abb 18) (249,250). Das *slyD*-Gen ist kein Bestandteil des *hyp*-Operons. Unter Ni-Limitierung hat sein Fehlen in *E. coli* jedoch einen pleiotropen Effekt auf die Hydrogenase-Reifung (251). In *E. coli* wurde ein Multiproteinkomplex aus HypA, HypB, SlyD und der großen Untereinheit der Hydrogenase-3 (HycE) beobachtet (252). Dies deutet auf koordinierte Aktivitäten aller drei Proteine am Nিকেleinbau hin. SlyD interagiert mit HypB und liefert bzw. fördert wahrscheinlich die Nickelfreisetzung aus dem HypAB-Komplex (253).

Basierend auf den aktuellen Erkenntnissen wurde ein Arbeitsmodell für die Nickel-Bindung und -Übertragung auf die große Untereinheit der Hydrogenase in Abb. 18 dargestellt (241). Eine Komplexbildung zwischen HypA und nur der ATP-gebundenen HypB-Form induziert eine drastische Konformationsänderung in der ZnBD von HypA. Der konservierte His-Rest<sup>98</sup> des ZnBD kommt nah an die MHE Ni-Bindestelle des HypA, was seine Affinität zu Nickel von mikromolaren auf nanomolare Konzentration erhöht. Die Nickelbindung führt wiederum zu einer Konformationsänderung im HypAB-Komplex, was die ATPase von HypB stimuliert und damit zur Dissoziation des Komplexes führt. Anschließend kann HypA Nickel zur

Fe(CN)<sub>2</sub>CO-beladenen großen Untereinheit weiterleiten und nimmt seine mikromolare Affinität zu Nickel wieder an (241).



**Abbildung 18 : Nickel-Bindung und Insertion in die große Untereinheit der Hydrogenase.** Der Obere Teil zeigt die Kristallstruktur von HypA aus *T. kodakaraensis* (240), HypB aus *Methanocaldococcus jannaschii* (244) und SlyD aus *T. thermophilus* (250). Die einzelnen Domänen sind farblich voneinander abgesetzt. Die Positionen verschiedener Metallionen sind gezeigt, GTP $\gamma$ S steht für nicht hydrolysierbares ATP-Analogon. Im unteren Teil ist ein Modell für die Nickel-Bindung und -Übertragung auf die große Untereinheit der Hydrogenase dargestellt. Eine Komplexbildung zwischen zwei HypA und zwei ATP-gebundenen HypB-Formen (das zweite HypA wird nicht gezeigt) induziert eine Konformationsänderung in der ZnBD von HypA. Der konservierte His-Rest<sup>98</sup> des ZnBD kommt nah an die MHE-Ni-Bindestelle des HypA, was seine Affinität zu Nickel von mikromolare auf nanomolare Konzentration erhöht. Die Nickelbindung führt wiederum zu einer Konformationsänderung im HypAB-Komplex, was die ATPase von HypB stimuliert und zur Dissoziation des Komplexes führt. Anschließend kann HypA Nickel zur Fe(CN)<sub>2</sub>CO-beladenen großen Untereinheit weiterleiten und nimmt seine mikromolare Affinität zu Nickel wieder an. Modifiziert nach (241). (HypA: PDB-Code 3A44 (240); HypB: PDB-Code 2HF9 (244); SlyD: PDB-Code 3CGM (250)).

### 3.4.5. Endoproteolytische Spaltung

Die große Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase liegt während des gesamten Reifungsprozesses in unprozessierter Form vor. Im letzten Schritt der Reifung wird nach der Insertion des kompletten  $\text{NiFe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Cofaktors in das Vorläuferprotein der großen Untereinheit, eine C-terminale Extension abgeschnitten (205,217,254,255). Die Abspaltung des C-terminalen Peptids führt zu einer Konformationsänderung der großen Untereinheit, durch die das Metallzentrum tief ins Innere des Proteins eingebettet wird (168,217). Die proteolytische Spaltung wird durch eine der für jede Hydrogenase spezifischen Endopeptidasen katalysiert, die im jeweiligen Operon der Strukturgene kodiert wird. Bei Hydrogenase-1 und -2 von *E. coli* werden Peptide mit 15 Aminosäuren durch die Endopeptidasen HyaD bzw. HybD abgespalten. Im Fall der Hydrogenase-3 wird ein Peptid aus 32-Aminosäuren durch die Hycl-Protease entfernt (217,256). Die Endopeptidasen der Hydrogenasen werden nicht von herkömmlichen Inhibitoren wie PMSF, EDTA und Benzamidin gehemmt (256). Bis heute ist der Katalysemechanismus nicht vollständig geklärt. So ist unbekannt, auf welche Art und Weise die Substraterkennung und -bindung durch die spezifische Endopeptidase erfolgt. Die Kristallstruktur der HybD- und Hycl-Endopeptidasen sowie die genetische Analyse der Schnittstelle haben einen genaueren Einblick in diesen Reifungsschritt geliefert (257). Die gereinigten HybD- und Hycl-Endopeptidasen enthalten kein Metall. Jedoch zeigt die Kristallstruktur von HybD, dass das Protein in einem Komplex mit  $\text{Cd}^{2+}$ -Ion aus dem Kristallisierungspuffer vorliegt, wobei das Metall durch Glutamat-16, Aspartat-62 und Histidin-93, sowie einem  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül pentakoordiniert wird. Diese Aminosäuren sind unter allen Mitgliedern der Familie dieser Endopeptidasen konserviert. Ein Austausch dieser Aminosäuren oder eine Substitution des Nickels des  $\text{NiFe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Cofaktors durch Zinkionen, führte zur Inaktivierung der Endopeptidase (256,258).

Die Funktion der Metallbindestelle der Protease liegt also in der Erkennung des Nickels in der Vorstufe der großen Untereinheit. Damit wird sichergestellt, dass erst nach einer erfolgreich abgeschlossenen Insertion des Cofaktors in den Vorläufer eine Prozessierung stattfindet (259,260). Die C-terminale Spaltstelle der großen Untereinheit verschiedener [NiFe]-Hydrogenasen ist drei Aminosäuren vom vierten Cysteinrest, der den Cofaktor koordiniert, entfernt. Die Konsensus-Sequenz ist  $\text{DPCxxCxxH/R}$ . Während der an der reifen Hydrogenase verbleibende Rest immer basisch vorkommt, ist der mit dem C-Terminus abgespaltene Rest meist unpolar. Diese Konserviertheit der Aminosäuren könnte auf eine Funktion dieser Reste bei der Erkennung durch die spezifischen Endopeptidasen und/oder bei der Beteiligung an der Spaltreaktion selbst hindeuten. Während der Austausch dieser Reste mit chemisch ähnlichen Aminosäuren toleriert wird, führt der nichtkonservative Ersatz dieser Reste zum Verlust der Prozessierbarkeit und zur Instabilität des Proteins (258). Somit

muss dem C-terminalen Peptid eine wichtige Funktion bei der Reifung zugewiesen werden. Wahrscheinlich hält es die große Untereinheit in einer reifungskompetenten Konformation entlang des Reifungswegs (256,259).

Das C-terminale Peptid der großen Untereinheit verschiedener Hydrogenasen variiert sehr stark bezüglich der Länge und Aminosäuresequenz. In seltenen Fällen kommen auch Hydrogenasen vor, deren große Untereinheit keine C-terminale Extension besitzt und somit nicht proteolytisch gespalten werden kann. Beispiele dafür sind die Mitglieder der membran-gebundenen energiekonservierenden Ech-Hydrogenasen (261,262) und die regulatorische Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* (263). Möglicherweise besitzt die Hydrogenase-Reifungsmaschinerie in diesen Organismen ein Protein-Chaperon, das die Funktion des C-terminalen Peptids ersetzen kann. Da die C-terminale Extension nicht kovalent an die große Untereinheit verknüpft werden muss (192), kann die Extension Teil eines separaten Polypeptids sein.

Neueste Ergebnisse aus unserem Labor zeigen, dass die C-terminale Extension der großen Untereinheit der Hydrogenase-2 (HybC) als intramolekulares Chaperon fungiert, das die Proteinsynthese und den Einbau des aktiven Zentrums in der katalytischen Untereinheit steuert. Das C-terminale Peptid ist erforderlich für die effiziente Erkennung der großen Untereinheit der Hydrogenase durch die Hyp-Reifungsmaschinerie, die den NiFe(CN)<sub>2</sub>CO-Cofaktor inseriert. Es konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Abspaltung des C-terminalen Peptids von HybC eine Konformationsänderung bewirkt, die die Interaktion mit der das [Fe-S]-Cluster enthaltenden kleinen Untereinheit (HybO) ermöglicht (Lindenstrauß, Lilie und Soboh; 2015 zur Publikation eingereicht). Der aktive heterodimere HybC-HybO-Komplex kann nun durch das Tat-System (Twin-Arginin-Translokationssystem) über die Cytoplasmamembran transportiert und eingebaut werden (195).

#### **3.4.6. *In vitro* Reifungssystem für die [NiFe]-Hydrogenase**

Die meisten Proteine, die in die Biosynthese und den Zusammenbau des [NiFe]-Zentrums involviert sind, wurden identifiziert. Allerdings konnte der Ablauf der Biosynthese-Ereignisse in der komplexen Reifungskaskade der [NiFe]-Hydrogenasen noch nicht vollständig aufgeklärt werden (217,264). Bis heute ist wenig über die Zusammensetzung von Proteinkomplexen entlang des Reifungswegs bekannt. Ebenso konnte die Herkunft und der Übertragungsweg des Eisenatoms und des CO-Liganden auf den Cofaktor noch nicht endgültig geklärt werden. Ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung des Cofaktorbiosynthesewegs könnte die Entwicklung eines *in vitro* Systems zur Reifung der Hydrogenasen leisten, bei dem ausschließlich gereinigte Komponenten eingesetzt werden. Ähnliche Rekonstitutionssysteme zur Aktivierung von Metalloproteinen *in vitro* haben eine

entscheidende Rolle bei der detaillierten Aufklärung der Biogenese und dem Zusammenbau von komplexen Metallcluster-Proteinen gespielt. Beispiel hierfür sind die Nitrogenase und die [Fe-Fe]-Hydrogenasen (106,108,265-267). Ein erstes *in vitro* Reifungssystem für [NiFe]-Hydrogenasen aus *E. coli* zeigte, dass die Insertion von Nickel und die proteolytische Prozessierung essentiell für die Reifung der katalytischen Einheit sind (212). Durch Kombination von zwei verschiedenen zellfreien Extrakten Hydrogenase-defizienter Mutanten ist es gelungen, unter Zugabe von anorganischen Supplementen, die Hydrogenaseaktivität wieder herzustellen. Bei dieser *in vitro* Komplementation konnte außerdem gezeigt werden, dass mindestens ein anaerober Schritt für die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli* wichtig ist (235,268).

Dieses System wurde dann als Aktivitätstest bei der Anreicherung und Reinigung weiterer akzessorischer Hydrogenase-Proteine und NiFe-(CN)<sub>2</sub>CO-Intermediate eingesetzt. Wir haben erfolgreich verschiedene Reifungsproteine und Intermediate entlang des Reifungsweges der NiFe(CN)<sub>2</sub>CO-Cofaktor-Biosynthese isoliert, identifiziert und in einem multidisziplinären Ansatz mittels biochemischer und verschiedener spektroskopischer Techniken charakterisiert (225,228). Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, verschiedene unvollständige Intermediate des Reifungsweges der Hydrogenase zu einem funktionell aktiven Enzym *in vitro* zu reifen. Die Reifung der Hydrogenase-1 und -2 konnte durch Zugabe von gereinigtem HybG-HypDE-Komplex zum zellfreien Extrakt eines Hyd-defizienten Stammes demonstriert werden. Die Reifung war von ATP, Carbamylphosphat, Nickel und einem Reduktionsmittel abhängig (228,268).

Weiterhin ist es uns gelungen, ein *in vitro* Reifungssystem für [NiFe]-Hydrogenase unter ausschließlicher Verwendung von gereinigten Protein-Komponenten zu etablieren. Es zeigt, dass die unprozessierte Variante der großen Untereinheit der Hydrogenase 2 (Pro-HybC) zu einem aktiven Enzym gereift werden kann. Damit besitzen wir ein Werkzeug, um die komplette Cofaktorsynthesemaschinerie in ihrem zeitlichen Ablauf kontrollieren zu können. Dies wird dabei helfen, die komplette Biogenese des aktiven Zentrums der Hydrogenase aufzuklären. Weiterhin wird damit ein Beitrag zum Verständnis des Aufbaus weiterer in aktiven Zentren von Enzymen vorkommender Metallcluster geleistet (Lindenstrauß, Lilie und Soboh; 2015 zur Publikation eingereicht).

#### 4. Zusammenfassung und Perspektiven

1) Die Biogenese von Fe-S-Cluster-haltigen Metalloproteinen scheint in allen bekannten Systemen dem gleichen biosynthetischen Prinzip zu folgen und kann im Wesentlichen in zwei Hauptschritte unterteilt werden: Diese Schritte umfassen (i) die Assemblierung eines Fe-S-Clusters auf einem Gerüstprotein, wobei einfache Fe-S-Cluster zu höher kondensierten oder modifizierten Clustern transformiert werden können. (ii) der Transfer und die Insertion des neu assemblierten Fe-S-Clusters oder Cofaktors vom Gerüstprotein zum Apoprotein.

2) Die Proteine, die an der Biosynthese Fe-S-Cluster-haltiger Cofaktoren beteiligt sind, können nach ihrer Funktion in drei Klassen unterteilt werden: (i) molekulare Gerüstproteine, an denen der Cofaktor schrittweise zusammengebaut wird. (ii) Metallocluster-Trägerproteine, die den Cofaktor bzw. dessen Bildungsintermediate tragen und diese zum nächsten Gerüstprotein im Biosyntheseweg weiterleiten sowie (iii) Enzyme, die Substrate für die Cofaktor-Synthese liefern.

3) Die Synthese des Fe-Mo-Cofaktors der Nitrogenase aus seinen Grundkomponenten Molybdän, Eisen, Schwefel und Homocitrat *in vitro* war entscheidend für eine detaillierte Aufklärung der Biogenese des Fe-Mo-Co.

4) Verschiedene Intermediate entlang des Biosyntheseweges der NiFe(CN)<sub>2</sub>CO-Cofaktoren der Hydrogenasen konnten isoliert, identifiziert und unter kombinierter Anwendung biochemischer und diverser spektroskopischer Techniken charakterisiert werden. Die Analyse des anaerob gereinigten HypCD- und seines homologen HybG-HypDE-Komplexes zeigte, dass der Komplex den Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teil des Cofaktors koordiniert und zusätzlich CO<sub>2</sub> bindet. Während isoliertes HypD-Protein allein das Gerüst für den Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teil bilden kann, koordiniert HypC oder sein homologes HybG das Fe-gebundene CO<sub>2</sub>. Die biochemischen und spektroskopischen Analysen zeigen, dass eine funktionelle Kopplung zwischen dem Eisenatom, CO, CN<sup>-</sup> und CO<sub>2</sub> vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass die HypC-Protein-Familie sowohl CO<sub>2</sub> für die CO-Liganden-Biosynthese zur Verfügung stellt, als auch das Fe-Atom des Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Teils liefert.

5) Ein *in vitro* System zur Analyse der Reifung der [NiFe]-Hydrogenase-2 von *E. coli* konnte etabliert werden. Mit der Rekonstitution des [NiFe]-Zentrum-Biosynthesewegs unter ausschließlicher Verwendung von gereinigten Komponenten, konnte die komplette Cofaktorsynthesemaschinerie in ihrem zeitlichen Regime kontrolliert werden. Dies wird in Zukunft dabei helfen, die Biogenese des aktiven Zentrums der Hydrogenase auf molekularer Ebene aufzuklären. Weiterhin wird damit ein Beitrag zum Verständnis des Aufbaus weiterer in aktiven Zentren von Enzymen vorkommender Metallcluster geleistet.



Die unmittelbaren Fragestellungen für die kommenden Jahre sind die folgenden: Wie erfolgt die Biosynthese und der Zusammenbau des  $\text{NiFe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Cofaktors? An welcher Stelle treten die konstituierenden Komponenten Fe, CO, CN und Ni in den Biosyntheseweg ein? Welche Intermediate treten auf? Wie erfolgt *in vivo* die Stabilisierung der Struktur des Cofaktors und seiner Intermediate während der Biosynthese? Welcher neuen Konzepte bedarf es, um die Natur hier zu imitieren?

Langfristig gesehen wird dieses Forschungsgebiet auch einen wichtigen Beitrag zur gezielten Synthese von maßgeschneiderten, hochkomplexen Metallclustern für die Erzeugung von Biokatalysatoren mit optimaler Selektivität und Aktivität sowie für die Erzeugung anorganischer Materialien mit außergewöhnlichen Eigenschaften leisten.

## 5. Literatur

1. Beinert, H. (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* **5**, 2-15
2. Huber, C., and Wachtershauser, G. (1998) Peptides by activation of amino acids with CO on (Ni,Fe)S surfaces: implications for the origin of life. *Science* **281**, 670-672
3. Arnon, D. I., Whatley, F. R., and Allen, M. B. (1957) Triphosphopyridine nucleotide as a catalyst of photosynthetic phosphorylation. *Nature* **180**, 182-185
4. Mortenson, L. E., Valentine, R. C., and Carnahan, J. E. (1962) An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun* **7**, 448-452
5. Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-659
6. Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annual review of biochemistry* **77**, 669-700
7. Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., and Barras, F. (2013) Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 455-469
8. Netz, D. J., Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A. J., and Lill, R. (2014) Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol* **24**, 303-312
9. Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., and Barras, F. (2013) Reprint of: Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 923-937
10. Sticht, H., and Rosch, P. (1998) The structure of iron-sulfur proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **70**, 95-136
11. Beinert, H. (2000) A tribute to sulfur. *Eur J Biochem* **267**, 5657-5664
12. Rieske, J. S., Hansen, R. E., and Zaugg, W. S. (1964) Studies on the Electron Transfer System. 58. Properties of a New Oxidation-Reduction Component of the Respiratory Chain as Studied by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J Biol Chem* **239**, 3017-3022
13. Werst, M. M., Kennedy, M. C., Houseman, A. L., Beinert, H., and Hoffman, B. M. (1990) Characterization of the [4Fe-4S]<sup>+</sup> cluster at the active site of aconitase by 57Fe, 33S, and 14N electron nuclear double resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 10533-10540
14. Aprahamian, G., and Feinberg, B. A. (1981) High-potential iron-sulfur proteins and their possible site of electron transfer. *Biochemistry* **20**, 915-919
15. Nicolet, Y., Cavazza, C., and Fontecilla-Camps, J. C. (2002) Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *Journal of Inorganic Biochemistry* **91**, 1-8
16. Drennan, C. L., and Peters, J. W. (2003) Surprising cofactors in metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 220-226
17. Peters, J. W., Stowell, M. H., Soltis, S. M., Finnegan, M. G., Johnson, M. K., and Rees, D. C. (1997) Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry* **36**, 1181-1187
18. Rees, D. C., and Howard, J. B. (2003) The interface between the biological and inorganic worlds: iron-sulfur metalloclusters. *Science* **300**, 929-931
19. Kim, J., and Rees, D. C. (1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *azotobacter vinelandii*. *Nature* **360**, 553-560
20. Lindahl, P. A. (2002) The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? *Biochemistry* **41**, 2097-2105
21. Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P. A., and Fontecilla-Camps, J. C. (2003) Ni-Zn-[Fe-4-S-4] and Ni-Ni-[Fe-4-S-4] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nature Structural Biology* **10**, 271-279
22. Seravalli, J., Xiao, Y., Gu, W., Cramer, S. P., Antholine, W. E., Krymov, V., Gerfen, G. J., and Ragsdale, S. W. (2004) Evidence that NiNi acetyl-CoA synthase is active and that the CuNi enzyme is not. *Biochemistry* **43**, 3944-3955

23. Svetlitchnyi, V., Dobbek, H., Meyer-Klaucke, W., Meins, T., Thiele, B., Romer, P., Huber, R., and Meyer, O. (2004) A functional Ni-Ni-[4Fe-4S] cluster in the monomeric acetyl-CoA synthase from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 446-451
24. Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R., and Meyer, O. (2001) Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* **293**, 1281-1285
25. Seravalli, J., and Ragsdale, S. W. (2000) Channeling of carbon monoxide during anaerobic carbon dioxide fixation. *Biochemistry* **39**, 1274-1277
26. Watenpaugh, K. D., Sieker, L. C., and Jensen, L. H. (1980) Crystallographic refinement of rubredoxin at 1 x 2 Å degrees resolution. *J Mol Biol* **138**, 615-633
27. Kameda, H., Hirabayashi, K., Wada, K., and Fukuyama, K. (2011) Mapping of protein-protein interaction sites in the plant-type [2Fe-2S] ferredoxin. *PLoS One* **6**, e21947
28. Kolling, D. J., Brunzelle, J. S., Lhee, S., Crofts, A. R., and Nair, S. K. (2007) Atomic resolution structures of rieske iron-sulfur protein: role of hydrogen bonds in tuning the redox potential of iron-sulfur clusters. *Structure* **15**, 29-38
29. Kissinger, C. R., Sieker, L. C., Adman, E. T., and Jensen, L. H. (1991) Refined crystal structure of ferredoxin II from *Desulfovibrio gigas* at 1.7 Å. *J Mol Biol* **219**, 693-715
30. Fukuyama, F., and Stock, G. (2002) Bio-Luddites square up to friends of Frankenstein. *Times Higher Education Supplement*, 16
31. Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., and Seefeldt, L. C. (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**, 1853-1858
32. Johnson, D. C., Unciuleac, M. C., and Dean, D. R. (2006) Controlled expression and functional analysis of iron-sulfur cluster biosynthetic components within *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **188**, 7551-7561
33. Frazzon, J., and Dean, D. R. (2003) Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 166-173
34. Jacobson, M. R., Brigle, K. E., Bennett, L. T., Setterquist, R. A., Wilson, M. S., Cash, V. L., Beynon, J., Newton, W. E., and Dean, D. R. (1989) Physical and genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **171**, 1017-1027
35. Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F., and Dean, D. R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2754-2758
36. Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., and Dean, D. R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **273**, 13264-13272
37. Patzer, S. I., and Hantke, K. (1999) SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3307-3309
38. Takahashi, Y., and Tokumoto, U. (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**, 28380-28383
39. Ayala-Castro, C., Saini, A., and Outten, F. W. (2008) Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 110-125
40. Fontecave, M., and Ollagnier-de-Choudens, S. (2008) Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Arch Biochem Biophys* **474**, 226-237
41. Frazzon, J., and Dean, D. R. (2002) Biosynthesis of the nitrogenase iron-molybdenum-cofactor from *Azotobacter vinelandii*. *Met Ions Biol Syst* **39**, 163-186
42. Outten, F. W., Wood, M. J., Munoz, F. M., and Storz, G. (2003) The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 45713-45719
43. Yuvaniyama, P., Agar, J. N., Cash, V. L., Johnson, M. K., and Dean, D. R. (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 599-604
44. Roy, A., Solodovnikova, N., Nicholson, T., Antholine, W., and Walden, W. E. (2003) A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *EMBO J* **22**, 4826-4835

45. Balk, J., and Lill, R. (2004) The cell's cookbook for iron--sulfur clusters: recipes for fool's gold? *ChemBiochem* **5**, 1044-1049
46. Lill, R., Dutkiewicz, R., Freibert, S. A., Heidenreich, T., Mascarenhas, J., Netz, D. J., Paul, V. D., Pierik, A. J., Richter, N., Stumpfig, M., Srinivasan, V., Stehling, O., and Muhlenhoff, U. (2015) The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Eur J Cell Biol* **94**, 280-291
47. Lill, R. (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831-838
48. Unciuleac, M. C., Chandramouli, K., Naik, S., Mayer, S., Huynh, B. H., Johnson, M. K., and Dean, D. R. (2007) *In vitro* activation of apo-aconitase using a [4Fe-4S] cluster-loaded form of the IscU [Fe-S] cluster scaffolding protein. *Biochemistry* **46**, 6812-6821
49. Chandramouli, K., Unciuleac, M. C., Naik, S., Dean, D. R., Huynh, B. H., and Johnson, M. K. (2007) Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* **46**, 6804-6811
50. Barthelme, D., Dinkelaker, S., Albers, S. V., Londei, P., Ermler, U., and Tampe, R. (2011) Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3228-3233
51. Zhang, C. (2014) Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein Cell* **5**, 750-760
52. Booker, S. J., Cicchillo, R. M., and Grove, T. L. (2007) Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 543-552
53. Harrison, P. M., Treffry, A., and Lilley, T. H. (1986) Ferritin as an iron-storage protein: mechanisms of iron uptake. *J Inorg Biochem* **27**, 287-293
54. Meyer, J. (2008) Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J Biol Inorg Chem* **13**, 157-170
55. Hinchliffe, P., and Sazanov, L. A. (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**, 771-774
56. Miller, H. K., and Auerbuch, V. (2015) Bacterial iron-sulfur cluster sensors in mammalian pathogens. *Metallomics : integrated biometal science* **7**, 943-956
57. Lanz, N. D., and Booker, S. J. (2015) Auxiliary iron-sulfur cofactors in radical SAM enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 1316-1334
58. Duin, E. C., Lafferty, M. E., Crouse, B. R., Allen, R. M., Sanyal, I., Flint, D. H., and Johnson, M. K. (1997) [2Fe-2S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **36**, 11811-11820
59. Kulzer, R., Pils, T., Kappl, R., Huttermann, J., and Knappe, J. (1998) Reconstitution and characterization of the polynuclear iron-sulfur cluster in pyruvate formate-lyase-activating enzyme. Molecular properties of the holoenzyme form. *J Biol Chem* **273**, 4897-4903
60. Crane, B. R., and Getzoff, E. D. (1996) The relationship between structure and function for the sulfite reductases. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 744-756
61. Hidalgo, E., Ding, H., and Dimple, B. (1997) Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. *Trends Biochem Sci* **22**, 207-210
62. Kobayashi, K., Fujikawa, M., and Kozawa, T. (2014) Oxidative stress sensing by the iron-sulfur cluster in the transcription factor, SoxR. *J Inorg Biochem* **133**, 87-91
63. Imlay, J. A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry* **77**, 755-776
64. Sawers, R. G., Zehelein, E., and Böck, A. (1988) Two-dimensional gel electrophoretic analysis of *Escherichia coli* proteins: influence of various anaerobic growth conditions and the fnr gene product on cellular protein composition. *Arch Microbiol* **149**, 240-244
65. Crack, J. C., Green, J., Le Brun, N. E., and Thomson, A. J. (2006) Detection of sulfide release from the oxygen-sensing [4Fe-4S] cluster of FNR. *J Biol Chem* **281**, 18909-18913
66. Porello, S. L., Leyes, A. E., and David, S. S. (1998) Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates. *Biochemistry* **37**, 14756-14764

67. Kuo, C. F., McRee, D. E., Fisher, C. L., O'Handley, S. F., Cunningham, R. P., and Tainer, J. A. (1992) Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III. *Science* **258**, 434-440
68. Zastrow, M. L., and Pecoraro, V. L. (2013) Designing functional metalloproteins: from structural to catalytic metal sites. *Coord Chem Rev* **257**, 2565-2588
69. Petrik, I. D., Liu, J., and Lu, Y. (2014) Metalloenzyme design and engineering through strategic modifications of native protein scaffolds. *Curr Opin Chem Biol* **19**, 67-75
70. Burgess, B. K., and Lowe, D. J. (1996) Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chemical reviews* **96**, 2983-3012
71. Isobe, K., and Ohte, N. (2014) Ecological perspectives on microbes involved in N-cycling. *Microbes Environ* **29**, 4-16
72. Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., and Blankenship, R. E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* **21**, 541-554
73. Bulen, W. A., and LeComte, J. R. (1966) The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N<sub>2</sub> reduction, ATP-dependent H<sub>2</sub> evolution, and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 979-986
74. Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J., and Rees, D. C. (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* **257**, 1653-1659
75. Shah, V. K., and Brill, W. J. (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3249-3253
76. Shah, V. K., Imperial, J., Ugalde, R. A., Ludden, P. W., and Brill, W. J. (1986) *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1636-1640
77. Einsle, O., Tezcan, F. A., Andrade, S. L., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J. B., and Rees, D. C. (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science* **297**, 1696-1700
78. Spatzal, T., Aksoyoglu, M., Zhang, L., Andrade, S. L., Schleicher, E., Weber, S., Rees, D. C., and Einsle, O. (2011) Evidence for interstitial carbon in nitrogenase FeMo cofactor. *Science* **334**, 940
79. Hageman, R. V., and Burris, R. H. (1978) Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2699-2702
80. Igarashi, R. Y., and Seefeldt, L. C. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38**, 351-384
81. Simpson, F. B., and Burris, R. H. (1984) A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science* **224**, 1095-1097
82. Burgess, B. K. (1990) Substrate Reactions of Nitrogenase Overview. *Abstr Pap Am Chem S* **200**, 140-Inor
83. Schmid, B., Ribbe, M. W., Einsle, O., Yoshida, M., Thomas, L. M., Dean, D. R., Rees, D. C., and Burgess, B. K. (2002) Structure of a cofactor-deficient nitrogenase MoFe protein. *Science* **296**, 352-356
84. Lanzilotta, W. N., Parker, V. D., and Seefeldt, L. C. (1998) Electron transfer in nitrogenase analyzed by Marcus theory: evidence for gating by MgATP. *Biochemistry* **37**, 399-407
85. Eady, R. R. (1996) Structure minus sign Function Relationships of Alternative Nitrogenases. *Chemical reviews* **96**, 3013-3030
86. Ruttimann-Johnson, C., Staples, C. R., Rangaraj, P., Shah, V. K., and Ludden, P. W. (1999) A vanadium and iron cluster accumulates on VnfX during iron-vanadium-cofactor synthesis for the vanadium nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **274**, 18087-18092
87. Bishop, P. E., Jarlenski, D. M., and Hetherington, D. R. (1980) Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7342-7346
88. Bishop, P. E., Jarlenski, D. M., and Hetherington, D. R. (1982) Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **150**, 1244-1251
89. Joerger, R. D., and Bishop, P. E. (1988) Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *Crit Rev Microbiol* **16**, 1-14

90. Boyd, E. S., Hamilton, T. L., and Peters, J. W. (2011) An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation. *Front Microbiol* **2**, 205
91. Masepohl, B., and Hallenbeck, P. C. (2010) Nitrogen and molybdenum control of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Adv Exp Med Biol* **675**, 49-70
92. Schneider, K., Muller, A., Schramm, U., and Klipp, W. (1991) Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a nifHDK-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem* **195**, 653-661
93. Luque, F., and Pau, R. N. (1991) Transcriptional regulation by metals of structural genes for *Azotobacter vinelandii* nitrogenases. *Mol Gen Genet* **227**, 481-487
94. Chan, M. K., Kim, J., and Rees, D. C. (1993) The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science* **260**, 792-794
95. Hu, Y., and Ribbe, M. W. (2013) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J Biol Chem* **288**, 13173-13177
96. Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U. B., and Puhler, A. (1988) Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* **203**, 715-738
97. MacNeil, T., MacNeil, D., Roberts, G. P., Supiano, M. A., and Brill, W. J. (1978) Fine-structure mapping and complementation analysis of nif (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **136**, 253-266
98. Roberts, G. P., MacNeil, T., MacNeil, D., and Brill, W. J. (1978) Regulation and characterization of protein products coded by the nif (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **136**, 267-279
99. Martinez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P., and Dixon, R. (2004) The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *Journal of Bacteriology* **186**, 601-610
100. Rubio, L. M., and Ludden, P. W. (2005) Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J Bacteriol* **187**, 405-414
101. Shah, V. K., Stacey, G., and Brill, W. J. (1983) Electron transport to nitrogenase. Purification and characterization of pyruvate:flavodoxin oxidoreductase. The nifJ gene product. *J Biol Chem* **258**, 12064-12068
102. Rubio, L. M., and Ludden, P. W. (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual review of microbiology* **62**, 93-111
103. Dos Santos, P. C., Dean, D. R., Hu, Y., and Ribbe, M. W. (2004) Formation and insertion of the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Chemical reviews* **104**, 1159-1173
104. Corbett, M. C., Hu, Y., Fay, A. W., Ribbe, M. W., Hedman, B., and Hodgson, K. O. (2006) Structural insights into a protein-bound iron-molybdenum cofactor precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1238-1243
105. Soboh, B., Igarashi, R. Y., Hernandez, J. A., and Rubio, L. M. (2006) Purification of a NifEN protein complex that contains bound molybdenum and a FeMo-Co precursor from an *Azotobacter vinelandii* DeltanifHDK strain. *J Biol Chem* **281**, 36701-36709
106. Curatti, L., Hernandez, J. A., Igarashi, R. Y., Soboh, B., Zhao, D., and Rubio, L. M. (2007) *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum, and homocitrate using purified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17626-17631
107. Schwarz, G., Mendel, R. R., and Ribbe, M. W. (2009) Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature* **460**, 839-847
108. Ribbe, M. W., Hu, Y., Hodgson, K. O., and Hedman, B. (2014) Biosynthesis of nitrogenase metalloclusters. *Chemical reviews* **114**, 4063-4080
109. Zhao, D., Curatti, L., and Rubio, L. M. (2007) Evidence for nifU and nifS participation in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J Biol Chem* **282**, 37016-37025
110. Curatti, L., Ludden, P. W., and Rubio, L. M. (2006) NifB-dependent *in vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5297-5301
111. Hernandez, J. A., Igarashi, R. Y., Soboh, B., Curatti, L., Dean, D. R., Ludden, P. W., and Rubio, L. M. (2007) NifX and NifEN exchange NifB cofactor and the VK-cluster, a newly

- isolated intermediate of the iron-molybdenum cofactor biosynthetic pathway. *Mol Microbiol* **63**, 177-192
112. Hoover, T. R., Shah, V. K., Roberts, G. P., and Ludden, P. W. (1986) nifV-dependent, low-molecular-weight factor required for *in vitro* synthesis of iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J Bacteriol* **167**, 999-1003
  113. Hoover, T. R., Robertson, A. D., Cerny, R. L., Hayes, R. N., Imperial, J., Shah, V. K., and Ludden, P. W. (1987) Identification of the V factor needed for synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase as homocitrate. *Nature* **329**, 855-857
  114. Hu, Y., Corbett, M. C., Fay, A. W., Webber, J. A., Hodgson, K. O., Hedman, B., and Ribbe, M. W. (2006) FeMo cofactor maturation on NifEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17119-17124
  115. Rubio, L. M., Rangaraj, P., Homer, M. J., Roberts, G. P., and Ludden, P. W. (2002) Cloning and mutational analysis of the gamma gene from *Azotobacter vinelandii* defines a new family of proteins capable of metallocluster binding and protein stabilization. *J Biol Chem* **277**, 14299-14305
  116. Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E., and Dean, D. R. (1989) Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet* **219**, 49-57
  117. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., and Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry* **74**, 247-281
  118. Fu, W., Jack, R. F., Morgan, T. V., Dean, D. R., and Johnson, M. K. (1994) nifU gene product from *Azotobacter vinelandii* is a homodimer that contains two identical [2Fe-2S] clusters. *Biochemistry* **33**, 13455-13463
  119. Smith, A. D., Jameson, G. N., Dos Santos, P. C., Agar, J. N., Naik, S., Krebs, C., Frazzon, J., Dean, D. R., Huynh, B. H., and Johnson, M. K. (2005) NifS-mediated assembly of [4Fe-4S] clusters in the N- and C-terminal domains of the NifU scaffold protein. *Biochemistry* **44**, 12955-12969
  120. George, S. J., Igarashi, R. Y., Xiao, Y., Hernandez, J. A., Demuez, M., Zhao, D., Yoda, Y., Ludden, P. W., Rubio, L. M., and Cramer, S. P. (2008) Extended X-ray absorption fine structure and nuclear resonance vibrational spectroscopy reveal that NifB-co, a FeMo-co precursor, comprises a 6Fe core with an interstitial light atom. *J Am Chem Soc* **130**, 5673-5680
  121. Shah, V. K., Allen, J. R., Spangler, N. J., and Ludden, P. W. (1994) *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. Purification and characterization of NifB cofactor, the product of NIFB protein. *J Biol Chem* **269**, 1154-1158
  122. Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., and Miller, N. E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* **29**, 1097-1106
  123. McGlynn, S. E., Boyd, E. S., Shepard, E. M., Lange, R. K., Gerlach, R., Broderick, J. B., and Peters, J. W. (2010) Identification and characterization of a novel member of the radical AdoMet enzyme superfamily and implications for the biosynthesis of the Hmd hydrogenase active site cofactor. *J Bacteriol* **192**, 595-598
  124. Soboh, B., Boyd, E. S., Zhao, D., Peters, J. W., and Rubio, L. M. (2010) Substrate specificity and evolutionary implications of a NifDK enzyme carrying NifB-co at its active site. *FEBS Lett* **584**, 1487-1492
  125. Happe, T., and Hemschemeier, A. (2014) Metalloprotein mimics - old tools in a new light. *Trends Biotechnol* **32**, 170-176
  126. Paustian, T. D., Shah, V. K., and Roberts, G. P. (1989) Purification and characterization of the nifN and nifE gene products from *Azotobacter vinelandii* mutant UW45. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6082-6086
  127. Roll, J. T., Shah, V. K., Dean, D. R., and Roberts, G. P. (1995) Characteristics of NIFNE in *Azotobacter vinelandii* strains. Implications for the synthesis of the iron-molybdenum cofactor of dinitrogenase. *J Biol Chem* **270**, 4432-4437

128. Ugalde, R. A., Imperial, J., Shah, V. K., and Brill, W. J. (1984) Biosynthesis of iron-molybdenum cofactor in the absence of nitrogenase. *J Bacteriol* **159**, 888-893
129. Brigle, K. E., Weiss, M. C., Newton, W. E., and Dean, D. R. (1987) Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. *J Bacteriol* **169**, 1547-1553
130. George, S. J., Igarashi, R. Y., Piamonteze, C., Soboh, B., Cramer, S. P., and Rubio, L. M. (2007) Identification of a Mo-Fe-S cluster on NifEN by Mo K-edge extended X-ray absorption fine structure. *J Am Chem Soc* **129**, 3060-3061
131. Rangaraj, P., and Ludden, P. W. (2002) Accumulation of 99Mo-containing iron-molybdenum cofactor precursors of nitrogenase on NifNE, NifH, and NifX of *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **277**, 40106-40111
132. Hernandez, J. A., George, S. J., and Rubio, L. M. (2009) Molybdenum trafficking for nitrogen fixation. *Biochemistry* **48**, 9711-9721
133. Hollenstein, K., Frei, D. C., and Locher, K. P. (2007) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446**, 213-216
134. Bevers, L. E., Hagedoorn, P. L., Krijger, G. C., and Hagen, W. R. (2006) Tungsten transport protein A (WtpA) in *Pyrococcus furiosus*: the first member of a new class of tungstate and molybdate transporters. *J Bacteriol* **188**, 6498-6505
135. Pau, R. N., and Lawson, D. M. (2002) Transport, homeostasis, regulation, and binding of molybdate and Tungstate to proteins. *Met Ions Biol Syst* **39**, 31-74
136. Delarbre, L., Stevenson, C. E., White, D. J., Mitchenall, L. A., Pau, R. N., and Lawson, D. M. (2001) Two crystal structures of the cytoplasmic molybdate-binding protein ModG suggest a novel cooperative binding mechanism and provide insights into ligand-binding specificity. *J Mol Biol* **308**, 1063-1079
137. Wiethaus, J., Muller, A., Neumann, M., Neumann, S., Leimkuhler, S., Narberhaus, F., and Masepohl, B. (2009) Specific interactions between four molybdenum-binding proteins contribute to Mo-dependent gene regulation in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **191**, 5205-5215
138. Schemberg, J., Schneider, K., Demmer, U., Warkentin, E., Muller, A., and Ermler, U. (2007) Towards biological supramolecular chemistry: a variety of pocket-templated, individual metal oxide cluster nucleations in the cavity of a mo/w-storage protein. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 2408-2413
139. Imperial, J., Ugalde, R. A., Shah, V. K., and Brill, W. J. (1984) Role of the *nifQ* gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **158**, 187-194
140. Ugalde, R. A., Imperial, J., Shah, V. K., and Brill, W. J. (1985) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*: effect of sulfur source. *J Bacteriol* **164**, 1081-1087
141. Fenske, D., Gnida, M., Schneider, K., Meyer-Klaucke, W., Schemberg, J., Henschel, V., Meyer, A. K., Knochel, A., and Muller, A. (2005) A new type of metalloprotein: The Mo storage protein from *azotobacter vinelandii* contains a polynuclear molybdenum-oxide cluster. *Chembiochem* **6**, 405-413
142. Hernandez, J. A., Curatti, L., Aznar, C. P., Perova, Z., Britt, R. D., and Rubio, L. M. (2008) Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11679-11684
143. Lee, H. I., Thrasher, K. S., Dean, D. R., Newton, W. E., and Hoffman, B. M. (1998) 14N electron spin-echo envelope modulation of the  $S = 3/2$  spin system of the *Azotobacter vinelandii* nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Biochemistry* **37**, 13370-13378
144. Zheng, L., White, R. H., and Dean, D. R. (1997) Purification of the *Azotobacter vinelandii* *nifV*-encoded homocitrate synthase. *J Bacteriol* **179**, 5963-5966
145. Mayer, S. M., Gormal, C. A., Smith, B. E., and Lawson, D. M. (2002) Crystallographic analysis of the MoFe protein of nitrogenase from a *nifV* mutant of *Klebsiella pneumoniae* identifies



- citrate as a ligand to the molybdenum of iron molybdenum cofactor (FeMoco). *J Biol Chem* **277**, 35263-35266
146. McLean, P. A., Smith, B. E., and Dixon, R. A. (1983) Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae* nifV mutants. *Biochem J* **211**, 589-597
  147. Hoover, T. R., Imperial, J., Ludden, P. W., and Shah, V. K. (1988) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Biofactors* **1**, 199-205
  148. Imperial, J., Hoover, T. R., Madden, M. S., Ludden, P. W., and Shah, V. K. (1989) Substrate reduction properties of dinitrogenase activated *in vitro* are dependent upon the presence of homocitrate or its analogues during iron-molybdenum cofactor synthesis. *Biochemistry* **28**, 7796-7799
  149. Ruttimann-Johnson, C., Rubio, L. M., Dean, D. R., and Ludden, P. W. (2003) VnfY is required for full activity of the vanadium-containing dinitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **185**, 2383-2386
  150. Rangaraj, P., Ruttimann-Johnson, C., Shah, V. K., and Ludden, P. W. (2001) Accumulation of <sup>55</sup>Fe-labeled precursors of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase on NifH and NifX of *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **276**, 15968-15974
  151. Rubio, L. M., Singer, S. W., and Ludden, P. W. (2004) Purification and characterization of NafY (apodinitrogenase gamma subunit) from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **279**, 19739-19746
  152. Homer, M. J., Dean, D. R., and Roberts, G. P. (1995) Characterization of the gamma protein and its involvement in the metallocluster assembly and maturation of dinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **270**, 24745-24752
  153. Stephenson, M., and Stickland, L. H. (1933) Hydrogenase: The bacterial formation of methane by the reduction of one-carbon compounds by molecular hydrogen. *Biochem J* **27**, 1517-1527
  154. Green, D. E., Stickland, L. H., and Tarr, H. L. (1934) Studies on reversible dehydrogenase systems: Carrier-linked reactions between isolated dehydrogenases. *Biochem J* **28**, 1812-1824
  155. Conrad, R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO). *Microbiological Reviews* **60**, 609-640
  156. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148
  157. Thauer, R. K., Kaster, A. K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T., and Shima, S. (2010) Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H<sub>2</sub> storage. *Annual review of biochemistry* **79**, 507-536
  158. Cammack, R. (1999) Hydrogenase sophistication. *Nature* **397**, 214-215
  159. Frey, M. (2002) Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes. *ChemBiochem* **3**, 153-160
  160. Friedrich, B., and Schwartz, E. (1993) Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annual review of microbiology* **47**, 351-383
  161. Wu, L. F., and Mandrand, M. A. (1993) Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS microbiology reviews* **10**, 243-269
  162. Shima, S., and Thauer, R. K. (2007) A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation. *Chem Rec* **7**, 37-46
  163. Vignais, P. M., and Billoud, B. (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical reviews* **107**, 4206-4272
  164. Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2008) The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science* **321**, 572-575
  165. Hiromoto, T., Ataka, K., Pilak, O., Vogt, S., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K., Shima, S., and Ermler, U. (2009) The crystal structure of C176A mutated [Fe]-hydrogenase suggests an acyl-iron ligation in the active site iron complex. *FEBS Lett* **583**, 585-590
  166. Nicolet, Y., Lemon, B. J., Fontecilla-Camps, J. C., and Peters, J. W. (2000) A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends Biochem Sci* **25**, 138-143

167. Pandey, A. S., Harris, T. V., Giles, L. J., Peters, J. W., and Szilagyi, R. K. (2008) Dithiomethylether as a ligand in the hydrogenase h-cluster. *J Am Chem Soc* **130**, 4533-4540
168. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580-587
169. Higuchi, Y., Yagi, T., and Yasuoka, N. (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* **5**, 1671-1680
170. Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C., and Nicolet, Y. (2007) Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chemical reviews* **107**, 4273-4303
171. Albracht, S. P., Graf, E. G., and Thauer, R. K. (1982) The EPR properties of nickel in hydrogenase from *Methanobacterium*. *FEBS Lett* **140**, 311-313
172. Vogt, S., Lyon, E. J., Shima, S., and Thauer, R. K. (2008) The exchange activities of [Fe] hydrogenase (iron-sulfur-cluster-free hydrogenase) from methanogenic archaea in comparison with the exchange activities of [FeFe] and [NiFe] hydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **13**, 97-106
173. Schleucher, J., Griesinger, C., Schworer, B., and Thauer, R. K. (1994) H<sub>2</sub>-forming N<sub>5</sub>, N<sub>10</sub>-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* catalyzes a stereoselective hydride transfer as determined by two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 3986-3993
174. Lyon, E. J., Shima, S., Boecher, R., Thauer, R. K., Grevels, F. W., Bill, E., Roseboom, W., and Albracht, S. P. (2004) Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. *J Am Chem Soc* **126**, 14239-14248
175. Pilak, O., Mamat, B., Vogt, S., Hagemeyer, C. H., Thauer, R. K., Shima, S., Vonrhein, C., Warkentin, E., and Ermler, U. (2006) The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. *J Mol Biol* **358**, 798-809
176. Shima, S., Schick, M., and Tamura, H. (2011) Preparation of [Fe]-hydrogenase from methanogenic archaea. *Methods Enzymol* **494**, 119-137
177. Hatchikian, E. C., Magro, V., Forget, N., Nicolet, Y., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) Carboxy-terminal processing of the large subunit of [Fe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757. *J Bacteriol* **181**, 2947-2952
178. Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A., and Albracht, S. P. (1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)<sub>2</sub>CO, Biology's way to activate H<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **274**, 3331-3337
179. Silakov, A., Wenk, B., Reijerse, E., and Lubitz, W. (2009) (14)N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge. *Phys Chem Chem Phys* **11**, 6592-6599
180. Malki, S., Saimmaime, I., De Luca, G., Rousset, M., Dermoun, Z., and Belaich, J. P. (1995) Characterization of an operon encoding an NADP-reducing hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans*. *J Bacteriol* **177**, 2628-2636
181. Verhagen, M. F., O'Rourke, T., and Adams, M. W. (1999) The hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, contains an unusually complex iron-hydrogenase: amino acid sequence analyses versus biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* **1412**, 212-229
182. Soboh, B., Linder, D., and Hedderich, R. (2004) A multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase and an NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Microbiology* **150**, 2451-2463
183. Mulder, D. W., Shepard, E. M., Meuser, J. E., Joshi, N., King, P. W., Posewitz, M. C., Broderick, J. B., and Peters, J. W. (2011) Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation. *Structure* **19**, 1038-1052
184. Driesener, R. C., Challand, M. R., McGlynn, S. E., Shepard, E. M., Boyd, E. S., Broderick, J. B., Peters, J. W., and Roach, P. L. (2010) [FeFe]-hydrogenase cyanide ligands derived from S-adenosylmethionine-dependent cleavage of tyrosine. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 1687-1690

185. Shepard, E. M., McGlynn, S. E., Bueling, A. L., Grady-Smith, C. S., George, S. J., Winslow, M. A., Cramer, S. P., Peters, J. W., and Broderick, J. B. (2010) Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10448-10453
186. Shepard, E. M., Duffus, B. R., George, S. J., McGlynn, S. E., Challand, M. R., Swanson, K. D., Roach, P. L., Cramer, S. P., Peters, J. W., and Broderick, J. B. (2010) [FeFe]-hydrogenase maturation: HydG-catalyzed synthesis of carbon monoxide. *J Am Chem Soc* **132**, 9247-9249
187. Shepard, E. M., Boyd, E. S., Broderick, J. B., and Peters, J. W. (2011) Biosynthesis of complex iron-sulfur enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **15**, 319-327
188. Czech, I., Stripp, S., Sanganas, O., Leidel, N., Happe, T., and Haumann, M. (2011) The [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF contains a H-cluster like [4Fe4S]-2Fe site. *FEBS Lett* **585**, 225-230
189. Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C., and Nicolet, Y. (2007) Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases (vol 107, pg 4273, 2007). *Chemical reviews* **107**, 5411-5411
190. Fontecilla-Camps, J. C., Amara, P., Cavazza, C., Nicolet, Y., and Volbeda, A. (2009) Structure-function relationships of anaerobic gas-processing metalloenzymes. *Nature* **460**, 814-822
191. Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P., and Bagley, K. A. (1997) Biological activation of hydrogen. *Nature* **385**, 126
192. Sorgenfrei, O., Linder, D., Karas, M., and Klein, A. (1993) A novel very small subunit of a selenium containing [NiFe] hydrogenase of *Methanococcus voltae* is postranslationally processed by cleavage at a defined position. *Eur J Biochem* **213**, 1355-1358
193. Pinske, C., Kruger, S., Soboh, B., Ihling, C., Kuhns, M., Brausemann, M., Jaroschinsky, M., Sauer, C., Sargent, F., Sinz, A., and Sawers, R. G. (2011) Efficient electron transfer from hydrogen to benzyl viologen by the [NiFe]-hydrogenases of *Escherichia coli* is dependent on the coexpression of the iron-sulfur cluster-containing small subunit. *Arch Microbiol* **193**, 893-903
194. Constant, P., Chowdhury, S. P., Hesse, L., Pratscher, J., and Conrad, R. (2011) Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **77**, 6027-6035
195. Sargent, F. (2007) Constructing the wonders of the bacterial world: biosynthesis of complex enzymes. *Microbiology* **153**, 633-651
196. Appel, J., Phunpruch, S., Steinmuller, K., and Schulz, R. (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol* **173**, 333-338
197. Sawers, R. G. (2005) Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **33**, 42-46
198. Oelgeschlager, E., and Rother, M. (2008) Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea. *Arch Microbiol* **190**, 257-269
199. Drennan, C. L., Heo, J., Sintchak, M. D., Schreiter, E., and Ludden, P. W. (2001) Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11973-11978
200. Soboh, B., Linder, D., and Hedderich, R. (2002) Purification and catalytic properties of a CO-oxidizing:H<sub>2</sub>-evolving enzyme complex from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Eur J Biochem* **269**, 5712-5721
201. Constant, P., Chowdhury, S. P., Pratscher, J., and Conrad, R. (2010) Streptomycetes contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environ Microbiol* **12**, 821-829
202. Conrad, R., Aragno, M., and Seiler, W. (1983) Production and consumption of hydrogen in a eutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* **45**, 502-510
203. Ballantine, S. P., and Boxer, D. H. (1985) Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**, 454-459

204. Rossmann, R., Sawers, G., and Böck, A. (1991) Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol* **5**, 2807-2814
205. Forzi, L., and Sawers, R. G. (2007) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals* **20**, 565-578
206. Menon, N. K., Robbins, J., Peck, H. D., Jr., Chatelus, C. Y., Choi, E. S., and Przybyla, A. E. (1990) Cloning and sequencing of a putative *Escherichia coli* [NiFe] hydrogenase-1 operon containing six open reading frames. *J Bacteriol* **172**, 1969-1977
207. Menon, N. K., Chatelus, C. Y., Dervartanian, M., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T., Peck, H. D., Jr., and Przybyla, A. E. (1994) Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *J Bacteriol* **176**, 4416-4423
208. Sauter, M., Bohm, R., and Böck, A. (1992) Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. in *Mol Microbiol*
209. Andrews, S. C., Berks, B. C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P., and Guest, J. R. (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143 ( Pt 11)**, 3633-3647
210. Self, W. T., Hasona, A., and Shanmugam, K. T. (2004) Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 580-587
211. Lutz, S., Jacobi, A., Schlensog, V., Bohm, R., Sawers, G., and Böck, A. (1991) Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 123-135
212. Maier, T., and Böck, A. (1996) Generation of active [NiFe] hydrogenase *in vitro* from a nickel-free precursor form. *Biochemistry* **35**, 10089-10093
213. Schlensog, V., Lutz, S., and Böck, A. (1994) Purification and DNA-binding properties of FHLA, the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**, 19590-19596
214. Jacobi, A., Rossmann, R., and Böck, A. (1992) The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **158**, 444-451
215. Blokesch, M., Magalon, A., and Böck, A. (2001) Interplay between the specific chaperone-like proteins *HybG* and *HypC* in maturation of hydrogenases 1, 2, and 3 from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 2817-2822
216. Hube, M., Blokesch, M., and Böck, A. (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins *HypA* and *HybF*. *J Bacteriol* **184**, 3879-3885
217. Böck, A., King, P. W., Blokesch, M., and Posewitz, M. C. (2006) Maturation of hydrogenases. *Adv Microb Physiol* **51**, 1-71
218. Paschos, A., Glass, R. S., and Böck, A. (2001) Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett* **488**, 9-12
219. Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E., and Böck, A. (2002) *HypF*, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J Biol Chem* **277**, 49945-49951
220. Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S., and Böck, A. (2003) Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* **299**, 1067-1070
221. Petkun, S., Shi, R., Li, Y., Asinas, A., Munger, C., Zhang, L., Waclawek, M., Soboh, B., Sawers, R. G., and Cygler, M. (2011) Structure of hydrogenase maturation protein *HypF* with reaction intermediates shows two active sites. *Structure* **19**, 1773-1783
222. Rosano, C., Zuccotti, S., Bucciantini, M., Stefani, M., Ramponi, G., and Bolognesi, M. (2002) Crystal structure and anion binding in the prokaryotic hydrogenase maturation factor *HypF* acylphosphatase-like domain. *J Mol Biol* **321**, 785-796
223. Tominaga, T., Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2012) Structure of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein *HypF* from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **68**, 1153-1157

224. Tominaga, T., Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2013) Crystal structures of the carbamoylated and cyanated forms of HypE for [NiFe] hydrogenase maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20485-20490
225. Stripp, S. T., Lindenstrauss, U., Sawers, R. G., and Soboh, B. (2015) Identification of an Isothiocyanate on the HypEF Complex Suggests a Route for Efficient Cyanyl-Group Channeling during [NiFe]-Hydrogenase Cofactor Generation. *PLoS One* **10**, e0133118
226. Blokesch, M., Albracht, S. P., Matzanke, B. F., Drapal, N. M., Jacobi, A., and Böck, A. (2004) The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *J Mol Biol* **344**, 155-167
227. Shomura, Y., and Higuchi, Y. (2012) Structural basis for the reaction mechanism of S-carbamoylation of HypE by HypF in the maturation of [NiFe]-hydrogenases. *J Biol Chem* **287**, 28409-28419
228. Soboh, B., Lindenstrauss, U., Granich, C., Javed, M., Herzberg, M., Thomas, C., and Stripp, S. T. (2014) [NiFe]-hydrogenase maturation *in vitro*: analysis of the roles of the HybG and HypD accessory proteins1. *Biochem J* **464**, 169-177
229. Soboh, B., Stripp, S. T., Muhr, E., Granich, C., Brausseman, M., Herzberg, M., Heberle, J., and Sawers, R. G. (2012) [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands. *FEBS Lett* **586**, 3882-3887
230. Burstel, I., Siebert, E., Winter, G., Hummel, P., Zebger, I., Friedrich, B., and Lenz, O. (2012) A universal scaffold for synthesis of the Fe(CN)<sub>2</sub>(CO) moiety of [NiFe] hydrogenase. *J Biol Chem* **287**, 38845-38853
231. Watanabe, S., Matsumi, R., Arai, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2007) Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: insights into cyanation reaction by thiol redox signaling. *Mol Cell* **27**, 29-40
232. Wang, L., Xia, B., and Jin, C. (2007) Solution structure of *Escherichia coli* HypC. *Biochem Biophys Res Commun* **361**, 665-669
233. Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2012) Crystal structures of the HypCD complex and the HypCDE ternary complex: transient intermediate complexes during [NiFe] hydrogenase maturation. *Structure* **20**, 2124-2137
234. Stripp, S. T., Soboh, B., Lindenstrauss, U., Brausseman, M., Herzberg, M., Nies, D. H., Sawers, R. G., and Heberle, J. (2013) HypD is the scaffold protein for Fe-(CN)<sub>2</sub>CO cofactor assembly in [NiFe]-hydrogenase maturation. *Biochemistry* **52**, 3289-3296
235. Stripp, S. T., Lindenstrauss, U., Granich, C., Sawers, R. G., and Soboh, B. (2014) The influence of oxygen on [NiFe]-hydrogenase cofactor biosynthesis and how ligation of carbon monoxide precedes cyanation. *PLoS One* **9**, e107488
236. Roseboom, W., Blokesch, M., Böck, A., and Albracht, S. P. (2005) The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different. *FEBS Lett* **579**, 469-472
237. Lenz, O., Zebger, I., Hamann, J., Hildebrandt, P., and Friedrich, B. (2007) Carbamoylphosphate serves as the source of CN(-), but not of the intrinsic CO in the active site of the regulatory [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett* **581**, 3322-3326
238. Forzi, L., Hellwig, P., Thauer, R. K., and Sawers, R. G. (2007) The CO and CN- ligands to the active site Fe in [NiFe]-hydrogenase of *Escherichia coli* have different metabolic origins. *Febs Letters* **581**, 3317-3321
239. Soboh, B., Stripp, S. T., Bielak, C., Lindenstrauss, U., Brausseman, M., Javaid, M., Hallensleben, M., Granich, C., Herzberg, M., Heberle, J., and Sawers, R. G. (2013) The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Lett* **587**, 2512-2516
240. Watanabe, S., Arai, T., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2009) Crystal structure of HypA, a nickel-binding metallochaperone for [NiFe] hydrogenase maturation. *J Mol Biol* **394**, 448-459
241. Watanabe, S., Kawashima, T., Nishitani, Y., Kanai, T., Wada, T., Inaba, K., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2015) Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe]

- hydrogenase by Ni-metallochaperone HypA and its enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7701-7706
242. Sydor, A. M., Lebrette, H., Ariyakumaran, R., Cavazza, C., and Zamble, D. B. (2014) Relationship between Ni(II) and Zn(II) coordination and nucleotide binding by the *Helicobacter pylori* [NiFe]-hydrogenase and urease maturation factor HypB. *J Biol Chem* **289**, 3828-3841
  243. Sydor, A. M., Liu, J., and Zamble, D. B. (2011) Effects of metal on the biochemical properties of *Helicobacter pylori* HypB, a maturation factor of [NiFe]-hydrogenase and urease. *J Bacteriol* **193**, 1359-1368
  244. Gasper, R., Scrima, A., and Wittinghofer, A. (2006) Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *J Biol Chem* **281**, 27492-27502
  245. Xia, W., Li, H., Yang, X., Wong, K. B., and Sun, H. (2012) Metallo-GTPase HypB from *Helicobacter pylori* and its interaction with nickel chaperone protein HypA. *J Biol Chem* **287**, 6753-6763
  246. Maier, T., Lottspeich, F., and Böck, A. (1995) GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**, 133-138
  247. Mehta, N., Benoit, S., and Maier, R. J. (2003) Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. *Microb Pathog* **35**, 229-234
  248. Xia, W., Li, H., and Sun, H. (2014) Functional disruption of HypB, a GTPase of *Helicobacter pylori*, by bismuth. *Chem Commun (Camb)* **50**, 1611-1614
  249. Cheng, T., Li, H., Yang, X., Xia, W., and Sun, H. (2013) Interaction of SlyD with HypB of *Helicobacter pylori* facilitates nickel trafficking. *Metallomics : integrated biometal science* **5**, 804-807
  250. Low, C., Neumann, P., Tidow, H., Weininger, U., Haupt, C., Friedrich-Epler, B., Scholz, C., Stubbs, M. T., and Balbach, J. (2010) Crystal structure determination and functional characterization of the metallochaperone SlyD from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol* **398**, 375-390
  251. Pinske, C., Sargent, F., and Sawers, R. G. (2015) SlyD-dependent nickel delivery limits maturation of [NiFe]-hydrogenases in late-stationary phase *Escherichia coli* cells. *Metallomics : integrated biometal science* **7**, 683-690
  252. Chan Chung, K. C., and Zamble, D. B. (2011) Protein interactions and localization of the *Escherichia coli* accessory protein HypA during nickel insertion to [NiFe] hydrogenase. *J Biol Chem* **286**, 43081-43090
  253. Kaluarachchi, H., Zhang, J. W., and Zamble, D. B. (2011) *Escherichia coli* SlyD, more than a Ni(II) reservoir. *Biochemistry* **50**, 10761-10763
  254. Menon, N. K., Robbins, J., Der Vartanian, M., Patil, D., Peck, H. D., Jr., Menon, A. L., Robson, R. L., and Przybyla, A. E. (1993) Carboxy-terminal processing of the large subunit of [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett* **331**, 91-95
  255. Leach, M. R., and Zamble, D. B. (2007) Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 159-165
  256. Theodoratou, E., Huber, R., and Böck, A. (2005) [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochem Soc Trans* **33**, 108-111
  257. Fritsche, E., Paschos, A., Beisel, H. G., Böck, A., and Huber, R. (1999) Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HYBD from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **288**, 989-998
  258. Theodoratou, E., Paschos, A., Mintz, W., and Böck, A. (2000) Analysis of the cleavage site specificity of the endopeptidase involved in the maturation of the large subunit of hydrogenase 3 from *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **173**, 110-116
  259. Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R., and Böck, A. (2000) Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem* **267**, 1995-1999
  260. Magalon, A., Blokesch, M., Zehelein, E., and Böck, A. (2001) Fidelity of metal insertion into hydrogenases. *Febs Letters* **499**, 73-76
  261. Hedderich, R. (2004) Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 65-75

262. Hedderich, R., and Forzi, L. (2005) Energy-converting [NiFe] hydrogenases: more than just H<sub>2</sub> activation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**, 92-104
263. Friedrich, B., Buhrke, T., Burgdorf, T., and Lenz, O. (2005) A hydrogen-sensing multiprotein complex controls aerobic hydrogen metabolism in *Ralstonia eutropha*. *Biochem Soc Trans* **33**, 97-101
264. Peters, J. W., Schut, G. J., Boyd, E. S., Mulder, D. W., Shepard, E. M., Broderick, J. B., King, P. W., and Adams, M. W. (2015) [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 1350-1369
265. McGlynn, S. E., Ruebush, S. S., Naumov, A., Nagy, L. E., Dubini, A., King, P. W., Broderick, J. B., Posewitz, M. C., and Peters, J. W. (2007) *In vitro* activation of [FeFe] hydrogenase: new insights into hydrogenase maturation. *J Biol Inorg Chem* **12**, 443-447
266. Betz, J. N., Boswell, N. W., Fugate, C. J., Holliday, G. L., Akiva, E., Scott, A. G., Babbitt, P. C., Peters, J. W., Shepard, E. M., and Broderick, J. B. (2015) [FeFe]-hydrogenase maturation: insights into the role HydE plays in dithiomethylamine biosynthesis. *Biochemistry* **54**, 1807-1818
267. Kuchenreuther, J. M., Myers, W. K., Suess, D. L., Stich, T. A., Pelmentschikov, V., Shiigi, S. A., Cramer, S. P., Swartz, J. R., Britt, R. D., and George, S. J. (2014) The HydG enzyme generates an Fe(CO)<sub>2</sub>(CN) synthon in assembly of the FeFe hydrogenase H-cluster. *Science* **343**, 424-427
268. Soboh, B., Kruger, S., Kuhns, M., Pinske, C., Lehmann, A., and Sawers, R. G. (2010) Development of a cell-free system reveals an oxygen-labile step in the maturation of [NiFe]-hydrogenase 2 of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **584**, 4109-4114

## 6. Anhang

### 6.1. Verzeichnis der für diese Arbeit relevanten eigenen Veröffentlichungen

#### 6.1.1. *In vitro* Biosynthese von Fe-Mo-Cofaktor der Nitrogenase

**Soboh B.**, Boyd ES., Zhao D, Peters JW. and Rubio LM. (2010) Substrate specificity and evolutionary implications of a NifDK enzyme carrying NifB-co at its active site. *FEBS Lett.* 584(8),1487-92

Curatti L., Hernandez JA., Igarashi RY., **Soboh B.**, Zhao D. and Rubio LM. (2007). *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum and homocitrate using purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (45), 17626-31

George SJ., Igarashi RY., Piamonteze C., **Soboh B.**, Cramer SP. and Rubio LM. (2007) Identification of a Mo-Fe-S cluster on NifEN by Mo K-edge EXAFS. *J. Am. Chem. Soc.*,129(11),3060-3061

Hernández JA., Igarashi RY., **Soboh B.**, Curatti L., Dean DR., Ludden PW. and Rubio, LM. (2006) NifX and NifEN exchange biosynthetic precursors of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Mol. Microbiol.*,63 (1),177-92

**Soboh B.**, Igarashi RY., Hernandez JA. and Rubio LM. (2006) Purification of a NifEN protein complex that contains bound Mo and a FeMo-co precursor from an *Azotobacter vinelandii*  $\Delta$ nifHDK strain. *J. Biol. Chem.*, 281, 36701-36709

#### 6.1.2. *In vitro* Reifung der [NiFe]-Hydrogenase

Stripp ST., Lindenstrauss U., Sawers RG. and **Soboh B.** (2015) Identification of an Isothiocyanate on the HypEF Complex Suggests a Route for Efficient Cyanyl-Group Channeling during [NiFe]-Hydrogenase Cofactor Generation. *PLoS One* e0133118. doi: 10.1371/journal.pone.0133118.

Stripp ST., Lindenstrauss U., Granich C., Sawers RG. and **Soboh B.** (2014) The influence of oxygen on [NiFe]-hydrogenase cofactor biosynthesis and how ligation of carbon monoxide precedes cyanation. *Plos ONE* 9 e107488. doi: 10.1371/journal.pone.0107488.

**Soboh B.**, Lindenstrauss U., Granich C., Javaid M., Herzberg M., Claudia T. and Stripp ST. (2014) [NiFe]-hydrogenase maturation *in vitro*: analysis of the roles of the HybG and HypD accessory proteins. *Biochemical journal.* 1;464(2):169-77.

**Soboh B.**, Stripp ST., Bielak C., Lindenstrauß U., Braussemann M., Javaid M., Hallensleben M., Granich C., Herzberg M., Heberle J. and Sawers RG. (2013) The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Lett.* 19;587(16):2512-6.

Stripp ST., **Soboh B.**, Lindenstrauss U., Braussemann M., Herzberg M., Nies DH. , Sawers RG. and Heberle J. (2013) HypD is the Scaffold Protein for Fe-(CN)<sub>2</sub>CO Cofactor Assembly in [NiFe]-Hydrogenase Maturation. *Biochemistry*, 52 (19), 3289–32962

**Soboh B.**, Stripp ST., Muhr E., Granich C., Braussemann M., Herzberg M., Heberle J. and Sawers RG. (2012) [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands. *FEBS Lett.*, 586(21) 3882-3887



**Soboh B.**, Kuhns M., Braussemann M., Waclawek M., Muhr E., Pierik AJ. and Sawers RG. (2012) Evidence for an oxygen-sensitive iron-sulfur cluster in an immature large subunit species of *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 424(1),158-163

Petkun S., Shi R., Li Y., Asinas A., Munger C., Zhang L., Waclawek M., **Soboh B.**, Sawers RG. and Cygler M. (2011) Structure of Hydrogenase Maturation Protein HypF with Reaction Intermediates Shows Two Active Sites. *Structure* 19 (12), 1773–1783

**Soboh B.**, Krüger S., Kuhns M., Pinske C., Lehmann A. and Sawers RG. (2010) Development of a cell-free system reveals an oxygen-labile step in the maturation of [NiFe]-hydrogenase 2 of *E. coli*. *FEBS Lett.* 584 (18), 4109-4114

## 6.2. Verzeichnis aller wissenschaftlichen Veröffentlichungen des Verfassers

1. Stripp ST., Lindenstrauss U., Sawers RG. and **Soboh B.** (2015) Identification of an Isothiocyanate on the HypEF Complex Suggests a Route for Efficient Cyanyl-Group Channeling during [NiFe]-Hydrogenase Cofactor Generation. *PLoS One* e0133118. doi: 10.1371/journal.pone.0133118.

2. Stripp ST., Lindenstrauss U., Granich C., Sawers RG. and **Soboh B.** (2014) The influence of oxygen on [NiFe]-hydrogenase cofactor biosynthesis and how ligation of carbon monoxide precedes cyanation. *Plos ONE* 9 e107488. doi: 10.1371/journal.pone.0107488.

3. **Soboh B.**, Lindenstrauss U., Granich C., Javaid M., Herzberg M., Claudia T. and Stripp ST. (2014) [NiFe]-hydrogenase maturation *in vitro*: analysis of the roles of the HybG and HypD accessory proteins. *Biochemical journal.* 1;464(2):169-77.

4. **Soboh B.**, Stripp ST., Bielak C., Lindenstrauss U., Braussemann M., Javaid M., Hallensleben M., Granich C., Herzberg M., Heberle J. and Sawers RG. (2013) The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Lett.* 19;587(16):2512-6.

5. **Soboh B.** and Sawers RG. (2013) [NiFe]-hydrogenase cofactor assembly. In: *Encyclopedia of Inorganic and Bioorganic Chemistry - Metals in Cells*, Chapter eibc2154 ISBN: 9781119951438. doi: 10.1002/9781119951438.eibc2154.

6. Stripp ST., **Soboh B.**, Lindenstrauss U., Braussemann M., Herzberg M., Nies DH. , Sawers RG. and Heberle J. (2013) HypD is the Scaffold Protein for Fe-(CN)<sub>2</sub>CO Cofactor Assembly in [NiFe]-Hydrogenase Maturation. *Biochemistry*, 52 (19), 3289–32962

7. Trchounian K., **Soboh B.**, Sawers RG. and Trchounian A. (2013) Contribution of hydrogenase 2 to stationary phase H<sub>2</sub> production by *Escherichia coli* during fermentation of glycerol. *Cell. Biochem. Biophys.* 66-(1)103-108.

8. **Soboh B.**, Stripp ST., Muhr E., Granich C., Braussemann M., Herzberg M., Heberle J. and Sawers RG. (2012) [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands. *FEBS Lett.*, 586(21) 3882-3887

9. **Soboh B.**, Kuhns M., Braussemann M., Waclawek M., Muhr E., Pierik AJ. and Sawers RG. (2012) Evidence for an oxygen-sensitive iron-sulfur cluster in an immature large subunit species of *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 424(1),158-163

10. Petkun S., Shi R., Li Y., Asinas A., Munger C., Zhang L., Waclawek M., **Soboh B.**, Sawers RG. and Cygler M. (2011) Structure of Hydrogenase Maturation Protein HypF with Reaction Intermediates Shows Two Active Sites. *Structure* 19 (12), 1773–1783
11. Pinske C., Krüger S., **Soboh B.**, Ihling C., Kuhns M., Brausseman M., Jaroschinsky M., Sauer C., Sargent F., Sinz A. and Sawers RG. (2011) Efficient electron transfer from hydrogen to benzyl viologen by the [NiFe]-hydrogenases of *Escherichia coli* is dependent on the coexpression of the iron-sulphur cluster-containing small subunit. *Arch. Microbiol.*193(12),893-903
12. **Soboh B.**, Pinske C., Kuhns M., Waclawek M., Ihling C., Trchounian K., Trchounian A., Sinz. A., and Sawers RG. (2011) The respiratory molybdo-selenoprotein formate dehydrogenases of *Escherichia coli* have hydrogen: benzyl viologen oxidoreductase activity. *BMC Microbiol.*11:173
13. **Soboh B.**, Krüger S., Kuhns M., Pinske C., Lehmann A. and Sawers RG. (2010) Development of a cell-free system reveals an oxygen-labile step in the maturation of [NiFe]-hydrogenase 2 of *E. coli*. *FEBS Lett.* 584 (18), 4109-4114
14. **Soboh B.**, Boyd ES., Zhao D, Peters JW. and Rubio LM. (2010) Substrate specificity and evolutionary implications of a NifDK enzyme carrying NifB-co at its active site. *FEBS Lett.* 584(8),1487-92
15. Rubio LM., Hernández JA., **Soboh B.**, Zhao D., Igarashi RY., Curatti L. and Ludden PW. (2008). The Role of Nif Proteins in Nitrogenase Maturation. *Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Book: Biological Nitrogen Fixation, Volume 42, pp 325-328
16. Curatti L., Hernandez JA., Igarashi RY., **Soboh B.**, Zhao D. and Rubio LM. (2007). *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from iron, sulfur, molybdenum and homocitrate using purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (45), 17626-31
17. George SJ., Igarashi RY., Piamonteze C., **Soboh B.**, Cramer SP. and Rubio LM. (2007) Identification of a Mo-Fe-S cluster on NifEN by Mo K-edge EXAFS. *J. Am. Chem. Soc.*,129(11),3060-3061
18. Hernández JA., Igarashi RY., Soboh B., Curatti L., Dean DR., Ludden PW. and Rubio, LM. (2006) NifX and NifEN exchange biosynthetic precursors of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Mol. Microbiol.*,63 (1),177-92
19. **Soboh B.**, Igarashi RY., Hernandez JA. and Rubio LM. (2006) Purification of a NifEN protein complex that contains bound Mo and a FeMo-co precursor from an *Azotobacter vinelandii*  $\Delta nifHDK$  strain. *J. Biol. Chem.*, 281, 36701-36709 cofactor of nitrogenase. *Mol. Microbiol.*,63 (1),177-92
20. **Soboh B.**, Linder D. and Hedderich R. (2004) A multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase and a NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis* *Microbiology* 150, 2451-2463
21. **Soboh B.**, Linder D. and Hedderich R. (2002) Purification and catalytic properties of a CO-oxidizing:H<sub>2</sub> evolving enzyme complex from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* *Eur.J. Biochem.* 269, 5712-21.

### In review

Lindenstrauss U., Lillie H. and **Soboh B.** (2015) Pro-protein cleavage is an important checkpoint during maturation of [NiFe]-hydrogenases (submitted to *Journal of Biological Chemistry*)

### 6.3. Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name: Basem Soboh  
 Geburtsdatum: 16.09.1974  
 Geburtsort: Gaza/Palästina  
 Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

#### Schulbildung

1980-1986 Grundschule in Gaza  
 1986-1989 Mittelschule in Gaza  
 1989-1992 Secondary School (Gymnasium) in Gaza  
 Juni 1992 Abitur

#### Hochschulausbildung

1992-1996 Studium der Mikrobiologie/Chemie an der Al-Azhar-Universität Gaza (Bachelor of Science, Note: sehr gut)  
 1996-1997 Sprachkurs Deutsch in Marburg  
 1997-2000 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg  
 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie  
 2000-2001 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter Betreuung von PD Dr. R. Hedderich mit dem Thema „Reinigung und Charakterisierung eines CO-oxidierenden/H<sub>2</sub>-bildenden Enzymkomplexes aus der Membranfraktion von *C. hydrogenoformans*“ (Note: sehr gut )  
 2001-2004 Anfertigung der Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter Betreuung von Prof. Thauer mit dem Thema „Zu Komplex I verwandte Hydrogenasen in *C. hydrogenoformans* und *T. tengcongensis*“ (Note: sehr gut)

#### Beruflicher Werdegang

Juli 2004-Feb 2005 Postdoc am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Thauer

März 2005-Nov.2007 Postdoc an der University of California, Berkeley, USA in der Arbeitsgruppe von Prof. Ludden mit dem Forschungs-thema „Biosynthese, Struktur, Funktion und Regulation von Metalloenzymen“ (Schwerpunkt: *in vitro* Biosynthese des Fe-Mo-Cofaktors der Nitrogenase)

Seit Dez. 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Gruppe von Prof. Gary Sawers, Leiter einer neu gebildeten Arbeitsgruppe mit dem Thema “*In vitro* Reifung der [NiFe]-Hydrogenase in *E. coli*“

### **Stipendien und Ehrungen**

1993-1996 Al-Azhar-University “First Prize-Scholarship for Bachelor Excellence”

1996-2003 World University Service (WUS)-Stipendium, Deutschland

Juli 2003-Feb 2005 Max-Planck-Gesellschaft, Stipendium, Marburg

#### 6.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich in dieser spannenden wissenschaftlichen Phase meines Lebens begleitet haben.

Vor allem möchte ich Herrn Prof. Thauer herzlich für die Förderung meiner wissenschaftlichen Pläne und für seine fortdauernde tatkräftige Unterstützung, die auch über Studienangelegenheiten hinausging, danken.

Prof. Sawers danke ich für unsere fruchtbare Zusammenarbeit und für seine Unterstützung, die mir die Rückkehr aus den USA ermöglichte sowie für die Möglichkeit, eine eigene Arbeitsgruppe zu einem eigenen Thema aufbauen zu können.

Prof. Ludden sei für seine zahlreichen Ideen und Diskussionen gedankt. Ich danke auch allen ehemaligen Mitgliedern der Ludden-Labs (Dr. Luis M. Rubio, Dr. Robert Igarashi, Dr. Dehua Zhao, Dr. Leonardo Curatti und Dr. Jose Hernandez) für die wunderbaren Jahre der Zusammenarbeit in California-Berkeley.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meine technische Assistentin Frau Ute Lindenstrauß für ihre hervorragende Leistung und ihre sorgfältige technische Assistenz richten.

Allen heutigen und ehemaligen Mitgliedern der Hydrogenase-Gruppe in Halle (Conny Pinske, Anne Lehmann, Michael Zorn, Martin Kuhns, Mandy Waclawek, Andor Krizsan, Enrico Muhr, Mario Brausseemann, Mahwish Javaid, Claudia Thomas und Claudia Granich) danke ich für ihre experimentellen und intellektuellen Beiträge, die belastbare Primärdatensätze für unsere Publikationen produzierten. Mein Dank geht auch an alle weiteren Mitglieder des Instituts für Mikrobiologie in Halle, sowie an Prof. Nies und seine Mitarbeiter auf der dritten Etage unseres Institutes. Martin Herzberg danke ich für die ICP-MS-Messungen sowie die Hilfe bei allen Fragen rund um den PC. Dr. Kathrin Makdessi danke ich für die schöne gemeinsame Zeit in Halle und für das Korrekturlesen. Ebenso danke ich meinen Kollegen PD. Dr. Ute Lechner und Dr. Erhard Jöx für ihre aufbauenden Ratschläge und für die vielen guten gemeinsamen Mittagessen.

Ich möchte mich auch herzlich bei allen Kooperationspartnern für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bedanken, besonders bei Prof. Joachim Heberle und Dr. Sven Stripp (FU Berlin), Prof. Ulrich Ermler (MPI für Biophysik, Frankfurt), PD. Dr. Hauke Lilie, AG-Sinz (MLU-Halle) und Prof. Antonio Pierik (TU-Kaiserslautern).

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Azhar. Ohne ihr Verständnis wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Das Land Sachsen-Anhalt, das National Institute of General Medical Sciences und die National Institutes of Health (USA) haben die meisten der hier dargestellten Arbeiten finanziell gefördert. Dafür sei diesen Institutionen gedankt.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 30. 09.2015

Basem Soboh