

Untersuchungen  
zur Bildung Wolfram- und Rhenium-haltiger Nitrogenasen in  
*Rhodobacter capsulatus* und  
zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors in einer *nifE*<sup>-</sup>-Mutante

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Chemie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Stefan Siemann**  
aus Paderborn

Bielefeld  
2000

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Müller

Koreferent: Prof. Dr. H. Tschesche

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abkürzungen</b>   | <b>VI</b> |
| <b>1 EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Die biologische Stickstoff-Fixierung                             | 1         |
| 1.2 Die konventionelle, Molybdän-abhängige Nitrogenase               | 2         |
| 1.3 Alternative, Molybdän-unabhängige Nitrogenase-Systeme            | 4         |
| 1.4 Funktion des Heterometalls in den Cofaktoren                     | 5         |
| 1.5 Biosynthese der Cofaktoren                                       | 6         |
| 1.6 Molybdän-Aufnahme in <i>R. capsulatus</i> und anderen Organismen | 11        |
| 1.7 Ziele dieser Arbeit  | 12        |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>                                       | <b>14</b> |
| 2.1 Organismen   | 14        |
| 2.2 Nährmedien   | 15        |
| 2.2.1 Nährmedium für Flüssigkulturen                                 | 15        |
| 2.2.2 Aktivkohlebehandlung   | 16        |
| 2.2.3 Komplexmedium  | 17        |
| 2.3 Zellanzucht  | 17        |
| 2.3.1 Stammhaltung   | 17        |
| 2.3.2 Flüssigkulturen  | 17        |
| 2.4 Extinktionsmessung von Zellsuspensionen                          | 18        |
| 2.5 Gewährleistung anaerober Bedingungen                             | 18        |
| 2.5.1 Bereitung von O <sub>2</sub> -freien Gasen                     | 19        |
| 2.5.2 Vorbereitung von Gefäßen, Spritzen und Lösungen                | 19        |
| 2.5.3 Überprüfung des Reduktionszustandes                            | 20        |
| 2.6 Zellernte  | 20        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.7 Zellaufschluss zur Herstellung von Extrakten</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.8 Reinigung der Nitrogenasekomponenten</b>   | <b>21</b> |
| 2.8.1 Chromatographie an Q-Sephrose   | 21        |
| 2.8.2 Gelfiltration mit Sephacryl S-200   | 22        |
| <b>2.9 Bestimmung der Nitrogenaseaktivität</b>  | <b>23</b> |
| 2.9.1 C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -Reduktion und H <sub>2</sub> -Produktion ganzer Zellen       | 24        |
| 2.9.2 C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -Reduktion und H <sub>2</sub> -Produktion zellfreier Extrakte | 24        |
| <b>2.10 Proteinbestimmung</b>   | <b>25</b> |
| 2.10.1 Proteinbestimmung ganzer Zellen  | 25        |
| 2.10.2 Proteinbestimmung zellfreier Extrakte  | 26        |
| 2.10.3 Proteinbestimmung nach Bradford  | 26        |
| <b>2.11 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</b>  | <b>27</b> |
| 2.11.1 Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung  | 27        |
| 2.11.2 Probenvorbereitung   | 28        |
| 2.11.3 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese   | 28        |
| 2.11.4 Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese   | 30        |
| 2.11.5 Färbung der Proteinbanden  | 31        |
| <b>2.12 Immunologische Methoden</b>   | <b>32</b> |
| 2.12.1 Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest  | 32        |
| 2.12.2 Radiale Immundiffusion   | 33        |
| 2.12.3 Analytischer Immunoblot (Western Blot)   | 35        |
| <b>2.13 EPR-spektroskopische Untersuchungen</b>   | <b>39</b> |
| 2.13.1 Probenvorbereitung   | 39        |
| 2.13.2 EPR-spektroskopische Messungen   | 39        |
| <b>2.14 Redox titration</b>   | <b>40</b> |
| 2.14.1 Probenvorbereitung (Gelfiltration mit Sephadex G-25)                                       | 40        |
| 2.14.2 Mediatorenlösung   | 40        |
| 2.14.3 Durchführung der Redox titration   | 40        |
| <b>2.15 Metallanalysen</b>  | <b>42</b> |
| 2.15.1 Metallaufnahme von <i>R. capsulatus</i> -Zellen  | 42        |
| 2.15.2 Probenvorbereitung für Metallanalysen  | 44        |
| 2.15.3 Metallanalysen durch ICP-MS  | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.16 Konstruktion einer <i>nifE</i><sup>-</sup> <i>anfA</i><sup>-</sup> -Doppelmutante</b>   | <b>44</b> |
| 2.16.1 Medien und Puffer  | 45        |
| 2.16.2 Kreuzung und Identifizierung von Homogenotisanten  | 46        |
| <b>2.17 Chemikalien</b>   | <b>46</b> |
| <br>  |           |
| <b>3 ERGEBNISSE</b>   | <b>48</b> |
| <br>  |           |
| <b>Teil A: Untersuchungen zur Bildung und zum Nachweis einer W-haltigen Nitrogenase in <i>R. capsulatus</i></b>   | <b>48</b> |
| <br>  |           |
| <b>3.1 Einfluss der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>- und WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium auf die <i>in-vivo</i>-Aktivität einer <i>anfA</i><sup>-</sup> Mutante von <i>R. capsulatus</i></b> | <b>49</b> |
| <br>  |           |
| <b>3.2 Einfluss von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im Nährmedium auf die Expression der Nitrogenase</b>   | <b>52</b> |
| 3.2.1 Einfluss von MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> im Nährmedium auf die Expression der Nitrogenase  | 52        |
| 3.2.2 Einfluss von WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> im Nährmedium auf die Expression der Nitrogenase   | 60        |
| 3.2.3 Quantifizierung des gebildeten MoFe-Proteins durch radiale Immundiffusion   | 62        |
| <br>  |           |
| <b>3.3 Identifizierung des 27 kDa-Proteins als Protein des „High-Affinity“-Molybdän-Transport (HAMT)-Systems</b>  | <b>66</b> |
| <br>  |           |
| <b>3.4 Präparation und Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase</b>  | <b>67</b> |
| <br>  |           |
| <b>3.5 Charakterisierung der W-haltigen Dinitrogenase („WFe-Protein“)</b>   | <b>70</b> |
| 3.5.1 Bestimmung der Nitrogenaseaktivität   | 70        |
| 3.5.2 Metallgehalt der isolierten Dinitrogenase-Komponente aus „W-Zellen“   | 70        |
| 3.5.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung der Wolfram-haltigen Nitrogenase   | 71        |
| 3.5.4 EPR-Spektrum der „Enzym-reduzierten“ W-haltigen Nitrogenase („Turnover“-Zustand)  | 76        |
| 3.5.5 Redox Titration der W-haltigen Nitrogenase  | 79        |
| 3.5.5.1 Redox Titration des konventionellen MoFe-Proteins   | 79        |
| 3.5.5.2 Redox Titration der W-haltigen Nitrogenase aus <i>R. capsulatus</i>   | 85        |
| <br>  |           |
| <b>3.6 Versuche zur Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase aus dem alternativen Nitrogenase-System von <i>R. capsulatus</i></b>  | <b>88</b> |
| 3.6.1 Einfluss der WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> - bzw. MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -Konzentration im Nährmedium auf die Aktivität ganzer Zellen einer <i>ΔnifHDK Δmod</i> -Mutante                            | 89        |
| 3.6.2 Einfluss von WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> auf die Expression der Fe-Nitrogenase  | 93        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.7 Untersuchungen zur Bildung einer Rhenium-Nitrogenase aus <i>R. capsulatus</i></b>   | <b>94</b>  |
| 3.7.1 Einfluss von $\text{ReO}_4^-$ auf das Zellwachstum und die Nitrogenaseaktivität  | 95         |
| 3.7.2 Aufnahme von $\text{MoO}_4^{2-}$ in Zellen einer <i>anfA</i> <sup>-</sup> -Mutante   | 96         |
| 3.7.3 Aufnahme von $\text{ReO}_4^-$ in Zellen einer <i>anfA</i> <sup>-</sup> -Mutante  | 98         |
| <br>   |            |
| <b>Teil B: Untersuchungen zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors an einer <i>nifE</i><sup>-</sup>-Mutante von <i>R. capsulatus</i></b>   | <b>101</b> |
| <br>   |            |
| <b>3.8 Abhängigkeit der <i>in-vivo</i> Nitrogenaseaktivität verschiedener <i>nifE</i><sup>-</sup>-Mutanten von der <math>\text{MoO}_4^{2-}</math>-Konzentration im Nährmedium</b>            | <b>101</b> |
| <br>   |            |
| <b>3.9 Expression des MoFe-Proteins in Zellen der apolaren <i>nifE</i><sup>-</sup>-Mutante</b>   | <b>106</b> |
| 3.9.1 Einfluss der $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium auf die MoFe-Proteinbildung  | 107        |
| 3.9.2 Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Expression des MoFe-Proteins   | 109        |
| <br>   |            |
| <b>3.10 Abhängigkeit der <math>\text{C}_2\text{H}_6</math>-Bildung von der Kultivierungsdauer der <i>nifE</i><sup>-</sup>-Zellen</b>   | <b>110</b> |
| <br>   |            |
| <b>3.11 Diazotrophes Wachstum der <i>nifE</i><sup>-</sup>-Mutante</b>  | <b>112</b> |
| <br>   |            |
| <b>3.12 Inhibierungsversuche mit Kohlenmonoxid</b>   | <b>114</b> |
| <br>   |            |
| <b>3.13 Isolierung und Identifizierung des FeMoco-enthaltenden MoFe-Proteins aus der <i>nifE</i><sup>-</sup>-Mutante</b>   | <b>118</b> |
| <br>   |            |
| <b>3.14 Vergleich der EPR-Spektren von ganzen Zellen und dem isolierten MoFe-Protein</b>   | <b>120</b> |
| <br>   |            |
| <b>4 DISKUSSION</b>  | <b>123</b> |
| <br>   |            |
| <b>Teil A: Untersuchungen zur Bildung und zum Nachweis einer W-haltigen Nitrogenase in <i>R. capsulatus</i></b>  | <b>123</b> |
| <br>   |            |
| <b>4.1 Einfluss der <math>\text{MoO}_4^{2-}</math>- und <math>\text{WO}_4^{2-}</math>-Konzentration im Nährmedium auf die Bildung und Aktivität der Nitrogenase von <i>R. capsulatus</i></b> | <b>125</b> |
| 4.1.1 Einfluss von $\text{MoO}_4^{2-}$ auf die Expression der Nitrogenase von <i>R. capsulatus</i>   | 126        |
| 4.1.2 Einfluss von $\text{WO}_4^{2-}$ auf die Expression der Nitrogenase von <i>R. capsulatus</i>  | 129        |
| <br>   |            |
| <b>4.2 Isolierung und Charakterisierung der W-haltigen Nitrogenase aus <i>R. capsulatus</i></b>  | <b>129</b> |
| 4.2.1 Isolierung der W-haltigen Nitrogenase  | 129        |
| 4.2.2 EPR-spektroskopische Charakterisierung der W-haltigen Nitrogenase  | 131        |
| 4.2.3 Redox titration der W-haltigen Nitrogenase   | 133        |
| <br>   |            |
| <b>4.3 Zur Bedeutung W-haltiger Enzyme und Nitrogenasen</b>  | <b>135</b> |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>Teil B: Untersuchungen zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors an einer <i>nifE</i>-Mutante von <i>R. capsulatus</i></b> | <b>139</b> |
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>151</b> |
| <b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>  | <b>155</b> |
| <b>Publikationen</b>   | <b>168</b> |
| <b>Danksagung</b>  | <b>169</b> |
| <b>Lebenslauf</b>  | <b>170</b> |

## Abkürzungen:

|            |   |
|------------|---|
| <i>anf</i> | <u>A</u> lternative <u>n</u> itrogen <u>f</u> ixation (Molybdän- und Vanadium-unabhängig) |
| Bis-Tris   | Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan                                    |
| Ches       | 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure  |
| $\Delta$   | Deletionsmutante  |
| DEAE       | Diethylaminoethyl   |
| $E_m$      | Halbstufenpotential   |
| EDTA       | Ethylendiamintetraacetat  |
| EPR        | Elektronenparamagnetische Resonanz  |
| FeFeco     | Cofaktor der Eisen-Nitrogenase  |
| FeMoco     | Cofaktor der Molybdän-Nitrogenase   |
| FeVco      | Cofaktor der Vanadium-Nitrogenase   |
| FeWco      | Cofaktor der Wolfram-haltigen Nitrogenase   |
| <i>g</i>   | <i>g</i> -Faktor (Landé-Faktor)   |
| Gm         | Gentamicin  |
| Hepes      | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure  |
| Hepps      | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure  |
| Km         | Kanamycin   |
| <i>nif</i> | <u>N</u> itrogen <u>f</u> ixation (Molybdän-abhängig)                                     |
| $P^{ox1}$  | P-Cluster im 1-Elektronen-oxidierten Zustand  |
| PMSF       | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| <i>r</i>   | Resistent   |
| $Rc1^{Mo}$ | Dinitrogenase-Komponente der Mo-Nitrogenase von <i>R. capsulatus</i>                      |
| $Rc2^{Fe}$ | Dinitrogenase-Reduktase der Fe-Nitrogenase von <i>R. capsulatus</i>                       |
| $Rc2^{Mo}$ | Dinitrogenase-Reduktase der Mo-Nitrogenase von <i>R. capsulatus</i>                       |
| Sm         | Streptomycin  |
| Spc        | Spectinomycin   |
| SDS        | Natriumdodecylsulfat  |
| TEMED      | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin  |
| Tris       | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| U          | Einheit der Enzymaktivität  |
| <i>vnf</i> | <u>V</u> anadium-dependent <u>n</u> itrogen <u>f</u> ixation                              |

# 1 Einleitung

## 1.1 Die biologische Stickstoff-Fixierung

Die biologische Reduktion von molekularem Stickstoff in die für Pflanzen verwertbare Form des Ammoniaks ist – ähnlich wie die Photosynthese – einer der fundamentalen Prozesse in der Natur. Die Fixierung des Luftstickstoffs trägt schätzungsweise 40 - 50 % zum globalen Stickstoffeintrag in die Biosphäre bei [1]. Etwa die gleiche Menge wird als Stickstoff-haltiger Dünger - synthetisiert nach dem Haber-Bosch-Verfahren - in die Natur eingebracht.

Aufgrund der Reaktionsträgheit des N<sub>2</sub>-Moleküls, die durch die stabile N≡N-Dreifachbindung vermittelt wird, ist die NH<sub>3</sub>-Synthese nach dem Haber-Bosch-Verfahren ein äußerst kostspieliger und energieaufwendiger Prozess, der den Einsatz eines promotierten Eisen-Katalysators sowie hohe Temperaturen und Drücke, erfordert. Die Natur hingegen hat einen Weg gefunden, den reaktionsträgen Stickstoff unter viel milderen Bedingungen (bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck) in NH<sub>3</sub> umzuwandeln. Zur N<sub>2</sub>-Fixierung sind in der Natur ausschließlich einige Prokaryonten befähigt. Diese sind in der Lage, das Enzymsystem Nitrogenase zu bilden, welches die N<sub>2</sub>-Reduktion gemäß der folgenden Gleichung katalysiert:



Neben N<sub>2</sub> (und H<sup>+</sup>) vermag die Nitrogenase noch eine Reihe weiterer Verbindungen, wie z. B. Ethin, Azid, Cyanid oder Hydrazin, zu reduzieren [2]. Die Substratfunktion des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> wird im Labor zur standardmäßigen Bestimmung der Nitrogenase-Aktivität ausgenutzt.

In allen bislang bekannten N<sub>2</sub>-fixierenden (diazotrophen) Organismen kommt ein sogenanntes konventionelles, Mo-abhängiges Nitrogenase-System vor, dessen Proteine – ob sie strukturelle oder regulatorische Funktionen übernehmen, oder ob sie an der Biosynthese des Cofaktors beteiligt sind – durch *nif*-(nitrogen fixation-)Gene kodiert werden. Einige Mikroorganismen sind dazu in der Lage neben einer konventionellen, Mo-haltigen Nitrogenase, auch alternative, Mo-unabhängige Nitrogenasen zu bilden. Zwei, auf eigenständigen genetischen Systemen basierende alternative Nitrogenase-Systeme konnten bislang identifiziert werden: (i) eine durch das *vnf*-(vanadium dependent nitrogen fixation-) System kodierte V-haltige Nitrogenase, und (ii) eine auf dem *anf*-(alternative nitrogen fixation-)System basierende Heterometall-freie Fe-Nitrogenase (siehe Übersichtsartikel [3]).

## 1.2 Die konventionelle, Molybdän-abhängige Nitrogenase

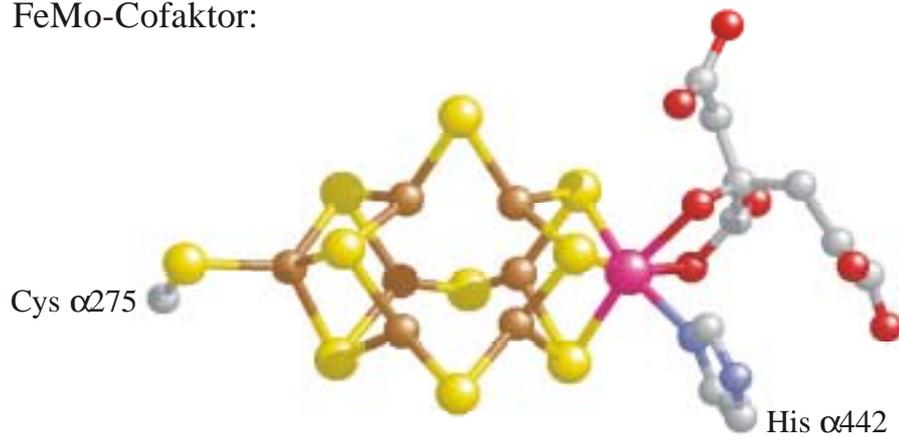
Das konventionelle Nitrogenase-System besteht aus zwei Sauerstoff-empfindlichen, getrennt voneinander isolierbaren Proteinen, die als Dinitrogenase (MoFe-Protein) und Dinitrogenase-Reduktase (Fe-Protein) bezeichnet werden. Die detaillierte Aufklärung der Struktur dieser Proteine durch Röntgenstrukturanalyse vor ca. acht Jahren revolutionierte die Vorstellungen über die Nitrogenase und die Struktur und Funktion der enthaltenen Cluster (siehe Übersichtsartikel: [4 - 6]). Strukturdaten über die beiden Nitrogenase-Komponenten liegen bislang für die Fe-Proteine von *Azotobacter vinelandii* [7, 8] und *Clostridium pasteurianum* [8], sowie für die aus den gleichen Organismen isolierten MoFe-Proteine, vor (*A. vinelandii* [9 - 12], *C. pasteurianum* [13 - 15]).

Die **Dinitrogenase-Reduktase** (Fe-Protein, NifH) besitzt eine homodimere Struktur mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Die beiden Untereinheiten werden durch einen an Cysteinreste gebundenen  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ -Cluster symmetrisch miteinander verbrückt. Außerdem beherbergt das Protein eine Bindungsstelle für zwei ATP-Moleküle, welche sich ebenfalls zwischen den beiden Untereinheiten befindet. Das Fe-Protein fungiert im Nitrogenase-System u.a. als physiologischer Elektronendonator für die Dinitrogenase-Komponente [16].

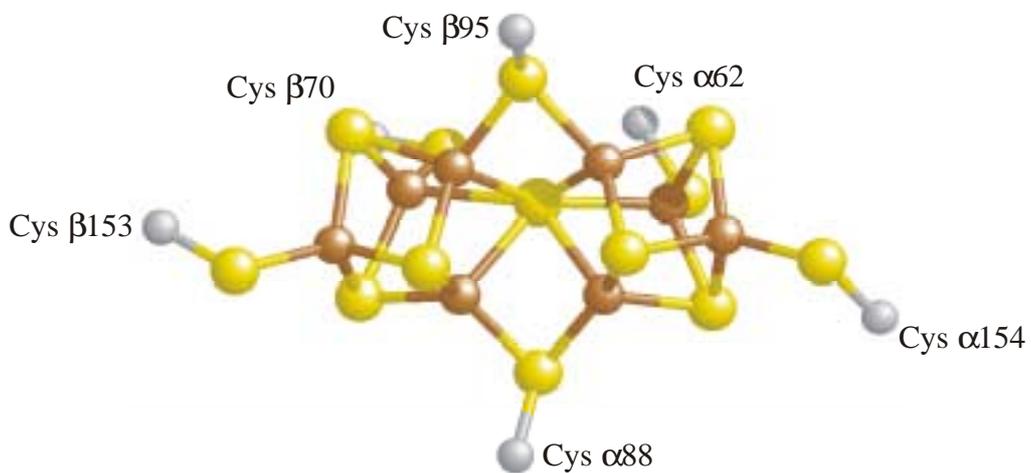
Die **Dinitrogenase** (MoFe-Protein, NifDK) stellt das Protein dar, an welchem  $\text{N}_2$  reduziert wird. Es besitzt eine  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer-Struktur mit einem Molekulargewicht von ca. 240 kDa. Das MoFe-Protein enthält zwei  $\text{Fe}_8\text{S}_7$ -Cluster (P-Cluster), die jeweils eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Untereinheit verbrücken, und zwei FeMo-Cofaktoren (FeMoco), die sich innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheiten befinden. Während beide Clustertypen ca. 10 Å unter der Proteinoberfläche liegen, beträgt der Abstand zwischen P-Cluster und FeMoco etwa 14 Å.

Der **P-Cluster** ist an beide Untereinheiten des MoFe-Proteins symmetrisch durch je drei Cysteinreste gebunden (Abb. 1). Im reduzierten Zustand besteht der Cluster formal betrachtet aus zwei  $\text{Fe}_4\text{S}_3$ -Cubanfragmenten, die durch ein zentrales, hexavalentes S-Zentrum sowie durch zwei Cysteinreste miteinander verbrückt sind. Durch Oxidation des P-Clusters vollzieht sich an diesem eine interessante Strukturumlagerung. Dabei entfernen sich zwei der von der  $\beta$ -Untereinheit gebundenen Fe-Zentren von dem zentralen Schwefelzentrum (Erniedrigung der Koordinationszahl von 6 nach 4), sodass ein geschlossenes  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ - und ein offenes  $\text{Fe}_4\text{S}_3$ -Clusterfragment entstehen [12].

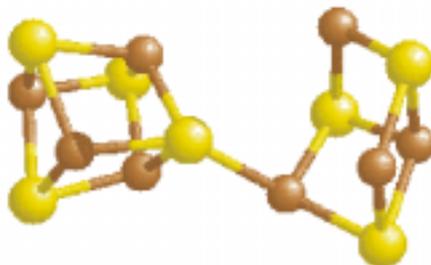
FeMo-Cofaktor:



Reduzierter P-Cluster:



Oxidierter P-Cluster:



**Abb. 1: Strukturen des FeMo-Cofaktors und des P-Clusters (im reduzierten und oxidierten Zustand).** Zusätzlich zur Struktur der Cluster sind die proteinogenen Liganden des FeMo-Cofaktors und des reduzierten P-Clusters abgebildet. Fe braun, S gelb, Mo violett, C grau, O rot, N blau.

Der FeMoco, an dem höchstwahrscheinlich die Reduktion von  $N_2$  stattfindet, setzt sich aus einem  $MoFe_7S_9$ -Clusterkern und Homocitrat, welches als zweizähniger Ligand an das Mo-Zentrum koordiniert ist, zusammen (Abb. 1). Der Cofaktor besteht – formal gesehen – aus einem  $Fe_4S_3$ - und einem  $MoFe_3S_3$ -Clusterfragment, welche über drei Sulfid-Liganden miteinander verknüpft sind. Der FeMoco kann durch Extraktion aus der Proteinumgebung entfernt und somit isoliert werden [17, 18]. Im Protein ist der Cofaktor über zwei Aminosäurereste (im Fall von *A. vinelandii* über His  $\alpha 442$  und Cys  $\alpha 275$ ) kovalent an die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Desweiteren existieren zwischen den Sulfid-Liganden des Cofaktors und dem Protein noch mehrere Wasserstoffbrücken-Bindungen. Das Molybdänzentrum im FeMoco ist wahrscheinlich formal vierwertig [19]. Äußerst ungewöhnlich ist die annähernd trigonal planare Umgebung der sechs Fe-Zentren, die ein trigonales Prisma im Zentrum des Clusters bilden. Aufgrund der Anwesenheit nicht koordinativ abgesättigter Fe-Zentren im FeMoco wurde postuliert, dass an diesen die Bindung und die Reduktion des  $N_2$ -Moleküls erfolgt [20 - 24]. Die Bindungs- und Reaktionsstelle des  $N_2$  wird allerdings sehr kontrovers diskutiert. Andere Forschergruppen favorisieren z. B. ein Modell, bei dem das Substrat direkt an das Mo-Zentrum koordiniert [25 - 27].

Im Verlauf der  $N_2$ -Reduktion assoziiert das Fe-Protein an das MoFe-Protein. Nach der Übertragung eines Elektrons vom  $Fe_4S_4$ -Cluster des Fe-Proteins auf das MoFe-Protein (bei gleichzeitiger Hydrolyse von zwei ATP-Molekülen) dissoziiert das Fe-Protein vom Nitrogenase-Komplex ab, um das Anbinden des nächsten Fe-Proteinmoleküls für den Transfer eines weiteren Elektrons für ermöglichen [28]. Das vom Fe-Protein zur Verfügung gestellte Elektron wird wahrscheinlich zuerst auf den P-Cluster des MoFe-Proteins übertragen, bevor es zum FeMoco weitergeleitet wird [29, 30]. Der P-Cluster scheint zudem nicht nur als „Zwischenspeicher“ von Elektronen zu dienen, sondern auch am Transfer von Protonen zum FeMoco beteiligt zu sein [12, 31].

### 1.3 Alternative, Molybdän-unabhängige Nitrogenase-Systeme

Während das konventionelle Nitrogenase-System in sämtlichen diazotrophen Organismen vorkommt, sind nur einige von ihnen in der Lage auch Mo-unabhängige (Vanadium-haltige oder Heterometall-freie) Nitrogenasen zu bilden. Das Vorkommen einer V- bzw. Fe-Nitrogenase divergiert von Organismus zu Organismus. Während z. B. im phototrophen

Bakterium *R. capsulatus* neben den *nif*-Genen nur die Gene, die eine Fe-Nitrogenase kodieren, nachgewiesen wurden [32], können in *A. vinelandii* sämtliche drei Nitrogenase-Systeme gebildet werden [33]. Die Gene des *vnf*-System, welche die V-haltige Nitrogenase kodieren, werden nur in Abwesenheit von Molybdän exprimiert. Die Bildung einer Fe-Nitrogenase hingegen findet nur bei Molybdän- und gleichzeitigem Vanadiummangel statt [34].

Die alternativen Nitrogenasen stellen ein Enzymsystem dar, welches sich – wie die konventionelle Nitrogenase – aus einer Dinitrogenase-Reduktase und einer Dinitrogenase-Komponente zusammensetzt. Im Gegensatz zum konventionellen Nitrogenase-System zeichnen sich die alternativen Nitrogenase-Systeme allerdings durch (i) eine  $\alpha_2\beta_2\delta_2$ -hexamere Proteinstruktur der Dinitrogenase-Komponente (FeV- bzw. FeFe-Protein), (ii) eine äußerst hohe Labilität und  $O_2$ -Empfindlichkeit, und (iii) veränderte katalytische Eigenschaften (geringere Substrataffinität gegenüber  $N_2$ , Reduktion des  $C_2H_2$  zu  $C_2H_4$  und  $C_2H_6$ , Bildung großer Mengen an  $H_2$ ) aus [3].

Obwohl es derzeit noch keine röntgenographischen Strukturdaten über alternative Nitrogenasen gibt, konnte mithilfe von EXAFS- und Mössbauerstudien demonstriert werden, dass die V-haltige Dinitrogenase-Komponente einen, mit dem FeMoco strukturell verwandten FeV-Cofaktor ( $VFe_7S_9$ ) enthält, in welchem sich anstelle des Mo-Zentrums Vanadium befindet [3]. In der Fe-Nitrogenase scheint ein entsprechender  $Fe_8S_9$ -Cluster (FeFeco) vorzuliegen, bei dem das Heterometallatom (Mo, V) durch ein weiteres Fe-Zentrum ersetzt ist [35].

#### 1.4 Funktion des Heterometalls in den Cofaktoren

Aufgrund der Existenz Mo-unabhängiger Nitrogenasen stellt sich zwangsläufig die Frage nach der Rolle des Heterometallatoms in den Cofaktoren. Vor allem die veränderten katalytischen Eigenschaften der alternativen Nitrogenasen im Allgemeinen und die Existenz einer Heterometall-freien Fe-Nitrogenase im Besonderen weisen darauf hin, dass das Heterometall (direkt oder indirekt) an der Substrat-Reduktion beteiligt ist. Wie bereits erwähnt wurde, wird die Bindungsstelle des  $N_2$ -Moleküls (am Heterometall oder an den koordinativ ungesättigten Fe-Zentren) und somit auch die Rolle des Heterometalls sehr kontrovers diskutiert.

Ein Ansatz, indirekt die Funktion des Molybdäns in der Nitrogenase zu ermitteln, besteht im Austausch des Molybdäns gegen andere Metallzentren, wie z. B. Wolfram, und einer anschließenden vergleichenden Charakterisierung (katalytische Merkmale, Substratspezifität, Redoxeigenschaften) des neu erzeugten Enzyms (z. B. Wolfram-Nitrogenase) und der Mo-Nitrogenase. Der Einfluss von  $\text{WO}_4^{2-}$  auf die Synthese bzw. die Aktivität der Nitrogenase wurde vor allem an *A. vinelandii* studiert. Es konnte demonstriert werden, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  einerseits die  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Aufnahme in die Zellen inhibiert [36], andererseits in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  in hohen Konzentrationen im Nährmedium eine inaktive Nitrogenase synthetisiert wird [37]. Ein erster Hinweis, dass Wolfram tatsächlich in die Dinitrogenase-Komponente des konventionellen Nitrogenase-Systems inkorporiert wird, ergab sich bereits 1973 [38]. Ein eindeutiger Beweis für den Austausch des Molybdäns gegen Wolfram im Cofaktor konnte allerdings erst 1987 durch die Isolierung und anfängliche Charakterisierung der Dinitrogenase-Komponente aus *A. vinelandii*-Zellen (Kultivierung in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$ ) geliefert werden [39].

Dass Wolfram in der belebten Natur nicht nur eine antagonistische Funktion besitzt, sondern für einige (meist hyperthermophile) Mikroorganismen tatsächlich ein essentielles Spurenelement darstellt, ist sicherlich eine der überraschendsten Entdeckungen des letzten Jahrzehnts auf dem Gebiet der bioanorganischen Chemie (Übersichtsartikel: [40, 41]). In dieser Hinsicht hat Wolfram das Iod als schwerstes Element mit signifikanter biologischer Funktion abgelöst. Die bis dato entdeckten natürlich vorkommenden Wolfram-Enzyme lassen sich in vier Kategorien unterteilen. Diese sind: (i) Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktasen (AOR), (ii) Formiat-Dehydrogenasen (FDH), (iii) Formyl-Methanofuran-Dehydrogenasen (FMDH), und (iv) Acetylen-Hydratasen (AH). Mit Ausnahme der Acetylen-Hydratase katalysieren sämtliche Wolfram-Enzyme Redoxreaktionen mit extrem niedrigem Potential ( $< -420$  mV).

## 1.5 Biosynthese der Cofaktoren

Eine der interessantesten offenen Fragen auf dem Gebiet der Nitrogenaseforschung ist ohne Zweifel der Verlauf der Biosynthese der Nitrogenase-Cofaktoren. Die Biosynthese der Metall-Cluster ist die bislang einzige bekannte schrittweise verlaufende Biosynthese einer anorganischen Clusterverbindung [42]. Im Hinblick auf den immensen Aufwand, den die Natur zur Synthese der Nitrogenase-Cofaktoren betreibt (zahlreiche Proteine sind an der

Biosynthese beteiligt), ist es nicht verwunderlich, dass alle Versuche, den FeMo-Cofaktor auf chemisch-präparativem Wege herzustellen bislang erfolglos blieben.

Das Interesse der Chemiker an der Aufklärung des Biosyntheseweges ist sicherlich zweierlei. Einerseits können Erkenntnisse über den Biosyntheseprozess dazu dienen, völlig neue Wege in der präparativen Clusterchemie zu begehen, andererseits besteht die Hoffnung, FeMoco-ähnliche Cluster herzustellen, die auch ohne Proteinumgebung in der Lage sind  $N_2$  in  $NH_3$  umzuwandeln [42].

Durch zahlreiche Studien an verschiedenen Organismen konnte gezeigt werden, dass zumindest die Genprodukte von *nifB*, *E*, *N*, *H* und *V* essentiell für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors sind, da sie direkt an der Synthese von Bestandteilen des Cofaktors beteiligt sind (siehe Übersichtsartikel: [43]).

Mutanten mit Defekten in diesen Genen (außer *nifV*) akkumulieren eine P-Cluster enthaltende, jedoch Cofaktor-lose Apo-Dinitrogenase und sind somit nicht in der Lage  $N_2$  zu fixieren [44, 45]. Durch den Zusatz von isoliertem FeMoco zu Extrakten dieser Mutanten kann die Nitrogenase jedoch aktiviert werden (Einbau des Cofaktors) [44 - 46].

Weitere sieben *nif*-Gene (*Y*, *X*, *U*, *S*, *W*, *Z*, *Q*) sind ebenfalls in die FeMoco-Biosynthese involviert. Die Gene scheinen zwar nicht zwingend für diesen Prozess erforderlich zu sein, ihre Expression trägt jedoch zur Maximierung der Cofaktor-Biosyntheserate bei [47]. Die Dinitrogenase-Komponente (NifDK) selbst wird für die Biosynthese des Cofaktors nicht benötigt [48].

Eine zentrale Rolle zur Identifizierung der an der FeMoco-Biosynthese beteiligten Genprodukte, sowie zu deren Isolierung und Reinigung kommt dem sogenannten *in-vitro*-Biosynthese-System zu [49 - 53]. Für die *in-vitro*-Biosynthese werden die Genprodukte von *nifB*, *N*, *E*, *X* und *H*, sowie  $MoO_4^{2-}$ , MgATP, Homocitrat und ein Reduktionsmittel (in den meisten Fällen  $Na_2S_2O_4$  [54]) benötigt. Normalerweise werden allerdings nicht die isolierten Proteine, sondern eine geeignete Auswahl von Extrakten Cofaktorbiosynthese-defekter Mutanten verwendet, die miteinander kombiniert, sämtliche für die Cofaktor-Biosynthese benötigten Proteine enthalten.

Da sich ein großer Teil dieser Arbeit mit der Biosynthese des FeMo-Cofaktors beschäftigt, sollen im Folgenden die Funktionen der an der Cofaktor-Biosynthese beteiligten Proteine näher beschrieben werden.

Das Genprodukt von *nifB* katalysiert die Synthese eines Fe-S-Clusters bislang noch unbekannter Struktur, welcher als NifB-Cofaktor oder kurz NifB-co bezeichnet wird [50, 55]. Da NifB sowohl für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors, als auch für die der alternativen Cofaktoren (FeVco und FeFeco) essentiell ist [33], wurde vermutet, dass der NifB-co das Fe-S-Grundgerüst der Cofaktoren für deren Biosynthese zur Verfügung stellt [50].

Die Gensequenzen von *nifE* und *nifN* weisen eine ausgeprägte Homologie zu denen von *nifD* bzw. *nifK* (Gene, die die Untereinheiten der Dinitrogenase-Komponente kodieren) auf [56, 57]. Aufgrund der beobachteten Homologien wurde spekuliert, dass NifE und NifN die Untereinheiten eines  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers ( $\sim 200$  kDa) bilden und als „Baugerüst“ für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors fungieren, an dem einzelne Bestandteile des Clusters zusammengefügt werden [56]. Außerdem wurde für NifNE und NifDK ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung postuliert [56, 58]. Durch die Isolierung und Reinigung des NifNE-Proteins konnte die Tetramerstruktur bestätigt und darüber hinaus zwei proteingebundene identische  $Fe_4S_4$ -Cluster identifiziert werden [59 - 61].

Basierend auf einem Homologie-Modell für die dreidimensionale Struktur des NifNE-Proteins [47] wurde vermutet, dass die  $Fe_4S_4$ -Zentren – analog zum P-Cluster im MoFe-Protein – die beiden Untereinheiten verbrücken. Im Gegensatz zum P-Cluster im MoFe-Protein scheinen die  $Fe_4S_4$ -Cluster in NifNE jedoch assymetrisch an vier Cysteinreste koordiniert zu sein, von denen drei durch NifE und ein Rest durch NifN zur Verfügung gestellt werden [47, 61]. Da die  $Fe_4S_4$ -Zentren – basierend auf dem Homologie-Modell – nicht in der Nähe einer möglichen FeMoco-Bindungsstelle liegen, könnten die Cluster einerseits in die Bildung bzw. Stabilisierung der tetrameren Struktur des Proteins involviert sein, andererseits könnten sie auch eine für die Cofaktor-Biosynthese notwendige Redoxfunktion übernehmen [47, 61]. In *R. capsulatus* sind sowohl *nifE* als auch *nifN* zusammen mit *nifX*, *orf4*, *fdxb* und *nifQ* in einem Operon organisiert [57, 62]. Während *orf4* homolog zu *A. vinelandii orf3* ist, kodiert *fdxb* ein Ferredoxin.

Das Genprodukt von *nifX* ist essentiell für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors *in-vitro* [63], jedoch ist seine Anwesenheit *in-vivo* nicht zwingend erforderlich [64]. Kürzlich konnte demonstriert werden, dass ein V-Fe-S-Cluster (FeVco-Vorstufe, die kein Homocitrat enthält) an VnfX – dem Homologen zu NifX im *vnf*-Regulon – akkumuliert [65]. Außerdem konnte

der Nachweis erbracht werden, dass (i) der NifB-co an dieses Protein bindet, (ii) in einer *vnfX*-Mutante wahrscheinlich NifX die Funktion von VnfX übernimmt, und (iii) der an das NifNE-Protein gebundene NifB-co direkt auf NifX übertragen werden kann [65, 66]. NifX scheint somit an einem Biosynthese-Schritt nach der Insertion des NifB-co in NifNE beteiligt zu sein.

Das Fe-Protein, welches durch *nifH* kodiert wird, dient nicht nur als physiologischer Elektronendonator für die Dinitrogenase-Komponente im Verlauf der Substratreduktion, sondern übernimmt auch eine essentielle Rolle im Biosynthese-Prozess des FeMo-Cofaktors [43]. Außerdem ist NifH in die Insertion des komplett synthetisierten FeMo-Cofaktors in die Apo-Dinitrogenase involviert [45]. Dieser Prozess wird auch als „Reifung“ der Apo-Dinitrogenase (Vorbereitung des Apoproteins auf den Einbau des Cofaktors) bezeichnet [67]. Da auch das Apoprotein von NifH (Protein ohne Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cluster) sowohl die Biosynthese als auch die Reifung der Apo-Dinitrogenase katalysiert, scheint ein Transfer von Elektronen oder die Bereitstellung eines Fe-S-Clusterfragments für diese Prozesse nicht erforderlich zu sein [68]. An genetisch veränderten NifH-Proteinen konnte zudem gezeigt werden, dass zwar die Bindung, nicht aber die Hydrolyse von ATP für den Biosyntheseprozess des FeMo-Cofaktors und die Reifung der Apo-Dinitrogenase notwendig sind [53]. Da sich die Eigenschaften von NifH, die für die Cofaktor-Synthese und die Reifung des Apoproteins benötigt werden, auch voneinander unterscheiden, wurde vermutet, dass das Fe-Protein separate, überlappende Bindungsdomänen für die Erfüllung der einzelnen Aufgaben (Elektronendonator für das MoFe-Protein, Biosynthese des Cofaktors, Reifung der Apo-Dinitrogenase) besitzt [53].

In *Klebsiella pneumoniae* assoziiert das *nifY*-Genprodukt an das Apoprotein der Dinitrogenase [69]. Ein ähnliches, aber nicht homologes Protein, welches ebenfalls mit der Apo-Dinitrogenase einen Komplex bildet, wurde in *A. vinelandii* identifiziert und als  $\gamma$ -Protein bezeichnet [70]. Die Expression des  $\gamma$ -Proteins wird im Gegensatz zu der des *nifY*-Gens in *K. pneumoniae* nicht *nif*-reguliert [70]. Es wird vermutet, dass das  $\gamma$ -Protein als Chaperon-Insertase fungiert, indem es an die  $\alpha$ -Untereinheit der Dinitrogenase bindet, um in diese eine Art „Kanal“ für die FeMoco-Insertion zu schaffen (Chaperon-Funktion). Anschließend wird der an das  $\gamma$ -Protein gebundene FeMoco in die  $\alpha$ -Untereinheit inkorporiert (Insertase-Funktion) [70]. Die Anbindung des  $\gamma$ -Proteins an das Apoprotein der Dinitrogenase (in Gegenwart von NifH und MgATP) stellt den wesentlichen Bestandteil der Apo-Dinitrogenase-Reifung dar [67]. Obwohl NifY in *K. pneumoniae* nicht homolog zum  $\gamma$ -Protein in *A. vinelandii* ist, scheint es doch eine ähnliche Rolle zu übernehmen [69].

Das Genprodukt von *nifV* wurde als Homocitrat-Synthase identifiziert. Das Enzym konnte kürzlich als ein dimeres Protein, welches die Kondensation von Acetyl-CoA und  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Homocitrat katalysiert, isoliert und gereinigt werden [71]. Mutationen in *nifV* bewirken, dass Homocitrat durch andere organische Säuren (z. B. Citrat in *K. pneumoniae* [72]) ersetzt wird. Ein solcher Austausch führt aber generell zur Akkumulierung eines MoFe-Proteins mit veränderten katalytischen Eigenschaften (siehe Übersichtsartikel: [43]). Desweiteren scheint das *nifW*-Genprodukt bei der „Verarbeitung“ des Homocitrats eine Rolle zu spielen [73]. Es ist wahrscheinlich in den Transport oder in den Einbau von Homocitrat in den Cofaktor involviert.

Das Genprodukt von *nifQ* scheint an der Prozessierung des Molybdäns vor seinem Einbau in den Cofaktor beteiligt zu sein [74, 75]. Obwohl *nifQ*-Mutanten eigentlich nicht in der Lage sind, eine aktive Mo-abhängige Nitrogenase zu bilden, kann dieser Gendefekt durch eine Kultivierung in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in der Nährlösung (Endkonz.:  $> 100 \mu\text{M}$ ) kompensiert werden (Nif<sup>Q</sup>-Phänotyp) [62, 74, 76]. Ein defektes *nifQ*-Gen kann darüber hinaus auch durch den Zusatz von Cystin (in relativ großen Mengen) kompensiert werden [77]. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vorgeschlagen, dass ein Schwefel-Donor (Cystin) und Molybdän in einer frühen Phase der FeMoco-Biosynthese in Wechselwirkung treten, und dass diese Reaktion bei hohen Konzentrationen der Reaktionspartner nicht-enzymatisch – also nicht mithilfe von NifQ – abläuft [77].

Das Genprodukt von *nifS* ist in die Mobilisierung von Schwefel für die Synthese des FeMo-Cofaktors involviert. NifS ist eine Pyridoxalphosphat enthaltende Cystein-Desulfurase, welche die Bildung von L-Alanin und elementarem Schwefel aus Cystein katalysiert [78, 79]. Der elementare Schwefel, der an NifS unter Bildung eines Perthio-Cysteinrestes gebunden wird, stellt wahrscheinlich eine Quelle für „anorganischen“ Schwefel für eine Vielzahl von Clusterbiosynthesen dar. In *R. capsulatus* ist die Anwesenheit von *nifS* sogar essentiell für die  $\text{N}_2$ -Fixierung [73].

Das *nifU*-Gen kodiert ein homodimeres Protein, welches wahrscheinlich zwei redoxaktive  $\text{Fe}_2\text{S}_2$ -Cluster enthält. Aufgrund der Anwesenheit von acht konservierten Cysteinresten in sämtlichen bislang bekannten NifU-Proteinen wurde vermutet, dass NifU als Quelle für Eisen bei der Cluster-Biosynthese fungiert [80].

Die Funktion des *nifZ*-Genprodukts ist derzeit noch umstritten. Es scheint jedoch für die Bildung und Akkumulierung einer aktiven Dinitrogenase benötigt zu werden [43].

## 1.6 Molybdän-Aufnahme in *R. capsulatus* und anderen Organismen

Neben den *nif*-regulierten Proteinen existieren in *R. capsulatus* Proteine, die in die Aufnahme und den Transport von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in die Zelle involviert sind. Vier Genprodukte (ModA, B, C und D) sind an diesem Prozess beteiligt und stellen die Komponenten des sogenannten „High-Affinity“-Molybdän-Transport-Systems (HAMT-System) dar [81]. Die Gene, die das HAMT-System kodieren, gehören zwar nicht zu den *nif*-Genen, werden aber dennoch synchron mit diesen reguliert. So werden die HAMT-Proteine z. B. in Gegenwart von  $\text{N}_2$  oder Serin exprimiert und in Anwesenheit von Ammoniumionen reprimiert [82]. Während über die Funktion von ModD derzeit noch wenig bekannt ist, gehören die ModABC-Proteine der Familie der ABC-Transporter an [83, 84]. ModA ist ein periplasmatisches Protein, welches  $\text{MoO}_4^{2-}$  und  $\text{WO}_4^{2-}$  mit etwa gleicher Affinität bindet [85] und auf das membrangebundene ModB-Protein überträgt. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird  $\text{MoO}_4^{2-}$  anschließend mithilfe des cytoplasmatischen ModC-Proteins in die Zelle transportiert. Andere Organismen, wie *Escherichia coli*, *A. vinelandii* oder *K. pneumoniae*, verfügen ebenfalls über ein spezifisches Molybdän-Transportsystem, welches dem des HAMT-Systems in *R. capsulatus* stark ähnelt ([75], [85] und dort zitierte Literatur).

Neben den Proteinen des HAMT-Systems existieren in *R. capsulatus* noch zwei weitere, wahrscheinlich Molybdopterin-bindende Proteine (MopA und MopB), die eine regulatorische Funktion in der Zelle übernehmen [81]. Vermutlich fungieren beide Proteine als intramolekulare Molybdät-Sensormoleküle, die in die Mo-abhängige Genregulation involviert sind [82]. In *A. vinelandii* existieren zwei ähnliche, Molybdopterin-bindende Proteine (ModE und ModG), die jedoch, im Gegensatz zu MopA und B in *R. capsulatus*, an der Biosynthese des FeMo-Cofaktors beteiligt zu sein scheinen [86]. In *E. coli* hingegen reguliert ModE, als  $\text{MoO}_4^{2-}$ -bindendes (!) Protein, die Transkription der *mod*-Gene ([87] und dort zitierte Literatur).

Neben dem HAMT-System existiert auch ein „Low-Affinity“-Molybdän-Transport-System (LAMT-System), welches wahrscheinlich den Mo-Transport bei hohen  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen übernimmt, bislang aber noch nicht weiter charakterisiert worden ist [81, 86]. Für *A. vinelandii* konnte demonstriert werden, dass fast die gesamte  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Aufnahme über das HAMT- und das LAMT-System erfolgt [86], und dass eventuell Siderophore, die eigentlich für den Eisen-Transport in die Zelle verantwortlich sind, an der Aufnahme von  $\text{MoO}_4^{2-}$  über das LAMT-System beteiligt sind [86, 88]. Außerdem scheint

ModE – ein den Mop-Proteinen von *R. capsulatus* ähnliches Protein – in diesem Organismus am  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Transport über das LAMT-System beteiligt zu sein [86].

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Obwohl die Aufklärung der Struktur der Dinitrogenase-Komponente und der Dinitrogenase Reduktase erheblich zum Verständnis der in die biologische Stickstoff-Fixierung involvierten Prozesse beigetragen hat, bleiben noch viele Einzelheiten ungeklärt. Die offenen Fragen umfassen u. a. den genauen Mechanismus der  $\text{N}_2$ -Reduktion (z. B. Bindungsstelle von  $\text{N}_2$ ), den Ablauf der beteiligten Elektronen-Transferprozesse, die Rolle des Heterometalls im FeMoco bzw. FeVco sowie den Verlauf der Biosynthese der Cofaktoren. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei dieser Themen näher behandelt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zum Einbau von Wolfram und Rhenium in den Cofaktor der Nitrogenase durchgeführt. Der Einbau von Wolfram in den Cofaktor der konventionellen Nitrogenase konnte erstmals von Hales und Case an *A. vinelandii* demonstriert werden [39]. Eine detaillierte Untersuchung der W-haltigen Nitrogenase bzw. des FeW-Cofaktors wurde von diesen Autoren allerdings nicht veröffentlicht. Untersuchungen zur potentiellen Bildung einer Re-haltigen Nitrogenase wurden bislang nur an *A. vinelandii* durchgeführt [89]. Aufgrund der Beobachtung, dass die Aktivität der Nitrogenase in Zellen, die in Mo-defizientem Nährmedium kultiviert wurden, durch den Zusatz von  $\text{KReO}_4$  stimuliert wird, wurde die Dinitrogenase-Komponente nach dem Zusatz von  $\text{KReO}_4$  zur Nährlösung isoliert. Für das gereinigte Protein wurde jedoch lediglich ein Gehalt von 0,02 Re-Zentren pro Molekül bestimmt.

Da eine eingehendere Charakterisierung solcher „artifizieller“ erzeugter, nicht auf eigenständigen genetischen Systemen basierender Nitrogenasen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion des Heterometalls im FeMoco liefern kann, sollte im Rahmen des ersten Teils dieser Arbeit die Bildung einer W- und Re-haltigen Nitrogenase in *R. capsulatus* nachgewiesen und gegebenenfalls diese Proteine isoliert und näher charakterisiert werden. Dieser Teil der Arbeit gliedert sich in folgende thematische Schwerpunkte: (i) Aufnahme von Wolframat und Perrhenat in die Zelle von *R. capsulatus*; (ii) Einfluß der Metallionen auf die Bildung und Aktivität der Nitrogenase; (iii) Isolierung artifizieller Nitrogenasen aus Zellen

einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante<sup>1</sup> von *R. capsulatus*; (iv) Charakterisierung der isolierten Proteine und der in ihnen enthaltenen Cofaktoren (EPR-spektroskopische Untersuchungen, Aktivitätsbestimmungen, Redox-titrations).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors durchgeführt. In Voruntersuchungen zur Isolierung der Apo-Dinitrogenase aus einer Cofaktorbiosynthese-defekten *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* war beobachtet worden, dass sowohl ganze Zellen als auch Extraktpräparationen in der Lage waren, geringe Mengen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zu C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> – und interessanterweise auch zu C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> – zu reduzieren<sup>2</sup>. Aufgrund dieses überraschenden Befundes wurden umfangreiche Versuche an verschiedenen *nifE*<sup>-</sup>-Mutanten von *R. capsulatus* durchgeführt, um den Ursprung dieses Phänomens aufzuklären. Diese Untersuchungen umfassten einerseits die Optimierung der Anzuchtbedingungen zur Erzielung maximaler Nitrogenaseaktivität (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktionstest), andererseits Untersuchungen zur Identifizierung des Reaktionszentrums, an welchem die Substratreduktion erfolgt. In diesem Zusammenhang sollten die folgenden Fragen geklärt werden: (i) Wird in der (eigentlich) Cofaktorbiosynthese-defekten *nifE*<sup>-</sup>-Mutante der intakte FeMoco, ein veränderter Cofaktor oder eine Vorstufe des Cofaktors gebildet? (ii) Wird der FeMo-Cofaktor (bzw. ein veränderter Cofaktor/eine FeMoco-Vorstufe) in das MoFe-Protein oder in ein anderes Protein inkorporiert? (iii) Falls sich der Cofaktor (bzw. die Vorstufe) im MoFe-Protein befindet, sind beide Cofaktor-Bindungsstellen im Tetramer besetzt oder bleibt eine  $\alpha$ -Untereinheit unbesetzt? Die Klärung dieser Fragen sollte vor allem dazu dienen, die Funktion von NifE (bzw. NifNE) im äußerst komplexen Biosyntheseprozess des FeMo-Cofaktors herauszufinden.

---

<sup>1</sup> Die Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante sind nicht in der Lage die Fe-Nitrogenase zu exprimieren.

<sup>2</sup> Die Bildung signifikanter Mengen von C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ist ein charakteristisches Merkmal Mo-unabhängiger Nitrogenasen (vgl. Kap. 1.3), aber für die konventionelle Nitrogenase jedoch äußerst ungewöhnlich.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden von Herrn Prof. Dr. W. Klipp (Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 1 aufgeführt. Neben der Verwendung der Mutanten des Stammes *Rhodobacter capsulatus* B10 wurde für die Konstruktion der *nifE<sup>-</sup> anfA<sup>-</sup>*-Doppelmutante der Stamm *Escherichia coli* S17-1 sowie das Plasmid pKS28 I verwendet (Tab. 1).

**Tab. 1: Bakterienstämme und Plasmide**

| Stämme und Plasmide          | Merkmale   | Bezeichnung                              | Referenz     |
|------------------------------|--|--|--------------|
| <i>R. capsulatus</i><br>B10S | Spontane Sm <sup>r</sup> -Mutante von <i>R. capsulatus</i> B10   | B10S                                     | [90]         |
| KS 94 AI                     | <i>anfA<sup>-</sup>::Spc<sup>r</sup></i>   | <i>anfA<sup>-</sup></i>                  | [91]         |
| KS 94 AI<br>WKR 423 CI       | <i>anfA<sup>-</sup>::Spc<sup>r</sup></i><br><i>ΔmopAB::Gm<sup>r</sup>&gt;</i>                            | <i>anfA<sup>-</sup>ΔmopAB</i> apolar     | [81]         |
| KS 94 AI<br>WKR 423 CII      | <i>anfA<sup>-</sup>::Spc<sup>r</sup></i><br><i>ΔmopAB::Gm<sup>r</sup>&lt;</i>                            | <i>anfA<sup>-</sup>ΔmopAB</i> polar      | [81]         |
| WKR 279 I<br>R 231 DII       | <i>ΔnifAB<sub>II</sub>modABCD::Km<sup>r</sup></i><br><i>nifB<sub>I</sub><sup>-</sup>::Gm<sup>r</sup></i> | <i>nifB<sup>-</sup></i>                  | [92]         |
| KS 28 I                      | <i>nifE<sup>-</sup>::Km<sup>r</sup>&gt;</i>  | <i>nifE<sup>-</sup></i> apolar           | [93]         |
| WKR 300.5 II                 | <i>nifE<sup>-</sup>::Spc<sup>r</sup>&lt;</i>   | <i>nifE<sup>-</sup></i> polar            | [93]         |
| KS 28 I<br>KS 94 AI          | <i>nifE<sup>-</sup>::Km<sup>r</sup>&gt;</i><br><i>anfA<sup>-</sup>::Spc<sup>r</sup></i>                  | <i>nifE<sup>-</sup> anfA<sup>-</sup></i> | diese Arbeit |
| US 322<br>WKR 279 I          | <i>ΔnifHDK::Gm<sup>r</sup></i><br><i>ΔnifAB<sub>II</sub>modABCD::Km<sup>r</sup></i>                      | <i>ΔnifHDK Δmod</i>                      | [92]         |
| WKR 229 I                    | <i>nifV<sup>-</sup>::Gm<sup>r</sup>&gt;</i>  | <i>nifV<sup>-</sup></i>                  | [73]         |

| Stämme und Plasmide     | Merkmale   | Bezeichnung | Referenz |
|-------------------------|--|-------------|----------|
| <i>E. coli</i><br>S17-1 | RP4-2 (Tc :: Mu) (Km :: Tn7) im Chromosom integriert   |             | [94]     |
| Plasmid<br>pKS28I       | pWKR300 mit <i>nifE</i> <sup>-</sup> ::Km <sup>r</sup> |             | [93]     |

## 2.2 Nährmedien

### 2.2.1 Nährmedium für Flüssigkulturen

Für die anaerobe, phototrophe Anzucht von *R. capsulatus* in Flüssigkulturen wurde zur Derepression der Nitrogenase das folgende Mineralmedium (modifiziert nach Schneider et al. [32]) verwendet:

|                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| Mineral-Stammlösung             | 5 % (v/v)   |
| Vitamin-Stammlösung             | 0,4 % (v/v) |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 7,4 mM      |
| L-Milchsäure                    | 12 mM       |
| Serin                           | 1,8 - 5 mM  |
| EDTA                            | 60 µM       |
| Eisen(III)-citrat               | 0,5 mM      |

Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH · H<sub>2</sub>O (Suprapur, Merck, Darmstadt) auf 6,8 eingestellt. Für eine Bakterienkultivierung unter Molybdän-abgereicherten Bedingungen wurde die Eisen(III)-citrat-Stammlösung vor ihrem Zusatz zur Nährlösung mit Aktivkohle behandelt (siehe Abschnitt 2.2.2). Außerdem wurde L-(+)-Milchsäure der Qualität „ultrapur“ (Sigma) verwendet.

Die Vitamin-Stammlösung enthielt Thiamin · HCl (53 µM) und D-Biotin (8 µM). Die Mineral-Stammlösung hatte die folgende Zusammensetzung:

|                   |         |
|-------------------|---------|
| MgSO <sub>4</sub> | 16,2 mM |
| NaCl              | 34,2 mM |
| CaCl <sub>2</sub> | 6,8 mM  |
| MnCl <sub>2</sub> | 0,37 mM |

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> bzw. KReO<sub>4</sub> wurden der Nährlösung je nach Bedarf (siehe Ergebnisteil) gesondert zugesetzt.

Die Mutanten wurden, entsprechend ihrer Resistenzen, in Gegenwart von Antibiotika angezogen. Die sterilfiltrierten Antibiotika-Stammlösungen wurden dem autoklavierten Medium in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

|               |         |
|---------------|---------|
| Kanamycin     | 25 mg/l |
| Spectinomycin | 10 mg/l |
| Gentamicin    | 4 mg/l  |

### 2.2.2 Aktivkohlebehandlung

Zur Derepression der Molybdän-unabhängigen Nitrogenase von *R. capsulatus* sowie zur Untersuchung diverser Mutanten unter Molybdän-Mangelbedingungen, waren möglichst molybdänfreie Kulturbedingungen erforderlich. Aufgrund eines hohen Molybdänanteils im Eisen(III)-citrat, wurde die Stammlösung mit Aktivkohle behandelt. Die Abreicherung von Molybdänverbindungen durch selektive Adsorption an Aktivkohle wurde modifiziert nach Schneider et al. [95] durchgeführt.

Zur Herstellung der Aktivkohlesuspension wurden 50 g pulverisierte Aktivkohle 2 Tage in 1 l Wasser bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 10 min gekocht. 400 ml Eisen(III)-citrat-Stammlösung (38 mM, pH 2,3) wurden mit 200 ml dieser Aktivkohlesuspension versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aktivkohle wurde durch Filtration entfernt und die so behandelte Eisen(III)-citrat-Stammlösung als Nährlösungsbestandteil eingesetzt.

### 2.2.3 Komplexmedium

Die Reinheitskontrolle der verschiedenen *R. capsulatus*-Mutanten, sowie deren Stammhaltung erfolgte durch Verdünnungsausstrich auf Agar-Platten. Das hierfür benutzte Komplexmedium hatte die folgende Zusammensetzung:

|             |        |
|-------------|--------|
| Hefeextrakt | 3 g/l  |
| Bactopepton | 3 g/l  |
| NaCl        | 1 g/l  |
| Agar-Agar   | 15 g/l |

## 2.3 Zellanzucht

### 2.3.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden die *R. capsulatus*-Mutanten auf Agarplatten mit Komplexmedium (siehe Abschnitt 2.2.3) bei 30 °C aerob angezogen. Dem Medium wurde entsprechend der Resistenz der jeweiligen Mutante ein Antibiotikum in der in Abschnitt 2.2.1 aufgeführten Konzentration zugesetzt. Die Mutanten wurden alle vier Wochen neu auf das Selektivmedium überimpft. Bei Mutanten, die mehrere Resistenzen tragen, wurde bei jedem neuen Ausstrich das Antibiotikum gewechselt.

### 2.3.2 Flüssigkulturen

Zur Anzucht von *R. capsulatus*-Flüssigkulturen unter anaeroben, phototrophen Bedingungen wurden Serumflaschen verschiedener Größe (30, 100, 300 oder 500 ml) mit (27, 90, 270 bzw. 450 ml) Mineralmedium befüllt, mit einem gasdichten Gummiseptum geeigneter Größe verschlossen und autoklaviert (120 °C, 1,2 bar, 20 min). Die autoklavierte Nährlösung wurde vor dem Beimpfen mit einem geeigneten Antibiotikum und je nach Bedarf mit Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> bzw. KReO<sub>4</sub> (siehe Ergebnisteil) versetzt. Zur Entfernung des im Medium gelösten Sauerstoffs wurden die Kulturen nach dem Beimpfen mit einem sterilen Argonstrom für 20 min kontinuierlich begast. Die Inkubation der Kulturen erfolgte anschließend in einem auf 35 °C temperierten Wasserbad unter Belichtung mit 60W-Glühbirnen.

*Vorkulturen:* Die Vorkulturen wurden in 30 ml-Serumflaschen angezogen. Hierzu wurde die Antibiotikum enthaltende Nährlösung mit auf Agarplatten heterotroph gewachsenen Zellen mittels einer Impfschlinge angeimpft. Das Impfmateriale in der Nährlösung wurde anschließend mithilfe eines Vortex-Gerätes suspendiert. Die Inkubationszeit der Vorkulturen betrug in der Regel 2-3 Tage. *Zwischenkulturen:* Die Anzucht der Zwischenkulturen erfolgte, je nach der Menge des benötigten Materials für die Hauptkulturen, in 100- bzw. 300 ml-Serumflaschen. Als Inoculum dienten jeweils 10 % der in den Vorkulturen angezogenen Zellsuspension. Die Inkubationszeit der Zwischenkulturen betrug in der Regel 16 - 24 h. *Hauptkulturen:* Zur Anreicherung und Isolierung von Nitrogenaseproteinen wurden 500 ml-Serumflaschen verwendet. Zur Bestimmung der  $[\text{MoO}_4^{2-}]$ - bzw.  $[\text{WO}_4^{2-}]$ -Abhängigkeit der Nitrogenase-Expression sowie der Aktivität der *nifE*-Mutanten wurden Hauptkulturen in 30 ml-Serumflaschen angezogen. Als Inoculum dienten jeweils 10 % der in den Zwischenkulturen angezogenen Zellsuspension. Die Inkubationszeit der Hauptkulturen betrug in der Regel 18 -24 h.

## 2.4 Extinktionsmessung von Zellsuspensionen

Um das Wachstum von *Rhodobacter*-Kulturen verfolgen bzw. die Wachstumsphase, in der sich eine Kultur befindet, identifizieren zu können, wurde die Extinktion von Zellsuspensionen an einem UV/VIS-Spektralphotometer (Lambda 2, Bodenseewerk Perkin Elmer, Düsseldorf) bei 600 nm gegen Wasser gemessen.

Die Extinktion einer Bakteriensuspension stellt ein indirektes Maß für die Anzahl an Bakterienzellen (Zelldichte) in der Suspension dar. Da eine lineare Abhängigkeit zwischen Extinktion und Zelldichte nur im Bereich geringerer Dichten besteht, wurden die Zellsuspensionen routinemäßig 1 : 5 mit Wasser verdünnt, sodass die Extinktion unterhalb von 0,5 lag. Die auf diese Weise ermittelten Extinktionswerte wurden unter Berücksichtigung der Verdünnung als  $E_{600}$  angegeben.

## 2.5 Gewährleistung anaerober Bedingungen

Da es sich bei der Nitrogenase um ein extrem sauerstoffempfindliches Enzymsystem handelt, mussten sämtliche Arbeitsschritte, wie z. B. die Zellanzucht, Aktivitätstests, Extraktpräparationen, Enzymisolierungen und die Bereitung der EPR-Proben, unter striktem

Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt werden. Dieses wurde durch Begasung der verwendeten Gefäße mit O<sub>2</sub>-freiem Argon sowie durch den Zusatz von Natriumdithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) zu den Enzym- und Pufferlösungen erreicht.

### 2.5.1 **Bereitung von O<sub>2</sub>-freien Gasen**

Für sämtliche Arbeiten unter anaeroben Bedingungen wurde Argon (Linde, Höllriegelskreuth) verwendet. Zur Entfernung restlicher Spuren von Sauerstoff wurde das Gas vor Gebrauch über einen auf ca. 200 °C aufgeheizten Kupferoxid-Katalysator (Ochs, Bovenden) und anschließend durch eine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-haltige Pufferlösung (50 mM Tris/HCl, pH 8) geleitet.

Das für die Bestimmung der Nitrogenaseaktivität verwendete C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Linde, Höllriegelskreuth) wurde in vollständig mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-haltigem Tris-Puffer (50 mM, pH 7,6, ~ 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) gefüllten 15-ml-Hungateröhrchen (mit gasdichtem Septum und Schraubverschluss verschlossen) eingeleitet, bis ca. 2/3 des Puffers durch das C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> verdrängt war. Durch anschließendes kräftiges Schütteln wurde gewährleistet, dass die restlichen Spuren von O<sub>2</sub> durch Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> reduziert wurden. Die so präparierten C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Röhrchen konnten für ca. 1 Woche bei Raumtemperatur gelagert werden. Für die Aktivitätstests wurde den Röhrchen maximal 500 µl C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> entnommen. Vor einer erneuten Verwendung wurde das Röhrchen wieder mit C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> aufgefüllt.

### 2.5.2 **Vorbereitung von Gefäßen, Spritzen und Lösungen**

Für Enzym- und Pufferlösungen wurden Serumflaschen mit gasdichten Septen verwendet. Jedes für das anaerobe Arbeiten benutzte Gefäß wurde vor seiner Verwendung für ca. 20 min mit O<sub>2</sub>-freiem Argon begast. Pufferlösungen wurden vor Gebrauch ebenfalls für ca. 20 min mit Argon begast und anschließend mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Endkonz.: 4 mM) versetzt. Sämtliche fertiggestellten Lösungen wurden ständig unter leichtem Argondruck gehalten, um das Eindringen von Luftsauerstoff zu vermeiden.

Zur Überführung von Zellsuspensionen und Extrakten sowie sämtlicher Lösungen, die mit diesen in Kontakt traten, wurden gasdichte Hamiltonspritzen (für Volumina bis 250 µl) bzw. gasdichte Einmalspritzen (für Volumina bis 50 ml) verwendet. Diese wurden ebenfalls vor Gebrauch mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-haltigem Tris-Puffer (50 mM, pH 7,6, 4 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) gespült.

### 2.5.3 Überprüfung des Reduktionszustandes

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Puffer- und Enzymlösungen ausreichend reduziert waren, wurde eine geringe Menge (einige  $\mu\text{l}$ ) in eine Benzylviologenlösung (3 mM, in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6)) getropft. Eine Violettfärbung an der Eintropfstelle zeigte an, dass die zu prüfende Lösung noch ausreichend reduziert war. Trat keine Farbänderung auf, wurden die Puffer- bzw. Enzymlösungen nochmals mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (Endkonz.: 1 - 2 mM) versetzt.

## 2.6 Zellernte

Für Enzymisolierungen wurden jeweils 12 Hauptkulturen (je 500 ml) unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen (2,3 mM Serin) angezogen. Die Bakterien wurden in der späten logarithmischen Wachstumsphase bei einer  $E_{600} \sim 1,6$  geerntet. Zur Gewährleistung anaerober und reduzierender Bedingungen bei der Zellernte wurde den Zellsuspensionen  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (Endkonz.: 4 mM) zugesetzt, bevor sie in mit Argon begaste 500 ml-Zentrifugenbecher gefüllt wurden. Die Zellen wurden 1 h bei 13.000 g und 4 °C in einer Sorvall RC-5B-Zentrifuge (Rotor Typ GS3, DuPont Instruments, Wilmington, USA) zentrifugiert. Aufgrund ihrer schleimhaltigen Kapsel bildeten die zentrifugierten Zellen kein festes Pellet. Daher wurde der Überstand unter kontinuierlicher Argonbegasung vorsichtig mithilfe eines Wasserstrahlvakuums abgesaugt. Das Zellpellet (gegenüber der ursprünglichen Zellsuspension ca. 100-fach konzentriert) wurde resuspendiert und mit einer gasdichten Spritze in eine mit Argon begaste Serumflasche überführt. Anschließend wurde das Pellet mit autoklaviertem und Ar-begastem Glycerin (Endkonz.: 20 % (v/v)), Desoxyribonuclease I aus Rinderpankreas (Endkonz.: 0,2 mg/ml) sowie Superoxiddismutase aus Rindererythrozyten (Endkonz.: 0,2 mg/ml) versetzt. Die gesammelten Zellen konnten entweder sofort lysozymatisch aufgeschlossen oder bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert werden (maximal 3 Wochen).

## 2.7 Zellaufschluss zur Herstellung von Extrakten

Zur Herstellung von Extrakten aus *R. capsulatus* wurden die Zellen, unter Einhaltung anaerober Bedingungen, einem schonenden lysozymatischen Zellaufschluss unterworfen. Dazu wurde die für den Aufschluss vorbereitete Zellsuspension (siehe Abschnitt 2.6) auf eine

Tris-Konzentration von 50 mM mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -haltigem Tris/HCl-Puffer (500 mM, pH 8,0, 4 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) eingestellt und mit folgenden Substanzen versetzt (Endkonzentrationen):

|                                   |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| Lysozym (Hühnerei)                | 2 mg/ml          |
| Polymyxin B-Sulfat                | 0,4 mg/ml        |
| EDTA                              | 50 $\mu\text{M}$ |
| PMSF                              | 1 mM             |
| Leupeptin-Hydrogensulfat          | 50 $\mu\text{M}$ |
| Pepstatin A                       | 1 $\mu\text{M}$  |
| $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ | 4 mM             |

PMSF- und Pepstatin A-Stammlösungen (100- bzw. 1000-fach) wurden in Ethanol angesetzt. Sämtliche anderen Stammlösungen wurden anaerob in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) angesetzt und enthielten  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (Endkonz.: 4 mM). Während EDTA und das Polypeptidantibiotikum Polymyxin B-Sulfat die Mureinschicht für das Lysozym zugänglich machten, trugen sowohl die Verwendung von Proteaseinhibitoren, wie PMSF, Leupeptin und Pepstatin A (Schutz vor proteolytischem Abbau), als auch der Zusatz von Superoxiddismutase (Schutz vor Sauerstoff) zur Gewinnung Nitrogenase-aktiver Zellextrakte bei [96, 97].

Nach dem Zusatz aller Bestandteile wurden die Zellen für ca. 20 min bei 30 °C unter Rühren aufgeschlossen. Anschließend wurde dem daraus resultierenden Rohextrakt  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (Endkonz.: 2 mM) zugesetzt, um anaerobe Bedingungen während der folgenden Ultrazentrifugation zu gewährleisten. Die Zelltrümmer und Membranpartikel wurden vom löslichen Überstand durch Ultrazentrifugation (Sorvall Ultra Pro 80, Rotor T 865, Sorvall GmbH, Bad Homburg) mit  $2 \cdot 10^5$  g für 1 h bei 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation mit gasdichten Spritzen in begaste Serumflaschen überführt und weiterverarbeitet.

## 2.8 Reinigung der Nitrogenasekomponenten

### 2.8.1 Chromatographie an Q-Sepharose

Die beiden Komponenten der Nitrogenase wurden voneinander durch einen einzigen Chromatographieschritt an Q-Sepharose (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

getrennt und gereinigt. Hierzu wurde der ultrazentrifugierte Rohextrakt über einen Flow-Adapter auf die Geloberfläche einer Q-Sepharose Säule (Innendurchmesser: 2,5 cm, Gelvolumen: ca. 60 ml) aufgetragen, die zuvor mit Äquilibrierpuffer (pH 7,6) folgender Zusammensetzung äquilibriert worden war:

|   |            |
|---|------------|
| Tris/HCl                                      | 50 mM      |
| Glycerin                                      | 10 % (v/v) |
| NaCl  | 150 mM     |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | 4 mM       |

Nach dem Auftragen des Rohextraktes wurden die gebundenen Proteine mit einem diskontinuierlichen NaCl-Gradienten (200, 250, 300, 350, 400 mM NaCl in Äquilibrierpuffer) eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden in mit Argon begasten Serumflaschen aufgefangen und bis zu ihrer Konzentrierung auf Eis gelagert. Sämtliche Chromatographieschritte (Äquilibrierung der Säule, Auftragen des Extrakts sowie Elution der Proteine) wurden bei 8 °C und mit einer Durchflussrate von 2 ml/min durchgeführt.

Die Konzentrierung der Nitrogenase-enthaltenden Proteinfractionen bis auf 5 - 10 ml erfolgte durch Ultrafiltration in 250 ml-Diaflo-Kammern (Amicon, Witten) über PM 30-Membranen unter einem Argondruck (Argon 4.8, Linde) von ca. 3 bar. Die Kammern wurden vor der Konzentrierung mehrmals mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-haltigem Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6, 4 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) unter Argondruck gespült, um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Die weitere Konzentrierung der Proben auf 0,2 - 1 ml erfolgte in mit Argon begasten Minicon B15-Kammern (Amicon, Witten), die vor ihrer Verwendung ebenfalls mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-haltigem Tris/HCl-Puffer gespült wurden. Die auf diese Weise konzentrierten Proben wurden anschließend mit gasdichten Spritzen in zuvor mit Argon begaste Hungateröhrchen (Vol.: 5,75 ml) überführt und bei Bedarf in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.8.2 Gelfiltration mit Sephacryl S-200

Zur weiteren Aufreinigung der W-haltigen Nitrogenase vor einer Redox Titration wurde die Dinitrogenase enthaltende Fraktion nach der Chromatographie an Q-Sepharose einer Gelfiltration mit Sephacryl S-200 HR (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei 8 °C unterzogen. Dazu wurde die Proteinprobe nach der Chromatographie an Q-Sepharose bis auf

ca. 1 ml (wie unter 2.8.1 beschrieben) konzentriert und anschließend über einen Flow-Adapter auf die Geloberfläche der mit Glycerin-haltigem Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6, 10 % Glycerin (v/v), 4 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) äquilibrierten Sephacryl S-200 Säule (Innendurchmesser: 2,5 cm, Gelvolumen: 400 ml) aufgetragen. Die W-haltige Dinitrogenase-Komponente wurde mit dem Äquilibrierpuffer bei einer Durchflussrate von 1 ml/min von der Säule eluiert, in mit Argon begasten Serumflaschen aufgefangen und anschließend bis auf ca. 0,8 ml (wie unter 2.8.1 beschrieben) konzentriert.

## 2.9 Bestimmung der Nitrogenaseaktivität

Die Aktivität der Nitrogenase konnte einerseits aus der Geschwindigkeit der Reduktion des Substrates  $\text{C}_2\text{H}_2$  zu  $\text{C}_2\text{H}_4$  und  $\text{C}_2\text{H}_6$ , andererseits auch aus der  $\text{H}_2$ -Produktion ermittelt werden. Der Nachweis der Umsetzungsprodukte ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6$  und  $\text{H}_2$ ) erfolgte gaschromatographisch (Mod. 5890, Hewlett Packard, USA). Sowohl  $\text{C}_2\text{H}_4$  als auch  $\text{C}_2\text{H}_6$  wurden auf einer Aluminasäule (Länge: 2m, Durchmesser: 0,32 mm, Chrompack, Frankfurt) bei einer Temperatur von 120 °C und einem Trägergasdruck ( $\text{N}_2$ ) von 200 kPa getrennt und mittels FID-Detektor nachgewiesen.  $\text{H}_2$  wurde auf einem Molekularsieb (5 Å, 60-80 mesh, Länge: 2m) bei einer Temperatur von 100 °C und einem Trägergasdruck (Ar) von 200 kPa getrennt und mittels WLD-Detektor nachgewiesen. Die Aufzeichnung erfolgte durch einen Integrator (Mod. 3394A, Hewlett Packard, USA). Die Konzentration der detektierten Gase wurde über die Peakfläche anhand von Kalibrierkurven (im Bereich von 0 - 100  $\mu\text{l}$  0,01 % (v/v)  $\text{C}_2\text{H}_4$  bzw.  $\text{C}_2\text{H}_6$  und 1 % (v/v)  $\text{H}_2$ ) ermittelt.

Die Aktivität der Nitrogenase in Extrakten und gereinigten Enzympräparaten wurde in internationalen Einheiten (U), definiert als 1 nmol umgesetztes Substrat ( $\text{C}_2\text{H}_2$  bzw.  $\text{H}^+$ ) pro Minute, und die spezifische Enzymaktivität wurde in U/mg Protein angegeben. Die Aktivität ganzer Zellen wurde in nmol umgesetztes Substrat pro Milliliter Zellsuspension pro Stunde angegeben. Für Zellen, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden, betrug der Proteingehalt ca. 500  $\mu\text{g}$  pro Milliliter Zellsuspension. Zur groben Umrechnung der Aktivität ganzer Zellen (nmol/ml·h) in spezifische Aktivität (U/mg Protein) muss somit erstere durch 30 (ml·h  $\sim$  0,5 mg · 60 min = 30 mg·min) dividiert werden.

Für die ermittelten Messwerte wurden folgende Fehler veranschlagt: ca. 10 % für die mit ganzen Zellen gemessenen Nitrogenaseaktivitäten und ca. 15 % für die spezifischen Enzymaktivitäten von Zellextrakten und gereinigtem Protein.

### 2.9.1 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion und H<sub>2</sub>-Produktion ganzer Zellen

Für die Bestimmung der Nitrogenaseaktivität ganzer Zellen wurden gasdichte, mit Argon begaste Hungaterörchen (Vol.: 5,75 ml) benutzt. Direkt vor der anaeroben Überführung von je 1 ml Zellsuspension in die begasten Teströhrchen (mit einer gasdichten 1 ml-Spritze) wurde diesen zur Entfernung von O<sub>2</sub>-Spuren jeweils 5 µl einer mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> neutralisierten Ti(III)-Citrat-Lösung (85 mM) zugesetzt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 10 min in einem Wasserbad bei 30 °C unter Beleuchtung durch zwei 60 W-Glühbirnen (unter dem Boden des Wasserbades installiert) geschüttelt. Im Anschluss an diese Aktivierungsphase wurde die Reaktion durch den Zusatz von 250 µl C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (ca. 5 % (v/v) der Gasphase) gestartet. Die äußeren Bedingungen, wie Temperatur und Beleuchtung wurden beibehalten. Die Reaktion wurde nach 1 h durch die Zugabe von 100 µl Trichloressigsäure (3 M) gestoppt. Anschließend wurden 100 µl Probe mittels einer gasdichten Hamiltonspritze aus dem Gasraum entnommen und in den Gaschromatographen injiziert.

Zur Bestimmung von H<sub>2</sub> wurde der Gasraum des Reaktionsgefäßes vor Inkubationsbeginn mit Argon bzw. Stickstoff begast, um die Anfangskonzentration des H<sub>2</sub> gering zu halten. Für den Fall, dass neben H<sub>2</sub> auch die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion in einem Testansatz gemessen werden sollte, wurde die Reaktion nach der Begasung durch Zugabe von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> gestartet.

### 2.9.2 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion und H<sub>2</sub>-Produktion zellfreier Extrakte

Die Bestimmung der Aktivität zellfreier Extrakte und isolierten Nitrogenase-Komponenten wurde in 500 µl Testansätzen folgender Zusammensetzung durchgeführt:

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| ATP                    | 2,5 mM    |
| Creatinphosphat        | 10 mM     |
| Creatinkinase          | 200 µg    |
| MgCl <sub>2</sub>      | 20 mM     |
| Hepes (100 mM, pH 7,4) | ad 500 µl |

Die Reagenzien wurden in Hepes-Puffer (50 mM, pH 7,4) angesetzt. Als Reaktionsgefäße dienten Hungaterörchen (Vol.: 5,75 ml) mit gasdichten Septen, die nach dem Zusammenpipettieren der Reagenzien für 20 min mit Argon begast wurden. Anschließend wurden Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Endkonz.: 6 mM) und 500 µl C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> in die Reaktionsgefäße injiziert und für

10 min bei 30 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Durch Zugabe der Enzymkomponenten bzw. des Extrakts (max. 100 µl) wurde die Reaktion gestartet. Nach 15 min Inkubation wurde die Reaktion durch den Zusatz von 100 µl Trichloressigsäure (3 M) beendet. Anschließend wurden 100 µl Probe mittels einer gasdichten Hamiltonspritze aus dem Gasraum entnommen und in den Gaschromatographen injiziert.

Die Testansätze für die Bestimmung der H<sub>2</sub>-Produktion setzten sich wie oben beschrieben zusammen. Allerdings wurde den Ansätzen kein C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zugesetzt. Sollte neben der H<sub>2</sub>-Produktion auch die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion gemessen werden, wurde C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zugefügt.

## **2.10 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung des Proteingehalts sowohl ganzer Zellen, als auch von Proteinlösungen wurde nach der Biuret-Methode durchgeführt. Der Proteingehalt stark verdünnter Proteinlösungen, wie sie bei der chromatographischen Trennung von Extraktproteinen anfallen, wurde mittels der empfindlicheren Bradford-Methode bestimmt.

### **2.10.1 Proteinbestimmung ganzer Zellen**

Die Bestimmung des Proteingehalts ganzer Zellen wurde modifiziert nach einer von Schmidt et al. beschriebenen Methode durchgeführt [98]. Hierzu wurden 10 ml Zellsuspension in acetonfesten Zentrifugenröhrchen in einer Tischzentrifuge (Medifuge, Heraeus, Hanau) 10 min bei 3.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet in 7 ml Aceton suspendiert und 15 min inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet nochmals mit 7 ml Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das von den Chromophoren in der Schleimhülle befreite Zellpellet in 2 ml NaOH (0,5 M) suspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde der Ansatz anschließend 60 min gekocht und die Zelltrümmer durch nachfolgende Zentrifugation entfernt. 200 µl des Überstandes wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Wasser verdünnt und mit 400 µl Biuret-Reagenz folgender Zusammensetzung versetzt:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Na-K-Tartrat      | 32 mM  |
| CuSO <sub>4</sub> | 19 mM  |
| KJ                | 30 mM  |
| NaOH              | 200 mM |

Nach 30-minütiger Inkubation bei 30 °C wurde die Extinktion gegen einen Leerwert (Ansatz ohne Protein, bestehend aus 200 µl Wasser, 200 µl NaOH (0,5 M) und 400 µl Biuret-Reagenz) bei 546 nm gemessen. Die Kalibrierung wurde mit einer Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml) im Bereich von 0 - 500 µg Protein pro Ansatz durchgeführt.

### 2.10.2 Proteinbestimmung zellfreier Extrakte

Die Proteinbestimmung zellfreier Extrakte und gereinigter Proteine erfolgte mit einem Mikroansatz der Biuret-Methode nach Beisenherz et al. [99]. Dazu wurden 200 µl Proteinlösung in Eppendorfgefäßen mit 50 µl Trichloressigsäure (3 M) versetzt. Das gefällte Protein wurde 10 min bei 13.000 g abzentrifugiert (Biofuge A, Heraeus), der Überstand vorsichtig abdekantiert und das Proteinpellet mit 250 µl Biuret-Reagenz und 250 µl Wasser versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und die Extinktion anschließend gegen einen Leerwert (Ansatz ohne Protein, bestehend aus je 250 µl Wasser und Biuret-Reagenz) bei 546 nm gemessen. Die Kalibrierung wurde mit einer Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml) im Bereich von 0 - 250 µg Protein pro Ansatz durchgeführt.

### 2.10.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts von verdünnten Proteinlösungen, wie sie z. B. nach der Eluierung von Chromatographiesäulen anfallen, wurde die von Bradford beschriebene Methode angewendet [100]. Dazu wurden 100 µl Proteinlösung, deren Proteingehalt nicht höher als 1 g/l ist, mit 5 ml Farbreagenz folgender Zusammensetzung versetzt:

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| Coomassie Brilliant Blue G250         | 0,01 % (w/v) |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %) | 10 % (v/v)   |
| Ethanol (96 %)                        | 5 % (v/v)    |

Anschließend wurde die Lösung durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Wasser bestimmt. Zur Ermittlung des Proteingehalts aus der Extinktion wurde eine Kalibrierkurve mit Rinderserumalbumin als Proteinstandard (0,1 - 1 g/l) erstellt.

## 2.11 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamidgelelektrophoresen zur Reinheitskontrolle und zur Molekulargewichtsbestimmung wurden unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt. Für die als vertikale Plattenelektrophorese durchgeführten Polyacrylamidgelelektrophoresen wurde eine Mini-Gelkammer (Biometra, Göttingen) mit den Abmessungen 105 x 85 x 1 mm verwendet. Die Gelelektrophoresen wurden entweder als Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli [101]) oder als Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt [102].

### 2.11.1 Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung

Für die Molekulargewichtsbestimmung der Proteine wurde eine Markerlösung mit folgenden Referenzproteinen verwendet:

|   | Molekulargewicht<br>(kDa) | eingesetzte<br>Menge (mg) |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Rinderserumalbumin                      | 66,0                      | 1,5                       |
| Ovalbumin                               | 45,0                      | 1,5                       |
| Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase | 36,0                      | 1,5                       |
| Carboanhydrase                          | 29,0                      | 1,0                       |
| Sojabohnentrypsininhibitor              | 20,1                      | 2,0                       |
| $\alpha$ -Lactalbumin                   | 14,2                      | 1,0                       |

Die Markerproteine wurden in 700  $\mu$ l Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,8) gelöst und mit jeweils 100  $\mu$ l SDS (350 mM) und Dithiothreitol (200 mM) versetzt. Die Lösung wurde für 5 min auf 100 °C erhitzt und mit 100  $\mu$ l Bromphenolblaulösung (0,75 mM) sowie ca. 20 % (w/v) Saccharose versetzt. Der Proteinmarker wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert.

### 2.11.2 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden 100  $\mu$ l Proteinlösung mit Dithiothreitol (Endkonz.: 20 mM) und SDS (Endkonz.: 35 mM) versetzt und für 10 min im Wasserbad bei 100 °C denaturiert. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Saccharose (ca. 20 % (w/v)) beschwert und mit 10  $\mu$ l einer Bromphenolblaulösung (0,75 mM) versetzt.

### 2.11.3 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde modifiziert nach der Methode von Laemmli [101] durchgeführt. Um eine möglichst scharfe Bandierung der Proteine zu erzielen, wurde das Trenngel (Acrylamidkonzentration 12,5 % (w/v)) mit einem Sammelgel (Acrylamidkonzentration 4,8 % (w/v)) überschichtet. Die für die Elektrophorese verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

#### *Trenngel*

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| Acrylamid                 | 12,5 % (w/v) |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | 0,33 % (w/v) |
| Tris/HCl, pH 8,8          | 250 mM       |
| SDS                       | 3,5 mM       |
| TEMED                     | 0,2 % (v/v)  |
| Ammoniumperoxodisulfat    | 0,9 mM       |

*Sammelgel*

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| Acrylamid                 | 4,8 % (w/v)  |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | 0,13 % (w/v) |
| Tris/HCl, pH 6,8          | 60 mM        |
| SDS                       | 3,5 mM       |
| TEMED                     | 0,4 % (v/v)  |
| Ammoniumperoxodisulfat    | 1,9 mM       |

Die Polymerisation des Trenngels wurde durch den Zusatz von Ammoniumperoxodisulfat gestartet. Das noch flüssige Gel wurde bis ca. 2 cm unter den oberen Rand der Gelkammer gegossen und mit 200 µl Wasser überschichtet, um ein Austrocknen des oberen Trenngelrandes während der Polymerisation zu vermeiden. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt und anschließend das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Die Polymerisation des Sammelgels wurde ebenfalls durch den Zusatz von Ammoniumperoxodisulfat initiiert. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Teflonkamm, der für die Ausbildung von zehn, voneinander getrennten Geltaschen sorgte, eingesetzt.

Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels wurde die Elektrophoresekammer zusammengebaut und mit Elektrophorese-Puffer folgender Zusammensetzung befüllt:

|        |        |
|--------|--------|
| Tris   | 100 mM |
| Glycin | 100 mM |
| SDS    | 3,5 mM |

Anschließend wurden die vorbereiteten Proteinproben (max. 10 µl pro Geltasche) auf das Gel aufgetragen und die als vertikale Plattenelektrophorese durchgeführte Elektrophorese gestartet. Zu Beginn wurden die Proteine im Sammelgel bei einer Stromstärke von 10 mA konzentriert, bis sie die Grenze zum Trenngel erreichten. Zur eigentlichen Trennung der Proteine im Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde beendet nachdem die Bromphenolblau-Frontbande das Trenngel gerade verlassen hatte (Dauer ca. 45 min).

#### 2.11.4 Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mithilfe von Tricin anstatt Glycin als Folgeion wurde erstmals von Schagger et al. [102] beschrieben. Der Einsatz von Tricin bei der Elektrophorese gewährleistet im Allgemeinen eine bessere Auflösung bei der Trennung kleinerer Proteine (1 - 100 kDa). Mithilfe dieser Methode können vor allem Proteine im Bereich von 5 - 20 kDa besonders effektiv aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurde die Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese allerdings eingesetzt, um die Auftrennung der beiden Untereinheiten des MoFe-Proteins, im Vergleich zu der mit der konventionellen Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erreichten Separierung der Proteine, zu verändern (siehe Ergebnisse).

Wie auch bei der Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ein Trenngel (10 % (w/v) Acrylamid) mit überschichtetem Sammelgel (4 % (w/v) Acrylamid) eingesetzt. Die Polymerisation der Gele wurde ebenfalls mit Ammoniumperoxodisulfat gestartet und die Gele wie oben beschrieben gegossen. Die verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

##### *Trenngel*

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| Acrylamid                 | 10 % (w/v)   |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | 0,27 % (w/v) |
| Tris/HCl, pH 8,45         | 1 M          |
| Glycerin                  | 13 % (v/v)   |
| SDS                       | 3,5 mM       |
| TEMED                     | 0,1 % (v/v)  |
| Ammoniumperoxodisulfat    | 2,2 mM       |

##### *Sammelgel*

|                           |              |
|---------------------------|--------------|
| Acrylamid                 | 6,7 % (w/v)  |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | 0,18 % (w/v) |
| Tris/HCl, pH 8,45         | 1 M          |
| SDS                       | 3,5 mM       |
| TEMED                     | 0,1 % (v/v)  |
| Ammoniumperoxodisulfat    | 2,9 mM       |

Nach der vollständigen Polymerisation des Trenn- und Sammelgels wurde die Elektrophoresekammer zusammengesetzt und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Im Unterschied zur Elektrophorese mit Glycin, wurden bei der Elektrophorese mit Tricin Kathoden- und Anodenpuffer unterschiedlicher Zusammensetzung benutzt. Während als Anodenpuffer Tris/HCl-Puffer (200 mM, pH 8,9) eingesetzt wurde, setzte sich der Kathodenpuffer wie folgt zusammen:

|        |        |
|--------|--------|
| Tris   | 100 mM |
| Tricin | 100 mM |
| SDS    | 3,5 mM |

Nach dem Auftragen der vorbereiteten Proteinproben (max. 10 µl pro Tasche) wurde die Elektrophorese gestartet. Die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel wurde bei einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt. Zur anschließenden Trennung der Proteine im Trenngel wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde beendet, nachdem die Bromphenolblau-Frontbande das Trenngel gerade verlassen hatte. Die gesamte Elektrophorese dauerte ca. drei Stunden und wurde bei Raumtemperatur ohne zusätzliche Kühlung durchgeführt.

### 2.11.5 Färbung der Proteinbanden

Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteinbanden wurden die Gele nach der Elektrophorese 15 min mit einer Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung behandelt. Anschließend wurden sie so lange mit Entfärberlösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar angefärbt und der Gelhintergrund fast farblos war. Eine vollständige Entfärbung des Gelhintergrunds, bei gleichbleibender Schärfe der Proteinbanden, wurde durch Inkubation der Gele für ca. 16 h in Essigsäure (7,5 % (v/v)) bei 4 °C erzielt. Zur begrenzten Aufbewahrung (ca. 1 - 2 Wochen) wurden die Gele bei 4 °C in Essigsäure (7,5 % (v/v)) gelagert. Die Färbelösung sowie der Entfärber setzten sich wie folgt zusammen:

#### *Färbelösung*

|                                |              |
|--------------------------------|--------------|
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | 2,4 mM       |
| Ethanol                        | 45,5 % (v/v) |
| Essigsäure                     | 9,1 % (v/v)  |

*Entfärbelösung*

|            |              |
|------------|--------------|
| Ethanol    | 45,5 % (v/v) |
| Essigsäure | 9,1 % (v/v)  |

**2.12 Immunologische Methoden**

Zum immunologischen Nachweis der Dinitrogenase (MoFe-Protein) wurden polyklonale Kaninchenantikörper verwendet, die gegen das gereinigte MoFe-Protein gebildet worden waren (anti-Rc1<sup>Mo</sup>-IgG). Zur immunologischen Identifizierung des Fe-Proteins der Mo-abhängigen Nitrogenase wurden Antikörper, die gegen das Fe-Protein der Fe-Nitrogenase produziert worden waren, eingesetzt (anti-Rc2<sup>Fe</sup>-IgG). Es konnte aber gezeigt werden, dass diese Antikörper mit dem Fe-Protein der Mo-abhängigen Nitrogenase spezifische Antigen-Antikörper-Präzipitate bilden [103].

Zur routinemäßigen Identifizierung und zum qualitativen Nachweis der Nitrogenase in Extrakten und Säuleneluaten wurde der Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest eingesetzt. Die quantitative immunologische Bestimmung des Antigens (Nitrogenase) wurde mithilfe der radialen Immundiffusion (RID) durchgeführt. Als Ergänzung zu den beiden bereits erwähnten immunologischen Methoden wurden analytische Immunoblots (Western Blots) durchgeführt. Diese dienten vor allem der Identifizierung der Nitrogenaseuntereinheiten sowie eventueller Bruchstücke (z. B. durch proteolytischen Angriff in Fragmente gesplante Nitrogenase). Außerdem wurde der Western Blot zum „semi-quantitativen“ Nachweis der Nitrogenaseproteine eingesetzt.

**2.12.1 Ouchterlony-Doppelimmundiffusionstest**

Zur routinemäßigen Identifizierung und Detektierung der Dinitrogenase in Extrakten und Säuleneluaten von *R. capsulatus* wurden Immundiffusionstests nach einer erstmals von Ouchterlony beschriebenen Methode [104], modifiziert nach Oakley, durchgeführt [105]. Als Gelgrundlage diente ein Veronal-Puffer (50 mM, pH 8,2) der folgenden Zusammensetzung:

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| 5,5-Diethylbarbitursäure (Na-Salz) | 21,6 mM |
| Natriumacetat                      | 21,6 mM |
| NaN <sub>3</sub>                   | 6,8 mM  |

*Gelherstellung:*

Der Puffer wurde in einem Erlenmeyerkolben mit 1 % (w/v) Agarose versetzt und bis zur Klärung erhitzt. Nach dem Zusatz von 3 % (w/v) Polyethylenglykol-6000 und vorsichtiger Durchmischung wurden jeweils 3 ml des Gelmaterials auf zuvor mit Ethanol gereinigte Objektträger (7,5 x 2,5 cm) pipettiert. Nach Verfestigung des Gels nach ca. 1 h wurden rosettenförmig angeordnete Löcher (Durchmesser: 3 mm) ausgestanzt und das Gelmaterial im Innern des Lochs mithilfe eines Wasserstrahlvakuum abgessaugt. Die gestanzten Gele konnten bis zu einer Woche in einer Feuchtkammer bei 4 °C gelagert werden.

*Probenvorbereitung:*

Zur Vorbereitung der Proteinproben für die Ouchterlony-Immundiffusionstest wurden diese mit SDS (Endkonz.: 35 mM) versetzt und für 10 min im Wasserbad bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und mit Triton X-100 (2 % (v/v)) versetzt.

*Durchführung der Immundiffusion:*

Nach dem Auftragen der vorbereiteten Proben und Antikörperlösungen in die ausgestanzten Löcher (max. 4 µl) wurden die Gele in einer Feuchtkammer bei 4 °C für 24 - 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit einer NaCl-Lösung (0,85 % (w/v)) für ca. 24 h bei Raumtemperatur behandelt, um überschüssiges Protein zu entfernen. Die Gele wurden zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Präzipitate für 10 min mit der Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung behandelt, welche auch für die Entwicklung von SDS-Gelen verwendet wurde (siehe Abschnitt 2.11.5). Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte, wie bei der SDS-Gelelektrophorese, mit Entfärberlösung. Anschließend wurden die entwickelten Gele zur Lagerung auf Gel-Fix für Agarose (Serva, Heidelberg) fixiert.

**2.12.2 Radiale Immundiffusion**

Eine Methode zum quantitativen Nachweis von Antigenen bzw. Antikörpern stellt die von Mancini et al. entwickelte radiale Immundiffusion (RID) dar [106].

Im Gegensatz zur Ouchterlony-Doppelimmundiffusion wird bei der RID ein mit Antikörpern in der Gelphase äquilibriertes Agarosegel verwendet. Das Antigen wird wie bei der Ouchterlony-Doppelimmundiffusion in ausgestanzte Löcher aufgetragen. Das Prinzip der RID beruht darauf, dass die Antigenmoleküle radial in das Agarosegel hinein diffundieren und so lange im Gel gebundene Antikörper „sammeln“, bis die Reaktion durch den

vollständigen Verbrauch des Antigens beendet ist und sich somit ein einzelner stabiler Präzipitationsring gebildet hat. Die Quantifizierung des Antigens basiert auf der linearen Beziehung zwischen der Fläche, die vom Präzipitationsring eingeschlossen wird, und der aufgetragenen Antigenmenge. Durch Mitauftragen eines Antigen-Standards bekannter Konzentration (zur Kalibrierung) kann die Konzentration des zu bestimmenden Antigens ermittelt werden. Die Methode der radialen Immundiffusion erweist sich als besonders effektiv, wenn der tatsächliche Gehalt an einem Protein in Extrakten bestimmt werden soll, da mit den üblichen Proteinbestimmungsmethoden (siehe Abschnitt 2.10) nur der Gesamtproteingehalt ermittelt werden kann.

Zur Quantifizierung des MoFe-Proteins in gereinigten Nitrogenasepräparaten und Extrakten wurde eine RID, modifiziert nach Catty und Raykundalia [107], durchgeführt. Dazu wurde Agarose (1 % (w/v)) in Veronal-Puffer (50 mM, pH 8,6) bis zur Klärung erhitzt und anschließend mit Polyethylenglykol-6000 (3 % (w/v)) versetzt. Portionen von je 11,5 ml wurden in Reagenzgläser überführt, diese in einem auf 56 °C temperierten Wasserbad heruntergekühlt und eine geeignete Menge an Antikörpern (anti-Rc1<sup>Mo</sup>; 0,5 ml) zugefügt und vorsichtig durchmischt. Das Antikörper-enthaltende Gel (12 ml) wurde danach gleichmäßig auf gereinigte 7,5 x 9 cm-Glasplatten gegossen (0,18 ml Gel/cm<sup>2</sup>). Nach der Verfestigung des Gels wurden 20 Löcher (4 Reihen mit je 5 Löchern) ausgestanzt. Der Durchmesser der Löcher betrug 3 mm. Die Vorbereitung der Proben (Extrakte und gereinigtes MoFe-Protein) wurde wie in 2.12.1 beschrieben durchgeführt. Sowohl die Proben, als auch eine Verdünnungsreihe eines gereinigten MoFe-Proteins bekannter Konzentration (1,5 - 15 µg) wurden zur Kalibrierung in die ausgestanzten Löcher pipetiert (2 x 4,5 µl pro Loch) und für 48 h bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Da die Präzipitationsringe nach 48 h Inkubation in den meisten Fällen deutlich sichtbar waren, brauchte das Gel normalerweise nicht gefärbt zu werden und konnte somit direkt zur Quantifizierung herangezogen werden. Zur Ermittlung des Durchmessers der Präzipitationsringe wurde das Gel zur Erhöhung des Kontrasts auf eine schwarze Unterlage gelegt. Zur Bestimmung der MoFe-Proteinkonzentration in den Proben wurde zuerst eine Kalibriergerade aus der Verdünnungsreihe des MoFe-Protein-Standards erstellt. Hierzu wurde der Logarithmus der aufgetragenen MoFe-Proteinmenge (µg) gegen den Ringdurchmesser (mm) oder dessen Quadrat (mm<sup>2</sup>) aufgetragen, je nachdem welche Darstellungsform zu einer linearen Abhängigkeit von Ringdurchmesser und Antigenkonzentration führt. Eine detaillierte Beschreibung der unterschiedlichen Darstellungsformen zur Auswertung von RID-Gelen

würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Die verschiedenen Auswertungsmethoden wurden allerdings von Catty und Raykundalia ausführlich diskutiert [107]. Nach der Erstellung der Kalibriergeraden wurde der Ringdurchmesser der Proben ermittelt und die MoFe-Proteinkonzentration mithilfe dieser Geraden bestimmt.

Zur späteren Dokumentation wurde das Gel einerseits als feuchtes Gel auf schwarzem Hintergrund fotografiert oder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Dazu wurde das Gel zuerst für 24 h bei Raumtemperatur mit einer NaCl-Lösung (0,85 % (w/v)) und dann für 2 h mit Wasser behandelt. Anschließend wurde das Gel, wie unter 2.11.5 beschrieben, gefärbt und auf Gel-Fix für Agarose fixiert. Allerdings erwies sich die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue in einigen Fällen als nicht sehr kontrastreich, da die Entfärbung des Hintergrunds bei gleichzeitiger Erhaltung der Präzipitationsring-Färbung nur unzureichend gelang. Daher wurde die Coomassie-Färbung durch eine Silberfärbung ersetzt. Dazu wurde das Gel wie oben beschrieben mit NaCl-Lösung sowie Wasser gewaschen und anschließend einer Silber-Färbung, modifiziert nach einer Methode von Switzer et al. [108] und Oakley et al. [109], wie folgt unterzogen: das Gel wurde für 2 min mit einer 1%-igen (w/v) Farmer's Reducer-Lösung (Gemisch aus  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  und  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  im Verhältnis von 1,8 : 1) behandelt und danach solange mit Wasser gewaschen, bis das Gel vollständig entfärbt war. Anschließend wurde das Gel für 15 min in einer  $\text{AgNO}_3$ -Lösung (0,1 % (w/v)) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Wasser für 1 min wurde das Gel in einer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (2,5 % (w/v)) durch den Zusatz von ca. 200  $\mu\text{l}$  Formaldehyd (30 % (v/v)) entwickelt. Die Entwicklung des Gels wurde nach der Färbung durch die Zugabe von Essigsäure (10 % (v/v)) gestoppt und das Gel anschließend in Wasser gewaschen.

Die so mit Silber gefärbten Gele zeichneten sich durch besonders hohen Kontrast aus, was eine leichtere und exaktere Bestimmung der Ringdurchmesser ermöglichte. Durch die lange Behandlungsprozedur und das ständige Schütteln der Gele kam es in einigen Fällen zum Zerfall in größere Bruchstücke (meist an den Ecken). Daher erscheint die Färbung mit Silber zwar hervorragend zur Auswertung der Gele geeignet zu sein, jedoch ist sie eher ungeeignet zur sauberen Dokumentation der Gele.

### **2.12.3 Analytischer Immunoblot (Western Blot)**

Zur eindeutigen Identifizierung der Nitrogenaseuntereinheiten sowie eventueller, durch proteolytischen Abbau bedingter Nitrogenaseprotein-Fragmente wurden Western Immunoblots, modifiziert nach der von Towbin et al. beschriebenen Methode [110],

durchgeführt. Dazu wurden vor dem eigentlichen Blot die Proteine der zu untersuchenden Proben mittels SDS-Gelelektrophorese (Tris-Glycin- oder Tris-Tricin-Polyacrylamidgellelektrophorese) getrennt. Als Proteinmarker zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 8  $\mu$ l eines vorgefärbten SDS-PAGE-Standards folgender Zusammensetzung verwendet:

|                            | kalibriertes<br>Molekulargewicht [kDa] |
|----------------------------|--|
| Phosphorylase B            | 102,0                                  |
| Rinderserumalbumin         | 81,0                                   |
| Ovalbumin                  | 46,9                                   |
| Carboanhydrase             | 32,7                                   |
| Sojabohnentrypsininhibitor | 30,2                                   |
| Lysozym                    | 24,0                                   |

Die Markerproteine sind mit Farbstoffmolekülen kovalent verknüpft, sodass die Proteinbanden bereits während der Elektrophorese und des Proteintransfers sichtbar sind. Durch die kovalente Anbindung des Farbstoffs verändert sich das apparente Molekulargewicht der Proteine in der in der Tabelle angegebenen Weise.

*Durchführung des Proteintransfers:*

Der Immunoblot wurde als Druckblot durchgeführt. Der Proteintransfer erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel) mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m. Diese Membranen wurden zusammen mit einem 3-mm-Blot-Filterpapier (Sigma, Deisenhofen) vor Beendigung der Gelelektrophorese in Trenngelgröße geschnitten und für ca. 10 min in frisch vorbereitetem Transferpuffer folgender Zusammensetzung getränkt:

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Tris/HCl (pH 8,8) | 10 mM  |
| NaCl              | 2 mM   |
| EDTA              | 2 mM   |
| Dithiothreitol    | 0,1 mM |

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel dreimal für 10 min in Transferpuffer gewaschen und anschließend wie folgt weiterbehandelt:

Zwei bis drei Blätter des mit Transferpuffer getränkten Filterpapiers wurden auf eine ebene Glasplatte gelegt und ein Blatt Nitrocellulose auf das obere Filterpapier aufgelegt. Direkt auf die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend das Gel luftblasenfrei platziert und eine weitere Nitrocellulose-Membran (ebenfalls luftblasenfrei) auf das Gel gelegt. Danach wurden zwei bis drei Filterpapiere auf die oberste Nitrocellulose-Membran platziert und abschließend eine zweite Glasplatte aufgelegt. Das „Sandwich“ wurde in eine verschließbare Plastiktüte gegeben und mit einem Gewicht von ca. 2 kg beschwert. Der Proteintransfer erfolgte über einen Zeitraum von ca. 16 - 20 h bei Raumtemperatur.

#### *Immunologische Detektion der Proteine:*

Die Visualisierung der geblotteten Proteine (MoFe- bzw. Fe-Protein) erfolgte nach Inkubation mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-IgG bzw. anti-Rc2<sup>Fe</sup>-IgG durch enzymatisch induzierte Farbreaktion mithilfe eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers.

#### a) Absättigung:

Zur Absättigung der Nitrocellulose-Membran wurde die Membran nach erfolgtem Blot dreimal für 10 min in CMF-PBS-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h in Absättigungspuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in CMF-PBS-Puffer) bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Nach der Absättigung wurde die Nitrocellulose zweimal für 10 min in Waschpuffer unter langsamem Schütteln inkubiert.

Zusammensetzung des CMF-PBS-Puffers (calcium-magnesium-free phosphate-buffered-saline):

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 140 mM |
| KCl                              | 3 mM   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10 mM  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1,5 mM |

Zusammensetzung des Waschpuffers (modifiziert nach De Blas und Cherwinski [111]):

|                  |                   |
|------------------|-------------------|
| Magermilchpulver | 0,5 % (w/v)       |
| Tween 20         | 0,05 % (v/v)      |
|                  | in CMF-PBS-Puffer |

b) Inkubation mit primärem Antikörper:

Nach Entfernung des Waschpuffers wurde die Nitrocellulose-Membran mit dem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Antikörper (anti-Rc1<sup>Mo</sup>-IgG oder anti-Rc2<sup>Fe</sup>-IgG) inkubiert. Dazu wurde der Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:500) in Inkubationspuffer (0,5 % (w/v) Magermilchpulver in CMF-PBS-Puffer) angesetzt. Die Nitrocellulose-Membran wurde in diesem Puffer für ca. 2 h bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in Waschpuffer inkubiert.

c) Inkubation mit sekundärem Antikörper und Visualisierung:

Zur letztendlichen Detektion der an das Zielprotein gekoppelten primären Antikörper wurde die Nitrocellulose-Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG (sekundärer Antikörper) behandelt, der an den primären Antikörper (Kaninchen-IgG) bindet. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper mithilfe einer durch die gekoppelte Peroxidase katalysierten Farbreaktion (Entwicklung) sichtbar gemacht.

Die Nitrocellulose-Membran wurde mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:500 in Inkubationspuffer) für ca. 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und langsamem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran, ebenfalls unter Lichtausschluss, dreimal in Waschpuffer, einmal in CMF-PBS-Puffer und abschließend einmal in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,35) für je 10 min gewaschen. Die Visualisierung der geblotteten Proteine wurde, modifiziert nach Hawkes [112], mithilfe einer frisch bereiteten Entwickler-Lösung, bestehend aus 4-Chloro-1-naphthol (2,8 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,005 % (v/v)), Methanol (17 % (v/v)) in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,35) unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet. Die Entwicklung wurde solange durchgeführt, bis die erwünschten Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach 5 bis maximal 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von CMF-PBS-Puffer gestoppt. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend kurz mit CMF-PBS-Puffer gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die entwickelten Membranen wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

## 2.13 EPR-spektroskopische Untersuchungen

### 2.13.1 Probenvorbereitung

Zur EPR-spektroskopischen Untersuchung von ganzen Zellen, Extrakten und gereinigten Enzymlösungen wurden ca. 200  $\mu$ l Probe mit einer gasdichten Hamiltonspritze mit Spezialkanüle (Kanülenlänge: 260 mm, Modell 1702SN, Gage 22S; Hamilton, Schweiz) in mit Argon begaste EPR-Röhrchen (Quarzröhrchen, SQ 707; Spintec, Remshalden) gefüllt. Die Proben wurden in kaltem Isopentan (- 140 °C) schockgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bis zur EPR-Messung gelagert.

Zur Untersuchung von Extrakten wurde die Probe im EPR-Röhrchen vor dem Einfrieren mit EDTA (Endkonz.: 2 mM) versetzt, um das störende, intensive Signal im  $g \sim 2$ -Bereich, welches durch anwesende  $Mn^{2+}$ -Ionen hervorgerufen wird, zu unterdrücken.

Zur EPR-spektroskopischen Untersuchung der W-haltigen Nitrogenase unter „Turnover“-Bedingungen wurde das die Probe (200  $\mu$ l) enthaltende und in flüssigem Stickstoff gelagerte EPR-Röhrchen unter  $N_2$ -Begasung aufgetaut und mit den folgenden Substanzen in den angegebenen Endkonzentrationen versetzt: Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6),  $Na_2S_2O_4$  (6 mM),  $MgCl_2$  (12 mM) und Creatinkinase (200  $\mu$ g). Anschließend wurden ca. 25  $\mu$ l konzentriertes Fe-Protein der Mo-Nitrogenase ( $Rc2^{Mo}$ ) zugesetzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ATP (7,5 mM) und Creatinphosphat (15 mM) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 2 min unter  $N_2$ -Begasung wurde die Probe in kaltem Isopentan (- 140 °C) schockgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bis zur EPR-Messung gelagert.

### 2.13.2 EPR-spektroskopische Messungen

Die EPR-spektroskopischen Messungen wurden an einem ECS106-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe), das mit einem ESP1600-System zur Datenauswertung und einem Helium Kryostaten (ESR900, Oxford Instruments, Oxford (UK)) ausgestattet war, durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer Mikrowellenfrequenz von 9,45 GHz, einem rct (conversion time) von 40 msec und einem rtc (time scale) von 80 msec aufgenommen. Die Modulationsfrequenz betrug 100 kHz, die Modulationsamplitude 1 mT. Alle weiteren Messparameter, wie Temperatur, Mikrowellenleistung, Receiver Gain und Anzahl der Scans, sind in den Legenden der EPR-Spektren enthalten.

## 2.14 Redoxtitration

Zur Bestimmung der Redoxpotentiale der Redoxzentren im MoFe-Protein der konventionellen sowie der W-haltigen Nitrogenase wurden Redox titrationen, modifiziert nach einer Methode von Dutton [113], durchgeführt. Die Proben wurden im Anschluss an die Titration EPR-spektroskopisch auf die Potentialabhängigkeit der durch die Redoxzentren verursachten EPR-Signale näher untersucht.

### 2.14.1 Probenvorbereitung (Gelfiltration mit Sephadex G-25)

Sowohl zur Verringerung der NaCl- und Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Konzentration, als auch zur Umpufferung der zu untersuchenden gereinigten Proteinprobe wurde eine Gelfiltration mit Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Dazu wurde die zuvor auf ca. 1 ml in einer B15-Kammer konzentrierte Proteinprobe über einen Flow-Adapter auf die Geloberfläche der mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-haltigem Hepes-Puffer (50 mM, pH 7,4, + 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) äquilibrierten Sephadex G-25-Säule (Innendurchmesser: 1,5 cm, Gelvolumen: 8 ml) aufgetragen. Das Protein wurde anschließend bei 8 °C und einer Durchflussrate von 1 ml/min mit dem Äquilibrierpuffer von der Säule eluiert und in begasten Hungateröhrchen aufgefangen.

### 2.14.2 Mediatorenlösung

Die Redox titrationen wurden in Gegenwart von Redoxmediatoren durchgeführt. Diese haben die Aufgabe, einen schnellen und einfachen Austausch von Elektronen zwischen Elektrode und zu untersuchender Proteinprobe zu gewährleisten [113, 114]. Die Mediatoren wurden einzeln vor jeder Redox titration frisch, als 10 mM Stammlösung in Hepes-Puffer (50 mM, pH 7,4), angesetzt und in einer Endkonzentration von 40 µM verwendet. Die benutzten Redoxmediatoren sind in Tab. 2 aufgeführt.

### 2.14.3 Durchführung der Redox titration

Die Redox titration wurde bei Raumtemperatur in einer Redox titration skammer, wie sie von Dutton [113] beschrieben wurde, unter ständiger Argonbegasung durchgeführt. Die Messung des Potentials der ständig gerührten Enzym lösung erfolgte mittels einer Kombinations-redoxelektrode (PT 4800 M5, Mettler Toledo, Steinbach) und eines handelsüblichen Potentialmessgerätes. Die Elektrode wurde vor der Titration mit einer frisch gesättigten Chinhydrone lösung (pH 7, E<sub>m</sub> = 286 mV [114]) kalibriert.

**Tab. 2: Redoxmediatoren**

| Mediator   | $E_m$ (mV) <sup>1)</sup> | Referenzen |
|--|--------------------------|------------|
| Methylviologen   | - 440                    | [114]      |
| Benzylviologen   | - 311                    | [113]      |
| Safranin O   | - 280                    | [97]       |
| Anthrachinon-2-sulfonsäure, Na <sup>+</sup> , · H <sub>2</sub> O     | - 225                    | [115]      |
| Resorufin  | - 195                    | [97]       |
| 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon  | - 145                    | [115]      |
| Indigocarmin   | - 125                    | [115]      |
| Indigotrisulfonat  | - 70                     | [116]      |
| Methylenblau   | + 10                     | [116]      |
| Thionin  | + 60                     | [116]      |
| Phenanzinmethosulfat   | + 80                     | [113]      |
| 1,2-Naphthochinon  | + 143                    | [114]      |
| 2,6-Dichlorphenol-Indophenol, Na <sup>+</sup> , · 2 H <sub>2</sub> O | + 217                    | [115]      |

<sup>1)</sup> Die angegebenen Potentiale beziehen sich auf die Normalwasserstoffelektrode bei pH 7,0.

Die zur Redox titration vorbereitete Enzymprobe (Endvolumen ca. 1,5 - 3 ml) wurde mittels einer gasdichten Spritze in die begaste Redox titrationskammer, die bereits die Mediatoren enthielt, überführt. Die Erhöhung des Redoxpotentials wurde durch den Zusatz von K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-Lösungen (20, 70 oder 100 mM in Hepes (500 mM, pH7,4)) zum Enzym-Mediatoren-Gemisch erreicht. Zur Erniedrigung des Redoxpotentials, im Zuge einer Rücktitration, wurde eine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-Lösung (20, 70 oder 100 mM in Hepes (500 mM, pH 7,4)) verwendet. Zur genauen Einstellung der Redoxpotentiale wurden das Oxidationsmittel und das Reduktionsmittel in 0,5 µl-Schritten aus gasdichten 25 µl-Hamiltonspritzen, die in PB 600-1-Dosier Vorrichtungen gespannt waren, dem Enzym-Mediatoren-Gemisch zugefügt. Nach dem Einstellen eines stabilen Potentials wurden Proben zu je 170 µl mittels einer gasdichten 250 µl-Hamiltonspritze in argonbegaste EPR-Röhrchen überführt, in Isopentan (- 140 °C) schockgefroren und anschließend in flüssigem N<sub>2</sub> bis zur Messung aufbewahrt.

## 2.15 Metallanalysen

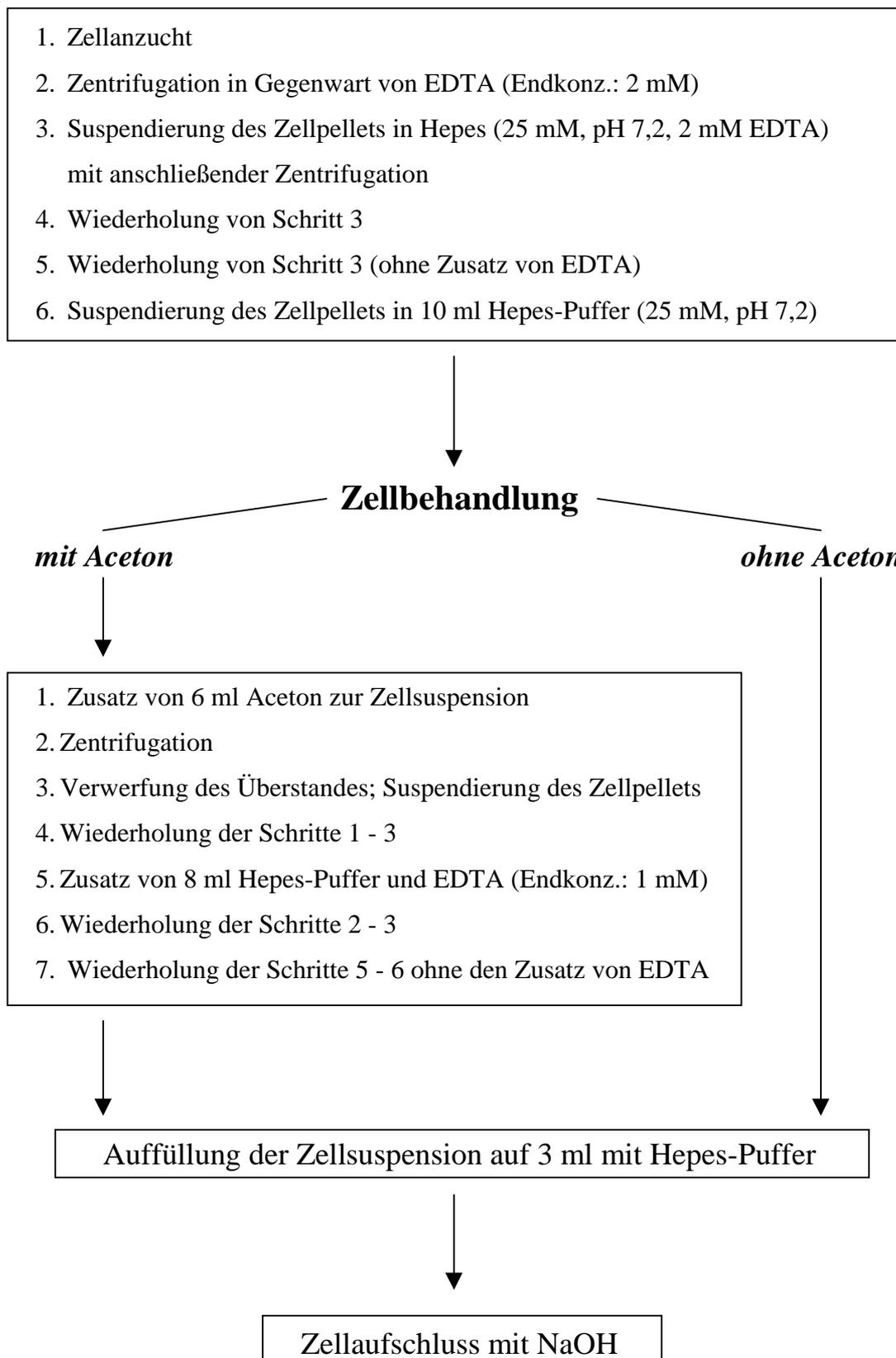
### 2.15.1 Metallaufnahme von *R. capsulatus*-Zellen

Zur Untersuchung der Bildung einer potentiellen Rhenium-haltigen Nitrogenase sollte die Frage geklärt werden, ob das dem Medium zugesetzte  $\text{KReO}_4$  von der Zelle überhaupt aufgenommen wird. Daher wurden Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante mit  $\text{KReO}_4$  angezogen und der Rheniumgehalt in der Zelle bestimmt. Zum Vergleich wurden auch Zellen mit  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  angezogen und auf ihren intrazellulären Molybdängehalt hin untersucht.

Das Protokoll zur Ermittlung der intrazellulären Metallgehalte in *Rhodobacter*-Zellen ist schematisch in Abb. 2 abgebildet. Es umfasst zwei verschiedene Vorgehensweisen (Zellbehandlung mit und ohne Aceton), die im Ergebnisteil miteinander verglichen werden sollen.

Zur Bestimmung der intrazellulären Mo- bzw. Re-Konzentrationen in Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante wurden zwei 300 ml-Kulturen mit  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  bzw.  $\text{KReO}_4$  (in geeigneter Konzentration; siehe Ergebnisteil) anaerob angezogen. Die Zellsuspensionen wurden anschließend, nach dem Zusatz von EDTA (Endkonz.: 2 mM), aerob bei 4 °C für 1 h mit 13.000 g zentrifugiert und das Zellpellet in 25 ml EDTA-enthaltendem Hepes-Puffer (25 mM, pH 7,2, 2 mM EDTA) suspendiert. Nach erfolgter Zentrifugation (4 °C, 30 min, 13.000 g) wurde das Pellet erneut mit EDTA-enthaltendem Hepes-Puffer gewaschen und wieder zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in Hepes-Puffer (25 mM, pH 7,2) ohne Zusatz von EDTA suspendiert, erneut zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 10 ml Hepes-Puffer aufgenommen. Während ein Teil der Zellsuspension (ca. 2 ml) zur Proteinbestimmung (Durchführung wie unter 2.10.1 beschrieben) verwendet wurde, wurden 8 ml für die weitere Zellbehandlung eingesetzt. Dazu wurden zweimal 2 ml (zwecks Doppelbestimmung) direkt auf 3 ml mit Hepes-Puffer aufgefüllt (Zellbehandlung ohne Aceton), während ebenfalls zweimal 2 ml einer Acetonbehandlung unterworfen wurden.

Diese Behandlung wurde wie folgt durchgeführt: Zuerst wurde die Zellsuspension mit 6 ml Aceton versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur mit 5.000 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Pellet erneut in ca. 7 ml Aceton suspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 8 ml EDTA-enthaltendem Hepes-Puffer (25 mM, pH 7,2, 1 mM EDTA) resuspendiert und wieder zentrifugiert. Der zuletzt erwähnte Wasch-Schritt wurde anschließend wiederholt. Im letzten Wasch-Vorgang wurde das Pellet in reinem Hepes-Puffer EDTA-frei gewaschen.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Protokolls zur Bestimmung intrazellulärer Metallgehalte.

Abschließend wurde nach erfolgter Zentrifugation das Zellpellet in Hepes-Puffer suspendiert und auf 3 ml mit demselben Puffer aufgefüllt. Zum Aufschluss der Zellen wurden die Zellsuspensionen (mit und ohne Acetonbehandlung) mit 150 µl NaOH (40 % (w/v), suprapur) versetzt, für 30 min gekocht und anschließend für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Probenvorbereitung (nächster Abschnitt) verwendet.

### 2.15.2 Probenvorbereitung für Metallanalysen

Enzymlösungen und aufgeschlossene Zellproben wurden vor der Bestimmung des Metallgehalts in Polystyrol-Röhrchen auf 9,8 ml mit dreifach destilliertem Wasser aufgefüllt, mit 100 µl Rhodium-Standard (1 mg/l) sowie 100 µl HNO<sub>3</sub> (65 %, suprapur) versetzt und bis zur Messung bei - 20 °C gelagert.

### 2.15.3 Metallanalysen durch ICP-MS

Je nach Fragestellung wurden die Molybdän-, Wolfram-, Eisen- und Rheniumgehalte der Nitrogenaseproteine bzw. aufgeschlossenen Zellproben mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), an einem Perkin-Elmer/Sciex ICP-QMS Elan 6000 (Ontario, Canada), bestimmt. Die Analysen wurden am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Knöchel durchgeführt.

Zur Kalibrierung des ICP-MS-Geräts wurden Standardlösungen (leer / 0,05 / 0,1 / 1 / 10 / 25 / 50 / 100 µg/l) der jeweils zu messenden Metalle in HNO<sub>3</sub> (2 %) angesetzt. Als interner Standard wurde den Proben RhCl<sub>3</sub> in einer Endkonzentration von 10 µg/l (bezogen auf den Rhodium-Anteil im RhCl<sub>3</sub>) zugesetzt. Die Kalibrierkurven wurden durch lineare Regression berechnet. Folgende Isotope wurden in Vierfach-Bestimmung gemessen: <sup>57</sup>Fe, <sup>92</sup>Mo, <sup>95</sup>Mo, <sup>96</sup>Mo, <sup>98</sup>Mo, <sup>182</sup>W, <sup>184</sup>W, <sup>186</sup>W, <sup>185</sup>Re, <sup>187</sup>Re.

## 2.16 Konstruktion einer *nifE*<sup>-</sup> *anfA*<sup>-</sup> -Doppelmutante

Für die Konstruktion einer *nifE*<sup>-</sup> *anfA*<sup>-</sup> -Doppelmutante wurde eine Spectinomycin-resistente *anfA*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* sowie bereits mit dem Hybridplasmid pKS28 I transformierte *E. coli*-S17-1-Zellen verwendet. Das Plasmid enthielt neben der *mob*-Site die Resistenzgene gegen die Antibiotika Tetracyclin und Ampicillin sowie ein mutiertes

*Rhodobacter-nifE*-Gen, in dessen *BclI*-Site ein für Kanamycinresistenz kodiertes Interposon inseriert war [93]. Bei der Verwendung des Plasmids pKS28 I kam es zu einer apolaren Mutation. Das bedeutet, dass nur das *nifE*-Gen inaktiviert war, die nachfolgenden Gene des Operons (*nifNX*, *orf4*, *fdxb*, *nifQ*) jedoch mit Hilfe des  $Km^r$ -Promotors exprimiert wurden.

Zur Konstruktion der Doppelmutanten wurde die DNA des Hybridplasmids von den transformierten *E. coli*-Zellen (S17-1) durch Konjugation in die *R. capsulatus anfA*<sup>-</sup>-Mutante transferiert. Tests auf die entsprechenden Antibiotikaresistenzen gaben Aufschluss, ob die Homogenisierung des Interposons oder die Integration des gesamten Plasmids erfolgt war.

### 2.16.1 Medien und Puffer

#### Spurenelementlösung

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| MnSO <sub>4</sub>                 | 9,5 mM  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>    | 45,3 mM |
| Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 0,2 mM  |
| ZnSO <sub>4</sub>                 | 0,8 mM  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>  | 3,3 mM  |

#### Mineralmedium (RCV-Medium)

|  |             |
|--|-------------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                    | 110 mM      |
| DL-Äpfelsäure  | 440 mM      |
| EDTA   | 0,8 mM      |
| MgSO <sub>4</sub>  | 12 mM       |
| CaCl <sub>2</sub>  | 7,5 mM      |
| FeSO <sub>4</sub>  | 0,6 mM      |
| Thiamin · HCl  | 40 μM       |
| Spurenelementlösung  | 0,1 % (v/v) |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Puffer (pH 6,8) | 140 mM      |

*Penassay Broth (PA)-Medium*

|                |          |
|----------------|----------|
| Penassay Broth | 17,5 g/l |
| Agar-Agar      | 10 g/l   |

*Pepton-Hefeextrakt (PY)-Medium*

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Hefeextrakt       | 0,5 g/l |
| Bactopepton       | 10 g/l  |
| MgCl <sub>2</sub> | 2 mM    |
| CaCl <sub>2</sub> | 2 mM    |
| FeSO <sub>4</sub> | 43 µM   |
| Agar-Agar         | 15 g/l  |

**2.16.2 Kreuzung und Identifizierung von Homogenisanten**

Für die Kreuzung wurden die transformierten *E. coli*-Zellen auf PA-Medium ausgestrichen und für 20 h bei 37 °C inkubiert. Die *R. capsulatus anfa*<sup>-</sup>-Mutante wurde in 5 ml RCV-Medium bis zur Stationärphase bei 30 °C angezogen. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen in 1 ml eisenfreiem PY-Medium (PY-Medium ohne FeSO<sub>4</sub> und Agar-Agar) suspendiert und jeweils 0,5 ml der *E. coli*-Zellsuspension und der *R. capsulatus*-Mutante zusammengegeben, abzentrifugiert und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Das Zellgemisch wurde zum Plasmidtransfer auf einen Cellulose-Acetat-Filter (Durchmesser: 20 mm, Porengröße: 0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) aufgetragen. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen in 1 ml stickstofffreiem RCV-Medium suspendiert.

Zur Überprüfung, ob ein Plasmidtransfer erfolgt war, wurde das Kreuzungsgemisch in verschiedenen Verdünnungsstufen auf PY-Medium (mit Streptomycin, Spectinomycin, Kanamycin) ausplattiert. Die Primärselektion nach der Kreuzung beruhte auf der durch den Vektor vermittelten Kanamycin-Resistenz. Die korrekte Homogenisierung wurde durch den Verlust der vektor-kodierten Tetracyclin-Resistenz getestet.

**2.17 Chemikalien**

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Gase von der Fa. Linde (Höllriegelskreuth) und die Chemikalien (Reinheitsgrad „pro analysi“) von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen.

Sämtliche SDS-PAGE-Markerproteine sowie Redoxmediatoren wurden von Sigma (Deisenhofen) geliefert. Außerdem lieferten:

Amicon (Witten):

Minicon B15-Kammern, Diaflo-Kammern und PM 30-Membranen

Bio-Rad (München):

Prestained SDS-PAGE-Standards (Low Range)

Boehringer (Mannheim):

D-Biotin, Kanamycin, ATP, Creatinkinase, Creatinphosphat, Desoxyribonuclease I, Leupeptin Hydrogensulfat, Pepstatin A

Fluka (Buchs, Schweiz):

Eisen(III)-citrat, Serin, Natriumdithionit, Hepes, Agar-Agar

Messer-Griesheim (Kassel):

Ethin, Helium (für EPR-Messungen)

Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden):

DEAE-Sephacel, Sephadex G-25, Sephacryl<sup>TM</sup> S-200 HR, Q-Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow

Serva (Heidelberg):

L-Milchsäure, Thiamin, Dithiothreitol, Lysozym, Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, TEMED, Ammoniumperoxodisulfat, SDS, EDTA, Coomassie Brilliant Blue

Sigma (Deisenhofen):

L-(+)-Milchsäure (SigmaUltra), Polymyxin B-Sulfat, Superoxiddismutase, Gentamicin, Spectinomycin, PMSF, Tris, Benzylviologen, 4-Chloro-1-naphthol, Tween 20, Tricin

Spintec (Remshalden):

EPR-Röhrchen SQ 707

### 3 Ergebnisse

#### **Teil A: Untersuchungen zur Bildung und zum Nachweis einer W-haltigen Nitrogenase in *R. capsulatus***

Da bislang noch keine natürlich vorkommende, d. h. auf einem eigenständigen genetischen System basierende W-Nitrogenase nachgewiesen werden konnte, sollten Zellen (von *R. capsulatus*) durch gezielte Einstellung von Nährlösungsbedingungen (Mo-Verarmung des Nährmediums, Anzucht der Zellen in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$ ) dazu gebracht werden, eine „artifizielle“ W-Nitrogenase zu erzeugen.

Die erfolgreiche Isolierung einer Wolfram-haltigen Nitrogenase aus *A. vinelandii* wurde erstmal von Hales und Case beschrieben [39]. Allerdings konnte in dieser Nitrogenase neben dem FeW-Cofaktor auch der FeMoco nachgewiesen werden. Die „Verunreinigung“ mit dem FeMoco lässt sich wahrscheinlich auf das grundlegende Problem zurückführen, dass es nicht möglich ist, eine ausreichende Mo-Verarmung in den *A. vinelandii*-Zellen zu erreichen. Die Schwierigkeit, Mo-defiziente Bedingungen zu gewährleisten liegt bei diesem Organismus sicherlich an der Anwesenheit eines hochspezifischen Mo-Speicherproteins, welches das Metall effizient zu speichern vermag und dieses bei Bedarf zur Synthese von Mo-haltigen Cofaktoren wieder zur Verfügung stellt [117].

Da in *R. capsulatus* die Anwesenheit eines Mo-Speicherproteins nicht nachgewiesen werden konnte, schien der Einsatz dieses Organismus besser für die Bildung und Isolierung einer „reinen“ W-haltigen Nitrogenase geeignet zu sein. Außerdem konnte die Expression der Eisen-Nitrogenase unter Mo-abgereicherten Bedingungen durch den Einsatz einer *anfA*-Mutante unterdrückt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt von *anfA*, wie NifA bei der konventionellen Nitrogenase, die Transkription der Strukturgene der alternativen Nitrogenase von *R. capsulatus* (*anfHDGK*) unter Mo-defizienten Bedingungen aktiviert [82, 91]. Eine Mutation im *anfA*-Gen bewirkte daher, dass die Zellen keine Fe-Nitrogenase bilden konnten.

Obwohl ein kompetitiver Hemmeffekt von  $\text{WO}_4^{2-}$  auf die Nitrogenaseaktivität bei *R. capsulatus* bereits nachgewiesen werden konnte [89], lagen bislang noch keine detaillierten Informationen zum Einfluss von  $\text{WO}_4^{2-}$  im Nährmedium auf die Nitrogenaseaktivität und zum

Effekt hoher  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$ ) auf das Wachstum der *anfA*<sup>-</sup>-Mutante vor. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von  $\text{WO}_4^{2-}$  (und  $\text{MoO}_4^{2-}$  als Referenz) im Nährmedium auf die *in-vivo*-Nitrogenaseaktivität ( $\text{C}_2\text{H}_2$ -Reduktion) sowie auf das Zellwachstum einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante näher untersucht.

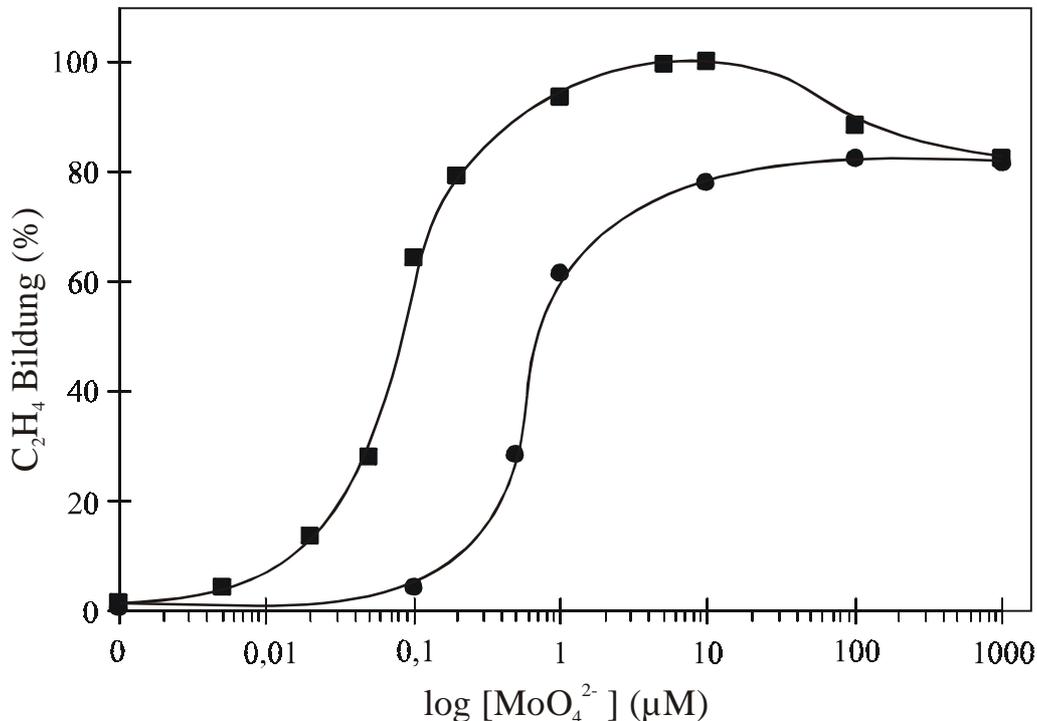
### 3.1 Einfluss der $\text{MoO}_4^{2-}$ - und $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium auf die *in-vivo*-Aktivität einer *anfA*<sup>-</sup> Mutante von *R. capsulatus*

Zur Ermittlung der Abhängigkeit der Nitrogenaseaktivität ( $\text{C}_2\text{H}_2$ -Reduktion) von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium wurden Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $\text{MoO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$  (bis 1 mM) in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) als Stickstoffquelle angezogen und die Zelldichte ( $E_{600}$ ), die Nitrogenaseaktivität, sowie der Proteingehalt der Zellen, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden ( $\sim 20$  h), bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Proteingehalt der Zellen unabhängig von der  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium war. Hieraus folgt, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  das Zellwachstum von *R. capsulatus* bis zu einer Konzentration von 1 mM nicht hemmt.

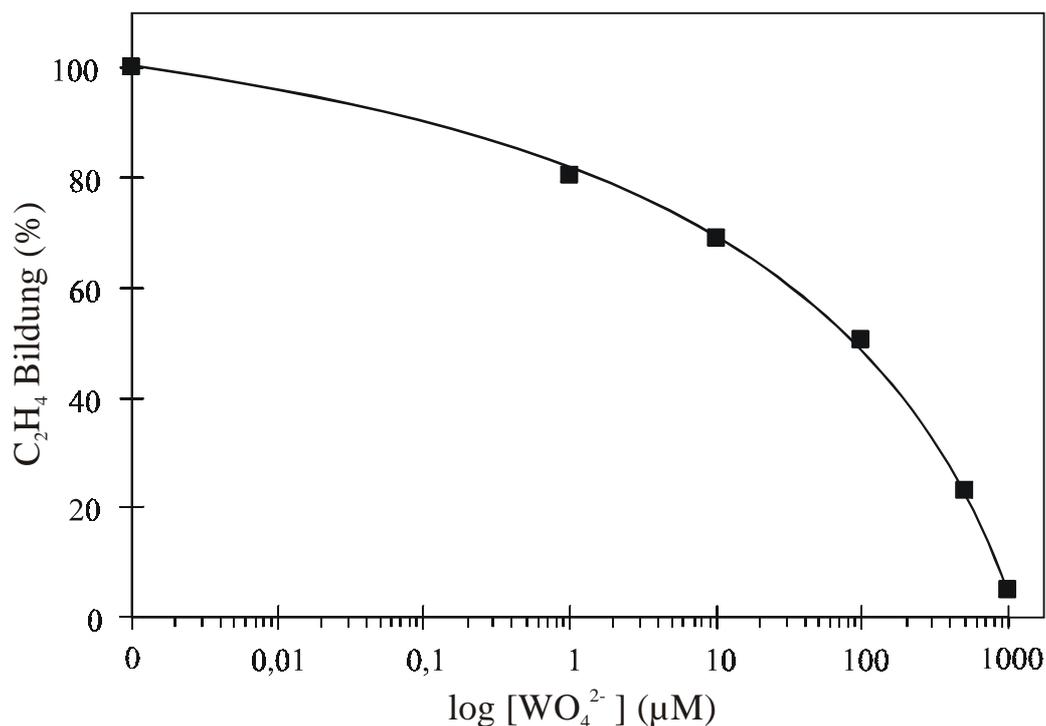
Wie in Abb. 3 dargestellt, stieg die Aktivität ( $\text{C}_2\text{H}_4$ -Produktion) durch Zusatz von  $\text{MoO}_4^{2-}$  zum Nährmedium stark an und erreichte ein Maximum zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ . Die Abhängigkeit der Aktivität von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration stimmte somit mit der des Wildtyps (B10S) überein, außer, dass im Bereich geringer  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen ( $< 0,1 \mu\text{M}$ ) bei der *anfA*<sup>-</sup>-Mutante keine Aktivität festzustellen war. Es konnte aber gezeigt werden, dass die für den Wildtyp ermittelte Aktivität bei sehr geringen  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen durch die Expression der Eisen-Nitrogenase bedingt war, die ja in der *anfA*<sup>-</sup>-Mutante nicht exprimiert wird. Der inhibierende Effekt des  $\text{WO}_4^{2-}$  im Nährmedium ließ sich auf zwei unterschiedliche Weisen feststellen. Wie in Abb. 3 dargestellt, wurde den Zellen pro Ansatz  $\text{WO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  zum Nährmedium zugesetzt und die  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration variiert. Die Entwicklung der Aktivität in Abhängigkeit von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration wurde mit den Ergebnissen eines analogen Versuchs ohne  $\text{WO}_4^{2-}$ -Zusatz verglichen. Der hemmende Einfluss des  $\text{WO}_4^{2-}$  auf die Aktivität ließ sich deutlich an der Verschiebung der Aktivitätskurve um den Konzentrations-Faktor 10 nach rechts erkennen. Dies bedeutet, dass die  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  (10  $\mu\text{M}$ )

um ca. das 10-fache erhöht werden musste, um die gleiche Aktivität wie in Abwesenheit des  $\text{WO}_4^{2-}$  zu erzielen.



**Abb. 3: Abhängigkeit der Nitrogenaseaktivität ( $\text{C}_2\text{H}_4$ -Bildungsrate) von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration in Abwesenheit und Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$ .** Die Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und unterschiedlichen  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentrationen kultiviert. Der Aktivitätstest wurde an Zellsuspensionen durchgeführt, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden ( $E_{600} \sim 1,8 - 2,0$ ). Der Proteingehalt der Zellen lag bei  $0,40 (\pm 0,02)$  mg Protein/ml Zellen. 100 % Aktivität entspricht einer  $\text{C}_2\text{H}_4$ -Produktion von 2500 nmol gebildetes  $\text{C}_2\text{H}_4$  pro ml Zellsuspension pro Stunde ( $\sim 105$  nmol/mg·min). ■, Anzucht in Abwesenheit von  $\text{WO}_4^{2-}$ ; ●, Anzucht in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  (10 µM).

Der inhibierende Effekt des  $\text{WO}_4^{2-}$  auf die Nitrogenaseaktivität wird auch in Abb. 4 verdeutlicht. Hier wurden die Zellen in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  (1 µM) kultiviert und die dem Nährmedium zugesetzte Menge  $\text{WO}_4^{2-}$  variiert. Wie aus der Abb. 4 ersichtlich ist, setzte eine erhebliche Hemmung der Aktivität erst ab einer  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration von 10 µM, also bei einem  $[\text{MoO}_4^{2-}] : [\text{WO}_4^{2-}]$ -Verhältnis von 1 : 10, ein. In Gegenwart eines 1000-fachen  $\text{WO}_4^{2-}$ -Überschusses im Nährmedium sank die Aktivität sogar auf unter 5 %.



**Abb. 4: Einfluss der WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium auf die C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Bildung von Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante.** Die Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante wurden in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Endkonz.: 1 μM), Serin (5 mM) und WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen, angezogen. Der Aktivitätstest wurde an Zellsuspensionen durchgeführt, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden ( $E_{600} \sim 1,8 - 2,0$ ). Der Proteingehalt der Zellen lag bei 0,39 ( $\pm 0,02$ ) mg Protein/ml Zellen. 100 % Aktivität entspricht einer C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Produktion von 2050 nmol gebildetes C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> pro ml Zellsuspension pro Stunde ( $\sim 90$  nmol/mg·min).

Um Anzuchtbedingungen anzuwenden, die zur Bildung einer W-haltigen Nitrogenase führen, war der Einsatz von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-abgereichertem Medium erforderlich, da davon auszugehen war, dass sonst vorzugsweise der FeMoco in das MoFe-Protein eingebaut wird. Bei Anzucht von *anfA*<sup>-</sup>-Zellen unter MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-abgereicherten Bedingungen konnte eine nur äußerst geringe „Restaktivität“ gemessen werden (Abb. 3), was darauf schließen lässt, dass kaum intaktes Holoprotein gebildet wurde. Die Frage, die sich im Hinblick auf die Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase an dieser Stelle zwangsläufig stellt, ist, ob das MoFe-Protein von *R. capsulatus* unter Mo-defizienten Anzuchtbedingungen überhaupt gebildet wird. Für *A. vinelandii* konnte gezeigt werden, dass MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> für die Expression der Nitrogenase benötigt wird [34, 37, 118], während bei *K. pneumoniae* das Enzym auch unter Mo-abgereicherten Bedingungen gebildet wird [119].

Die Beantwortung der Frage, ob die Expression des MoFe-Proteins  $\text{MoO}_4^{2-}$ -abhängig ist, war essentiell für die Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase. Für den Fall, dass das Apoprotein nicht gebildet wird, schien eine Bildung, geschweige denn die Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase nicht möglich zu sein, es sei denn, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  die Expression der Nitrogenase fördert. Da bislang noch keine gesicherten Erkenntnisse über eine eventuelle  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Nitrogenase-Expression bei *R. capsulatus* vorlagen, wurden umfangreiche Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden näher beschrieben.

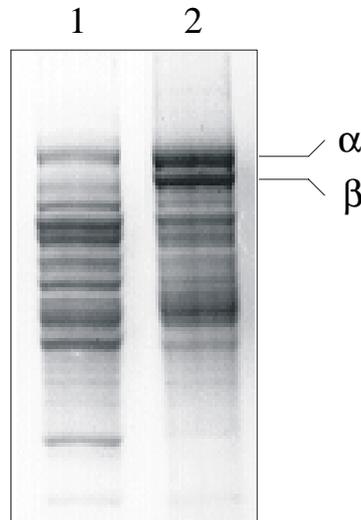
## 3.2 Einfluss von $\text{MoO}_4^{2-}$ und $\text{WO}_4^{2-}$ im Nährmedium auf die Expression der Nitrogenase

### 3.2.1 Einfluss von $\text{MoO}_4^{2-}$ im Nährmedium auf die Expression der Nitrogenase

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob das MoFe-Protein auch unter Mo-defizienten Anzuchtbedingungen gebildet wird, wurden Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* sowohl unter Mo-abgereicherten Bedingungen als auch in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  (1  $\mu\text{M}$ ) kultiviert. Nach lysozymatischem Aufschluss der Zellen und Abtrennung der Zelltrümmer durch Ultrazentrifugation wurden die löslichen Extraktproteine SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, konnte bei der Anzucht der Zellen in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit des MoFe-Proteins detektiert werden (Bahn 2).

Im Extrakt aus Zellen, die unter Mo-abgereicherten Bedingungen kultiviert worden waren, konnte im SDS-Gel jedoch nur eine schwache Proteinbande in etwa auf Höhe der  $\alpha$ -Untereinheit detektiert werden (Bahn 1). Eine Proteinbande in Höhe der  $\beta$ -Untereinheit konnte nicht beobachtet werden. Aus dem signifikanten Unterschied zwischen den beiden aufgetragenen Extrakten ergibt sich, dass die Menge an MoFe-Protein in unter  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Mangel angezogenen Zellen äußerst gering war. Die Frage, die sich unmittelbar stellt, ist, ob das in Höhe der  $\alpha$ -Untereinheit (Bahn 1) detektierte Protein tatsächlich die  $\alpha$ -Untereinheit (NifD) ist und somit die Dinitrogenase Komponente zwar gebildet, vor allem die  $\beta$ -Untereinheit aber aufgrund der eventuellen Instabilität des Apoproteins proteolytisch wieder abgebaut wurde. Das Fehlen der  $\beta$ -Bande, die schwach ausgeprägte  $\alpha$ -Bande, sowie

das Auftreten einiger weiterer Banden im Gel (im Vergleich zu Bahn 2) könnten darauf hinweisen.



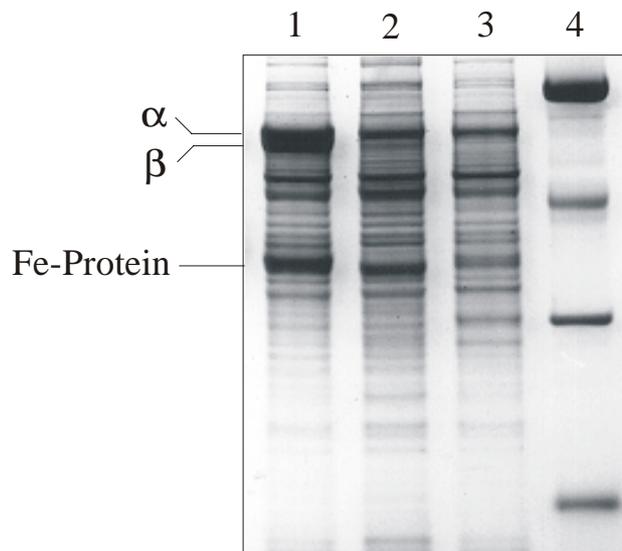
**Abb. 5: SDS-Polyacrylamidgel zur Darstellung des Einflusses von  $\text{MoO}_4^{2-}$  im Nährmedium auf die Bildung des MoFe-Proteins in einer  $\text{anfA}^-$ -Mutante.** Die  $\text{anfA}^-$ -Zellen wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 2,3 mM) angezogen und nach 20 h Wachstum geerntet. Nach lysozymatischem Aufschluss und Entfernung der Membranpartikel durch Ultrazentrifugation wurden die löslichen Extrakte einer SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese unterzogen. Bahn 1: 5  $\mu\text{g}$  Extraktprotein aus Zellen einer Mo-abgereicherten Kultur ( $\text{Mo}^-$ ); Bahn 2: 4  $\mu\text{g}$  Extraktprotein aus Zellen einer in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  (1  $\mu\text{M}$ ) gewachsenen Kultur.

Um der Frage nachzugehen, ob eventuell die Serinkonzentration im Nährmedium einen Einfluss auf die Bildung der Dinitrogenase besitzt, wurden Zellen einer  $\text{anfA}^-$ -Mutante unter  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Mangelbedingungen mit verschiedenen Serinkonzentrationen (1,5, 2,3 und 5 mM) angezogen. Anschließend wurden Extrakte aus den Zellen hergestellt und diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung des Gels zeigte jedoch, dass die Konzentration der Stickstoffquelle im Nährmedium keinen Einfluss auf die Bandierung im Gel hatte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Expression der Strukturgene der Nitrogenase sowie sämtlicher weiterer  $\text{nif}$ -Gene wird durch Ammoniumionen reprimiert [83]. Zur Klärung der Frage, ob das in Höhe der  $\alpha$ -Untereinheit detektierte Protein (Abb. 5, Bahn 1) tatsächlich NifD, oder zumindest ein  $\text{nif}$ -reguliertes Protein ist, wurden Zellen des Wildtyps in Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$  angezogen und aus diesen ein Extrakt zur gelelektrophoretischen Untersuchung hergestellt. Als Referenz

wurde der Wildtyp-Extrakt aus Zellen, die in Gegenwart von Serin kultiviert wurden, verwendet. Außerdem wurde auch ein Extrakt aus einer Cofaktorbiosynthese-defekten *nifB*<sup>-</sup>-Mutante hergestellt und ebenfalls gelelektrophoretisch untersucht.

Das SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 6) zeigt, dass auch im Extrakt der „NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Zellen“, wie im Fall des Extrakts Mo-verarmter *anfA*<sup>-</sup>-Zellen, eine Proteinbande in Höhe der α-Untereinheit auftrat (Bahn 2). Im Referenz-Extrakt (aus „Serin“-Zellen des Wildtyps) konnten erwartungsgemäß beide Untereinheiten der Dinitrogenase detektiert werden (Bahn 1). Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass es sich bei dem in Höhe der α-Untereinheit nachgewiesenen Protein – sowohl in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Zellen als auch in *anfA*<sup>-</sup>-Zellen, die unter Mo-defizienten Bedingungen kultivierten wurden – um kein *nif*-reguliertes Protein, und somit auch nicht um die α-Untereinheit der Nitrogenase, handelt.



**Abb. 6: SDS-gelelektrophoretische Identifizierung des Proteins in Höhe der α-Untereinheit als nicht *nif*-reguliertes Protein.** Bahn 1: Extrakt aus Wildtyp-Zellen nach Wachstum in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Endkonz.: 1 μM) und Serin (2,3 mM), 13 μg Extraktprotein; Bahn 2: Extrakt aus Wildtyp-Zellen nach Wachstum in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 μM) und NH<sub>4</sub>Cl (40 mM), 13 μg; Bahn 3: Extrakt aus Zellen einer *nifB*<sup>-</sup>-Mutante nach Wachstum in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (10 μM) und Serin (2,3 mM), 9,6 μg; Bahn 4: Marker, 8 μl.

Auch der Extrakt der *nifB*<sup>-</sup>-Mutante zeigte im SDS-Gel nur eine Proteinbande in Höhe der α-Untereinheit, aber keine β-Bande (Bahn 3). Da *nifB*<sup>-</sup>-Zellen keinen FeMoco und somit auch kein intaktes Holoprotein synthetisieren können, ergibt sich die Frage, ob ein intaktes

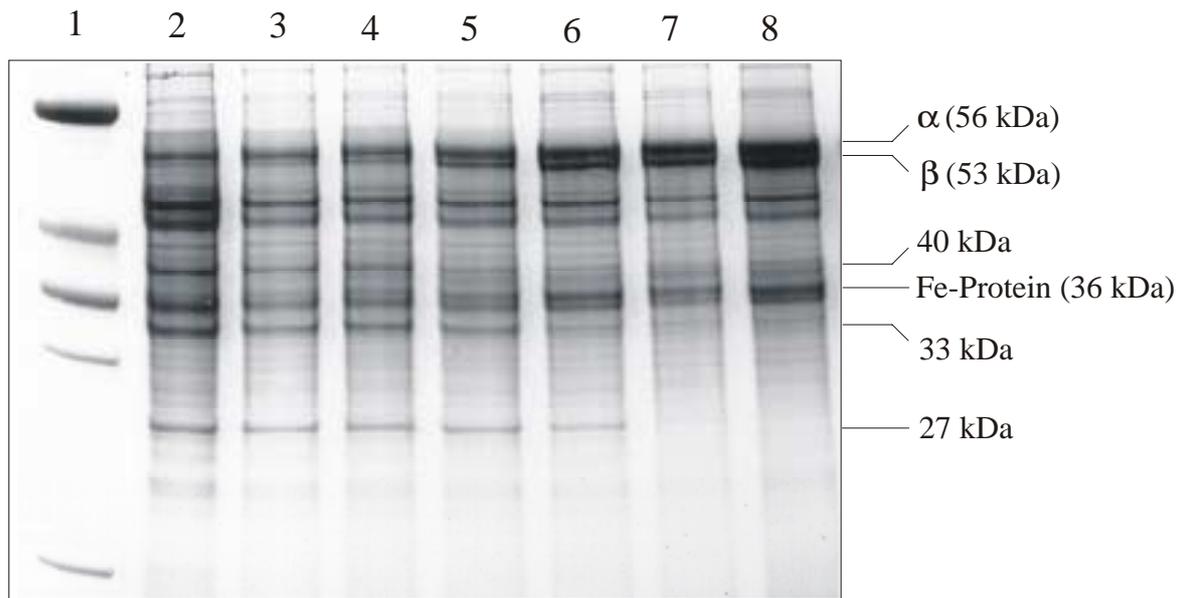
Apoprotein in *R. capsulatus* überhaupt erzeugt werden kann. Der erste konkrete Hinweis darauf, dass kein Apoprotein gebildet wird, ergab sich aus der Beobachtung, dass weder die Cofaktorbiosynthese-defekte *nifB*<sup>-</sup>-Mutante, noch die unter MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Mangelbedingungen kultivierte *anfA*<sup>-</sup>-Mutante signifikante Mengen an Nitrogenase bilden konnten.

Da im Extrakt einer unter Mo-defizienten Bedingungen angezogenen *anfA*<sup>-</sup>-Mutante gelelektrophoretisch kein Apoprotein der Dinitrogenase nachgewiesen werden konnte, dieses aber in Extrakten MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-angezogener Zellen vorhanden war, wurden detailliertere Untersuchungen zur MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationsabhängigkeit der Nitrogenase-Bildung durchgeführt.

Zur eingehenderen Charakterisierung des Einflusses der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium auf die Nitrogenase-Bildung wurden Extrakte aus Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante hergestellt, die mit unterschiedlichen MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen angezogen wurden (0, 10, 20, 50, 100, 200 und 1000 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Nach dem Zellaufschluss wurden die Extraktproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Mithilfe der Proteinbandierung im SDS-Gel (Abb. 7) konnte bestätigt werden, dass *anfA*<sup>-</sup>-Zellen nicht in der Lage waren, unter MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Mangelbedingungen ein intaktes Apoprotein zu bilden (Bahn 2). Da die Anwesenheit eines nicht-*nif*-Proteins in Höhe der  $\alpha$ -Untereinheit eine quantitative Analyse in diesem Gelbereich störte, wurde als Maß für die Synthese des MoFe-Proteins das Erscheinen der Proteinbande in Höhe der  $\beta$ -Untereinheit herangezogen. Mit steigender MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium bildete die  $\beta$ -Untereinheit der Dinitrogenase-Komponente eine zunehmend intensive Bande (Bahnen 3 - 8). Bereits ab einer MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration von 0,1  $\mu$ M liess sich mit bloßem Auge kein Unterschied mehr zwischen der Intensität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteinbande erkennen.

Außer der MoFe-Protein-Bildung schien auch die Expression des Fe-Proteins (NifH) durch eine zunehmende MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium gefördert zu werden. Das Fe-Protein konnte eindeutig auf den Bahnen 6 bis 8 (0,1 - 1  $\mu$ M MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) des SDS-Gels als 36 kDa-Protein identifiziert werden. In Extrakten aus *anfA*<sup>-</sup>-Zellen, die unter Mo-defizienten Bedingungen kultivierten wurden, konnte eine 36 kDa-Proteinbande jedoch nicht beobachtet werden. Die Tatsache, dass weder das MoFe- noch das Fe-Protein in Extrakten von unter Mo-defizienten Bedingungen angezogenen Zellen detektiert werden konnte, deutet darauf hin, dass MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> die Transkription des gesamten *nifHDK*-Operons in *R. capsulatus* reguliert.

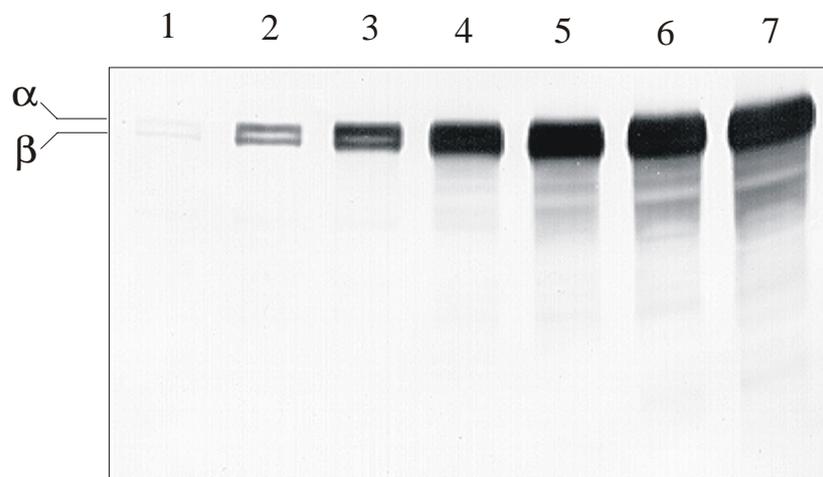


**Abb. 7: SDS-Polyacrylamidgel zur Darstellung der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationsabhängigkeit der Nitrogenase-Bildung in Zellen einer *anfA*-Mutante.** Die *anfA*-Zellen wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 2,3 mM) sowie verschiedenen  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen angezogen und nach 20 h Wachstum geerntet. Nach der Extraktpräparation wurden die löslichen Extraktproteine mittels SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese getrennt. Pro Extrakt wurden (außer für den Marker) zwischen 30 und 40  $\mu\text{g}$  Extraktprotein aufgetragen. Bahn 1: Marker (4  $\mu\text{l}$ ); Bahn 2: ohne  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Zusatz ( $\text{Mo}^-$ ); Bahn 3: 10 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Bahn 4: 20 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Bahn 5: 50 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Bahn 6: 100 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Bahn 7: 200 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Bahn 8: 1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ .

Zusätzlich zur Erhöhung der Syntheserate des MoFe- und des Fe-Proteins mit steigender  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium konnten in den Extrakten, die auf den Bahnen 2 bis 6 aufgetragen wurden, drei weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von 27, 33 und 40 kDa beobachtet werden. Bis zu einer  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration von 50 nM schien die Menge dieser Proteine nicht vom  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Gehalt im Nährmedium abzuhängen. Bei Zellen, die mit  $\text{MoO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  kultiviert wurden, verringerte sich die Intensität der Proteinbanden, während sie ab einer  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  kaum noch zu detektieren waren. Aufgrund der deutlichen  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Bildung dieser drei Proteine lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen um Proteine des „High-Affinity“-Molybdän-Transport-Systems (HAMT-System) handelt. Diese Annahme stützt sich u. a. auf die Beobachtung, dass die Expression des HAMT-Systems durch hohe  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen reprimiert wird [83]. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht

ausgeschlossen werden, dass es sich bei den drei Proteinen um Bruchstücke des eventuell proteolytisch abgebauten MoFe-Proteins handelte.

Um die Proteinbanden in Höhe der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bande eindeutig als die Untereinheiten des MoFe-Proteins identifizieren zu können, wurde ein Western Blot mit Antikörpern gegen das MoFe-Protein (anti-Rc1<sup>Mo</sup>) durchgeführt. Der Immunoblot sollte auch Aufschluss darüber bringen, ob es sich bei den 27-, 33- bzw. 40 kDa-Proteinen um Fragmente des MoFe-Proteins handelte. Nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung der Extraktproteine aus den mit verschiedenen MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen angezogenen Zellen, wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet, mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern behandelt, und die Antigen-Antikörper-Reaktion, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, nachgewiesen.



**Abb. 8: Western Blot zur Darstellung der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationsabhängigkeit der Nitrogenase-Bildung in Zellen einer *anfa*<sup>-</sup>-Mutante.** Die Zellanzucht sowie die Extraktpräparation wurden wie in der Legende von Abb. 7 beschrieben durchgeführt. Die Extraktproteine wurden nach dem Auftragen von ca. 6 bis 8 µg Extraktprotein pro Bahn mittels SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Als primärer Antikörper diente anti-Rc1<sup>Mo</sup> in der Verdünnung 1 : 500. Die Verteilung der verschiedenen Extrakte auf die Bahnen 1 - 7 entspricht der in Abb. 7 beschriebenen (Bahnen 2 - 8). Bahn 1: ohne MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Zusatz; Bahn 2: 10 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; Bahn 3: 20 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; Bahn 4: 50 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; Bahn 5: 100 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; Bahn 6: 200 nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; Bahn 7: 1 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

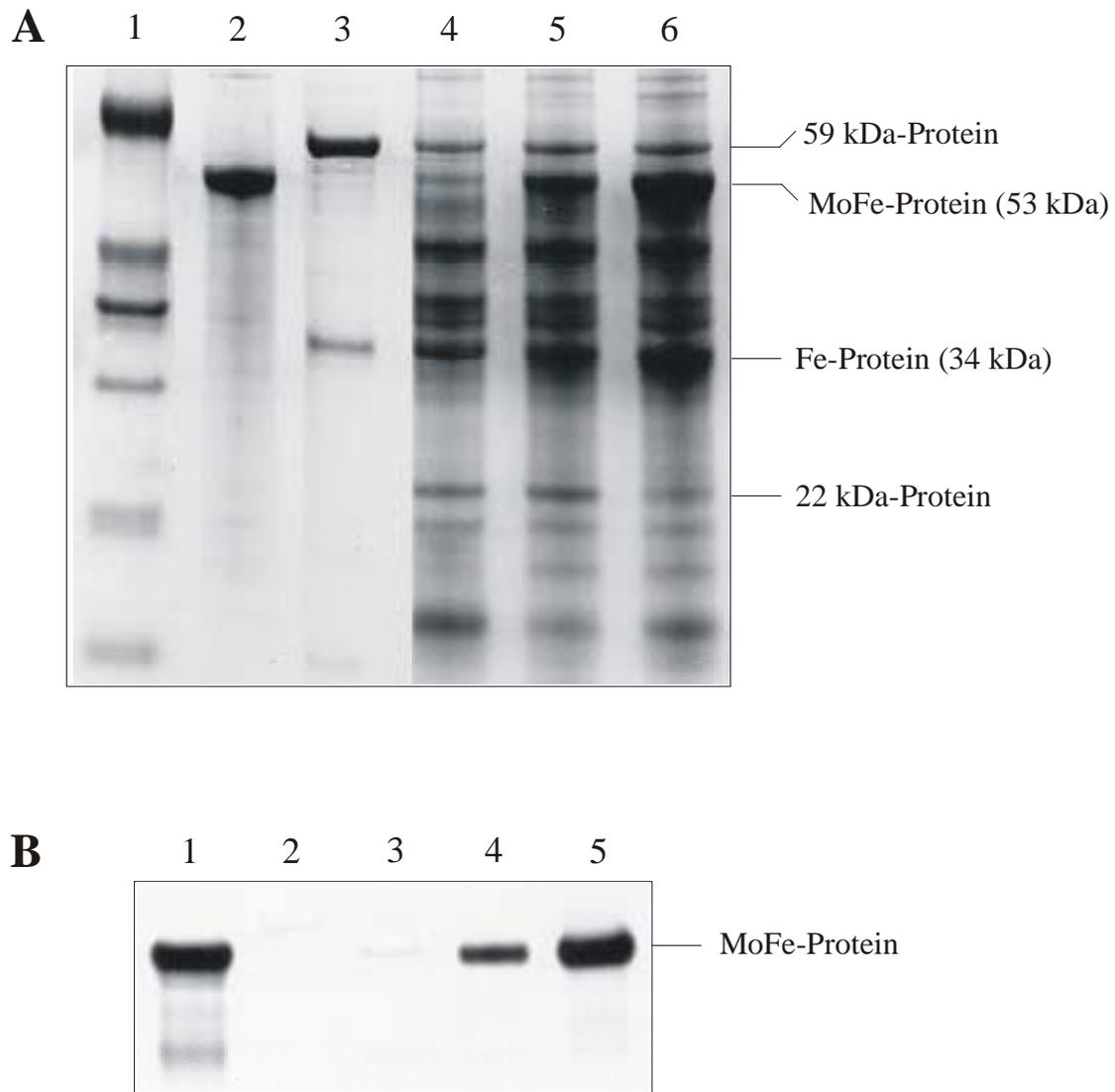
Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, korrelierte die Menge des gebildeten MoFe-Proteins eindeutig mit der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium. Außerdem waren die Intensitäten der  $\alpha$ - sowie der  $\beta$ -Banden annähernd gleich. Diese Beobachtung steht im Einklang damit, dass

es sich bei der Bande des 56 kDa-Proteins, das nach der Zellkultivierung unter Mo-abgereicherten Bedingungen nachweisbar ist, nicht um die  $\alpha$ -Untereinheit des MoFe-Proteins handelt. Weiterhin ist erwähnenswert, dass auf den Bahnen 1 bis 5 keine weiteren Banden, die auf eine Fragmentierung des MoFe-Proteins hinweisen könnten, immunologisch detektiert werden konnten. Daraus lässt sich folgern, dass es sich bei den 27-, 33- bzw. 40 kDa-Proteinen somit nicht um Dinitrogenase-Fragmente handelt. Der Frage, ob es sich bei den letztgenannten Proteinen tatsächlich um Proteine des HAMT-Systems handelt, soll in Abschnitt 3.3 nachgegangen werden.

Zusätzlich zur Tris-Glycin-Gelelektrophorese wurden die Extraktproteine mithilfe einer Tris-Tricin-Gelelektrophorese separiert. Bei der gelelektrophoretischen Trennung mit Tricin als Folgeion werden Proteine mit niedrigem Molekulargewicht besser voneinander getrennt [102]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Verwendung des Tris-Tricin-Gelsystems auf die Bandierung der Proteine in den Extrakten der mit 0, 50 bzw. 1000 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  angezogenen Zellen hat.

Wie anhand Abb. 9 A zu erkennen ist, unterschied sich die Bandierung der Proteine im Tris-Tricin-Gelsystem signifikant von der im Tris-Glycin-Gelsystem. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des MoFe-Proteins lagen in dem Tris-Tricin-Gelsystem nicht mehr voneinander getrennt vor, sondern bildeten eine gemeinsame Bande (Bahnen 2 und 4 - 6). Dies konnte auch durch einen Western Blot (Abb. 9 B) bestätigt werden. Während die  $\alpha$ -Untereinheit im Tris-Glycin-Gelsystem ein „apparentes“ Molekulargewicht von 56 kDa besaß, wurde mithilfe des Tris-Tricin-Gelsystems ein Molekulargewicht von 53 kDa ermittelt. Das apparente Molekulargewicht der  $\beta$ -Untereinheit schien sich dagegen nicht verändert zu haben.

Das Protein, welches im Tris-Glycin-Gelsystem eine mit der  $\alpha$ -Untereinheit identische Position hatte, aber als nicht-*nif*-Gen identifiziert wurde, erschien im Tris-Tricin-Gelsystem deutlich abgetrennt von den Untereinheiten des MoFe-Proteins. Der Beweis, dass es sich bei diesem „Fremdprotein“, für das ein apparentes Molekulargewicht von 59 kDa bestimmt wurde, tatsächlich um das nicht-*nif*-Protein handelte, ergab sich aus Folgendem: Im Zuge der gelchromatographischen Reinigung einer W-haltigen Nitrogenase mit Q-Sepharose (siehe Abschnitt 3.4) konnte in dem 350 mM NaCl-Säuleneluat mittels SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese das Protein in Höhe der  $\alpha$ -Untereinheit – vollkommen abgetrennt von dem MoFe-Protein und nur etwas mit dem Fe-Protein verunreinigt – nachgewiesen werden. Dieses Säuleneluat wurde auf das Tris-Tricin-Gel aufgetragen. In diesem Gelsystem erschien das nicht-*nif* Protein als 59 kDa-Protein (Bahn 3).



**Abb. 9: Tris-Tricin-Polyacrylamidgel (A) und Western Blot (B) zur Untersuchung der Bandierung des MoFe-Proteins.** Drei Extrakte von *anfA*<sup>-</sup>-Zellen (ohne MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Zusatz, 50 nM und 1 μM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), die bereits mithilfe der Tris-Glycin-Gelelektrophorese untersucht worden waren (siehe Abb. 7), wurden auf ein Tris-Tricin-Gel aufgetragen. Außerdem wurde die 350 mM NaCl Fraktion einer Q-Sepharose-Chromatographie, die im Rahmen einer Isolierung der W-haltigen Nitrogenase durchgeführt wurde, aufgetragen. Es wurden zwei Elektrophoresen durchgeführt. Während ein Gel gefärbt wurde, wurde das andere zur Durchführung des Immunoblots benutzt. Die SDS-Gelproben für den Western Blot wurden vor der Elektrophorese 1 : 5 verdünnt. *SDS-Gel*: Bahn 1: Marker (5 μl); Bahn 2: gereinigtes Wildtyp MoFe-Protein (8 μg); Bahn 3: 350 mM NaCl-Fraktion (~ 6 μg); Bahn 4: *anfA*<sup>-</sup> ohne MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Zusatz (17 μg); Bahn 5: *anfA*<sup>-</sup> 50nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (23 μg); Bahn 6: *anfA*<sup>-</sup> 1 μM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (23 μg). *Western Blot*: Bahn 1: gereinigtes Wildtyp MoFe-Protein; Bahn 2: 350 mM NaCl-Fraktion; Bahn 3: *anfA*<sup>-</sup> ohne MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Zusatz; Bahn 4: *anfA*<sup>-</sup> 50nM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; Bahn 5: *anfA*<sup>-</sup> 1 μM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

Wie bereits nach Durchführung des Immunoblots nach der Tris-Glycin-Gelelektrophorese vermutet werden konnte (Abb. 8), zeigte das 59 kDa-Protein keine immunologische Reaktion mit den anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern (Abb. 9 B). Damit wurde endgültig bestätigt, dass dieses Protein tatsächlich ein Fremdprotein ist, welches mit dem MoFe-Protein in keinem Zusammenhang steht. Außerdem konnte über die Verunreinigung des Säulenuats mit geringen Mengen an Fe-Protein diese Nitrogenase-Komponente in den Extrakten der *anfA*<sup>-</sup>-Mutante als 34 kDa-Protein identifiziert werden. Desweiteren wurde für das eventuell zum HAMT-System gehörende 27 kDa-Protein (Tris-Glycin-Gelsystem, Abb. 7) ein Molekulargewicht von 22 kDa bestimmt. Die beiden 33- bzw. 40 kDa-Proteine (siehe Abb. 7) konnten nicht im Tris-Tricin-Gelsystem beobachtet werden, da sie wahrscheinlich von anderen Proteinbanden verdeckt wurden.

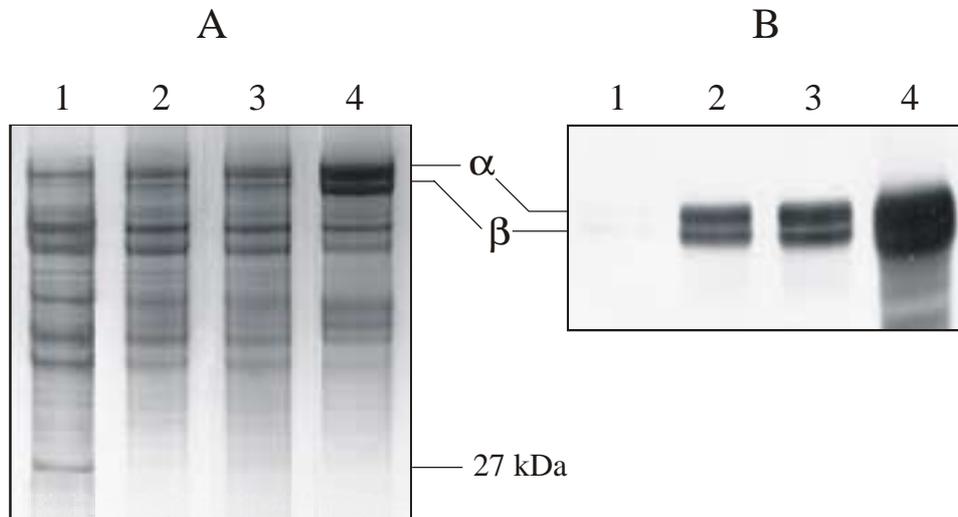
### 3.2.2 Einfluss von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im Nährmedium auf die Expression der Nitrogenase

Die Isolierung einer rein W-haltigen, d. h. Mo-freien Nitrogenase schien auf den ersten Blick – hinsichtlich der Tatsache, dass die Komponenten der Nitrogenase in Abwesenheit von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im Nährmedium nicht exprimiert werden – nicht möglich zu sein. Allerdings konnte noch nicht ausgeschlossen werden, dass die Anwesenheit von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im Nährmedium einen induzierenden Einfluss auf die Synthese der Nitrogenase ausübt. Aufgrund der chemischen Verwandtschaft von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> war ein solcher Effekt durchaus vorstellbar.

Um die Frage nach dem Einfluss von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> auf die Expression der Nitrogenase zu klären, wurden zwei Kulturen von *anfA*<sup>-</sup>-Zellen – eine Kultur unter Mo-abgereicherten Bedingungen in Gegenwart von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Endkonz.: 1 mM), die andere mit WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 mM) und gleichzeitig MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 μM) – angezogen. Nach der Zellanzucht und Extraktpräparation wurden die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 10 A, Bahnen 2 und 4). Zum Vergleich wurden außerdem die Extrakte aus *anfA*<sup>-</sup>-Zellen, die in Mo-abgereichertem Medium (Bahn 1) bzw. in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in einer Endkonzentration von 1 μM (Bahn 3) angezogen wurden, mit aufgetragen.

Zusätzlich zur Identifizierung des MoFe-Proteins mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die im Extrakt enthaltenen Proteine nach ihrer Separierung geblottet und vorhandenes MoFe-Protein mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern eindeutig nachgewiesen (Abb. 10 B). Anhand des SDS-Gels und vor allem anhand des Immunoblots ist ersichtlich, dass die mit WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> angezogenen Zellen eine signifikant größere Menge an Dinitrogenase (also an α- und β-Protein) bildeten

als Mo-abgereicherte Zellen. Die gebildete Menge an Dinitrogenase war jedoch wesentlich geringer als die Mengen, die in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  ( $1 \mu\text{M}$ ) synthetisiert wurden.



**Abb. 10: SDS-Polyacrylamidgel (A) und Western Blot (B): Analyse der  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentrationsabhängigkeit der Nitrogenase-Bildung in Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante.** Die *anfA*<sup>-</sup>-Zellen wurden in Mo-abgereichertem Medium in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 2,3 mM) unter Zusatz von  $\text{WO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{MoO}_4^{2-}$  in verschiedenen Konzentrationen angezogen und nach 20 h Wachstum geerntet. Nach der Extraktpräparation wurden die löslichen Extraktproteine mittels SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese getrennt. Es wurden zwei Elektrophoresen durchgeführt. Während ein Gel gefärbt wurde, wurde das andere zur Durchführung des Immunoblots benutzt. Die SDS-Gelproben für den Western Blot wurden vor der Elektrophorese 1 : 5 verdünnt. *SDS-Gel*: Bahn 1: ohne  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Zusatz (30  $\mu\text{g}$  Extraktprotein); Bahn 2: 1 mM  $\text{WO}_4^{2-}$  (26  $\mu\text{g}$ ); Bahn 3: 1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  und 1 mM  $\text{WO}_4^{2-}$  (28  $\mu\text{g}$ ); Bahn 4: 1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  (40  $\mu\text{g}$ ). *Western Blot*: Bahnen analog zum SDS-Gel.

Interessanterweise schien es keinen großen Unterschied in der gebildeten Dinitrogenase-Menge zu geben, egal ob die mit  $\text{WO}_4^{2-}$  angezogenen Zellen auch  $\text{MoO}_4^{2-}$  enthielten oder nicht. Zumindest im Konzentrationsbereich bis 1  $\mu\text{M}$  schien  $\text{MoO}_4^{2-}$  (bei gleichzeitiger Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  (1 mM)) die Expression der Nitrogenase nicht zu fördern. Dies erscheint allerdings im Hinblick auf den 1000-fachen Überschuss an  $\text{WO}_4^{2-}$  nicht ungewöhnlich.

Um auszuschließen, dass die Expression der Nitrogenase nicht auf eventuell vorhandene Spuren von  $\text{MoO}_4^{2-}$ , die sich im  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  befinden, zurückzuführen ist, wurde der Mo-Gehalt sämtlicher  $\text{WO}_4^{2-}$ -Stammlösungen mittels ICP-MS bestimmt. Die so analysierte  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration in einer 1 mM  $\text{WO}_4^{2-}$ -Lösung betrug ca. 5 nM. Diese geringe Verunreinigung

des  $\text{WO}_4^{2-}$  mit  $\text{MoO}_4^{2-}$  kann die erhöhte Expression der Nitrogenase nicht erklären. In Extrakten einer zusätzlichen Kontrollkultur die  $\text{MoO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von nur 5 nM im Nährmedium enthielt, konnten keine signifikanten Mengen an Nitrogenase detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei genauerer Betrachtung der Bandierung im SDS-Gel (Abb. 10 A) fällt auf, dass das 27 kDa-Protein nicht in „ $\text{WO}_4^{2-}$ -Zellen“ gebildet wurde. Da dieses Protein auch nicht in Zellen synthetisiert wurde, die in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von mindestens 0,2  $\mu\text{M}$  kultiviert wurden, weist dies darauf hin, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  die regulatorische Funktion des  $\text{MoO}_4^{2-}$  bei der Bildung dieses Proteins partiell ersetzen kann.

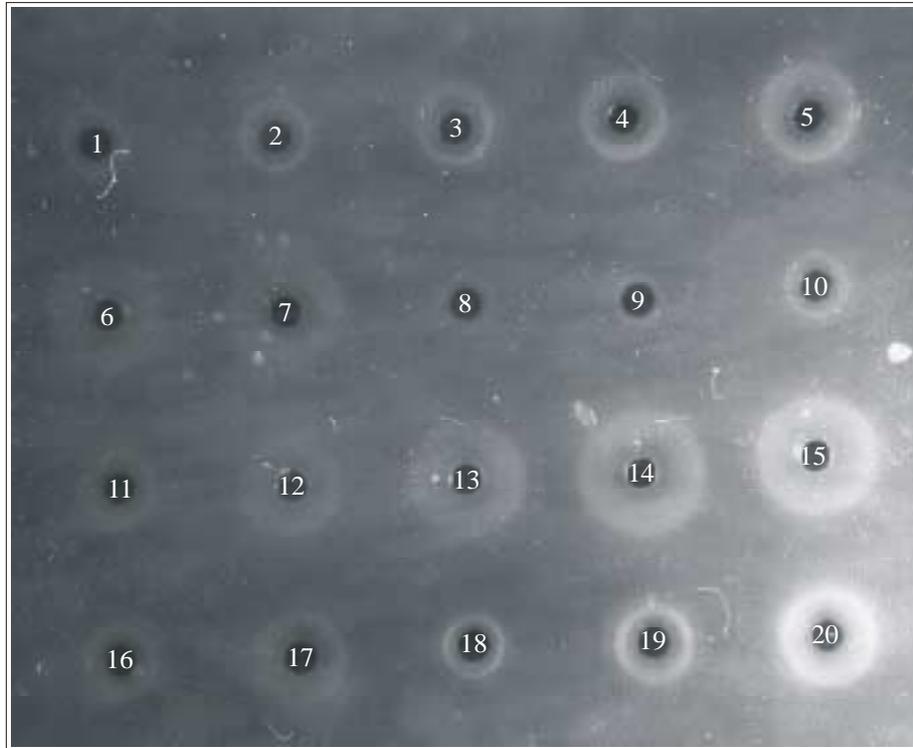
Die Tatsache, dass die Nitrogenase in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  in wesentlich geringeren Mengen gebildet wird als unter optimalen Anzuchtbedingungen (mit  $\text{MoO}_4^{2-}$ ), ist ein Hinweis darauf, dass die Expression der Nitrogenase wahrscheinlich nicht direkt durch Molybdat, sondern eher über eine andere Molybdän-haltige Verbindung, die sich von der homologen W-haltigen Verbindung unterscheidet, reguliert wird.

### 3.2.3 Quantifizierung des gebildeten MoFe-Proteins durch radiale Immundiffusion

Die Quantifizierung des MoFe-Proteins, das in den mit unterschiedlichen  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentrationen angezogenen *anfA*<sup>-</sup>-Zellen gebildet worden ist, wurde mithilfe der radialen Immundiffusion durchgeführt.

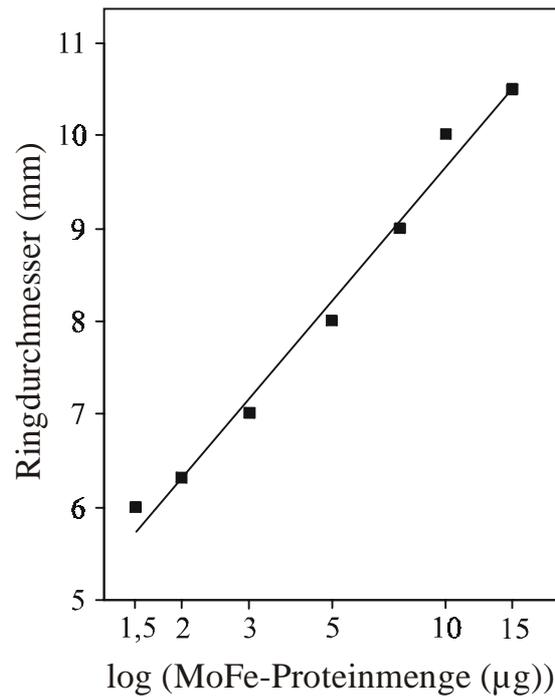
Dazu wurden die Extrakte, die auch für die gelelektrophoretischen Untersuchungen benutzt wurden, nach der Probenvorbereitung in die Löcher eines mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern beladenen Agarosegels pipettiert. Als Antigenstandard diente ein aus dem Wildtyp isoliertes und gereinigtes MoFe-Protein bekannter Konzentration. Abb. 11 zeigt das ungefärbte Agarosegel nach einer Diffusionszeit von 48 h. Zur Kalibrierung wurden die Durchmesser der Präzipitationsringe der aufgetragenen Verdünnungsreihe des Antigenstandards gegen die eingesetzte MoFe-Proteinmenge ( $\mu\text{g}$ ) aufgetragen (Abb. 12). Mithilfe der Kalibriergeraden konnte anschließend die Konzentration der zu bestimmenden Proben aus deren Ringdurchmesser ermittelt werden. Zusätzlich zur Auswertung des ungefärbten Gels wurde dieses mit  $\text{AgNO}_3$  gefärbt und anschließend die Durchmesser der Präzipitationsringe erneut bestimmt. Eine Auswahl von Präzipitationsringen nach der Färbung ist in Abb. 13 dargestellt. Im Vergleich zum ungefärbten Gel konnte der Kontrast der Ringe gegenüber dem Hintergrund deutlich erhöht werden, wodurch sich die Vermessung der Durchmesser

vereinfachte. Die Durchmesser der Präzipitationsringe unterschieden sich nicht signifikant von denen, die mit dem ungefärbten Gel bestimmt wurden.

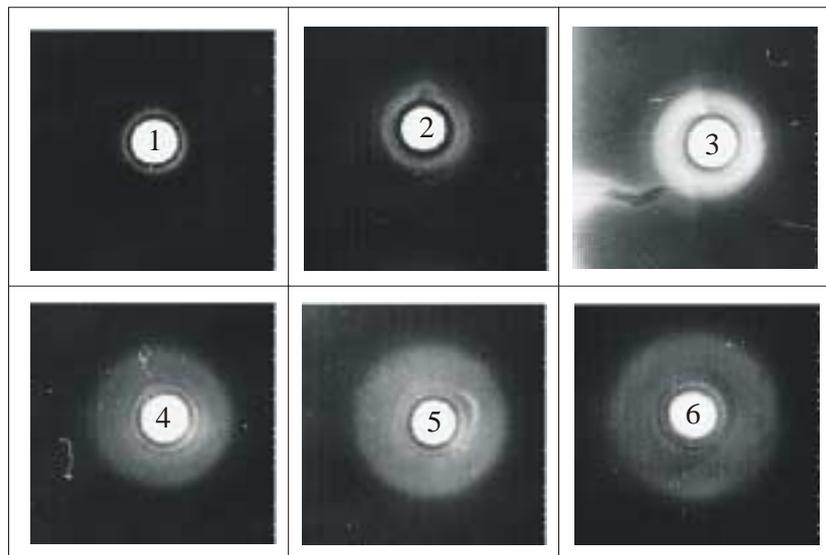


**Abb. 11: Ungefärbtes RID-Gel zur Quantifizierung des MoFe-Proteingehalts in Extrakten einer mit unterschiedlichen  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentrationen kultivierten *anfA*-Mutante.** Die RID wurde wie im Abschnitt 2.12.2 beschrieben durchgeführt. Außer den Proben wurde zur Kalibrierung eine Verdünnungsreihe eines gereinigten MoFe-Protein-Standards (isoliert aus dem Wildtyp) bekannter Konzentration aufgetragen. Das Agarosegel wurde auf schwarzem Hintergrund fotografiert und die Durchmesser der Präzipitationsringe bestimmt. Löcher 1 bis 7: MoFe-Protein-Standard (1,5 / 2 / 3 / 5 / 7,5 / 10 / 15  $\mu\text{g}$ ); Loch 8: Extrakt aus B10S mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (40 mM) angezogen (46  $\mu\text{g}$ ); Loch 9: *anfA* ohne  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Zusatz (26  $\mu\text{g}$ ); Loch 10: *anfA* 10 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (25  $\mu\text{g}$ ); Loch 11: *anfA* 20 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (36  $\mu\text{g}$ ); Loch 12: *anfA* 50 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (51  $\mu\text{g}$ ); Loch 13: *anfA* 100 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (66  $\mu\text{g}$ ); Loch 14: *anfA* 200 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  (55  $\mu\text{g}$ ); Loch 15: *anfA* 1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  (51  $\mu\text{g}$ ); Loch 16: *anfA* ohne  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Zusatz, mit 1 mM  $\text{WO}_4^{2-}$  (30  $\mu\text{g}$ ); Loch 17: *anfA* 1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  und 1 mM  $\text{WO}_4^{2-}$  (42  $\mu\text{g}$ ); Löcher 18 bis 20: MoFe-Protein-Standard (1,5 / 3 / 15  $\mu\text{g}$ ).

Der prozentuale Anteil des MoFe-Proteingehalts bezogen auf den Gesamtproteingehalt ist in Tab. 3 dargestellt. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, stieg die Menge an gebildetem MoFe-Protein mit zunehmender  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration (0 - 0,2  $\mu\text{M}$ ) im Nährmedium drastisch an. Zwischen 0,2  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  konnte keine signifikante Erhöhung des MoFe-Proteinanteils mehr detektiert werden.



**Abb. 12: Kalibrierung der RID mit gereinigtem MoFe-Protein.** Zur Kalibrierung der RID wurde eine Verdünnungsreihe eines MoFe-Protein-Standards bekannter Konzentration auf das Agarosegel aufgetragen und die ermittelten Durchmesser der Präzipitationsringe gegen den Logarithmus der MoFe-Proteinmenge ( $\mu\text{g}$ ) aufgetragen. Die Kalibriergerade wurde durch lineare Regression ermittelt.



**Abb. 13: Ausgewählte Präzipitationsringe des mit  $\text{AgNO}_3$  gefärbten Agarosegels.** Nach durchgeführter RID wurde das in Abb. 11 dargestellte Gel wie in Abschnitt 2.12.2 beschrieben einer Silberfärbung unterzogen. Loch 1: *anfA*<sup>-</sup> ohne  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Zusatz; Loch 2: *anfA*<sup>-</sup> 10 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Loch 3: *anfA*<sup>-</sup> 20 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Loch 4: *anfA*<sup>-</sup> 50 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Loch 5: *anfA*<sup>-</sup> 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ ; Loch 6: *anfA*<sup>-</sup> 1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ .

Außerdem konnte bestätigt werden, dass Zellen, die unter Mo-defizienten Bedingungen in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  (Endkonz.: 1 mM) angezogen wurden, Nitrogenase in einer Menge produzierten, die mit der MoFe-Proteinbildung in einer mit 20 bis 50 nM  $\text{MoO}_4^{2-}$  kultivierten *anfA*<sup>-</sup>-Mutante vergleichbar ist. Anders ausgedrückt: Gemessen am Dinitrogenase-Gehalt nach Wachstum unter optimalen Expressionsbedingungen ( $> 0,2 \mu\text{M MoO}_4^{2-}$ ), werden in Gegenwart eines hohen Überschusses an  $\text{WO}_4^{2-}$  (Mo-verarmt, 1 mM  $\text{WO}_4^{2-}$ ) ca. 25 % des Nitrogenaseenzym gebildet.

**Tab. 3: Quantifizierung des MoFe-Proteingehalts in Extrakten einer mit unterschiedlichen  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentrationen kultivierten *anfA*<sup>-</sup>-Mutante.** Zur Bestimmung des prozentualen Anteils an MoFe-Protein- zum Gesamtprotein-Gehalt der löslichen Extrakte wurden – nach durchgeführter RID – die Durchmesser der Präzipitationsringe bestimmt. Die aufgetragene MoFe-Proteinmenge wurde anschließend mithilfe der Kalibriergeraden (siehe Abb. 12) ermittelt und mit dem Gesamtprotein-Gehalt der Extrakte, der mit der Biuret-Methode bestimmt wurde, ins Verhältnis gesetzt.

| Anzucht in Gegenwart von |                         | MoFe-Proteingehalt / Gesamtproteingehalt (%) |
|--------------------------|-------------------------|--|
| $\text{MoO}_4^{2-}$ (nM) | $\text{WO}_4^{2-}$ (mM) |  |
| –                        | –                       | 2,5  |
| 10                       | –                       | 5  |
| 20                       | –                       | 8  |
| 50                       | –                       | 14   |
| 100                      | –                       | 21   |
| 200                      | –                       | 39   |
| 1000                     | –                       | 38   |
| –                        | 1                       | 10   |
| 1000                     | 1                       | 14   |

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die durch das  $\text{WO}_4^{2-}$  eingetragene  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration nur ca. 5 nM beträgt, ergibt sich, dass tatsächlich auch  $\text{WO}_4^{2-}$  die Expression des MoFe-Proteins hervorrufen kann. Auch wenn der Einfluss des  $\text{WO}_4^{2-}$  eher gering ist, erschien die Isolierung einer reinen W-haltigen Nitrogenase nicht mehr unmöglich. Auf erste

Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung einer W-haltigen Nitrogenase wird in Abschnitt 3.4 eingegangen.

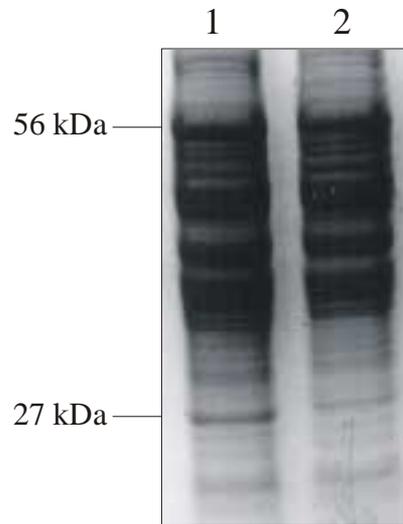
### 3.3 Identifizierung des 27 kDa-Proteins als Protein des „High-Affinity“-Molybdän-Transport (HAMT)-Systems

Das HAMT-System stellt ein hochspezifisches Transportsystem dar, welches Molybdän bei niedriger extrazellulärer  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration effizient in die Zelle transportiert [81]. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene des HAMT-Systems (*modABCD*) zusammen mit *mopA* – einem Gen, welches das Molybdopterin-bindende MopA-Protein kodiert – eine Transkriptionseinheit (Operon) bilden und dass deren Expression durch  $\text{MoO}_4^{2-}$  reprimiert wird [81, 83]. Bei hohen  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen im Nährmedium, bei denen das HAMT-System reprimiert wird, wird das Oxoanion wahrscheinlich mithilfe eines sogenannten „Low-Affinity“-Molybdän-Transport-Systems (LAMT-System) in die Zelle befördert [81]. Da die Expression des 27 kDa-Proteins durch höhere  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen ( $> 0,2 \mu\text{M}$ ) reprimiert wurde (vgl. Abb. 7), schien es nahe zu liegen, dass es sich bei diesem um ein Protein des HAMT-Systems oder um MopA handelt.

Zur eindeutigen Identifizierung des 27 kDa-Proteins wurde ein Extrakt aus Zellen einer apolaren sowie einer polaren *anfA*  $\Delta$ *mopAB* -Doppelmutante gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Bandierung der Proteine untersucht (Abb. 14). Während bei der apolaren Mutante nur das *anfA*- und die *mopAB*-Gene nicht exprimiert werden können, werden bei der polaren Mutante zusätzlich die Proteine des HAMT-Systems nicht gebildet. Wie aus Abb. 14 ersichtlich ist, konnte eine 27 kDa-Proteinbande nur im Extrakt der apolaren Mutante (Bahn 1) nachgewiesen werden.

Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass es sich bei dem 27 kDa-Protein um ein Mod-Protein handelt. Da ModB ein integrales Membranprotein ist und dieses durch Ultrazentrifugation des Rohextraktes vor der Elektrophorese abgetrennt wurde, schied dieses Protein als Kandidat für das 27 kDa-Protein aus. ModC – ein 38,5 kDa-Protein – schied wegen seines zu hohen Molekulargewichts ebenfalls aus. ModA und ModD besitzen eine – basierend auf den Gensequenzen – berechnete molare Massen von etwa 24,0 bzw. 26,8 kDa [81]. Eine eindeutige Aussage, ob es sich bei dem 27 kDa-Protein um das periplasmatische ModA oder um ModD handelt, konnte aufgrund des geringen Molekulargewichtunterschieds

nicht getroffen werden, zumal die Genauigkeit der auf der Basis der SDS-Gele berechneten Molekulargewichte nicht ausreichte (vergleiche abweichendes Molekulargewicht, welches mit dem Tris-Tricin-Gelsystem bestimmt wurde, Abb. 9).



**Abb. 14: Identifizierung des 27 kDa-Proteins als Mod-Protein durch SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese.** Die Zellen der apolaren bzw. polaren *anfA*<sup>-</sup>  $\Delta$ *mopAB*-Mutante wurden in Mo-abgereichertem Medium in Gegenwart von Serin (5 mM) angezogen und nach 20 h Wachstum geerntet. Nach der Extraktpräparation wurden die löslichen Extrakte einer SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese unterzogen. Bahn 1: *anfA*<sup>-</sup>  $\Delta$ *mopAB* (60  $\mu$ g Extraktprotein); Bahn 2: *anfA*<sup>-</sup>  $\Delta$ *mopAB*  $\Delta$ *modABCD* (55  $\mu$ g).

Die im Tris-Glycin-Gel detektierten 33- bzw. 40 kDa-Proteine, deren Expression ebenfalls durch  $\text{MoO}_4^{2-}$  reguliert wurde (vgl. Abb. 7), konnten auf dem in Abb. 14 dargestellten Gel aufgrund der hohen aufgetragenen Proteinkonzentration nicht eindeutig identifiziert werden. Das Auftragen einer großen Menge Extraktprotein war allerdings notwendig, um die relativ schwache 27 kDa-Proteinbande im Extrakt der apolaren Mutante sichtbar zu machen.

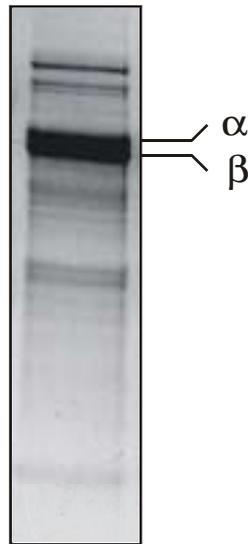
### 3.4 Präparation und Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase

Zur Isolierung einer potentiellen W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* wurden Zellen einer *anfA*-Mutante in sechs Liter Mo-abgereichertem Medium in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 1 mM angezogen und in der späten logarithmischen

Wachstumsphase unter anaeroben Bedingungen geerntet. Die Ausbeute an Zellpellet betrug ca. 60 ml. Da damit gerechnet werden musste, dass eine potentielle W-haltige Nitrogenase labiler ist als das konventionelle Molybdän-enthaltende Enzym, wurden bei der Extraktpräparation besondere Schutzmaßnahmen angewendet. Diese umfassten, (i) den Einsatz eines besonders schonenden lysozymatischen Zellaufschluss-Verfahrens, (ii) den Zusatz von Glycerin (20 % (v/v)) zum Aufschlussansatz und (iii) die Verwendung von Proteaseinhibitoren. In Arbeiten zur labilen Fe-Nitrogenase von *R. capsulatus* konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl Glycerin als auch Proteaseinhibitoren im Zellaufschluss einen stabilisierenden Effekt auf die Nitrogenase ausüben [97]. Der Einsatz von Glycerin dient dabei dem wirksamen Schutz des Enzyms, besonders bei Einfrier- und Auftauvorgängen. Zum Schutz vor proteolytischem Abbau der potentiell W-haltigen Dinitrogenase wurden dem Zellaufschluss besonders wirksame Proteaseinhibitoren wie PMSF (spezifisch für Serin-Proteasen), Leupeptin-Hydrogensulfat (spezifisch für Trypsin-ähnliche Serin- und einige Cystein-Proteasen), Pepstatin A (spezifisch für einige Asparaginsäure-Proteasen) sowie EDTA (spezifisch für Metallo-Proteasen) zugesetzt [96].

Nach erfolgter Abtrennung der unlöslichen Extrakt-Bestandteile durch Ultrazentrifugation wurde der Überstand an Q-Sepharose chromatographiert. Gegenüber DEAE-Sepharose erwies sich die Verwendung des stärkeren Anionenaustauschers Q-Sepharose als vorteilhaft, da mit letzterem eine wesentlich bessere Trennung der Dinitrogenase-Komponente vom Fe-Protein erzielt werden konnte. Die Q-Sepharose-Säule wurde vor dem Auftragen des löslichen Extrakts mit Tris-Puffer (50 mM, pH 7,6) in Gegenwart von Glycerin (10 % (v/v)),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (4 mM) und NaCl (150 mM) äquilibriert. Die Elution der Proteine erfolgte bei 8 °C mit einem diskontinuierlichen NaCl Gradienten (Äquilibrierpuffer in Gegenwart von 200, 250, 300, 350 bzw. 400 mM NaCl). Sämtliche Fraktionen wurden anaerob aufgefangen und gelelektrophoretisch sowie immunologisch (Ouchterlony-Doppelimmundiffusion) auf die Anwesenheit der Dinitrogenase-Komponente untersucht.

Während ein Großteil der Proteine bereits mit 150 mM und 200 mM NaCl eluiert wurde, konnte der Hauptanteil des Dinitrogenase-Proteins in der 300 mM NaCl-Fraktion isoliert werden (Abb. 15). Das Protein, welches in den Untersuchungen zur  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Nitrogenase-Expression gelelektrophoretisch in Höhe der  $\alpha$ -Untereinheit der Dinitrogenase-Komponente detektiert und als Fremdprotein identifiziert wurde (siehe Abschnitt 3.2.1), konnte in der 350 mM NaCl-Fraktion nachgewiesen werden. Der Hauptanteil des Fe-Proteins wurde erst mit 400 mM NaCl eluiert.



**Abb. 15: SDS-gelelektrophoretische Identifizierung der Dinitrogenase-Komponente in der 300 mM NaCl-Fraktion.** Es wurden 4  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen.

Die Dinitrogenase-enthaltende 300 mM NaCl-Fraktion (ca. 35 ml) wurde anaerob bei 4 °C bis auf ca. 500  $\mu\text{l}$  eingengt. Von diesem Präparat wurden 200  $\mu\text{l}$  für EPR-spektroskopische Untersuchungen in ein EPR-Röhrchen abgefüllt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die restlichen 300  $\mu\text{l}$  der Probe wurden zur Protein-, Reinheits-, Aktivitäts- und Metallgehaltsbestimmung verwendet. Der Gesamtproteingehalt der Probe betrug 39 mg Protein/ml. Die Reinheit des Präparats (Anteil der Dinitrogenase-Komponente zum Gesamtprotein) wurde mithilfe der radialen Immundiffusion bestimmt und betrug 52 % (20,3 mg Dinitrogenase/ml). Die Gesamtausbeute an Dinitrogenase-Protein, isoliert aus 6 l Flüssigkultur, betrug somit ca. 10 mg. Im Vergleich dazu konnten – ebenfalls ausgehend von 6 l Flüssigkultur – aus dem Wildtyp unter optimalen Bedingungen ca. 50 mg MoFe-Protein isoliert werden. Die 5-fach höhere Ausbeute an MoFe-Protein bei der Isolierung der Nitrogenase aus dem Wildtyp deckt sich annähernd mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zur  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Nitrogenase-Expression. Danach ist die relativ geringe Reinheit der Probe auf den Umstand zurückzuführen, dass die Ausgangsmenge an Dinitrogenase-Protein in den „ $\text{WO}_4^{2-}$ -Zellen“ der *anfA*<sup>-</sup>-Mutante erheblich geringer ist (nur ca. 1/4) als in Zellen, die unter optimalen Expressionsbedingungen ( $> 0,2 \mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ ) angezogen wurden (vgl. Tab. 3).

### 3.5 Charakterisierung der W-haltigen Dinitrogenase („WFe-Protein“)

#### 3.5.1 Bestimmung der Nitrogenaseaktivität

Die konzentrierte Dinitrogenase-Proteinprobe (300 mM NaCl Fraktion) wurde auf ihre Fähigkeit,  $C_2H_2$  zu reduzieren überprüft. Dabei ergab sich, dass die Probe nur äußerst geringe Mengen  $C_2H_2$  zu reduzieren vermochte. Die spezifische Aktivität betrug ca. 1,3 U/mg Dinitrogenase-Protein, bei einem 2,5-fachen Überschuss an Dinitrogenase-Reduktase. Für das native Mo-haltige Enzym konnte eine annähernd 1000-fache spezifische Aktivität (bei 40-fachem Überschuss an Fe-Protein) bestimmt werden [103]. Der zur Erzielung maximaler spezifischer Aktivitäten erforderliche Zusatz von Fe-Protein im großen Überschuss zum Testansatz war allerdings im Rahmen der hier beschriebenen Aktivitätsansätze nicht möglich, da keine ausreichenden Mengen an hochkonzentriertem, hochreinem und stabilem Fe-Protein zur Verfügung standen.

#### 3.5.2 Metallgehalt der isolierten Dinitrogenase-Komponente aus „W-Zellen“

Der Eisen-, Molybdän- und Wolframgehalt der isolierten Dinitrogenase-Komponente wurde durch ICP-MS bestimmt. Wie aus Tab. 4 ersichtlich ist, wurde im Durchschnitt ca. ein ( $\pm 0,15$ ) W-Zentrum in das Protein eingebaut. Die in das Dinitrogenase-Protein integrierte Menge an Molybdän ist ca. 100-fach geringer als die des Wolframs. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass in die aus *R. capsulatus* isolierte W-haltige Nitrogenase unter den gegebenen Anzuchtbedingungen tatsächlich Wolfram in den Cofaktor eingebaut wurde, und dass das Wolfram-zu-Molybdän-Verhältnis wesentlich größer ist, als das, welches von Hales und Case für eine W-haltige Nitrogenase aus *A. vinelandii* analysiert wurde [39].

Der ermittelte Eisengehalt der W-haltigen Nitrogenase betrug ca. 16 ( $\pm 2$ ) Fe-Zentren pro Tetramer. Es ist auffällig, dass das Verhältnis des Fe-Gehalts zum W-Gehalt in der isolierten W-haltigen Nitrogenase (Fe : W  $\sim$  16 : 1) nahezu dem bei der konventionellen Mo-haltigen Nitrogenase zu erwartenden Idealwert (Fe : Mo = 15 : 1) entsprach. Die Mo-Nitrogenase enthält im Idealfall 2 Mo- (1 Mo-Zentrum pro FeMoco-Molekül) und 30 Fe-Zentren (7 Fe-Zentren pro FeMoco-Molekül und 8 Fe-Zentren pro P-Cluster) pro Tetramer.

Da die tatsächliche Anzahl der Fe und W-Zentren im W-haltigen Dinitrogenase-Protein jedoch nur ca. die Hälfte des Idealwertes betrug, schien im vorliegenden Präparat im Durchschnitt nur eine der beiden Cofaktor- bzw. P-Cluster-Bindungsstellen besetzt zu sein.

Interessanterweise wurde die Halbbesetzung der Cofaktorbindungsstellen mit einem FeWco-Molekül bereits von Hales und Case nachgewiesen [39]. Allerdings war in der aus *A. vinelandii* isolierten W-haltigen Nitrogenase die andere Cofaktorbindungsstelle stets mit einem FeMo-Cofaktor besetzt.

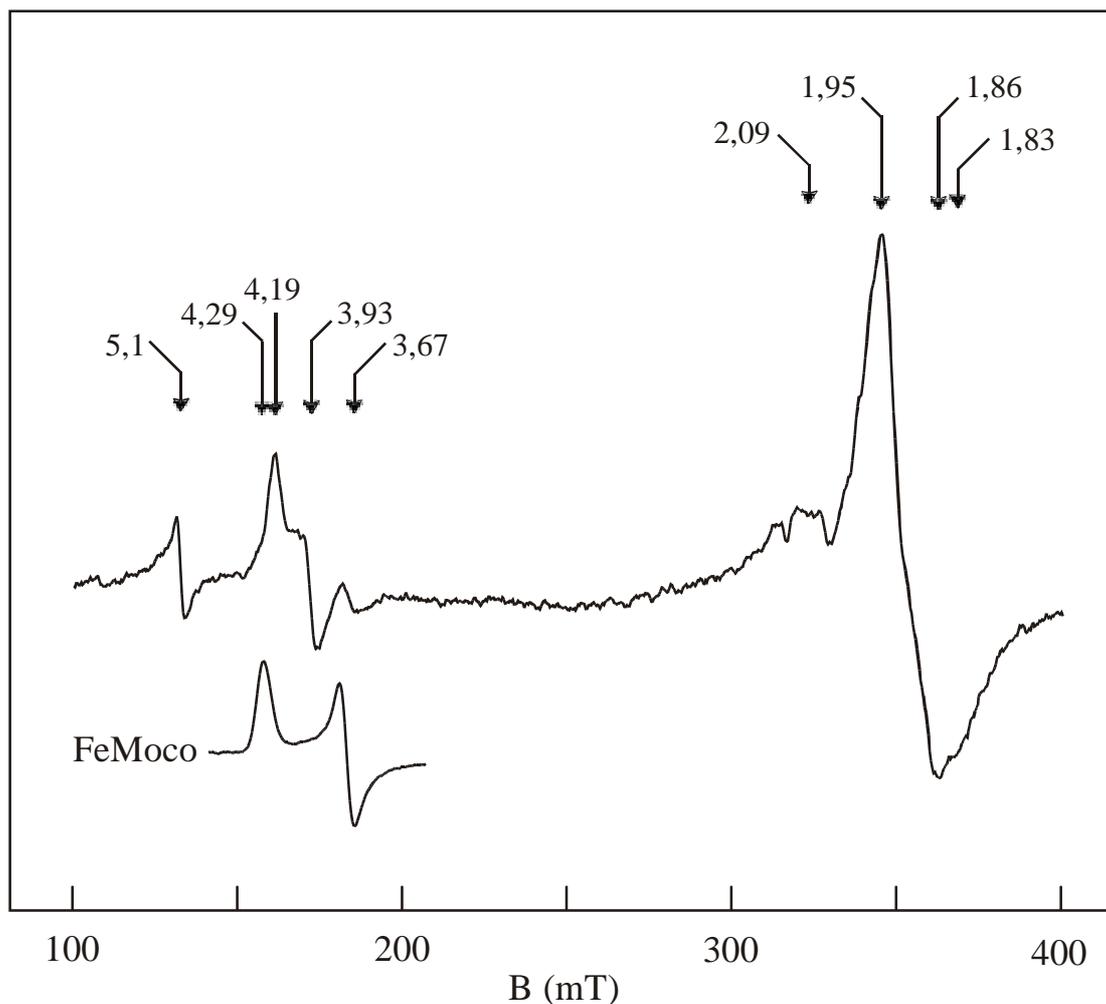
**Tab. 4: Wolfram-, Molybdän- und Eisengehalt der isolierten und partiell gereinigten Dinitrogenase-Komponente.** Zur Berechnung der Anzahl der Metallzentren pro  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer wurden die durch ICP-MS ermittelten Metallgehalte, für die ein Fehler von  $\pm 15\%$  veranschlagt wurde, durch die Anzahl der in der Probe vorhandenen Dinitrogenase-Proteinmoleküle (Proteingehalt 20,3 mg/ml) dividiert.

| Metall | Anzahl der Metallzentren pro $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer |
|--------|--|
| W      | 1  |
| Mo     | $\leq 0,01$  |
| Fe     | 16   |

### 3.5.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung der Wolfram-haltigen Nitrogenase

Obwohl eine W-haltige, aber noch stark mit dem FeMo-Cofaktor „verunreinigte“ Nitrogenase bereits aus *A. vinelandii* isoliert und untersucht worden ist [39], wurde eine detaillierte EPR-spektroskopische Charakterisierung des Proteins bisher nicht veröffentlicht. Aus diesem Grund sollte die aus *R. capsulatus* isolierte W-haltige Nitrogenase mithilfe der EPR-Spektroskopie eingehender untersucht und charakterisiert werden. Das EPR-Spektrum der isolierten W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* ist in Abb. 16 dargestellt.

Wie aus dem Spektrum ersichtlich ist, konnten Signale sowohl im Tieffeld- als auch im Hochfeldbereich detektiert werden. Die dominantesten Resonanzen im Tieffeldbereich liegen bei  $g = 4,19$  und  $3,93$ . Ähnliche Signale konnten auch mit dem Wolfram-enthaltenden Protein aus *A. vinelandii* beobachtet werden ( $g = 4,22$  und  $3,95$ ) und wurden aufgrund der Ähnlichkeit zum charakteristischen  $S = 3/2$ -FeMoco-Signal ( $g = 4,29$ ,  $3,67$  und  $2,01$ ) dem FeW-Cofaktor zugeordnet [39].



**Abb. 16: EPR-Spektrum einer aus *anfA*-Zellen isolierten W-haltigen Nitrogenase.** Die Probe enthielt 20,3 mg Dinitrogenase-Protein/ml (in 300 mM NaCl-Elutionspuffer, pH 7,6). Die Aufnahme des Spektrums erfolgte bei 4 K in einem Magnetfeldbereich von 50 - 450 mT mit 20 mW, einem Receiver Gain von  $2,5 \cdot 10^5$  und 5 scans. Alle weiteren Messparameter sind im Material- und Methodenteil aufgeführt. Unterhalb des Spektrums ist zum Vergleich ein Teil des Spektrums des im MoFe-Protein gebundenen FeMo-Cofaktors (isoliert aus dem Wildtyp) abgebildet.

Das in Abb. 16 dargestellte  $S = 3/2$ -Signal zeichnet sich durch eine geringere Rhombizität gegenüber dem des FeMoco-Signals aus. Die schwach ausgeprägte Resonanz bei  $g = 3,67$  deutet auf die Anwesenheit geringfügiger Mengen an FeMoco im Präparat bzw. die Insertion eines kleinen Anteils des Cofaktors in das W-haltige Dinitrogenase-Protein hin (vergleiche hierzu auch die charakteristischen Resonanzen im Tieffeldbereich des FeMoco-Spektrums unterhalb des Probenspektrums in Abb. 16). Die für den proteingebundenen FeMoco typische Resonanz bei  $g = 4,29$  lässt sich im Spektrum als schwach ausgeprägte Schulter links der

$g = 4,19$ -Resonanz erkennen. Obwohl somit auch Spuren des FeMoco EPR-spektroskopisch nachgewiesen werden konnten, so dominierte doch – im Gegensatz zu Messungen am *A. vinelandii*-Protein – eindeutig das  $S = 3/2$ -Signal des FeW-Cofaktors.

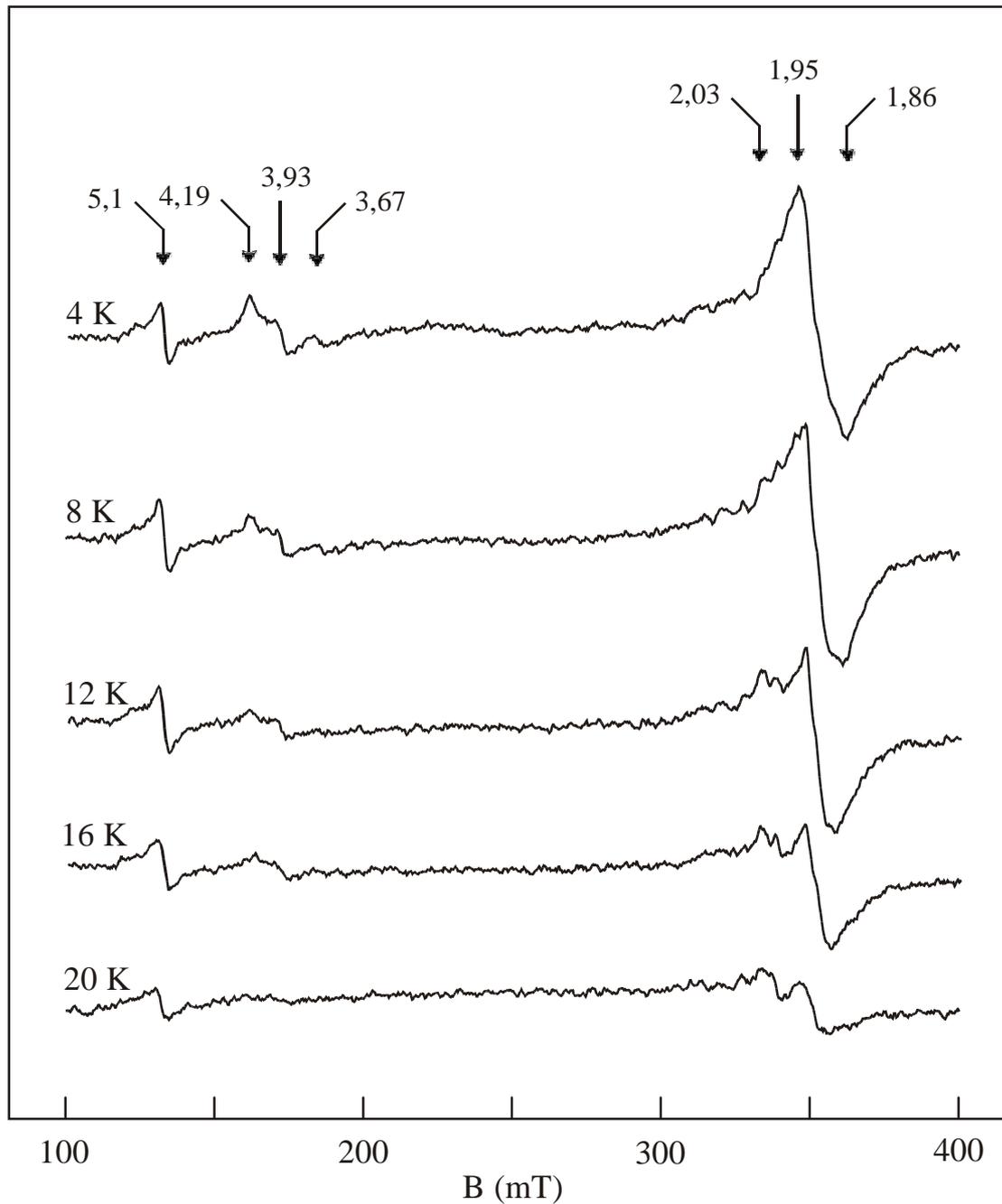
Das Signal bei  $g = 5,1$  scheint ein präparationsbedingtes, zu vernachlässigendes Artefakt darzustellen, da dieses Signal auch mit einigen Präparationen der konventionellen Mo-Nitrogenase EPR-spektroskopisch detektierbar war. Das dominanteste Signal im Gesamtspektrum ist das ebenfalls von Hales und Case beschriebene und von den Autoren als S3 bezeichnete Signal im Hochfeldbereich (300-400 mT) [39]. Die Bezeichnung S3 geht auf die Tatsache zurück, dass die Autoren drei verschiedene Signaltypen in der von ihnen isolierten W-Nitrogenase detektieren konnten: (i) den FeMoco (S1), (ii) den FeWco (S2) und (iii) ein breites Signal im  $g \sim 2$ -Bereich (S3). Aus der Form der Resonanzen im Hochfeldbereich lässt sich erkennen, dass es bei diesen nicht um ein einziges, sondern um die Überlagerung mindestens zweier Signale handelt. Da aufgrund dieser Überlagerung eine eindeutige Ermittlung bzw. Zuordnung der  $g$ -Werte nicht möglich war, wurden nur die  $g$ -Werte der charakteristischen Signalmaxima und -minima ermittelt. Die auf diese Weise bestimmten  $g$ -Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit denen, die für die W-haltige Nitrogenase aus *A. vinelandii* angegeben wurden ( $g = 2,10, 1,92$  und  $1,85$  [39]).

Zur eingehenderen Charakterisierung der beobachteten Signale wurde die Abhängigkeit der Signalintensität des FeWco- sowie des S3-Signals von der Temperatur und der Mikrowellenleistung bestimmt. Die Temperaturabhängigkeit der Signalintensitäten ist in Abb. 17 dargestellt.

Die Temperatur wurde von 4 K an sukzessive in 4 K-Schritten erhöht und die Spektren gemessen. Sowohl die Intensität des FeWco- als auch die des S3-Signals wiesen eine starke Temperaturabhängigkeit auf. Maximal waren beide Signale bei 4 K ausgeprägt. Bei einer Temperaturerhöhung nahm die Signalintensität drastisch ab. Außerdem erschien ab 12 K im Spektrum eine weitere Resonanz bei  $g = 2,03$ . Diese konnte bei tieferen Temperaturen nicht aufgelöst werden, da sie unter dem breiten und dominanten S3-Signal lag.

Durch grobe Quantifizierung der Signalintensität ließ sich ermitteln, dass sich sowohl die Intensität des FeWco- als auch des S3-Signals annähernd identisch bzgl. einer Temperaturänderung verhielten. So konnte z. B. bei einer Temperaturerhöhung von 4 auf 8 K eine Abnahme der Intensität beider Signale um ca. 20 % beobachtet werden. Bei 16 K betragen die Signalintensitäten bereits weniger als 50 % verglichen mit denen, die bei 4 K

gemessen wurden. Bei Temperaturen über 20 K konnten weder das S3- noch das FeWco-Signal detektiert werden.



**Abb. 17: Temperaturabhängigkeit der EPR-Signale der W-haltigen Nitrogenase.** Die Probe enthielt 20,3 mg Dinitrogenase-Protein/ml (in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, + 4 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in einem Messbereich von 50 - 450 mT mit 20 mW und einem Receiver Gain von  $10^5$ .

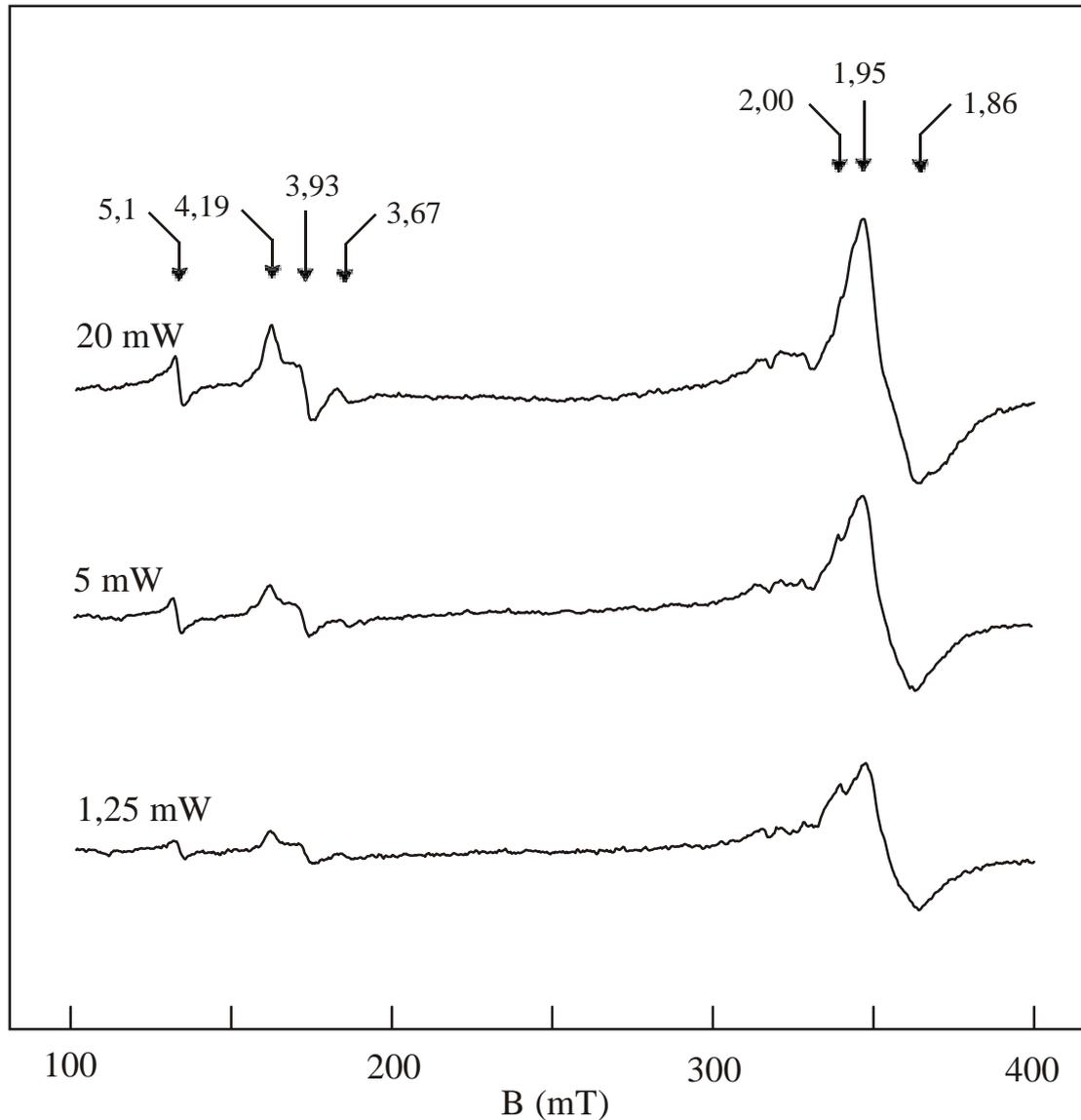
Im Vergleich zum FeWco- zeigte das FeMoco-Signal (in einer gereinigten MoFe-Protein-Probe) eine etwas drastischere Temperaturabhängigkeit. So nahm die Intensität des FeMoco-Signals bei einer Temperaturerhöhung von 4 auf 8 K auf die Hälfte ab, während bei 12 K nur noch ca. 16 % der Ausgangsintensität detektiert werden konnte.

Zur weiteren Charakterisierung der Signale und zur Bestimmung von Sättigungseffekten im Spektrum der W-haltigen Nitrogenase wurde die Abhängigkeit der Signalintensitäten von der Mikrowellenleistung ermittelt. Dazu wurden Spektren bei 4 K mit drei verschiedenen Leistungen (1,25, 5, 20 mW) aufgenommen (Abb. 18).

Für den Fall, dass keine Sättigungseffekte auftreten, verdoppelt sich die Signalintensität bei Vervierfachung der Mikrowellenleistung. Die Quantifizierung der Signalintensitäten ergab, dass das FeWco-Signal bis zu einer Leistung von 5 mW nicht gesättigt ist, d. h., dass sich die Intensität des Signals bei vierfacher Leistung verdoppelte. Bei einer Leistung von 20 mW konnte bereits eine geringe Sättigung des Signals festgestellt werden. In vergleichenden Experimenten mit dem aus dem Wildtyp isolierten MoFe-Protein konnte eine ähnliche – aber nicht gleiche – Abhängigkeit der Signalintensität des FeMoco-Signals von der Mikrowellenleistung gemessen werden. So konnte beim FeMoco-Signal bereits durch Erhöhung der Leistung von 1,25 auf 5 mW eine geringe Signalsättigung detektiert werden.

Das S3-Signal schien im Gegensatz zum FeWco-Signal schon bei einer Leistung von 5 mW deutlichen Sättigungseffekten zu unterliegen. So erhöhte sich z. B. die Signalintensität bei einer Vervierfachung der Leistung von 1,25 auf 5 mW nur um den Faktor 1,6.

Durch die Messung der Leistungsabhängigkeit konnte, neben der Ermittlung der Signalsättigung, eine Resonanz bei  $g = 2,00$  bei niedrigen Leistungen aufgelöst werden. Die bessere Auflösung dieser Resonanz kommt durch die drastische Abnahme des Signals zwischen  $g = 1,95$  und  $1,86$  zustande. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern: (i) das S3-Signal besteht aus mindestens zwei unabhängigen Signalen und (ii) die Resonanz bei  $g = 2,00$  liegt bei höheren Leistungen unter dem breiten S3-Signal, da sich beide Signaltypen in ihrer Leistungsabhängigkeit unterscheiden (das Signal bei  $g = 2,00$  ist stärker gesättigt).



**Abb. 18: Abhängigkeit der EPR-Signale der W-haltigen Nitrogenase von der Mikrowellenleistung.** Die Probe enthielt 20,3 mg Dinitrogenase-Protein/ml (in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, + 4 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in einem Feldbereich von 50 - 450 mT bei 4 K, einem Receiver Gain von  $2,5 \cdot 10^5$  und mit 5 Scans.

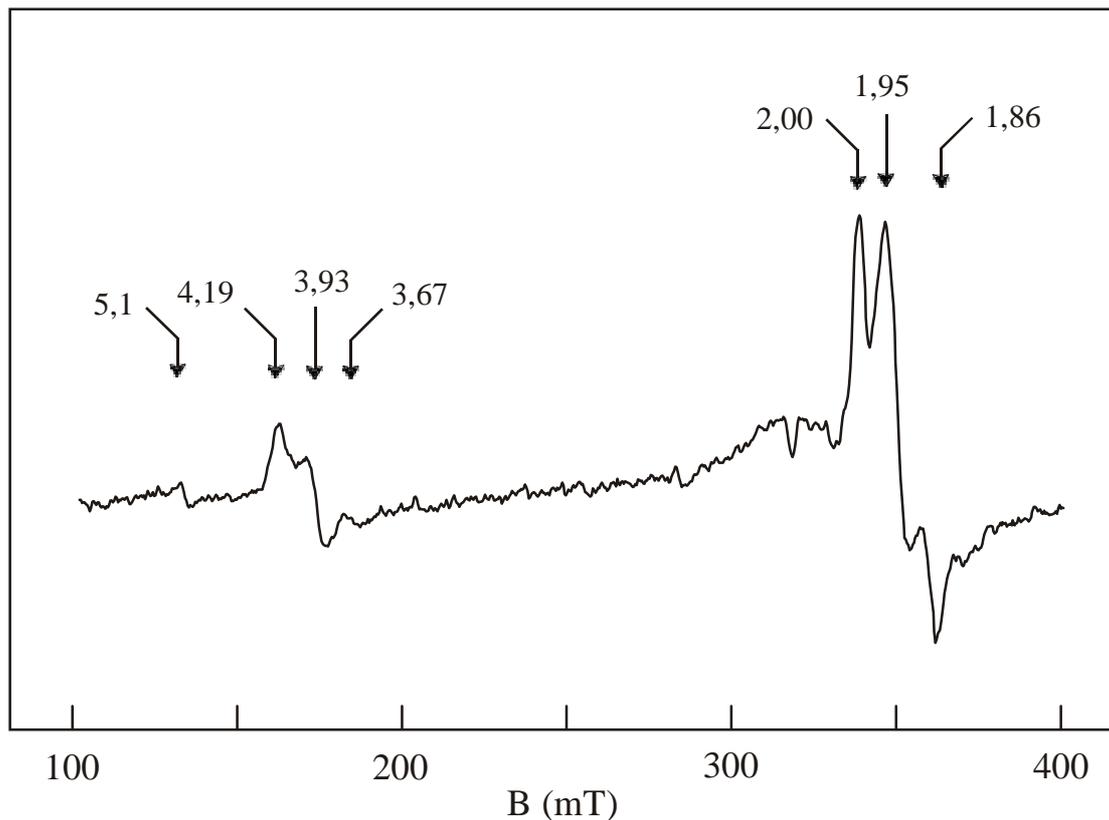
### 3.5.4 EPR-Spektrum der „Enzym-reduzierten“ W-haltigen Nitrogenase („Turnover“-Zustand)

Im isolierten, d. h.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduzierten Zustand befindet sich die konventionelle Dinitrogenase im „semi“-reduzierten Zustand. Aus diesem Zustand heraus kann eine Substratreduktion nicht erfolgen. Unter „Turnover“-Bedingungen, d. h. in Gegenwart des Fe-Proteins, welches die Dinitrogenase enzymatisch reduzieren soll, einem Elektronendonator

( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), MgATP und Substrat ( $\text{N}_2$ ), wird der größte Teil des MoFe-Proteins bzw. des FeMo-Cofaktors vom „semi“- in den vollreduzierten Zustand überführt, wodurch die Intensität des FeMoco-Signals im EPR-Spektrum um ca. 2/3 abnimmt [120, 97]. Dies deutet darauf hin, dass ca. 2/3 aller FeMoco-Moleküle unter diesen Bedingungen weiter reduziert werden, während noch 1/3 im „semi“-reduzierten Zustand vorliegen. In Abb. 19 ist das Signal dargestellt, welches die W-haltige Nitrogenase unter „Turnover“-Bedingungen zeigt. Während im niederen Feldbereich keine neuen Signale auftraten, konnte im  $g \sim 2$ -Bereich eine starke Veränderung des S3-Signals gegenüber dem der W-haltigen Nitrogenase im „semi“-reduzierten Zustand (vgl. Abb. 16) beobachtet werden. Zusätzlich zur signifikanten Veränderung der Signalform, konnte ein neue, im Spektrum nicht aufgelöste oder vorhandene Resonanz bei  $g = 2,00$  detektiert werden.

Die Quantifizierung der Signalintensitäten im Vergleich zu denen, die im „semi“-reduzierten Zustand ermittelt wurden, ergab, dass die Intensität des „Rest“-FeMoco-Signals um annähernd 60 % abnahm und kaum noch nachweisbar war, während die Intensität des FeWco-Signals sich nur um 20 % verringerte. Das weitgehende Verschwinden des FeMoco-Signals wies einerseits deutlich nach, dass sich das Dinitrogenase-Protein unter den angewendeten Bedingungen tatsächlich im „Turnover“-Zustand befunden hat, es führte andererseits dazu, dass das charakteristische Signal-Profil des FeW-Cofaktors deutlicher zu Tage trat.

Am stärksten wurde überraschenderweise das Signal bei  $g = 5,1$  beeinflusst, das nicht spezifisch im Zusammenhang mit W-Nitrogenase-Präparationen auftritt, aber offensichtlich doch eine Nitrogenase-relevante Komponente repräsentiert. Dieses  $g = 5,1$ -Signal verlor im „Turnover“-Zustand über 75 % der Ausgangsintensität. Die relative Signalintensität des S3-Signals, gemessen als Differenz der Intensitäten zwischen dem Signalmaximum bei  $g = 1,95$  und dem Minimum bei  $g = 1,87$ , betrug unter „Turnover“-Bedingungen ca. 80 % der Ausgangsintensität. Diese geringe Abnahme deckt sich mit der für den FeWco detektierten Verringerung der Signalintensität. In Untersuchungen des „Turnover“-Zustandes der W-haltigen Nitrogenase aus *A. vinelandii* konnte gezeigt werden, dass sich die Signalintensitäten des FeWoco- und des S3-Signals beim Übergang vom „semi“-reduzierten Zustand nicht änderten [39]. Allerdings wurde von den Autoren der Hochfeldbereich des „Turnover“-Spektrums nicht veröffentlicht, sodass unklar ist, ob ebenfalls eine Veränderung der S3-Signalform beobachtet werden konnte.



**Abb. 19: EPR-Spektrum der W-haltigen Nitrogenase unter „Turnover“-Bedingungen.** Die Probe enthielt 14,8 mg Dinitrogenase-Protein/ml und 0,5 mg/ml Fe-Protein sowie alle weiteren für die Schaffung des „Turnover“-Zustandes wichtigen Bestandteile (100 mM Hepes-Puffer (pH 7,6), 10 mM ATP, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Creatinphosphat, 6 mM  $Na_2S_2O_4$ , 200  $\mu g$  Creatinkinase und  $N_2$  als Substrat). Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von ATP gestartet und der Ansatz für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Spektrum wurde bei 4 K mit 20 mW, einem Receiver Gain von  $2,5 \cdot 10^5$  und 5 Scans aufgenommen.

Obwohl eine geringe Abnahme an Signalintensität des FeWco- sowie des S3-Signals bei der W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* bei der Überführung in den „Turnover“-Zustand beobachtet werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verringerung der Signalintensitäten durch eine teilweise Inaktivierung oder Zerstörung des Proteins bzw. des FeW-Cofaktors hervorgerufen wurde. Im Rahmen der Probenpräparation (Auftauen der Probe, Inkubation bei Raumtemperatur, erneutes Einfrieren der Probe) könnte eine solche partielle Zerstörung des FeW-Cofaktors durchaus stattgefunden haben.

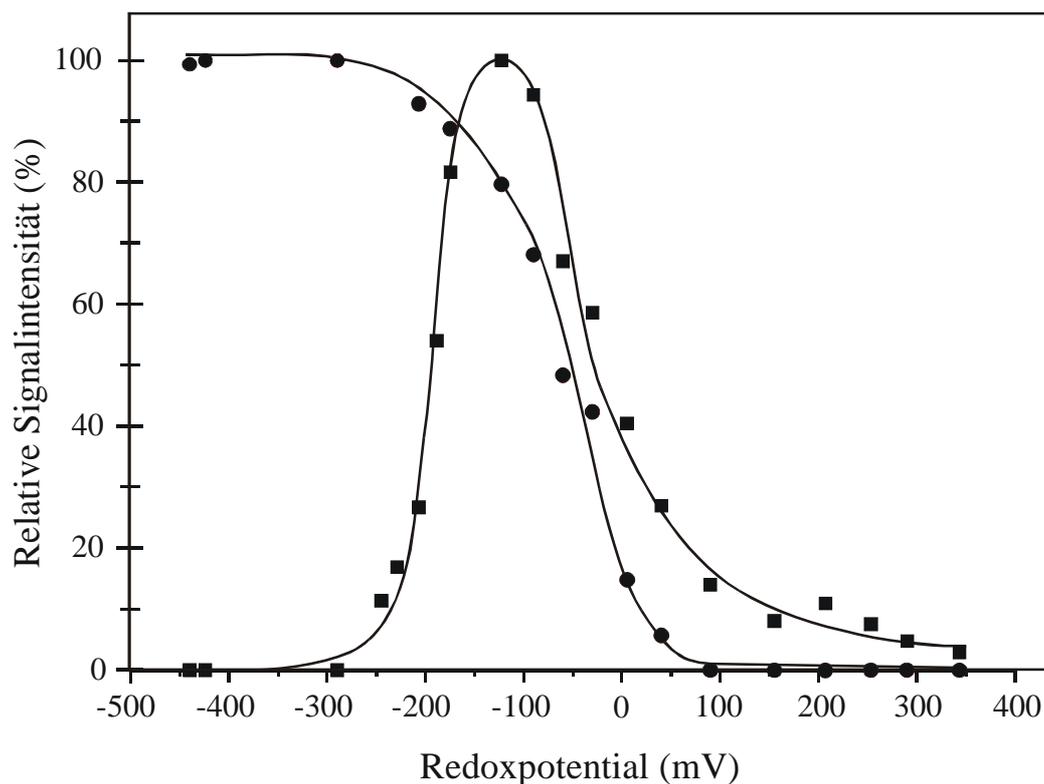
### 3.5.5 Redoxtitration der W-haltigen Nitrogenase

Zur weiteren Charakterisierung der W-haltigen Nitrogenase sowie deren Redoxzentren (P-Cluster, FeWco und das Redoxzentrum, welches das S3-Signal hervorruft) wurde das Protein einer Redoxtitration unterzogen. Zum Vergleich wurde auch das MoFe-Protein der Mo-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* redoxitriert, da noch keine detaillierten Informationen zur Potentialabhängigkeit der Redoxzentren in dem konventionellen MoFe-Protein (FeMoco und P-Cluster) vorlagen.

#### 3.5.5.1 Redoxtitration des konventionellen MoFe-Proteins

Zur Ermittlung der Halbstufenpotentiale der paramagnetischen Zentren im MoFe-Protein der konventionellen Mo-abhängigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* wurde eine Redoxtitration mit dem aus dem Wildtyp isolierten und gereinigten Enzym durchgeführt. Die Potentiale im Bereich von - 440 bis + 340 mV wurden durch sukzessive Zugabe von konzentrierten  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ - bzw.  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lösungen eingestellt. Im Abstand von ca. 30 mV wurden dem Enzym/Mediatoren-Gemisch Proben entnommen und in EPR-Röhrchen eingefroren. Die EPR-spektroskopische Untersuchung erfolgte bei 4 K zur Messung des charakteristischen  $S = 3/2$ -FeMoco-Signals bzw. bei 16 K zur Detektion des  $S = 1/2$ -Signals des P-Clusters im 1-Elektronen-oxidierten Zustand (siehe pH 7,4-Probenspektrum in Abb. 21; g-Werte: 2,06, 1,96 und 1,84). Zur Bestimmung der Halbstufenpotentiale ( $E_m$ ) wurden, wie in Abb. 20 dargestellt, die relativen Signalintensitäten des FeMoco-Signals (4 K, 20 mW,  $g = 3,67$ ) und des P-Clusters (16 K, 100 mW,  $g = 1,96$ ) ermittelt und in Abhängigkeit vom Redoxpotential aufgetragen.

Das apparente Halbstufenpotential – das Redoxpotential, bei dem die relative Signalintensität 50 % beträgt – des FeMo-Cofaktors betrug ca. - 50 mV. Ab einem Redoxpotential über + 100 mV konnte das FeMoco-Signal nicht mehr detektiert werden. Nach durchgeführter Rücktitration mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  auf ein Potential von - 440 mV konnte dieses Signal wieder mit einer relativen Intensität von 100 % gemessen werden. Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass der FeMoco (bis hin zu einem Potential von + 340 mV) reversibel oxidier- und wieder reduzierbar ist.



**Abb. 20: Redox titrationskurven des MoFe-Proteins der konventionellen Nitrogenase.** Die Redox titration wurde wie im Abschnitt 2.14 beschrieben durchgeführt. Die Probe enthielt 12 mg MoFe-Protein/ml (in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,4, + 1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , + Mediatoren). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in einem Feldbereich von 50 - 450 mT mit einem Receiver Gain von  $10^4$ . Zur Bestimmung der relativen Signalintensität des FeMoco-Signals wurde die Resonanz bei  $g = 3,67$  (gemessen bei 4 K mit 20 mW) ausgewertet. Die Signalintensität des P-Clusters im 1-Elektronen-oxidierten Zustand wurde bei 16 K mit 100 mW anhand der Resonanz bei  $g = 1,96$  ermittelt. Sämtliche Potentiale beziehen sich auf das Standardwasserstoffpotential bei pH 7,0. ●, FeMoco; ■, P-Cluster.

Für den P-Cluster konnten zwei Halbstufenpotentiale ermittelt werden. Das zum Übergang des reduzierten P-Clusters in den 1-Elektronen-oxidierten Zustand ( $\text{P}^{\text{ox}1}$ ) gehörige Halbstufenpotential betrug - 195 mV, während das zum Übergang von  $\text{P}^{\text{ox}1}$  in den 2-Elektronen-oxidierten Zustand ( $\text{P}^{\text{ox}2}$ ) gehörige Halbstufenpotential bei - 30 mV lag. Für das aus *A. vinelandii* isolierte MoFe-Protein konnte gezeigt werden, dass der Gesamtspin des P-Clusters im  $\text{P}^{\text{ox}2}$ -Zustand  $S = 3$  beträgt [121]. Da der Spin des P-Clusters in diesem Zustand geradzahlig ist, kann ein EPR-Signal unter Standardbedingungen im Allgemeinen meist nicht detektiert werden (Übergangsverbot für geradzahlige Spinsysteme). Jedoch konnten bei der hier beschriebenen Messung, die für ein  $S = 3$ -Signal typische Resonanz im Tieffeldbereich ( $g = 12,8$ ) bei 14 und 28 K ab einem Potential von ca. 0 mV detektiert werden. Die Intensität

des Signals war allerdings, aufgrund des verbotenen Übergangs, so gering, dass eine Bestimmung des Halbstufenpotentials nicht möglich war. Bei Potentialen ab + 100 mV konnte ein zusätzliches, äußerst schwaches Signal ( $g = 2,03$  und  $2,00$ ) detektiert werden. Die Intensität wuchs mit zunehmendem Potential, war aber bei + 340 mV immer noch so schwach, dass auch hier auf eine quantitative Auswertung des Signals verzichtet werden musste. Dieses Signal könnte von einem 3-Elektronen-oxidierten P-Cluster ( $P^{ox3}$ ) stammen, dessen Signal bereits beschrieben worden ist [121, 122]. Nicht einmal der Zusatz von  $K_3[Fe(CN)_6]$  (Endkonz.: 2 mM) zu einer oxidierten Probe (+ 350 mV) aus der Redoxtitration vermochte die Intensität dieses Signals weiter zu erhöhen.

Zur Klärung der Frage, ob auch der 1-Elektronen-oxidierte P-Cluster reversibel oxidiert und reduziert werden kann, wurden Rücktitrationen von zwei unterschiedlichen Potentialen aus (+ 155 und + 340 mV) mit  $Na_2S_2O_4$  auf ein Potential von - 125 mV (Maximum der Signalintensität) durchgeführt. Das  $S = 1/2$ -Signal des P-Clusters im  $P^{ox1}$ -Zustand konnte allerdings in keiner der beiden durchgeführten Rücktitrationen detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass der P-Cluster – zumindest in einem Potentialbereich ab + 155 mV – nicht mehr reversibel oxidierbar bzw. reduzierbar ist, sondern wahrscheinlich oxidativ geschädigt wird.

Im Verlauf der Redoxtitration konnte im Potentialbereich, bei der die Intensität des  $P^{ox1}$ -Signals maximal war, ein weiteres, neuartiges  $S = 1/2$ -Signal bei  $g = 2,00$  und  $1,88$  detektiert werden. Zur genaueren Charakterisierung dieses axialen Signals wurde die Potentialabhängigkeit der Signalintensität näher untersucht. Wie im Fall des P-Clusters konnten auch hier zwei Halbstufenpotentiale – eines für das Auftauchen und das zweite für das Verschwinden des Signals – ermittelt werden. Das erste Halbstufenpotential betrug - 200 mV und unterschied sich nur unwesentlich von dem des P-Clusters. Die maximale Signalintensität lag bei einem Potential von - 125 mV und war somit identisch mit der Lage des Maximums des  $P^{ox1}$ -Signals. Nur das zweite Halbstufenpotential ( $E_m = - 75$  mV) unterschied sich signifikant von dem des P-Clusters ( $E_m = - 30$  mV).

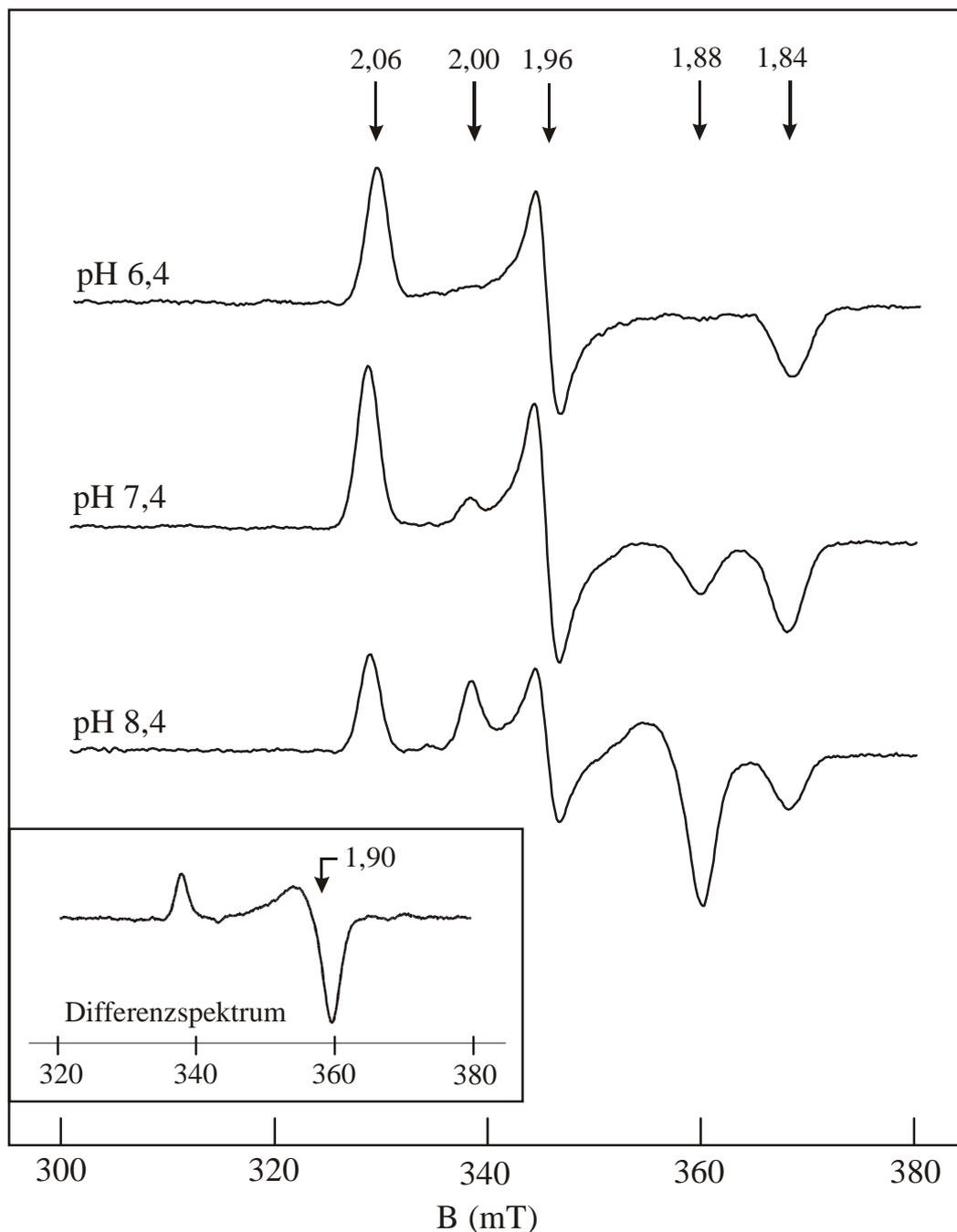
Zur weiteren vergleichenden Charakterisierung des neuartigen Signals und des P-Cluster-Signals wurde die Temperatur-, die Mikrowellenleistungs-Abhängigkeit sowie die pH-Abhängigkeit näher untersucht. Während das Intensitätsmaximum des P-Cluster-Signals zwischen 16 und 18 K lag, befand sich das des axialen Signals bei etwas tieferen Temperaturen (zwischen 12 und 14 K). Da bei Messungen um 12 K die Intensität des P-Cluster-Signals bereits auf die Hälfte reduziert vorlag, wurde bei dieser Temperatur das

Spektrum vom dem axialen Signal dominiert. Beide Signaltypen unterschieden sich signifikant in ihrer Mikrowellenleistungsabhängigkeit. Während beim axialen Signal bis 200 mW keine Sättigung auftrat, konnten beim P-Cluster-Signal bereits ab 25 mW leichte Sättigungseffekte festgestellt werden.

Für die Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit wurden zwei Proben der Redoxtitration, bei denen die relativen Signalintensitäten maximal waren (Redoxpotential von - 125 bzw. - 90 mV) mit Kombinationspuffern von pH 7,4 auf pH 6,4 bzw. 8,4 umgepuffert. Die EPR-Spektren der umgepufferten Proben sind in Abb. 21 dargestellt. Während bei pH 7,4 ein Mischspektrum aus P-Cluster-Signal und dem neuartigen Signal detektiert wurde, konnte bei pH 6,4 nur das rhombische P-Cluster-Signal ( $g = 2,06, 1,96$  und  $1,84$ ) beobachtet werden. Die Intensität des  $P^{ox1}$ -Signals nahm beim Übergang von pH 7,4 nach 6,4 um ca. 10 % ab. Durch erneute „Rück“-Pufferung auf pH 7,4 wurde sowohl das  $P^{ox1}$ -Signal als auch das neuartige Signal in seiner ursprünglichen Intensität wieder erhalten.

Im Alkalischen (pH 8,4) nahm die Signalintensität des P-Clusters auf etwa 60 % ab, während die des neuartigen Signals um mehr als das Doppelte zunahm. Aus dem Spektrum der Probe bei pH 8,4 lässt sich deutlich erkennen, dass es sich bei dem neuartigen Signal tatsächlich um ein axiales Signal handelt. Durch Subtraktion des rhombischen P-Cluster-Signals (Spektrum bei pH 6,4) von dem Mischsignal bei pH 8,4 konnte ein Differenzspektrum erhalten werden, welches nur das axiale Signal zeigt (siehe Abb. 21). Die aus diesem Spektrum nun exakter bestimmbaren  $g$ -Werte des axialen Signals lagen bei 2,00 und 1,90. Durch erneute Umpufferung auf pH 9,0 blieb die Signalintensität des axialen Signal annähernd gleich, während die Intensität des  $P^{ox1}$ -Signals weiter reduziert wurde.

Eine zusammenfassende Übersicht aller Ergebnisse der EPR-Untersuchungen am nativen MoFe-Protein ist in Tab. 5 aufgeführt.



**Abb. 21: pH-Abhängigkeit der EPR-Signale der Redoxzentren im  $g \sim 2$ -Bereich.** Zur Umpufferung wurden zwei Proben der Redoxtitration verwendet ( $E = -125$  und  $-90$  mV). Die Umpufferung auf pH 6,4 bzw. 8,4 wurde nach dem Auftauen der Probe unter Argon durch die Zugabe eines Kombinationspuffers (pH 6,0 bzw. 9,0) erreicht. Der Kombinationspuffer setzte sich wie folgt zusammen: Bis-Tris (0,87 M), Ches (0,44 M) und Hepps (0,44 M). Nach dem Zusatz des Kombinationspuffers wurden die Proben mit einer gasdichten Hamiltonspritze durchmischt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Spektren wurden bei 16 K mit 100 mW sowie einem Receiver Gain von  $10^4$  gemessen und auf die Verdünnung durch den Kombinationspuffer korrigiert.

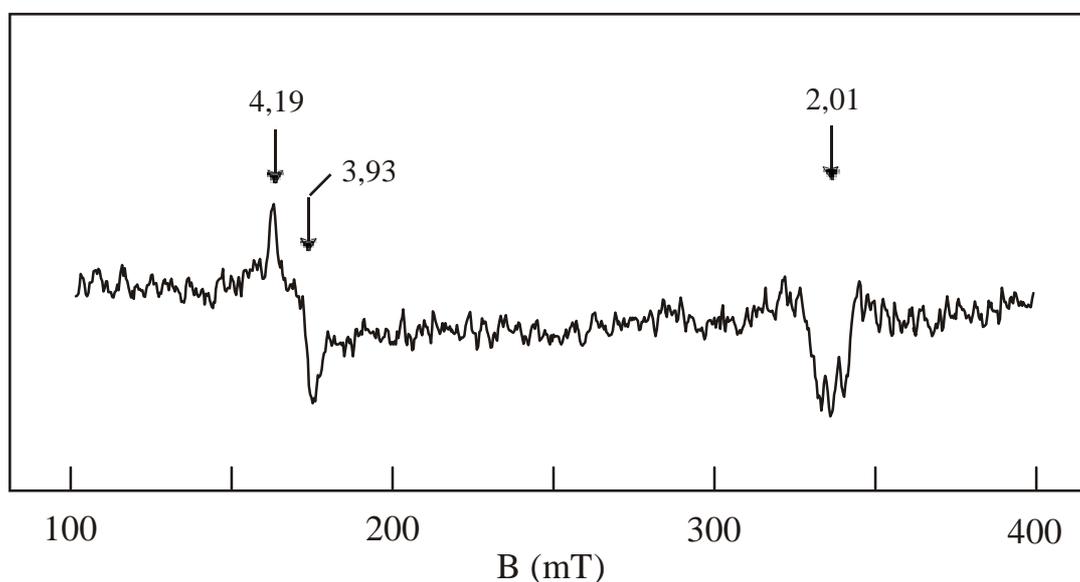
**Tab. 5: Übersicht über die Merkmale der Redoxzentren im MoFe-Protein.** Die aufgeführten Daten wurden im Zusammenhang mit der Redoxtitration des MoFe-Proteins ermittelt.

| Eigenschaften  | FeMoco-Signal                        | P <sup>ox1</sup> -Signal                                      | axiales Signal  |
|--|--------------------------------------|---|---|
| g-Werte  | 4.29, 3.67, 2.01                     | 2.06, 1.96, 1.84  | 2.00, 1.90  |
| E <sub>m</sub>   | - 50 mV                              | E <sub>m</sub> (1) = - 195 mV<br>E <sub>m</sub> (2) = - 30 mV | E <sub>m</sub> (1) = - 200 mV<br>E <sub>m</sub> (2) = - 75 mV                           |
| E <sub>max</sub>   | ≤ - 300 mV                           | - 125 mV  | - 150 mV  |
| Völliges Verschwinden des Signals                                    | E ≥ + 100 mV                         | nicht erreicht  | E ≥ 0 mV  |
| Temperaturoptimum  | 4 K                                  | 16 - 18 K   | 12 - 14 K   |
| Leistungsabhängigkeit  | ≤ 1 mW nicht gesättigt               | ≤ 25 mW nicht gesättigt                                       | ≤ 200 mW nicht gesättigt  |
| pH-Abhängigkeit der Signalintensität<br>(pH = 6,4 / 7,4 / 8,4 / 9,0) | keine Abhängigkeit<br>(pH 6,4 - 8,4) | pH 6,4: 90 %<br>pH 7,4: 100 %<br>pH 8,4: 60 %<br>pH 9,0: 38 % | pH 6,4: nicht detektierbar<br>pH 7,4: 100 %<br>pH 8,4: 250 %<br>pH 9,0: ca. 200 - 250 % |
| Signalintensität nach Rücktitration                                  | 100 %                                | nicht rücktitrierbar  | nicht rücktitrierbar  |

### 3.5.5.2 Redox Titration der W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus*

Zur Ermittlung der Potentialabhängigkeit der Redoxzentren in der W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* (FeWco, P-Cluster) wurde eine Redox Titration mit dem partiell gereinigten W-haltigen Protein durchgeführt. Da die Reinheit der Dinitrogenase-Komponente aufgrund der geringen Expression unter Mo-Mangelbedingungen nach der Chromatographie an Q-Sepharose nur bei ca. 50 % lag, wurde das Protein zur weiteren Reinigung einer Gelfiltration an Sephacryl S-200 unterzogen. Die Reinheit der Proteinprobe lag nach diesem Chromatographieschritt zwischen 60 und 70 %. Im Anschluss an die Gelfiltration wurde – wie auch vor der Redox Titration des konventionellen MoFe-Proteins – durch Chromatographie an Sephadex G-25 die  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Konzentration auf 1 mM reduziert und auf HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) umgepuffert.

Da einerseits die Gesamtausbeute an der Dinitrogenase-Komponente wesentlich geringer war als nach einer Anreicherung des Wildtyp-Enzyms, andererseits aber hohe Proteinkonzentrationen – und daher ein drastisches Einengen des Probevolumens – für auswertbare EPR-Spektren erforderlich waren, reichte die verfügbare Menge an W-haltiger Proteinlösung nur für wenige Redoxproben. Das EPR-Spektrum des W-haltigen Proteins nach der Sephadex G-25-Gelfiltration (ohne Mediatoren !) ist in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 22: EPR-Spektrum des W-haltigen Dinitrogenase-Proteins nach einer Sephacryl S-200- und einer Sephadex G-25-Gelfiltration.** Die Probe enthielt ca. 2 mg Dinitrogenase-Protein/ml in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4, + 1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Das Spektrum wurde bei 4 K mit 20 mW, einem Receiver Gain von  $2,5 \cdot 10^5$  und 10 Scans gemessen. Von dem Probenspektrum wurde ein Leerspektrum subtrahiert, welches unter identischen Bedingungen vermessen wurde.

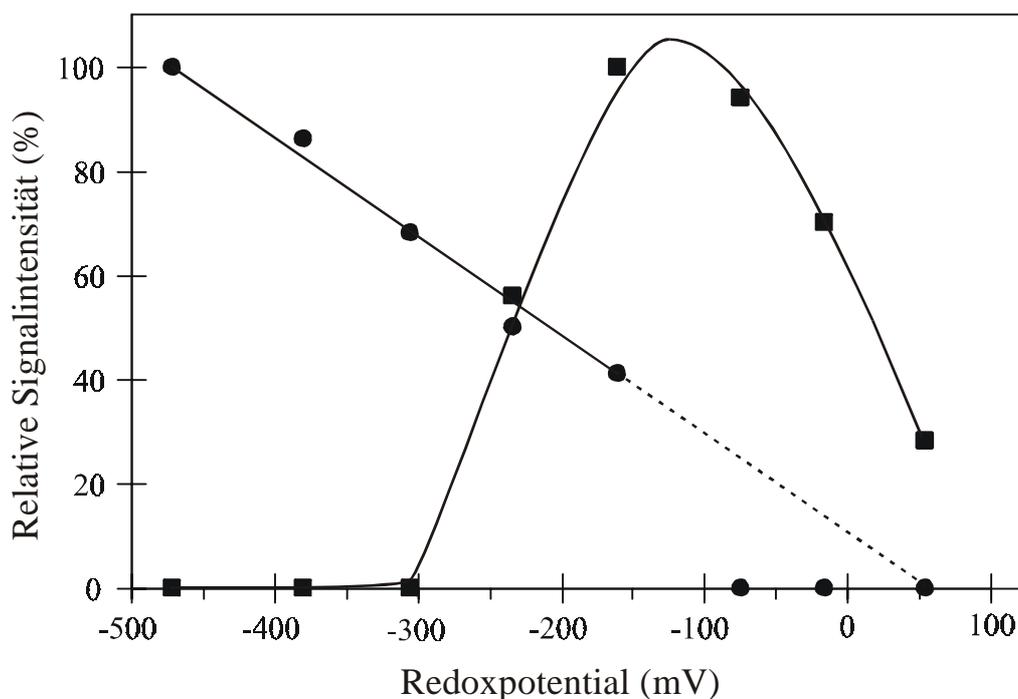
Überraschenderweise konnte in diesem Präparat kein S3-typisches Signal detektiert werden. Aufgrund des Fehlens dieses Signals konnte die bisher noch nicht beobachtete Resonanz des FeW-Cofaktors bei  $g = 2,01$  ansatzweise detektiert werden. Da das FeWco-Signal aufgrund der geringen Proteinkonzentration nur sehr schwach ausgeprägt war, musste ein Leerspektrum vom Probenspektrum subtrahiert werden. Daraus ergab sich zwangsläufig ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis, welches für die nicht vollständige Auflösung der Resonanz bei  $g = 2,01$  verantwortlich ist.

Die Tatsache, dass das S3-Signal nicht im Spektrum vorhanden war, deutet darauf hin, dass das Redoxzentrum, welches dieses Signal hervorruft, im Zuge der Probenpräparation verloren gegangen ist. Im Hinblick auf die ca. dreistündige Gelfiltration an Sephacryl S-200 erscheint die Annahme plausibel, dass während dieses Chromatographieschritts das entsprechende Redoxzentrum aus dem Protein entfernt wurde, und nicht während der kurzen, schonenderen Gelfiltration an Sephadex G-25.

Die Redoxtitration wurde wie beim nativen MoFe-Protein durchgeführt. Aufgrund der geringeren Proteinmenge wurden die Proben allerdings in größeren Potentialabständen (ca. 75 mV) dem Protein/Mediatoren-Gemisch entnommen. Zur Ermittlung der Potentialabhängigkeit des FeWco-Signals wurde das Protein in einem Potentialbereich von - 470 bis + 55 mV titriert, die Gesamtspektren (50 - 450 mT) bei 4 K mit 20 mW aufgenommen und die Signalintensität der Resonanz bei  $g = 3,93$  bestimmt.

Wie aus der Abb. 23 ersichtlich ist, unterscheidet sich die Redoxtitrationskurve des FeW-Cofaktors signifikant von der des FeMo-Cofaktors im Wildtyp-Enzym (siehe Abb. 20). Die Intensität des FeWco-Signals nahm – unter den angewendeten Bedingungen – mit steigendem Redoxpotential kontinuierlich ab. Ab einem Potential von - 75 mV konnte das FeWco-Signal bereits nicht mehr detektiert werden, während die Intensität des FeMoco-Signals (in einer analogen Redoxtitration mit dem nativen Enzym) bei diesem Potential sogar noch ca. 65 % der Ausgangsintensität betrug. Die kontinuierliche Zunahme der Intensität des FeWco-Signals mit sinkendem Potential und die Tatsache, dass die Redoxtitrationskurve bei dem niedrigsten erreichbaren Potential (- 470 mV) noch nicht abknickt, weisen darauf hin, dass das Maximum der Signalintensität bei noch tieferen Potentialen (als - 470 mV) liegt. Im Gegensatz dazu erreichte das FeMoco-Signal bereits bei - 300 mV das Intensitätsmaximum. Bei noch tieferen Redoxpotentialen blieb die Signalintensität konstant. Da die Lage des Intensitätsmaximums des FeW-Cofaktors unbekannt ist, wurde die höchste gemessene Intensität (bei - 470 mV) willkürlich auf 100 % gesetzt. Auch wenn das *tatsächliche* Halbstufenpotential des FeW-

Cofaktors nicht bestimmt werden konnte, lässt sich aufgrund dieser willkürlichen Festlegung ein „*apparentes*“ Halbstufenpotential von ca. - 200 mV angeben.



**Abb. 23: Redox-titrationskurven des W-haltigen Dinitrogenase-Proteins.** Die Redox-titration wurde wie in 2.14 beschrieben durchgeführt. Die Probe zu Beginn der Redox-titration enthielt 2 mg Dinitrogenase-Protein/ml (in 50 mM Hepes-Puffer, pH 7,4, 1 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , + Mediatoren). Die Aufnahme der Spektren erfolgte in einem Feldbereich von 50 - 450 mT mit einem Receiver Gain von  $2,5 \cdot 10^5$  und 5 Scans. Zur Bestimmung der relativen Signalintensität des FeWco-Signals wurde die Resonanz bei  $g = 3,93$  (gemessen bei 4 K mit 20 mW) ausgewertet. Die Signalintensität des P-Clusters im 1-Elektronen-oxidierten Zustand wurde bei 16 K mit 100 mW anhand der Resonanz bei  $g = 1,96$  ermittelt. Sämtliche Potentiale beziehen sich auf das Standardwasserstoffpotential bei pH 7,0. ●, FeWco; ■, P-Cluster. Die gestrichelte Linie indiziert den „hypothetischen“ weiteren (linearen) Verlauf der Redox-titrationskurve des FeW-Cofaktors, bei Potentialen, bei denen der Cofaktor aufgrund zu starken Rauschens nicht mehr eindeutig zu identifizieren war.

Da das tatsächliche Intensitätsmaximum des FeWco-Signals bei tieferen Potentialen als - 470 mV liegt, und somit das wirkliche Halbstufenpotential niedriger als - 200 mV ist, kann gefolgert werden, dass das Halbstufenpotential des FeW-Cofaktors im Vergleich zu dem des FeMo-Cofaktors ( $E_m = - 50$  mV) um mehr als 150 mV zu tieferen Potentialen verschoben liegt. Durch Rücktitration auf ein Potential von - 470 mV konnte das FeWco-Signal in seiner

ursprünglichen Intensität wieder erhalten werden. Daraus lässt sich schließen, dass der FeWco (i) während der Redoxtitration intakt bleibt und (ii) innerhalb der Potentialgrenzen von - 470 bis + 50 mV reversibel oxidierbar und wieder reduzierbar ist.

Außer dem FeWco-Signal konnte im Verlauf der Redoxtitration auch der P-Cluster im  $P^{ox1}$ -Zustand (bei 16 K mit 100 mW) nachgewiesen werden. Die g-Werte des P-Clusters in dem W-haltigen Protein waren identisch mit denen, die für das konventionelle Nitrogenasesystem ermittelt wurden ( $g = 2,06, 1,96$  und  $1,84$ ). Im Gegensatz zu den Unterschieden der Potentialabhängigkeiten zwischen FeMoco und FeWco, verhielten sich die P-Cluster der Mo- und der W-haltigen Nitrogenase identisch (siehe Abb. 23). Das P-Cluster-Signal des 1-Elektronen-oxidierten Zustands (W-Protein) konnte – wie auch beim Mo-haltigen nativen Enzym – erst ab einem Potential  $> - 300$  mV detektiert werden.

Aufgrund der großen Potentialabstände der gemessenen Proben konnte das Maximum des P-Cluster-Signals nicht genau bestimmt werden. Es lag jedoch – genau wie im Falle des konventionellen MoFe-Proteins – zwischen - 160 und - 75 mV. Bei einem Potential von ca. + 50 mV konnte, im Einklang mit den Ergebnissen aus der Redoxtitration mit dem Wildtyp-Enzym, noch eine relative Signalintensität zwischen 20 und 30 % gemessen werden.

Weitere Signale, wie die des P-Clusters in einer höheren Oxidationsstufe ( $P^{ox2}$ ,  $P^{ox3}$ ) konnten im Verlauf der Redoxtitration, hauptsächlich aufgrund der zu geringen Proteinkonzentration, nicht beobachtet werden.

### **3.6 Versuche zur Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase aus dem alternativen Nitrogenase-System von *R. capsulatus***

Da *R. capsulatus* nicht nur die konventionelle Mo-Nitrogenase sondern auch eine Fe-Nitrogenase zu bilden vermag [32], sollte überprüft werden, ob nicht eine W-haltige Nitrogenase auch mit dem alternativen Nitrogenase-System (Integration des FeW-Cofaktors in das FeFe-Protein) erzeugt werden kann.

Zu diesem Zweck sollte zuerst der Einfluss von  $WO_4^{2-}$  (und  $MoO_4^{2-}$  als Referenz) im Nährmedium auf die  $C_2H_2$ -Reduktion an Zellen einer Mutante bestimmt werden, welche nur die Fe-Nitrogenase bildet. Aus vorangegangenen Untersuchungen war bereits bekannt, dass die Bildung bzw. die Aktivität (als Maß für die Synthese) der Fe-Nitrogenase von *R. capsulatus* in einer  $\Delta nifHDK$ -Mutante durch 6 nM  $MoO_4^{2-}$  in der Nährlösung zu 50 %

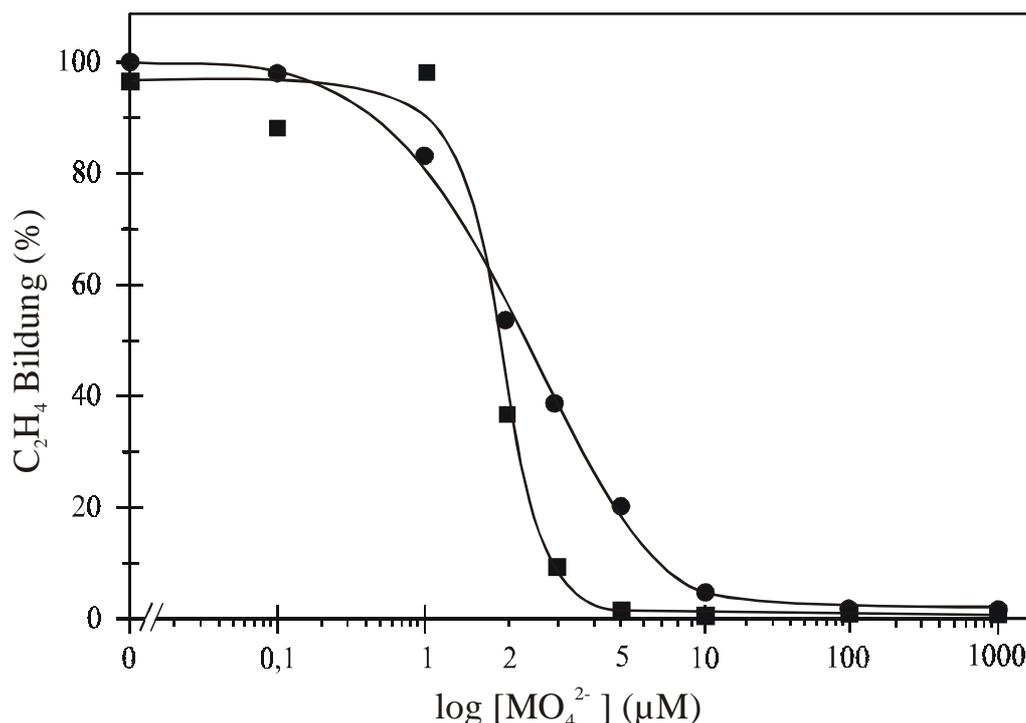
reprimiert bzw. reduziert wird [93]. Für eine  $\Delta nifHDK \Delta nifAB_{II} modABCD$ -Doppelmutante (kurz  $\Delta nifHDK \Delta mod$ ), die weder die Strukturproteine der Mo-Nitrogenase noch das „High-Affinity“-Molybdän-Transportsystem zu bilden vermag, konnte gezeigt werden, dass sich die zur 50 %-igen Reprimierung benötigte  $MoO_4^{2-}$ -Konzentration um ca. das 1000-fache ( $\sim 5 \mu M$ ) erhöht [81]. Basierend auf dieser Beobachtung wurde spekuliert, dass bei hohen  $MoO_4^{2-}$ -Konzentrationen im Nährmedium das Anion mithilfe des „Low-Affinity“-Molybdän-Transportsystems (LAMT-System) in die Zelle befördert wird [81]. Außerdem wurde vermutet, dass nicht die extrazelluläre  $MoO_4^{2-}$ -Konzentration, sondern der Mo-Gehalt innerhalb der Zelle (oder die Aktivierung des LAMT-Systems durch höhere  $MoO_4^{2-}$ -Konzentrationen) für die Reprimierung der Fe-Nitrogenase verantwortlich ist [81].

Da für die Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase aus dem alternativen Nitrogenasesystem sicherlich die Anzucht der Zellen mit hohen  $WO_4^{2-}$ -Konzentrationen erfolgen muss, wurde für die Zellkultivierung die  $MoO_4^{2-}$ -tolerante  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Doppelmutante gewählt. Inwiefern sich die Aktivität der Fe-Nitrogenase mit der  $WO_4^{2-}$ - bzw.  $MoO_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium ändert, sollte im Folgenden näher untersucht werden.

### **3.6.1 Einfluss der $WO_4^{2-}$ - bzw. $MoO_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium auf die Aktivität ganzer Zellen einer $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Mutante**

*Untersuchungen an einer bei 33 °C kultivierten Kultur.* Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Aktivität der Fe-Nitrogenase von der  $WO_4^{2-}$ - bzw.  $MoO_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium wurden Zellen einer  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Doppelmutante mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Oxoanionen kultiviert. Im Gegensatz zu den Zellanzuchten des Wildtyps (Mo-Nitrogenase) bei 35 °C wurden die  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Zellen, wie von Schneider et al. beschrieben, zunächst bei 33 °C angezogen [103].

Wie in Abb. 24 dargestellt, verringerte sich die Aktivität der Fe-Nitrogenase um die Hälfte bei einer Konzentration von  $2 \mu M$   $WO_4^{2-}$  im Nährmedium, während eine 50 %-ige Inaktivierung durch  $MoO_4^{2-}$  bereits bei einer Konzentration zwischen 1 und  $2 \mu M$  erfolgte. Die Abnahme der Aktivität (Zunahme der Repression) durch  $MoO_4^{2-}$  verlief wesentlich drastischer, d. h. in einem engeren Konzentrationsbereich (steilerer Abfall der Aktivität), als die durch das  $WO_4^{2-}$  bedingte Verringerung der  $C_2H_2$ -Reduktionsrate. Im Falle des  $MoO_4^{2-}$  konnte im Konzentrationsbereich von 1 bis  $3 \mu M$  eine Abnahme der Aktivität um ca. 90 % gemessen werden. Der Einfluss des  $WO_4^{2-}$  auf die Aktivität der Fe-Nitrogenase war hingegen in diesem Konzentrationsbereich nicht ganz so drastisch (Abnahme der Aktivität von ca. 85 auf 35 %).



**Abb. 24: Einfluss der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>- bzw. WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium auf die Aktivität einer  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Mutante.** Die Zellen einer  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Mutante wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> bzw. WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, in den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen, bei 33 °C kultiviert. Die Aktivitätstests wurden an Zellsuspensionen durchgeführt, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden (nach ca. 20 h). 100 % Aktivität entsprechen 150 nmol gebildetes C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> pro ml Zellsuspension pro Stunde. Der Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 µM wurde der Übersicht halber „gestreckt“ dargestellt. ■, M = Mo; ●, M = W.

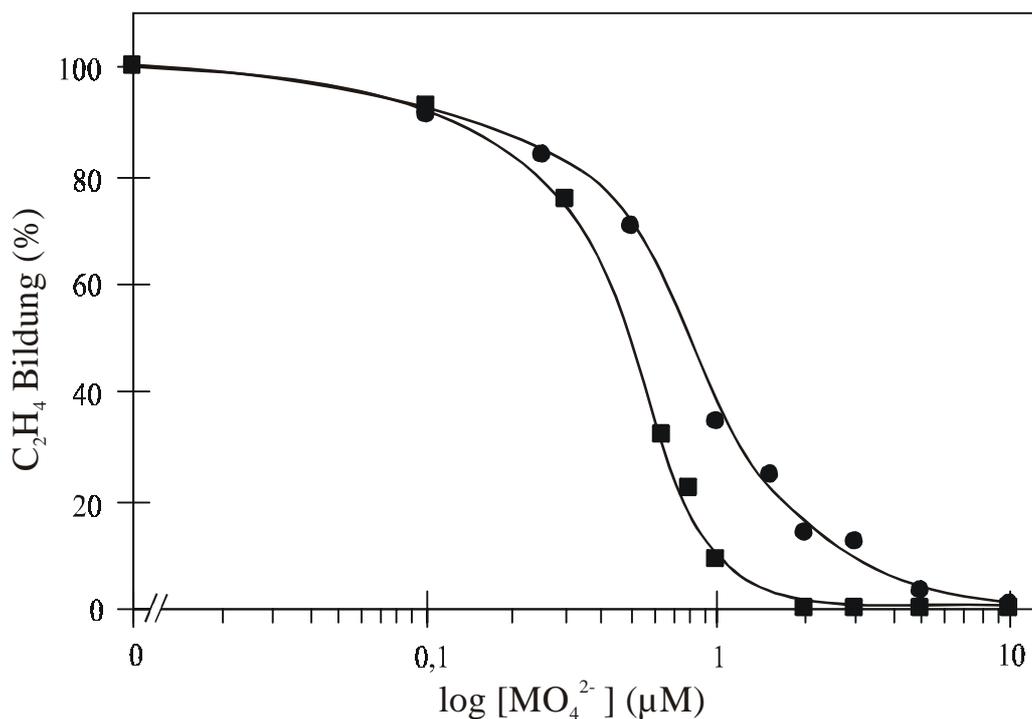
Aufgrund der rapiden Abnahme der Nitrogenaseaktivität in einem sehr begrenzten Konzentrationsbereich scheint die Regulation der Fe-Nitrogenase-Expression über eine Art „molekularen Schaltmechanismus“ zu verlaufen. Folgender Prozess könnte sich dabei abspielen: Da in der eingesetzten Mutante das hochspezifische HAMT-System fehlt, wird unterhalb einer Konzentration von 1 µM kein MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> aufgenommen. In einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 3 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> wird das LAMT-System exprimiert („eingeschaltet“) und kann somit das Oxoanion in die Zelle befördern, wo es sofort die Expression der Fe-Nitrogenase unterbindet. Es ist auch denkbar, dass MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, im oben angegebenen Konzentrationsbereich, die bereits exprimierten Proteine des LAMT-Systems aktiviert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das Sulfat-Transportsystem, ähnlich wie in *E. coli* [123], die zur Reprimierung der Fe-Nitrogenase notwendigen Mengen an MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in die Zelle schleust. Dieses für MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> unspezifische Transportsystem würde erst in

Gegenwart höherer  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen wirksam werden. Ob das Sulfat-Transportsystem in *R. capsulatus* tatsächlich mit dem LAMT-System identisch ist, ist derzeit allerdings noch nicht geklärt. Jedoch könnten ausführliche Untersuchungen (i) zur Abhängigkeit des intrazellulären Metallgehalts von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium, und (ii) zum Einfluss von  $\text{SO}_4^{2-}$  auf die Nitrogenaseaktivität, Aufschluss darüber geben, welche der oben angegebenen Möglichkeiten zur Regulierung der Expression der alternativen Nitrogenase benutzt wird.

*Untersuchungen an einer bei 35 °C kultivierten Kultur.* Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration für die 50 %-ige Abnahme der Aktivität der Fe-Nitrogenase (1 - 2  $\mu\text{M}$ ) war geringer als die von Wang et al. bestimmte Konzentration (4 - 5  $\mu\text{M}$ ) [81]. Jedoch basiert der von den Autoren ermittelte Konzentrationswert auf einer Zellkultivierung bei einer tieferen Temperatur (30 °C). Ein signifikanter Einfluss der Temperatur auf die Molybdänaufnahme konnte bereits an *A. vinelandii* demonstriert werden [124]. So nehmen Zellen bei 20 °C oder tieferen Temperaturen nur geringe Mengen an  $\text{MoO}_4^{2-}$  auf, sodass eine Reprimierung der Mo-unabhängigen Nitrogenasen nur in geringem Umfang stattfindet, d. h. dass alle drei Nitrogenasesysteme in *A. vinelandii* synchron exprimiert werden.

Um zu überprüfen, ob im Fall der  $\Delta\text{nifHDK } \Delta\text{mod}$ -Mutante die Inkubationstemperatur die Reprimierung der Fe-Nitrogenase durch  $\text{MoO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$  beeinflusst, wurde die  $[\text{MoO}_4^{2-}]$ - bzw.  $[\text{WO}_4^{2-}]$ -Abhängigkeit der Aktivität auch von Zellen, die bei 35 °C (Standardbedingungen für die Mo-Nitrogenase) angezogen wurden, bestimmt.

Wie in Abb. 25 dargestellt, nahm die Aktivität unter solchen Bedingungen schon bei einer  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. einer  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration von 0,8  $\mu\text{M}$  um die Hälfte ab. Die Inhibierung durch  $\text{MoO}_4^{2-}$  verlief – wie bei der Zellanzucht mit 33 °C – erheblich stärker (engerer Konzentrationsbereich) als durch  $\text{WO}_4^{2-}$ . Jedoch waren die Konzentrationen der beiden Oxoanionen, die zur 50 %-igen „Inaktivierung“ der Fe-Nitrogenase benötigt wurden, deutlich (um ca. das 3-fache) geringer als die für die Zellkultivierung bei 33 °C ermittelten Werte (siehe Abb. 24).



**Abb. 25: Einfluss der  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium auf die Aktivität einer bei 35 °C kultivierten  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Mutante.** Die Zellen einer  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Mutante wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und  $\text{MoO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ , in den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen, bei 35 °C kultiviert. Die Aktivitätstests wurden an Zellsuspensionen durchgeführt, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befanden (nach ca. 20 h). 100 % Aktivität entsprechen 100 nmol gebildetes  $\text{C}_2\text{H}_4$  pro ml Zellsuspension pro Stunde. ■, M = Mo; ●, M = W.

Insgesamt kann gefolgert werden, dass sich bei einer Erniedrigung der Temperatur die zur Reprimierung der Fe-Nitrogenase benötigte  $\text{MoO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Konzentration erhöht. Die von Wang et al. ermittelte höhere  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration bei einer Zellanzucht bei 30 °C (4 - 5  $\mu\text{M}$  [81]) steht somit im Einklang mit den hier beschriebenen Ergebnissen. Die Temperaturabhängigkeit der Fe-Nitrogenase-Reprimierung lässt außerdem auf eine Abhängigkeit der Expression oder Aktivierung des LAMT-Systems von der Temperatur schließen, da allein dieses Transportsystem für die  $\text{MoO}_4^{2-}$ - bzw.  $\text{WO}_4^{2-}$ -Aufnahme in einer  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Mutante verantwortlich ist [81]. Die Beobachtungen, dass die Aufnahme von Metallionen in *A. vinelandii* ebenfalls stark temperaturabhängig ist [124], und dass die alternative V-haltige Nitrogenase aus *Azotobacter chroococcum* bei tieferen Temperaturen aktiver ist, als die Mo-haltige Nitrogenase des gleichen Organismus [125], weisen auf die große physiologische Bedeutung hin, die alternative Nitrogenase-Systeme bei tieferen

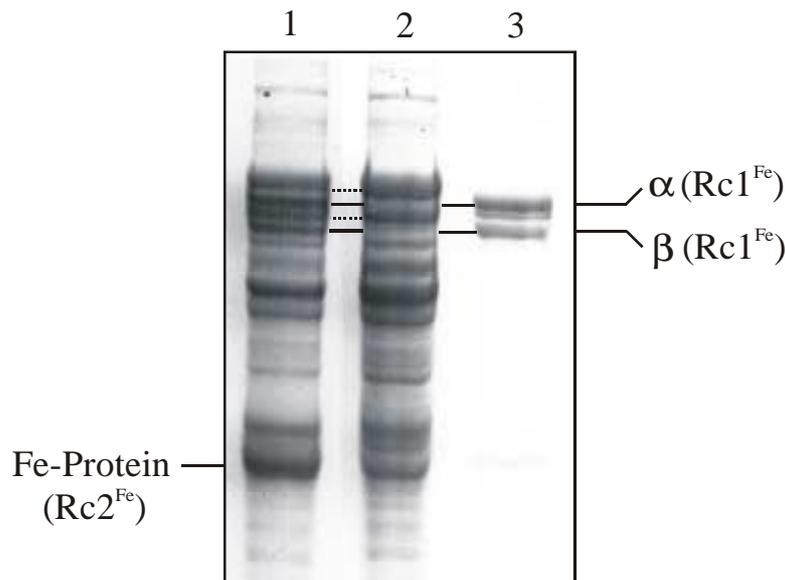
Temperaturen, d. h. vor allem in kalten Jahreszeiten haben. Es scheint also, dass die Existenz der alternativen Nitrogenasesysteme hauptsächlich in ihrer Fähigkeit, bei niedrigen Temperaturen besser  $N_2$  zu fixieren, begründet liegt. Eine solche Hypothese wurde bereits von Miller und Eady formuliert [125]. Die hier präsentierten Ergebnisse unterstützen diese Theorie, da die Bildung der Fe-Nitrogenase aus *R. capsulatus* bei tieferen Temperaturen aufgrund der späteren Expression oder Aktivierung des LAMT-Systems nicht so stark durch  $MoO_4^{2-}$  reprimiert wird. Eine effizientere  $N_2$ -Fixierung durch alternative Nitrogenasen bei niedrigen Temperaturen könnte somit in dem Zusammenspiel von der Verminderung der  $MoO_4^{2-}$ -Aufnahme in die Zelle (notwendig zur Expression der alternativen Nitrogenasen auch bei höheren extrazellulären  $MoO_4^{2-}$ -Konzentrationen) und ihrer – im Vergleich zum konventionellen Nitrogenase-System – höheren Aktivität, begründet liegen. Wahrscheinlich ist dies auch der Grund, warum die Natur im Verlauf der Evolution die weniger effizient „arbeitenden“ alternativen Nitrogenasen (geringere Aktivität, höhere  $H_2$  Produktion) nicht aufgegeben bzw. zusätzlich entwickelt hat.

### 3.6.2 Einfluss von $WO_4^{2-}$ auf die Expression der Fe-Nitrogenase

Um eindeutig zu beweisen, dass die Verringerung der Aktivität durch die Erhöhung der  $WO_4^{2-}$ -Konzentration von 1 auf 10  $\mu M$  (siehe Abb. 24) tatsächlich auf die Reprimierung der Fe-Nitrogenase zurückzuführen ist, wurden Extrakte dieser Zellen gelelektrophoretisch auf die Anwesenheit des FeFe-Proteins untersucht.

Dazu wurden zwei Kulturen von Zellen einer  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Mutante in Gegenwart von  $WO_4^{2-}$  (1 bzw. 10  $\mu M$ ) im Nährmedium bei 33 °C angezogen und die Aktivität vor der Zellernte bestimmt. In Übereinstimmung mit den in Abb. 24 dargestellten Aktivitätswerten zeigten die mit 1  $\mu M$   $WO_4^{2-}$  kultivierten Zellen eine Aktivität von 110 nmol gebildetes  $C_2H_4/ml \cdot h$ , während die mit 10  $\mu M$   $WO_4^{2-}$  angezogenen Zellen fast gänzlich inaktiv (5 nmol/ml·h) waren. Nach der Extraktpräparation wurden die Proteine mittels SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese getrennt und die Bandierung der Proteine im Gel untersucht. Das SDS-Gel ist in Abb. 26 dargestellt.

Durch das Auftragen einer gereinigten FeFe-Proteinprobe (Bahn 3) gelang die Identifizierung zweier Proteinbanden im Extrakt aus mit 1  $\mu M$   $WO_4^{2-}$  angezogenen Zellen als die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit des FeFe-Proteins (durchgezogene Linie). Außerdem erschien im Gel auf Bahn 1 eine dominante Proteinbande, die dem Fe-Protein (AnfH) der alternativen Nitrogenase zugeordnet werden konnte.



**Abb. 26: SDS-Polyacrylamidgel zur Darstellung der  $\text{WO}_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Expression der Fe-Nitrogenase.** Die  $\Delta nifHDK \Delta mod$ -Zellen wurden in Gegenwart von Serin (2,3 mM) und  $\text{WO}_4^{2-}$  (1 bzw. 10  $\mu\text{M}$ ) bei 33 °C für 20 h kultiviert. Nach dem Zellaufschluss wurden die löslichen Extrakte einer SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese unterzogen. Außerdem wurde zur Identifizierung der Untereinheiten des FeFe-Proteins eine Probe des gereinigten Proteins auf das Gel aufgetragen. Bahn 1: 1  $\mu\text{M}$   $\text{WO}_4^{2-}$  (12  $\mu\text{g}$  Extraktprotein); Bahn 2: 10  $\mu\text{M}$   $\text{WO}_4^{2-}$  (10  $\mu\text{g}$ ); Bahn 3: gereinigtes FeFe-Protein (3  $\mu\text{g}$ ).

In Extrakten von Zellen, die mit  $\text{WO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  kultiviert wurden, konnte das FeFe-Protein jedoch nicht nachgewiesen werden. Hieraus folgt, dass der beobachtete Aktivitätsverlust tatsächlich auf die Reprimierung der Fe-Nitrogenasesynthese zurückzuführen ist und dass somit eine Isolierung eines W-haltigen FeFe-Proteins, zumindest *in-vivo*, nicht möglich ist.

### 3.7 Untersuchungen zur Bildung einer Rhenium-Nitrogenase aus *R. capsulatus*

Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Rhenium und Molybdän wurde spekuliert, dass eine Re-haltige Nitrogenase (Re als Heterometall im Cofaktor (FeReco) der Dinitrogenase-Komponente) evtl. in der Lage wäre,  $\text{N}_2$  zu fixieren [126]. Die im Hinblick auf die Bildung einer Re-haltigen Nitrogenase wichtigen Gemeinsamkeiten sollen im Folgenden kurz

dargestellt werden. (i) Sowohl Rhenium als auch Molybdän bilden unter physiologischen Bedingungen (wässrige Lösungen, pH ~ 7) stabile Oxoanionen, welche – zumindest im Fall von  $\text{MoO}_4^{2-}$  – eine zentrale Rolle bei der Aufnahme der Metalle in die Zelle spielen. (ii) Desweiteren sind beide Metalle in der Lage Tetrathioanionen ( $\text{MoS}_4^{2-}$  bzw.  $\text{ReS}_4^-$ ) zu bilden, die evtl. als Vorstufe zur Cofaktorbiosynthese dienen könnten. (iii) An einer Reihe von Clustern des Typs  $\text{MFe}_3\text{S}_4$  (M = Mo, W, Re, etc.) konnte demonstriert werden, dass sich die  $[\text{MoFe}_3\text{S}_4]^{3+}$ - und  $[\text{ReFe}_3\text{S}_4]^{4+}$ -Einheiten in diesen Verbindungen sehr stark in ihrer Geometrie ähneln, und dass sowohl die Fe-S als auch die Mo-S- bzw. Re-S-Abstände nahezu identisch sind [127]. (iv) Außerdem verfügen Rhenium und Molybdän über eine gewisse Variationsbreite bzgl. ihrer Oxidationsstufen. Diese Eigenschaft scheint von zentraler Bedeutung für die  $\text{N}_2$ -Fixierung zu sein, da – im Gegensatz zu Fe – Mo, V und auch Re besonders gut für Mehrelektronen-Prozesse, wie sie zur Reduktion von  $\text{N}_2$  erforderlich sind, geeignet sind [128, 126]. Aufgrund der geringen Konzentration und wenig gleichmäßigen Verteilung von Re- Verbindungen in der Erdkruste spielt Rhenium biogeochemisch allerdings keine Rolle. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass bisher noch keine natürlich vorkommende Re-haltige Nitrogenase nachgewiesen wurde. Dies bedeutet jedoch nicht, dass eine durch Zellanzucht in Gegenwart hoher  $\text{ReO}_4^-$ -Konzentrationen artifiziell erzeugte Re-haltige Nitrogenase inaktiv sein muss.

Anhand von Arbeiten zum Einfluss von  $\text{ReO}_4^-$  auf die konventionelle Nitrogenase von *A. vinelandii* wurde bereits die Bildung einer Rhenium-haltigen Nitrogenase postuliert [89]. Im Verlauf der Isolierung bzw. Reinigung des Re-haltigen Proteins verringerte sich jedoch zunehmend der Re-Gehalt des Präparates, sodass letztlich die Bildung einer Re-haltigen Nitrogenase, bei der das Molybdänzentrum im FeMoco durch Rhenium substituiert wird, nicht eindeutig bewiesen werden konnte.

### 3.7.1 Einfluss von $\text{ReO}_4^-$ auf das Zellwachstum und die Nitrogenaseaktivität

Um die Bildung einer Re-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* zu untersuchen, wurde zuerst der Einfluss der  $\text{KReO}_4$ -Konzentration im Nährmedium auf das Zellwachstum und die Nitrogenaseaktivität bestimmt. Dazu wurden Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Endkonz.: 1  $\mu\text{M}$ ) sowie unterschiedlichen  $\text{KReO}_4$ -Konzentrationen (0 - 1 mM) angezogen und das Zellwachstum ( $E_{600}$ ) sowie die Nitrogenaseaktivität der Zellen gemessen. Bei keiner der verwendeten  $\text{KReO}_4$ -Konzentrationen konnte jedoch eine Abweichung vom Zellwachstum oder von der katalytischen Aktivität, im Vergleich zu einer Perrhenat-freien

Referenzkultur, detektiert werden. Auch bei *anfA*<sup>-</sup>-Zellen, die in MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-abgereichertem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von KReO<sub>4</sub> (0 - 1 mM) angezogen wurden, konnten keine von einer Referenzkultur (*anfA*<sup>-</sup>-Mutante in Mo-defizientem Medium) signifikant abweichenden Aktivitätswerte festgestellt werden. Eine marginale Erhöhung der Aktivität bei hohen ReO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Konzentrationen (> 10 µM) war wahrscheinlich auf das Einschleppen von Spuren von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in das Nährmedium durch die Zugabe des KReO<sub>4</sub> zurückzuführen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass ReO<sub>4</sub><sup>-</sup>, zumindest *in-vivo*, keinen Effekt auf die Nitrogenase-Aktivität ausübt.

Von *anfA*<sup>-</sup>-Zellen, die in Mo-defizientem Medium in Gegenwart von ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> (10 µM) kultiviert worden waren, wurden hoch konzentrierte Extrakte hergestellt und diese anschliessend EPR-spektroskopisch untersucht. Die Spektren wiesen jedoch keine EPR-Signale auf, die auf einen veränderten Cofaktor (FeReco) hindeuteten (Spektrum nicht dargestellt).

Da ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> keinen Einfluss auf die Nitrogenaseaktivität ausübt, sollte im Folgenden geklärt werden, ob das Anion überhaupt von der Zelle aufgenommen wird. Bevor allerdings Untersuchungen zur Aufnahme von ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> durchgeführt wurden, sollte die MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Aufnahme einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante (als Referenz) näher studiert werden.

### 3.7.2 Aufnahme von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante

In Untersuchungen zur Mo-Akkumulation in *R. capsulatus*-Zellen konnte gezeigt werden, dass die ermittelten intrazellulären Mo-Gehalte hohen Schwankungen unterlagen [129]. Die Schwankungen der Messwerte wurden dabei auf das Vorhandensein von einer die *R. capsulatus*-Zellen umgebenden schleimhaltigen Kapselhülle [130] zurückgeführt, welche im Nährmedium enthaltenes MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> adsorbiert. Das wahrscheinlich an der Kapsel anhaftende MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> konnte sogar durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit HEPES-Puffer oder einer Kochsalzlösung nicht vollständig entfernt werden [129].

Falls die Kapselhülle von *R. capsulatus* Metallionen tatsächlich in größeren Mengen adsorbiert, auf diese Weise sogar eine gewisse Metallionen-Speicherfunktion übernehmen könnte, dann wären die Messungen zur Bestimmung des tatsächlichen intrazellulären Metallgehalts auf der Basis der oben genannten Zellwaschungen nur äußerst ungenau, weil beim anschließenden Zellaufschluss (NaOH-Behandlung) die Kapsel-assoziierten Metallionen mit in den löslichen Extrakt gelangen würden.

Um den tatsächlichen intrazellulären Mo-Gehalt der Zellen genauer zu bestimmen, sollte daher die Waschprozedur um eine Behandlung der Zellen mit Aceton – wie sie auch im

Rahmen der Proteinbestimmung ganzer Zellen angewendet wurde (siehe Abschnitt 2.10.1) – ergänzt werden. Durch das Lösungsmittel wird die schleimhaltige Kapsel zerstört und farbige Pigmente, die bei der UV-VIS-spektroskopischen Messung des Proteingehalts stören würden, entfernt [98].

Um den Einfluss der Acetonbehandlung auf den Mo-Gehalt zu untersuchen, wurden *anfA*<sup>-</sup>-Zellen in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 μM) kultiviert und wie unter 2.15.1 beschrieben geerntet. Anschließend wurde mit einem Teil des Zellpellets der Proteingehalt der Zellen bestimmt und der Rest für die Bestimmung des Metallgehalts verwendet. Zur Ermittlung des intrazellulären Mo-Gehalts wurde das Zellpellet weiter portioniert. Während ein Teil nach der konventionellen Methode (mit HEPES-Puffer) gewaschen wurde, so wurden die anderen Portionen des Zellpellets einer unterschiedlichen Anzahl von zusätzlichen Acetonwaschschritten (2 x, 3 x und 6 x) unterzogen. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese mit 2%-iger NaOH bei 100 °C aufgeschlossen, die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Mo-Gehalt des löslichen Überstands mittels ICP-MS bestimmt. Die Abhängigkeit der detektierten Mo-Konzentration von der Anzahl der Acetonbehandlungsschritte ist in Tab. 6 dargestellt.

**Tab. 6: Abhängigkeit des gemessenen intrazellulären Mo-Gehalts von der Anzahl der Acetonbehandlungen.** Die Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante wurden in Gegenwart von Serin (5 mM) und MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 μM) kultiviert. Die Zellernte und die Waschschritte wurden wie unter 2.15.1 beschrieben durchgeführt, wobei die Anzahl der Acetonbehandlungen, wie in der Tabelle angegeben, variiert wurde. Nach alkalischem Zellaufschluss wurde der intrazelluläre Mo-Gehalt durch ICP-MS bestimmt und mit dem zuvor ermittelten Gesamtproteingehalt der Zellen korreliert. Für die Bestimmung des Mo-Gehalts wurde ein Fehler von ± 15 % veranschlagt.

| Anzahl an<br>Acetonwaschschritten | Mo-Gehalt<br>(nmol/g Protein) |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| 0                                 | 1000                          |
| 2                                 | 320                           |
| 3                                 | 250                           |
| 6                                 | 200                           |

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, sank die gemessene intrazelluläre Mo-Konzentration nach zwei Acetonbehandlungsschritten bereits um 2/3 im Vergleich zur Mo-Konzentration, die im Anschluss an die konventionelle Waschmethode gemessen wurde. Durch weitere Behandlungen mit Aceton wurde der Mo-Gehalt nur geringfügig gesenkt, was wahrscheinlich auf den Verlust von geringen Mengen an Zellpellet beim Abdekantieren der Acetonphase nach der Zentrifugation zurückzuführen ist. Die hier beschriebenen Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu: (i) Der tatsächliche intrazelluläre Mo-Gehalt der Zellen ist wesentlich geringer als der ohne Acetonbehandlung bestimmte. (ii) Hieraus folgt, dass die Kapselhülle beträchtliche Mengen an  $\text{MoO}_4^{2-}$  speichert. (iii) Bereits nach zwei bis drei Waschschritten wird ein Grenzwert annähernd erreicht, der die intrazelluläre Mo-Konzentration widerspiegelt. (iv) Die Zellen bleiben nach der Acetonbehandlung intakt (d. h. es tritt keine intrazelluläre Flüssigkeit und somit  $\text{MoO}_4^{2-}$  aus), da sich der Mo-Gehalt nach sechs Acetonbehandlungen einem Grenzwert näherte und nicht weiter deutlich abfiel.

Die Beseitigung des  $\text{MoO}_4^{2-}$  durch die Behandlung mit Aceton beruht auf der Zerstörung der schleimhaltigen Kapselhülle. Die eigentliche Entfernung des  $\text{MoO}_4^{2-}$  geschieht allerdings erst durch die Waschung mit EDTA-haltigem Hepes-Puffer nach der Acetonbehandlung (Ergebnis nicht dargestellt).

### 3.7.3 Aufnahme von $\text{ReO}_4^-$ in Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante

Um die Fähigkeit von *anfA*<sup>-</sup>-Zellen zur Aufnahme von  $\text{ReO}_4^-$  zu überprüfen, wurden zwei Kulturen angezogen. Während der einen Kultur  $\text{ReO}_4^-$  (in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ ) zugesetzt wurde, wurde die andere in Gegenwart von  $\text{ReO}_4^-$  (10  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{MoO}_4^{2-}$  (1  $\mu\text{M}$ ) kultiviert. Nach der Zellernte wurden die Zellsuspensionen jeweils in zwei Teile portioniert. Ein Teil wurde dem konventionellen Waschverfahren unterzogen, der andere zusätzlich zweimal mit Aceton gewaschen. Nach alkalischem Zellaufschluss und der Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurden der Mo- und Re-Gehalt des löslichen Überstands mittels ICP-MS bestimmt.

Die ermittelten intrazellulären Mo- und Re-Konzentrationen sind in Tab. 7 aufgeführt und lassen folgende Schlussfolgerungen zu: (i) Die marginalen Re-Gehalte nach einer Acetonbehandlung der Zellen belegen eindeutig, dass signifikante Mengen des Anions nicht von den Zellen aufgenommen werden. (ii) Außerdem scheint die Affinität der Kapselhülle für  $\text{ReO}_4^-$  sehr gering zu sein. Während  $\text{MoO}_4^{2-}$  in großen Mengen an die Kapsel adsorbiert (große Differenz zwischen den Mo-Gehalten mit  $(1600 \pm 240 \text{ nmol/g})$  und ohne

( $350 \pm 50$  nmol/g) Acetonbehandlung), konnten nur geringe Mengen, an die Kapselhülle assoziiertes  $\text{ReO}_4^-$  nachgewiesen werden ( $170 \pm 25$  nmol/g). (iii) Desweiteren scheint  $\text{MoO}_4^{2-}$  die Adsorption von  $\text{ReO}_4^-$  an die Kapselhülle zu hemmen, da die Menge an adsorbiertem  $\text{ReO}_4^-$  in unter Mo-defizienten Bedingungen angezogenen Zellen ( $170 \pm 25$  nmol/g) weitaus größer war als die, welche in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  kultivierten Zellen ( $10 \pm 1,5$  nmol/g) bestimmt wurde.

**Tab. 7: Abhängigkeit des intrazellulären Mo- bzw. Re-Gehalts in *anfA*<sup>-</sup>-Zellen von der zugesetzten Metallionenkonzentration im Nährmedium und vom Zellwasch-Verfahren.** Die Zellen einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante wurden in Mo-abgereichertem Medium in Gegenwart von Serin (5 mM) und  $\text{MoO}_4^{2-}$  bzw.  $\text{ReO}_4^-$ , in den in der Tabelle angegebenen Konzentrationen, für 20 h angezogen. Die Zellernte und die Waschschrte, mit (+) und ohne (-) Aceton, wurden wie unter 2.15.1 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen alkalisch aufgeschlossen und der Metallgehalt der löslichen Fraktion durch ICP-MS bestimmt. Für die Bestimmung des Mo- bzw. Re-Gehalts wurde ein Fehler von  $\pm 15$  % veranschlagt.

| Zellanzucht in Gegenwart<br>von       |                                    | Aceton-<br>Behandlung | Mo-Gehalt<br>(nmol/g Protein) | Re-Gehalt<br>(nmol/g Protein) |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| $\text{MoO}_4^{2-}$ ( $\mu\text{M}$ ) | $\text{ReO}_4^-$ ( $\mu\text{M}$ ) |                       |                               |                               |
| –                                     | 10                                 | –                     | 15                            | 170                           |
| –                                     | 10                                 | +                     | 10                            | < 0,1                         |
| 1                                     | 10                                 | –                     | 1600                          | 10                            |
| 1                                     | 10                                 | +                     | 350                           | < 0,1                         |

Aufgrund der im Vergleich zum  $\text{ReO}_4^-$  hohen Affinität des  $\text{MoO}_4^{2-}$  zur Kapselhülle kann vermutet werden, dass  $\text{MoO}_4^{2-}$  selektiv an die Kapsel adsorbiert wird, und dass diese somit als Mo-Speicher fungieren kann. Vielleicht ist die Fähigkeit der Kapselhülle,  $\text{MoO}_4^{2-}$  zu speichern auch der Grund, warum *R. capsulatus* auf ein Mo-Speicherprotein, wie es für *A. vinelandii* bereits nachgewiesen werden konnte [117], verzichtet.

Da  $\text{ReO}_4^-$  nicht in die Zelle befördert werden kann, lässt sich eine Rhenium-haltige Nitrogenase aus *R. capsulatus* nicht *in-vivo* erzeugen. Die im Falle der Re-haltigen

Nitrogenase aus *A. vinelandii* gemessenen geringen Re-Gehalte des Nitrogenaseproteins [89] lassen sich im Hinblick auf die hier dargestellten Ergebnisse wahrscheinlich auf elektrostatische Wechselwirkungen des Anions mit positiv geladenen Aminosäuregruppen des MoFe-Proteins zurückführen. Da die Zellen zur Isolierung der Re-haltigen Nitrogenase aus *A. vinelandii* vor dem Zellaufschluss nur einmal mit Tris-Puffer, und somit wahrscheinlich nicht „Rhenium-frei“ gewaschen wurden, sind solche Wechselwirkungen durchaus denkbar.

## **Teil B: Untersuchungen zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors an einer *nifE*-Mutante von *R. capsulatus***

In zahlreichen Untersuchungen an verschiedenen Organismen konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt von *nifE* essentiell für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors und somit für die Mo-abhängige N<sub>2</sub>-Fixierung ist [44, 59, 57]. Zellen mit Mutationen im *nifE*-Gen zeichnen sich i. A. durch einen Nif<sup>-</sup>-Phänotyp (kein diazotrophes Wachstum) aus und akkumulieren eine Cofaktor-lose und daher inaktive Apo-Dinitrogenase [44, 59].

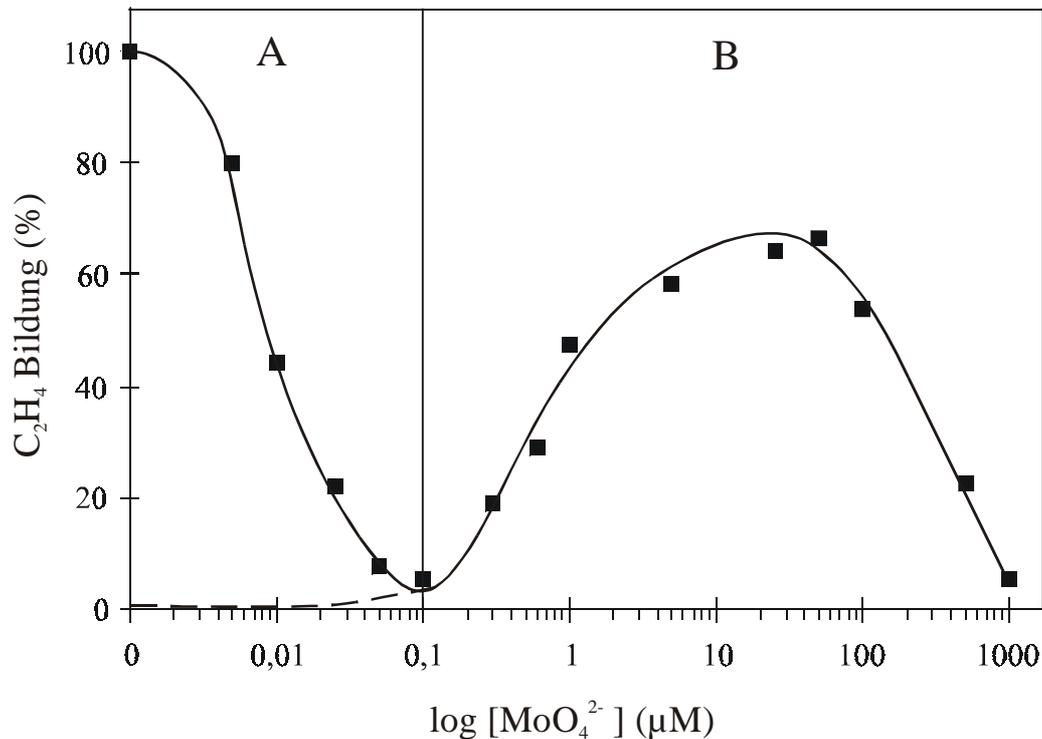
In anfänglichen Versuchen zur Isolierung einer Cofaktor-losen Apo-Dinitrogenase aus einer apolaren *nifE*-Mutante von *R. capsulatus* konnte jedoch eine geringe Restaktivität sowohl mit Zellextrakten, als auch mit ganzen Zellen gemessen werden. Überraschenderweise konnten bei Aktivitätsmessungen an ganzen Zellen der *nifE*-Mutante nicht nur C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> als Reaktionsprodukt der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion, sondern auch beträchtliche Mengen an C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ~ 6 - 12 %) nachgewiesen werden. Die Weiterreduktion des C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> zu C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ist für Mo-abhängige Nitrogenasen äußerst ungewöhnlich. Der Anteil des produzierten C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> im Bezug auf C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> liegt bei der konventionellen Nitrogenase des Wildtyps von *R. capsulatus* bei nur ca. 0,03 % [32, 131]. Desweiteren ergab sich im Zuge der Vorversuche zur Isolierung der Apo-Dinitrogenase ein erster Hinweis darauf, dass die gemessene Aktivität von der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium abhängt.

Aufgrund dieser überraschenden Befunde sollten eingehende Untersuchungen zum Ursprung der erwähnten Phänomene (Aktivität einer eigentlich Cofaktorbiosynthese-defekten Mutante und hoher C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Anteil) durchgeführt werden.

### **3.8 Abhängigkeit der *in-vivo* Nitrogenaseaktivität verschiedener *nifE*-Mutanten von der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium**

Um zu beurteilen, ob die MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration in der Nährlösung tatsächlich einen Einfluss auf die Aktivität ganzer Zellen der apolaren *nifE*-Mutante besitzt, wurden die Zellen mit MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in verschiedenen Konzentrationen (0 - 1 mM) kultiviert und die Aktivität (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion) der Zellen bestimmt. Wie aus Abb. 27 ersichtlich ist, war die Aktivität deutlich von der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium abhängig. Die Abbildung kann in zwei

Sektionen aufgeteilt werden: Sektion A umfasst einen  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationsbereich von 0 bis 0,1  $\mu\text{M}$ , während die zweite (B) höhere  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen einschließt (0,1 bis  $10^3 \mu\text{M}$ ).



**Abb. 27: Abhängigkeit der  $\text{C}_2\text{H}_4$ -Bildung ganzer Zellen einer apolaren *nifE*-Mutante von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium.** Die Zellen wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und mit den in der Abbildung angegebenen  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen, kultiviert. 100 % Aktivität entsprechen 190 nmol gebildetes  $\text{C}_2\text{H}_4/\text{ml}\cdot\text{h}$ . Die gestrichelte Linie indiziert die Aktivitäten, die mit ganzen Zellen einer apolaren *nifE anfA*-Doppelmutante erhalten wurden. Die bei höheren  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentrationen ( $> 0,1 \mu\text{M}$ ) gemessenen Aktivitäten dieser Mutante waren identisch mit denen, die auch für die einfache *nifE*-Mutante detektiert wurden.

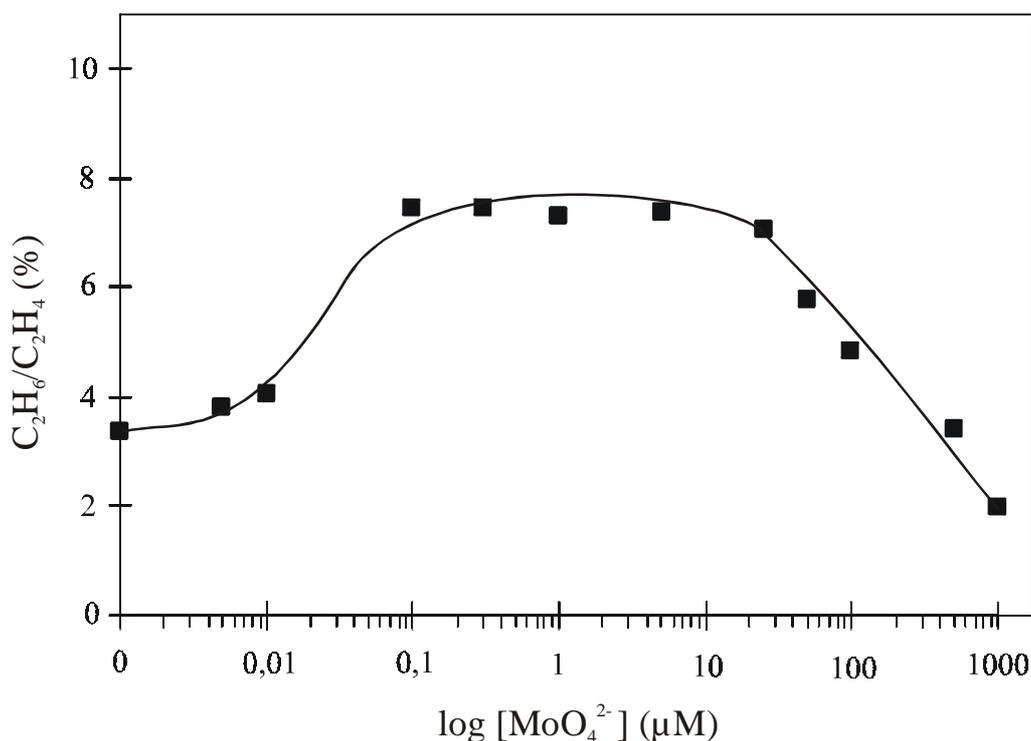
In Sektion 1 führte eine steigende  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium zu einem drastischen Rückgang der Aktivität. Bei einer weiteren Erhöhung der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration ( $> 0,1 \mu\text{M}$ ) stieg die Aktivität bis zu einer Konzentration zwischen 20 und 50  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  in der Nährlösung wieder an. In diesem Konzentrationsbereich, in dem maximale Aktivitäten nachgewiesen werden konnten, betrug die  $\text{C}_2\text{H}_4$ -Produktionsrate ca. 130 nmol/ml·h. Diese

Aktivität entspricht in etwa 7 % der  $C_2H_2$ -Reduktionsrate von Zellen des Wildtyps, die unter optimalen Bedingungen ( $1 \mu M MoO_4^{2-}$ ) kultiviert wurden [131].

Die  $MoO_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Aktivität von Wildtyp-Zellen (bzw. *anfA*<sup>-</sup>-Zellen) im Konzentrationsbereich der Sektion B unterscheidet sich signifikant von der, die mit Zellen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante beobachtet wurde. Annähernd maximale  $C_2H_4$ -Bildungsraten für den Wildtyp bzw. die *anfA*<sup>-</sup>-Mutante konnten bereits in einem  $MoO_4^{2-}$ -Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und  $1 \mu M$  erzielt werden ([81, 93], Abb. 27). Während die Nitrogenaseaktivität der Wildtyp-Zellen in diesem Konzentrationsbereich annähernd konstant blieb, stieg die der *nifE*<sup>-</sup>-Zellen drastisch an. Offensichtlich muss die zur Erzielung maximaler Aktivität einzusetzende  $MoO_4^{2-}$ -Konzentration im Fall der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante – im Vergleich zum Wildtyp-Organismus – zu deutlich höheren Konzentrationen verschoben werden.

Abgesehen von der Verschiebung des Aktivitätsmaximums lassen sich zwei weitere signifikante Unterschiede zwischen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante und Wildtyp-Zellen erkennen: (i) Ein drastischer Rückgang der Aktivität bei hohen  $MoO_4^{2-}$ -Konzentrationen ( $> 50 \mu M$ ), wie sie im Fall der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante beobachtet wurde, konnte mit Wildtyp-Zellen nicht nachgewiesen werden [81, 93], und (ii) *nifE*<sup>-</sup>-Zellen, die in Gegenwart von  $MoO_4^{2-}$  in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis  $50 \mu M$  kultiviert wurden, reduzierten nicht nur  $C_2H_2$  zu  $C_2H_4$ , sondern bildeten auch – wie in Abb. 28 dargestellt – beträchtliche Mengen an  $C_2H_6$  ( $C_2H_6/C_2H_4 \sim 7 - 8 \%$ ). Bei höheren  $MoO_4^{2-}$ -Konzentrationen nahm der  $C_2H_6$ -Anteil deutlich ab, lag aber mit  $1 mM MoO_4^{2-}$  in der Nährlösung immer noch bei ca. 2 %, und somit etwa 100-fach höher als der für den Wildtyp dokumentierte  $C_2H_6$ -Anteil [32, 131].

Die Abnahme der Aktivität mit steigender  $MoO_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium in Sektion A wies eine deutliche Ähnlichkeit mit der  $MoO_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Aktivität der Fe-Nitrogenase von *R. capsulatus* auf, welche in Anwesenheit des Anions stark reprimiert wird [32, 93]. Außerdem entsprach der gemessene  $C_2H_6$ -Anteil in Abwesenheit von  $MoO_4^{2-}$  ( $C_2H_6/C_2H_4 \sim 3 - 4 \%$ ), dem, der auch für die alternative Nitrogenase ermittelt wurde [32, 131]. Um eindeutig zu belegen, dass die in Sektion A detektierten Aktivitäten der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante auf die Bildung der Fe-Nitrogenase zurückzuführen ist, wurde eine *nifE anfA*<sup>-</sup>-Doppelmutante konstruiert (siehe Abschnitt 2.16) und die  $MoO_4^{2-}$ -Abhängigkeit der Aktivität wie im Fall der einfachen apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante bestimmt. Durch die Einführung eines Defekts in das *anfA*-Gen sind die Zellen der Doppelmutante nicht in der Lage, die Fe-Nitrogenase zu exprimieren [91, 82].

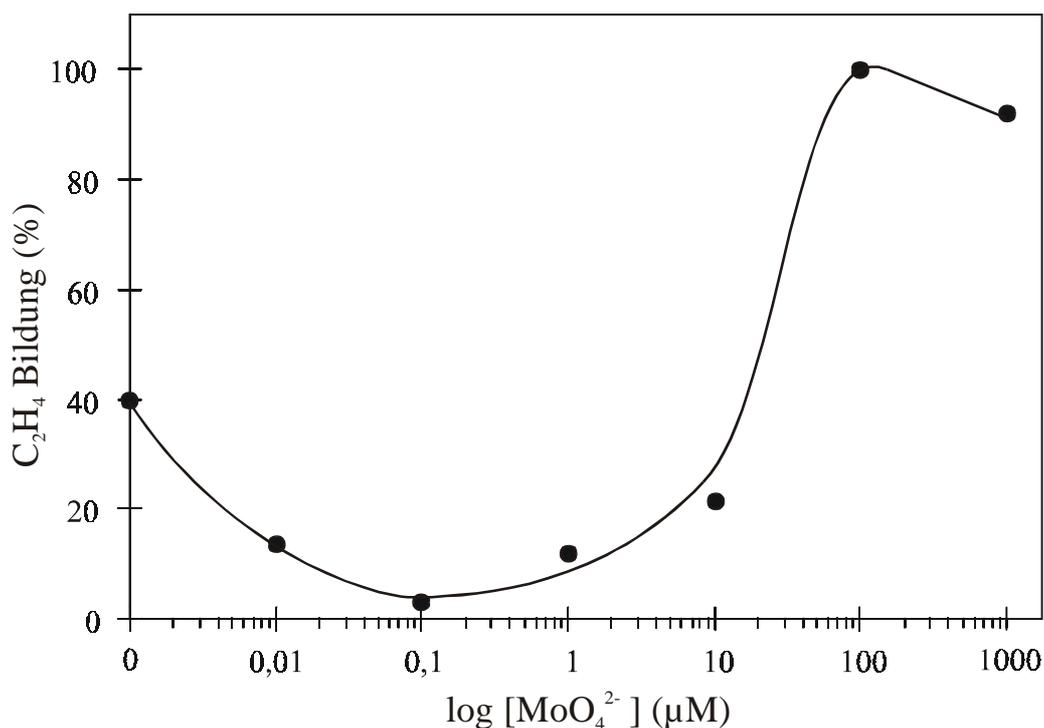


**Abb. 28: Abhängigkeit der C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Bildung (relativ zu C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) ganzer Zellen der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium.** Die Zellen wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, in den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen, kultiviert. Das C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Verhältnis wurde durch Division der gebildeten C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Menge und der gleichzeitig entstandenen Menge an C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ermittelt.

Untersuchungen an Zellen der *nifE* *anfA*<sup>-</sup>-Doppelmutante ergaben, dass diese – im Konzentrationsbereich der Sektion A – nicht in der Lage waren, die Reduktion von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zu katalysieren (Abb. 27, gestrichelte Linie). Daraus lässt sich folgern, dass die Aktivitäten, die im gleichen Konzentrationsbereich mit der einfachen *nifE*<sup>-</sup>-Mutante gemessen wurden, eindeutig auf die Bildung der Fe-Nitrogenase zurückzuführen war. Bei Erhöhung der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration über 0,1 µM hinaus (Sektion B) unterschieden sich die mit der Doppelmutante ermittelten Aktivitäten kaum von denen, die mit der einfachen *nifE*<sup>-</sup>-Mutante bestimmt wurden. Die hier aufgeführten Ergebnisse beweisen eindeutig, dass die Aktivität, welche im Konzentrationsbereich von Sektion B gemessen wurde, nicht mit der Fe-Nitrogenase in Zusammenhang steht, sondern ein inhärentes Merkmal der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* darstellt.

Um zu untersuchen, ob die MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Abhängigkeit der Aktivität durch Defekte in anderen Genen, welche sich im *nifE*-enthaltenden Operon befinden, beeinflusst wird, wurden

Messungen an einer polaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante durchgeführt. Diese Mutante zeichnet sich dadurch aus, dass sie keines der Gene im *nifENX-orf4-fdxB-nifQ*-Operon zu exprimieren vermag. Wie in Abb. 29 dargestellt, konnte auch mit Zellen der polaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante Aktivität nachgewiesen werden.



**Abb. 29: Abhängigkeit der C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Bildung ganzer Zellen einer polaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium.** Die Zellen wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, in den in der Abbildung angegebenen Konzentrationen, kultiviert. 100 % Aktivität entsprechen 30 nmol gebildetes C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ml·h.

Jedoch waren diese im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> nur äußerst gering. Kulturen, die mit 100 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> angezogen wurden, wiesen im Vergleich zu Zellen, welche mit 10 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> kultiviert wurden, eine 5-fach höhere Aktivität auf. Für die mit 100 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> gewachsenen Zellen wurde eine C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Bildungsrate von ca. 30 nmol/ml·h gemessen. Dies entsprach nur ca. 25 % der Aktivität der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante unter gleichen Bedingungen. Während jedoch in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in einer Endkonzentration von 1 mM bei der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante ein drastischer Rückgang der Aktivität beobachtet werden konnte, blieb die C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Bildungsrate der polaren Mutante annähernd konstant.

Auf den ersten Blick scheinen die Zellen der polaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante aufgrund des Defekts in der Expression sämtlicher Gene des *nifENX-orf4-fdxB-nifQ*-Operons nicht in der Lage zu sein, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zu reduzieren. Eine präzise Aussage darüber, welcher Gendefekt im Einzelnen für die drastische Verringerung der Aktivität (im Vergleich zur Aktivität der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante) verantwortlich ist, kann an dieser Stelle jedoch nicht gemacht werden. In diversen Untersuchungen an *nifQ*<sup>-</sup>-Mutanten konnte allerdings gezeigt werden, dass die Deletion des *nifQ*-Gens durch hohe MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen im Nährmedium ( $\geq 100 \mu\text{M}$ ) kompensiert wird [74, 76, 62]. Da auch im Fall der polaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* die Aktivität bei hohen MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen drastisch anstieg, ist es durchaus möglich, dass die niedrige Aktivität bei geringeren MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen ( $< 100 \mu\text{M}$ ) auf den Defekt in *nifQ* zurückzuführen ist. Ein weiterer Aktivitätsanstieg im Zuge der Konzentrationserhöhung von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (0,1 bis 1 mM) in der Nährlösung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Tatsache, dass die Aktivität durch den Zusatz von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in höheren Konzentrationen nicht weiter stimuliert wurde, hängt wahrscheinlich mit dem Überlappen der gleichzeitig auftretenden Aktivitätshemmung zusammen, die bereits mit Zellen der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante bei einer MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration von 1 mM beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 27).

Die geringe Aktivität der Zellen der polaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante in Mo-abgereichertem Medium (Abb. 29) deutet auf einen Einfluss irgendeines Genprodukts aus dem *nifENX-orf4-fdxB-nifQ*-Operon auf die Bildung der Fe-Nitrogenase hin. Um die Frage zu klären, um welches Genprodukt es sich dabei handelt, müsste die MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Abhängigkeit der Aktivität weiterer Mutanten (z. B. *nifX*, *nifN*, *nifENX*) analysiert werden. Solche Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt, da die benötigten Mutanten nicht zur Verfügung standen.

### 3.9 Expression des MoFe-Proteins in Zellen der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante

Da die Aktivität ganzer Zellen der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante relativ niedrig ist (ca. 7 - 10 % der Wildtyp-Aktivität), sollte die Frage geklärt werden, ob diese niedrige Aktivität in einer eventuell geringen Expression des MoFe-Proteins begründet liegt. Im Teil A dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des MoFe-Proteins in einer *anfA*<sup>-</sup>-Mutante von der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium abhängt. Um zu klären, ob eine ähnliche Abhängigkeit auch bei der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante vorliegt, wurden Zellen in Gegenwart verschiedener

MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen kultiviert, Zellextrakte präpariert und diese anschließend sowohl SDS-gelelektrophoretisch, als auch mithilfe eines Western Immunoblots auf das Vorhandensein des MoFe-Proteins näher untersucht. Außerdem sollte der Einfluss der Kultivierungsdauer der Zellen auf die Bildung des MoFe-Proteins – ebenfalls gelelektrophoretisch und immunologisch – ermittelt werden.

### 3.9.1 Einfluss der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium auf die MoFe-Proteinbildung

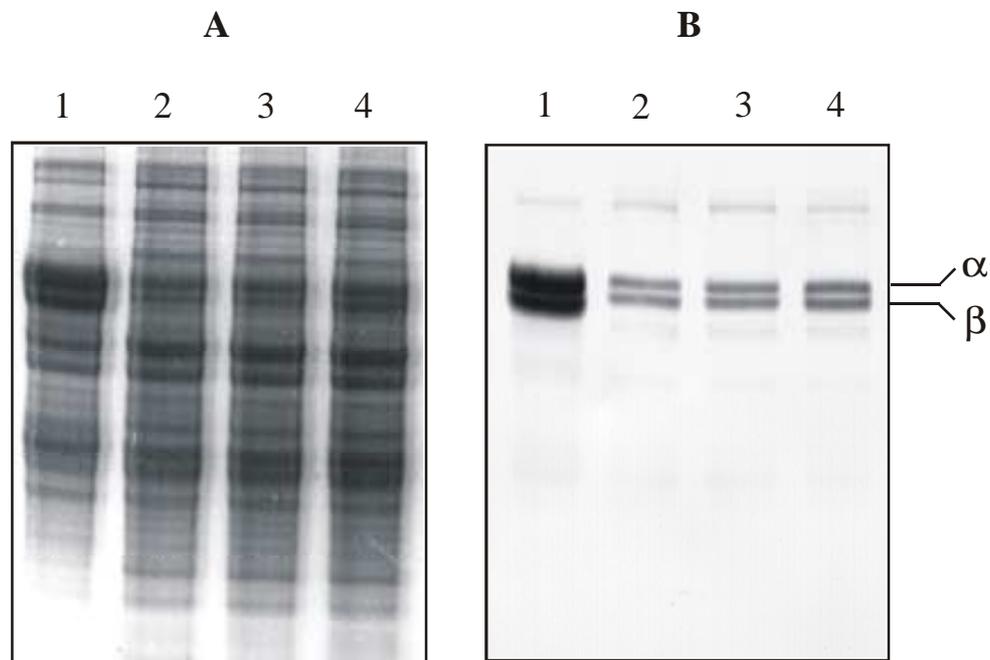
Um den Einfluss der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium auf die Nitrogenasebildung in der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante näher zu untersuchen, wurden Zellen in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1, 20 und 1000 µM) kultiviert. Außerdem wurden zum Vergleich Zellen des Wildtyps mit MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 µM) angezogen. Nach Zellernte und -aufschluss wurden die löslichen Extraktproteine mittels SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophorese getrennt und die Proteine anschließend auf Nitrocellulose-Membranen gebロットet. Die Membranen wurden zur Detektion des MoFe-Proteins mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern, und zum Nachweis des Fe-Proteins mit anti-Rc2<sup>Fe</sup>-Antikörpern behandelt. Sowohl das SDS-Gel als auch der Immunoblot zur Visualisierung des MoFe-Proteins sind in Abb. 30 dargestellt.

Wie aus dem abgebildeten SDS-Gel und dem Western Blot ersichtlich ist, wurden – unabhängig von der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium – in *nifE*<sup>-</sup>-Zellen signifikant geringere Mengen an MoFe-Protein gebildet als in Wildtyp-Zellen. Eine densitometrische Quantifizierung<sup>3</sup> der MoFe-Proteinmenge auf dem Immunoblot ergab, dass *nifE*<sup>-</sup>-Zellen unter optimalen Anzuchtbedingungen (20 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nur ca. 5 % der MoFe-Proteinmenge bildeten. Diese Beobachtung stimmt mit den im Vergleich zum Wildtyp gemessenen geringeren *in-vivo*-Nitrogenaseaktivitäten überein (ebenfalls ca. 5 %). Aufgrund der deutlichen Korrelation zwischen der *in-vivo*-Nitrogenaseaktivität und der gebildeten MoFe-Proteinmenge lässt sich folgern, dass *nifE*<sup>-</sup>-Zellen zwar signifikant weniger Dinitrogenase-Komponente exprimieren, die spezifische Nitrogenaseaktivität (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-

---

<sup>3</sup> Hierzu wurde das mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern sichtbar gemachte MoFe-Protein mithilfe eines Flachbett-Scanners und QuantiScan 2.0-Software (Microbial Systems Ltd.) quantifiziert. Die Anwendungsmöglichkeiten von konventionellen Scannern zur quantitativen Auswertung von Immunoblots wurden ausführlich von Tarlton und Knight beschrieben [132].

Reduktionsrate) jedoch vergleichbar ist mit der des Wildtyps. Dies deutet auf ein optimal funktionierendes Nitrogenase-System, also auch auf einen intakten Cofaktor hin.



**Abb. 30: Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgel (A) und Western Immunoblot (B) zur Darstellung des Einflusses der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium auf die Bildung des MoFe-Proteins in der  $nifE^-$ -Mutante.** Die Zellen der apolaren  $nifE^-$ -Mutante wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und  $\text{MoO}_4^{2-}$  (1, 20 bzw. 1000  $\mu\text{M}$ ) für 20 h kultiviert. Die Zellen des Wildtyps wurden mit Serin (5 mM) und  $\text{MoO}_4^{2-}$  (1  $\mu\text{M}$ ) für 20 h angezogen. Nach Ernte und Aufschluss der Zellen wurden die Extraktproteine mittels zweier SDS-Tris-Glycin-Gelelektrophoresen getrennt. Während ein Gel gefärbt wurde, wurde das andere zur Durchführung eines Western Immunoblots verwendet. Die aufgetragene Proteinmenge betrug ca. 20  $\mu\text{g}$  Extraktprotein pro Bahn für das gefärbte Gel und ca. 10  $\mu\text{g}$  für das SDS-Gel, welches für den Immunoblot benutzt wurde. Nach erfolgtem Blot wurde das MoFe-Protein mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern (1 : 500 Verdünnung) behandelt. Bahn 1: B10S; Bahn 2:  $nifE^-$  (1  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ ); Bahn 3:  $nifE^-$  (20  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ ); Bahn 4:  $nifE^-$  (1 mM  $\text{MoO}_4^{2-}$ ).

$nifE^-$ -Zellen, die in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 1 mM angezogen wurden synthetisierten zwar ähnliche Mengen an MoFe-Protein wie mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  kultivierte Zellen, ihre *in-vivo*-Nitrogenaseaktivität betrug jedoch nur ca. 10 % betrug (siehe Abb. 27). Hieraus kann gefolgert werden, dass ein derartig hoher Überschuss an  $\text{MoO}_4^{2-}$  zwar die Proteinexpression nicht negativ beeinflusst, jedoch eine nicht näher untersuchte toxische Wirkung auf das Enzymsystem hat.

Überraschenderweise konnte mithilfe eines Western Immunoblots zur Detektion des Fe-Proteins (mit anti-Rc2<sup>Fe</sup>-Antikörpern) festgestellt werden, dass dieses in sämtlichen Extrakten, also im Wildtyp-Extrakt und in den analysierten *nifE*<sup>-</sup>-Extrakten in vergleichbaren Mengen vorhanden war (Blot nicht dargestellt). Der krasse Unterschied in der Syntheserate des MoFe-Proteins und des Fe-Proteins in *nifE*<sup>-</sup>-Zellen legt den Schluss nahe, dass die Bildung des MoFe-Proteins in *R. capsulatus* nicht nur auf der Transkriptionsebene (Regulation durch NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (vgl. Kapitel 3.2)), sondern auch auf der Translationsebene reguliert wird, da sich die Gene, die das MoFe- und das Fe-Protein kodieren, im gleichen Operon befinden [133].

### 3.9.2 Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Expression des MoFe-Proteins

Um den Einfluss der Kultivierungsdauer der *nifE*<sup>-</sup>-Zellen auf die Nitrogenasebildung näher zu untersuchen, wurden Zellen in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Endkonz.: 20 µM) im Nährmedium für 20, 24, 45 und 170 h kultiviert. Außerdem wurden zum Vergleich Zellen des Wildtyps 20 h mit MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 µM) angezogen. Nach der Extraktpräparation wurden die löslichen Extraktproteine mittels SDS-Tris-Tricin-Gelelektrophorese getrennt und anschließend auf Nitrocellulose-Membranen geblottet.



**Abb. 31: Western Immunoblot zur Darstellung der Abhängigkeit der Expression des MoFe-Proteins in *nifE*-Zellen von der Kultivierungsdauer.** Die Zellen der apolaren *nifE*<sup>-</sup>-Mutante wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (20 µM) für 20, 24, 45 bzw. 170 h kultiviert. Die Zellen des Wildtyps (B10S) wurden ebenfalls Serin (5 mM) und MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (1 µM) für 20 h angezogen. Nach Zellernte und -aufschluss wurden die Extraktproteine mithilfe einer SDS-Tris-Tricin-Gelelektrophorese getrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Das MoFe-Protein wurde anschließend mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern (1 : 500 Verdünnung) sichtbar gemacht. Bahn 1: B10S, 14,5 µg Extraktprotein; Bahn 2: *nifE*<sup>-</sup> (20 h), 17,3 µg; Bahn 3: *nifE*<sup>-</sup> (24 h), 15,5 µg; Bahn 4: *nifE*<sup>-</sup> (45 h), 21,0 µg; Bahn 5: *nifE*<sup>-</sup> (170 h), 23,2 µg.

Wie aus dem abgebildeten Western Blot (Abb. 31) ersichtlich ist, war die Menge an gebildetem MoFe-Protein in der *nifE*-Mutante – in Übereinstimmung mit den im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Ergebnissen – deutlich geringer, als die, die von Zellen des Wildtyps produziert wurde. Außerdem war sie signifikant von der Kultivierungsdauer abhängig. Maximale Expression konnte nach 24 h Zellanzucht detektiert werden, während nach 45 h bereits ein Rückgang der MoFe-Proteinmenge nachgewiesen werden konnte.

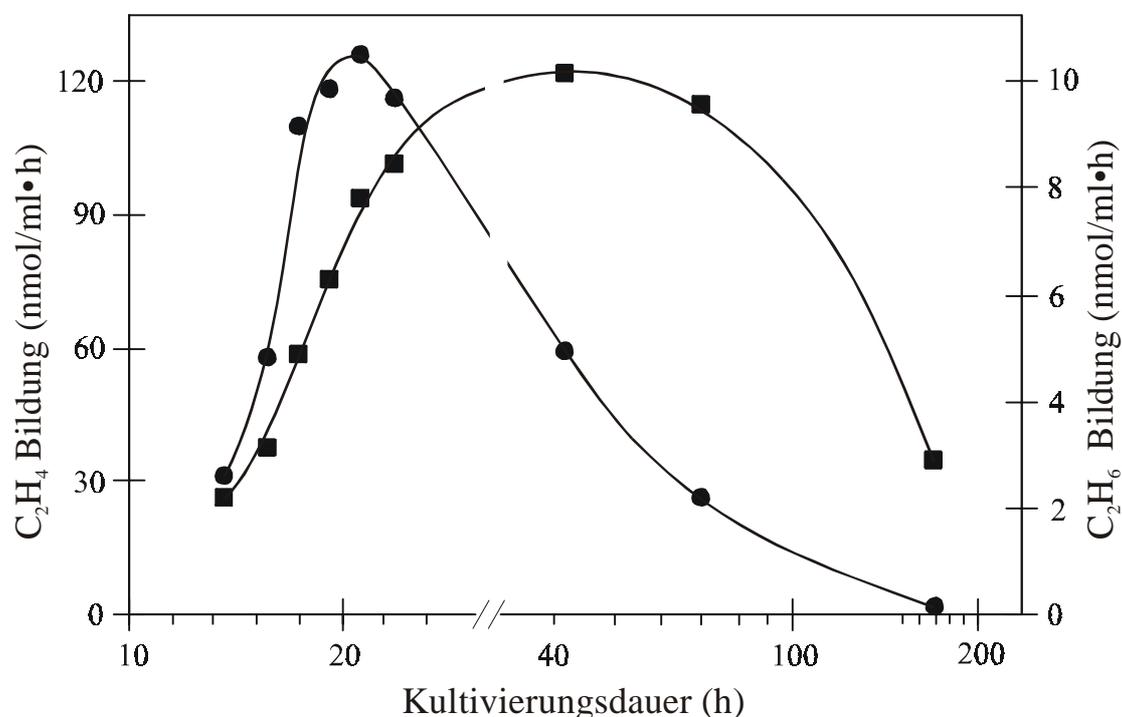
Ebenfalls in Übereinstimmung mit den im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Ergebnissen konnte eine deutliche Korrelation zwischen den densitometrisch quantifizierten MoFe-Proteinmengen und den *in-vivo*-Nitrogenaseaktivitäten demonstriert werden. Desweiteren konnte mithilfe von Western Immunoblots mit anti-Rc2<sup>Fe</sup>-Antikörpern bestätigt werden, dass die Bildung des Fe-Proteins nicht mit der Expression des MoFe-Proteins korreliert (Ergebnisse nicht dargestellt).

### **3.10 Abhängigkeit der C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Bildung von der Kultivierungsdauer der *nifE*<sup>-</sup>-Zellen**

Da der gemessene C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Anteil in verschiedenen Zellpräparationen zwischen 6 und 12 % schwankte, sollte näher untersucht werden, ob die C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Bildungsrate von der Kultivierungsdauer der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante abhängt. Dazu wurden Zellen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Endkonz.: 20 μM) für eine Woche (170 h) kultiviert. Zwischenzeitlich wurden den Kulturen Proben entnommen und die Nitrogenaseaktivität bestimmt.

Die Zelldichte (E<sub>600</sub>) war ab einer Kultivierungsdauer von 24 h bis zum Ende des Experiments annähernd konstant und betrug ca. 1,8 bis 2,0. Wie in Abb. 32 dargestellt, war die C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Bildung deutlich von der Kultivierungszeit abhängig. Nach ca. 18 bis 22 h Wachstum (E<sub>600</sub> ~ 1,8) konnte eine maximale C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Produktionsrate gemessen werden, während die Bildungsrate von C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> noch weiter – bis zu einem Maximum nach ca. 40 h – anstieg. Sogar nach einer Kultivierungszeit von 70 h blieb die C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Bildungsrate annähernd auf dem Niveau, welches bereits nach 40 h erreicht wurde. Die C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Produktionsrate hingegen fiel bereits nach 40 h drastisch ab. Das Experiment wurde nach 170 h beendet, da nur noch marginale Mengen an

$C_2H_6$  gebildet wurden und die  $C_2H_4$ -Bildungsrate gegenüber der maximalen Rate nach 40 h auf ca. 25 % abnahm.



**Abb. 32: Abhängigkeit der  $C_2H_4$ - und  $C_2H_6$ -Bildung von der Kultivierungsdauer der Zellen der apolaren  $nifE^-$ -Mutante.** Die Zellen wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und  $MoO_4^{2-}$  (20  $\mu$ M) kultiviert. Proben von je 1 ml wurden der Kultur zu den in der Abbildung indizierten Zeiten entnommen und deren Nitrogenaseaktivität bestimmt. ■,  $C_2H_4$ -Bildung; ●,  $C_2H_6$ -Bildung.

Die hier dargestellten Ergebnisse belegen eindeutig, dass die  $C_2H_6$ -Bildung stark von der Kultivierungsdauer der  $nifE^-$ -Zellen abhängt. Das  $C_2H_6/C_2H_4$ -Verhältnis erreichte ein Maximum nach ca. 20 h. Mit dem Auftauchen eines scharfen Maximums in der  $C_2H_6$ -Bildungskurve (Abb. 32) nach ca. 20 h lassen sich auch die anfangs erwähnten präparationsbedingten Schwankungen des  $C_2H_6/C_2H_4$ -Verhältnisses erklären<sup>4</sup>.

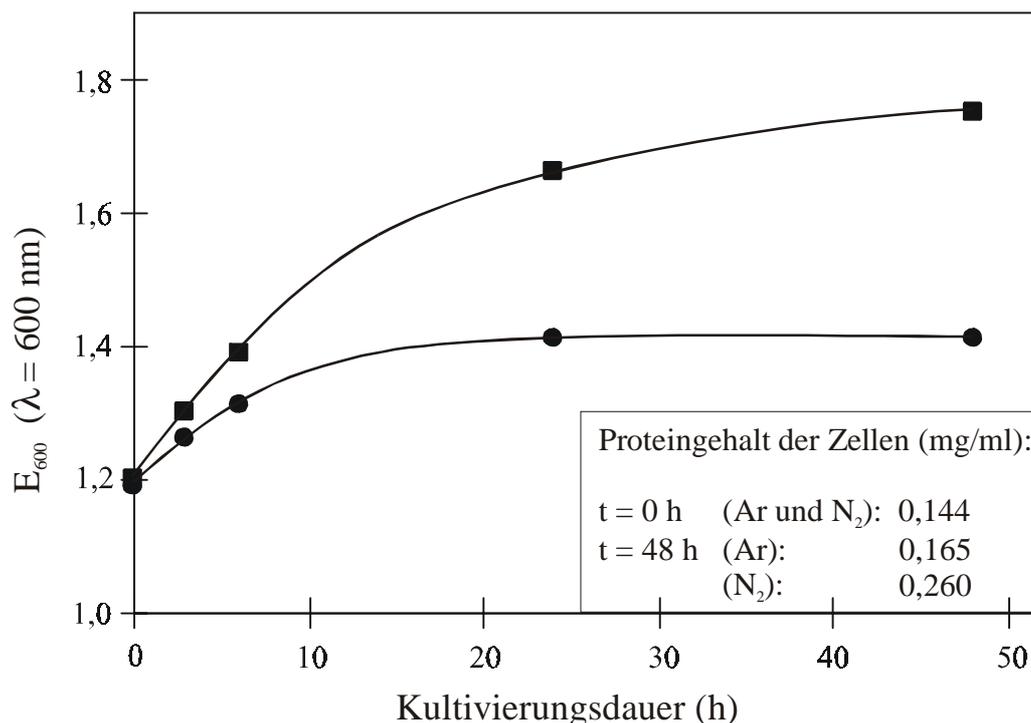
<sup>4</sup> Wenn sich die Zellen in einem Wachstumsstadium in der Nähe des scharfen Maximums befinden, kann es zu erheblichen Schwankungen im  $C_2H_6$ -Anteil kommen.

### 3.11 Diazotrophes Wachstum der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante

Wie bereits im Rahmen dieser Arbeit mehrfach nachgewiesen werden konnte, sind Zellen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante in der Lage C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> und C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> umzuwandeln. Aus dem Potential der Zellen, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zu reduzieren, folgt allerdings nicht generell, dass auch N<sub>2</sub> als Substrat dienen kann [134]. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob *nifE*<sup>-</sup>-Zellen in der Lage sind, auch N<sub>2</sub> zu NH<sub>3</sub> zu reduzieren und somit diazotroph zu wachsen. Eine flüssige *nifE*<sup>-</sup>-Kultur, die frisch mit 10 % einer mit Serin-angezogenen Vorkultur beimpft wurde, war allerdings zu verdünnt (E<sub>600</sub> ~ 0,2), um mit N<sub>2</sub> als einziger N-Quelle, anwachsen zu können. Daher wurde das Experiment zur Bestimmung des diazotrophen Wachstums abgeändert, indem die Zellen zuerst unter N-limitierten Bedingungen (1,8 mM Serin) unter Argon kultiviert wurden, um ein anfängliches Wachstum der Zellen und somit höhere Zelldichten zu ermöglichen. Nachdem das Serin nahezu verbraucht war (E<sub>600</sub> ~ 1,2), wurden die Zellen mit N<sub>2</sub> begast (N<sub>2</sub>-Zellen). Eine Referenzkultur hingegen blieb unter Argon (Ar-Zellen).

Wie in der Abb. 33 dargestellt, wuchsen N<sub>2</sub>-Zellen schneller und zu signifikant höheren Zelldichten als Ar-Zellen. Nach 24 h Kultivierungsdauer wuchs die Referenzkultur nicht mehr weiter (E<sub>600</sub> ~ 1,4), während die Zelldichte der N<sub>2</sub>-Zellen noch bis zu einem Wert von 1,8 zunahm.

Zusätzlich zur Bestimmung der Zelldichte in verschiedenen Wachstumsphasen wurde der Proteingehalt der Ar- bzw. N<sub>2</sub>-Zellen zu Beginn des Experiments (t = 0 h) und nach 48 h Kultivierungsdauer ermittelt (Tabelle in Abb. 33). Während nach 48 h eine drastische Zunahme des Proteingehalts der N<sub>2</sub>-Zellen festgestellt werden konnte, erhöhte sich der Proteingehalt der Referenzzellen nur marginal. Da eine Zunahme der optischen Dichte nicht zwangsläufig Zellwachstum bedeuten muss – sie kann auch durch Speicherstoffe wie Polyhydroxybuttersäure verursacht werden – stellt der deutliche Anstieg des Proteingehalts den Schlüsselnachweis für die Fähigkeit zur N<sub>2</sub>-Fixierung dar. Schließlich wurde auch die Abhängigkeit der Nitrogenaseaktivität von der Kultivierungsdauer bestimmt (Tab. 1).



**Abb. 33: Nachweis diazotrophen Wachstums von *nifE*<sup>-</sup>-Zellen.** Die Zellen wurden unter N-limitierten Bedingungen (1,8 mM Serin) bei 35 °C mit MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (20 μM) in einer Argonatmosphäre kultiviert, bis die Zellen nach ca. 20 h die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten ( $E_{600} \sim 1,2$ ). Anschließend wurden die Kulturen 20 min mit Ar bzw. N<sub>2</sub> begast und zur weiteren Kultivierung wieder in das temperierte Wasserbad (35 °C) zurückgestellt (t = 0 h). Nach den in der Abbildung dargestellten Zeiten wurden den Kulturen Proben entnommen und die Zelldichte bestimmt. Außerdem wurde sowohl zu Beginn (t = 0 h), als auch nach 48 h der Kultivierung der Proteingehalt der Zellen ermittelt. ■, N<sub>2</sub>-Begasung; ●, Ar-Begasung.

**Tab. 1: Nitrogenaseaktivität diazotroph wachsender *nifE*<sup>-</sup>-Zellen.** Die Zellen wurden wie in der Legende von Abb. 33 beschrieben kultiviert. Zu den in der Tabelle aufgeführten Zeiten wurden den Kulturen Proben entnommen und deren Nitrogenaseaktivität bestimmt.

| Zeit (h) | Ar  |  | N <sub>2</sub>  |  |
|----------|---|--|---|--|
|          | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -Bildung<br>(nmol/ml·h) | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> /C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (%) | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -Bildung<br>(nmol/ml·h) | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> /C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (%) |
| 0        | 65  | 5,3  | 70  | 5,0  |
| 3        | 70  | 5,2  | 85  | 6,0  |
| 6        | 55  | 4,6  | 100   | 7,6  |
| 24       | 50  | 2,5  | 235   | 4,2  |
| 48       | 45  | 1,8  | 250   | 1,2  |

Vor der Begasung der Zellen mit  $N_2$  bzw. Ar war die Aktivität beider Kulturen ( $N_2$ - und Ar-Zellen) annähernd identisch ( $t = 0$  h). Innerhalb der ersten drei Stunden der Zellkultivierung veränderte sich die  $C_2H_2$ -Reduktionsrate der Ar-Zellen nicht signifikant. Nach sechs Stunden verringerte sich sogar sowohl die  $C_2H_4$ - als auch die  $C_2H_6$ -Bildungsrate kontinuierlich über den restlichen Zeitraum des Experiments. Auf der anderen Seite stieg die Aktivität der  $N_2$ -Zellen kontinuierlich über den gesamten Zeitraum an. Weiterhin konnte eine signifikante Zunahme des  $C_2H_6/C_2H_4$ -Verhältnisses beobachtet werden (von 0 bis 6 h). Nach 24 h betrug die Aktivität der  $N_2$ -Zellen ca. 235 nmol/ml·h. Sie war somit ca. doppelt so hoch wie die Aktivität, die unter Standard-Kultivierungsbedingungen gemessen werden konnte (~ 130 nmol/ml·h mit 5 mM Serin unter Argon).

Die Beobachtung, dass die Nitrogenaseaktivität diazotroph gewachsener Zellen dramatisch ansteigt, ist im Übrigen nicht beispiellos. So konnte an Wildtyp-Zellen von *K. pneumoniae* demonstriert werden, dass sich die Geschwindigkeit der Nitrogenaseprotein-Synthese in  $N_2$ -Zellen gegenüber der in Ar-Zellen um etwa den Faktor 2,5 erhöht [135]. Die Zunahme der Nitrogenase-Produktion unter diazotrophen Wachstumsbedingungen wurde dabei auf eine generelle Erhöhung des N-Status der Zellen zurückgeführt, welche zumindest eine Steigerung der Translation bewirkt [135].

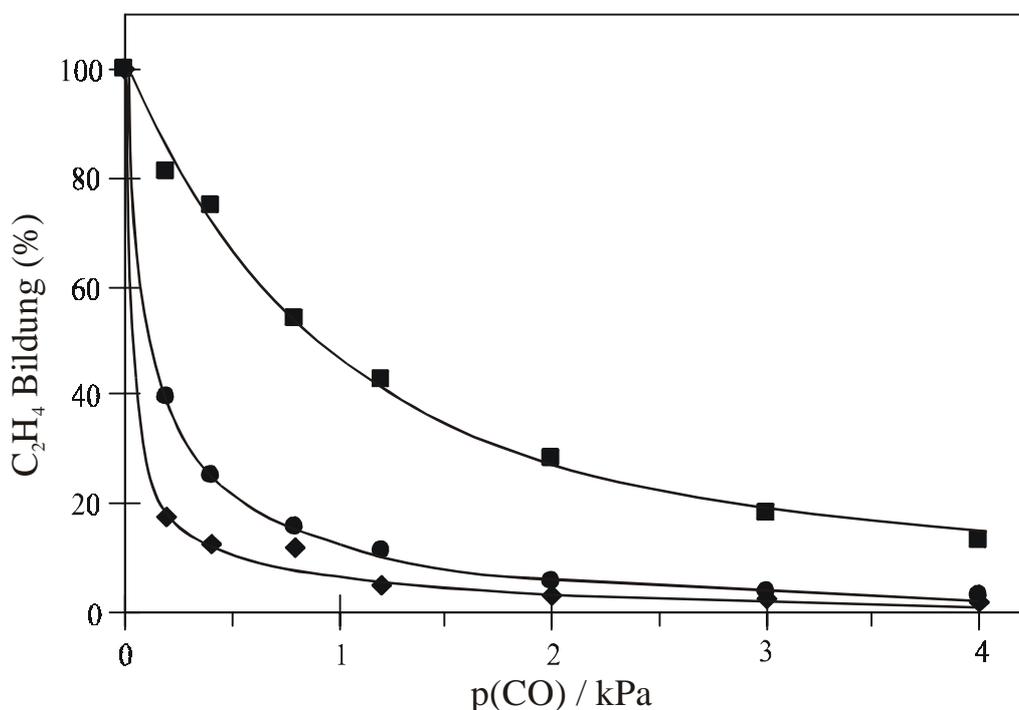
Interessanterweise wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass Zellen der *nifE*-Mutante von *R. capsulatus* nicht in der Lage sind, in Gegenwart von  $N_2$  als einzige Stickstoffquelle zu wachsen (Nif-Phänotyp) [57]. Jedoch zeigen alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, der beträchtliche Anstieg der Zelldichte, des Proteingehalts und der Nitrogenaseaktivität nach Begasung der Zellen mit  $N_2$ , dass die Zellen der *nifE*-Mutante tatsächlich in der Lage sind,  $N_2$  zu fixieren und somit diazotroph zu wachsen. Die frühere Beobachtung eines Nif-Phänotyps [57] scheint daher in der Anwendung ungeeigneter Bedingungen zur Ermittlung des diazotrophen Wachstums der *nifE*-Mutante begründet zu liegen.

### 3.12 Inhibierungsversuche mit Kohlenmonoxid

Aufgrund seiner starken  $\pi$ -Akzeptor-Wechselwirkungen ist Kohlenmonoxid ein starker Inhibitor für zahlreiche durch Metalloenzyme katalysierte Reaktionen. Der inhibierende Einfluss von CO auf die Nitrogenaseaktivität in zahlreichen  $N_2$ -fixierenden Organismen

wurde bereits mehrfach demonstriert. So konnte gezeigt werden, dass CO als nicht-kompetitiver Inhibitor der Nitrogenaseaktivität für sämtliche Substrat-Reduktionen (außer  $H^+$ -Reduktion) fungiert [136, 2]. An einer *nifV*-Mutante von *K. pneumoniae* konnte jedoch gezeigt werden, dass, im Gegensatz zum Wildtyp des gleichen Organismus, CO sogar die  $H_2$ -Entwicklung (d. h.  $H^+$ -Reduktion) inhibiert [137].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vergleichende Experimente zum Einfluss von CO auf die Nitrogenaseaktivität des Wildtyps, der *nifE*- und der *nifV*-Mutante von *R. capsulatus in-vivo* (mit ganzen Zellen) und *in-vitro* (mit Extrakten) durchgeführt (Abb. 34 und Tab. 2).



**Abb. 34: Inhibierung der  $C_2H_4$ -Bildung durch CO.** Die Zellen wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und  $MoO_4^{2-}$  (1  $\mu M$ ; Wildtyp und *nifV*-Mutante) bzw.  $MoO_4^{2-}$  (20  $\mu M$ ; *nifE*-Mutante) angezogen. Den Kulturen wurden in der späten logarithmischen Wachstumsphase ( $E_{600} \sim 1,8$ ) Proben entnommen und die Nitrogenaseaktivität nach dem Zusatz von  $C_2H_2$  (Partialdruck von je 5 kPa pro Ansatz) und den in der Abbildung angegebenen Mengen (Partialdrücke) an CO bestimmt. 100 % Aktivität entsprechen 2000 nmol gebildetes  $C_2H_4/ml \cdot h$  für den Wildtyp, 110 nmol/ml·h für Zellen der *nifE*-Mutante und 85 nmol/ml·h für Zellen der *nifV*-Mutante. ■, Wildtyp; ●, *nifE*-Mutante; ◆, *nifV*-Mutante.

Die Zellen des Wildtyps reduzierten  $C_2H_2$  in Abwesenheit von CO mit einer Bildungsrate von 2000 nmol/ml·h. Zellen der *nifE*-Mutante hingegen produzierten unter den gleichen

Bedingungen ca. 110 nmol/ml·h C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, während *nifV*-Zellen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> etwa mit einer Rate von 85 nmol/ml·h zu C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> reduzierten. Die in Abb. 34 und Tab. 2 dargestellten Ergebnisse belegen, dass die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion in Wildtyp-Zellen nicht so stark durch CO inhibiert wurde wie in Zellen der *nifE*- bzw. *nifV*-Mutante. Die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktionsrate in *nifV*-Zellen nahm bereits bei einem Partialdruck von 0,04 kPa CO auf die Hälfte ab, während der zur 50 %-igen Inhibierung benötigte CO-Partialdruck bei der *nifE*-Mutante etwa doppelt so hoch war (0,09 kPa). Der am wenigsten durch CO beeinflusste Organismus war jedoch der Wildtyp, dessen Aktivität – im Vergleich zu der *nifE*-Mutante – erst bei der 10-fachen CO-Konzentration (0,9 kPa) zu 50 % inhibiert wurde. Sogar bei einem CO-Partialdruck von 4 kPa konnte im Fall der Wildtyp-Zellen eine mehr als 10 %-ige Restaktivität festgestellt werden, während die Zellen der *nifE*- bzw. *nifV*-Mutante bereits durch den Zusatz von 1,2 bzw. 0,6 kPa CO zu 90 % inhibiert wurden.

**Tab. 2: Einfluss von CO und N<sub>2</sub> auf die C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Bildung von ganzen Zellen des Wildtyps, der *nifE*- und der *nifV*-Mutante.** Die Zellkultivierung und die Aktivitätstests wurden wie in der Legende von Abb. 34 beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung des Einflusses von N<sub>2</sub> auf die C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-Bildung wurden die Aktivitätsteströhrchen mit N<sub>2</sub> statt Ar begast. Der Aktivitätstest wurde durch den Zusatz von 250 µl C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (5 % der Gasphase) gestartet.

| Bedingungen                 | Wildtyp        | <i>nifE</i> -Mutante | <i>nifV</i> -Mutante |
|-----------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Einfluss von CO             |                |                      |                      |
| – CO (100 % Aktivität)      | 2000 nmol/ml·h | 110 nmol/ml·h        | 85 nmol/ml·h         |
| 50 %-ige Inhibierung        | 0,90 kPa CO    | 0,09 kPa CO          | 0,04 kPa CO          |
| 90 %-ige Inhibierung        | > 4 kPa CO     | 1,2 kPa CO           | 0,6 kPa CO           |
| Einfluss von N <sub>2</sub> |                |                      |                      |
|                             | 1000 nmol/ml·h | 105 nmol/ml·h        | 80 nmol/ml·h         |

Zusätzlich zur Bestimmung der Abhängigkeit der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion vom CO-Partialdruck wurde der Einfluss von N<sub>2</sub> auf die Nitrogenaseaktivität untersucht. Dazu wurde die Ar-Atmosphäre, in der die C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion unter Standardbedingungen abläuft, durch N<sub>2</sub> ersetzt. Die Atmosphäre beim Aktivitätstest bestand somit aus 95 % N<sub>2</sub> und 5 % C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen (siehe Tab. 2) zeigen, dass N<sub>2</sub> im Fall der Wildtyp-Zellen

deutlich inhibierend auf die  $C_2H_2$ -Reduktion wirkt. Die  $C_2H_4$ -Bildungsrate war in einer  $N_2$ -Atmosphäre im Vergleich zu Zellen unter Argon nur halb so groß (1000 nmol/ml·h). Dagegen wurde die  $C_2H_4$ -Produktion der Zellen der *nifE*<sup>-</sup>- bzw. *nifV*-Mutante nur sehr geringfügig in Gegenwart von  $N_2$  inhibiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen, dass die diazotrophe Wachstumsrate von Zellen der *nifE*<sup>-</sup>- (siehe Abschnitt 3.11) und der *nifV*-Mutante [73] von *R. capsulatus* weitaus geringer ist als die der Wildtyp-Zellen.

Wie bereits erwähnt wurde, inhibiert CO die  $H_2$ -Produktion in Extrakten einer *nifV*-Mutante von *K. pneumoniae*, während ein solcher Effekt weder beim Wildtyp, noch bei anderen Mutanten des gleichen Organismus beobachtet wurde [137]. Leider konnte der Einfluss von CO auf die  $H_2$ -Bildung in der *nifE*<sup>-</sup>- bzw. *nifV*-Mutante von *R. capsulatus* aufgrund des geringen  $H_2$ -Partialdrucks nicht *in-vivo* bestimmt werden. Die Bildung geringer Mengen an  $H_2$  ist wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass erstens in den Zellen nur wenig MoFe-Protein gebildet wird, und zweitens in *R. capsulatus* parallel zur Nitrogenase das Enzym Hydrogenase exprimiert wird, welches entstandenes  $H_2$  sofort wieder zu Protonen zurück-oxidiert. Nur wenn Gasproben nicht aus den Aktivitätstest-Röhrchen, sondern direkt aus dem Gasraum von 500 ml-Kulturen, die bereits die stationäre Wachstumsphase erreicht hatten, entnommen wurden, konnten signifikante Mengen an  $H_2$  nachgewiesen werden. So bestand z. B. die Atmosphäre über der Zellsuspension einer mit Serin (Endkonz.: 5 mM) angezogenen *nifE*<sup>-</sup>-Kultur zu 13 % aus  $H_2$  und zu 87 % aus Argon. Der Gasraum über einer *nifE*<sup>-</sup>-Kultur, die in einer  $N_2$ -Atmosphäre angezogen wurde, bestand jeweils etwa zur Hälfte aus  $H_2$  und  $N_2$ .

In Untersuchungen zum Einfluss von CO auf die  $H_2$ -Bildung mit konzentrierten Extrakten aus Zellen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante konnte jedoch gezeigt werden, dass CO (im Partialdruckbereich von 0 bis 4 kPa) die Reduktion von Protonen nicht signifikant inhibiert (Ergebnis nicht dargestellt). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus Experimenten, die mit dem Wildtyp von *R. capsulatus* durchgeführt wurden, nicht aber mit denen, die für die *nifV*-Mutante (von *K. pneumoniae*) beschrieben wurden, da die  $H_2$ -Entwicklung in dieser Mutante durch CO inhibiert wird [137].

Außer der  $H_2$ -Produktion wurde auch die  $C_2H_2$ -Reduktion in Extrakten der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante untersucht. Interessanterweise nahm die  $C_2H_6$ -Bildungsrate in solchen Extrakten, im Vergleich zur *in-vivo*-Produktionsrate, drastisch ab ( $C_2H_6/C_2H_4 \sim 0,5$  % im Gegensatz zu 6 - 12 % *in-vivo*). Aufgrund dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass die hohe  $C_2H_6$ -Bildungs-Aktivität *in-vivo* während der Extraktpräparation verlorengegangen ist. Es ist

auffällig, dass die Ergebnisse aus den CO-Inhibierungsversuchen mit der *nifE*-Mutante *in-vivo* denen aus den Studien mit der *nifV*-Mutante ähneln, während die Ergebnisse mit *nifE*-Extrakten (*in-vitro*-Bedingungen) eher mit denen korrespondieren, die aus den Untersuchungen mit dem Wildtyp-Extrakt erzielt wurden. Es ist also offensichtlich, dass sich die katalytischen Eigenschaften der *nifE*-Mutante *in-vivo* von denen *in-vitro* unterscheiden. Diese Beobachtung deutet erstmals auf einen Unterschied zwischen der *in-vivo*- und *in-vitro*-Struktur des Reaktionszentrums (FeMoco) hin.

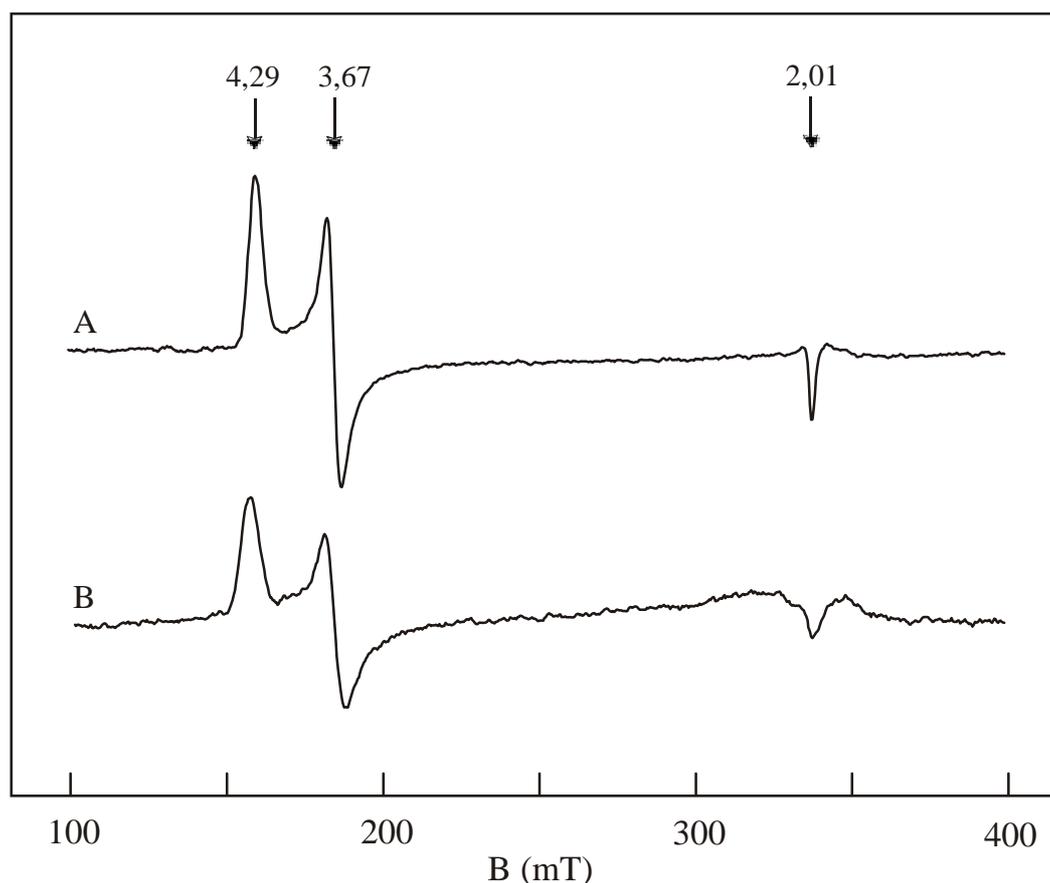
### 3.13 Isolierung und Identifizierung des FeMoco-enthaltenden MoFe-Proteins aus der *nifE*-Mutante

Um den Cofaktor des MoFe-Proteins von *nifE*-Zellen eindeutig beschreiben und identifizieren zu können, wurde dieses MoFe-Protein isoliert und partiell gereinigt. Dazu wurden Zellen in sechs Liter Nährlösung in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  (Endkonz.: 20  $\mu\text{M}$ ) und Serin (1,8 mM) in einer  $\text{N}_2$ -Atmosphäre kultiviert, bis die Zelldichte ca. 1,8 betrug. Die Anzucht der Zellen wurde aufgrund der bereits beschriebenen Stimulierung der Nitrogenaseaktivität bzw. MoFe-Proteinexpression (siehe Abschnitt 3.11) unter diazotrophen Bedingungen durchgeführt.

Nach der Zellernte, dem lysozymatischen Aufschluss und der Abtrennung der unlöslichen Extraktbestandteile durch Ultrazentrifugation wurde der lösliche Überstand bei 8 °C an Q-Sepharose chromatographiert. Der Hauptanteil des MoFe-Proteins wurde – wie auch bei der Isolierung des Wildtyp-Enzyms bzw. der W-haltigen Dinitrogenase Komponente – mit 300 mM NaCl eluiert, während das Fe-Protein in der 350 mM NaCl-Fraktion nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der geringeren Expression des MoFe-Proteins in der *nifE*-Mutante betrug die Reinheit der Dinitrogenase Komponente nur ca. 40 % und die Gesamtausbeute an MoFe-Protein etwa 8 mg. Der Unterschied zwischen den Proteinausbeuten nach einer Isolierung des Wildtyp-Enzyms und der des MoFe-Proteins aus der *nifE*-Mutante deckt sich mit der beobachteten Differenz in den *in-vivo*-Nitrogenaseaktivitäten (die Aktivität der *nifE*-Mutante betrug  $13 \pm 2$  % der Wildtyp-Aktivität). Obwohl die Reinheit des MoFe-Proteins (aus *nifE*-Zellen) in der 300 mM NaCl-Fraktion eher gering war, war das Eluat jedoch nicht mit signifikanten Mengen an Fe-Protein verunreinigt.

Im Anschluss an die Isolierung des MoFe-Proteins aus der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante wurde das Protein SDS-gelelektrophoretisch sowie immunologisch (Western Blot) näher untersucht. Sowohl das SDS-Gel als auch der Immunoblot zeigten, dass das isolierte Protein als intaktes  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer von der Q-Sepharosesäule eluiert wurde (gleiche Intensität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteinbanden im SDS-Gel und auf den Immunoblots; nicht dargestellt). Die Intaktheit der tetrameren Struktur der Dinitrogenase Komponente nach dem Zellaufschluss konnte bereits anhand des in Abb. 31 dargestellten Immunoblots demonstriert werden.

Ergänzend zur elektrophoretischen und immunologischen Charakterisierung des MoFe-Proteins wurde die 300 mM NaCl-Fraktion EPR-spektroskopisch untersucht. Im Spektrum konnte das FeMoco-typische  $S = 3/2$ -Signal ( $g = 4,29, 3,67$  und  $2,01$ ) eindeutig identifiziert werden (Abb. 35).



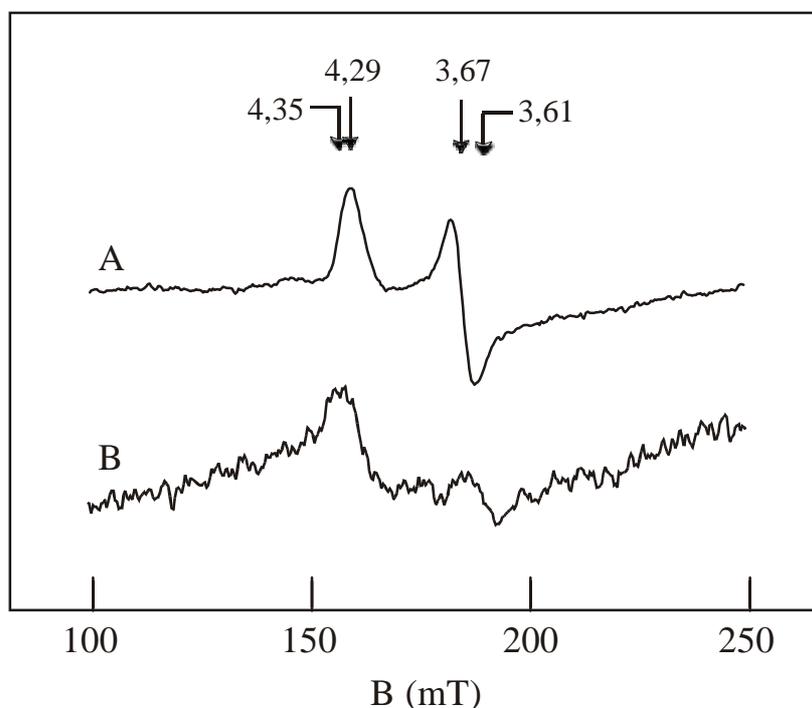
**Abb. 35: EPR-Spektren des MoFe-Proteins isoliert aus dem Wildtyp (A) und der *nifE*-Mutante (B).** Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 4 K mit 20 mW in einem Magnetfeldbereich von 50 - 450 mT und mit einem Receiver Gain von  $10^4$ . Alle weiteren Messparameter sind im Material- und Methodenteil aufgeführt. Spektrum A: MoFe-Protein, isoliert aus dem Wildtyp (12,6 mg/ml); Spektrum B: MoFe-Protein, isoliert aus der *nifE*-Mutante (2,9 mg/ml), 5 Scans.

Außerdem wurde der Metallgehalt (Fe und Mo) des partiell gereinigten MoFe-Proteins mittels ICP-MS analysiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass das Protein im Durchschnitt  $1,7 (\pm 0,2)$  Molybdän- und  $29 (\pm 4)$  Fe-Zentren pro Tetramer enthält. Im Idealfall enthält das tetramere MoFe-Protein zwei Mo- und 30 Fe-Zentren (zwei FeMoco-Moleküle ( $\text{Fe}_7\text{MoS}_9$ ) und zwei P-Cluster ( $\text{Fe}_8\text{S}_7$ ) pro Tetramer). Die durchgeführte Berechnung des Metallgehalts pro Tetramer basierte dabei auf der tatsächlichen MoFe-Proteinkonzentration in der 300 mM NaCl-Fraktion. Diese betrug 40 % der Gesamtproteinkonzentration und wurde mithilfe der radialen Immundiffusion (RID) ermittelt. Aufgrund der geringen Reinheit des Präparates kann der bestimmte Metallgehalt nur grob den tatsächlichen Metallgehalt widerspiegeln, da die Berechnungen auf der Annahme basieren, dass die restlichen 60 % Protein kein Molybdän bzw. Eisen enthalten. Bewerkenswerterweise konnte im EPR-Spektrum des isolierten MoFe-Proteins (Abb. 35) kein weiteres EPR-Signal im  $g \sim 2$ -Bereich (für  $S = 1/2$ -Systeme) detektiert werden. Dies schloss zumindest eine Kontamination des Präparats mit einem anderen Fe-S-Protein aus. Obwohl bei der Interpretation der ermittelten Metallgehalte sicherlich Vorsicht geboten ist, so weisen doch sämtliche weiteren Ergebnisse (Aktivität, SDS-Gel, Immunoblot und EPR-Spektren) auf die Isolierung eines größtenteils intakten MoFe-Proteins aus einer *nifE*-Mutante von *R. capsulatus* hin.

### **3.14 Vergleich der EPR-Spektren von ganzen Zellen und dem isolierten MoFe-Protein**

Wie bereits erläutert wurde, konnten zwischen den Präparationen ganzer Zellen und von Extrakten der *nifE*-Mutante deutliche Unterschiede bezüglich der  $\text{C}_2\text{H}_6$ -Bildungsrate bzw. den Inhibitor-Suszeptibilitäten (Inhibierung der  $\text{C}_2\text{H}_2$ - und  $\text{H}^+$ -Reduktion durch CO) beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.12). Es stellte sich daher die Frage, ob die katalytischen Eigenschaften *in-vivo* nicht auf die Existenz eines veränderten FeMo-Cofaktors im MoFe-Protein hinweisen. Um diese Frage zu klären, wurden Proben ganzer Zellen der *nifE*-Mutante hergestellt, diese EPR-spektroskopisch untersucht und das Spektrum mit dem ganzer Wildtyp-Zellen verglichen. Wie in Abb. 36 dargestellt, konnten tatsächlich signifikante Unterschiede zwischen beiden Spektren festgestellt werden. Das  $S = 3/2$ -Signal des FeMo-Cofaktors von *nifE*-Zellen zeichnete sich durch eine höhere Rhombizität ( $g = 4,35$  und  $3,61$ ) gegenüber der des Wildtyp-Signals ( $g = 4,29$  und  $3,67$ ) aus. Leider können, aufgrund der

geringen Intensität des Signals in Spektrum B, welche auf die geringere Expression des MoFe-Proteins zurückzuführen ist, keine Aussagen darüber getroffen werden, ob sich die  $S = 3/2$ -Signale auch in ihrer Linienform bzw. Linienbreite unterscheiden. Bei Verwendung der Resonanzen bei  $g = 3,61$  (für *nifE*) bzw.  $g = 3,67$  (für B10S) zur groben Auswertung der Signalintensität, konnte allerdings festgestellt werden, dass die Intensität des *nifE*-Cofaktorsignals ca. 10 % der Intensität des Wildtyp-Signals betrug. Dieses Ergebnis steht somit im Einklang mit den quantitativen Daten zur verringerten katalytischen Aktivität ( $C_2H_2$ -Reduktionsrate) und zum deutlich reduzierten MoFe-Proteingehalt.



**Abb. 36: EPR-Spektren ganzer Zellen des Wildtyps (A) und der *nifE*-Mutante (B).** Die Zellen der *nifE*-Mutante wurden in Gegenwart von Serin (Endkonz.: 5 mM) und  $MoO_4^{2-}$  (20  $\mu M$ ) für 20 h kultiviert und anschließend unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen (+ 4 mM  $Na_2S_2O_4$ ) zentrifugiert. Das Zellpellet (ca. 100-fach konzentriert) wurde anaerob in ein EPR-Röhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gleiche Prozedur wurde auch für die Präparation einer EPR-Probe mit den Wildtyp-Zellen, die in Gegenwart von  $MoO_4^{2-}$  (1  $\mu M$ ) kultiviert wurden, angewendet. Die Spektren wurden wie in der Legende von Abb. 35 beschrieben aufgenommen. Die  $g = 2,01$ -Resonanz des FeMo-Cofaktor-Signals konnte nicht dargestellt werden, da sie in Spektren ganzer Zellen von einem dominanten  $S = 5/2$ -Signal, welches durch anwesende  $Mn^{2+}$ -Ionen verursacht wird, überlagert wurde. Spektrum A: Wildtyp-Zellen (19 mg Protein/ml); Spektrum B: Zellen der *nifE*-Mutante (24 mg Protein/ml).

Im Gegensatz zu den voneinander abweichenden *in-vivo*-Spektren waren die FeMoco-EPR-Signale, welche mit dem isolierten MoFe-Protein aus der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante und dem Wildtyp aufgenommen wurden, identisch bezüglich der g-Werte und der Linienform (Abb. 35). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich das EPR-Spektrum, welches mit dem Rohextrakt aus der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante aufgenommen wurde, nicht von dem des isolierten MoFe-Proteinspektrums unterscheidet (Spektrum nicht dargestellt). Aufgrund dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass sich im Fall der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante die Struktur des FeMo-Cofaktors bzw. die Proteinumgebung des Clusters in ganzen Zellen deutlich von der in zellfreien Extrakten bzw. gereinigten Proteinlösungen unterscheidet.

## 4 Diskussion

### Teil A: Untersuchungen zur Bildung und zum Nachweis einer W-haltigen Nitrogenase in *R. capsulatus*

Molybdän und Wolfram sind zwei chemisch sehr ähnliche Elemente, die sich sowohl in ihren Atomradien bzw. Ionenradien als auch in ihrer Elektronenaffinität kaum unterscheiden. Beide Elemente bzw. ihre Verbindungen kommen in der Erdkruste in fast identischen Mengen (1,55 mg/kg) vor. Im Meerwasser hingegen ist die Konzentration von Molybdät – die seit Beginn der Photosynthese stabilste Mo-Verbindung – ca.  $5 \cdot 10^5$  mal größer ( $\sim 10 \mu\text{g/kg}$ ) als die von Wolframat [41]. Da die Häufigkeit eines Elements (bzw. seiner Verbindungen) in der Biosphäre eine der Grundvoraussetzungen für seine biologische Verwendung darstellt, ist es nicht verwunderlich, dass Wolfram in der belebten Natur eine weitaus geringere Rolle spielt als Molybdän.

Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Molybdän und Wolfram wurde in der Vergangenheit immer wieder versucht, das in den ubiquitären Mo-haltigen Enzymen bzw. Proteinen vorkommende Molybdän durch Wolfram zu ersetzen, um so neue Erkenntnisse über die Funktion des Molybdäns in den Proteinen zu gewinnen. In den meisten Fällen stellte sich jedoch heraus, dass bei solchen „Substitutions-Versuchen“ entweder gar kein Metallzentrum in das betreffende Protein inkorporiert wurde (Bildung eines Apoproteins) oder das durch Wolfram substituierte Molybdo-Protein fast oder sogar gänzlich inaktiv war. Obwohl sich Molybdän und Wolfram chemisch sehr ähnlich sind, scheint die Natur allerdings zwischen den beiden Metallen unterscheiden zu können.

Bei Versuchen Wolfram in die Nitrogenase einzubauen, ergab sich immer wieder das Problem, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  mehr oder minder den gesamten Mo-Metabolismus der Organismen inhibiert. Der inhibierende Effekt von  $\text{WO}_4^{2-}$  auf das Wachstum  $\text{N}_2$ -fixierender Organismen ist schon lange bekannt [36 - 38, 138]. Vor allem in Untersuchungen an *A. vinelandii* konnte demonstriert werden, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  die Aufnahme von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in die Zelle inhibiert [36], und dass Wolfram zwar in die Nitrogenase eingebaut wird, das resultierende Protein aber inaktiv

ist [37, 38]. In Untersuchungen an einer „W-resistenten“ Spontanmutante<sup>5</sup> von *A. vinelandii* konnte festgestellt werden, dass die Zellen tatsächlich in der Lage waren, in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  in hohen Endkonzentrationen im Nährmedium diazotroph zu wachsen [139]. Die in diesem Fall beobachtete Nitrogenaseaktivität hing aber wohl eher mit der unter den angewendeten Bedingungen (Zellanzucht in Mo-defizientem Nährmedium) erfolgten Expression der alternativen Fe-Nitrogenase von *A. vinelandii* zusammen. Dass neben der Mo-abhängigen Nitrogenase auch alternative Nitrogenase-Systeme existieren, die auf eigenständigen genetischen System basieren, war jedoch zum Zeitpunkt der oben beschriebenen Untersuchungen noch nicht bekannt. In einer späteren Studie an einer anderen W-resistenten Spontanmutante von *A. vinelandii* konnte dann allerdings demonstriert werden, dass in Abwesenheit von  $\text{MoO}_4^{2-}$  bei gleichzeitiger Anwesenheit von  $\text{WO}_4^{2-}$  im Nährmedium tatsächlich nur die Fe-Nitrogenase exprimiert wurde [140]. Bemerkenswerterweise konnte außerdem gezeigt werden, dass in Anwesenheit von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in der Nährlösung in dieser Mutante sowohl die Mo-abhängige als auch die alternative Fe-Nitrogenase gebildet werden. Diese Beobachtungen wurden dahingehend interpretiert, dass die  $\text{WO}_4^{2-}$ -Toleranz durch eine Mutation in den Genen vermittelt wird, welche in die Expression des Molybdat-Transportsystems (wahrscheinlich das LAMT-System) involviert sind [140].

Der erste – und bis dato einzige – eindeutige Beweis, dass Wolfram tatsächlich in die Dinitrogenase, und zwar in den Cofaktor, eingebaut werden kann, wurde von Hales und Case anhand von EPR-spektroskopischen Untersuchungen an einer aus *A. vinelandii* isolierten W-haltigen Nitrogenase erbracht [39]. Diese W-haltigen Nitrogenase-Präparationen waren allerdings noch mit signifikanten Mengen Molybdän bzw. FeMoco „kontaminiert“. So dominierte im aufgenommenen EPR-Spektrum sogar das FeMoco-Signal gegenüber dem des FeWco-Signals. Die nachgewiesene Nitrogenaseaktivität wurde ebenfalls als Indiz für den Einbau von Molybdän in den Cofaktor der Dinitrogenase bewertet und nicht auf die Anwesenheit des FeW-Cofaktors zurückgeführt [39]. Eine eingehendere Charakterisierung der W-Nitrogenase aus *A. vinelandii* wurde bislang nicht durchgeführt.

An dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus* wurden noch keine detaillierten Untersuchungen zum Einfluss von  $\text{WO}_4^{2-}$  auf die Nitrogenaseaktivität und die Bildung einer

---

<sup>5</sup> W-resistente Mutanten sind i. A. Spontanmutanten, die in der Lage sind, in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  (in hoher Konzentration) diazotroph zu wachsen. Sie werden normalerweise vom Wildtyp durch mehrwöchige Anzucht in  $\text{WO}_4^{2-}$ -haltigem Nährmedium in Gegenwart von  $\text{N}_2$  als einziger N-Quelle generiert.

W-substituierten Nitrogenase durchgeführt. Die Erzeugung einer W-haltigen Nitrogenase in diesem Organismus ist aber aus den folgenden Gründen besonders günstig: (i) *R. capsulatus* besitzt im Gegensatz zu *A. vinelandii* kein Mo-Speicherprotein, sodass bei der Zellanzucht sicherlich – für die Unterdrückung der FeMoco-Synthese entscheidende – Mo-defizientere Kulturbedingungen erreicht werden können. (ii) Mithilfe der verfügbaren *anfA*<sup>-</sup>-Mutante kann die Bildung der alternativen Fe-Nitrogenase unter Mo-Mangelbedingungen unterdrückt werden. Aufgrund der offensichtlichen Vorteile von *R. capsulatus* (gegenüber *A. vinelandii*) wurde im Rahmen dieser Arbeit das phototrophe Bakterium zur Erzeugung einer „artificialen“ W-haltigen Nitrogenase eingesetzt.

#### **4.1 Einfluss der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>- und WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium auf die Bildung und Aktivität der Nitrogenase von *R. capsulatus***

Im Einklang mit den Ergebnissen, die mit anderen diazotrophen Organismen erhalten wurden, konnte gezeigt werden, dass WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> auch die Aktivität der Nitrogenase (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion) von *R. capsulatus* inhibiert. Ein toxischer Einfluss hoher WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen auf das Zellwachstum in Gegenwart von Serin als N-Quelle konnte nicht beobachtet werden.

Eine starke Hemmung der Nitrogenaseaktivität wurde erst bei einem großen Überschuss von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> gegenüber MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> erreicht (vgl. Abb. 4). Auf der anderen Seite bewirkte eine Erhöhung der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium eine Minderung des durch WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> verursachten inhibierenden Effekts (vgl. Abb. 3). Das „kompetitive“ Verhalten der beiden Oxoanionen deutet u. a. auf eine Konkurrenz um die Aufnahme dieser Anionen in die Zelle hin, wie sie auch im Fall von *A. vinelandii* beobachtet wurde [36]. Kürzlich konnte in Untersuchungen an dem periplasmatischen ModA-Protein (Protein des HAMT-Systems) von *A. vinelandii* demonstriert werden, dass ModA MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mit ähnlicher, aber nicht gleicher Affinität bindet [85]. Eine – wenn auch geringfügige – Differenzierung zwischen MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> gelingt also auch auf der Oxoanionen-Ebene.

Die Bildung der W-haltigen Nitrogenase in *R. capsulatus* erfordert – wie bei anderen Organismen auch – den Einsatz Mo-defizienter Anzuchtbedingungen. Dass dies eine zwingende Notwendigkeit ist, konnte – wenn auch ungewollt – am Beispiel von *A. vinelandii* demonstriert werden, da die W-haltigen Nitrogenase-Präparationen nachweislich mit

deutlichen Mengen an FeMoco „verunreinigt“ waren, obwohl die Zellen in Mo-verarmtem Nährmedium in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  (1 - 10 mM) kultiviert wurden [39].

#### 4.1.1 Einfluss von $\text{MoO}_4^{2-}$ auf die Expression der Nitrogenase von *R. capsulatus*

Beim Einsatz Mo-defizienter Anzuchtbedingungen zur Bildung einer W-haltigen Nitrogenase muss gewährleistet sein, dass unter diesen Bedingungen auch die Strukturproteine der Nitrogenase gebildet werden. Die Notwendigkeit der Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  zur Expression der Nitrogenase scheint aber von Organismus zu Organismus zu divergieren.

In ursprünglichen Versuchen an *K. pneumoniae* wurde demonstriert, dass  $\text{MoO}_4^{2-}$  die Bildung des MoFe- und des Fe-Proteins induziert, also in Abwesenheit von  $\text{MoO}_4^{2-}$  die Strukturproteine der Nitrogenase nicht gebildet werden [141]. In späteren Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass  $\text{MoO}_4^{2-}$  keine direkte regulatorische Funktion auf die Nitrogenase-Expression besitzt.  $\text{MoO}_4^{2-}$  wird, ebenso wie die beiden Dinitrogenase-Untereinheiten (NifD und NifK) lediglich zur maximalen Expression der Nitrogenase-Strukturgene benötigt [119]. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass Molybdän entweder die Stabilität des MoFe-Proteins erhöht oder die Insertion von Molybdän (wahrscheinlich als FeMoco oder FeMoco-Vorstufe) in die Dinitrogenase für die Bildung einer regulatorisch aktiven Spezies notwendig ist. Die Bildung der nativen, FeMoco-haltigen Nitrogenase ist somit einer „Autoregulation“ unterworfen. Der Begriff Autoregulation deutet dabei an, dass, wie bei autokatalytischen Prozessen, einmal gebildetes Mo-haltiges Dinitrogenase-Protein seine weitere Expression katalysiert. Die Autoregulation der Nitrogenase-Expression, so wurde auch spekuliert, könnte ein nützliches Hilfsmittel zur Verhinderung der Synthese einer nicht-funktionsfähigen Nitrogenase darstellen [119]. In einer späteren Studie wurde allerdings demonstriert, dass nicht das MoFe-, sondern nur das Fe-Protein eine mögliche autoregulatorische Funktion übernehmen kann [135]. Leider wurde in diesem Zusammenhang die Rolle des  $\text{MoO}_4^{2-}$  in der Regulation der Nitrogenase-Bildung nicht weiter untersucht, sodass weiterhin unklar ist, welchen Einfluss das Oxoanion tatsächlich auf die Expression der Nitrogenase besitzt [135].

Im Gegensatz zu den Verhältnissen in *K. pneumoniae* konnte im Fall von *A. vinelandii* eindeutig gezeigt werden, dass die Expression der Strukturproteine der konventionellen Nitrogenase – auf transkriptionaler Ebene – durch  $\text{MoO}_4^{2-}$  reguliert wird. In Abwesenheit des Oxoanions werden also weder das MoFe- noch das Fe-Protein gebildet [34, 37, 118]. Überraschenderweise konnte zudem demonstriert werden, dass die konventionelle Mo-

abhängige Nitrogenase in einer *vnfA*<sup>-</sup>-Mutante von *A. vinelandii* (VnfA aktiviert die Transkription der Strukturgene der V-haltigen Nitrogenase) auch in Abwesenheit von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> gebildet wird [34]. Diese Beobachtung wurde dahingehend interpretiert, dass MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – zumindest in *A. vinelandii* – die Expression der Mo-abhängigen Nitrogenaseproteine induziert, indem deren Repression durch *vnfA* aufgehoben wird [34].

Ein erster Hinweis darauf, dass MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> auch die Bildung der Strukturproteine der Nitrogenase von *R. capsulatus* reguliert, ergab sich aus gelelektrophoretischen Untersuchungen an zellfreien Extrakten des Wildtyps, die von Hallenbeck et al. durchgeführt wurden [142]. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass weder das MoFe- noch das Fe-Protein gebildet wird, wenn die Zellen in Abwesenheit von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> kultiviert werden. Jedoch wurden die Zellanzuchten in Gegenwart von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (2 mM) als N-Quelle durchgeführt. In etlichen Studien an einer Vielzahl von diazotrophen Organismen konnte aber demonstriert werden, dass NH<sub>4</sub><sup>+</sup> die Bildung sämtlicher Nitrogenase-Systeme reprimiert. Da im Zuge der von Hallenbeck et al. durchgeführten gelelektrophoretischen Untersuchungen keine Strukturproteine der alternativen Fe-Nitrogenase von *R. capsulatus* nachgewiesen werden konnten, scheint die von den Autoren eingesetzte NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentration zu hoch gewesen zu sein, um eine eindeutige Aussage über den Einfluss von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> auf die Nitrogenase-Expression treffen zu können. Eine vergleichende Untersuchung zum Einfluss von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im Nährmedium in Gegenwart einer anderen Stickstoffquelle (z. B. Serin), welche die Bildung der Nitrogenase nicht reprimiert, wurde leider nicht durchgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration auf die Bildung und Aktivität der konventionellen Nitrogenase von *R. capsulatus* belegen somit zum ersten Mal eindeutig, dass MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> an der Regulation der Nitrogenase-Expression beteiligt ist. So konnte mithilfe von SDS-Gelelektrophoresen und anschließenden Immunoblots (vgl. Abb. 7 und 8) nachgewiesen werden, dass *anfA*<sup>-</sup>-Zellen, die nicht in der Lage sind, das alternative Nitrogenase-System zu exprimieren, in Mo-defizientem Nährmedium weder das MoFe- noch das Fe-Protein synthetisieren. Ein Protein, das auf den SDS-Gelen in Höhe der  $\alpha$ -Untereinheit der Dinitrogenase detektiert wurde, und auf einen eventuellen proteolytischen Abbau der Nitrogenase hinwies, konnte in folgenden Untersuchungen eindeutig als nicht-*nif*-Protein identifiziert werden. Folgende Beobachtungen führten zu diesem Ergebnis: (i) Das Protein konnte auch in Extrakten aus Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden, die in Gegenwart von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> angezogen wurden und somit keine *nif*-Genprodukte bildeten (vgl. Abb. 6). (ii) Das Protein konnte von den

Untereinheiten der Dinitrogenase mithilfe eines SDS-Tris-Tricin-Gelsystems separiert werden. (iii) Das auf diese Weise vom MoFe-Protein abgetrennte Protein reagierte nicht mit anti-Rc1<sup>Mo</sup>-Antikörpern (vgl. Abb. 9).

Mit steigender MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium nahm die gelelektrophoretisch und immunologisch nachweisbare Menge an MoFe-Protein zu. Die Quantifizierung der von den Zellen gebildeten MoFe-Proteinmengen mittels radialer Immundiffusion ergab eine maximale Expression des MoFe-Proteins ab 0,2 µM MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> im Nährmedium. Unter Mo-defizienten Bedingungen wurden hingegen nur ca. 5 % der MoFe-Proteinmenge synthetisiert (vgl. Tab. 3).

Da in Abwesenheit von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> auch kein Fe-Protein nachgewiesen werden konnte, die Menge dieses Proteins aber parallel zu der des MoFe-Proteins mit steigender MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium zunahm, ist offensichtlich, dass beide Strukturproteine der Nitrogenase zusammen reguliert werden (höchstwahrscheinlich auf transkriptionaler Ebene). Ein solcher Sachverhalt konnte auch im Fall von *A. vinelandii* beobachtet werden (Transkription von *nifH* erfolgte ab einer MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration von 50 nM [34]). Es ist bemerkenswert, dass in der *vnfA*<sup>-</sup>-Mutante von *A. vinelandii* auch unter Mo-defizienten Anzuchtbedingungen die Strukturproteine der konventionellen Nitrogenase gebildet werden und VnfA in Abwesenheit von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> somit wahrscheinlich als Repressor für die Bildung der konventionellen Mo-abhängigen Nitrogenase fungiert [34]. So sinnvoll ein solcher Mechanismus – zur Verhinderung der Synthese inaktiver und somit überflüssiger Nitrogenase-Moleküle (Apoprotein-Bildung) – auch sein mag, in *R. capsulatus* läuft die Regulation der Nitrogenase-Synthese definitiv anders ab, da (i) eine V-haltige Nitrogenase – und somit ein *vnfA*-Gen – nicht existiert, und (ii) funktionelles AnfA-Protein, welches eventuell diese Funktion übernehmen könnte, in der in dieser Arbeit verwendeten Mutante (*anfA*<sup>-</sup>-Mutante) nicht gebildet wird.

Die Beobachtung, dass auch in einer Cofaktorbiosynthese-defekten *nifB*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* sogar in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> keine signifikanten Mengen an Nitrogenaseprotein gebildet werden (vgl. Abb. 6), weist darauf hin, dass die Expression der Nitrogenase in diesem Organismus wahrscheinlich nicht durch MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, sondern durch eine andere Mo-haltige Verbindung (z. B. eine FeMoco-Vorstufe) reguliert wird. Diese Vermutung steht im Einklang mit der bereits von Dixon et al. formulierten Hypothese zur Autoregulation der Nitrogenase-Expression [119].

#### 4.1.2 Einfluss von $\text{WO}_4^{2-}$ auf die Expression der Nitrogenase von *R. capsulatus*

Der Einfluss von  $\text{WO}_4^{2-}$  (in Abwesenheit von  $\text{MoO}_4^{2-}$ ) im Nährmedium auf die Bildung der Nitrogenase-Strukturproteine wurde erstmals detaillierter an *A. vinelandii* untersucht. So konnte demonstriert werden, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  unter Mo-defizienten Bedingungen die Synthese der Nitrogenase induziert [37]. Diese Tatsache war sicherlich die Voraussetzung für die spätere Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase aus *A. vinelandii* [39]. Im Gegensatz dazu konnte mit einer W-resistenten Mutante von *A. vinelandii* gezeigt werden, dass in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  keine konventionellen Nitrogenase-Strukturproteine gebildet werden [140]. Diese Beobachtung wurde jedoch auf einen Defekt in der Metallionen-Aufnahme zurückgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an *R. capsulatus* zeigen, dass  $\text{WO}_4^{2-}$  – wie auch in *A. vinelandii* – einen induzierenden Einfluss auf die Nitrogenase-Expression besitzt. Unter Mo-defizienten Bedingungen in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 1 mM synthetisierten die Zellen ca. 1/4 der Nitrogenase-Proteinmenge, die unter optimalen Anzuchtbedingungen ( $0,2 \mu\text{M MoO}_4^{2-}$ ) gebildet wurden (vgl. Abb. 10 und Tab. 3). Aufgrund der deutlich geringeren Syntheserate gegenüber den optimalen Kultivierungsbedingungen lässt sich folgern, dass die Nitrogenase-Expression wahrscheinlich nicht durch  $\text{WO}_4^{2-}$  selbst, sondern durch eine andere W-haltige Verbindung (vielleicht eine FeWco-Vorstufe) reguliert wird, die sich in ihren chemischen Eigenschaften signifikant von der entsprechenden Mo-Verbindung unterscheidet. Da Zellen, die in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  angezogen wurden, nur marginal aktiv waren, folgt aber, dass eine katalytisch aktive Spezies (wie evtl. ein FeMoco in der konventionellen Nitrogenase) an der Regulation der Nitrogenase-Expression nicht beteiligt sein kann.

## 4.2 Isolierung und Charakterisierung der W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus*

### 4.2.1 Isolierung der W-haltigen Nitrogenase

Die Tatsache, dass die Strukturproteine der konventionellen Nitrogenase von *R. capsulatus* unter Mo-defizienten Bedingungen in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  synthetisiert werden, bildete die Voraussetzung für die Isolierung einer W-haltigen Nitrogenase aus diesem Organismus. Zur Isolierung des W-haltigen Proteins wurden *anfA*<sup>-</sup>-Zellen in Mo-defizientem Nährmedium mit

$\text{WO}_4^{2-}$  (Endkonz.: 1 mM) angezogen, lysozymatisch in Gegenwart von Glycerin und wirksamen Proteaseinhibitoren aufgeschlossen und die löslichen Extraktproteine an Q-Sepharose chromatographiert. Die Dinitrogenase-Komponente konnte durch Elution mit 300 mM NaCl – abgetrennt vom Fe-Protein und zu ca. 50 % rein – erhalten werden. Die Integration von Wolfram in die Nitrogenase konnte eindeutig durch (i) Metallgehalts-Bestimmungen (im Durchschnitt: 1 ( $\pm$  0,15) W-, 16 ( $\pm$  2) Fe- sowie 0,01 Mo-Zentren pro  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer), und (ii) durch die Analyse des EPR-Spektrums (FeWco-Signal) bewiesen werden.

Die ermittelten Metallgehaltswerte weisen auf einen deutlichen Überschuss von W- gegenüber Mo-Zentren im Protein hin. Interessanterweise scheint das Tetramer im Durchschnitt nur mit einem FeWco und einem P-Cluster (insgesamt 1 W, 15 Fe) besetzt zu sein. Eine solche „Halbbesetzung“ der Cofaktor-Bindungsstellen mit nur einem FeWco-Molekül wurde auch von Hales und Case nachgewiesen [39]. So war im aktiven W-haltigen *A. vinelandii*-Protein immer eine Cofaktor-Bindungsstelle mit einem FeMoco-Molekül besetzt, während in die andere ein FeWco inkorporiert worden war.

Das Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Metallanalyse der W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* (Hinweis auf eine „Halbbesetzung“ der Cofaktor-Bindungsstellen mit einem FeWco) ist in diesem Zusammenhang äußerst bemerkenswert. Die Natur scheint evtl. einen Weg gefunden zu haben, den Einbau eines zweiten FeW-Cofaktormoleküls in die Dinitrogenase zu unterbinden, um somit in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  in großem Überschuss – bei gleichzeitiger Anwesenheit von zumindest geringen Mengen an  $\text{MoO}_4^{2-}$ , die zur Synthese von FeMoco-Molekülen dienen – die Fixierung von  $\text{N}_2$  zu ermöglichen. Während dies im Fall von *A. vinelandii* auch gelang (eine Cofaktor-Bindungsstelle mit einem FeMoco-Molekül besetzt), war dies mit *R. capsulatus* nicht möglich, da das Nährmedium für die Zellanzucht zu  $\text{MoO}_4^{2-}$ -verarmt war, um sämtliche freie Cofaktor-Bindungsstellen zu besetzen. Denkbar wäre aber auch, dass ca. die Hälfte aller Dinitrogenase-Moleküle aufgrund der Labilität des Proteins ihre Cluster im Zuge der Präparation verloren haben, während die andere Hälfte der Proteinmoleküle noch intakt sind (mit jeweils zweifacher, also kompletter Besetzung der Metallcluster-Bindungsstellen).

Aktivitätsmessungen mit der aus *R. capsulatus* isolierten W-haltigen Nitrogenase führten zu der Annahme, dass das Protein inaktiv ist. Ein äußerst geringes Maß an Aktivität konnte allerdings dennoch nachgewiesen werden. Diese „Restaktivität“ lässt sich aber mit aller

Wahrscheinlichkeit auf die geringen Mengen an FeMoco-Molekülen zurückführen, die nachweislich in die Dinitrogenase eingebaut wurden. Diese Vermutung steht auch im Einklang mit dem starken inhibierenden Effekt von  $\text{WO}_4^{2-}$  auf die Nitrogenaseaktivität *in-vivo* und das in seiner Intensität nur minimal veränderte EPR-Signal des FeW-Cofaktors nach der Überführung des Proteins in den „Turnover“-Zustand. Mit der aus *A. vinelandii* isolierten W-haltigen Nitrogenase wurde zwar eine wesentlich höhere Aktivität gemessen, diese korrelierte aber mit dem signifikant höheren Mo-Gehalt (Verunreinigung durch FeMoco) [39].

Die Frage, ob die aus *R. capsulatus* isolierte W-haltige Nitrogenase nicht doch eine – wenn auch geringe – Aktivität besitzt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt leider nicht endgültig beantwortet werden, da eine präzise Aussage darüber nur mithilfe von Messungen am vollkommen Mo-freien Präparat (welches bislang noch nicht hergestellt werden konnte) getroffen werden kann. Die geringfügige Abnahme der Intensität des FeWco-Signals im EPR-Spektrum nach der Überführung des Proteins in den „Turnover“-Zustand, könnte auf eine eventuelle katalytische Funktion hinweisen. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass das labile Protein im Zuge der Probenpräparation (Auftau- und Einfriervorgang; Inkubation mit Reagenzien bei Raumtemperatur) geringfügig zerstört bzw. inaktiviert worden ist. Diese Überlegungen stehen auch im Einklang mit den Ergebnissen, die mit dem *A. vinelandii*-Protein erhalten wurden [39].

#### 4.2.2 EPR-spektroskopische Charakterisierung der W-haltigen Nitrogenase

Der sicherlich eindeutigste Beleg dafür, dass Wolfram tatsächlich in Form eines FeWco in die Nitrogenase von *R. capsulatus* eingebaut wurde, ist das EPR-Spektrum. Dieses weist ein deutliches  $S = 3/2$ -Signal auf, welches weniger rhombisch ist als das des FeMo-Cofaktors. Auch im EPR-Spektrum der von Hales und Case aus *A. vinelandii* isolierten W-haltigen Nitrogenase wurde ein solches Signal detektiert und dem FeWoco zugeordnet [39]. Die im Fall des W-haltigen *R. capsulatus*-Proteins ermittelten g-Werte von 4,19 und 3,93 sind mit denen, die für das *A. vinelandii*-Protein bestimmt wurden ( $g = 4,22$  und  $3,95$ ) fast identisch. Die Zuordnung des beobachteten  $S = 3/2$ -Signals zum FeWco basiert allerdings nicht nur auf dem Vergleich des *Rhodobacter*- mit dem *Azotobacter*-Spektrum, sondern auch auf Untersuchungen an synthetisierten Mo- und W-Fe-S-Clustern, welche ebenfalls einen Spin von  $S = 3/2$  haben [143 - 145]. In all diesen Modellverbindungen ist die Rhombizität des W-haltigen Clusters geringer als die des analogen Mo-haltigen Clusters. Diese Beobachtung steht auch im Einklang mit theoretischen Berechnungen [145].

Wie auch im Fall des *A. vinelandii*-Proteins, konnte in der im Rahmen dieser Arbeit präparierten W-haltigen Nitrogenase ein FeMoco-Signal detektiert werden. Während im *Azotobacter*-Spektrum jedoch das FeMoco-Signal dominierte, war die Signalintensität des FeW-Cofaktors im *Rhodobacter*-Spektrum erheblich größer als die des FeMo-Cofaktors. Die aus *R. capsulatus* isolierte W-haltige Nitrogenase war also wesentlich „reiner“, d. h. Mo-verärmerter als das *A. vinelandii*-Präparat.

Im Einklang mit dem *Azotobacter*-Spektrum konnte auch im *Rhodobacter*-Spektrum ein breites Signal im Hochfeldbereich detektiert werden, welches von Hales und Case als S3-Signal bezeichnet und einem reduzierten Fe-S-Cluster zugeordnet wurde [39]. Die g-Werte dieses Signals ( $g = 2,09, 1,95$  und  $1,86$ ) stimmen ebenfalls weitgehend mit denen des *A. vinelandii*-Proteins überein ( $g = 2,10, 1,92$  und  $1,85$ ) [39].

Zur weiteren Charakterisierung der EPR-aktiven Spezies in der W-haltigen Nitrogenase wurde die Temperatur- und die Mikrowellenleistungs-Abhängigkeit der Signalintensitäten ermittelt. Solche Untersuchungen wurden am *A. vinelandii*-Protein nicht detailliert (Temperatur-Abhängigkeit) bzw. gar nicht (Leistungs-Abhängigkeit) durchgeführt. Wie auch im Fall des FeMo-Cofaktors lag das Temperaturoptimum der Intensität des FeWco-Signals bei ca. 4 K. Jedoch konnte demonstriert werden, dass die Intensität des FeMoco-Signals mit steigender Temperatur drastischer abnimmt, als die des FeW-Cofaktors. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Cofaktoren besteht in dem abweichenden Verhalten der entsprechenden Signalintensitäten gegenüber der Mikrowellenleistung. Während das FeWco-Signal bis zu einer Leistung von ca. 5 mW ungesättigt blieb (siehe Abb. 18), konnten beim FeMoco-Signal geringfügige Sättigungseffekte bereits ab ca. 1 mW beobachtet werden (vgl. Tab. 5). Das S3-Signal hingegen unterlag bei einer Mikrowellenleistung von 1 mW bereits deutlichen Sättigungseffekten. Außerdem konnte durch die Verringerung der Leistung von 20 auf 5 bzw. 1,25 mW eine Auflösung des breiten S3-Signals in mindestens zwei voneinander unterscheidbare Resonanzen ( $g = 2,00$  und  $1,95$ ) beobachtet werden. Neben der Linienbreite und assymetrischen Form des Signals ist dies ein eindeutiger Hinweis auf die Existenz mindestens zweier EPR-aktiven Spezies in diesem Feldbereich. Ein weiterer Hinweis darauf ergab sich auch aus der Temperaturabhängigkeit des S3-Signals. Bei höheren Temperaturen (12 - 16 K) erschien im Spektrum ein bei tieferen Temperaturen nicht aufgelöstes Signal bei  $g = 2,03$ .

Interessanterweise verhielt sich die Intensität des S3-Signals bezüglich der Temperaturabhängigkeit identisch mit der des FeWco-Signals, d. h. dass das Intensitätsmaximum ebenfalls bei 4 K beobachtet werden konnte und mit steigender Temperatur parallel zum FeWco-Signal abnahm. Bemerkenswert ist auch, dass sich die Amplitude des S3-Signals durch die Überführung des Proteins in den „Turnover“-Zustand kaum veränderte, während die Signalform (Abnahme der Signalbreite und gleichzeitiges Auftauchen eines Signals bei  $g = 2,00$ ) signifikant von der im Spektrum der „semi“-reduzierten Probe abweicht. Da der „Turnover“-Zustand zwar auch an der W-haltigen Nitrogenase von *A. vinelandii* EPR-spektroskopisch untersucht worden ist, jedoch leider keine Angaben über eine Veränderung der Linienform des S3-Signals gemacht wurden, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Aussage zur Relevanz der Spezies, die dieses S3-Signal in der W-haltigen Nitrogenase hervorruft, möglich.

#### 4.2.3 Redox Titration der W-haltigen Nitrogenase

Bereits von Müller et al. wurde postuliert, dass die Substitution von Molybdän durch Wolfram im Cofaktor der Dinitrogenase zu einem inaktiven Protein führt, da ein Wertigkeitswechsel (wichtig für die Elektronen-Speicherfunktion) von Wolfram in einer vorwiegenden S-Koordinationssphäre im Cluster nicht so leicht erfolgt wie der von Molybdän oder Vanadium [126]. Diese Hypothese konnte mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Redox Titration der W-haltigen Nitrogenase erstmals bestätigt werden. Durch stufenweise Oxidation des Proteins (ab einem Redoxpotential von  $-470\text{mV}$ ) verringerte sich die Intensität des FeWco-Signals kontinuierlich, bis das Signal ab einem Potential von  $-75\text{ mV}$  nicht mehr detektiert werden konnte. Vergleichende Untersuchungen an der konventionellen Mo-abhängigen Nitrogenase von *R. capsulatus* (isoliert aus dem Wildtyp) hingegen ergaben, dass die Intensität des FeMoco-Signals in einem Potentialbereich von  $-440$  bis  $-300\text{ mV}$  konstant (100 % der Signalintensität) war. Das im Fall des FeMo-Cofaktors ermittelte Halbstufenpotential betrug ca.  $-50\text{ mV}$ , einem Potential, bei dem der FeWco bereits nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der noch kontinuierlichen Zunahme der Intensität des FeWco-Signals im tiefen Potentialbereich ( $< -400\text{ mV}$ ) und der Tatsache, dass unter den angewendeten Bedingungen mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  als Reduktionsmittel ein Intensitätsmaximum des Signals offensichtlich nicht erreicht wird, ist es schwierig für den Cofaktor ein Halbstufenpotential anzugeben. Es liegt jedoch auf jeden Fall tiefer als  $-200\text{ mV}$ , da bei diesem Potential die Signalintensität des Cofaktors die Hälfte der Intensität

betrug, die bei - 470 mV gemessen wurde („apparentes Halbstufenpotential“). Da aber zu erwarten ist, dass sich die Signalintensität bei tieferen, im Rahmen der experimentellen Bedingungen aber nicht erreichbaren Potentialen weiter erhöht, wird das tatsächliche Halbstufenpotential des FeW-Cofaktors sogar wesentlich tiefer als - 200 mV zu liegen. Aus diesen Überlegungen ergibt sich, dass sich der FeWco gegenüber dem FeMoco durch ein deutlich niedrigeres Redoxpotential auszeichnet, und dass die Differenz der Halbstufenpotentiale mindestens 150 mV beträgt.

Im Vergleich zum FeMoco-Signal der konventionellen Mo-haltigen Nitrogenase ist die Intensität des FeWco-Signals der W-haltigen Nitrogenase wesentlich geringer. Diese Beobachtung konnte auch anhand des W-haltigen *A. vinelandii*-Proteins gemacht werden, in dessen Spektrum das FeMoco-Signal eindeutig über das des FeWco dominierte, obwohl das Verhältnis der beiden Cofaktoren im Protein 1 : 1 war [39]. Aufgrund der durch die Redox Titration erhaltenen Daten lässt sich folgern, dass die geringe Intensität des FeWco-Signals wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass der FeWco nur zum Teil „semi“-reduziert, d. h. im  $S = 3/2$ -Spinzustand vorliegt. Dieser könnte aber evtl. bei tieferen Redoxpotentialen als die, welche mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  eingestellt werden können, zunehmend populiert werden.

Der ebenfalls im Zuge der Redox Titration nachgewiesene P-Cluster im 1-Elektronen-oxidierten Zustand wies eine mit dem P-Cluster in der Mo-haltigen Dinitrogenase nahezu identische Potentialabhängigkeit auf. Diese Beobachtung lässt folgende Schlussfolgerungen zu: (i) Der P-Cluster im W-haltigen Protein ist intakt und – zumindest EPR-spektroskopisch – kaum vom P-Cluster im konventionellen MoFe-Protein zu unterscheiden. (ii) Dies wiederum lässt darauf schließen, dass eine drastische Veränderung des Cofaktors (Austausch des Heterometalls) keinen Einfluss auf das Potential und somit die Elektronenspeicher-Funktion des P-Clusters hat.

Interessanterweise konnte das bislang nur im Zusammenhang mit W-haltigen Nitrogenasen nachgewiesene „S3-Signal“ (breites Signal im  $g \sim 2$ -Bereich) im Spektrum der für die Redox Titration vorbereiteten W-haltigen Nitrogenasepräparation nicht mehr detektiert werden. Das Verschwinden dieses Signals scheint auf die Labilität der Spezies zurückzuführen zu sein, die dieses Signal hervorruft. Es ist wahrscheinlich, dass diese Spezies im Zuge der durchgeführten Gelfiltration an Sephacryl S-200 aus dem Protein herausgelöst wurde. Bereits von Hales und Case wurde spekuliert, dass es sich bei diesem Redoxzentrum um einen reinen Fe-S-Cluster handelt [39]. Wolfram ist wahrscheinlich kein Bestandteil dieser Spezies, da

EPR-Spektren von W-Clustern sich häufig durch ein sichtbares Hyperfein-Splitting – hervorgerufen durch die Anwesenheit von  $^{183}\text{W}$  (Kernspin 1/2) – auszeichnen, welches im S3-Signal jedoch nicht beobachtet werden konnte. Somit ist es tatsächlich sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem Redoxzentrum, welches das S3-Signal hervorruft, um einen Fe-S-Cluster, wahrscheinlich sogar um einen zerstörten FeWco bzw. FeWco-Fragment handelt, bei dem das W-Zentrum verlorengegangen ist. Von einem solchen Cluster, bei dem das Heterometall und somit die Anbindung an das Protein durch einen Histidinrest und Homocitrat fehlt, ist zu erwarten, dass er äußerst labil ist und leicht aus dem Protein entfernt werden kann. Denkbar, aber weniger wahrscheinlich ist auch, dass es sich bei dieser Spezies um zerstörte P-Clustermoleküle handelt. Weitere Untersuchungen sind allerdings nötig, um den wirklichen Ursprung und die Relevanz dieses bislang nur in W-haltigen Nitrogenasepräparationen beobachteten Signals zu ermitteln.

### 4.3 Zur Bedeutung W-haltiger Enzyme und Nitrogenasen

Die kürzliche Entdeckung, dass Wolfram für einige hyperthermophile Mikroorganismen ein essentielles Spurenelement darstellt, hat zu einer immensen Zunahme des Interesses auf dem Gebiet der Wolframprotein-Forschung geführt. Bis heute sind vier verschiedene Typen von Wolframenzymen bekannt, die alle Redoxreaktionen bei tiefem Potential und hohen Temperaturen katalysieren [40, 41]. Die einzige Ausnahme stellt die Acetylen-Hydratase dar, die keine Redoxreaktion, sondern die Hydratation von  $\text{C}_2\text{H}_2$  zu Acetaldehyd katalysiert. Dennoch konnte enzymatische Aktivität bei diesem Enzym nur bei tiefem Potential ( $\sim -330$  mV) nachgewiesen werden [146]. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass nach dem Austausch des Wolfram-Zentrums durch Molybdän das Enzym aktiv bleibt, die Hydratation von  $\text{C}_2\text{H}_2$  allerdings nur bei wesentlich höheren Potentialen gelingt.

Das Dogma, dass die Substitution von Molybdän durch Wolfram in Molybdoenzymen zu einem inaktiven Protein führt, besteht ebenfalls nicht mehr. Besonders in den letzten Jahren konnten einige Beispiele dafür gefunden werden, dass durch den Austausch des Molybdän-Zentrums durch Wolfram die katalytische Aktivität nicht generell verloren geht [146 - 148]. Auch die Ansicht, dass sämtliche natürlich vorkommenden Wolfram-Proteine nur bei tiefem Potential wirksam sind, konnte kürzlich widerlegt werden. Durch Substitution des Mo-Zentrums in der Mo-haltigen TMAO (Trimethylamin N-oxid)-Reduktase aus *E. coli* durch

Wolfram konnte ein aktives Wolfram-Enzym isoliert werden, welches die Reduktion von TMAO zu Trimethylamin bei einem Potential von + 130 mV katalysiert [148]. Interessanterweise vermag das W-haltige Protein nicht nur TMAO sondern auch DMSO (Dimethylsulfoxid) zu reduzieren (+ 160 mV), eine Eigenschaft, die das natürlich vorkommende Molybdoenzym nicht besitzt. Aufgrund der höheren thermischen Stabilität ist das W-substituierte Enzym bei hohen Temperaturen (> 80°C) höchstwahrscheinlich aktiver als das Mo-haltige Protein [148]. Die Isolierung eines aktiven W-substituierten Enzyms aus *E. coli*, welches eine Redoxreaktion bei relativ hohem Potential katalysiert, ist das bislang einzige Indiz dafür, dass der entscheidende Vorteil von Wolfram gegenüber Molybdän die thermische Stabilität des Proteins ist, dass aber tiefe Redoxpotentiale zur Katalyse nicht zwingend erforderlich sind. Auf der anderen Seite sprechen die Beobachtungen, die mit der deutlichen Mehrheit der bislang bekannten Wolframenzyme gemacht wurden, dafür, dass nur Wolfram in der Lage ist unter reduzierenden sulfidischen Bedingungen – wie sie in der Nähe von Tiefsee-Hydrothermalöffnungen herrschen – in der Oxidationsstufe + 6, die essentiell für die katalytische Aktivität ist, zu verbleiben [40, 149]. Die Hypothese, dass ein niedriges Redoxpotential ein entscheidendes Kriterium für die Funktion von Wolframenzymen ist, konnte auch anhand zahlreicher Untersuchungen an synthetisierten W-Komplexen demonstriert werden, die sich durch eine höhere thermische Stabilität, ein geringeres Redoxpotential und durch eine erhöhte O<sub>2</sub>-Sensitivität auszeichnen.

Ein gegenüber dem Cofaktor von Mo-Nitrogenasen auffällig niedriges Halbstufenpotential konnte jetzt auch erstmals an der im Rahmen dieser Arbeit isolierten W-haltigen Nitrogenase aus *R. capsulatus* anhand einer Redoxtitration demonstriert werden. Während das Halbstufenpotential des FeMo-Cofaktors (Übergang vom „semi“-reduzierten in den oxidierten Zustand) ca. - 50 mV beträgt, liegt das des FeW-Cofaktors erheblich tiefer (< - 200 mV). Ob die W-haltige Nitrogenase – trotz des tieferen Potentials – nicht doch zumindest geringfügig aktiv ist, konnte, wie bereits erläutert, bislang nicht eindeutig geklärt werden. Die beobachteten marginalen Restaktivitäten deuten jedoch darauf hin, dass diese auf äußerst geringe Mengen an FeMoco im Protein zurückzuführen sind, und dass eine reine W-haltige Nitrogenase demnach wahrscheinlich – zumindest unter den angewendeten *in-vitro*-Aktivitätstestbedingungen – inaktiv ist. Es könnte, wie bereits oben schon angedeutet, sein, dass der FeWco im Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-reduzierten Zustand überwiegend in der oxidierten und nicht – wie der FeMoco – in der „semi“-reduzierten Form vorliegt.

Abgesehen von der Schwierigkeit, den FeWco zu reduzieren, könnte die Inaktivität der W-haltigen Nitrogenase aber auch darin begründet liegen, dass durch eine eventuell stärkere Bindung des W-Zentrums zu den terminalen Liganden des Cofaktors, das Homocitrat vom W-Zentrum nicht abdissoziieren kann, und somit eine Bindung des N<sub>2</sub>-Moleküls an das W-Zentrum nicht gelingt. Ein solcher Mechanismus, bei dem durch Dissoziation der Homocitrat-Carboxyl-Mo-Bindung das Anbinden von N<sub>2</sub> an das Heterometall-Zentrum (Mo im FeMoco) ermöglicht wird, wurde bereits von Grönberg et al. vorgeschlagen [26].

Der Mechanismus der N<sub>2</sub>-Reduktion wurde in einigen Fällen auch anhand von W-haltigen Modellverbindungen, bei denen N<sub>2</sub> an das W-Zentrum koordiniert, untersucht [150, 151]. Kürzlich konnte erstmals in der Arbeitsgruppe von M. Hidai eine W-haltige Koordinationsverbindung synthetisiert werden, die sowohl N<sub>2</sub> als auch H<sub>2</sub> aktiviert (Haber-Typ) [151, 152]. Jedoch verläuft die Ammoniaksynthese in diesem Fall stöchiometrisch und nicht katalytisch [151, 153]. Die W-N-Bindung zeichnet sich in diesem Komplex durch eine stärkere Rückbindung gegenüber einer analogen Mo-N-Bindung aus. Dies könnte von Vorteil für die Fixierung von N<sub>2</sub> mithilfe von W-haltigen Koordinationsverbindungen sein, da durch die Rückbindung nachweislich (anhand der N-N-Streckschwingung) die N-N-Bindung gelockert und somit eine Protonierung bis zum NH<sub>3</sub> leichter erfolgt (M. Hidai, persönliche Mitteilung).

In diesem Zusammenhang ist die folgende Beobachtung höchst bemerkenswert: Es konnte demonstriert werden, dass das methanogene Archaeobakterium *Methanococcus thermolithotrophicus* in der Lage ist (in Gegenwart von WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>!), N<sub>2</sub> zu fixieren [154]. Das Nitrogenase-Enzym unterscheidet sich signifikant von den bislang bekannten Nitrogenasen, da es bei hohen Temperaturen (64°C) aktiv ist. Die Notwendigkeit hoher Temperaturen zur enzymatischen N<sub>2</sub>-Reduktion in diesem Organismus könnte darauf hinweisen, dass – im Einklang mit der Beobachtung, dass die meisten Wolframenzyme in hyperthermophilen Organismen vorkommen – die Nitrogenase in diesem Bakterium ein funktionsfähiges W-haltiges Enzym ist. Falls dies korrekt ist, stellt sich natürlich zwangsläufig die Frage, ob vielleicht auch die aus *R. capsulatus* isolierte W-haltige Nitrogenase zwar nicht bei 30°C (Temperatur des Aktivitätstests), aber doch bei höheren Temperaturen signifikante katalytische Aktivität aufweist. Aufgrund der Tatsache, dass in der Nähe von Hydrothermalöffnungen die Wolfram-Konzentration ca. 1000-fach größer ist als im Meerwasser [41] und sich dort vielleicht das Leben zuerst entwickelt hat, ist denkbar, dass die

evolutionsgeschichtlich ersten Nitrogenasen sogar W-haltige Enzyme waren und sie eventuell heute noch existieren.

Die in dieser Arbeit zum ersten Mal erfolgreich durchgeführte Isolierung einer fast Mo-freien W-haltigen Nitrogenase, sowie die partielle Charakterisierung dieses Proteins könnten als Basis für weitere wichtige Untersuchungen (wie z. B. zur präzisen Ermittlung der spezifischen Aktivität und der Substratspezifität, der Temperaturabhängigkeit der Aktivität sowie Stabilität des W-haltigen Proteins) dienen.

## Teil B: Untersuchungen zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors an einer *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus*

In zahlreichen Untersuchungen – vor allem an *K. pneumoniae* und *A. vinelandii* – konnte demonstriert werden, dass diverse Proteine, u. a. NifB, H, V, N, aber auch NifE, in den Biosynthese-Prozess des FeMo-Cofaktors und seine anschließende Insertion in die Apo-Dinitrogenase involviert sind [43]. Ein Defekt im *nifE*-Gen führt i. A. zur Bildung einer Cofaktor-losen und somit inaktiven Apo-Dinitrogenase [44, 43].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an einer *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* beweisen jedoch, dass Zellen dieser Mutante, trotz eines Defekts in *nifE*, in der Lage sind, eine aktive Dinitrogenase – wenn auch gegenüber Wildtyp-Zellen in deutlich verminderter Menge – zu exprimieren. Dieses Enzym vermag nachweislich sowohl C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> als auch N<sub>2</sub> zu reduzieren. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die Fähigkeit der *nifE*<sup>-</sup>-Zellen, N<sub>2</sub> und C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zu reduzieren, ein inhärentes Merkmal der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* ist und nicht mit der Bildung der alternativen Fe-Nitrogenase in Zusammenhang steht. Interessanterweise wurden marginale Nitrogenaseaktivitäten auch in Extrakten einer *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *A. vinelandii* [49] und in ganzen Zellen sowie Extrakten einer *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *K. pneumoniae* [44] nachgewiesen. Jedoch wurde der Ursprung der beobachteten Aktivitäten in diesen Mutanten nicht weiter untersucht.

Versuche, eine Kopie des *nifE*-Gens (*nifE*<sub>II</sub>) in *R. capsulatus* zu identifizieren, blieben bislang erfolglos [83]. Obwohl die Existenz eines zweiten *nifE*-ähnlichen Proteins (NifE<sub>II</sub>) in *R. capsulatus* nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, scheint sie jedoch aufgrund der zwei auffälligsten Merkmale der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante unwahrscheinlich. Diese Merkmale sind: (i) die Abhängigkeit der maximalen Expression einer aktiven Dinitrogenase von einer relativ hohen MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration (20 - 50 μM) im Nährmedium (vgl. Abb. 27), und (ii) der im Zuge der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion entstehende hohe C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Anteil (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ~ 6 - 12 %), der mit ganzen Zellen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante gemessen werden konnte (vgl. Abb. 28). Die beobachteten Schwankungen im C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Anteil in unterschiedlichen Zellpräparationen hingen zumindest teilweise mit der Kultivierungsdauer der Zellen zusammen (siehe Abschnitt 3.10). Beide charakteristischen Merkmale der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante – die Notwendigkeit hoher MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen zur maximalen Expression der Dinitrogenase und die relativ hohe C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Produktionsrate – stehen in krassem Gegensatz zu den Ergebnissen, die aus Untersuchungen

mit der nativen Mo-Nitrogenase des Wildtyps von *R. capsulatus* und anderen Organismen erhalten wurden.

Die  $C_2H_2$ -Reduktionsrate, die mit diazotroph gewachsenen Zellen der *nifE*-Mutante gemessen wurde, betrug nur etwa 15 % der Rate, die für Wildtyp-Zellen bestimmt wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die  $C_2H_2$ -Reduktionsrate *in-vivo* mit der in den Zellen gebildeten MoFe-Proteinmenge korreliert. Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich folgern, dass die ermittelten Aktivitäten auf ein intaktes MoFe-Protein zurückzuführen sind, und dass in den Zellen keine signifikanten Mengen an Apo-Dinitrogenase (bzw. an einem veränderten, inaktiven oder gering aktiven MoFe-Protein) vorhanden sind. Die geringe *in-vivo*-Aktivität unter optimalen Anzuchtbedingungen ( $\sim 20 \mu M MoO_4^{2-}$ ) hat ihren Ursprung also nicht in einer Inhibierung der Nitrogenaseaktivität bzw. in der Existenz eines strukturell veränderten, weniger aktiven Cofaktors, sondern in der geringen MoFe-Proteinmenge in den Zellen. Nur wenn *nifE*-Zellen in Gegenwart von  $MoO_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 1 mM im Nährmedium kultiviert wurden, korrelierte die *in-vivo*-Aktivität nicht mit der synthetisierten MoFe-Proteinmenge (vgl. Abb. 27 und 30). Außerdem konnte eine drastische Verringerung der  $C_2H_6$ -Bildung beobachtet werden. Sowohl die geringe  $C_2H_4$ -Bildungsrate, als auch der im Vergleich zur Anzucht unter optimalen Bedingungen niedrigere  $C_2H_6$ -Anteil, könnten in einer eventuellen Toxizität solch hoher  $MoO_4^{2-}$ -Konzentrationen in der Nährlösung begründet liegen.

Die Frage, die sich im Zusammenhang mit der niedrigen MoFe-Proteinkonzentration in den Zellen der *nifE*-Mutante stellte, war, ob diese durch eine geringere Nitrogenase-Syntheserate oder durch Proteolyse eines möglicherweise instabilen Apo-Dinitrogenaseproteins hervorgerufen wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein besonders schonendes Zellaufschluss-Verfahren (mit Lysozym), bei gleichzeitiger Anwesenheit wirksamer Protease-Inhibitoren, zur Extraktpräparation angewendet. Die Tatsache, dass einige der eingesetzten Inhibitoren tatsächlich den Abbau der Nitrogenase verhindern, konnte kürzlich demonstriert werden [155]. In den SDS-Gelen und Western Immunoblot-Membranen, die mit den Extrakten angefertigt worden waren, konnten keine Anzeichen eines intrazellulären proteolytischen Abbaus des MoFe-Proteins detektiert werden (keine zusätzlichen Proteinbanden im SDS-Gel und Immunoblot). Zellen, die sich in der späten logarithmischen Wachstumsphase befinden, synthetisieren ständig Proteine und somit auch neue Nitrogenase-Proteinmoleküle. Falls nicht-funktionsfähige Nitrogenase-Proteine nach ihrer Synthese sofort wieder durch Proteolyse abgebaut werden würden, müssten Fragmente eines gerade

proteolytisch angegriffenen Nitrogenase-Proteins nachgewiesen werden können. Da dies nicht der Fall war, scheint der Grund für die geringe MoFe-Proteinkonzentration in den *nifE*-Zellen nicht ein proteolytischer Abbau der Dinitrogenase zu sein, sondern in der tatsächlich niedrigeren Expression begründet zu liegen.

Wie bereits im vorangegangenen Diskussionsenteil ausführlich beschrieben, konnte für *K. pneumoniae* gezeigt werden, dass die maximale Expression der Strukturgene der Nitrogenase von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium und den Untereinheiten der Dinitrogenase-Komponente (NifDK) abhängt [119]. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass die Bildung der Nitrogenase „autoreguliert“ wird. Die geringe MoFe-Protein-Syntheserate in der *nifE*-Mutante von *R. capsulatus* weist darauf hin, dass ein autoregulatorischer Prozess möglicherweise auch in diesem Organismus an der Expression des MoFe-Proteins beteiligt ist. Es ist allerdings erwähnenswert, dass die von den Zellen der *nifE*-Mutante gebildete Menge an Fe-Protein vergleichbar ist mit der, die von Wildtyp-Zellen synthetisiert wird. Da sich die Strukturgene der Nitrogenase (*nifHDK*) in der gleichen Transkriptionseinheit befinden, lässt sich aus dieser Beobachtung schließen, dass die Regulation der Dinitrogenase-Expression in der *nifE*-Mutante wahrscheinlich – abgekoppelt von der rein transkriptionalen Regulation des Fe-Proteins – auch auf der Translationsebene in *R. capsulatus* abläuft.

Um die Existenz einer funktionsfähigen, d. h. intakten, den FeMoco enthaltenden Dinitrogenase in der *nifE*-Mutante zu beweisen, wurde das MoFe-Protein aus diazotroph gewachsenen Zellen isoliert und anschließend in einem einzigen Chromatographie-Schritt an Q-Sepharose partiell gereinigt. Aufgrund der geringen Konzentration des MoFe-Proteins in Zellen der *nifE*-Mutante betrug die Reinheit der Dinitrogenase-Komponente (300 mM NaCl-Fraktion) allerdings nur ca. 40 %. Die Analyse des partiell gereinigten MoFe-Proteins ergab, dass das Protein als intaktes  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer, welches durchschnittlich  $1,7 (\pm 0,2)$  Mo- und  $29 (\pm 4)$  Fe-Zentren enthielt, von der Säule eluiert wurde. Ein weiterer Beweis für die Anwesenheit eines intakten MoFe-Proteins war das Auftreten des typischen  $S = 3/2$ -FeMoco-Signals im EPR-Spektrum (siehe Abb. 35).

Einer der auffälligsten Unterschiede zwischen der *nifE*-Mutante und dem Wildtyp-Organismus war das Verhältnis des durch die Reduktion von  $\text{C}_2\text{H}_2$  gebildeten  $\text{C}_2\text{H}_6$  zu  $\text{C}_2\text{H}_4$ . Dieser Unterschied war am größten *in-vivo* (bis zu 12 %  $\text{C}_2\text{H}_6$  in der *nifE*-Mutante), während der  $\text{C}_2\text{H}_6$ -Anteil in Extrakten und isolierten MoFe-Proteinpräparationen der *nifE*-Mutante auf Werte zurückging ( $< 1$  %), die zumindest vergleichbar mit denen sind, die für das native, aus

dem Wildtyp isolierte Enzym gemessen wurden. Es scheint, dass beim Übergang vom „*in-vivo*“ in den „*in-vitro*-Zustand“ des Nitrogenase-Systems eine Veränderung der katalytischen Eigenschaften und daher eine Modifizierung des Cofaktors oder eher der Cofaktor-Umgebung stattgefunden haben muss. Eine solche Veränderung wird auch in den Untersuchungen zur Inhibierung der Nitrogenaseaktivität durch CO offensichtlich. Frühere Berichte darüber, dass CO die  $C_2H_2$ -Reduktion, nicht aber die  $H_2$ -Bildung der nativen Mo-Nitrogenase inhibiert, konnten in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Ein inhibierender Effekt von CO auf die  $H_2$ -Bildungsrate konnte bislang nur für eine *nifV*-Mutante von *K. pneumoniae* [137] und für ein genetisch verändertes MoFe-Protein von *A. vinelandii* [156, 157] demonstriert werden. Die veränderten katalytischen Eigenschaften liegen in der strukturellen Veränderung des FeMo-Cofaktors im MoFe-Protein der *nifV*-Mutante (Citrat anstelle von Homocitrat) [72], bzw. im Fall des genetisch modifizierten MoFe-Proteins von *A. vinelandii*, in einer veränderten Cofaktorumgebung begründet. Die vergleichenden Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit sowohl an der *nifE*<sup>-</sup>- als auch an der *nifV*-Mutante von *R. capsulatus* durchgeführt wurden, zeigen deutlich, dass die  $C_2H_2$ -Reduktion in Zellen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante annähernd so stark durch CO inhibiert wird wie die der *nifV*-Mutante. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde die durch den Wildtyp katalysierte  $C_2H_4$ -Bildung nur geringfügig durch CO inhibiert.

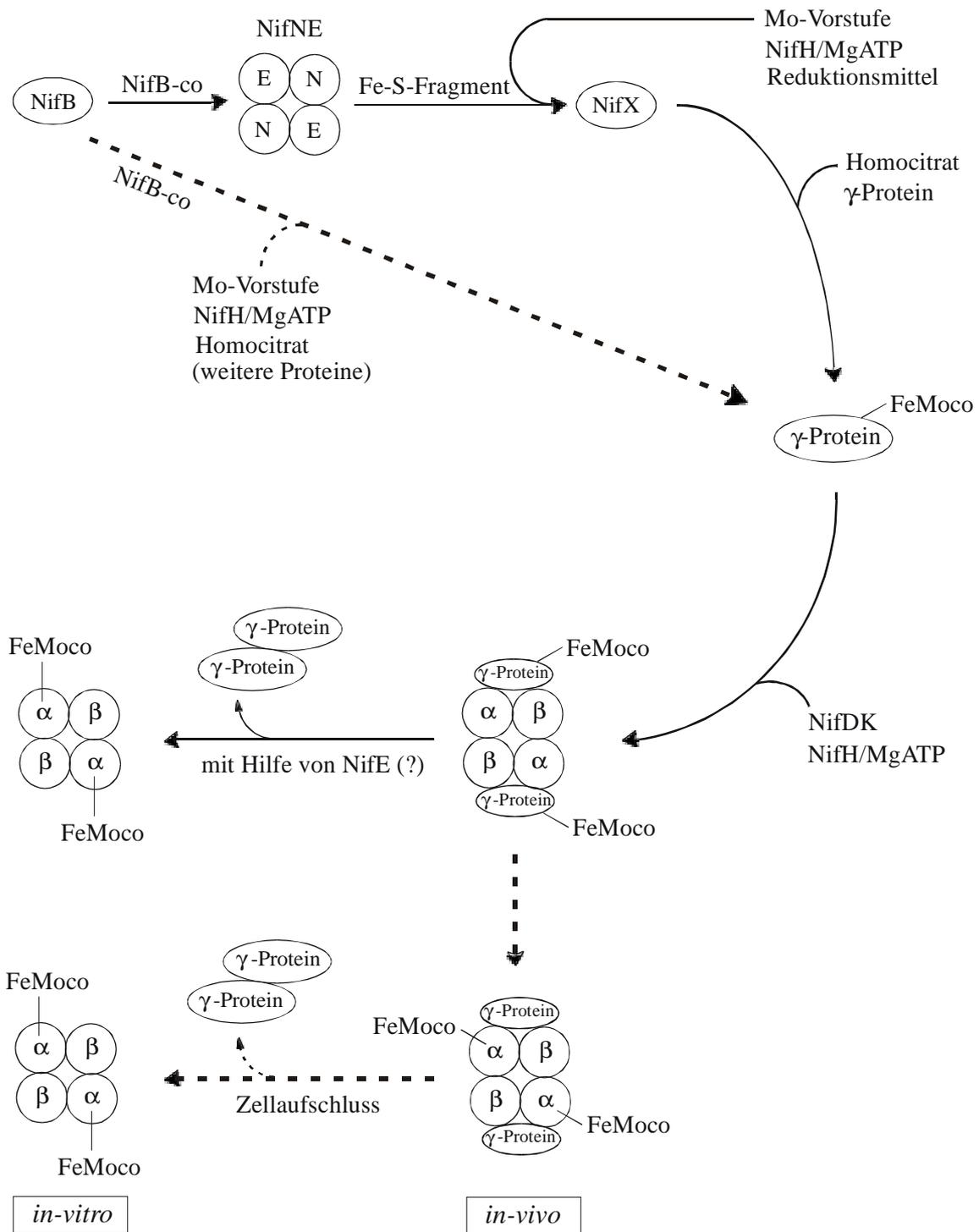
Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die  $H_2$ -Bildung, die mit Extrakten der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante gemessen wurde, nur marginal durch CO inhibiert wird. Das Fehlen eines inhibierenden Effekts von CO auf die  $H_2$ -Entwicklung konnte auch mit dem Wildtyp-Organismus festgestellt werden, nicht aber mit der *nifV*-Mutante.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse aus den vergleichenden CO-Inhibierungsversuchen weisen auf eine Veränderung der katalytischen Eigenschaften und Inhibitorsuszeptibilitäten beim Übergang vom „*in-vivo*“ in den „*in-vitro*-Zustand“ hin. Die *in-vitro*-Eigenschaften scheinen mit denen, die für den Wildtyp ermittelt wurden, zu korrespondieren, und deuten somit auf die Anwesenheit eines intakten, FeMoco enthaltenden MoFe-Proteins hin. Diese Überlegungen werden auch durch die Analyse des aus Zellen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante isolierten MoFe-Proteins gestützt. Die *in-vivo*-Eigenschaften hingegen weisen auf die Existenz eines modifizierten MoFe-Proteins bzw. FeMo-Cofaktors hin. Weitere Indizien für einen veränderten FeMo-Cofaktor bzw. MoFe-Protein im Zuge des Übergangs vom „*in-vivo*“ in den „*in-vitro*-Zustand“ konnte aus dem Vergleich des EPR-Spektrums ganzer Zellen mit dem des isolierten MoFe-Proteins erhalten werden. Die im Vergleich zum

Wildtyp-Enzym veränderten g-Werte des FeMoco-Signals im EPR-Spektrum ganzer *nifE*<sup>-</sup>-Zellen (siehe Abb. 36) weisen auf die Insertion eines modifizierten Cofaktors, oder zumindest auf den Einbau des FeMo-Cofaktors in eine modifizierte Cofaktor-Umgebung, hin.

Da die Nitrogenase in Extrakten und in den gereinigten Proteinpräparationen der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante intakt und ununterscheidbar von dem Wildtyp-Enzym zu sein scheint, soll im Folgenden näher auf die in ganzen *nifE*<sup>-</sup>-Zellen vorhandene und abweichende Merkmale zeigende Nitrogenase eingegangen werden. Die logische Frage stellt sich, warum eine Mutante von *R. capsulatus* mit einem Defekt in *nifE* – einem Gen, welches eigentlich eine essentielle Rolle in der Biosynthese des FeMo-Cofaktors spielt – überhaupt eine aktive Nitrogenase bildet und außerdem ein verändertes EPR-Spektrum ebenso wie veränderte katalytische Eigenschaften und Inhibitorsuszeptibilitäten *in-vivo* aufweist. Das Genprodukt von *nifE* wird in *R. capsulatus* zweifelsfrei für die volle Expression des MoFe-Proteins und die Synthese des FeMo-Cofaktors benötigt. Das Auftreten von Aktivität in dieser Mutante zeigt aber auch deutlich, dass die Anwesenheit von NifE nicht prinzipiell für diese Prozesse erforderlich ist.

Zur Klärung der oben gestellten Frage ist es hilfreich, im Folgenden näher auf den Biosyntheseweg des FeMo-Cofaktors einzugehen, der für *A. vinelandii* vorgeschlagen wurde. Ein Schema des Biosyntheseweges für den FeMoco, der auf den Ergebnissen zahlreicher Untersuchungen an diesem Organismus basiert, ist in Abb. 37 dargestellt. Das aktuelle Cofaktorbiosynthese-Modell ist wie folgt: Der NifB-Cofaktor wird nach seiner Synthese an NifB auf das NifNE-Protein übertragen. Letzteres Protein katalysiert wahrscheinlich eine Umlagerung des Fe-S-Bindungen im NifB-co, sodass eine Fe-S-Einheit entsteht, die der im FeMoco vorhandenen stark ähnelt. Die Insertion von Molybdän in diese Fe-S-Einheit geschieht an NifX (mithilfe von NifH, MgATP und einem Reduktionsmittel). Der FeMoco wird anschließend durch den Einbau von Homocitrat komplettiert. Dieser Schritt findet wahrscheinlich am  $\gamma$ -Protein statt, dessen Funktion in *A. vinelandii* erst kürzlich aufgeklärt werden konnte [67, 70, 158].



**Abb. 37: Schematische Darstellung eines Modells zur FeMoco-Biosynthese.** Das Schema wurde basierend auf einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung zur Biosynthese des FeMoco-Cofaktors in *A. vinelandii*, erstellt [159]. Die gestrichelten Pfeile indizieren die im Diskussionsteil dieser Arbeit vorgestellte Hypothese zur Cofaktor-Bioynthese in der *nifE*-Mutante von *R. capsulatus*.

Das  $\gamma$ -Protein, dessen Expression nicht *nif*-reguliert wird, fungiert im Biosynthese-Prozess als Chaperon-Insertase, die die Insertion des FeMo-Cofaktors in das Apoprotein der Dinitrogenase katalysiert [70]. Das FeMoco enthaltende  $\gamma$ -Protein assoziiert in diesem Prozess (mithilfe des Fe-Proteins und MgATP) an die Apo-Dinitrogenase unter Bildung eines Hexamers. Nach dem Einbau des Cofaktors in die  $\alpha$ -Untereinheit der Dinitrogenase-Komponente dissoziiert letztlich das  $\gamma$ -Protein als Dimer von der Holo-Dinitrogenase ab.

Während das  $\gamma$ -Protein in *A. vinelandii* ein nicht-*nif* reguliertes Protein ist, übernimmt in *K. pneumoniae* wahrscheinlich ein *nif*-Genprodukt (NifY) eine ähnliche Funktion [69]. Es ist denkbar, dass ein vergleichbares Protein auch in *R. capsulatus* existiert, obwohl ein Gen, welches ein  $\gamma$ - oder NifY-ähnliches Protein kodiert, bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Wie in Abb. 37 dargestellt, wird der NifB-co – die wahrscheinliche Fe-S-Vorstufe des FeMoco – in NifB synthetisiert und anschließend auf das NifNE-Protein übertragen. Es wurde spekuliert, dass an letzterem Protein eine Umlagerung der Fe-S-Bindungen des NifB-co stattfindet [159]. Ein solcher Prozess könnte dabei die Folge einer vorangegangenen Redoxreaktion sein [47], d. h. dass der Fe-S-Cluster (NifB-co) am NifNE-Protein zuerst reduziert wird und sich dann umlagert. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Nitrogenaseaktivität der *nifE*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus*, scheint ein solcher Prozess jedoch – ob es sich um eine Redoxreaktion, eine Umlagerung des Clusters oder um beides handelt – auch in Abwesenheit von NifE stattzufinden. Der Nachweis von Aktivität legt den Schluss nahe, dass der NifB-co in der *nifE*-Mutante von *R. capsulatus* auf ein anderes Protein übertragen wird, welches ebenfalls in die Biosynthese des FeMo-Cofaktors involviert ist. Die Beobachtung, dass von *nifE*-Zellen in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen nur geringe Mengen an FeMoco bzw. MoFe-Protein gebildet werden, weist darauf hin, dass irgendein Schritt innerhalb dieses „alternativen“ Biosyntheseweges geschwindigkeitsbestimmend ist, und dass NifNE somit nicht spezifisch in seiner Biosynthese-Funktion ist, sondern zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit des oben erwähnten, nicht weiter identifizierbaren Schrittes während der Cofaktor-Synthese benötigt wird.

Ein möglicher Kandidat für die Aufnahme des NifB-co (in Abwesenheit von NifE) ist NifX. In Untersuchungen an *A. vinelandii* konnte bereits demonstriert werden, dass der NifB-co in der Lage ist, sowohl an NifX, als auch an VnfX zu binden [66, 65]. Letzteres Protein ist das Genprodukt von *vnfX*, ein Homologes von *nifX* im *vnf*-Regulon in *A. vinelandii*. Obwohl NifX

für die *in-vitro*-Biosynthese des FeMo-Cofaktors benötigt wird [63], ist die Anwesenheit dieses Proteins für die *in-vivo*-Biosynthese jedoch nicht zwingend erforderlich [64]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *nifX*-Mutanten von *R. capsulatus* in der Lage sind, diazotroph zu wachsen (Nif<sup>+</sup>-Phänotyp) [57]. Diese Beobachtung bestätigt, dass NifX auch in diesem Organismus nicht essentiell für die FeMoco-Biosynthese in ganzen Zellen ist. Auch Beobachtungen, die mit der polaren *nifE*-Mutante gemacht wurden, sprechen dafür, dass NifX nicht essentiell für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors ist. In dieser Mutante werden sämtliche Gene des *nifENX-orf4-fdxB-nifQ*-Operons – also auch *nifX* – nicht exprimiert. Jedoch konnte auch mit dieser Mutante Aktivität nachgewiesen werden, wenn die Zellen in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in hohen Endkonzentrationen (> 0,1 mM) kultiviert wurden. Wie bereits im Ergebnisteil näher erläutert wurde, liegt die Notwendigkeit hoher MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentrationen im Nährmedium für eine maximale Aktivität in dem Fehlen des NifQ-Proteins begründet. Weder NifNE noch NifX scheinen somit essentiell für die Biosynthese des FeMo-Cofaktors in *R. capsulatus* zu sein.

Da in der polaren *nifE*-Mutante ein Nif<sup>Q</sup>-Phänotyp – d. h. eine Steigerung der Aktivität in Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> in hohen Endkonzentrationen – nachgewiesen werden konnte, lässt sich folgern, dass das Molybdän im Wildtyp nicht an NifNE in eine FeMoco-Vorstufe integriert wird. Da NifQ wahrscheinlich eine Funktion in der Prozessierung des Molybdäns vor dem Einbau des Metalls in den Cofaktor übernimmt, hätte ein Nif<sup>Q</sup>-Phänotyp nicht in der polaren *nifE*-Mutante, in der weder ein funktionsfähiges NifNE-Protein noch NifQ exprimiert wird, beobachtet werden dürfen. Diese Überlegungen werden auch dadurch gestützt, dass in NifNE-Proteinpräparationen niemals signifikante Molybdänmengen nachgewiesen werden konnten [59, 158].

Es ist denkbar, dass im Verlauf der Cofaktor-Biosynthese in Abwesenheit von NifE der Einbau des Molybdäns und des Homocitrats in NifB-co – eventuell mithilfe des Fe-Proteins, MgATP und weiteren Proteinen – direkt an einem  $\gamma$ - bzw.  $\gamma$ -ähnlichen Protein geschieht (vergleiche Abb. 37, gestrichelter Pfeil). Die im Fall der *nifE*-Mutante beobachtete Abhängigkeit der maximalen Nitrogenaseaktivität (als Maß für die Menge exprimierten Enzyms) von der ungewöhnlich hohen MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Konzentration im Nährmedium (20 - 50  $\mu$ M) könnte darauf hinweisen, dass an irgendeiner Stelle des alternativen Biosyntheseweges eine hohe Konzentration an MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> bzw. einer Mo-haltigen Vorstufe des FeMo-Cofaktors benötigt wird.

Wie bereits ausführlich geschildert wurde, scheint sich der FeMoco, der *in-vivo* in der *nifE*-Mutante durch einen alternativen Biosyntheseweg synthetisiert und in das MoFe-Protein eingebaut wird, von dem Cofaktor im Wildtyp-Enzym zu unterscheiden. Sämtliche Beobachtungen – die Bildung relativ großer Mengen an C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, die starke Inhibierung der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Reduktion durch CO und das veränderte FeMoco-EPR-Signal – deuten darauf hin, dass der Cofaktor entweder in seiner Struktur verändert oder in einer geringfügig modifizierten Umgebung vorliegt. Obwohl die Gesamtaktivität und die MoFe-Proteinmenge in den Zellen gering ist, ist die spezifische Nitrogenaseaktivität der *nifE*-Mutante jedoch vergleichbar mit der, die für den Wildtyp gemessen wurde. Daher können die strukturellen Unterschiede zwischen dem FeMoco in ganzen Zellen der *nifE*-Mutante und dem Cofaktor im Wildtyp-Enzym nicht gravierend sein.

Eines der signifikantesten Merkmale der *nifE*-Mutante *in-vivo* ist der durch Reduktion von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> entstandene, hohe Anteil an C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>. Bislang konnte ein relativ hoher C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Anteil nur bei folgenden Enzymsystemen beobachtet werden: (i) bei alternativen Nitrogenasen [3], (ii) bei der *nifV*-Mutante von *R. capsulatus* [73], (iii) bei der Mo-abhängigen Nitrogenase von *Xanthobacter autotrophicus* unter bestimmten Reaktionsbedingungen [160], (iv) bei MoFe-Proteinen mit Aminosäure-Substitutionen [156, 157], und (v) bei Hybridenzym-Systemen (in das MoFe-Protein eingebauter FeV-Cofaktor [161]; in das FeFe-Protein eingebauter FeMoco [93, 162, 163]).

Die Frage, die sich an dieser Stelle stellt, ist, ob eine Beziehung zwischen der relativ hohen C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Produktionsrate in der *nifE*-Mutante *in-vivo* und dem hohen C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-Anteil, der in den oben erwähnten Fällen beobachtet werden konnte, besteht. Die Ursache für die Bildung von C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> durch die *nifE*-Mutante von *R. capsulatus* kann nicht in dem Auftreten eines Hybridenzym liegen, da ein FeV-Cofaktor in diesem Organismus nicht synthetisiert wird und ein gegebenenfalls synthetisierter und in das MoFe-Protein eingebundener FeFeco kein FeMoco-typisches EPR-Signal zeigt. Außerdem ist das MoFe-Protein in der *nifE*-Mutante nicht genetisch modifiziert, sodass ein Zusammenhang mit (iv) ebenfalls ausgeschlossen werden kann. Desweiteren wird die Fe-Nitrogenase von *R. capsulatus* unter den angewendeten Anzuchtbedingungen (Gegenwart von MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) nicht exprimiert, sodass auch in diesem Fall eine Verbindung zu (i) ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der Ähnlichkeiten hinsichtlich der katalytischen Eigenschaften der *nifE*- und der *nifV*-Mutante von *R. capsulatus* erscheint die Möglichkeit, dass der FeMoco in der *nifE*-Mutante kein

Homocitrat enthält durchaus plausibel. Die Substitution des Homocitrats durch eine andere organische Säure (z. B. Citrat) ist aber trotzdem aus den folgenden Gründen eher unwahrscheinlich: (i) In der *nifE*-Mutante gibt es keine genetische Veränderungen im *nifV*-Gen und intaktes NifV-Protein sollte in Mengen exprimiert werden, die vergleichbar sind mit denen, die auch im Wildtyp synthetisiert werden. (ii) Die spezifische Nitrogenaseaktivität der *nifV*-Mutante ist erheblich niedriger als die der *nifE*-Mutante ([73] und eigene Beobachtungen). (iii) Es erscheint nicht plausibel, dass Homocitrat – obwohl es von den Zellen synthetisiert wird – *in-vivo* nicht, aber nach dem Zellaufschluss doch in den Cofaktor eingebaut wird (Extrakte von *nifE*- und Wildtyp-Zellen weisen übereinstimmende katalytische Eigenschaften auf. Lediglich ganze Zellen der *nifE*-Mutante zeigen abweichende Merkmale).

Untersuchungen an der Mo-abhängigen Nitrogenase von *X. autotrophicus* haben ergeben, dass das Enzym als Hexamer, mit einem 13,6 kDa-Protein assoziiert, vorliegt [160]. Außerdem stellt das Enzym die bisher einzige nachgewiesene Mo-abhängige Nitrogenase dar, welche in der Lage ist, signifikante Mengen an  $C_2H_6$  zu bilden [160]. Eine hexamere Quartärstruktur wurde auch im Zusammenhang mit sämtlichen, bislang untersuchten alternativen Nitrogenase-Systemen nachgewiesen, die sich ebenfalls durch eine erhöhte  $C_2H_6$ -Bildungsrate auszeichnen [3]. Wie bereits erwähnt wurde, konnte auch für die konventionellen Mo-abhängigen Nitrogenasen von *A. vinelandii* und *K. pneumoniae* eine hexamere Struktur im Zusammenhang mit der Assoziation des  $\gamma$ - bzw. NifY-Proteins an die Dinitrogenase nachgewiesen werden. Die Assoziation des  $\gamma$ -Proteins an die Dinitrogenase ist allerdings nur vorübergehender Natur. Nach dem Einbau des Cofaktors dissoziiert  $\gamma$  wieder ab. Lediglich an dem in Cofaktorbiosynthese-defekten Mutanten vorkommenden Cofaktorlosen Apoprotein bleibt das  $\gamma$ -Protein assoziiert und damit die hexamere Struktur erhalten. Das Auftreten eines Hexamers scheint jedenfalls ein Merkmal aller Nitrogenase-Systeme zu sein, egal, ob eine solche Struktur im Zuge der Cofaktor-Biosynthese und/oder für die katalytische Funktion benötigt wird.

Im Hinblick auf die auffällige Beziehung zwischen der Quartärstruktur des Proteins und der  $C_2H_6$ -Bildungsrate ist denkbar, dass der hohe  $C_2H_6$ -Anteil, der mit der *nifE*-Mutante *in-vivo* beobachtet werden konnte, auf die Existenz einer relativ stabilen hexameren Struktur zurückzuführen ist. Die Bildung eines solchen Komplexes könnte die Folge einer Assoziation eines  $\gamma$ -ähnlichen Proteins mit der Apo-Dinitrogenase sein. Im Gegensatz zu den Prozessen, die im Wildtyp von *A. vinelandii* ablaufen, könnte das  $\gamma$ -ähnliche Protein nach der Insertion

des Cofaktors am  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer verbleiben (vergleiche Abb. 37, gestrichelter Pfeil). Es scheint, dass dieser Komplex jedoch nicht stabil genug ist, um den in dieser Arbeit verwendeten Zellaufschluss zu überstehen. Während der Extraktpräparation könnte das  $\gamma$ -ähnliche Protein von dem hexameren Komplex abdissoziieren, wobei sich das konventionelle MoFe-Protein, welches normalerweise im Wildtyp-Organismus vorkommt ( $\alpha_2\beta_2$ -Struktur), bildet. Die Funktion von NifNE im Biosyntheseprozess könnte demzufolge möglicherweise darin bestehen, dass das Protein eine Art „Helferfunktion“ in diesem Dissoziationsprozess übernimmt (siehe Abb. 37). Die Teilnahme von NifNE an einem solchen Prozess könnte die Assoziation an das  $\gamma$ -ähnliche Protein beinhalten, welches den synthetisierten FeMoco bereits in die  $\alpha$ -Untereinheit des MoFe-Proteins eingebaut hat. Ein solches Szenario mag zwar auf den ersten Blick ungewöhnlich erscheinen, ein kompetitives Bindungsverhalten, d. h. die Konkurrenz zwischen NifNE und dem MoFe-Protein um eine Bindung zum  $\gamma$ -ähnlichen Protein, ist aber aufgrund der hohen Homologie in der Gensequenz zwischen NifNE und NifDK (MoFe-Protein) durchaus denkbar [57].

Ein Beispiel für ein kompetitives Bindungsverhalten konnte kürzlich in *A. vinelandii* beobachtet werden. So konnte demonstriert werden, dass NifNE mit einem genetisch veränderten Fe-Protein wechselwirkt [164]. Das Fe-Protein scheint somit nicht nur in der Lage zu sein, einen Komplex mit dem MoFe-Protein, sondern auch mit NifNE zu bilden. Aufgrund dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass sowohl NifDK als auch NifNE ähnliche Bindungsdomänen besitzen, die eine Assoziation zum Fe-Protein ermöglichen. Die Wechselwirkungen zwischen NifNE und NifH sind ein weiteres Indiz dafür, dass eine Komplexbildung auch zwischen NifNE und einem  $\gamma$ - bzw.  $\gamma$ -ähnlichen Protein erfolgen kann, da letzteres Protein ja auch an NifDK assoziiert [67, 70]. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Hypothese zur Cofaktor-Biosynthese wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass NifX, welches während des Cofaktor-Biosyntheseprozesses mit NifNE wechselwirkt, eine gewisse Sequenzhomologie zum NifY-Protein, das in *K. pneumoniae* eine ähnliche Rolle wie das  $\gamma$ -Protein in *A. vinelandii* übernimmt, aufweist [64]. Aufgrund der Fähigkeit des Fe- und des  $\gamma$ -Proteins, einen Komplex mit NifDK bilden zu können, und die Fähigkeit von NifH und NifX – ein dem  $\gamma$ -Protein ähnliches Protein – an NifNE zu binden, erscheint eine Wechselwirkung zwischen NifNE und einem  $\gamma$ -ähnlichen Protein in *R. capsulatus* denkbar.

Die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Vorschläge zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors in Mo-abhängigen Nitrogenasen im Allgemeinen und in einer *nifE*-Mutante von *R. capsulatus* im Besonderen, basieren einerseits auf Ergebnissen, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, andererseits auf zahlreichen Beobachtungen an verschiedenen Mutanten diverser Organismen. Ein definitiver Beweis kann allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht erbracht werden. Die Schwierigkeit, die vorgestellte Hypothese zu belegen – oder aber auch zu widerlegen – besteht vor allem darin, dass die aufgeführten Beobachtungen bzw. Argumente, die diese Hypothese stützen, aus *in-vivo* Untersuchungen stammen. Da es nur einige begrenzte Möglichkeiten gibt, den FeMoco bzw. das MoFe-Protein in ganzen Zellen zu analysieren, ergibt sich das Problem, weitere Belege für den vorgeschlagenen Biosyntheseweg des FeMo-Cofaktors zu finden. Weitere Untersuchungen an verschiedenen Mutanten diverser Organismen könnten allerdings in Zukunft dazu beitragen, den Vorhang, der zur Zeit noch vor dem einzigartigen FeMoco-Syntheseprozess hängt, zu lüften.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden (i) Untersuchungen zur Bildung und Identifizierung Wolfram- sowie Rhenium-haltiger Nitrogenasen in *Rhodobacter capsulatus*, und (ii) Untersuchungen zur Biosynthese des Eisen-Molybdän-Cofaktors der konventionellen Mo-abhängigen Nitrogenase des gleichen Organismus durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde als Untersuchungsobjekt eine *anfA*<sup>-</sup>-Mutante von *R. capsulatus* verwendet, bei der das komplette System der alternativen Nitrogenase ausgeschaltet ist. In Voruntersuchungen zum Einfluss von  $\text{WO}_4^{2-}$ ,  $\text{ReO}_4^-$  und  $\text{MoO}_4^{2-}$  auf die Nitrogenaseaktivität ( $\text{C}_2\text{H}_2$ -Reduktion) konnte gezeigt werden, dass  $\text{MoO}_4^{2-}$  – wie zu erwarten – die Aktivität der Nitrogenase stimuliert, während  $\text{WO}_4^{2-}$  ein inhibierendes Effekt auf die  $\text{C}_2\text{H}_2$ -Reduktion ausübt. Mit  $\text{ReO}_4^-$  konnte hingegen kein Einfluss auf die Nitrogenaseaktivität beobachtet werden. Aufgrund letzteren Sachverhalts wurde überprüft, ob  $\text{ReO}_4^-$  (und  $\text{MoO}_4^{2-}$  als Referenz) überhaupt von den Zellen aufgenommen wird. Zu diesem Zweck wurde ein neuartiges Verfahren zur Bestimmung der intrazellulären Metallionen-Konzentration entwickelt, welches eine Behandlung der Zellen mit Aceton vor ihrem Aufschluss einbezog. Mithilfe dieser Methode konnte eindeutig demonstriert werden, dass  $\text{ReO}_4^-$  – im Gegensatz zu  $\text{MoO}_4^{2-}$  – nicht von den Zellen aufgenommen und infolgedessen keine Re-haltige Nitrogenase *in-vivo* erzeugt wird.

Da zur Erzeugung einer Mo-freien – nicht auf einem eigenständigen genetischen System basierenden – W-haltigen Nitrogenase stark Mo-verarmte Kulturbedingungen angewendet werden müssen, wurde untersucht, ob die Strukturproteine der Nitrogenase unter solchen Bedingungen überhaupt gebildet werden. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnte erstmals eindeutig belegt werden, dass die Bildung des konventionellen Nitrogenase-Enzymsystems (MoFe- und Fe-Protein) durch  $\text{MoO}_4^{2-}$  reguliert wird. Maximale Nitrogenase-Proteinkonzentrationen und entsprechende Enzymaktivitäten konnten gemessen werden, wenn die Zellen in Gegenwart von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von mindestens  $0,2 \mu\text{M}$  im Nährmedium kultiviert wurden. Unter Mo-defizienten Bedingungen wurden hingegen nur marginale Mengen Nitrogenase gebildet. In ähnlichen Untersuchungen zum Einfluss von  $\text{WO}_4^{2-}$  konnte demonstriert werden, dass auch dieses Anion (unter Mo-Mangelbedingungen) die Synthese der Nitrogenase-Strukturproteine induziert. Gemessen am intrazellulären Dinitrogenase-Gehalt nach Wachstum unter optimalen Bedingungen ( $> 0,2 \mu\text{M MoO}_4^{2-}$ )

wurden in Gegenwart eines hohen  $\text{WO}_4^{2-}$ -Überschusses (Mo-verarmt, 1 mM  $\text{WO}_4^{2-}$ ) jedoch nur ca. 25 % des Enzyms gebildet. Der Nachweis einer, wenn auch mit deutlich verminderter Rate gebildeten W-haltigen Nitrogenase, war die Grundvoraussetzung für die Isolierung dieses Proteins aus *R. capsulatus*.

Die W-haltige Dinitrogenase-Komponente wurde nach der Kultivierung der Zellen (in Mo-defizientem Nährmedium in Gegenwart von  $\text{WO}_4^{2-}$  (1 mM)), einem Lysozymaufschluss und Ultrazentrifugation mithilfe einer Chromatographie an Q-Sepharose angereichert (Reinheit des Präparats ca. 50 %). Das partiell gereinigte Protein zeichnete sich durch eine marginale Aktivität von nur 1,3 U/mg (ca. 1/1000 der Aktivität des nativen Mo-haltigen Enzyms) aus, in welches im Durchschnitt ca. 1 ( $\pm 0,15$ ) W-, 16 ( $\pm 2$ ) Fe- und 0,01 Mo-Zentren (d. h. auf etwa 100 W-Zentren kommt ein Mo-Zentrum) pro Protein-Tetramer eingebaut wurden. Die erhaltenen Daten weisen auf die Integration von einem FeW-Cofaktor- und einem P-Clustermolekül pro Tetramer hin. Durch anschließende EPR-spektroskopische Charakterisierung des W-haltigen Proteins konnte letztlich der Beweis für den Einbau von Wolfram in den Cofaktor erbracht werden. Im EPR-Spektrum konnten drei charakteristische Signale identifiziert werden: (i) ein dominantes  $S = 3/2$ -Signal ( $g = 4,19, 3,93, 2,01$ ), welches – in Übereinstimmung mit der Literatur – dem FeW-Cofaktor zugeordnet werden konnte, (ii) ein  $S = 1/2$ -Signal ( $g = 2,09, 1,95, 1,86$ ), welches höchstwahrscheinlich durch einen Fe-S-Cluster hervorgerufen wurde und bislang nur im Zusammenhang mit einer aus *Azotobacter vinelandii* isolierten W-haltigen Nitrogenase beschrieben wurde, (iii) ein in seiner Intensität marginales  $S = 3/2$ -Signal ( $g = 4,29, 3,67, 2,01$ ), welches charakteristisch für den FeMoco ist. Die erstmalige Isolierung einer fast Mo-freien, W-haltigen Nitrogenase ermöglichte eine eingehendere Charakterisierung der im Protein enthaltenen Cluster.

Anhand von vergleichenden EPR-spektroskopischen Untersuchungen mit dem nativen Enzym und der W-haltigen Nitrogenase konnte demonstriert werden, dass (i) sich die Intensitäten des FeMoco- und FeWco-Signals bzgl. ihrer Temperatur- und Mikrowellenleistungs-Abhängigkeit ähnlich, aber nicht identisch, verhalten, und (ii) die W-haltige Nitrogenase bzw. der FeWco enzymatisch (in Gegenwart des Fe-Proteins) nicht reduziert, d. h. in den „Turnover“-Zustand überführt werden kann und daher nicht bzw. allenfalls minimal aktiv ist. In Untersuchungen zur Abhängigkeit der Signalintensität vom Redoxpotential des FeW- und des FeMo-Cofaktors (eingestellt im Zuge von Redox-titrationen) konnte im Fall des FeMo-Cofaktors ein Halbstufenpotential ( $E_m$ ) von - 50 mV und für den FeWco eines, welches um mindestens 150 mV zu tieferen Potentialen verschoben war, ermittelt werden. Im Fall der P-Cluster ( $E_m = - 195$  mV für das Auftreten des Signals im Verlauf oxidativer Titration und

- 30 mV für das Verschwinden) konnten keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Potentialabhängigkeit zwischen dem P-Cluster der W-haltigen Nitrogenase und dem des nativen Enzyms beobachtet werden.

Versuche, eine W-haltige Nitrogenase zu isolieren, bei der der FeWco in die Dinitrogenase-Komponente der alternativen Fe-Nitrogenase von *R. capsulatus* inkorporiert wird, schlugen fehl, da die Bildung des FeFe-Proteins durch  $\text{WO}_4^{2-}$ , analog der Repression durch  $\text{MoO}_4^{2-}$ , unterdrückt wird. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang demonstriert werden, dass  $\text{MoO}_4^{2-}$  und  $\text{WO}_4^{2-}$  die Expression der Fe-Nitrogenase innerhalb eines äußerst kleinen Konzentrationsbereichs regulieren („molekularer Schalter“).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur Biosynthese des FeMo-Cofaktors der konventionellen Nitrogenase, hauptsächlich basierend auf der Arbeit mit einer *nifE*-Mutante von *R. capsulatus*, durchgeführt. In sämtlichen bislang untersuchten diazotrophen Organismen bewirkte ein Defekt im *nifE*-Gen, dessen Genprodukt in die Biosynthese des Cofaktors involviert ist, die Akkumulierung einer Cofaktor-losen und somit inaktiven Dinitrogenase. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch demonstriert werden, dass Zellen der *nifE*-Mutante in der Lage sind – wenn auch mit geringerer Rate als der Wildtyp-Organismus – diazotroph, d. h. mit  $\text{N}_2$  als N-Quelle, zu wachsen und  $\text{C}_2\text{H}_2$  nicht nur zu  $\text{C}_2\text{H}_4$  sondern auch zu  $\text{C}_2\text{H}_6$  ( $\text{C}_2\text{H}_6/\text{C}_2\text{H}_4$  ca. 6 - 12 % je nach Präparation) zu reduzieren. Die Bildung von  $\text{C}_2\text{H}_6$  ist ein katalytisches Merkmal, das völlig untypisch für Mo-abhängige Nitrogenase-Systeme ist. Im Verlauf der Untersuchungen an intakten Zellen der *nifE*-Mutante konnte weiterhin demonstriert werden, dass (i) die *in-vivo*-Aktivität eine für die konventionelle Nitrogenase vollkommen ungewöhnliche Abhängigkeit von der  $\text{MoO}_4^{2-}$ -Konzentration im Nährmedium (maximale Aktivität durch den Zusatz von  $\text{MoO}_4^{2-}$  in einer Endkonzentration von 20 - 50  $\mu\text{M}$ ) zeigt, (ii) die beobachtete Aktivität unter optimalen Anzuchtbedingungen (20  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$ ) nicht von der alternativen Nitrogenase von *R. capsulatus* herrührt, (iii) die gegenüber der Aktivität des Wildtyp-Organismus geringe Aktivität der *nifE*-Mutante (5 - 15 %) auf der verminderten Bildung des MoFe-Proteins beruht, die spezifische Aktivität (bezogen auf den MoFe-Proteingehalt) der Wildtyp- und der *nifE*-Zellen also letztlich annähernd identisch ist, (iv) eine polare *nifE*-Mutante, in der weder das *nifE*-Gen noch die anderen Gene des *nifENX-orf4-fdxB-nifQ*-Operons exprimiert werden, erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_4^{2-}$  aktiv ist.

Desweiteren konnte in vergleichenden Untersuchungen (an ganzen Zellen und Extrakten des Wildtyps und der *nifE*-Mutante) gezeigt werden, dass sich die katalytischen Merkmale ganzer

*nifE*-Zellen signifikant von denen der Extrakte in zweierlei Hinsicht unterscheiden: (i) die Rate der Bildung von  $C_2H_6$  aus  $C_2H_2$  ist im Extrakt von *nifE*-Zellen deutlich geringer (ca. 1/10) als die, die mit ganzen Zellen gemessen wurde, und (ii) der inhibierende Effekt von Kohlenmonoxid auf die  $C_2H_2$ -Reduktion ist in *nifE*-Zellen drastischer als im Extrakt.

Um das Reaktionszentrum, an dem die Substratreduktion erfolgt identifizieren zu können, wurde das MoFe-Protein aus *nifE*-Zellen isoliert und partiell gereinigt. Die anschließenden Untersuchungen ergaben, dass das MoFe-Protein als intaktes  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer isoliert wurde, in das im Durchschnitt ca. 1,7 ( $\pm 0,2$ ) Mo-Zentren eingebaut wurden. Der FeMoco in diesem Protein konnte eindeutig EPR-spektroskopisch identifiziert werden. Das Spektrum war identisch mit dem des gereinigten nativen Enzyms (isoliert aus dem Wildtyp-Organismus). Vergleichende EPR-spektroskopische Untersuchungen mit ganzen Zellen der *nifE*-Mutante und des Wildtyps ergaben jedoch, dass sich das FeMoco-Signal der *nifE*-Zellen ( $g = 4,35$  und  $3,61$ ) aufgrund seiner stärker ausgeprägten Rhombizität vom Cofaktorsignal der Wildtyp-Zellen ( $g = 4,29$ ,  $3,67$ ) unterschied. Diese Beobachtung lieferte einen eindeutigen Beweis, dass sich der FeMoco in ganzen Zellen der *nifE*-Mutante signifikant (aber nicht stark) von dem Cofaktor unterscheidet, der sich im Extrakt- bzw. gereinigten Protein befindet.

Auf der Basis der Ergebnisse des zweiten Teils dieser Arbeit wurde ein Modell für die Cofaktor-Biosynthese mit folgenden zentralen Aussagen vorgeschlagen: (i) NifE ist für die Cofaktorbiosynthese nicht zwingend erforderlich. Das NifE-Protein dient allerdings der ca. 10-fachen Erhöhung der Cofaktor-Syntheserate. (ii) Der Einbau des Mo-Zentrums in den Cofaktor erfolgt nicht auf der Stufe von NifE, sondern erst in einem späteren Syntheseschritt. (iii) Der FeMoco wird in *nifE*-Mutanten auf einem alternativen Biosyntheseweg synthetisiert. An einer nicht weiter identifizierten Stelle dieser Alternativroute wird eine vergleichsweise hohe Konzentration von  $MoO_4^{2-}$  oder einer Mo-haltigen Verbindung (evtl. FeMoco-Vorstufe) benötigt. (iv) In ganzen Zellen von *nifE*-Mutanten liegt das MoFe-Protein als Hexamer vor, d. h. es ist mit dem sog. „ $\gamma$ -Protein“ – einem Protein mit Cofaktor-Insertase-Funktion – assoziiert. Nach dem im Rahmen dieser Arbeit erarbeiteten Modell ist diese Hexamerstruktur für die veränderten katalytischen Merkmale ganzer Zellen verantwortlich, da der FeMoco zwar intakt, aber im Vergleich zum nativen Enzym in einer etwas veränderten Umgebung vorliegt. Die Funktion von NifE im Biosyntheseprozess besteht nach dem vorgeschlagenen Modell u. a. in einer unterstützenden Funktion beim Abdissoziieren des  $\gamma$ -Proteins vom MoFe-Protein.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Postgate, J. (1998) Nitrogen fixation, 3. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge.
- [2] Burgess, B.K. (1985) Substrate reactions of nitrogenase. **In:** *Molybdenum enzymes* (Spiro, T.G., Hrsg.), John Wiley & Sons, New York, S. 161-219.
- [3] Eady, R.R. (1996) Structure-function relationships of alternative nitrogenases, *Chem. Rev.* **96**, S. 3013-3030.
- [4] Rees, D.C., Chan, M.K. und Kim, J. (1993) Structure and function of nitrogenase, *Adv. Inorg. Chem.* **40**, S. 89-119.
- [5] Kim, J. und Rees, D.C. (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation, *Biochemistry* **33**, S. 389-397.
- [6] Howard, J.B. und Rees, D.C. (1994) Nitrogenase: A nucleotide-dependent molecular switch, *Annu. Rev. Biochem.* **63**, S. 235-264.
- [7] Georgiadis, M.M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J.J. und Rees, D.C. (1992) Crystallographic structure of nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*, *Science* **257**, S. 1653-1659.
- [8] Schlessman, J.L., Woo, D., Joshua-Tor, L., Howard, J.B. und Rees, D.C. (1998) Conformational variability in structures of the nitrogenase iron proteins from *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*, *J. Mol. Biol.* **280**, S. 669-685.
- [9] Kim, J. und Rees, D.C. (1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*, *Nature* **360**, S. 553-560.
- [10] Kim, J. und Rees, D.C. (1992) Structural models for the metal centers in nitrogenase molybdenum-iron protein, *Science* **257**, S. 1677-1682.
- [11] Chan, M.K., Kim, J. und Rees, D.C. (1993) The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures, *Science* **260**, S. 792-794.
- [12] Peters, J.W., Stowell, M.H.B., Soltis, S.M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K. und Rees, D.C. (1997) Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster, *Biochemistry* **36**, S. 1181-1187.
- [13] Kim, J., Woo, D. und Rees, D.C. (1993) X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution, *Biochemistry* **32**, S. 7104-7115.
- [14] Bolin, J.T., Campobasso, N., Muchmore, S.W., Minor, W., Morgan, T.V. und Mortenson, L.E. (1993) The crystal structure of the nitrogenase MoFe protein from *Clostridium pasteurianum*. **In:** *New horizons in nitrogen fixation* (Palacios, R., Mora, J., Newton, W.E., Hrsg.), Kluwer, Dordrecht, S. 89-94.

- [15] Bolin, J.T., Ronco, A.E., Morgan, T.V., Mortenson, L.E. und Xuong, N.-H. (1993) The unusual metal clusters of nitrogenase: structural features revealed by X-ray anomalous diffraction studies of the MoFe protein from *Clostridium pasteurianum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, S. 1078-1082.
- [16] Ljones, T. und Burris, R.H. (1978) Evidence for one-electron transfer by the Fe protein of nitrogenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, S. 22-25.
- [17] Shah, V.K. und Brill, W.J. (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, S. 3249-3253.
- [18] Shah, V.K. und Brill, W.J. (1981) Isolation of a molybdenum-iron cluster from nitrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, S. 3438-3440.
- [19] Venters, R.A., Nelson, M.J., McLean, P.A., True, A.E., Levy, M.A., Hoffman, B.M. und Orme-Johnson, W.H. (1986) ENDOR of the resting state of nitrogenase molybdenum-iron proteins from *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Clostridium pasteurianum*:  $^1\text{H}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{95}\text{Mo}$ , and  $^{33}\text{S}$  studies, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, S. 3487-3498.
- [20] Coucouvanis, D. (1996) Functional analogs for the reduction of certain nitrogenase substrates. Are multiple sites within the Fe/Mo/S active center involved in the  $6e^-$  reduction of  $\text{N}_2$ ?, *JBIC* **1**, S. 594-600.
- [21] Sellmann, D. und Fürsattel, A. (1999) Modellierung einer Nitrogenase-Schlüsselreaktion: die  $\text{N}_2$ -abhängige HD-Bildung durch  $\text{D}_2/\text{H}^+$ -Austausch, *Angew. Chem.* **111**, S. 2142-2145.
- [22] Deng, H. und Hoffmann, R. (1993) Wie die  $\text{N}_2$ -Aktivierung durch den FeMo-Cofaktor der Nitrogenase vonstatten gehen könnte, *Angew. Chem.* **105**, S. 1125-1128.
- [23] Dance, I. (1998) Understanding structure and reactivity of new fundamental inorganic molecules: metal sulfides, metallocarbohedrenes, and nitrogenase, *Chem. Commun.*, S. 523-530.
- [24] Plass, W. (1994) Electronic structure of the iron-molybdenum and alternative cofactors of nitrogenases: a comparison and its consequences, *J. Mol. Struct.* **315**, S. 53-62.
- [25] Pickett, C.J. (1996) The Chatt cycle and the mechanism of enzymic reduction of molecular nitrogen, *JBIC* **1**, S. 601-606.
- [26] Grönberg, K.L.C., Gormal, C.A., Durrant, M.C., Smith, B.E. und Henderson, R.A. (1998) Why R-homocitrate is essential to the reactivity of FeMo-cofactor of nitrogenase: studies on NifV<sup>-</sup>-extracted FeMo-cofactor, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, S. 10613-10621.
- [27] Smith, B.E., Durrant, M.C., Fairhurst, S.A., Gormal, C.A., Grönberg, K.L.C., Henderson, R.A., Ibrahim, S.K., Le Gall, T. und Pickett, C.J. (1999) Exploring the reactivity of the isolated iron-molybdenum cofactor of nitrogenase, *Coord. Chem. Rev.* **185-186**, S. 669-687.

- [28] Lanzilotta, W.N., Fisher, K. und Seefeldt, L.C. (1996) Evidence for electron transfer from the nitrogenase iron protein to the molybdenum-iron protein without MgATP hydrolysis: characterization of a tight protein-protein complex, *Biochemistry* **35**, S. 7188-7196.
- [29] Lanzilotta, W.N. und Seefeldt, L.C. (1996) Electron transfer from the nitrogenase iron protein to the [8Fe-(7/8)S] clusters of the molybdenum-iron protein, *Biochemistry* **35**, S. 16770-16776.
- [30] Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J.L., Howard, J.B. und Rees, D.C. (1997) Structure of ADP·AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction, *Nature* **387**, S. 370-376.
- [31] Lanzilotta, W.N., Christiansen, J., Dean, D.R. und Seefeldt, L.C. (1998) Evidence for coupled electron and proton transfer in the [8Fe-7S] cluster of nitrogenase, *Biochemistry* **37**, S. 11376-11384.
- [32] Schneider, K., Müller, A., Schramm, U. und Klipp, W. (1991) Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*, *Eur. J. Biochem.* **195**, S. 653-661.
- [33] Bishop, P.E. und Joerger, R.D. (1990) Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, S. 109-125.
- [34] Luque, F. und Pau, R.N. (1991) Transcriptional regulation by metals of structural genes for *Azotobacter vinelandii* nitrogenases, *Mol. Gen. Genet.* **227**, S. 481-487.
- [35] Krahn, E., Weiss, B.J.R., Kröckel, M., Cramer, S.P., Trautwein, A.X., Schneider, K. und Müller, A. (1998) The Fe-only nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: The FeFe protein metal centers probed by EXAFS and Mössbauer spectroscopy. **In:** *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* (Elmerich, C., Kondorosi, A. und Newton, W.E., Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 59-60.
- [36] Bulen, W.A. (1961) Effect of tungstate on the uptake and function of molybdate in *Azotobacter agilis*, *J. Bacteriol.* **82**, S. 130-134.
- [37] Nagatani, H.H. und Brill, W.J. (1974) The effect of Mo, W and V on the synthesis of nitrogenase components in *Azotobacter vinelandii*, *Biochim. Biophys. Acta* **362**, S. 160-166.
- [38] Benemann, J.R., Smith, G.M., Kostel, P.J. und McKenna, C.E. (1973) Tungsten incorporation into *Azotobacter vinelandii* nitrogenase, *FEBS Lett.* **29**, S. 219-221.
- [39] Hales, B.J. und Case, E.E. (1987) Nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* in tungsten-containing medium, *J. Biol. Chem.* **262**, S. 16205-16211.
- [40] Johnson, M.K., Rees, D.C. und Adams, M.W.W. (1996) Tungstoenzymes, *Chem. Rev.* **96**, S. 2817-2839.
- [41] Kletzin, A. und Adams, M.W.W. (1996) Tungsten in biological systems, *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, S. 5-63.

- [42] Müller, A. und Krahn, E. (1995) Zur Bildung des FeMo-Cofaktors der Nitrogenase in der Natur und im Reagensglas - ein Zusammenspiel von Genetik und Chemie, *Angew. Chem.* **107**, S. 1172-1179.
- [43] Allen, R.M., Chatterjee, R., Madden, M.S., Ludden, P.W. und Shah, V.K. (1994) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase, *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**, S. 225-249.
- [44] Roberts, G.P., MacNeil, T., MacNeil, D. und Brill, W.J. (1978) Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*, *J. Bacteriol.* **136**, S. 267-279.
- [45] Tal, S., Chun, T.W., Gavini, N. und Burgess, B.K. (1991) The  $\Delta nifB$  (or  $\Delta nifE$ ) FeMo cofactor-deficient MoFe protein is different from the  $\Delta nifH$  protein, *J. Biol. Chem.* **266**, S. 10654-10657.
- [46] Hawkes, T.R. und Smith, B.E. (1983) Purification and characterization of the inactive MoFe protein (NifB-Kp1) of the nitrogenase from *nifB* mutants of *Klebsiella pneumoniae*, *Biochem. J.* **209**, S. 43-50.
- [47] Muchmore, S.W., Jack, R.F. und Dean, D.R. (1996) Developments in the analysis of nitrogenase FeMo-Cofactor biosynthesis. **In:** *Mechanisms of metallocenter assembly* (Hausinger, R.P., Eichhorn, G.L. und Marzilli, L.G., Hrsg.), VCH Publishers, Inc., New York, S. 111-133.
- [48] Ugalde, R.A., Imperial, J., Shah, V.K. und Brill, W.J. (1984) Biosynthesis of iron-molybdenum cofactor in the absence of nitrogenase, *J. Bacteriol.* **159**, S. 888-893.
- [49] Shah, V.K., Imperial, J., Ugalde, R.A., Ludden, P.W. und Brill, W.J. (1986) *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, S. 1636-1640.
- [50] Shah, V.K., Allen, J.R., Spangler, N.J. und Ludden, P.W. (1994) *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase, *J. Biol. Chem.* **269**, S. 1154-1158.
- [51] Allen, R.M., Chatterjee, R., Ludden, P.W. und Shah, V.K. (1996) The requirement of reductant for *in vitro* biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase, *J. Biol. Chem.* **271**, S. 4256-4260.
- [52] Chatterjee, R., Allen, R.M., Ludden, P.W. und Shah, V.K. (1997) *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor and maturation of the *nif*-encoded apodinitrogenase, *J. Biol. Chem.* **272**, S. 21604-21608.
- [53] Rangaraj, P., Ryle, M.J., Lanzilotta, W.N., Ludden, P.W. und Shah, V.K. (1999) *In vitro* biosynthesis of iron-molybdenum cofactor and maturation of the *nif*-encoded apodinitrogenase, *J. Biol. Chem.* **274**, S. 19778-19784.
- [54] Bulen, W.A., Burns, R.C. und LeComte, J.R. (1965) Nitrogen fixation: hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, S. 532-539.

- [55] Allen, R.M., Chatterjee, R., Ludden, P.W. und Shah, V.K. (1995) Incorporation of iron and sulfur from NifB cofactor into the iron-molybdenum cofactor of dinitrogenase, *J. Biol. Chem.* **270**, S. 26890-26896.
- [56] Brigle, K.E., Weiss, M.C., Newton, W.E. und 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**, S. 1547-1553.
- [57] Moreno-Vivian, C., Schmehl, M., Masepohl, B., Arnold, W. und Klipp, W. (1989) DNA sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus nifENX* gene region: Homology between NifX and NifB suggests involvement of NifX in processing of the iron-molybdenum cofactor, *Mol. Gen. Genet.* **216**, S. 353-363.
- [58] Aguilar, O.M., Taormino, J., Thöny, B., Ramseier, T., Hennecke, H. und Szalay, A.A. (1990) The *nifEN* genes participating in FeMo cofactor biosynthesis and genes encoding dinitrogenase are part of the same operon in *Bradyrhizobium* species, *Mol. Gen. Genet.* **224**, S. 413-420.
- [59] Paustian, T.D., Shah, V.K. und Roberts, G.P. (1989) Purification and characterization of the *nifN* and *nifE* gene products from *Azotobacter vinelandii* mutant UW45, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, S. 6082-6086.
- [60] Roll, J.T., Shah, V.K., Dean, D.R. und Roberts, G.P. (1995) Characteristics of NIFNE in *Azotobacter vinelandii* strains, *J. Biol. Chem.* **270**, S. 4432-4437.
- [61] Goodwin, P.J., Agar, J.N., Roll, J.T., Roberts, G.P., Johnson, M.K. und Dean, D.R. (1998) The *Azotobacter vinelandii* NifEN complex contains two identical [4Fe-4S] clusters, *Biochemistry* **37**, S. 10420-10428.
- [62] Moreno-Vivian, C., Hennecke, S., Pühler, A. und Klipp, W. (1989) Open reading frame 5 (ORF5), encoding a ferredoxinlike protein, and *nifQ* are cotranscribed with *nifE*, *nifN*, *nifX*, and ORF4 in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.* **171**, S. 2591-2598.
- [63] Shah, V.K., Rangaraj, P., Chatterjee, R., Allen, R.M., Roll, J.T., Roberts, G.P. und Ludden, P.W. (1999) Requirement of NifX and other *nif* proteins for in vitro biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase, *J. Bacteriol.* **181**, S. 2797-2801.
- [64] Jacobson, M.R., Brigle, K.E., Bennett, L.T., Setterquist, R.A., Wilson, M.S., Cash, V.L., Beynon, J., Newton, W.E. und Dean, D.R. (1989) Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **171**, S. 1017-1027.
- [65] Rüttimann-Johnson, C., Staples, C.R., Rangaraj, P., Shah, V.K. und 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**, S. 18087-18092.

- [66] Rüttimann-Johnson, C., Rangaraj, P., Shah, V.K., Staples, C.R. und Ludden, P.W. (1999) Roles of VnfX and NifX in FeV-co and FeMo-co synthesis in *Azotobacter vinelandii*, *J. Inorg. Biochem.* **74**, S. 215.
- [67] Allen, R.M., Homer, M.J., Chatterjee, R., Ludden, P.W., Roberts, G.P. und Shah, V.K. (1993) Dinitrogenase reductase- and MgATP-dependent maturation of apodinitrogenase from *Azotobacter vinelandii*, *J. Biol. Chem.* **268**, S. 23670-23674.
- [68] Rangaraj, P., Shah, V.K. und Ludden, P.W. (1997) ApoNifH functions in iron-molybdenum cofactor synthesis and apodinitrogenase maturation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, S. 11250-11255.
- [69] Homer, M.J., Paustian, T.D., Shah, V.K. und Roberts, G.P. (1993) The *nifY* product of *Klebsiella pneumoniae* is associated with apodinitrogenase and dissociates upon activation with the iron-molybdenum cofactor, *J. Bacteriol.* **175**, S. 4907-4910.
- [70] Homer, M.J., Dean, D.R. und 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**, S. 24745-24752.
- [71] Zheng, L., White, R.H. und Dean, D.R. (1997) Purification of the *Azotobacter vinelandii* *nifV*-encoded homocitrate synthase, *J. Bacteriol.* **179**, S. 5963-5966.
- [72] Liang, J., Madden, M., Shah, V.K. und Burris, R.H. (1990) Citrate substitutes for homocitrate in nitrogenase of a *nifV* mutant of *Klebsiella pneumoniae*, *Biochemistry* **29**, S. 8577-8581.
- [73] Masepohl, B., Angermüller, S., Hennecke, S., Hübner, P., Moreno-Vivian, C. und Klipp, W. (1993) Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Rhodobacter capsulatus* ORF6-*nifU<sub>1</sub>* SVW gene region: possible role of NifW in homocitrate processing, *Mol. Gen. Genet.* **238**, S. 369-382.
- [74] Imperial, J., Ugalde, R.A., Shah, V.K. und Brill, W.J. (1984) Role of *nifQ* gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*, *J. Bacteriol.* **158**, S. 187-194.
- [75] Imperial, J., Ugalde, R.A., Shah, V.K. und Brill, W.J. (1985) Mol<sup>-</sup> mutants of *Klebsiella pneumoniae* requiring high levels of molybdate for nitrogenase activity, *J. Bacteriol.* **163**, S. 1285-1287.
- [76] Joerger, R.D. und Bishop, P.E. (1988) Nucleotide sequence and genetic analysis of the *nifB-nifQ* region from *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **170**, S. 1475-1487.
- [77] Ugalde, R.A., Imperial, J., Shah, V.K. und Brill, W.J. (1985) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*: effect of sulfur source, *J. Bacteriol.* **164**, S. 1081-1087.
- [78] Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F. und Dean, D.R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, S. 2754-2758.

- [79] Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L. und Dean, D.R. (1994) Mechanism for the desulfurisation of L-Cysteine catalyzed by the *nifS* gene product, *Biochemistry* **33**, S. 4714-4720.
- [80] Dean, D.R., Bolin, J.T. und Zheng, L. (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis, *J. Bacteriol.* **175**, S. 6737-6744.
- [81] Wang, G., Angermüller, S. und Klipp, W. (1993) Characterization of *Rhodobacter capsulatus* genes encoding a molybdenum transport system and putative molybdenum-pterin-binding proteins, *J. Bacteriol.* **175**, S. 3031-3042.
- [82] Kutsche, M., Leimkühler, S., Angermüller, S. und Klipp, W. (1996) Promoters controlling expression of the alternative nitrogenase and the molybdenum uptake system in *Rhodobacter capsulatus* are activated by NtrC, independent of  $\sigma^{54}$ , and repressed by molybdenum, *J. Bacteriol.* **178**, S. 2010-2017.
- [83] Masepohl, B. und Klipp, W. (1996) Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*, *Arch. Microbiol.* **165**, S. 80-90.
- [84] Higgins, C.F., Gallagher, M.P., Hyde, S.C., Mimmack, M.L. und Pearce, S.R. (1990) Periplasmic binding protein-dependent transport systems: the membrane-associated components, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **326**, S. 353-365.
- [85] Imperial, J., Hadi, M. und Amy, N.K. (1998) Molybdate binding by ModA, the periplasmic component of the *Escherichia coli mod* molybdate transport system, *Biochim. Biophys. Acta* **1370**, S. 337-346.
- [86] Mouncey, N.J., Mitchenall, L.A. und Pau, R.N. (1995) Mutational analysis of genes of the *mod* locus involved in molybdenum transport, homeostasis, and processing in *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **177**, S. 5294-5302.
- [87] Hall, D.R., Gourley, D.G., Duke, E.M.H., Leonard, G.A., Anderson, L.A., Pau, R.N., Boxer, D.H. und Hunter, W.N. (1999) Two crystal forms of ModE, the molybdate-dependent transcriptional regulator from *Escherichia coli*, *Acta Cryst.* **D55**, S. 542-543.
- [88] Duhme, A.-K., Hider, R.C. und Khodr, H. (1996) Spectrophotometric competition study between molybdate and Fe(III) hydroxide on N,N'-bis(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysine, a naturally occurring siderophore synthesized by *Azotobacter vinelandii*, *BioMetals* **9**, S. 245-248.
- [89] Lagarou, V. (1995) Untersuchungen zur Bildung einer "Rhenium-Nitrogenase" in *Azotobacter vinelandii* und *Rhodobacter capsulatus*, Dissertation, Universität Bielefeld.
- [90] Klipp, W., Masepohl, B. und Pühler, A. (1988) Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a *nifA-nifB* region, *J. Bacteriol.* **170**, S. 693-699.

- [91] Schüddekopf, K., Hennecke, S., Liese, U., Kutsche, M. und Klipp, W. (1993) Characterization of *anf* genes specific for the alternative nitrogenase and identification of *nif* genes required for both nitrogenases in *Rhodobacter capsulatus*, *Mol. Microbiol.* **8**, S. 673-684.
- [92] Masepohl, B., Klipp, W. und Pühler, A. (1988) Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*, *Mol. Gen. Genet.* **212**, S. 27-37.
- [93] Gollan, U., Schneider, K., Müller, A., Schüddekopf, K. und Klipp, W. (1993) Detection of the in vivo incorporation of a metal cluster into a protein, *Eur. J. Biochem.* **215**, S. 25-35.
- [94] Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria, *Biotechnology* **1**, S. 784-791.
- [95] Schneider, K., Müller, A., Johannes, K.-U., Diemann, E. und Kottmann, J. (1991) Selective removal of molybdenum traces from growth media of N<sub>2</sub>-fixing bacteria, *Anal. Biochem.* **193**, S. 292-298.
- [96] North, M.J. (1989) Prevention of unwanted proteolysis. **In:** *Proteolytic enzymes: A practical approach* (Beynon, R.J. und Bond, J.S., Hrsg.), Kap. 6, IRL Press, Oxford, S. 105-124.
- [97] Dröttboom, M. (1998) Biochemische und ESR-spektroskopische Charakterisierung der Molybdän-unabhängigen Eisen-Nitrogenase von *Rhodobacter capsulatus*, Dissertation, Universität Bielefeld.
- [98] Schmidt, K., Liaaen-Jensen, S. und Schlegel, H.G. (1963) Die Carotinoide der *Thiorhodaceae*. I. Okenon als Hauptcarotinoid von *Chromatium okenii* Perty, *Arch. Microbiol.* **46**, S. 117-126.
- [99] Beisenherz, G., Bolze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleiderer, G. (1953) Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang, *Z. Naturforsch.* **8b**, S. 555-577.
- [100] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, S. 248-254.
- [101] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, S. 680-685.
- [102] Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**, S. 368-379.

- [103] Schneider, K., Gollan, U., Dröttboom, M., Selsemeier-Voigt, S. und Müller, A. (1997) Comparative biochemical characterization of the iron-only nitrogenase and the molybdenum nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*, *Eur. J. Biochem.* **244**, S. 789-800.
- [104] Ouchterlony, Ö. (1971) Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis, 5. Aufl., Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, S. 32-59.
- [105] Oakley, C.L. (1971) Antigen-antibody reactions in microbiology. **In:** *Methods in Microbiology* (Norris, J.R. und Ribbons, D.W., Hrsg.), Bd. 5A, Kap. VII, Academic Press Inc., London, S. 174-218.
- [106] Mancini, G., Carbonara, A.O. und Heremans, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion, *Immunochemistry* **2**, S. 235-254.
- [107] Catty, D. und Raykundalia, C. (1988) Gel immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunostaining methods. **In:** *Antibodies. Vol. I: A practical approach* (Catty, D., Hrsg.), IRL Press, Oxford, Washington DC, S. 137-167.
- [108] Switzer, R.C., III, Merrill, C.R. und Shifrin, S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* **98**, S. 231-237.
- [109] Oakley, B.R., Kirsch, D.R. und Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* **105**, S. 361-363.
- [110] Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, S. 4350-4354.
- [111] De Blas, A.L. und Cherwinski, H.M. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies, *Anal. Biochem.* **133**, S. 214-219.
- [112] Hawkes, R. (1982) Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting, *Anal. Biochem.* **123**, S. 143-146.
- [113] Dutton, P.L. (1978) Redox potentiometry: Determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems, *Meth. Enzymol.* **54**, S. 411-435.
- [114] Barber, M.J. und Salerno, J.C. (1980) Theoretical and practical aspects of studying molybdenum-containing enzymes. **In:** *Molybdenum and molybdenum-containing enzymes* (Coughlan, M., Hrsg.), Kap. 18, Pergamon Press, Oxford, S. 543-568.
- [115] Dutton, P.L. (1971) Oxidation-reduction potential dependence of the interaction of cytochromes, bacteriochlorophyll and carotenoids at 77 K in chromatophores of *Chromatium D* and *Rhodospseudomonas gelatinosa*, *Biochim. Biophys. Acta* **226**, S. 63-80.
- [116] Neumüller, O.-A. (1987) Römpps Chemie-Lexikon, 8. Aufl., Bd. 5, Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, S. 3524.

- [117] Pienkos, P.T. und Brill, W.J. (1981) Molybdenum accumulation and storage in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **145**, S. 743-751.
- [118] Jacobson, M.R., Premakumar, R. und Bishop, P.E. (1986) Transcriptional regulation of nitrogen fixation by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **167**, S. 480-486.
- [119] Dixon, R., Eady, R.R., Espin, G., Hill, S., Iaccarino, M., Kahn, D. und Merrick, M. (1980) Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation (*nif*) gene cluster with gene fusions, *Nature* **286**, S. 128-132.
- [120] Smith, B.E., Lowe, D.J. und Bray, R.C. (1973) Studies by electron paramagnetic resonance on the catalytic mechanism of nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*, *Biochem. J.* **135**, S. 331-341.
- [121] Pierik, A.J., Wassink, H., Haaker, H. und Hagen, W.R. (1993) Redox properties and EPR spectroscopy of the P clusters of *Azotobacter vinelandii* MoFe protein, *Eur. J. Biochem.* **212**, S. 51-61.
- [122] Hagen, W.R., Wassink, H., Eady, R.R., Smith, B.E. und Haaker, H. (1987) Quantitative EPR of an  $S = 7/2$  system in thionine-oxidized MoFe proteins of nitrogenase, *Eur. J. Biochem.* **169**, S. 457-465.
- [123] Lee, J.H., Wendt, J.C. und Shanmugam, K.T. (1990) Identification of a new gene, *molR*, essential for utilization of molybdate by *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **172**, S. 2079-2087.
- [124] Walmsley, J. und Kennedy, C. (1991) Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, S. 622-624.
- [125] Miller, R.W. und Eady, R.R. (1988) Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*, *Biochem. J.* **256**, S. 429-432.
- [126] Müller, A., Jostes, R., Krickemeyer, E. und Bögge, H. (1987) Zur Rolle des Heterometall-Atoms im  $N_2$ -reduzierenden Protein der Nitrogenase, *Naturwissenschaften* **74**, S. 388-389.
- [127] Holm, R.H. (1992) Trinuclear cuboidal and heterometallic cubane-type iron-sulfur clusters: new structural and reactivity themes in chemistry and biology, *Adv. Inorg. Chem.* **38**, S. 1-71.
- [128] Erfkamp, J. und Müller, A. (1990) Die Stickstoff-Fixierung, *C.i.u.Z.* **24**, S. 267-279.
- [129] Gollan, U. (1994) Untersuchungen an der alternativen Nitrogenase von *Rhodobacter capsulatus*, Dissertation, Universität Bielefeld.
- [130] Weaver, P.F., Wall, J.D. und Gest, H. (1975) Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*, *Arch. Microbiol.* **105**, S. 207-216.

- [131] Krahn, E., Schneider, K. und Müller, A. (1996) Comparative characterization of H<sub>2</sub> production by the conventional Mo nitrogenase and the alternative "iron-only" nitrogenase of *Rhodobacter capsulatus hup<sup>-</sup>* mutants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, S. 285-290.
- [132] Tarlton, J.F. und Knight, P.J. (1996) Comparison of reflectance and transmission densitometry, using document and laser scanners, for quantitation of stained western blots, *Anal. Biochem.* **237**, S. 123-128.
- [133] Avtges, P., Scolnik, P.A. und Haselkorn, R. (1983) Genetic and physical map of the structural genes (*nifH,D,K*) coding for the nitrogenase complex of *Rhodospseudomonas capsulata*, *J. Bacteriol.* **156**, S. 251-256.
- [134] McLean, P.A. und Dixon, R.A. (1981) Requirement of *nifV* gene for production of wild-type nitrogenase enzyme in *Klebsiella pneumoniae*, *Nature* **292**, S. 655-656.
- [135] Hill, S. und Kavanagh, E.P. (1994) Autoregulation of nitrogenase expression in *Klebsiella pneumoniae*, *Microbiol.* **140**, S. 1917-1925.
- [136] Hwang, J.C., Chen, C.H. und Burris, R.H. (1973) Inhibition of nitrogenase-catalyzed reductions, *Biochim. Biophys. Acta* **292**, S. 256-270.
- [137] Hawkes, T.R., McLean, P.A. und Smith, B.E. (1984) Nitrogenase from *nifV* mutants of *Klebsiella pneumoniae* contains an altered form of the iron-molybdenum cofactor, *Biochem. J.* **217**, S. 317-321.
- [138] Keeler, R.F. und Varner, J.E. (1957) Tungstate as an antagonist of molybdate in *Azotobacter vinelandii*, *Arch. Biochem. Biophys.* **70**, S. 585-590.
- [139] Riddle, G.D., Simonson, J.G., Hales, B.J. und Braymer, H.D. (1982) Nitrogen fixation system of tungsten-resistant mutants of *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **152**, S. 72-80.
- [140] Premakumar, R., Jacobitz, S., Ricke, S.C. und Bishop, P.E. (1996) Phenotypic characterization of a tungsten-tolerant mutant of *Azotobacter vinelandii*, *J. Bacteriol.* **178**, S. 691-696.
- [141] Brill, W.J., Steiner, A.L. und Shah, V.K. (1974) Effect of molybdenum starvation and tungsten on the synthesis of nitrogenase components in *Klebsiella pneumoniae*, *J. Bacteriol.* **118**, S. 986-989.
- [142] Hallenbeck, P.C., Meyer, C.M. und Vignais, P.M. (1982) Regulation of nitrogenase in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* as studied by two-dimensional gel electrophoresis, *J. Bacteriol.* **151**, S. 1612-1616.
- [143] Friesen, G.D., McDonald, J.W., Newton, W.E., Euler, W.B. und Hoffman, B.M. (1983) Synthesis, characterization, and EPR spectral studies of the multimetal species  $[\text{Fe}(\text{MS}_4)_2]^{3-}$  (M = Mo, W), *Inorg. Chem.* **22**, S. 2202-2208.

- [144] Armstrong, W.H., Mascharak, P.K. und Holm, R.H. (1982) Doubly bridged double cubanes containing  $MFe_3S_4$  Clusters ( $M = Mo, W$ ). Synthesis, structure, and conversion to spin-quartet single clusters in solution, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, S. 4373-4383.
- [145] Christou, G., Collison, D., Garner, C.D., Acott, S.R., Mabbs, F.E. und Petrouleas, V. (1982) Magnetic moments and electron spin resonance spectra of some iron-sulphur-molybdenum and -tungsten cubane-like cluster dimers, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, S. 1575-1585.
- [146] Kisker, C., Schindelin, H., Baas, D., Rétey, J., Meckenstock, R.U. und Kroneck, P.M.H. (1999) A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes, *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, S. 503-521.
- [147] Schmitz, R.A., Albracht, S.P.J. und Thauer, R.K. (1992) Properties of the tungsten-substituted molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanobacterium wolfei*, *FEBS Lett.* **309**, S. 78-81.
- [148] Buc, J., Santini, C.-L., Giordani, R., Czjzek, M., Wu, L.-F. und Giordano, G. (1999) Enzymatic and physiological properties of the tungsten-substituted molybdenum TMAO reductase from *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* **32**, S. 159-168.
- [149] Das, S.K., Biswas, D., Maiti, R. und Sarkar, S. (1996) Modeling the tungsten sites of inactive and active forms of hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus* aldehyde ferredoxin oxidoreductase, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, S. 1387-1397.
- [150] Wagenknecht, P.S. und Norton, J.R. (1995) Mechanism of transition-metal-mediated nitrogen fixation: where does the third proton go?, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, S. 1841-1842.
- [151] Nishibayashi, Y., Iwai, S. und Hidai, M. (1998) Bimetallic system for nitrogen fixation: ruthenium-assisted protonation of coordinated  $N_2$  on tungsten with  $H_2$ , *Science* **279**, S. 540-542.
- [152] Leigh, G.J. (1998) Fixing nitrogen any which way, *Science* **279**, S. 506-507.
- [153] Hidai, M. (1999) Chemical nitrogen fixation by molybdenum and tungsten complexes, *Coord. Chem. Rev.* **185-186**, S. 99-108.
- [154] Belay, N., Sparling, R. und Daniels, L. (1984) Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium, *Nature* **312**, S. 286-288.
- [155] Reade, J.P.H., Dougherty, L.J., Rogers, L.J. und Gallon, J.R. (1999) Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* strain ATCC 27152, *Microbiology* **145**, S. 1749-1758.
- [156] Scott, D.J., May, H.D., Newton, W.E., Brigle, K.E. und Dean, D.R. (1990) Role of the nitrogenase MoFe protein  $\alpha$ -subunit in FeMo-cofactor binding and catalysis, *Nature* **343**, S. 188-190.

- [157] Scott, D.J., Dean, D.R. und Newton, W.E. (1992) Nitrogenase-catalyzed ethane production and CO-sensitive hydrogen evolution from MoFe proteins having amino acid substitutions in an  $\alpha$ -subunit FeMo cofactor-binding domain, *J. Biol. Chem.* **267**, S. 20002-20010.
- [158] Allen, R.M., Roll, J.T., Rangaraj, P., Shah, V.K., Roberts, G.P. und Ludden, P.W. (1999) Incorporation of molybdenum into the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase, *J. Biol. Chem.* **274**, S. 15869-15874.
- [159] Ludden, P.W., Shah, V.K., Roberts, G.P., Rüttimann-Johnson, C., Rangaraj, P., Foulger, T., Allen, R.M., Homer, M., Roll, J., Zhang, X. und Chatterjee, R. (1998) Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors. **In:** *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* (Elmerich, C., Kondorosi, A. und Newton, W.E., Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 33-38.
- [160] Schneider, K., Müller, A., Krahn, E., Hagen, W.R., Wassink, H. und Knüttel, K.-H. (1995) The molybdenum nitrogenase from wild-type *Xanthobacter autotrophicus* exhibits properties reminiscent of alternative nitrogenases, *Eur. J. Biochem.* **230**, S. 666-675.
- [161] Smith, E.E., Eady, R.R., Lowe, D.J. und Gormal, C. (1988) The vanadium-iron protein of vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* contains an iron-vanadium cofactor, *Biochem. J.* **250**, S. 299-302.
- [162] Pau, R.N., Mitchenall, L.A. und Robson, R.L. (1989) Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium, *J. Bacteriol.* **171**, S. 124-129.
- [163] Pau, R.N., Eldridge, M.E., Lowe, D.J., Mitchenall, L.A. und Eady, R.R. (1993) Molybdenum-independent nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*: a functional species of alternative nitrogenase-3 isolated from a molybdenum-tolerant strain contains an iron-molybdenum cofactor, *Biochem. J.* **293**, S. 101-107.
- [164] Rangaraj, P., Ryle, M.J., Lanzilotta, W.N., Goodwin, P.J., Dean, D.R., Shah, V.K. und Ludden, P.W. (1999) Inhibition of iron-molybdenum cofactor biosynthesis by L127 $\Delta$  NifH and evidence for a complex formation between L127 $\Delta$  NifH and NifNE, *J. Biol. Chem.* **274**, S. 29413-29419.

## Publikationen

Siemann, S., Schneider, K., Behrens, K., Knöchel, A., Klipp, W. & Müller, A.

FeMo cofactor biosynthesis in a *nifE*<sup>-</sup> mutant of *Rhodobacter capsulatus*.

Eur. J. Biochem. (2001) (im Druck)

The iron-only nitrogenase and the Mo nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: a comparative study on the redox properties of the metal clusters present in the dinitrogenase components.

(Manuskript zur Veröffentlichung im Eur. J. Biochem. vorgelegt)

Characterization of a tungsten-substituted nitrogenase isolated from *Rhodobacter capsulatus*.

(Manuskript in Vorbereitung)

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Müller danke ich für die Überlassung des Themas und sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Schneider für seine hervorragende Betreuung und die mir stets gewährte Unterstützung.

Den Mitgliedern der „Bioanorganik-Gruppe“, Frau E. Beckmann, Frau Dr. M. Dröttboom, Frau S. Fuchs, Herrn Dr. E. Krahn, Frau S. Selsemeier-Voigt und Herrn D. Tiemann möchte ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima danken.

Allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises sei ebenfalls für ihre Unterstützung in vielen Bereichen meiner Arbeit gedankt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Klipp von der Ruhr-Universität Bochum für die zur Verfügung gestellten Bakterienstämme sowie Frau S. Angermeier für ihre Hilfe bei der Konstruktion der Doppelmutante.

Herrn Prof. Dr. S. Albracht von der Universität Amsterdam sei für den fantastischen Einführungskurs in die EPR-Spektroskopie und Herrn Dr. A. Erkens für sein Engagement bei den nötigen Reparaturen des EPR-Spektrometers gedankt.

Herrn D. Tiemann und Herrn K. Behrens (Universität Hamburg) möchte ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Metallgehaltsbestimmungen und die sich anschließenden Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. H. Tschesche danke ich für die Übernahme des Kofererats.

Zuletzt (but not least) möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin Rita Bélanger für ihre Liebe und immerwährende Unterstützung bedanken.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Stefan Siemann  
Geburtsdatum/-ort: 11. Juni 1969 in Paderborn  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1976 - 1980 Grundschule St. Elisabeth, Paderborn  
1980 - 1989 Gymnasium Theodorianum, Paderborn

### Studium

Okt. 1990 - Mai 1996 Studium der Chemie an der Universität-GH Paderborn

Okt. 92: Vordiplom

Aug. 94 - Juni 95: Auslandsaufenthalt im Rahmen eines vom DAAD finanzierten Austauschprogrammes an der University of Waterloo (Ontario, Kanada)

Sept. 95: Diplomprüfung

Nov. 95 - Mai 96: Externe Diplomarbeit an der University of Waterloo (Kanada) unter der Leitung von Prof. Dr. T. Viswanatha (Waterloo) und Prof. Dr. K. Krohn (Paderborn).  
Titel der Arbeit: „Strategies for inhibition of enzymes in the aerobactin biosynthetic pathway“.

Seit Nov. 1996 Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h. c. A. Müller am Lehrstuhl für Anorganische Chemie I, Universität Bielefeld