

VAAM-Promotionspreisträger 2005

[NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*: Funktionen der am Metalleinbau beteiligten Proteine

Melanie Blokesch

► Das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen besteht aus den namensgebenden Metallen Nickel und Eisen, wobei letzteres als Nicht-Protein-Ligand zwei Cyanide (CN) und ein Kohlenmonoxid (CO) besitzt. Vorarbeiten haben gezeigt, dass für den Einbau dieses $\text{NiFe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Zentrums Hilfsproteine nötig sind, die durch die *hyp*-Gene (*hypA-F*) kodiert werden. Zusätzlich bedarf es einer Endopeptidase sowie ATP, GTP und Carbamoylphosphat (CP), dessen Carbamoylgruppe durch das Hilfsprotein HypF auf das C-terminale Cystein des HypE-Proteins übertragen und daran ATP-abhängig zum Cyanid dehydratisiert wird. Bekannt war, dass das Hilfsprotein HypC einen Komplex mit dem Vorläufer der großen Untereinheit der Hydrogenase eingeht. Im Mittelpunkt der Dissertation stand die Fragestellung, auf welchem Weg die Koordination des Fe durch das Cyanid und der Einbau der Metalle in die große Untereinheit stattfinden; sie wurde durch die Charakterisierung gereinigter Hilfsproteine, ihrer Interaktionen und Beteiligung am CN-Transfer angegangen.

In CP-defizienten *E. coli*-Stämmen kommt es zur Anhäufung eines Komplexes zwischen den Hilfsproteinen HypC und HypD^[1]. Die am HypE-Protein synthetisierte CN-Gruppe kann auf gereinigte HypC×HypD-Komplexe übertragen werden

(Abb. 1B)^[2]. Keine Übertragung erfolgte auf HypC oder HypD alleine.

Ein ternärer Komplex aus den Proteinen HypC, HypD und HypE wurde gereinigt^[2]. Die HypE-Untereinheit dieses ternären Komplexes akzeptiert die von HypF übertragene Carbamoylgruppe und transferiert sie auf den HypC×HypD-Subkomplex. Daraus kann die Existenz eines transient gebildeten quaternären Komplexes aus HypF, HypE, HypC und HypD gefolgert werden (Abb. 1A).

Gereinigtes Hilfsprotein HypD wurde über EPR und Mössbauer-Spektroskopie als Fe-S-Protein charakterisiert, das ein unüblich koordiniertes, redox-aktives [4Fe-4S] Zentrum trägt^[2]. Da nur aus anaerob gezogenen Zellen isolierter HypC×HypD-Komplex die CN-Gruppe akzeptiert, wird angenommen dass das [4Fe-4S] Zentrum Elektronen für die CN-Koordination bereitstellt.

Unser aus *in vivo*-Versuchen zum Transfer der CN-Gruppe abgeleitetes Modell postuliert, dass die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe am HypC×HypD-Komplex vorsynthetisiert und auf den Vorläufer der großen Untereinheit übertragen wird (Abb. 1A).

Das orthologe Proteinpaar HybF/HypA wurde als Zn-Protein charakterisiert, das Nickel bindet und in die große Untereinheit zusammen mit HypB einbaut und damit den

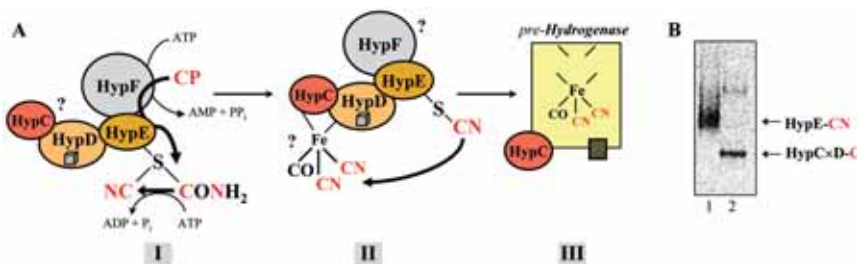


Abb. 1: Arbeitsmodell und Autoradiographie zur Übertragung der Cyanidgruppe. (A) Gerüstkomplex aus den Proteinen HypC, HypD, HypE und HypF zur Ligandensynthese; die Carbamoylgruppe von Carbamoylphosphat (CP) wird durch das Hilfsprotein HypF auf das C-terminale Cystein des HypE-Proteins übertragen und dort zum Cyanid dehydratisiert (I). Es folgt der Transfer der Cyanid-Gruppe auf den HypC×HypD-Subkomplex (II), wobei das komplette $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Zentrum an diesem Komplex vorsynthetisiert und anschließend auf den Vorläufer der großen Untereinheit der Hydrogenase übertragen wird (III). Der Kubus im HypD-Protein stellt das [4Fe-4S]-Zentrum dar. (B) Autoradiographie der *in vitro*-Markierung des HypE-Proteins durch HypF, [¹⁴C]-CP und ATP (Spur 1). Nach Zugabe des HypC×HypD-Komplexes (Spur 2) verschwindet die Radioaktivität von HypE und wird am HypC×HypD-Komplex detektierbar.



Melanie Blokesch

(Jahrgang 1976) studierte Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Die Diplomarbeit von 1999 bis 2000 unter

Leitung von August Böck, LMU München, befasste sich mit der „Rolle des chaperonartigen Proteins HybG bei der Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*“; sie promovierte 2004 ebenfalls dort. Seit Februar 2005 ist sie Post-Doc bei Gary Schoolnik an der Stanford Universität, USA.

Was war Ihr schönstes Erlebnis während der Doktorarbeit?

Melanie Blokesch: Am lustigsten waren unsere „Paper-Sekt“-Feiern, am schönsten war die Erleichterung nach dem Rigorosum.

Wann hätten sie am liebsten alles hingeschmissen? Nach jedem hundersten Western Blot, aber ernsthaft kam das nie in Frage.

Was werden Sie mit dem Preisgeld unternehmen? Mir einen langersehten Traum erfüllen: die Teilnahme an einem Verhaltenskurs über Haie geleitet von Dr. Erich Ritter.

Wie erträumen Sie sich ihr Leben in zehn Jahren? C4-Professorin in Deutschland/Schweiz, 20 Doktoranden, die für mich arbeiten, und selbst beim Tauchen auf den Galapagosinseln.

Welche Tipp haben Sie für künftige Promotionspreis-Bewerber?

Ende gut, alles gut.

(stö)

Vorläufer für die terminale proteolytische Reifung bereitet^[3].

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Böck für seine kontinuierliche Unterstützung und sein Vertrauen.

Literatur

- [1] Blokesch, M., Böck, A. (2002): *J. Mol. Biol.* 324: 287–96.
- [2] Blokesch, M., Albracht, S.P.J., Matzanke, B.F., Drapal, N.M., Jacobi, A., Böck, A. (2004): *J. Mol. Biol.* 344: 155–67.
- [3] Blokesch, M., Rohmoser, M., Rode, S., Böck, A. (2004): *J. Bacteriol.* 186: 2603–11.

Korrespondenzadresse:

Dr. Melanie Blokesch
Schoolnik Lab
School of Medicine
Beckman Center, B237
279 Campus Drive
Stanford, CA 94305, USA
Tel: +1 650 723 7026
Blokesch@stanford.edu