



Bärbel Friedrich

Wasserstoff : eine früh verfügbare Energiequelle der biochemischen Evolution

(Vortrag in der Sitzung der biowissenschaftlich-medizinischen Klasse
am 18. Mai 1995)

In: Berichte und Abhandlungen / Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften
(vormals Preußische Akademie der Wissenschaften) ; 4.1997, S. 9-22

Persistent Identifier: [urn:nbn:de:kobv:b4-opus-29681](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:b4-opus-29681)

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (cc by-nc-sa 4.0) Licence zur Verfügung gestellt.



Bärbel Friedrich

Wasserstoff: eine früh verfügbare Energiequelle der biochemischen Evolution

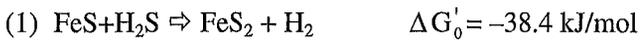
*(Vortrag in der Sitzung der biowissenschaftlich-medizinischen Klasse
am 18. Mai 1995)*

1 Einführung

Der biologischen Evolution ging vor etwa 4,5 Milliarden Jahren eine chemische Evolution voraus. Diese hat sich in einer, anoxigenen, d. h. weitgehend sauerstofffreien Umgebung vollzogen, in der neben Wasser die gasförmigen Verbindungen Methan, Kohlendioxid, Stickstoff, Ammoniak, Kohlenmonoxid und Wasserstoff sowie beträchtliche Mengen an Sulfiden vorhanden waren. Es herrschten hohe Temperaturen, und es ist allgemein anerkannt, daß unter diesen reduzierenden Bedingungen, katalysiert durch Sonnenlicht, elektrische Entladung und vulkanische Aktivitäten, biochemisch wichtige Moleküle wie Zucker, Aminosäuren, Nucleinsäuren, Fettsäuren und deren Polymere entstehen konnten. Diese „Ursuppentheorie“ wurde im Laboratorium experimentell gestützt (Dickerson, 1985). Skeptiker bezweifeln freilich, daß die Konzentration der Stoffe in wässriger Lösung unter den natürlichen Gegebenheiten für eine effiziente Polymerensynthese ausgereicht haben könnte, zumal die Bildung von Proteinen und Nucleinsäuren auf Dehydratisierungsreaktionen beruht. Der Münchener Chemiker und Patentanwalt Günter Wächtershäuser hat diesen Widerspruch aufgegriffen (Wächtershäuser, 1992) und das Konzept von der biochemischen Evolution überzeugend durch folgende Postulate modifiziert:

- Die Biomoleküle sind nicht durch spontanes Zusammenlagern in einer „präbiotischen Suppe“ entstanden, sondern sie haben sich durch Synthese an positiv geladenen, relativ dehydrierten Oberflächen gebildet, an denen die negativ geladenen monomeren Ausgangsmoleküle akkumulieren.
- Pyrit (FeS_2) wird als Matrix für den zweidimensionalen Syntheseprozess favorisiert, der elementare Stoffwechselzyklen und schließlich primitive Zellstrukturen hervorgebracht haben könnte.

- Die Annahme, daß der chemolithoautotrophe Stoffwechsel auf der urzeitlichen Eisen-Schwefel-reichen Erde zuerst entstanden ist, wird überzeugend begründet. Tatsächlich ist die chemolithoautotrophe Lebensweise typisch für eine Vielzahl hyperthermophiler Archaea, die, phylogenetischen Kenntnissen folgend, sehr frühen Ursprungs sind. Sie besitzen die Fähigkeit, bei Temperaturen über 80 °C zu wachsen und aus der mit Wasserstoff getriebenen Reduktion von Schwefel (S⁰) Energie zu gewinnen (Lithotrophie), die sie nutzen, um Kohlendioxid über den reduktiven Tricarbonsäure-Zyklus in Zellsubstanz zu fixieren (Autotrophie).
- Das Evolutionskonzept gewinnt durch eine weitere Beobachtung an Aussagekraft; die Entstehung von Pyrit ist exergon:



Die Reaktion liefert also Energie und könnte die oben genannten chemischen Synthesen batterieartig katalysieren.

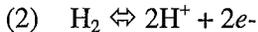
In Übereinstimmung mit diesen Thesen ergibt sich die plausible Schlußfolgerung, daß der bei der Pyritbildung freigesetzte Wasserstoff frühen Lebewesen als eine urtümliche Energiequelle gedient haben könnte. Ein einfacher Energiemetabolismus, der nur drei enzymatisch beschleunigte Reaktionen einschließt, ist wie folgt denkbar: Wasserstoff wird an einer biologischen Membran durch das Enzym Hydrogenase in Protonen und Elektronen gespalten. Letztere werden von einem zweiten elektronenakzeptierenden Redoxprotein, der Schwefel-Reduktase, aufgenommen und zur Reduktion von Schwefel genutzt. Das entstehende H₂S fließt nach Gleichung 1 in den Reaktionsprozeß der Pyritbildung zurück. Der aufgebaute Protonengradient wird von einer primitiven ATPase mit der Synthese von ATP gekoppelt. Damit ist Wasserstoff nicht nur für unsere heutige industrialisierte Gesellschaft ein attraktiver, da umweltverträglicher Energieträger, sondern wäre bereits von einer Gruppe frühzeitlicher Lebewesen erfolgreich als biologisch verwertbare Energiequelle erschlossen worden.

Im folgenden möchte ich an einem Modell, das in der eigenen Arbeitsgruppe erforscht wird, die bisher bekannten Voraussetzungen beschreiben, die für die Biogenese und Funktion eines H₂-umsetzenden Biokatalysators, genannt Hydrogenase, erfüllt sein müssen.

2 Verbreitung und Eigenschaften von Hydrogenasen

Vor etwa 65 Jahren beschrieben Stephenson und Stickland (1931) Bakterien, die Wasserstoff zu bilden oder zur Reduktion physiologischer bzw. artifizieller Ak-

zeptoren zu nutzen vermögen. Diese Organismen verfügen über das Enzym Hydrogenase und katalysieren folgende reversible Reaktion:



Hydrogenasen sind ubiquitär (Wu/Mandrand, 1993) und in allen drei Entwicklungslinien des phylogenetischen Stammbaums anzutreffen, den Bacteria, Archaea und Eukarya. In nahezu allen Gruppen der Bacteria, auch Eubakterien genannt, gibt es hydrogenasehaltige Organismen. Darunter befinden sich Gram-positive und Gram-negative, Phototrophe sowie die hyperthermophilen Vertreter *Aquifex pyrophilus* und *Hydrogenobacter thermophilus*. Die beiden letztgenannten bilden den tiefsten Verzweigungspunkt des phylogenetischen Stammbaums der Bacteria, was die These stützt, daß Hydrogenasen frühe Bausteine der Evolution sind. Damit im Einklang steht die Präsenz dieser Enzyme in methanogenen und hyperthermophilen, schwefelabhängigen Archaea. Prominentester Vertreter ist *Pyrodicticum* mit einem Temperaturoptimum von 105 °C. Unser Wissen über Hydrogenasen in Repräsentanten der nuklearen Domäne, der Eukarya, ist noch sehr begrenzt. Nachweislich sind Hydrogenasen in Algen gefunden worden. Interessant ist die Erkenntnis, daß energieliefernde Systeme jüngeren Ursprungs, z. B. die mitochondriale NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Complex I), Strukturelemente von Hydrogenasen enthalten (Friedrich/Weiss, 1996).

In den 70er Jahren wurden durch physiologische Studien, Isolierung und biochemische Charakterisierung von Hydrogenasen umfangreiche Daten über Funktion, Zusammensetzung und katalytische Eigenschaften dieser Enzymfamilie gewonnen (Schlegel/Schneider, 1985). Neue Erkenntnisse über deren molekularen und atomaren Aufbau sowie den Katalyse-Mechanismus lieferten molekularbiologische Arbeiten, begleitet von Röntgenstrukturanalysen und spektroskopischen Untersuchungen (Voordouw, 1992; Volbeda et al. 1995; Albracht, 1995). Hydrogenasen katalysieren die in Gleichung 2 dargestellte Reaktion und werden aufgrund ihres Metallgehaltes in zwei Hauptgruppen klassifiziert:

- nur Eisen-enthaltende [Fe]-Hydrogenasen. Sie sind in strikt anaeroben Organismen anzutreffen und durch extreme Sauerstoffempfindlichkeit gekennzeichnet.
- Eisen- und zusätzlich Nickel-enthaltende [NiFe]-Hydrogenasen. Nickelionen sind für die katalytische Aktivität dieser am weitesten verbreiteten sauerstofftoleranten Enzyme essentiell. Eine Variante der Klasse 2, [NiFeSe]-Hydrogenase, enthält außerdem Selen und kommt sowohl in sulfatreduzierenden Bacteria als auch in methanogenen Archaea vor.

Interessant ist das Auftreten multipler Hydrogenasen in einem einzigen Organismus. Diese Isoenzyme unterscheiden sich häufig in Zusammensetzung und/oder Funktion. So besitzt das Enterobakterium *Escherichia coli* drei [NiFe]-Hydro-

genasen, von denen eine H_2 freisetzt und zwei H_2 oxidieren. Das methanogene Bakterium *Methanococcus voltae* enthält die genetische Information zur Bildung von vier Hydrogenasen: zwei [NiFe]- und zwei [NiFeSe]-Enzyme, die sich jeweils in ihrer Elektronenakzeptorspezifität unterscheiden. Gleiches trifft für die zwei [NiFe]-Hydrogenasen des Gram-negativen Bakteriums *Alcaligenes eutrophus* zu, von denen eines NAD^+ als Akzeptor nutzt und direkt mit H_2 reduziert. Schließlich sind in Sulfatreduzenten der Gattung *Desulfovibrio* alle drei Typen von Hydrogenasen vereint (Wu/Mandrand, 1993).

Die erste und bisher einzige dreidimensionale Struktur einer Hydrogenase wurde 1995 von einer französischen Gruppe publiziert (Volbeda et al., 1995). Sie gab am Beispiel des periplasmatischen Enzyms aus *Desulfovibrio gigas* einen Einblick in den atomaren Aufbau einer Standard-[NiFe]-Hydrogenase, wie sie in Abb. 1 schematisch dargestellt ist. Obgleich das H_2 -aktivierende Zentrum noch nicht vollständig aufgelöst werden konnte, lassen die Daten in Verbindung mit zwischenzeitlich erzielten Strukturverfeinerungen und infrarotspektroskopischen Analysen (Albracht, 1995) folgende Aussagen zu:

- Das aktive Zentrum ist binuklear, d. h. es besteht aus Ni- und Fe-Atomen, die über vier bzw. zwei cysteinstämmige Thiolgruppen mit dem Protein verknüpft sind. Ein Paar dieser Schwefelliganden überbrückt die beiden Metalle.
- Die zunächst in der Kristallstruktur als H_2O gedeuteten nicht-proteingebundenen Moleküle am Eisenatom sind spektroskopischen Erkenntnissen zufolge ungewöhnliche diatomare CO- bzw. CN-Liganden. Damit ist ein völlig neues redoxaktives Metallzentrum entdeckt worden.

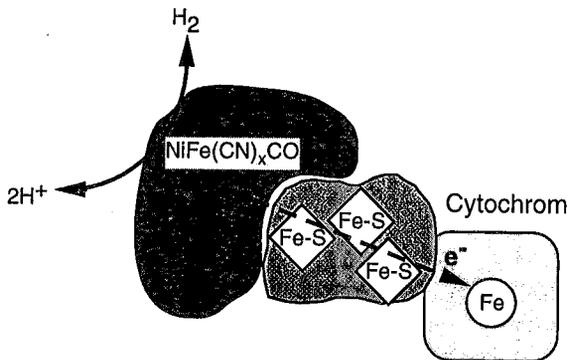


Abb. 1
Struktur einer Standard-[NiFe]-Hydrogenase
[modifiziert nach Volbeda et al., 1995]

- Die kleine elektronentransferierende Untereinheit der Hydrogenase verfügt über eine breite Kontaktfläche zur großen Untereinheit, so daß das [NiFe]-Zentrum tief im Innern des oligomeren Proteins verborgen ist. Drei [Fe-S]-Cluster sind in der kleinen Untereinheit aneinandergereiht und sind wahrscheinlich am Elektronentransfer vom katalytischen Zentrum auf den Primärakzeptor, in diesem Fall ein Cytochrom *c*, beteiligt.

3 Das H₂-oxidierende Enzymsystem in *Alcaligenes eutrophus*

Molekulare Untersuchungen an chemolithoautotrophen Archaea sind gegenwärtig nur sehr begrenzt möglich, da das erforderliche experimentelle Instrumentarium noch lückenhaft ist. Um den Katalysemechanismus, die Bildung aktiver Hydrogenase sowie die Regulation der daran mitwirkenden Komponenten auf molekularer Ebene aufzuklären, wählten wir das chemolithoautotrophe Bakterium *Alcaligenes eutrophus* als Modell. Es gehört zur größten, physiologisch diversen Gruppe der Purpur- oder Proteobakterien und ist leicht kultivierbar. *A. eutrophus* wächst bei mittleren Temperaturen (30–37 °C) fakultativ chemolithoautotroph, d. h. der Organismus verwertet neben H₂ und CO₂ eine Vielzahl von organischen Substraten chemoorganoheterotroph und nutzt neben Sauerstoff auch Nitrat bzw. Nitrit als terminalen Elektronenakzeptor der Atmung. Aufbauend auf breiten Kenntnissen der Physiologie und Biochemie der H₂-Oxidation (Bowien/Schlegel, 1981; Schlegel/Schneider, 1985), entwickelten wir für *A. eutrophus* ein genetisches System und erkannten im Verlauf dieser Studien die essentielle Funktion von Nickelionen für die Bildung aktiver Hydrogenase (Friedrich/Friedrich, 1990). Der aktuelle Kenntnisstand über die Struktur und Funktion der beiden [NiFe]-Hydrogenasen in *A. eutrophus* ist in einem Modell veranschaulicht (Abb. 2).

Der Organismus besitzt eine membrangebundene Hydrogenase (MBH), die in ihrer dimeren Form der in Abb. 1 beschriebenen Standard-Hydrogenase sehr ähnlich ist. Anders als das lösliche periplasmatische Enzym aus *D. gigas* koppelt die MBH nicht mit Cytochrom *c*, sondern ist auf der periplasmatischen Seite über ein Cytochrom *b*-artiges Protein fest mit der Membran verankert (Bernhard et al., 1996). Dieser Membrananker dient sehr wahrscheinlich gleichzeitig als primärer Elektronenakzeptor und leitet die Elektronen über Komponenten der Atmungskette auf Sauerstoff. Verbunden ist dieser Prozeß mit der Errichtung eines Protonengradienten und der Konservierung biochemischer Energie in Form von ATP. Die Entfernung des Cytochrom *b*-ähnlichen Proteins durch Ausschaltung des dafür kodierenden Gens, unterbricht den Elektronenfluß vom Wasserstoff zum Sauerstoff. Das weiterhin mit künstlichen Elektronenakzeptoren reagierende

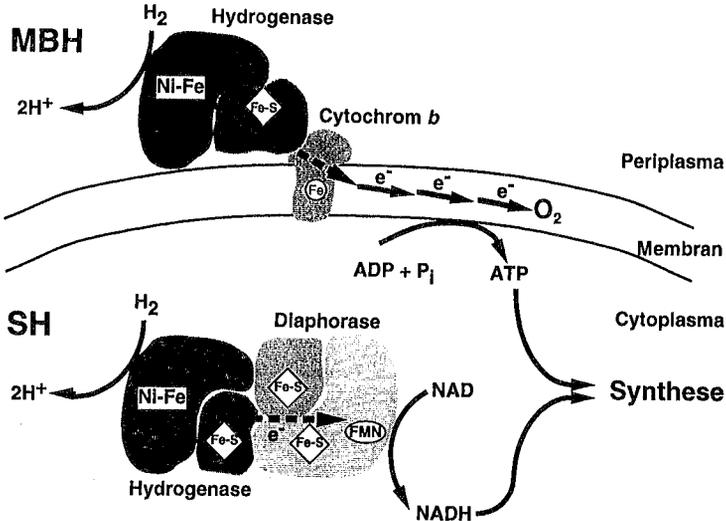


Abb. 2

Zusammensetzung und Funktion zweier [NiFe]-Hydrogenasen in *A. eutrophus*

MBH-Mutantenenzym ist erwartungsgemäß nicht mehr membrangebunden, sondern löslich und im periplasmatischen Raum der Zelle lokalisiert.

Die lösliche Hydrogenase (SH) in *A. eutrophus* ist ein cytoplasmatisches Enzym. Sie besteht aus zwei heterologen Komponenten, dem Hydrogenase- und dem Diaphorase-Dimer (Abb. 2). Das Hydrogenase-Dimer zeigt Ähnlichkeit zu der Standard-Hydrogenase (Abb. 1), auffällig ist jedoch eine Verkürzung der elektronentransferierenden Untereinheit, die anzeigt, daß die Elektronen auf einen anderen Akzeptor fließen. Die Verbindung zu diesem Endakzeptor (NAD^+) wird durch Assoziation mit dem Flavin- und [Fe-S]-haltigen Diaphorase-Dimer hergestellt. Dieser Teil der SH vermittelt NADH-Oxidoreduktase-Aktivität und zeigt bemerkenswerte Homologien zu drei peripheren Untereinheiten der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Complex I) aus Mitochondrien und bakteriellen Species (Friedrich/Weiss, 1996). Die Verwandtschaft von Hydrogenasen und Complex I wird darüber hinaus auch beim Vergleich des membranständigen Anteils mit dem Hydrogenase-Dimer sichtbar und deutet darauf hin, daß beide Enzyme einen gemeinsamen Ursprung haben.

Die SH versorgt bei Wachstum auf H_2 die Zellen vornehmlich mit Reduktionsäquivalenten (NADH) für Biosynthesen. Mutantenstudien zeigten jedoch, daß die physiologische Funktion der beiden Enzyme austauschbar ist, d. h. der Ausfall der MBH wird durch die SH kompensiert und umgekehrt. Die SH weist interessante Eigenschaften auf, die sie von den Standard-[NiFe]-Hydrogenasen abheben. Ur-

sprünglich war dieser Enzymtypus rar und außer in *Alcaligenes* Species nur in dem Gram-positiven *Rhodococcus erythropolis* (früher als *Nocardia opaca* bezeichnet) gefunden worden. Inzwischen mehren sich die Befunde, daß insbesondere Cyanobakterien über SH-homologe Hydrogenasen verfügen (Friedrich/Schwartz, 1993).

Durch einen molekulargenetischen Ansatz wurden weitergehende Informationen über die Beschaffenheit des katalytischen Zentrums und den Reaktionsmechanismus der SH aus *A. eutrophus* gewonnen. Hierbei konzentrierten wir uns zunächst auf die Analyse der H₂-aktivierenden Untereinheit HoxH (Abb. 2). Durch Nucleinsäuresequenzierung liegen inzwischen über 30 Primärsequenzen von [NiFe]-Hydrogenasen in Datenbanken vor. Ein multipler Vergleich führte zur Definition einer Konsensussequenz (Voordouw, 1992), die vier typische Elemente aufweist, die auch in der HoxH Untereinheit anzutreffen sind (Abb. 3). Durch gerichtete Mutagenese wurden die in Abb. 3 gekennzeichneten Aminosäurereste der Elemente 1 und 4 von HoxH ausgetauscht. Die resultierenden Mutantenproteine wurden auf ihre katalytischen Eigenschaften, den Nickelgehalt und ihre oligomere Struktur geprüft (Abb. 3).

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen:

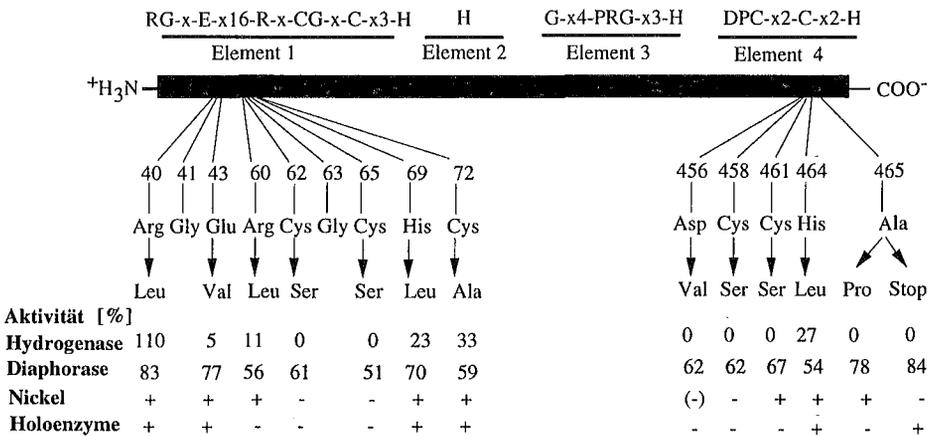


Abb. 3

Isolierung und Eigenschaften von SH Mutantenzymen durch Aminosäureaustausch

- Der Austausch der beiden N- und C-terminalen Cysteinpaare, die als Koordinationspunkte des binuklearen Metallzentrums gelten, hat einen vollständigen Verlust der H₂-Aktivierung zur Folge, gleichwohl bleibt die durch den Diphoraseteil katalysierte NADH-Oxidoreduktase-Aktivität erhalten. In drei der vier Mutantenproteine ist Nickel nicht mehr detektierbar, was die Metallkoordinationsfunktion dieser Aminosäuren stützt. Außerdem findet keine vollständige Assemblierung der Untereinheiten zum oligomeren Holoenzym statt, was für gravierende strukturelle Veränderungen infolge der Mutationen spricht.
- Auch die übrigen Aminosäureaustausche (die beiden endständigen werden später diskutiert) vermindern – mit Ausnahme von Arg40 – die H₂-aktivierende Funktion der SH beträchtlich. Anders als in der erstbeschriebenen Mutantengruppe, scheinen die Mutationen jedoch keinen Einfluß auf die Nickelbindung zu haben und in einigen Fällen sogar die Bildung des Holoenzym zuzulassen. Wir verfolgen die Hypothese, daß in diesen Isolaten der Protonenfluß blockiert ist. Um weitere Einblicke in die Mutantenproteine zu erhalten, werden derzeit mit Kooperationspartnern spektroskopische Analysen (ESR und FTIR) an z. T. gereinigten Proteinen durchgeführt, und es laufen Experimente zur Kristallisation der SH, über deren Erfolg noch keine Prognosen gemacht werden können.

4 Die Synthese aktiver Hydrogenase impliziert eine Serie posttranslationaler Schritte

Die hohe Komplexität des H₂-spaltenden Zentrums war unerwartet. Einen wahrlich verblüffenden Grad an Komplexität förderten genetische Studien zutage, die auf die Entschlüsselung der Hydrogenasebiosynthese abzielten. Diese Untersuchungen wurden vornehmlich an *Escherichia coli* (Maier/Böck, 1996) und einigen anderen Vertretern der Proteobakterien durchgeführt. In meinen Ausführungen beschränke ich mich weitgehend auf den von uns bearbeiteten Modellorganismus *A. eutrophus*.

Die genetische Information zur Bildung der beiden [NiFe]-Hydrogenasen ist in *A. eutrophus* auf einem Riesenplasmid verankert, dessen Größe (450 kb) etwa einem Zehntel des *E. coli* Chromosoms entspricht. Dieses Plasmid ist durch Zellkontakt konjugativ auf Empfängerzellen übertragbar. Inzwischen wurden mehr als 30 Hydrogenase-spezifische Gene in einer 80 kb umfassenden DNA Region auf dem Plasmid pHG1 lokalisiert (Friedrich/Schwartz, 1993). Die Strukturgene der SH und der MBH flankieren beidseitig den Hydrogenase (*hox*) Genbereich (Abb. 4). Sie sind jeweils assoziiert mit einer wechselnden Zahl sogenannter akzessorischer Gene, die für Hilfsproteine codieren. Obgleich die konkrete

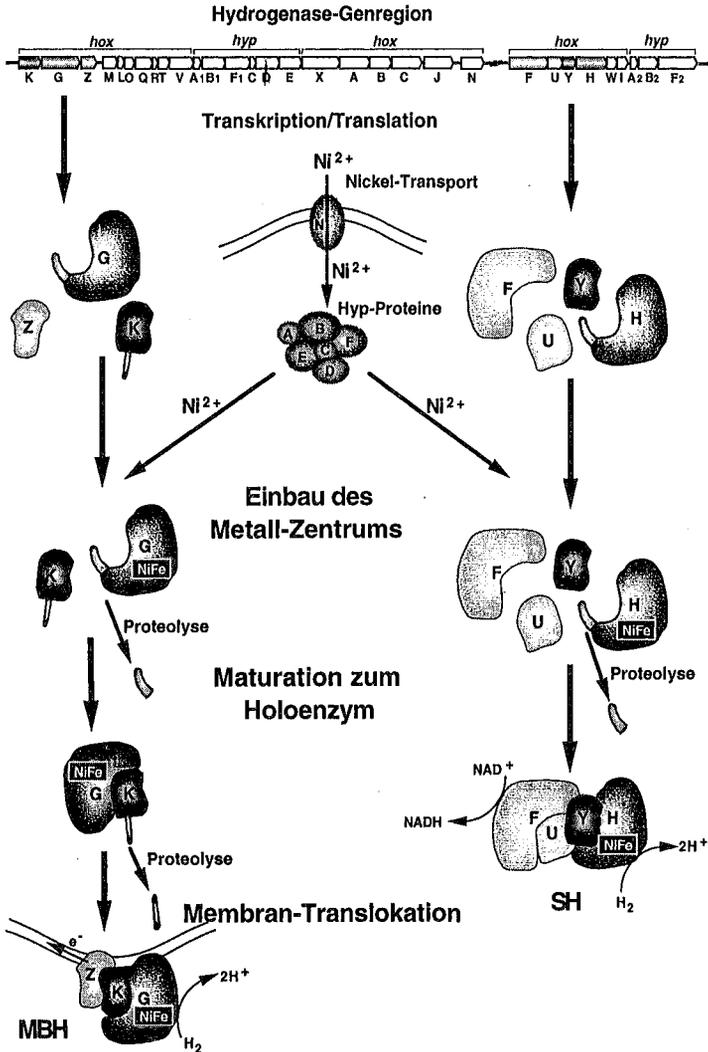


Abb. 4

Modell der Biogenese von [NiFe]-Hydrogenase am Beispiel der NAD⁺-reduzierenden (SH) und der membranengebundenen Hydrogenase (MBH) aus *A. eutrophus*

Reaktionsweise dieser Proteine noch weitgehend ungelöst ist, weisen Mutantanalysen darauf hin, daß sie eine besondere Aufgabe bei der Synthese katalytisch aktiver Hydrogenasen spielen (Friedrich/Schwartz, 1993). Dieser Weg wird nachfolgend kurz referiert:

Dem essentiellen Bedürfnis für Nickelionen bei der H_2 -Spaltung begegnet der Organismus durch Entwicklung eines aus mehreren Komponenten bestehenden Metallversorgungssystems, das gleichermaßen beiden Hydrogenasen dient. Mutationen in diesen Genen wirken demzufolge pleiotrop, d. h. sie beeinträchtigen sowohl die SH- als auch die MBH-Aktivität. Im zentralen Teil des Hydrogenase-Genkomplexes wurden mindestens vier regulatorische Komponenten identifiziert. Sie vermitteln die Fähigkeit, äußere Reize, z. B. die Gegenwart von Wasserstoff, zu sensieren und das Signal auf die Ebene der Genexpression zu transduzieren. Somit werden die in mehreren Transkriptionseinheiten organisierten Hydrogenasegene koordiniert an- und abgeschaltet; das Resultat ist ein funktionstüchtiges Regulon (Lenz et al., 1997). Die Transkriptionskontrolle des Systems wurde in dem Vortrag nur kurz gestreift und wird hier nicht weiter dokumentiert, da dies den Rahmen der Abhandlung sprengen würde.

Abb. 4 veranschaulicht die einzelnen Abschnitte der Hydrogenasebildung, die nach Transkription der Hydrogenasegene und Translation der mRNA ablaufen, bzw. in Vorbereitung auf die Proteinmaturation erfolgen:

- Um die Versorgung der Hydrogenasen mit Nickelionen zu gewährleisten, bildet *A. eutrophus* neben den allgemeinen Metallaufnahmesystemen eine sehr spezifisch wirkende Nickel-Permease (Eitinger/Friedrich, 1991). Dieses wahrscheinlich aus acht α -Helices bestehende integrale Membranprotein katalysiert die Aufnahme von Nickelionen mit ungewöhnlich hoher Affinität. Inzwischen wurden weitere Permeasen dieses Typs in anderen Bakterien identifiziert, und laufende Untersuchungen von T. Eitinger und Mitarbeitern konzentrieren sich auf die Frage, durch welche strukturellen Merkmale die spezifische Erkennung von Nickelionen vermittelt wird und wie der Transportprozeß im Detail abläuft.
- Nickelionen sind zwar essentiell für das Wachstum mit Wasserstoff, gleichzeitig wirken diese Metallionen toxisch auf die Lebensvorgänge in der Zelle, wie dies auch für höhere Organismen – den Menschen eingeschlossen – bekannt ist (Hausinger, 1987). *A. eutrophus* und andere H_2 -Oxidierer scheinen das Dilemma zwischen Notwendigkeit und Übel dahingehend zu lösen, indem sie die Nickelionen nach Eintritt ins Cytoplasma an speziell dafür bereitgestellte Proteine binden. Diese Hyp Proteine, von denen drei in *A. eutrophus* als doppelte Genkopien vorliegen, bilden vermutlich einen Komplex. Sie weisen interessante Strukturmerkmale auf (Dernedde et al., 1996). So enthalten HypB und HypF bis zu 15 eng aneinandergereihte Histidin-Reste, die potentiell Metallkomplexierungseigenschaften besitzen. Außerdem treten in vier der sechs Hyp Proteine alternierende Cysteinmotive auf, die typische Metallbindungsdomänen signalisieren. Die mutagene Inaktivierung der einzelnen *hyp* Gene hat zur Folge, daß beide Hydrogenasen zwar gebildet werden, gleichwohl katalytisch inaktiv sind, da ihnen Nickel fehlt. Das bedeutet, die Präsenz der Hyp Proteine

ist für den spezifischen Einbau von Nickelionen essentiell. Ob und inwieweit die Hyp Proteine auch bei der Assemblierung von Eisen und den umgebenden diatomaren Liganden mitwirken, ist derzeit noch unbekannt.

- Der Metallassemblierung folgt ein ungewöhnlicher Maturationschritt, bei dem durch jeweils spezifische Proteasen mindestens 15 Aminosäuren vom carboxy-terminalen Ende der H₂-aktivierenden Untereinheit entfernt werden. Im Falle der SH wurde durch Proteinsequenzierung die Prozessierungsstelle exakt zwischen His 464 und Ala 465 bestimmt (Abb. 3) und *in vitro* die Beteiligung des akzessorischen Genproduktes HoxW an der Konversion des Vorläufers in die mature Form gezeigt (Thiemermann et al., 1996). Ähnliche Befunde an anderen Hydrogenasen (Vignais/Toussaint, 1994; Maier/Böck, 1996) sprechen für die Gesetzmäßigkeit dieses Prozesses bei der Biosynthese von [NiFe]-Hydrogenasen. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß die C-terminale Extension das Polypeptid in einer Metallaufnahme-kompetenten Konformation hält. Molekulargenetische Befunde stützen diese Hypothese. So akkumulieren Metalleinbau-geschädigte Hyp Mutanten die Vorläuferform (Dernedde et al., 1996), während ein durch gezielte Mutation artifiziell verkürztes Polypeptid kein Nickel assembliert, wohl aber zum inaktiven Holoenzym oligomerisiert (Abb. 3). Dieses Mutantenprotein ist ein interessantes Untersuchungsobjekt für weitergehende Analysen des katalytischen Zentrums; hierbei interessiert insbesondere die Frage, ob der Eiseneinbau und die Verknüpfung der diatomaren Liganden in diesem Protein noch stattfinden.
- Der Grad der Komplexität wächst im Falle der MBH-Biogenese durch Translokation und Verankerung des Enzyms mit der Membran. Diese Schritte schließen den bisher beschriebenen Maturationsprozeß ab (Abb. 4). Mutantenproteine, die im Metalleinbau oder der C-terminalen Proteolyse getroffen sind, werden nicht über die Membran exportiert. Für die Translokation beider MBH Untereinheiten ist eine ungewöhnlich lange, in diesem Fall 47 Aminosäuren umfassende Signalsequenz in der kleinen Untereinheit verantwortlich. Wird sie durch Mutagenese entfernt, verbleiben beide Untereinheiten im Cytoplasma. Die große H₂-aktivierende Untereinheit ist frei von einem N-terminalen Signalpeptid (Bernhard et al., 1996). Die vorliegenden Resultate deuten auf eine gemeinsame Translokation beider Untereinheiten in einem zumindest partiell gefalteten Zustand. Damit weicht die Hydrogenase von dem allgemeinen Proteinsekretionsmodell ab. Es mehren sich Hinweise, daß auch andere cofaktorhaltige Proteine einen besonderen Weg der Translokation durchlaufen (Berks, 1996). Deshalb wird die weitere Analyse der MBH-spezifischen akzessorischen Proteine von Interesse sein (Abb. 4); sie könnten u. a. einen besonderen Sekretionsapparat darstellen.

5 *Schlußbemerkungen*

Um das simpelste Substrat auf Erden, molekularen Wasserstoff, als biologische Energiequelle zu erschließen, bedarf es eines aufwendig strukturierten enzymatischen Katalysators, dessen Synthese eine Vielzahl posttranslationaler Schritte umfaßt. Haben die Ausführungen über die komplexe Zusammensetzung und Biogenese der [NiFe]-Hydrogenasen die ursprünglich geweckte Erwartung, es könne sich um ein besonders primitives energielieferndes System handeln, entkräftet? Oder aber repräsentiert das hier vorgestellte Beispiel, das zumindest in der Gruppe der Proteobakterien hochgradig konserviert zu sein scheint, ein besonders weit entwickeltes System?

Die molekularen Erkenntnisse über Aufbau und Wirkungsweise von [NiFe]-Hydrogenasen aus methanogenen Archaea widersprechen dieser Annahme, z. B. weist die kürzlich publizierte genomische Sequenz von *Methanococcus jannaschii* neben Hydrogenase-Strukturgenen auch die für den Metalleinbau typischen akzesorischen Genprodukte auf (Bult et al., 1996). Es verbleibt die Möglichkeit, daß die ersten Hydrogenasen nur Eisen, also kein Heterometall, enthielten. Das würde sie zwar sauerstofflabil machen, aber in der anoxygenen urzeitlichen Atmosphäre dürfte Sauerstoff keine Barriere gewesen sein. Derzeit gibt es kaum molekulare Untersuchungen über [Fe]-Hydrogenasen; allerdings deuten die biochemischen Studien auf die Existenz eines ebenfalls komplex strukturierten katalytischen Zentrums hin (Adams, 1990). So dürfen wir gespannt auf die Resultate von molekularbiologischen und biochemischen Studien über Hydrogenasen aus hyperthermophilen Archaea sein, die derzeit in verschiedenen Laboratorien anlaufen; sie könnten eine Antwort auf die hier gestellten Fragen liefern.

Literatur

- Adams, M. W. W. (1990): The structure and mechanism of iron-hydrogenases. In: *Biochim. Biophys. Acta*, 1020, S. 115-145.
- Albracht, S. P. J. (1995): Hydrogenasen: Wasserstoffkatalysatoren aus der Natur. In: *Biospektrum*, 5, S. 42-45.
- Berks, B. C. (1996): A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors. In: *Molec. Microbiol.*, 22, S. 393-404.
- Bernhard, M., Schwartz, E., Rietdorf, J. & B. Friedrich (1996): The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. In: *J. Bacteriol.*, 178, S. 4522-4529.
- Bowien, B. & H. G. Schlegel (1981): Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 35, S. 405-452.

- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. C. et al. (1996): Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannschii*. In: Science, 273, S. 1058-1073.
- Dernedde, J., Eitinger, T., Patenge, N. & B. Friedrich (1996): *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. In: Eur. J. Biochem., 235, S. 351-358.
- Dickerson, R. E. (1985): Chemische Evolution und der Ursprung des Lebens. In: Spektrum der Wissenschaft, Evolution, S. 42-59.
- Eitinger, T. & B. Friedrich (1991): Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high affinity nickel transport gene from *Alcaligenes eutrophus*. In: J. Biol. Chem., 266, S. 3222-3227.
- Friedrich, B. & C. G. Friedrich (1990): Hydrogenases in lithoautotrophic bacteria. In: Codd, G. A., Dijkhuizen, L. & F. R. Tabita (eds.), Advances in Autotrophic Metabolism, Dordrecht: Kluwer, S. 55-92.
- Friedrich, B. & E. Schwartz (1993): Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. In: Annu. Rev. Microbiol., 47, S. 351-383.
- Friedrich, T. & H. Weiss (1996): Modular evolution of the respiratory NADH: ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. In: J. Theoret. Biol., in press.
- Hausinger, R. P. (1987): Nickel utilization by microorganisms. In: Microbiol. Rev., 51, S. 22-42.
- Lenz, O., Strack, A., Tran-Betcke, A. & B. Friedrich (1997): A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species. In: J. Bacteriol., in press.
- Maier, T. & A. Böck (1996): Nickel incorporation into hydrogenases. Mechanism of metallocenter assembly. In: Hausinger, R. P., Eichhorn, G. L. & L. G. Marzilli (eds.), Advances in Inorganic Biochemistry, 11, S. 173-192.
- Schlegel, H. G. & K. Schneider (1985): Microbial metabolism of hydrogen. In: Moo-Young, M. (ed.), Comprehensive Biotechnology, Oxford: Pergamon, S. 439-457.
- Stephenson, M., L. H. Stickland (1931): XXVII Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. The properties of the enzyme. In: Biochem. J., 25, S. 204-214.
- Thiemermann, S., Dernedde, J., Bernhard, M., Schroeder, W., Massanz, C. & B. Friedrich (1996): Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* requires the *hoxW* gene product. In: J. Bacteriol., 178, S. 2368-2374.
- Vignais, P. M. & B. Toussaint (1994): Molecular biology of the membrane-bound H₂ uptake hydrogenases. In: Arch. Microbiol., 161, S. 1-10.
- Volbeda, A. M., Charon, H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & J. C. Fontecilla-Camps (1995): Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. In: Nature, 373, S. 580-587.
- Voordouw, G. (1992): Evolution of hydrogenase genes. In: Advances in Inorganic Chemistry, 38, S. 397-422.
- Wächtershäuser, G. (1992): Groundworks for evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. In: Progress in Biophysics & Molecular Biology, 58, S. 85-202.

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