

**Der Einfluss eines neuartigen  
Fe-S Clusters auf die O<sub>2</sub>-Toleranz der  
membrangebundenen Hydrogenase aus  
*Ralstonia eutropha***

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Tobias Goris

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Hermann

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Bärbel Friedrich

2. Prof. Dr. Holger Dobbek

3. Prof. Dr. Wolfgang Lubitz

Datum der Einreichung: 20. Mai 2011

Datum der Promotion: 27. September 2011





Diese Arbeit wurde unter Leitung von Professor Dr. Bärbel Friedrich in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Gefördert wurde die Studie aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung im Rahmen des Projekts „BioH<sub>2</sub>, Grundlagen für einen biotechnologischen und biomimetischen Ansatz der Wasserstoffproduktion“.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Goris, T.; Wait, A. F.; Saggi, M.; Fritsch, J.; Heidary, N.; Stein, M.; Zebger, I.; Lenzian, F.; Armstrong, F. A.; Friedrich, B.; Lenz, O. (2011): A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase, *Nat Chem Biol* (Band 7), Nr. 5, S. 310-318.

Lenz, O.; Ludwig, M.; Schubert, T.; Bürstel, I.; Ganskow, S.; Goris, T.; Schwarze, A.; Friedrich, B. (2010): H<sub>2</sub> conversion in the presence of O<sub>2</sub> as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*., *ChemPhysChem* (Band 11), Nr. 6, S. 1107-1109.

Berlin, den

Tobias Goris



## Zusammenfassung

Hydrogenasen sind die zentralen Enzyme im mikrobiellen H<sub>2</sub>-Kreislauf und spielen eine große Rolle bei vielen Stoffwechsellleistungen von Mikroorganismen. Durch ihre Fähigkeit, H<sub>2</sub> zu produzieren und zu spalten, werden sie als vielversprechende Katalysatoren in biologisch basierten H<sub>2</sub>-Technologien angesehen. Ein entscheidender Nachteil vieler Hydrogenasen ist dabei ihre hohe O<sub>2</sub>-Sensitivität. Die membrangebundene Hydrogenase (MBH) aus *Ralstonia eutropha* ist eines der wenigen Beispiele für Hydrogenasen, die auch in Gegenwart von O<sub>2</sub> katalytisch aktiv sind. Die molekularen Ursachen dieser O<sub>2</sub>-Toleranz sind bislang ungeklärt. In bisherigen Studien wurde allerdings lediglich das [NiFe]-Zentrum und dessen Umgebung auf Faktoren untersucht, die die O<sub>2</sub>-Toleranz des Enzyms hervorrufen könnten. In dieser Arbeit wurde daher der Fokus auf die kleine Untereinheit der MBH gelegt, in der sich drei elektronentransferierende Fe-S Cluster befinden. Die ligandierenden Aminosäuren dieser Fe-S Cluster wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese verändert und die resultierenden MBH-Varianten physiologisch und biochemisch, sowie spektroskopisch und elektrochemisch charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass die O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH maßgeblich auf einer Modifikation eines dieser drei Fe-S Cluster beruht. In der direkten Umgebung des zum aktiven Zentrum nächstgelegenen Fe-S Clusters befinden sich sechs statt vier Cysteine, wie in O<sub>2</sub>-sensitiven [NiFe]-Hydrogenasen. Die beiden zusätzlichen Cysteine um dieses proximale Cluster wurden gegen Glycine ausgetauscht, die an der entsprechenden Position in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen zu finden sind. Der Austausch der beiden zusätzlichen Cysteine führte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* zu einer erhöhten O<sub>2</sub>-Sensitivität der MBH. Ferner wurde in EPR-spektroskopischen Untersuchungen beobachtet, dass diese MBH-Variante veränderte elektronische Eigenschaften aufweist. Statt des für O<sub>2</sub>-tolerante Hydrogenasen typischen EPR-Spektrums wurde ein Signal detektiert, welches in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen zu finden ist. Anhand der Ergebnisse wurde ein Modell erstellt, das erklärt, wie eine modifizierte Fe-S Clusterkette zur O<sub>2</sub>-Toleranz von Hydrogenasen beiträgt.

**Schlagworte:**

Hydrogenase, Wasserstoff, Eisen-Schwefel-Cluster, *Ralstonia eutropha*,  
Sauerstofftoleranz

## Abstract

Hydrogenases are essential for H<sub>2</sub> cycling in microbial metabolism and serve as valuable blueprints for H<sub>2</sub>-based biotechnological application. Like many metalloproteins, most hydrogenases are extremely oxygen-sensitive and prone to inactivation by even traces of O<sub>2</sub>. The O<sub>2</sub>-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* is one of the few examples that have established a mechanism enabling H<sub>2</sub> uptake in the presence of ambient O<sub>2</sub>. The molecular mechanisms of this O<sub>2</sub> tolerance are not yet unravelled. However, up to date, only the large subunit harbouring the [NiFe] active site has been in the focus of studies on O<sub>2</sub> tolerance. In the present study, the role of the small subunit with its electron relay, consisting of three Fe-S clusters, was investigated. Amino acid residues involved in coordination of all three clusters were exchanged, and the resulting MBH variants were investigated with physiological, biochemical, electrochemical and spectroscopic methods. It is shown that the rare feature of O<sub>2</sub> tolerance is crucially related to a modification of the electron transfer chain. The Fe-S cluster proximal to the catalytic centre is surrounded by six instead of the four conserved coordinating cysteines. Removal of the two additional cysteines renders the protein O<sub>2</sub>-sensitive *in vivo* and *in vitro*. Electron paramagnetic resonance spectroscopy of this MBH variant revealed a signal resembling the spectrum usually detected in O<sub>2</sub>-sensitive [NiFe]-hydrogenases. The data imply that the major mechanism of O<sub>2</sub> tolerance is based on the reductive removal of oxygenic species guided by the unique architecture of the electron transport chain rather than a restricted access of O<sub>2</sub> to the active site.

**Keywords:**

Hydrogenase, Hydrogen, iron sulfur cluster, oxygen tolerance, Ralstonia  
eutropha

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Hydrogenasen katalysieren die reversible Spaltung von H <sub>2</sub> .....	1
1.2	Hydrogenasen lassen sich in drei verschiedenen Gruppen einteilen .....	2
1.2.1	[FeFe]-Hydrogenasen .....	3
1.2.2	[NiFe]-Hydrogenasen .....	4
1.2.3	[Fe]-Hydrogenasen .....	12
1.3	<i>Ralstonia eutropha</i> besitzt mindestens drei unterschiedliche O <sub>2</sub> -tolerante Hydrogenasen .....	13
1.3.1	Die regulatorische Hydrogenase (RH) fungiert als H <sub>2</sub> -Sensor .....	15
1.3.2	Die lösliche, bidirektionale Hydrogenase ist für die Regeneration von Reduktionsäquivalenten verantwortlich .....	16
1.3.3	Die membrangebundene Hydrogenase (MBH) dient der Energiekonservierung .....	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit: Die Aufklärung der O <sub>2</sub> -Toleranz der MBH aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1	Stämme und Plasmide .....	21
2.2	Nährmedien .....	23
2.3	Zellanzucht und -ernte .....	24
2.4	Wachstumsmessung .....	25
2.5	Stammhaltung .....	25
2.6	Zellaufschluss und Fraktionstrennung .....	26
2.7	Proteinbestimmung .....	27
2.8	Quantitative Bestimmung der Aktivität membrangebundener Hydrogenase mit Methylenblau .....	27
2.9	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE .....	29
2.10	Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel .....	30
2.11	Immunoblot .....	30
2.12	Immunologische Detektion der Proteine .....	30
2.13	Proteinreinigung .....	31
2.14	Test auf H <sub>2</sub> -Produktion von Kolonien auf Agarplatten .....	32
2.15	Standardtechniken für die Arbeit mit Nukleinsäuren .....	33
2.15.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen .....	33
2.15.2	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	33

2.15.3	DNA-Fällung .....	33
2.15.4	DNA-Restriktionsspaltung.....	33
2.15.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	34
2.15.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.15.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
2.15.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
2.15.9	DNA-Präparation .....	35
2.16	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.17	DNA-Sequenzierung .....	37
2.18	Plasmidtransfer.....	37
2.18.1	Transformation.....	37
2.18.2	Konjugation.....	38
2.19	Ortsspezifische Mutagenese nach dem Quikchange-Protokoll.....	39
2.20	Gentechnische Konstruktionen.....	40
2.21	Computerbasierte Methoden .....	42
2.21.1	Geldokumentation und Datenverarbeitung.....	42
2.21.2	Multiple Sequenzvergleiche.....	42
2.21.3	Kladogramm-Erstellung.....	42
2.21.4	Komparative Proteinstrukturmodellierung .....	43
2.22	FTIR-Spektroskopie .....	43
2.23	EPR-Spektroskopie .....	43
2.24	Elektrochemie.....	44
2.24.1	Elektrochemischer Messaufbau .....	44
2.24.2	Elektrodenpräparation.....	45
2.24.3	K <sub>M</sub> -Wert-Bestimmung .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Multipler Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter [NiFe]-Hydrogenasen.....	47
3.2	Austausch des Histidins des distalen Fe-S Clusters der MBH aus <i>Ralstonia eutropha</i> gegen Cystein, Glycin und Alanin.....	52
3.2.1	Biochemische Charakterisierung der am distalen Cluster veränderten MBH-Varianten .....	54
3.2.2	Reinigung der MBH <sup>H187G</sup> aus dem löslichen Extrakt .....	59
3.3	Austausch von Aminosäuren am medialen Cluster.....	60

3.3.1	Physiologische Charakterisierung der am medialen Cluster veränderten Mutanten.....	62
3.3.2	Biochemische Charakterisierung der MBHs mit veränderten Aminosäuren am medialen Cluster .....	62
3.3.3	Die MBH <sup>P242C</sup> lässt sich über Affinitätschromatographie aus der Membran reinigen .....	65
3.4	Der Vergleich von Strukturmodellen des proximalen Clusters offenbart Unterschiede zwischen verschiedenen Hydrogenasen.....	66
3.4.1	Der Austausch von Aminosäuren in der Umgebung des proximalen Fe-S Clusters haben einen Effekt auf das lithoautotrophe Wachstum in Abhängigkeit der O <sub>2</sub> -Konzentration.....	67
3.4.2	Biochemische Charakterisierung der am proximalen Cluster veränderten MBH .....	70
3.4.3	Einfluss der O <sub>2</sub> -Konzentration auf die Synthese der am proximalen Cluster veränderten MBH.....	74
3.4.4	Spektroskopische Charakterisierung der MBH <sup>C19G</sup> und MBH <sup>C19G/C120G</sup> gebunden an die Membran .....	76
3.4.5	Das gereinigte MBH <sup>C19G/C120G</sup> -Dimer offenbart überraschende spektroskopische Eigenschaften.....	82
3.4.6	Elektrochemische Charakterisierung der MBH <sup>C19G/C120G</sup> .....	86
3.4.7	Reinigung der MBH <sup>C19G/C120G</sup> als Trimer.....	95
3.4.8	Der Austausch des Cysteins 17 in Analogie zur Complex I-Untereinheit führte zu Verlust der MBH-Aktivität .....	98
3.5	Eine gerichtete Evolution der MBH? Die Entwicklung eines genetischen Konstrukts zur zufälligen Mutagenese von HoxK.....	101
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>105</b>
4.1	O <sub>2</sub> -tolerante und O <sub>2</sub> -sensitive Hydrogenasen: Wo ist der Unterschied? .....	105
4.2	Der Einfluss des modifizierten proximalen Clusters auf die Eigenschaften der MBH .....	110
4.2.1	Lithoautotrophes Wachstum mit O <sub>2</sub> als Elektronenakzeptor liefert erste Hinweise für den Einfluss der zusätzlichen Cysteine am proximalen Cluster auf die O <sub>2</sub> -Toleranz der MBH .....	110
4.2.2	Die O <sub>2</sub> -Konzentration während der Anzucht hat einen Effekt insbesondere auf MBHs mit verändertem proximalem Cluster .....	113

4.2.3	Die zusätzlichen Cysteine am proximalen Cluster sind verantwortlich für das ungewöhnliche EPR-Signal der MBH im oxidierten Zustand .....	114
4.2.4	MBH <sup>C19G/C120G</sup> lässt sich über Affinitätschromatographie ähnlich effizient wie der Wildtyp reinigen und offenbart überraschende EPR-spektroskopische Eigenschaften.....	117
4.2.5	Die Proteinfilmvoltammetrie bestätigt eine Rolle der zusätzlichen Cysteine bei der O <sub>2</sub> -Toleranz der MBH.....	120
4.3	Die Rolle des medialen und distalen Fe-S Clusters in O <sub>2</sub> -toleranten Hydrogenasen.....	122
4.3.1	Ein Vergleich der Redoxpotentiale der drei Fe-S Cluster zeigt große Unterschiede zwischen verschiedenen [NiFe]-Hydrogenasen .....	125
4.4	Ein Modell der Beeinflussung der O <sub>2</sub> -Toleranz der MBH durch die Fe-S Cluster in der kleinen Untereinheit .....	128
4.5	Ein Modell des proximalen Clusters mit zusätzlichen Cysteinen .....	130
4.5.1	Vorkommen und Funktion von zusätzlichen Cysteinen und Tandemcysteinen bei Fe-S Clustern von anderen Proteinen .....	131
4.5.2	Einflüsse von Aminosäuren auf das Redoxpotential von Fe-S Clustern .....	133
4.5.3	[4Fe-4S] Cluster, die von der Standard-Kubanstruktur abweichen .....	135
4.5.4	Röntgenstrukturanalysen der MBH zeigen die Struktur des proximalen Fe-S Clusters.....	136
4.6	Ein multipler Vergleich der Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen zeigt Unterschiede der Fe-S Clustermotive.....	137
4.6.1	Das Vorkommen der zusätzlichen Cysteine und die O <sub>2</sub> -Toleranz von Hydrogenasen korreliert mit dem Vorhandensein bestimmter akzessorischer Proteine .....	142
4.7	Ausblick: Der biotechnologische Nutzen dieser Arbeit.....	148
<b>5</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>151</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>157</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>185</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>186</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchinonsäure (Bicinchinoic acid)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
bp	Basenpaare
DNase	Deoxyribonuclease I
dNTP	Deoxynucleosid triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Electron paramagnetic resonance
F(G)N	Fruktose- (Glycerol) Minimalsalzmedium
FTIR	Fourier transform infrarot
g	Erdanziehungskraft (9,81 m/s <sup>2</sup> )
HiPiP	Hochpotential-Eisen-Schwefel-Protein (High Potential Iron-sulphur Protein)
IgG	Immunglobulin G
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Inhibitor Konstante
K <sub>m</sub>	Michaelis Konstante
LB	Lysogenische Nährlösung (Lysogenic Broth)
LSLB	Niedrigsalz (Low Salt) LB
MBH	Membranebundene Hydrogenase
NBT	Nitro blau tetrazolium chlorid
n. b.	Nicht bestimmt
OD <sub>x nm</sub>	Optische Dichte bei Wellenlänge x
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RH	Regulatorische Hydrogenase
RT	Raumtemperatur
S	Spin
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulphate)
SH	Lösliche Hydrogenase (Soluble hydrogenase)
SHE	Standardwasserstoffelektrode (Standard hydrogen electrode)
Tat	Twin-arginine translocation
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (Tris-buffered Saline + Tween 20)
Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
UPW	Ultrapures Wasser
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

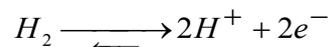




# 1 Einleitung

## 1.1 Hydrogenasen katalysieren die reversible Spaltung von H<sub>2</sub>

Aufgrund ihrer Fähigkeit, H<sub>2</sub> zu spalten (Stephenson und Stickland, 1931) und so Elektronen bereitzustellen und auch die Umkehrreaktion zu katalysieren, spielen Hydrogenasen im mikrobiellen Stoffwechsel eine große Rolle. Auf der einen Seite können die aus der H<sub>2</sub>-Spaltung bereitgestellten Elektronen die sich in der Cytoplasmamembran befindlichen Elektronentransportkette passieren und so Energie in Form von ATP liefern, auf der anderen Seite kann durch die Rückreaktion ein möglicher Überschuss an Reduktionsäquivalenten (z.B. in der Form von NAD(P)H + H<sup>+</sup>, wie es unter anderem bei der Photosynthese entsteht) abgebaut werden. Die Spaltung von H<sub>2</sub> läuft vermutlich heterolytisch (Krasna und Rittenberg, 1954; Niu und Hall, 2001; Pavlov *et al.*, 1998) nach folgender Formel ab.



Auch wenn die meisten Hydrogenasen zumindest *in vitro* in der Lage sind, die Reaktion in beiden Richtungen zu katalysieren, übernehmen dies im mikrobiellen Stoffwechsel in der Regel verschiedene Enzyme.

Hydrogenasen sind weit verbreitete Enzyme, die in vielen Mikroorganismen aller drei Domänen - Archaea, Bacteria und Eukarya - vorkommen (Vignais *et al.*, 2001). Dieses nahezu ubiquitäre Vorkommen wird dadurch erklärt, dass molekularer H<sub>2</sub> durch verschiedene Prozesse, beispielsweise mikrobielle Gärung oder Austritt des Gases aus dem Erdinneren, in verschiedensten mikrobiellen Habitaten wie Böden, Gewässern oder heißen Quellen vorliegt und als Energiequelle genutzt werden kann. Allen Hydrogenasen gemeinsam ist das Vorhandensein von Metallatomen im katalytischen Zentrum, an dem die Spaltung, bzw. die Synthese von H<sub>2</sub> abläuft.

Der genaue katalytische Mechanismus von Hydrogenasen ist noch nicht bekannt und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Mehrere Möglichkeiten werden diskutiert (Fontecilla-Camps *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2009; Pardo *et al.*, 2006; Stein und Lubitz, 2004). Allen Modellen gemeinsam ist die Annahme eines katalytischen Zyklus, in dem H<sub>2</sub> an das bimetallische Zentrum bindet und dort heterolytisch gespalten wird. Während das Proton durch protonenleitende Aminosäuren an die Oberfläche des Enzyms geleitet wird, werden die Elektronen über ein Netz aus Aminosäuren und Fe-S Cluster an einen spezifischen physiologischen Elektronenakzeptor übertragen.

## **1.2 Hydrogenasen lassen sich in drei verschiedenen Gruppen einteilen**

Im Laufe der Evolution haben sich auf divergentem Wege verschiedene, nicht miteinander verwandte Arten von Hydrogenasen entwickelt. Nach Vignais (Vignais und Billoud, 2007; Vignais *et al.*, 2001) wurden sie nach dem Aufbau ihres katalytischen Zentrums in drei phylogenetisch distinkte Gruppen eingeteilt (Tabelle 1). Allen gemeinsam ist das Vorhandensein eines low-spin Fe<sup>2+</sup> im aktiven Zentrum, das von mindestens zwei diatomaren Nichtprotein-Liganden (im Falle von [Fe]-Hydrogenasen zwei CO, bei [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen ein CO und zwei CN<sup>-</sup>) koordiniert wird.

## Einleitung

**Tabelle 1:** Überblick über die drei Gruppen von Hydrogenasen und ihre Funktion, nach (Barz *et al.*, 2010; Vignais und Billoud, 2007).

Gruppe	Bezeichnung	Funktion
<b>[FeFe]-Hydrogenasen</b>	-	Verbrauch von Reduktionsäquivalenten, Energiekonservierung
<b>[NiFe]-Hydrogenasen</b>		
Gruppe 1	H <sub>2</sub> -Aufnahme-Hydrogenasen	Energiekonservierung
Gruppe 2	H <sub>2</sub> -Sensor-Hydrogenasen, cyanobakterielle Aufnahme-Hydrogenasen	H <sub>2</sub> -Sensierung, Energiekonservierung
Gruppe 3	Bidirektionale, cytoplasmatische Hydrogenasen	Energiekonservierung, Bereitstellung und Verbrauch von Reduktionsäquivalenten
Gruppe 4	H <sub>2</sub> -produzierende MBHs	Verbrauch von Reduktionsäquivalenten bei der Fermentation
<b>[Fe]-Hydrogenasen</b>	Hmd	Hydridtransfer bei der Methanogenese

### 1.2.1 [FeFe]-Hydrogenasen

[FeFe]-Hydrogenasen bestehen in der Regel aus einer einzigen Untereinheit, die das katalytische Zentrum und die elektronentransferierende Domäne zusammenfasst, wobei es auch strukturell davon abweichende Enzyme gibt (Meyer, 2007). Das bimetallische katalytische Zentrum, H-Cluster genannt, besteht aus einem binuklearen Eisenzentrum und ist über ein Cystein mit einem [4Fe-4S] Cluster verbunden (Peters *et al.*, 1998).

Die meisten [FeFe]-Hydrogenasen sind H<sub>2</sub>-produzierende, cytoplasmatische Hydrogenasen und werden benötigt, um überschüssige Reduktionsäquivalente zu entsorgen, insbesondere in den fermentativen Clostridien (Adams, 1990). Der physiologische Redoxpartner der Hydrogenasen in Clostridien ist dabei Ferredoxin oder, bei Eisenmangel, Flavodoxin. In den wenigen Grünalgen, in denen [FeFe]-Hydrogenasen vorkommen, werden Elektronen entweder vom fermentativen Metabolismus oder von der H<sub>2</sub>O-Oxidation über Redoxpartner auf ein [2Fe-2S] Ferredoxin übertragen und von dort auf die [FeFe]-Hydrogenase (Melis, 2007). In einigen *Desulfovibrio*-Spezies übernimmt eine H<sub>2</sub>-oxidierende, periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase offenbar eine Rolle im Schutz gegen

oxidativen Stress ein (Fournier *et al.*, 2004), während cytoplasmatische, tetramere [FeFe]-Hydrogenasen  $\text{NADP}^+$  reduzieren (Nicolet *et al.*, 2002). Ferner sind [FeFe]-Hydrogenasen die einzigen Hydrogenasen, die auch in Eukaryoten vorkommen, wo sie in Chloroplasten oder Hydrogenosomen zu finden sind (Horner *et al.*, 2002). In Archeen sind bislang hingegen keine Gene gefunden worden, die für [FeFe]-Hydrogenasen kodieren.

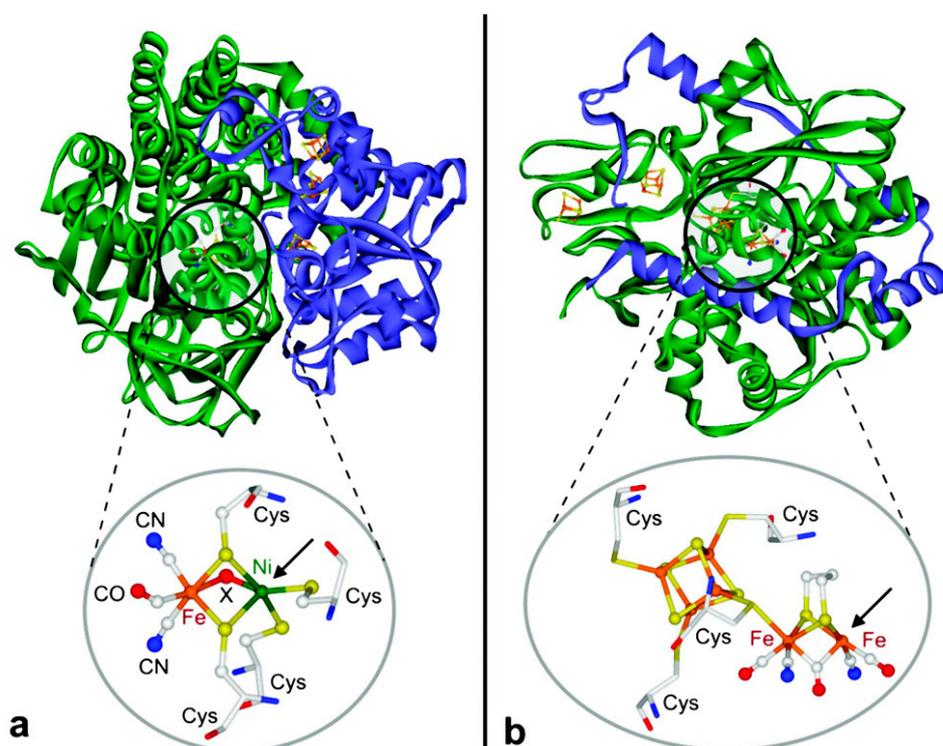
### 1.2.2 [NiFe]-Hydrogenasen

[NiFe]-Hydrogenasen sind die größte und vielfältigste Gruppe der Hydrogenasen und sind ausschließlich in Prokaryoten - sowohl Archaea als auch Bacteria - zu finden, wobei sie am prominentesten im Phylum der Proteobakterien sind (Vignais und Billoud, 2007). Der strukturelle Kern des Enzyms wird von einer großen Untereinheit, die das katalytische [NiFe]-Zentrum enthält, und einer kleinen Untereinheit, die die elektronentransferierenden Fe-S Cluster besitzt, gebildet (Volbeda *et al.*, 1995). Das heterobimetallische aktive Zentrum sitzt etwa in der Mitte der großen Untereinheit und wird dabei von vier Cystein-Schwefeln, zwei von ihnen an einer [NiFe]-überbrückenden Position, die anderen zwei als terminale Ni-Liganden, an das Protein gebunden (Abbildung 2). Zusätzlich binden drei nicht proteinogene Liganden an das Eisenatom, ein CO und zwei  $\text{CN}^-$  (Volbeda *et al.*, 1996). In [NiFeSe]-Hydrogenasen ist das Nickel-ligandierende Cystein durch ein Selenocystein ersetzt (Garcin *et al.*, 1999), während bei der löslichen Hydrogenase (SH) aus *R. eutropha* die Existenz von zwei zusätzlichen  $\text{CN}^-$ -Liganden diskutiert wurde (Burgdorf *et al.*, 2005b). Neuere spektroskopische Untersuchungen an ganzen Zellen deuten jedoch darauf hin, dass die Zusammensetzung der diatomaren Liganden im aktiven Zentrum der SH sehr ähnlich der in anderen [NiFe]-Hydrogenasen besitzt ist (Horch *et al.*, 2010). Die Fe-S Cluster liegen linear aufgereiht in der kleinen Untereinheit, die durch eine große, hydrophobe Oberfläche mit der großen Untereinheit verbunden ist und zusammen mit dieser die globuläre Struktur von [NiFe]-Hydrogenasen bildet. Das zum aktiven Zentrum nächstgelegene Fe-S Cluster ist etwa  $10 \text{ \AA}$  von diesem entfernt

## Einleitung

(Abbildung 2), während das am weitesten entfernt liegende Cluster nah an der Oberfläche des Proteins liegt, um die bei der  $H_2$ -Oxidation entstehenden Elektronen auf einen Elektronenakzeptor, oft ein Cytochrom, zu übertragen. In der Mitte dieser beiden [4Fe-4S] Cluster liegt bei den meisten [NiFe]-Hydrogenasen ein [3Fe-4S] Cluster, ligandiert durch drei Cysteine. Bei [NiFeSe]-Hydrogenasen und nah verwandten Hydrogenasen ist auch dieses mittlere Cluster ein [4Fe4S]-Cluster (Garcin *et al.*, 1999). Die Nomenklatur der Fe-S Cluster erfolgt nach ihrer Entfernung zum katalytischen Zentrum. Der zum aktiven Zentrum nächstgelegene wird mit proximal tituliert, der am weitesten entfernt liegende mit distal, während das intermediäre Cluster als medial bezeichnet wird (siehe auch Abbildung 2). Das proximale Cluster weist in den meisten [NiFe]-Hydrogenasen eine bei [4Fe-4S] Clustern übliche Ligandierung durch vier Cysteine auf, das distale Cluster wird hingegen durch drei Cysteine und ein Histidin ligandiert (Volbeda *et al.*, 1995), wobei das Histidin offenbar essentiell für die Elektronenübertragung ist (Dementin *et al.*, 2006).

Für den Gastransport von  $H_2$  sind aufgrund der Kristallstrukturen der [NiFe]-Hydrogenasen hydrophobe Gaskanäle in der großen Untereinheit vorhergesagt (Leroux *et al.*, 2008; Montet *et al.*, 1997).



**Abbildung 1:** Vergleich der Strukturen von [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen (große Untereinheit: grün, kleine Untereinheit: blau) mit einer vergrößerten Darstellung des aktiven Zentrum im unteren Teil. a: [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas*, b: [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans*. Die Pfeile symbolisieren die sechste, freie Koordinationsstelle des Ni-, bzw. des Fe-Atoms. Atomdarstellung: Grauweiß: Kohlenstoff, Blau: Stickstoff, Rot: Sauerstoff, gelb: Schwefel, Orange: Eisen, grün: Nickel. Nach (Lubitz *et al.*, 2007)

Üblicherweise liegen die Gene, die für Hydrogenasen und ihre meist spezifischen, akzessorischen Proteine für Maturation und die Insertion der Kofaktoren kodieren, gemeinsam auf Hydrogenase-Genclustern. Oft befinden sich auch die Gene der regulatorischen Proteine, die die Expression der Hydrogenasen regulieren, auf diesem Operon. Während die Zahl der strukturellen Gene bei [NiFe]-Hydrogenasen zwischen 2 und 5 schwankt und die Position der für die einzelnen Untereinheiten kodierenden Gene konserviert ist, ist die Anzahl und Position der für die akzessorischen und regulatorischen Proteine kodierenden Gene sehr unterschiedlich. So liegen die Strukturgene der Hydrogenase 1 aus *Thiocapsa roseopersicina* isoliert auf dem Genom, getrennt von den Hilfsproteinen, vor (Kovacs *et al.*, 2005), während auf dem MBH-Operon von *R. eutropha* mehr als 20 Gene liegen (Bernhard *et al.*, 1996; Kortlüke *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 2003).

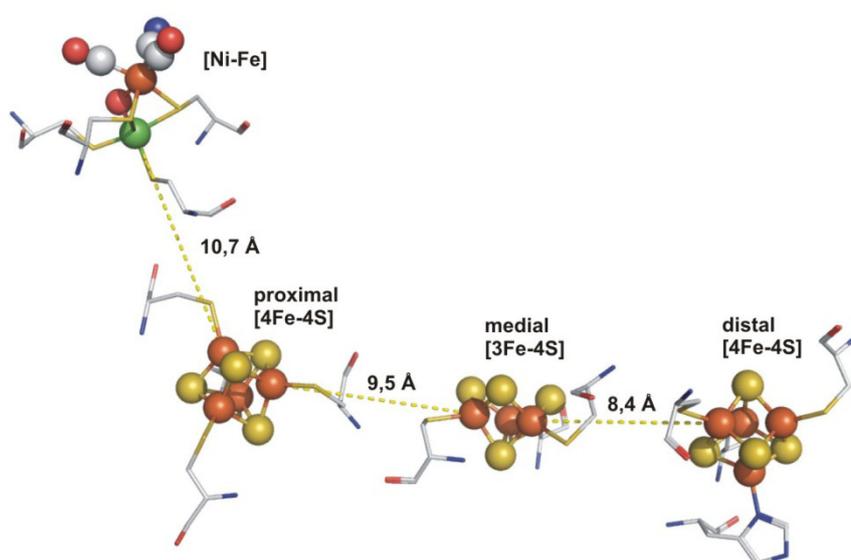
## Einleitung

Für die periplasmatische [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* sind bisher hingegen lediglich zwei Hilfsproteine identifiziert (Rousset *et al.*, 1998a).

Nach Vignais (Vignais und Billoud, 2007; Vignais *et al.*, 2001) können [NiFe]-Hydrogenasen aufgrund der Ergebnisse von multiplen Sequenzvergleichen in vier phylogenetisch distinkte Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 umfasst H<sub>2</sub>-oxidierende Hydrogenasen, Gruppe 2 H<sub>2</sub>-oxidierende Hydrogenasen des cyanobakteriellen Typs und H<sub>2</sub>-sensierende Hydrogenasen. Die bidirektionalen, heteromultimeren cytoplasmatischen [NiFe]-Hydrogenasen sind in Gruppe 3 zusammengefasst, während H<sub>2</sub>-produzierende, energiekonservierende und membranassoziierte Hydrogenasen in Gruppe 4 eingeteilt sind (siehe auch Tabelle 1).

Die Hydrogenasen der Gruppe 1, die H<sub>2</sub>-oxidierenden Hydrogenasen (kurz Hox von H<sub>2</sub>-oxidizing oder Hup von H<sub>2</sub>-uptake) sind - entweder frei oder an der Membran gebunden - im Periplasma lokalisiert und dienen der Energieproduktion über H<sub>2</sub>-Oxidation und der anschließenden Generation eines elektrochemischen Membrangradienten. Hierbei werden die freiwerdenden Elektronen über ein Cytochrom oder Ferredoxin in den Chinonpool der Cytoplasmamembran transportiert, wo sie dann O<sub>2</sub> (aerobe Atmung der Knallgasbakterien) oder einen anderen terminalen Elektronenakzeptor wie NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Fumarat oder CO<sub>2</sub> reduzieren (Schwartz und Friedrich, 2006; Vignais und Billoud, 2007). Membrangebundene Hydrogenasen (kurz MBH, z.B. HoxKGZ aus *R. eutropha* und HydABC *Wolinella succinogenes*) sind über einen Membrananker der kleinen Untereinheit an eine membranständige dritte Untereinheit, ein Cytochrom *b* (und, im Falle von *W. succinogenes*, über diesen Anker auch an die Membran), gekoppelt (Bernhard *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998). Periplasmatischen Hydrogenasen fehlt dieser Anker, sie sind somit nicht, bzw. nur lose an die Cytoplasmamembran gebunden. Die periplasmatischen Hydrogenasen (z.B. die [NiFe]-Hydrogenase HydAB aus *D. gigas*), geben die bei der H<sub>2</sub>-Oxidation freiwerdenden Elektronen an ein Cytochrom *c* ab (Yahata *et al.*, 2006). Von den vorhandenen Kristallstrukturen

(Higuchi *et al.*, 1997; Matias *et al.*, 2001; Montet *et al.*, 1997; Ogata *et al.*, 2010; Volbeda *et al.*, 1995) der [NiFe]-Hydrogenasen sind die der Desulfurikanten am besten untersucht und dienen daher als das Modell für [NiFe]-Hydrogenasen, wodurch sie allgemein als „Standard“ [NiFe]-Hydrogenasen (im folgenden: Standardhydrogenasen) bezeichnet werden. Diese besitzen den oben genannten Aufbau mit zwei [4Fe-4S]- und einem [3Fe-4S] Cluster in der kleinen Untereinheit (Abbildung 1 und Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Die vier Metallzentren einer Standard-[NiFe]-Hydrogenase und ihre Liganden. Basierend auf der Kristallstruktur des Ni-B-Zustandes der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* miyazaki (Ogata *et al.*, 2005). Metallatome und nichtproteinogene Liganden sind als Kalotten dargestellt, Aminosäuren als Stäbchen. Zwischen den Zentren ist der Abstand der jeweiligen Metallzentren angegeben. Grauweiß: Kohlenstoff, Blau: Wasserstoff, Rot: Sauerstoff, gelb: Schwefel, Orange: Eisen, grün: Nickel, blau: Stickstoff.

In der Gruppe 2 der [NiFe]-Hydrogenasen (Tabelle 1) werden Sensor-Hydrogenasen wie die regulatorische Hydrogenase (RH) aus *R. eutropha*, sowie cyanobakterielle H<sub>2</sub>-oxidierende Hydrogenasen zusammengefasst. Ihnen gemeinsam ist die cytoplasmatische Lokalisation und das dadurch bedingte Fehlen eines N-terminalen Signalpeptids, das für die Translokation über die Membran notwendig ist. Wie die Gruppe 1-Hydrogenasen bestehen alle Hydrogenasen dieser Gruppe aus zwei Untereinheiten, von denen die kleine Untereinheit gegenüber der

## Einleitung

der Gruppe 1-Hydrogenasen allerdings verkürzt ist und eventuell eine andere Zusammensetzung an Fe-S Cluster, die durch ungewöhnliche spektroskopische Eigenschaften auffallen, enthält (Buhrke *et al.*, 2005b). Die cyanobakteriellen H<sub>2</sub>-oxidierenden Hydrogenasen korrelieren mit dem Vorhandensein einer Nitrogenase und dienen der Regeneration des während der N<sub>2</sub>-Fixierung entstehenden H<sub>2</sub> (Tamagnini *et al.*, 2007). Ebenfalls zu dieser Gruppe gehört die Hydrogenase 3 aus *Aquifex aeolicus*, die wahrscheinlich Reduktionsäquivalente für den reduktiven TCA-Zyklus liefert. Die Sensor-Hydrogenasen sind, vermutlich aufgrund eines angepassten, verengten Gaskanals (Buhrke *et al.*, 2005a), unempfindlich gegenüber O<sub>2</sub>, das dadurch nicht mehr das aktive Zentrum erreichen kann. Sie dienen der Sensierung von H<sub>2</sub> und regulieren über eine Kinase die Expression der weiteren Hydrogenasen (Friedrich *et al.*, 2005; Vignais *et al.*, 2005). Enzyme dieser Klasse sind (neben der RH aus *R. eutropha*) auch in anderen Knallgasbakterien wie *Bradyrhizobium japonicum* und *Rhodobacter capsulatus* nachgewiesen worden (Friedrich *et al.*, 2005).

Bidirektionale, heteromultimere Hydrogenasen werden in Gruppe 3 zusammengefasst. Diese Hydrogenasen sind cytoplasmatische Enzyme, die durch ihren Aufbau aus drei bis sechs Untereinheiten charakterisiert sind. Dabei ist das Hydrogenase-Dimer mit anderen, kofaktorbindenden Untereinheiten assoziiert. Diese bidirektionalen Hydrogenasen katalysieren gleichermaßen die H<sub>2</sub>-Oxidation als auch die H<sup>+</sup>-Reduktion, wobei je nach Richtung Kosubstrate oxidiert oder reduziert werden. Die meisten dieser Enzyme kommen in Archeen vor, wo sie unter anderem Rollen in der Methanogenese und im Schwefelstoffwechsel übernehmen (Hendrickson und Leigh, 2008; Ma *et al.*, 1993). Bidirektionale Hydrogenasen in Bacteria kommen vorwiegend in photosynthetischen Spezies vor (Kovacs *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2002) und dienen neben der Energiekonservierung auch dazu, überschüssige Elektronen der Lichtreaktion loszuwerden (Appel *et al.*, 2000).

Zur wenig untersuchten Gruppe 4 gehören die H<sub>2</sub>-produzierenden, membrangebundenen Hydrogenasen. Diese multimeren Enzyme besitzen 6 oder

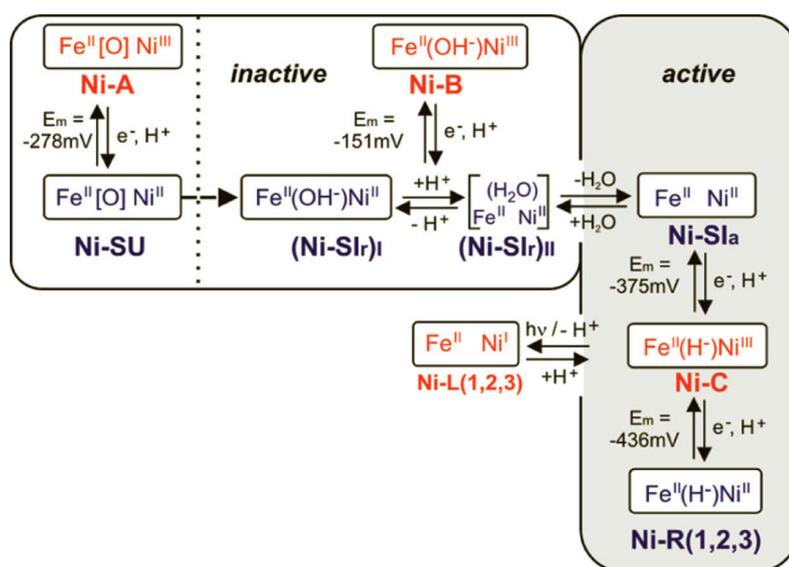
mehr Untereinheiten und dienen der Reduzierung von überschüssigen Reduktionsäquivalenten, die bei der anaeroben Oxidation von C1-Molekülen entstehen. Das am besten untersuchte Beispiel ist die Hydrogenase 3 aus *E. coli*, die Bestandteil des membrangebundenen Formiat-Hydrogenlyase-Komplexes ist, der Formiat zu H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> umwandelt (Bagramyan und Trchounian, 2003; Sawers *et al.*, 1985). Ein weiterer untersuchter Vertreter von Hydrogenasen der Gruppe 4 ist die Ech-Hydrogenase (Ech von *E. coli* hydrogenase 3) aus *Methanosarcina barkeri*, die zusammen mit anderen Enzymen der Reduktion von CO<sub>2</sub> zu Formylmethanofuran dient und wahrscheinlich auch als Elektronenpumpe fungiert (Meuer *et al.*, 1999). Die meisten Vertreter der Gruppe 4-Hydrogenasen sind in Archeen zu finden.

Das katalytische [NiFe]-Zentrum durchläuft während der Katalyse mehrere Redoxzustände (Abbildung 3), die vor allem mit Infrarot- und EPR-Spektroskopie untersucht wurde (Fontecilla-Camps *et al.*, 2007; Lubitz *et al.*, 2007). Während EPR-Spektroskopie nur paramagnetische Redoxzustände (solche mit ungepaartem Elektron) detektieren kann, ist es mit FTIR-Spektroskopie möglich, auch diamagnetische Redoxzustände, die vom katalytischen Zentrum durchlaufen werden, zu untersuchen. Die ersten spektroskopischen Untersuchungen an [NiFe]-Hydrogenasen wurden mit EPR-Spektroskopie durchgeführt (Cammack *et al.*, 1982b). Danach richtete man die Nomenklatur aus und bezeichnete die detektierten paramagnetischen Zustände als Ni-A, Ni-B und Ni-C. Den später mit FTIR entdeckten Zuständen wurde schließlich Ni-S („S“ für EPR-„silent“) vorgestellt. Ni-A und Ni-B treten im oxidierten Zustand des Enzyms auf. Da sie katalytisch nicht aktiv sind, werden sie oft mit dem Zusatz „u“ für unready als Ni<sub>u</sub>-A und „r“ für „ready“ als Ni<sub>r</sub>-B bezeichnet, in Abgrenzung von „a“ für „active“ bei Ni<sub>a</sub>-C. Sie lassen sich durch ihre unterschiedlich schnelle Reaktivierbarkeit und den Brückenligand zwischen Nickel und Eisen unterscheiden (Pandelia *et al.*, 2010b; Pardo *et al.*, 2007). Während Ni<sub>r</sub>-B schnell (innerhalb von Sekunden) reaktivierbar ist (Fernandez *et al.*, 1986), kann Ni<sub>u</sub>-A nur langsam (innerhalb von

## Einleitung

mehreren Minuten bis hin zu Stunden) unter erhöhter Temperatur reaktiviert werden (Fernandez *et al.*, 1984; Lamle *et al.*, 2004). Zurückzuführen ist dieser Unterschied wahrscheinlich auf die Natur des Brückenliganden zwischen Nickel und Eisen des aktiven Zentrums. Bei Ni<sub>r</sub>-B ist wahrscheinlich ein schnell reduzierbares Hydroxidmolekül gebunden (van Gastel *et al.*, 2006), während bei Ni-A ein peroxo-Ligand zur Diskussion steht (Lubitz *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2005). Nach Reduktion des aktiven Zentrums werden diverse EPR-inaktive Ni-S-Zustände durchlaufen (siehe Abbildung 3), bevor der aktive, paramagnetische Ni<sub>a</sub>-C-Zustand erreicht wird, in dem der Brückenligand am aktiven Zentrum ein Hydridion ist (Brecht *et al.*, 2003; Foerster *et al.*, 2005).

Ein weiterer paramagnetischer Zustand des aktiven Zentrums wird als Ni<sub>a</sub>-L bezeichnet, wobei das L für lichtinduziert steht - dieser Zustand wird durch Photo-konversion von Ni<sub>a</sub>-C erreicht (Brecht *et al.*, 2003; Foerster *et al.*, 2005). Die elektronischen Eigenschaften dieses Zustandes unterscheiden sich von denen in Ni<sub>a</sub>-C, woraufhin als Oxidationszustand Ni<sup>1+</sup> vorgeschlagen wurde und ein Modell entworfen wurde, in dem das Brücken-Hydridion als Proton an eine nahe Base transferiert wird (Stein *et al.*, 2001). Ob Ni<sub>a</sub>-L physiologisch relevant ist, ist bislang unklar.



**Abbildung 3:** Nickelzustände des Nickelzentrums von [NiFe]-Hydrogenasen (Pandelia, 2009; Pandelia *et al.*, 2010a).

Die EPR-detektierbaren Nickelzustände sind rot gekennzeichnet, die EPR-inaktiven blau. Die physiologisch relevanten Zustände sind umrahmt dargestellt, die aktiven Zustände sind im rechten, grau unterlegten Kasten eingezeichnet. Die zugehörigen Redoxpotentiale sind neben den Übergängen der Nickelzustände eingetragen.

### 1.2.3 [Fe]-Hydrogenasen

Eine Ausnahme unter den Hydrogenasen stellen die nur in einigen methanogenen Archeen vorkommenden [Fe]-Hydrogenasen (auch Fe-S Clusterfreie Hydrogenasen oder Hmd -  $\text{H}_2$ -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase - genannt) dar. Sie besitzen kein dimetallisches aktives Zentrum, wie die Kristallstruktur des Apoenzyms aus *Methanocaldococcus jannaschii* zeigt (Pilak *et al.*, 2006). Stattdessen besteht das aktive Zentrum aus einem einzelnen, ungewöhnlich koordinierten Eisenatom (Shima *et al.*, 2008), das nicht redoxaktiv und nicht EPR-detektierbar ist (Berkessel, 2001). [Fe]-Hydrogenasen katalysieren nicht die in Gleichung 1 dargestellte reversible Spaltung von  $\text{H}_2$ , sondern reduzieren den Kofaktor Methenyltetrahydromethanopterin zu Methyltetrahydromethanopterin und  $\text{H}^+$  (Zirngibl *et al.*, 1990), diese Reaktion stellt eine intermediäre Stufe in der Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{CH}_4$  dar. Das hochaktive Enzym (es reduziert  $300 \mu\text{mol CH-H}_4\text{MPT min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$ , die Rückreaktion läuft mit

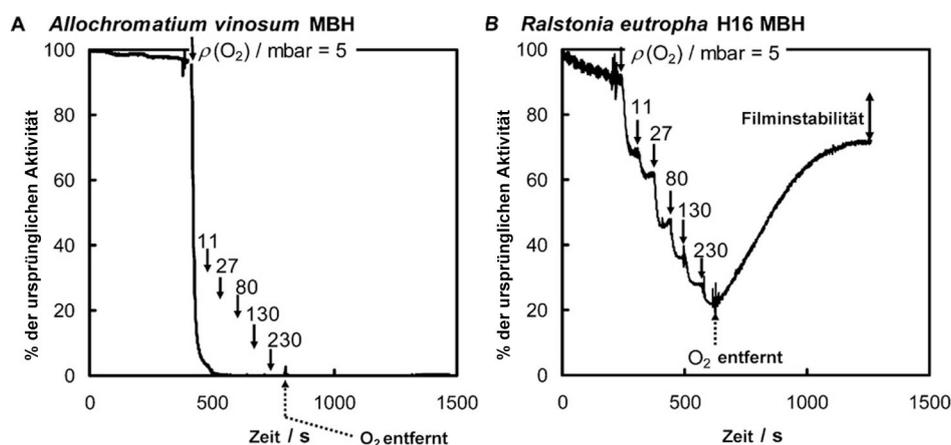
775  $\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}\text{mg}$  ab (Zirngibl *et al.*, 1990)) besteht aus zwei identischen, jeweils 38 kDa großen Untereinheiten, mit jeweils einem Eisenatom, das durch zwei CO und wahrscheinlich ein Cystein-Schwefel ligandiert wird. Durch Cyanid und CO, die vermutlich an die  $\text{H}_2$ -Bindestelle des aktiven Zentrums binden, wird das Enzym inhibiert, während die Aktivität in einer  $\text{O}_2$ -haltigen Atmosphäre nur leicht sinkt (Lyon *et al.*, 2004). Ein Umsatz des Enzyms von  $\text{H}_2$  mit redoxaktiven Farbstoffen findet, anders als bei [FeFe] und [NiFe] Hydrogenasen, nicht statt.

### **1.3 *Ralstonia eutropha* besitzt mindestens drei unterschiedliche $\text{O}_2$ -tolerante Hydrogenasen**

Das  $\beta$ -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* (2005 in *Cupriavidus necator* umbenannt, in dieser Arbeit wird die alte Nomenklatur beibehalten) ist in der Lage, mehr als eine Hydrogenase zu synthetisieren. Mindestens drei [NiFe]-Hydrogenasen werden im Genom des Organismus kodiert. Die membran-gebundene Hydrogenase (MBH, Gruppe 1 der [NiFe]-Hydrogenasen, siehe Tabelle 1) dient ausschließlich der Energiegewinnung; die regulatorische Hydrogenase (RH, Gruppe 2) der  $\text{H}_2$ -Sensierung, die lösliche Hydrogenase (SH, Gruppe 3) dient einerseits der Energiegewinnung, als auch der Oxidation überschüssiger Reduktionsäquivalente (Abbildung 5). *R. eutropha* ist in der Lage, mit  $\text{O}_2$  als terminalem Elektronenakzeptor und  $\text{H}_2$  als Energiequelle lithoautotroph zu wachsen, wobei  $\text{CO}_2$  durch den Calvin-Benson-Bossham- (CBB) Zyklus fixiert wird (Cramm, 2009). Durch die Nutzung von  $\text{O}_2$  als Elektronenakzeptor hat sich bei den Hydrogenasen aus *R. eutropha* (und anderen Bakterien, die als „Knallgasbakterien“ zusammengefasst werden) evolutionär eine  $\text{O}_2$ -Toleranz entwickelt, die es zulässt, dass die katalytische, reversible Spaltung von  $\text{H}_2$ , anders als bei den meisten anderen Hydrogenasen, auch in der Gegenwart von atmosphärischen Konzentrationen an  $\text{O}_2$  ablaufen kann.

Die drei Hydrogenasen aus *R. eutropha* sind die bestuntersuchtsten Beispiele  $\text{O}_2$ -toleranter Hydrogenasen. Definiert wird die  $\text{O}_2$ -Toleranz als Ablauf der Kata-

lyse in einer O<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre. Gemessen wird dies unter geeigneten Bedingungen mit gereinigtem Enzym durch Proteinfilmvoltammetrie, wobei eine Elektrode mit einer Proteinschicht bezogen wird. Katalytische Aktivität wird dabei durch einen Spannungsanstieg angezeigt, der bei Standardhydrogenasen nach Begasung mit O<sub>2</sub> auf Null abfällt. Bei O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen, wie der MBH aus *R. eutropha* kann hingegen noch katalytische Aktivität gemessen werden (Abbildung 4). Für die drei verschiedenen Hydrogenasen aus *R. eutropha* sind verschiedene Mechanismen postuliert, die zur O<sub>2</sub>-Toleranz beitragen. Allen drei Hydrogenasen gemein ist, dass in der Regel kein Ni<sub>u</sub>-A-Zustand spektroskopisch detektiert werden kann (Bernhard *et al.*, 2000; Happe *et al.*, 2000; Saggi *et al.*, 2009), was dafür spricht, dass der entsprechende Brückenligand, der in anderen [NiFe]-Hydrogenasen den molekularen Hintergrund für den Ni<sub>u</sub>-A-Zustand darstellt, entweder nicht ausgebildet wird oder schnell entfernt wird.



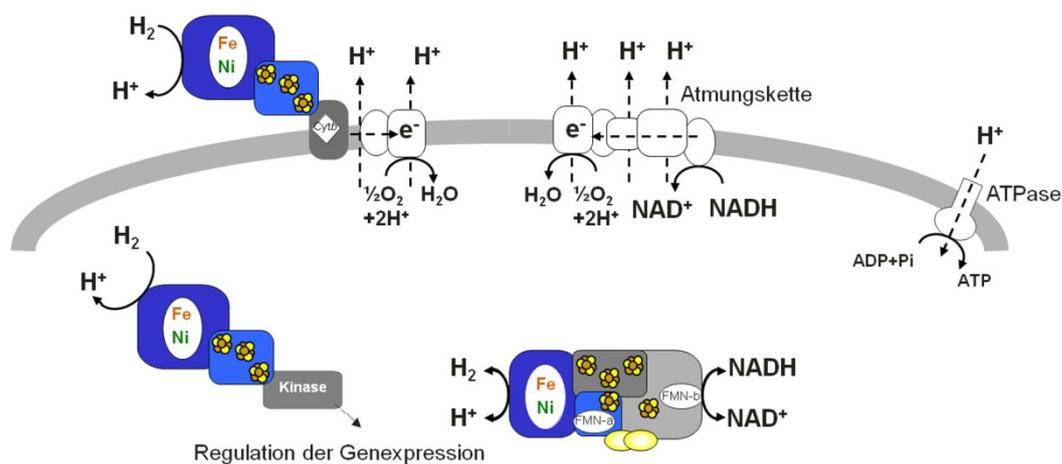
**Abbildung 4:** Der Effekt von O<sub>2</sub> auf die katalytische Aktivität von MBH-Proteinfilmen aus *Allochromatium vinosum* (links) und *R. eutropha* (rechts).

Nach (Vincent *et al.*, 2005a). Die elektrochemische Zelle wurde initial mit H<sub>2</sub> geflutet, worauf eine schrittweise Injektion von O<sub>2</sub> folgte, welcher dann mit N<sub>2</sub> herausgespült wurde. Nach Injektion von kleinsten Mengen O<sub>2</sub> sinkt die Aktivität der *A. vinosum*-MBH auf Null und kann nicht reaktiviert werden, während die *R.e.* MBH selbst bei atmosphärischen Mengen an O<sub>2</sub> aktiv bleibt und vollständig reaktiviert werden kann.

Kodiert werden die drei Hydrogenasen in zwei großen Operons auf dem Megaplasmid pHG1 (Pohlmann *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2003). Die Proteine, die auf dem MBH-Operon kodiert sind, umfassen neben

## Einleitung

den Strukturproteinen HoxKGZ und der spezifischen Endoprotease HoxM die akzessorischen Proteine HoxLOQRTV und HypA1B1F1CDEX, sowie die regulatorischen Proteine HoxABCJ. Das kleinere SH-Operon besteht aus den Genen für die SH-Strukturproteine HoxFUHYI, der spezifischen Endoprotease HoxW und den Hyp-Proteine A2, B2 und F2. Neben diesen beiden Hydrogenase-Operons existiert ein drittes Hydrogenase-Operon (mit den Strukturgenen *hyd4SL*, den Genen, *hypF3C2D2E2A3B3* für die akzessorischen Proteine und dem putativen Proteasegen PHG070) auf pHG1 (Cramm, 2009; Schwartz *et al.*, 2003), das für eine Streptomyceten-ähnliche Hydrogenase (Constant *et al.*, 2010) kodiert, deren physiologische Rolle, Expression, Aktivität und Struktur Gegenstand gegenwärtiger Forschung ist.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der drei Hydrogenasen, MBH, RH und SH aus *R. eutropha*.

Die großen Untereinheiten sind in dunklem blau dargestellt, die kleinen Untereinheiten in hellem blau, HoxI der SH in gelb, Untereinheiten ohne Hydrogenase-Funktion in grau, weitere Enzyme in weiß. Die Fe-S Cluster sind als braun-gelbe Tetraeder dargestellt. Die Cytoplasmamembran ist als durchgehender grauer Balken dargestellt, das Cytoplasma in der unteren Bildhälfte. Nach (Burgdorf *et al.*, 2005a).

### 1.3.1 Die regulatorische Hydrogenase (RH) fungiert als H<sub>2</sub>-Sensor

Die RH dient zusammen mit einer Histidin-Proteinkinase der Sensierung von H<sub>2</sub> in *R. eutropha* (Lenz und Friedrich, 1998; Lenz *et al.*, 1997). Diese beiden Proteine gehen wahrscheinlich einen funktionellen Komplex ein, der über eine

Phosphorylierung/Dephosphorylierung des zugehörigen Response-Regulators die Transkription der Hydrogenase steuert (Buhrke *et al.*, 2004).

Die RH ist ein Heterodimer aus einer großen Untereinheit (HoxC) mit dem [Ni-Fe]-Zentrum und einer kleinen Untereinheit (HoxB) mit den elektronentransferierenden Fe-S Cluster. Da die RH ein cytoplasmatisches Protein ist, fehlt das N-terminale Signalpeptid und der Membrananker. Stattdessen besitzt die RH eine C-terminale Verlängerung, die mutmaßlich zur Bildung eines Doppeldimers und für die Interaktion mit der Kinase notwendig ist (Buhrke *et al.*, 2004).

Die O<sub>2</sub>-Resistenz der RH scheint auf einem verengten hydrophoben Gaskanal zu basieren, der nicht passierbar für größere Gasmoleküle wie O<sub>2</sub> oder CO ist, wie durch Mutationen am Gaskanal, die die Hydrogenase empfindlich gegenüber O<sub>2</sub> machten, gezeigt werden konnte (Buhrke *et al.*, 2005a).

### **1.3.2 Die lösliche, bidirektionale Hydrogenase ist für die Regeneration von Reduktionsäquivalenten verantwortlich**

Die lösliche Hydrogenase (SH) aus *R. eutropha* ist im Cytoplasma lokalisiert und in der Lage, Reduktionsäquivalente in der Form von NADH aus H<sub>2</sub> und NAD<sup>+</sup> herzustellen und überschüssige Elektronen über den reversen Weg zu entsorgen. Die SH besteht aus einem Hydrogenase-Heterodimer (HoxHY), das an ein NADH-Dehydrogenase (Diaphorase)-Heterodimer (HoxFU) gekoppelt ist, welches FMN enthält. Zusätzlich zu diesen vier Untereinheiten werden zwei HoxI-Moleküle an das Diaphorase-Dimer des Basis-Heterotetramers gebunden. Die Funktion der HoxI-Untereinheit ist unklar, da es bei Deletionsmutanten keinen ausgeprägten Wachstumsphänotyp gibt (Thiemermann *et al.*, 1996). Bei in vitro-Experimenten wurde aber festgestellt, dass die SH mit HoxI von NADPH aktiviert werden kann, was auf eine Bindestelle für NADPH in HoxI hindeutet (Burgdorf *et al.*, 2005c). Die große Untereinheit des Hydrogenase-Dimers HoxH scheint nah verwandt mit Standardhydrogenasen zu sein, während die kleine Untereinheit HoxY im Vergleich zur kleinen Untereinheit von Standardhydrogenasen verkürzt ist und nach der Sequenz zu urteilen lediglich ein einzelnes Fe-S Cluster zu ent-

## Einleitung

halten scheint. Die O<sub>2</sub>-Toleranz der SH, die durch die Lokalisation in der reduktiven Umgebung des Cytoplasmas nicht so ausgeprägt sein muss, wie bei der MBH, wurde als ein Resultat eines modifizierten aktiven [NiFe]-Zentrums diskutiert. Bei Untersuchungen des gereinigten Enzyms mittels FTIR-Spektroskopie wurden zwei zusätzliche Cyanid-Banden entdeckt, die in Standardhydrogenasen nicht vorhanden sind (Happe *et al.*, 2000). XAS-Studien haben ferner nahegelegt, dass die zwei nicht überbrückenden Cysteine im NiFe-Zentrum Sulfenate formen und das Nickel über Sauerstoffatome ligandieren (Burgdorf *et al.*, 2005b). Die erstgenannte Modifikation des aktiven Zentrums stehen momentan unter Diskussion, da Studien an der SH Extrakt ganzer Zellen andere Ergebnisse liefern (Horch *et al.*, 2010) und auf eine Ligandierung des [NiFe]-Zentrums mit den üblichen zwei CO- und einem CN<sup>-</sup>-Liganden hindeuten. Ein zusätzliches FMN-Molekül (FMN-a), das bei Standardhydrogenasen nicht vorhanden ist (van der Linden *et al.*, 2004b), könnte eventuell essentiell für die schnelle reduktive Aktivierung der SH sein, was zu einer erhöhten O<sub>2</sub>-Toleranz führen würde. Alternativ werden auch die Koppelung an den NADP/H-Pool und ein ungewöhnliches Fe-S Cluster diskutiert und es ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

### **1.3.3 Die membrangebundene Hydrogenase (MBH) dient der Energiekonservierung**

Neben der SH dient die membrangebundene Hydrogenase der Energiebereitstellung bei lithoautotrophen Wachstum mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator. Über einen hydrophoben Membrananker ist die kleine Untereinheit HoxK (34,6 kDa) an ein membrandurchspannendes Cytochrom *b* (HoxZ) gekoppelt, das die über die Spaltung von H<sub>2</sub> am aktiven Zentrum in der großen Untereinheit HoxG (67,1kDa) gewonnenen Elektronen an den Chinonpool in der Membran weiterleitet (Bernhard *et al.*, 1997). Dort wird schließlich O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O reduziert und Energie in Form eines elektrochemischen Membrangradienten bereitgestellt. Der Aufbau der MBH ist dem von Standardhydrogenasen aus Sulfatreduzierern sehr ähnlich, abgesehen von dem Membrananker, der bei den periplasmatischen Hydrogenasen aus

*Desulfovibrio* fehlt und dem direkten Elektronenakzeptor, der dort ein *c*-Typ-Cytochrom ist. In frühen Untersuchungen mittels EPR- und FTIR-Spektroskopie wurde festgestellt, dass bei der MBH, ähnlich wie in Standardhydrogenasen, Signale für zwei [4Fe-4S] Cluster und ein [3Fe-4S] Cluster detektierbar sind (Knüttel *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1983). Nur zwei wesentliche Unterschiede konnten in spektroskopischen Untersuchungen im Vergleich mit O<sub>2</sub>-sensitiven Standardhydrogenasen festgestellt werden: Das Fehlen des Ni<sub>u</sub>-A-Zustandes und ein verbreitertes EPR-Signal (Split Signal) des [3Fe-4S] Clusters, das auf eine Kopplung mit einem unbekanntem paramagnetischen Zentrum hindeutet (Saggu *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 1983). Als Möglichkeiten für letzteres wurde die Kopplung des [3Fe-4S] Clusters mit einem unbekanntem paramagnetischen Zentrum in der großen Untereinheit diskutiert, ähnlich zum Beispiel dem zusätzlichen Fe-Atom in der *D. baculatum* [NiFeSe]-Hydrogenase (Garcin *et al.*, 1999). Da allerdings der Abstand dieses Metallatoms zum medialen Cluster relativ groß ist, wird eine Modifikation des proximalen Fe-S Clusters angenommen, der diesem Metallzentrum paramagnetische Eigenschaften verleiht (Saggu *et al.*, 2009). Das Fehlen des Ni<sub>u</sub>-A-Zustands wird mit dem Brückenligand erklärt, der sich bei O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen im oxidierten Zustand von dem des Brückenligands in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen unterscheidet, wobei die molekularen Ursachen dafür unbekannt sind. Ein weiterer Unterschied zu Standardhydrogenasen ist das große Arsenal an akzessorischen Proteinen, die für die Maturation der Hydrogenase, insbesondere für den Einbau der metallischen Cofaktoren unter aeroben Bedingungen, notwendig sind. Bei O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen sind bis auf die Hyp-Proteine A-F, die für den Einbau der CN<sup>-</sup>-Liganden des [NiFe]-Zentrums zuständig sind (Blokesh *et al.*, 2004; Reissmann *et al.*, 2003; Roseboom *et al.*, 2005), keine weiteren akzessorischen Proteine zu finden (Rousset *et al.*, 1998a). Das *R.e.* MBH-Operon hingegen kodiert für sieben weitere akzessorische Proteine, die für das lithoautotrophe Wachstum in Gegenwart von O<sub>2</sub> mit der MBH als alleiniger energieliefernder Hydrogenase notwendig sind (Lenz *et al.*, 2005).

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit: Die Aufklärung der O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH aus *Ralstonia eutropha***

Vor dem Hintergrund, dass regenerative Energien durch den Mangel an Rohstoffen und die Umweltproblematik bei der Nutzung von herkömmlichen Energieträgern immer mehr in den Fokus der Öffentlichkeit rücken, wird auch H<sub>2</sub> als ein Energieträger der Zukunft angesehen. Da die Herstellung von H<sub>2</sub> momentan aber einen energieaufwändigen Schritt darstellt, muss nach alternativen Produktionsmethoden gesucht werden. Hydrogenasen sind durch ihre bidirektionale Aktivität sowohl in Richtung H<sub>2</sub>-Produktion (Friedrich *et al.*, 2011; Ghirardi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Lubner *et al.*, 2010a; Tran *et al.*, 2010), als auch in Richtung H<sub>2</sub>-Oxidation (beispielsweise in biologischen Brennstoffzellen (Vincent *et al.*, 2006)) interessant für die Anwendung in biotechnologischen H<sub>2</sub>-Prozessen. Bei vielen Anwendungen ist eine hohe O<sub>2</sub>-Toleranz der Hydrogenasen eminent wichtig. So erscheint nur mit O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen eine nicht physikalisch getrennte, molekulare Kopplung an das O<sub>2</sub>-produzierende Photosystem II sinnvoll (Krassen *et al.*, 2009; Schwarze *et al.*, 2010). Auch die angesprochene biologische Brennstoffzelle kann nur dann als eine kompartmentfreie Einheit, in der die beiden Elektroden nicht durch eine Membran getrennt sind, verwirklicht werden, wenn die eingesetzte Hydrogenase O<sub>2</sub>-tolerant ist (Vincent *et al.*, 2006). Die O<sub>2</sub>-Toleranz der Hydrogenasen aus *R. eutropha*, insbesondere die hohe O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH, ist dabei von hohem Interesse - nicht zuletzt auch durch die gute genetische Manipulierbarkeit von *R. eutropha*, die einerseits die experimentelle Praxis erleichtert, andererseits aber auch eine Optimierung des Enzyms möglich macht. Bisher ist nicht gänzlich geklärt, auf welchen molekularen Mechanismen die nur selten anzutreffende O<sub>2</sub>-Toleranz von solchen Hydrogenasen beruht. Ein verengter, hydrophober Gaskanal der für O<sub>2</sub> undurchlässig ist, wie bei der RH, konnte durch Mutationsstudien für die MBH ausgeschlossen werden (Ludwig *et al.*, 2009a; Saggi *et al.*, 2010). Die vermeintlich O<sub>2</sub>-Toleranz vermittelnden, zusätzlichen Cyanid-Liganden am aktiven Zentrum der SH, mittlerweile als Artefakt dis-

kutiert (Horch *et al.*, 2010), wurden für die MBH nie in Betracht gezogen. Durch Punktmutationen in der ersten und zweiten Sphäre des aktiven Zentrums (Ludwig, 2008; Ludwig *et al.*, 2009a), wurde auch nicht nachgewiesen, dass die O<sub>2</sub>-Toleranz durch eine strukturelle Modifikationen am aktiven Zentrum mediiert wird. In dieser Arbeit wurde der Fokus daher auf die kleine Untereinheit HoxK und insbesondere die Umgebung der Fe-S Cluster gelegt. Durch Punktmutationen sollte die Rolle der Aminosäureumgebung der Fe-S Cluster im Hinblick auf die katalytische Funktion des Enzyms untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei die Herkunft des bei der EPR-Spektroskopie auftretenden Split-Signals um das [3Fe-4S] Clustersignal beim Enzym im isolierten (oxidierten) Zustand, das bei O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen nicht auftritt. Eine Aufschlüsselung der molekularen Mechanismen der O<sub>2</sub>-Toleranz einer energiekonservierenden [NiFe]-Hydrogenase kann von herausragender Bedeutung bei der biotechnologischen Herstellung von O<sub>2</sub>-toleranten, optimierten Hydrogenasen und beim Entwurf und der Synthese von neuartigen synthetischen Modellverbindungen sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Stämme und Plasmide

**Tabelle 2:** In dieser Arbeit verwendete Stämme und Plasmide

Stamm	Charakteristika	Referenz
HF210	pHG1 <sup>-</sup>	(Kortlüke und Friedrich, 1992)
HF388	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ )	(Massanz, 2000)
HF403	MBH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxK$ )	(Bernhard, 1996)
HF531	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), MBH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxG$ )	(Bernhard, 2000)
HF532	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), MBH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxK$ )	(Bernhard, 2000)
HF542	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK^{H187A}$	(Bernhard, 2000)
HF543	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK^{H187C}$	(Bernhard, 2000)
HF544	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK^{C252S}$	(Bernhard, 2000)
HF632	pHG1 <sup>-</sup> , pLO6, MBH-Operon auf pEDY309	(Lenz <i>et al.</i> , 2005)
HF800	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK^{C19G/C120G}$	Diese Arbeit
HF801	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK^{C19G}$	Diese Arbeit
HF802	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK^{C120G}$	Diese Arbeit
HF804	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK_{strepTag II}$	Diese Arbeit
HF805	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK_{strepTag II}^{C19GC120G}$	Diese Arbeit
HF806	pHG1 <sup>-</sup> , pGE709 in HF210, $hoxK_{strepTag II}^{C19S}$	Diese Arbeit
HF807	pHG1 <sup>-</sup> , pGE710 in HF210, $hoxK_{strepTag II}^{C120S}$	Diese Arbeit
HF808	pHG1 <sup>-</sup> , pGE711 in HF210, $hoxK_{strepTag II}^{C149S}$	Diese Arbeit
HF809	pHG1 <sup>-</sup> , pGE712 in HF210, $hoxK_{strepTag II}^{C20S}$	Diese Arbeit
HF881	pHG1 <sup>-</sup> , pGE745 in HF210, $hoxK_{strepTag II}^{H187G}$	Diese Arbeit
HF956	HF532 pCM 62_ $hoxK$	Diese Arbeit
HF957	HF403 pCM 62_ $hoxK$	Diese Arbeit
HF953	pCH1286 ( $hoxZ_{strepTag II}$ ) in HF 800	Diese Arbeit
HF955	HF388 $hoxK^{P242C}$	Diese Arbeit
HF772	HF210 $hoxK^{H187C}$	(Schwarze, 2010)
HF899	SH <sup>-</sup> ( $\Delta hoxH$ ), $hoxK_{strepTag II}^{C17S}$	Diese Arbeit
JM 109	F' <i>traD36 lacIq Δ(lacZ)M15 proA+B+/e14-(McrA-) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nalr) endA1 hsdR17(rK- mK+) relA1 supE44 recA1</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
S17-1	Tra+ <i>recA pro thi hsdR, chr::RP4-2</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)

Plasmid	Charakteristika	Referenz
p#1573	pBluescript HoxKG	Lenz, unveröffentlicht
pEDY309	RK2 <i>ori</i> , Tc <sup>r</sup> , Mob <sup>+</sup>	(Kleihues <i>et al.</i> , 2000)
pCH774	Litmus28 <i>hoxK</i> <sup>H187A</sup>	(Bernhard, 2000)
p#1037	<i>hoxKGZMLOQRT</i> auf Litmus 28	Lenz, unveröffentlicht
pCH1229	<i>hoxKGZ</i> auf Litmus 28	Ludwig, unveröff.
pCH1286	pLO2 <i>HoxZ<sub>strep</sub></i>	(Schubert, 2007)
pCH1306	<i>hox'KG'</i> auf Litmus 28	Ludwig, unveröff.
pCH1307	<i>hox'K<sub>strep</sub>G'</i> auf Litmus 28	Ludwig, unveröff.
pCH1485	QuikChange PCR von p#1573 mit Primer #793 and 794	Diese Arbeit
pCH1486	QuikChange PCR von p#1573 mit Primer #795 and 796	Diese Arbeit
pCH1487	1007-bp AatII-NdeI Fragment aus pCH1486 in 3956 bp AatII-NdeI Fragment von pCH1485	Diese Arbeit
pCH1488	QuikChange PCR von p#1573 mit Primer #803 and 804	Diese Arbeit
pCH1489	QuikChange PCR von p#1573 mit Primer #799 and 800	Diese Arbeit
pCH1490	QuikChange PCR von p#1573 mit Primer #797 and 798	Diese Arbeit
pCH1491	QuikChange PCR von p#1573 mit Primer #801 and 802	Diese Arbeit
pCH1492	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1485 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1493	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1486 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1494	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1487 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1495	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1488 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1496	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1489 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1497	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1490 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1498	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1491 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1499	787-bp Bsu36I-XcmI Fragment aus pCH 1485 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1500	787-bp Bsu36I-XcmI Fragment aus pCH 1486 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1501	787-bp Bsu36I-XcmI Fragment aus pCH 1487 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1502	787-bp Bsu36I-XcmI Fragment aus pCH 1488 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1503	787-bp Bsu36I-XcmI Fragment aus pCH 1489 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1504	787-bp Bsu36I-XcmI Fragment aus pCH 1490 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1505	787-bp Bsu36I-XcmI Fragment aus pCH 1491 in p#1037	Diese Arbeit
pCH1543	QuikChange PCR von p#1573 mit Primer #812 and 813	Diese Arbeit
pCH1544	1179-bp Bsu36I-Acc65I Fragment aus pCH 1543 in p#1037	Diese Arbeit
pGE713	2523-bp PstI-BstZ17I Fragment aus pCH1494 in pLO2	Diese Arbeit
pGE714	2490-bp PstI-BstZ17I Fragment aus pCH1499 in pLO2	Diese Arbeit
pGE715	2490-bp PstI-BstZ17I Fragment aus pCH1500 in pLO2	Diese Arbeit
pGE716	2490-bp PstI-BstZ17I Fragment aus pCH1501 in pLO2	Diese Arbeit
pGE709	pEDY309 HoxK <sub>strepTag</sub> <sup>C19S</sup>	Diese Arbeit
pGE710	pEDY309 HoxK <sub>strepTag</sub> <sup>C120S</sup>	Diese Arbeit
pGE711	pEDY309 HoxK <sub>strepTag</sub> <sup>C20S</sup>	Diese Arbeit
pGE712	pEDY309 HoxK <sub>strepTag</sub> <sup>C149S</sup>	Diese Arbeit
pGE745	pEDY309 HoxK <sub>strepTag</sub> <sup>H187G</sup>	Diese Arbeit
pGE717	2523-bp PstI-BstZ17I Fragment aus pCH1494 in pLO2	Diese Arbeit
pGE758	1066 bp AfeI/SmaI Fragment aus Tth111I/NdeI kloniertem pCH774~pCH1229 in PmeI pLO2	Diese Arbeit
pGE759	<i>hoxK</i> <sup>P242</sup> CGZ auf pLO2	Diese Arbeit
pGE756	1919-bp PstI-Acc65I Fragment aus p# 1788 in pCM62	Diese Arbeit
pGE757	1952-bp PstI-Acc65I Fragment aus p# 1573 in pCM62	Diese Arbeit

## Material und Methoden

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Primer

Primer	Designation	Sequenz
3	hoxG_fw	GAGCGTCCCAAGGAGCAGCTTGAGTA
9	hoxK_5'_fw_1	GGTTGGCGCATCGCGACGAATGCCAA
388	hoxK_rev	CGGTACAAACACCGCAGATGCG
390	hoxK_fw	AAGGTCCCAGGGGTGCCCTCCG
459	hoxG_int_Z_rev	CGCCTATAGCCAAGCCGTTGCCG
793	hoxK_MBHC19G_fw	GTCTCGAATGTACCGGTTGCTCGGAATCGTTCATTTCG
794	hoxK_MBHC19G_rev	AATGAACGATTCCGAGCACCAGGTACATTTCGAGACCGTGC
795	hoxK_MBHC120G_fw	TCCTGCGCATCCTGGGGAGGTGTACAGGCAGCCAAACC
796	hoxK_MBHC120G_rev	TTTGGCTGCCTGTACACCTCCCCAGGATGCGCAGGAACC
797	hoxK_C19S_fw	CTCGAATGTACCTCGTGTCTCGGAATCGTTCATTTCGC
798	hoxK_C19S_rev	CGAATGAACGATTCCGAGCACGAGGTACATTTCGAGAC
799	hoxK_C120S_fw	TCCTGCGCATCCTGGGGATCCGTGCAGGCAGCC
800	hoxK_C120S_rev	GCTGCCTGCACGGATCCCCAGGATGCGCAGGAAC
801	hoxK_C149S_fw	ATTATCAAGGTCCCAGGGTCTCCTCCGATTGCC
802	hoxK_C149S_rev	GCAATCGGAGGAGACCCCCGGGACCTTGATAATC
803	hoxK_C20S_fw	CACGGTCTCGAATGTACCTGCTCCTCGGAATCGTTCATTTCGC
804	hoxK_C20S_rev	CGAATGAACGATTCCGAGGAGCAGGTACATTTCGAGACCGTGC
805	hoxK_P242C_fw	GCTGGAACGAGGGGACGAGTTTCTGCATTTCAGTCGGGCCACGGTTG CTCCACCACGC
806	hoxK_1420_XcmI_rev	GCAACCAATGCAACCGTGGCCCCGACTGAATG
807	hoxK_H187G_fw	GGCCGAAGATGTTCTATAGCCAGCGCATCGGCGACAAATGCTACCG GCGTCC
808	hoxK_RM_fw	CCACATCCTTAGGACTGGGACCTTC
809	hoxK_RM_BstBI_fw	CGTCTGCGATCAAGCGTGCTTCGAAGAAGAACG
810	hoxK_RM_BstBI_rev	GCTGGTTTTCGTTCTTCTTCGAaGCACGCTTGATCG
811	hoxK_5'_fw_2	AGGGCGGTATCGCTCCCCGGTTG
812	hoxK_C17S_fw	TGGCTGCACGGTCTCGAGTCGACCTGTTGCTCG
813	hoxK_C17S_rev	CGAATGAACGATTCCGAGCAACAGGTCTGACTCGAGACCGT

## 2.2 Nährmedien

Als synthetisches Nährmedium zur Kultivierung von *R. e.* wurde ein nach Friedrich (Friedrich *et al.*, 1981a) modifiziertes Mineralmedium auf der Basis von Schlegel (Schlegel *et al.*, 1961) eingesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit H16-Puffer (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) auf 7,0 eingestellt. Als Mineralsalze wurden Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (0,02 % [w/v]), CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O (0,001 % [w/v]), FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O (5 x 10<sup>-4</sup> % [w/v]) sowie 1 µM NiCl<sub>2</sub> zugesetzt. Als Stickstoffquelle diente NH<sub>4</sub>Cl (0,2 % [w/v]). Für heterotrophe Anzuchten enthielt das Medium Fruktose als Kohlenstoffquelle (0,4 % [w/v]; FN-Medium) bzw. Fruktose und Glycerin für Hydrogenaseproduktion (je 0,2 % [w/v]; FGN-Medium). Für chemolithoautotrophes Wachstum wurde eine Gasphase mit 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub> (v/v/v) eingestellt. Gegen Ende dieser Arbeit wurde unter neuen

Sicherheitsvorkehrungen eine Mischung von 3 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % O<sub>2</sub> und 77 % N<sub>2</sub> (Gase: Air Liquide) und ansonsten wie im Ergebnisteil beschrieben erstellt. Die mixotrophe Kultivierung erfolgte in FGN-Medium unter derselben definierten Gasatmosphäre. Als Komplexmedien wurden LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl/L), LSLB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 2,5 g NaCl/L) und NB-Medium (8 g Nutrient Broth/L) eingesetzt. Feste Medien enthielten 1,5 % (w/v) Agar. Antibiotika wurden für selektive Medien in folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin (Amp), 100 µg/ml (für feste Medien) und 50 µg/ml (für Flüssigmedien, jeweils aus einer Stammlösung mit 100 mg des Natriumsalzes pro ml ultrapurem Wasser (UPW)). Kanamycin (Kan), 25 µg/ml für *E. coli* und 400 µg/ml für *R. e.* (jeweils aus einer Stammlösung mit 100 mg Kanamycinsulfat/ml UPW). Tetrazyklin (Tet), 10 µg/ml (flüssige Medien) bzw. 15 µg/ml (feste Medien, Stammlösung: 10 mg Tetrazyklin-Hydrochlorid/ml 80 % Ethanol (v/v)).

### 2.3 Zellanzucht und -ernte

Die Anzuchten in geringem Volumen erfolgten im Reagenzglas mit 2 ml Medium oder im 100 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml Medium. Die Inkubation verlief unter 100 Upm bei 30 °C. Zur Gewinnung von Zellen zur Hydrogenaseaktivitätsmessung wurden die Anzuchten in 500 ml Schikanenkolben mit 100 - 166 ml Medium für 48 h bei 30 °C durchgeführt. Die Hauptkulturen wurden mit 1 % Inokulum aus einer frühstationären Vorkultur beimpft. Für Wachstumsversuche unter definierten Gasgemischen wurden die Schikanenkolben in einem Exsikator, begast nach Aufbau eines Vakuums mit einer ILMVAC MPC 601 Membranpumpe, inkubiert. Die Gase (Air Liquide) wurden über eine Dräger Gaszapfanlage mit Gummischlauch und Sterilfilter eingeleitet, und besaßen eine Reinheit von 99,999 %. Großanzuchten von *R. e.* Stämmen erfolgten im 10 L Fermenter (Biostat MD, Braun, Germany). Das autoklavierte Fermentergefäß wurde mittels Druckluft über einen Sterilfilter (Millidisk 10, Millipore, USA) mit Medium beschickt. Die Zugabe wäßriger NiCl<sub>2</sub>- und FeCl<sub>3</sub>-Lösungen erfolgte

## Material und Methoden

separat. Angeimpft wurde 2 %ig mit einer frühstationären Vorkultur. Die Großanzucht verlief bei 30 °C, 400 Upm des Rührers und einer Begasungsrate von 0,4 Vvm (Vol. Luft pro Vol. Medium pro Minute). Die Bildung von Schaum wurde, wenn erforderlich, durch Zugabe (1 Tropfen) eines 1:1 Gemisches von Polypropylenglycol (P200, Fluka, Germany) und Ethanol verhindert. Die Zellernete erfolgte nach 48 h Wachstum bei einer OD<sub>436nm</sub> zwischen 9 und 12. Kulturvolumen um die 100 ml wurden in der Laborzentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus, Germany) bei 3500 x g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Bei Kulturgrößen von 10 L erfolgte die Ernte in einer Sorvall-Kühlzentrifuge RC-5C (Thermo, USA) unter Einsatz eines GS-3 Rotors für 20 min bei 10000 x g und 4 °C. Bestand der Bedarf, wurden die Zellen mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0 (K-PO<sub>4</sub> Puffer) gewaschen. Die gewonnene Zellmasse wurde entweder direkt aufgearbeitet oder für die spätere Verwendung im Falle kleinerer Mengen bei -20 °C eingefroren, größere Ernten wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 2.4 Wachstumsmessung

Das Wachstum der Kulturen wurde per Trübungsmessung verfolgt. Die Messung der OD erfolgte mittels eines Spektralphotometers (U-2000, Hitachi, Japan) bei einer Wellenlänge von 436 nm für *R. e.* und 600 nm für *E. coli*. Zu bestimmende Zellsuspensionen wurden dabei so verdünnt, dass ein gemessener Wert von 1 nicht überschritten wurde.

### 2.5 Stammhaltung

Zur Kurzlagerung wurden Stämme auf Selektionsplatten (LB-Medium für *E. coli*, FN-Medium für *R. eutropha*) mit Antibiotikum kultiviert und bei 4 °C bis zu 4 Wochen gelagert. Zur längeren Konservierung wurden Stämme mit entsprechendem Antibiotikum angezogen und steriles Glycerin (20% [v/v] Endkonzentration) hinzugegeben. Diese Kulturen wurden in Kultivierungsröhrchen

mit Schraubverschluss bei -80 °C gelagert. Die Entnahme von Zellen für Vorkulturen geschah durch Abkratzen des tiefgefrorenen Materials mit einer Impföse.

## 2.6 Zellaufschluss und Fraktionstrennung

Das nach der Ernte erhaltene Zellpellet wurde 1:2 bis 1:4 mit K-PO<sub>4</sub> Puffer pH 7,0 verdünnt und durch Rühren oder Aufziehen mit einer Glaspipette resuspendiert und mit einer Spatelspitze DNase I (Roche, Germany), sowie für die anschließende Reinigung mit einer Tablette Proteaseinhibitor (Roche) versetzt. Mittels zweimaliger Passage dieser Suspension durch eine vorgekühlte French-Press Zelle (SLS Aminco, USA) bei 4,1 MPa (900 psi bei der Zelle für niedrige Volumina bis 2 ml, 1100 psi bei einer Zelle für Volumina bis 30 ml) und anschließender, 2-minütiger Ultraschallbehandlung bei Stufe 2,5 und 75 % Puls (Sonifier B15, Branson Sonic Power; Danbury, USA) erfolgte der Aufschluss der Zellen. Die Zelltrümmer wurden durch niedrigtourige Zentrifugation (3500 x g, 20 min, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand (Rohextrakt) wurde entnommen und per Ultrazentrifugation (~ 90.000 x g, 30 - 45 min, 4°C; Sorvall Ultra Pro 80 je nach Volumen mit den Festwinkelrotoren T1270, T865 oder T647,5 [Thermo, USA]) in löslichen Extrakt und die Membranfraktion separiert. Der resultierende Überstand bildete den löslichen Extrakt. Das Pellet wurde zum Waschen im Zentrifugenröhrchen mit einem abgerundeten Glasstab homogenisiert und mit 1:5 (w/v) K-PO<sub>4</sub> Puffer pH 7,0 resuspendiert und erneut einer Ultrazentrifugation unterzogen. Das hieraus gewonnene Pellet wurde 1:1 bis 1:2 (w/v) K-PO<sub>4</sub> Puffer pH 7,0 verdünnt und mit einem Glasstab oder einem Homogenisator homogenisiert, die Suspension stellte die Membranfraktion. Zur Gewinnung der periplasmatischen Fraktion, der Membranfraktion und des Cytoplasmas von *R. e.* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Probst & Schlegel (1976) vorgegangen. Es wurden 50 ml FGN-Kulturen nach 48 h bei 30 °C geerntet (3500 x g, 20 min, 4 °C) und jeweils einmal mit 20 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 und 20 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 0,5 M Saccharose gewaschen. Im Folgenden wurde das Pellet mit dem isotonischen Puffer 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 0,5 M Saccharose,

## Material und Methoden

der jetzt zusätzlich 2 mM EDTA enthielt, resuspendiert (10 ml/g Pellet), der. Nach einer Inkubation von 10 min bei 30 °C, gefolgt von einer Inkubation von 15 min bei 30 °C unter Zugabe von Lysozym (10 mg/g Feuchtzellen; Merck, USA), wurden die entstandenen Sphaeroplasten mittels niedrigtouriger Zentrifugation (3500 x g, 20 min, 4 °C) abgetrennt und der gewonnene Überstand als Periplasma bezeichnet. Die Sphaeroplasten wurden mit dem isotonischen Puffer gewaschen und danach osmotisch, durch die Resuspendierung in 10 mM K-PO<sub>4</sub> Puffer, pH 7,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (5 ml/g Feuchtzellen) unter Zugabe von DNaseI, aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden per niedrigtouriger Zentrifugation abgetrennt und der Überstand durch Ultrazentrifugation in das Cytoplasma und die Membranfraktion separiert (siehe oben). In diesem Verfahren wurde die Membranfraktion mindestens zweimal mit K-PO<sub>4</sub> Puffer gewaschen.

### **2.7 Proteinbestimmung**

Der Proteingehalt in Lösungen wurde mit dem BCA<sup>TM</sup>-Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA, (Redinbaugh und Turley, 1986)) bestimmt. Die Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten, die in einem SpectraMax 340 Plattenleser (Molecular Devices, USA) ausgelesen wurden. Als Standardkurve wurden die parallel gemessenen Absorptionswerte von sieben Verdünnungen (0 bis 1000 µg/ml) einer BSA-Lösung (Pierce, Thermo Fisher Scientific oder Sigma-Aldrich, beide USA) eingesetzt.

### **2.8 Quantitative Bestimmung der Aktivität membrangebundener Hydrogenase mit Methylenblau**

Falls nicht anders angegeben, wurden bei allen Aktivitätsmessungen jeweils zwei Messungen aus zwei verschiedenen Anzuchten durchgeführt. Aus diesen wurde der Mittelwert errechnet, der zusammen mit der Standardabweichung, berechnet über Microsoft Excel, angegeben ist. Von allen Messwerten wurde, falls

feststellbar, der Betrag der Aktivität der Negativkontrolle (zum Beispiel durch die Aktivität der regulatorischen Hydrogenase) subtrahiert.

#### Photometrischer Assay

Die H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors Methylenblau wurde nach dem Protokoll von Schink & Schlegel (Schink und Schlegel, 1979) ausgeführt. 1,9 ml eines H<sub>2</sub>-gesättigten K-PO<sub>4</sub> Puffers (50 mM, pH7.0 für Membranextrakte, pH 5,5 für gereinigte MBH, bzw. wie im Text beschrieben) wurden in einer 3 ml Anaerobenküvette vorgelegt und mit 7,5 µl 50 mM Methylenblau-Lösung (in 50 mM K-PO<sub>4</sub> Puffer, pH 7.0) versetzt. Nach Zugabe von 10 µl einer 30 mM Natriumdithionit-Lösung (30 mM, H<sub>2</sub>-gesättigt) wurde die Reaktion durch 5-100 µl des Extraktes gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde bei 30°C mit einem Spektralphotometer (CARY 300 SCAN oder CARY 50, Varian, USA) bei 570 nm aufgezeichnet. Durch Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{570} = 13,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und der Proteinmenge der eingesetzten Probe konnte die Enzymaktivität bestimmt werden. Extinktionskoeffizienten für die bei der MBH-Heterotrimer eingesetzten Elektronenakzeptoren:

Durochinon:  $\epsilon_{255} = 12,72 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Menadion:  $\epsilon_{340} = 1,81 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,

Ubichinon Q<sub>0</sub>:  $\epsilon_{255} = 14,64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### Amperometrischer Assay mittels modifizierter Clark-Elektrode

Amperometrische Messungen wurden mit einer nach Wang et al. und Grüniger et al. (Grüniger *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1971) modifizierten Clark-Elektrode (S1 Electrode disk, Hansatech Instruments, UK) durchgeführt. Gesteuert und gemessen wurde über eine softwaregestützte Betriebseinheit (Oxygraph, Hansatech Instruments, UK). Die Lösungen wurden in eine Elektrodenkammer mit 2,5 ml Volumen (DW 2/2, Hansatech Instruments, UK) injiziert. Mit diesem Aufbau konnte sowohl die H<sub>2</sub>-Oxidation, als auch die H<sub>2</sub>-Produktion gemessen werden. Für die Oxidation wurde Methylenblau als Elektronenakzeptor verwendet. Nach Vorlage

## Material und Methoden

von 750  $\mu$ l K-PO<sub>4</sub>-Puffer des gewünschten pHs in die Elektrodenkammer wurden 750  $\mu$ l H<sub>2</sub>-gesättigter Puffer hinzugegeben. Durch den Anstieg in Skalenteilen nach Zugabe von gesättigtem Puffer und den Literaturwerten zur Löslichkeit von H<sub>2</sub> in Wasser (Wiebe und Gaddy, 1934; Wiebe *et al.*, 1932) konnte näherungsweise eine Eichung der Elektrode durchgeführt werden. Folgend wurde dem in die Elektrodenkammer vorgelegten Puffer 20  $\mu$ l 50 mM Methylenblau in K-PO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,0 zugesetzt, woraufhin mindestens eine Minute die Nullgerade aufgenommen, um deren Steigung von der Aktivität zu subtrahieren. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms. Für die H<sub>2</sub>-Produktion wurde Methylviologen als Elektronendonator eingesetzt. In einer mit einem Serumstopfen luftdicht verschlossenen Küvette wurde 1,3 ml K-PO<sub>4</sub> Puffer des gewünschten pH-Wertes vorgelegt und mit 10  $\mu$ l 1 M Methylviologen, sowie 100  $\mu$ l 1 M Natrium-Dithionit versetzt und für mindestens 10 min. mit N<sub>2</sub> begast. Die Lösung wurde in die Elektrodenkammer injiziert und die Messung nach mindestens 1 min. Aufnahme der Basislinie gestartet. Die Lösung in der Elektrodenkammer wurde stets mit 900 rpm gerührt.

### **2.9 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE**

Die Proteine wurden per diskontinuierlicher PAGE unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) folgend aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration lag für die Sammelgele bei 4 % und für die Trenngele zwischen 10-15 %. Für analytische Zwecke wurden Minigele (10 x 8 x 0.1 cm) in der Vertikalgelkammer MTV-1 der Firma cti (Idstein, Germany) verwendet. Vor dem Beschicken der Gele wurden die Proteinproben mit 1/5 Volumen 6-fach konzentrierten Probenpuffers (0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 33% (v/v) Glycerin, 0.6 M DTT, 10% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 37 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 10-60 mA (Netzgerät ECPS 3000/150, Pharmacia) in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Molekulargewichtsstandards wurden der "Prestained Protein Marker,

Broad Range" (6-175 kDa; New England Biolabs, USA) und der "Precision Plus Protein Dual Color Standard" (10-250 kDa; BIO-RAD, USA) eingesetzt.

## **2.10 Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel**

Die Visualisierung von Proteinbanden im Polyacrylamidgel erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Wilson (Wilson, 1983). Hierzu wurden die Gele für 10-30 min in einer Färbelösung (425 ml 96% (w/v) Ethanol, 100 ml Essigsäure, 50 ml Methanol, 42 ml H<sub>2</sub>O, 2,0 g Coomassie Brilliant Blue R-250 und 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G-250 [SERVA, Germany]) geschwenkt. Zur Herstellung der Entfärbelösung wurde 250 ml Methanol und 50 ml Essigsäure mit 700 ml H<sub>2</sub>O aufgefüllt, entfärbt wurde für mindestens 16 h unter kontinuierlichem Schwenken.

## **2.11 Immunoblot**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in denaturierender PAGE wurden diese im Semi-Dry-Blotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran (BioTrace NT, Pall, USA) übertragen, wobei das Puffersystem nach Towbin benutzt wurde (Towbin *et al.*, 1979). Das SDS-Gel, die Nitrocellulosemembran und das Filterpapier wurde im Sandwichverfahren auf dem Semi-Dry Blotgerät (PEQLAB PerfectBlue™ SemiDry Electrobloetter Sedec™) angeordnet, die Spannung wurde je nach Gesamtfläche der Gele eingestellt (Kyhse-Andersen, 1984). Die Kontrolle der erfolgten Proteinwanderung geschah durch reversibles Anfärben der Proteinbanden mittels Ponceau-Rot (0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure; SERVA, Germany). Durch wiederholtes Waschen der Blotmembran mit UPW konnte der Farbstoff wieder entfernt werden.

## **2.12 Immunologische Detektion der Proteine**

Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die Blotmembran für mindestens 30 min in Blockpuffer (3 % Skim Milk Powder [Fluka, Germany] in TBST-Puffer

## Material und Methoden

[20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20]) geschwenkt. Eine mindestens 30-minütige Inkubation mit primärem Antikörper (Verdünnung 1:500-1:10000 in TBST-Puffer) schloss sich an. Danach wurde dreimal für 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und eine wiederum mindestens 30-minütige Inkubation mit sekundärem Antikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG-Alkalische Phosphatase Konjugat (dianova, Germany), Verdünnung 1:20000 in TBST-Puffer) folgte. Anschließend wurde die Membran zweimal in TBST-Puffer und einmal in Entwicklungspuffer ohne Tween-20 für jeweils 5 min gewaschen. Für die Farbreaktion wurden die Reagentien BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (Roth, Germany), 50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid) und NBT (p-Nitroblautetrazoliumchlorid (AppliChem, Germany; 100 mg/ml in 70 % Dimethylformamid) stets frisch 1000-fach in Entwicklungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) verdünnt. In diesem Farbstoffgemisch wurde die Membran inkubiert, wobei die Alkalische Phosphatase BCIP zu einem violett erscheinenden Indigofarbstoff umsetzte. Durch Waschen mit UPW wurde die Farbreaktion gestoppt.

### 2.13 Proteinreinigung

Die Isolierung von *Strep*-TagII Fusionsproteinen basiert auf der reversiblen Wechselwirkung der *Strep*-TagII Aminosäuresequenz (WSHPQFEK) mit *Strep*-Tactin (IBA, Germany; (Skerra und Schmidt, 2000)). Alle Arbeitsschritte erfolgten gekühlt (4 °C). Tiefgefrorene Zellen (5-60 g) wurden 1:1 in Puffer A (100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und per French-Press aufgeschlossen. Durch anschließende Ultrazentrifugation wurden die Zelltrümmer und die Membranfraktion vom löslichen Extrakt abgetrennt. Zur Isolierung der MBH aus der löslichen Fraktion von *R. e.* wurde diese mit in Puffer A equilibriertem *Strep*-Tactin Superflow (Kapazität: 1 ml bindet 50-100 nmol; IBA, Germany) Material versetzt und für 1 h unter Schwenken inkubiert. Übertragen in einen leeren Säulenkörper wurde das entstandene Säulenbett mit 10 Volumen Puffer A gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution

erfolgte durch Zugabe von 3 Säulenvolumen Puffer C (Puffer A + 5 mM Desthiobiotin (Sigma, USA)). Die Fraktionen zu je 0,5 ml wurden in Eppendorfgläsern gesammelt. Nach der Auswertung der Zusammensetzung einzelner Fraktionen per SDS-PAGE wurde das Eluat per Ultrafiltration (Amicon Ultra Centrifugal Filter Units, 10-30 kDA; Millipore, USA) eingeeengt, mit flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C oder in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert. Zur Anreicherung der MBH aus der Membranfraktion wurde diese nach der dem Zellaufschluss folgenden Ultrazentrifugation, dem Pellet der Zelltrümmer als braune, weiche Masse aufliegend mit Hilfe eines Spatels abgenommen und in einen Homogenisator aus Glas (Ochs, Germany) überführt. Zum Waschen wurden 100 ml Puffer A + Proteaseinhibitor (Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail; Roche, Germany) zugesetzt, homogenisiert, ultrazentrifugiert und in 5ml Puffer A + Proteaseinhibitor + 2 % (v/v) Triton X114 pro mg Membran homogenisiert. Die Solubilisierung der Membran fand unter 2 h Rühren auf Eis statt, danach wurde ultrazentrifugiert. Für die Solubilisierung der MBH-Trimers wurde 1 % Digitonin verwendet (Serva, Heidelberg) Das Protokoll der Reinigung unter Verwendung von Strep-Tactin Superflow-Material deckte sich in den folgenden Schritten mit dem Vorgehen für die Proteinisolierung aus dem löslichen Extrakt.

#### **2.14 Test auf H<sub>2</sub>-Produktion von Kolonien auf Agarplatten**

Mindestens 24 h bei 30 °C inkubierte FN-Kulturen wurden auf FN-Platten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten an die Arbeitsgruppe Happe/Hemschemeier der Ruhr-Universität Bochum geschickt, wo sie zwei weitere Tage bei 30 °C gelagert wurden. Danach wurden die Kulturen einem Anaerobenshift durch Inkubation in einem Anaerobenzelt mit reiner N<sub>2</sub>-Atmosphäre ausgesetzt und Platin/Wolframoxid-Filme auf die Agarplatten appliziert. Eine blaue Verfärbung des Films deutete auf eine H<sub>2</sub>-Produktion hin, da H<sub>2</sub> - über den Platinfilm katalysiert - eine Reduktion und somit eine Blaufärbung des Wolframoxids (WO<sub>3</sub>) auslöst.

### **2.15 Standardtechniken für die Arbeit mit Nukleinsäuren**

#### **2.15.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen**

Hitzebeständige Geräte und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Geräte wurden mit 70 % Ethanol und sterilem UPW gespült. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.

#### **2.15.2 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch Messung in einem Spektrophotometer für Mikrovolumen (Nanodrop) bei 260 nm. Zur Feststellung des Reinheitsgrades wurde außerdem die Absorption bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  liegt für reine DNA um 1,8 (Sambrook und Russell, 2001), Proteinverunreinigungen lassen diesen Wert geringer ausfallen, andere Verunreinigungen (RNA) lassen ihn höher ausfallen. Bei einer Abweichung von mehr als 20 % wurde die DNA gereinigt (Invitek DNA purification kit) oder erneut isoliert.

#### **2.15.3 DNA-Fällung**

DNA lässt sich aus wässrigen Lösungen hoher Ionenstärke durch Zugabe organischer Lösungsmittel fällen. Hierzu wurde die Probe mit 0,1 Volumen 3 M N-Acetat Lösung (pH 6,5) versetzt und danach mit 2,5 Volumen 96 % Ethanol gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei -20 °C wurde der Ansatz für 5 min bei  $> 14000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 10 min vakuumgetrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

#### **2.15.4 DNA-Restriktionsspaltung**

Die Spaltung von DNA mittels spezifischer Endonukleasen (New England Biolabs, Fermentas) wurde in 30  $\mu$ l Ansätzen durchgeführt, die Zugabe von Puffer und BSA richtete sich nach dem Herstellerprotokoll. Die Inkubationszeit betrug

zwischen 1 und 18 h bei optimaler Temperatur. Bei Spaltung mit zwei Enzymen gleichzeitig (Doppelverdau) wurden dem Ansatz beide Enzyme zugesetzt, falls die Aktivität beider unter den gewählten Bedingungen noch mindestens 2000 U/ml betrug. Traf das nicht zu, wurden die Reaktionen nacheinander mit dem Puffer durchgeführt, der vom Hersteller empfohlen wurde. Nach dem ersten Restriktionsverdau wurde dabei eine Fällung oder Gelextraktion durchgeführt.

#### **2.15.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Zur Vermeidung von intra- und intermolekularer Ligation von per Restriktionspaltung behandelter Vektor-DNA wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch spezifische Dephosphorylierung entfernt. Hierzu wurde dem Restriktionsansatz 1 U Alkalische Phosphatase (Alkaline Phosphatase Calf Intestinal (CIP), New England Biolabs) beigefügt.

#### **2.15.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Trennung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in horizontalen Gelkammern (Werkstätten der FU und HU Berlin). Der Ansatz eines Gels enthielt 0,7 - 3 % (w/v) Agarose (Invitrogen, Germany) in TPE-Puffer (80 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,6, 8 mM EDTA). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von maximal 150 V. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit 0,2 - 0,5 Volumen Schwerelösung (33 % (v/v) Glycerin in TPE-Puffer, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt. Zur Detektion der DNA-Banden wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (2µg/ml) inkubiert. Die Sichtbarmachung der markierten DNA erfolgte mittels eines UV-Transilluminators bei 254 nm. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde 2-Log DNA Ladder (0,1–10,0 kb; New England Biolabs, USA) eingesetzt.

### 2.15.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Gewinnung der DNA aus einem Agarosegelstück wurde das "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Qiagen, Germany) verwendet und nach Handbuch verfahren.

### 2.15.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligierung von DNA-Fragmenten geschah in 30  $\mu$ l ~~An~~ätzen. Es wurden etwa 0,5-1  $\mu$ g DNA in Ligase-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1-2 U T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, USA) entweder für 1-2 h bei Raumtemperatur (im Falle glatter DNA-Enden) oder über Nacht oder länger bei 4-16 °C inkubiert. Wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, die Fragmente produzierten, die eine geringe Ligationseffizienz aufwiesen oder konnte nur wenig Fragment isoliert werden (weniger als 15 ng/ $\mu$ l DNA), wurde hochkonzentrierte Ligase (NEB, Invitrogen) eingesetzt.

### 2.15.9 DNA-Präparation

#### Plasmidisolierung in analytischem Maßstab

Für analytische Plasmidaufarbeitungen (modifiziert nach Birnboim & Dooley, 1979) wurden 1,5 ml einer Übernacht-Kultur in einem Reaktionsgefäß geerntet und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 $\mu$ l Lösung I (25 mM Tris - HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 mg/ml RNase) resuspendiert. Die alkalische Lysis erfolgte durch Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % [w/v] SDS). Durch Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung III (3 M K -Acetat, pH 4,8) wurden die Plasmide renaturiert und Proteine präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (15000  $\times$  g, 3 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA nach Zugabe von 1000  $\mu$ l eiskaltem absolutem Ethanol abzentrifugiert (15000  $\times$  g, 7 min). Das nach Waschen mit 70 % [w/v] Ethanol erhaltene Pellet wurde im Vakuum getrocknet und wurde anschließend in 50  $\mu$ l

UPW aufgenommen. Alternativ wurden diverse Plasmidreinigungskits benutzt (EurX, Invitex, Qiagen, Jena Analytics)

#### Plasmidisolierung in präparativem Maßstab

Zur Isolierung einer großen Menge an reinem, RNA-freiem Plasmidmaterial wurde das Qiagen Tip 100 Kit benutzt und nach Handbuch verfahren.

### **2.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zur *in vitro* Amplifikation doppelsträngiger DNA-Fragmente (Mullis & Faloona, 1987) wurde ein DNA Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research, USA) eingesetzt. Nach dem initialen Aufschmelzen der DNA für 3 - 5 min bei 94-96 °C wurden 25 bis 30 Zyklen der anschließenden aufeinanderfolgenden Schritte wiederholt: 1 min, 96 °C zur Trennung des DNA-Doppelstrangs, 1 min 50 - 65 °C zur Anlagerung der Primer (die genaue "Annealing"-Temperatur orientierte sich an der Schmelztemperatur eingesetzter Primer und wurde mit dem Programm Primer 3 berechnet (Rozen und Skaletsky, 2000)) und 1 min/kbp zu amplifizierendes Fragment bei 68 - 72 °C (je nach eingesetzter Polymerase). Abschließend wurde zum Auffüllen unvollständiger Amplifikate für 5 min bei 68 - 72 °C inkubiert. Die Zusammensetzung folgte den Empfehlungen der Protokolle der Hersteller-Polymerase (Taq-Polymerase, Invitrogen; Long Amp Polymerase, NEB). Für PCR-Produkte die bei der Klonierung eingesetzt wurden, wurde VENT oder Platinum DNA-Polymerase mit 3'→5' Korrekturfunktion und dadurch bedingter herabgesetzter Mutationshäufigkeit eingesetzt. Die PCR wurde auch zum Nachweis von per homologer Rekombination in das genetische Material von *R. e.* eingeführten Modifikationen verwendet. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommenes Koloniematerial in 100 µl UPW aufgenommen und für 10 min gekocht. 3 µl dieses Zell-Lysats wurden unmittelbar nach diesem Schritt in einem PCR-Standardansatz eingesetzt. Zur Detektion der eigentlichen Modifikation im resultierenden DNA-Fragment schloß sich dann eine Agarosegelelektrophorese an, der,

## Material und Methoden

falls erforderlich, eine DNA-Restriktion vorausging. Oligonukleotide wurden über das Molekularbiologische Labor Dr. Martin Meixner (Berlin, Germany) von Sigma-Genosys (USA) bezogen.

### 2.17 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde DNA aus 2 ml ÜN-Kultur über die Methode nach Birnboim und Dooley oder über ein Extraktionskit (Jena Analytics oder Invitex) nach Herstellerangaben isoliert. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) und wurde durch das Molekularbiologische Labor Dr. Martin Meixner (Berlin, Germany) durchgeführt. Die Analyse von Sequenzdaten erfolgte unter Nutzung der Software FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). Für die Suche nach homologen Sequenzen in einer Datenbank wurde das Programm BLAST (Altschul *et al.*, 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) verwendet. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe von BioEdit (Hall, 1999) und ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) erstellt.

### 2.18 Plasmidtransfer

#### 2.18.1 Transformation

Die Transformation erfolgte über Hitzeschock (Hanahan, 1983). Zum Einsatz bei Transformationen kamen die *E. coli*- Stämme JM 109 und S17-1 (siehe Tab. 1). Hierzu wurden 150 ml LB mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur beimpft und für 3 h bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 inkubiert. Vor der Ernte der Kultur wurde diese für 5 min auf Eis abgekühlt. Die niedertourige Zentrifugation der Zellen erfolgte in einem sterilen Zentrifugenröhrchen bei 4 °C und das resultierende Zellpellet wurde in 45 ml kaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Na-Acetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8, sterilfiltriert) resuspendiert. Nach Inkubation der Zellen auf Eis für 60 min wurde erneut abzentrifugiert und das Zellmaterial in 6 ml eiskaltem TFB2-Puffer

(10 mM MOPS/KOH, pH 6,8, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Die somit chemisch-kompetenten Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße in 200 µl aliquotiert und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen für mehrere Monate erfolgte bei -80°C. Für die eigentliche Transformation wurden mindestens 50 ng DNA (Ligationsansätze oder isolierte Plasmide) in einem Volumen von maximal 15 µl zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben. Das Gemisch wurde 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurde der Transformationsansatz kurz auf Eis inkubiert, anschließend mit 1 ml Psi-broth (LB Medium, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl) versetzt und für 30 min bis 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden dann auf jeweiligen LB-Selektivmedien ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.18.2 Konjugation

Die Konjugation wurde durch "Agar Spot Mating" (Friedrich *et al.*, 1981b) durchgeführt. Hierbei wurden mobilisierbare Plasmide aus dem Donatorstamm *E. coli* S17-1, der die Transferegene (*tra*) des Plasmids RP4 im Chromosom trägt, in den Rezipientenstamm *R. e.* übertragen. Die beiden entsprechenden Stämme wurden über Nacht in jeweils 10 ml LB- (*E. coli*) bzw. NB-Medium (*R. e.*) mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Die über Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, RT) gewonnenen Zellpellets wurden in jeweils 5 ml sterilem H16-Puffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in je 1 ml H16-Puffer aufgenommen. Je 0,2 ml dieser Zellsuspensionen wurden auf einer LSLB-Platte gemischt und ausplattiert. Nach 4 bis 12-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Zellmaterial mit einer sterilen Glaspipette abgenommen und in 5 ml H16-Puffer resuspendiert. Je 0,1 ml geeigneter Verdünnungsstufen (10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-3</sup>) wurden auf FN-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und etwa 72 h bei 37 °C inkubiert. Aus einer Konjugation hervorgegangene *R.e.*-Rekombinanten mit integrierten Suizidplasmiden wurden auf Kanamycin- und/oder Tetrazyklinhaltigen FN-Platten selektiert. Aus den resistenten Isolaten wurden über Reini-

## Material und Methoden

gungsausstrich gewonnene Einzelkolonien in 10 ml NB-Medium ohne Antibiotikum bei 30 °C über Nacht inkubiert. Nach der Ernte der Kulturen und einem Waschschrift mit 5 ml H16-Puffer wurden die Zellen in geeigneten Verdünnungsstufen ( $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$ ) auf Selektiv-Medium (LB mit, falls erforderlich, entsprechendem Antibiotikum und 15 % (w/v) Saccharose) ausplattiert. Die Klone mit weiterhin präsentem *sacB*-Gen können unter diesen Bedingungen kein Wachstum zeigen. Wachsende, Saccharose-resistente Rekombinanten hingegen, welche den konditional-letalen Plasmidteil durch die zweite Rekombination wieder verloren hatten, wurden auf FN-Agarplatten (wenn erforderlich mit entsprechendem Antibiotikum) gereinigt. Für den Austausch von Allelen durch doppelte homologe Rekombination wurden die Vektoren pLO1 und pLO2 (Lenz *et al.*, 1994) verwendet. Diese Vektoren basieren auf dem ColeI-Replikon und tragen neben dem *neo*-Gen für eine Kanamycinresistenz (pLO1 und pLO2) auch das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis*, das für eine Laevan-Saccharase codiert. Die pLO-Vektoren sind von *E. coli* S17-1 nach *R. e.* mobilisierbar (*mob+*), können aber nur nach der Integration in das Genom des Rezipienten stabil replizieren.

### 2.19 Ortsspezifische Mutagenese nach dem Quikchange-Protokoll

Der Austausch von Aminosäuren wurde durch ortsgerichtete Mutagenese nach dem Quikchange-Protokoll (Stratagene, USA) durchgeführt. Die komplementären, überlappenden Primer wurden so ausgewählt, dass die veränderten Basen von mindestens je 10 Basenpaaren in 3'- und 5'-Richtung flankiert wurde. Ferner wurde darauf geachtet, dass ein GC-Gehalt von 40 % nicht unterschritten wurde und am 3'-Ende ein C oder G vorlag. Die Schmelztemperatur betrug optimalerweise zwischen 78 und 85 °C. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion entsprach der von Standard-PCR-Reaktionen (siehe 2.16), wobei die Templatmenge zwischen 10 und 100 ng betrug. Als Polymerase wurde entweder *PfuTurbo* oder *PfuUltra* (Stratagene, USA) benutzt. Die initiale Aufschmelzung wurde für 30 s bei 95 °C durchgeführt, danach folgten 12 (bei Austausch eines Nucleotids) bis 16 (bei Austausch von zwei bis drei Nucleotiden) Zyklen mit 30 s

Aufschmelzung bei 95 °C, anschließend 1 min. Annealing bei 55 °C und die abschließende Elongation für 1 min. pro kb Plasmid bei 68 °C. Nach der PCR wurde 1 µl Dpn I pro 50 µl-Ansatz hinzugefügt, um das ursprüngliche, unmutierte Plasmid abzubauen. Die erhaltene DNA wurde in JM 109 transformiert (siehe 2.18.1), wobei 1 bis 5 µl Template verwendet wurde.

## 2.20 Gentechnische Konstruktionen

Der Austausch von Aminosäuren wurde entweder nach dem QuikChange<sup>TM</sup> Site Directed Mutagenesis Protokoll durchgeführt oder über die Amplifizierung des gewünschten Genabschnittes über PCR mit punktmutagenen Primern. Die anschließende Klonierung des Amplifikats in Plasmid pCH1229 erfolgte dabei via enthaltenen, oder über stille Mutagenese eingefügten Schnittstellen. Der Austausch der Cysteine am proximalen Cluster (C17, C19, C20, C120 und C149) wurde über die erstgenannte Methode ausgeführt. Für den C19G-Austausch wurde Primerpaar #793/794 verwendet, für den C120G-Austausch #795/796, für den C19S-Austausch #797/798, für C120S #799/800, sowie #801/802 für C149S, das Primerpaar #803/804 für den C20S-Austausch und #812 und 813 für den C17S-Austausch. Eine Übersicht über die verwendeten Primer gibt Tabelle 3. Als Ursprungplasmid wurde pCH#1573 verwendet, das HoxK mit C-terminal fusioniertem Strep-TagII auf pBluescript-Basis enthält. Der Austausch von P242C und von H187G wurde über PCR-Fragmente eingeführt. Hierfür wurde der entsprechende Genabschnitt von HoxK mit genomischer *R.e.* H16 DNA als Template mit den Primerpaaren #805/806 (P242C-Austausch) und #807/806 (H187G-Austausch), amplifiziert und anschließend über die Schnittstellen XcmI und PflMI in das Plasmid pCH1306 (ohne Strep Tag), bzw. pCH1307 (mit Strep Tag) und von dort mit Tth111I und NdeI in pCH1229 kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden BmgBI und PstI verdaut und in CIP-behandelten, PstI und EcoRV geschnittenen pLO2 ligiert, pGE745 und pGE759 entstanden.

Alle Plasmide mit den entsprechenden enthaltenen mutierten Abschnitten wurden über Sequenzierung mit den Primerpaaren #390/388 oder, wenn der

## Material und Methoden

mutagenisierte Bereich in der ersten Hälfte von HoxK vor dem #390-Abschnitt lag, Primerpaar #9/388 auf die enthaltene Mutation sowie Fehler überprüft. Die aus der QuikChange Mutagenese resultierenden Plasmide pCH1485 bis pCH1491 wurden mit Bsu36I und Acc65I (zur Herstellung eines Plasmids mit Strep-Tag an HoxK) oder XcmI (zur Herstellung eines Plasmids ohne Strep Tag) verdaut, die 1179 bp (mit Strep-Tag) oder 787 bp (ohne Strep Tag) lange Fragmente lieferten. Diese wurden in entsprechend verdautes pCH1351 ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide pCH 1494 bis 1505 wurden mit PstI und BstZ17I verdaut, was 2490 bp-Fragmente (strep Tag freie Variante) und 2523 bp-Fragmente (für die Variante mit Strep Tag) lieferte. Diese Fragmente wurden in den PstI/PmeI geschnittenen Suizidvektor pLO2 ligiert. Daraus resultierende Plasmide pGE699 bis pGE706 wurden über doppelt homologe Rekombination (Lenz *et al.*, 1994) in den SH-freien MBH-Wildtypstamm HF388 gebracht. Die Doppelmutation C19G/C120G wurde über eine Klonierung der C120G-Mutation in das Plasmid pCH1485 generiert. Dazu wurde pCH1486 mit AatII/NdeI geschnitten, was ein 1007bp-Fragment mit der C120G-Mutation lieferte. Dieses wurde in ebenso geschnittenen pCH1485 (3956bp Fragment) ligiert, was das Plasmid pCH1487 hervorbrachte. Dieses wurde nach oben stehender Klonierungsstrategie subkloniert und schließlich als pGE707 in HF388 gebracht, der resultierende Stamm war HF800. Durch homologe Rekombination von Plasmid pCH1286 in diesen Stamm entstand HF953 mit HoxK<sup>C19G/C120G</sup>HoxZ<sub>strep</sub>. Die HoxK<sub>strep</sub>-Variante wurde wie oben Bus36I/Acc65I in pCH1351 kloniert. Die Cystein-Serin-Mutationen wurden über das Plasmid pEDY309 in ein Überexpressionssystem gebracht. Dazu wurden die Plasmide pCH1495-1498 mit SpeI und BstZ17I verdaut und die resultierenden 2588bp Fragmente in ebenso geschnittenes pCH785 ligiert. Aus den resultierenden Plasmiden wurde über einen SpeI/XbaI-Verdau 21,6kbp Fragmente herausgeschnitten, die dann in pEDY309 ligiert wurden. So entstanden die Plasmide pGE709-712 mit breitem Wirtsspektrum die daraufhin über Konjugation in den megaplasmidfreien *R. eutropha*-Stamm HF210 transferiert wurden. Die resultierenden Stämme waren HF806-809. Die Frameshiftmutation in pCH774, dem

Ausgangsplasmid für HoxK<sup>H187A</sup> wurde entfernt, indem besagtes Plasmid mit Tth111I und NdeI verdaut wurde und so ein Fragment ohne enthaltene Mutation erhalten wurde. Dieses wurde in pCH1229 ligiert, welches mit AfeI und SmaI verdaut wurde und anschließend in PmeI-geschnittenes pLO2 ligiert wurde (pGE758). Dieses wurde mit HF388 rekombiniert.

## **2.21 Computerbasierte Methoden**

### **2.21.1 Geldokumentation und Datenverarbeitung**

Gefärbte Polyacrylamid-Gele, Immunoblots und Agarplatten wurden zur Dokumentation mit Hilfe eines Scanners oder einer Digitalkamera digitalisiert. Im Zuge der Bildbearbeitung, welche mit der Software Photoshop (Adobe, USA) erfolgte, wurden Tonwert, Helligkeit, Sättigung und Kontrast variiert.

### **2.21.2 Multiple Sequenzvergleiche**

Multiple Sequenzvergleiche von Aminosäuresequenzen wurden über ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) mit Hilfe des Programms BioEdit (Hall, 1999) erstellt, wobei die Anzahl der Bootstraps 1000 betrug. Die Aminosäuresequenzen wurden über die ncbi-Proteindatenbank abgerufen.

### **2.21.3 Kladogramm-Erstellung**

Kladogramme wurden nach Erstellung von multiplen Sequenzvergleichen (siehe 2.21.2) über das Programm DAMBE (Xia und Xie, 2001) erstellt und mit Hilfe von Dendroscope (Huson *et al.*, 2007) visualisiert. Der phylogenetische Baum wurde mit der FastME-Methode (Desper und Gascuel, 2004) erstellt, wobei der initiale Baum über den GME Algorithmus und Treeswapping mittels BNNI (balanced) Algorithmus generiert wurde. Die evolutionäre Aminosäuredistanz wurde nach der Methode von Grishin (Grishin, 1995) berechnet.

### 2.21.4 Komparative Proteinstrukturmodellierung

Die in-silico-Modellierung der MBH-Struktur wurde von Dr. Matthias Stein (Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg) erstellt. Als Strukturtemplate diente die Kristallstruktur der *D. gigas* [NiFe]-Hydrogenase, 2frv, die über die Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000) abgerufen wurde. Die Modellierung wurde mit Modeller 8 (Sali und Blundell, 1993) über ein verfeinertes Protokoll (Gabdoulline *et al.*, 2007) durchgeführt, welches eine verbesserte Orientierung der Aminosäureseitenketten zur Folge hatte. Die Fe-S Cluster wurden manuell eingefügt. Die graphische Darstellung des Modells erfolgte mit PyMOL Molecular Graphics, Version 0.98, Schrödinger, LLC.

### 2.22 FTIR-Spektroskopie

FTIR Spektren wurden von Nina Heidary und Dr. Ingo Zebger an der TU Berlin mit einem Bruker Tensor 27 Spektrometer gemessen, ausgestattet mit einem durch flüssigen N<sub>2</sub> gekühlten MCT Detektor (Bruker, Deutschland) der eine spektrale Auflösung von 2 cm<sup>-1</sup> besitzt. Die Probenkammer wurde mit getrockneter Luft gereinigt, bevor die Probe in eine gasdichte Infrarotkammer für flüssige Proben (Volumen: ~ 7 µl, Weglänge: 50 µm) mit CaF<sub>2</sub>-Fenstern injiziert wurde. Die Temperatur in der Kammer wurde bei konstant 10 °C gehalten. Die gemessenen Spektren wurden mittels einer softwareimplementierten Funktion des Spektrometers über eine zuvor gemessene Basislinie korrigiert. Reduziert wurden die Proben durch eine halb- bis einstündige Inkubation in einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemperatur in einem gasdichten Zelt.

### 2.23 EPR-Spektroskopie

Für die EPR-Spektroskopie (durchgeführt von Dr. Miguel Saggiu an der TU) wurden Membranextrakte oder gereinigte MBH in einem Volumen von mindestens 120 µl luftblasenfrei in EPR-Röhrchen (3 mm innerer Durchmesser, Wilmad, USA) überführt und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren. Die Messungen (9,5 GHz X-

Band) wurden mit einem Bruker ESP300E Spektrometer mit einem rechteckigen Mikrowellenhohlraumresonator (Bruker, Deutschland) im TE<sub>102</sub>-Modus durchgeführt. Für Tieftemperaturmessungen wurde die Probe in einem Oxford ESR 900 Helium-Durchflusskryostaten (Oxford ITC4, Oxford Instruments, UK) gekühlt, was eine Temperatureinstellung zwischen 5 K and 100 K ermöglichte. Die Mikrowellenfrequenz wurde mit einem Frequenzzähler (EIP Microwave Inc., USA) gemessen. Zur Bestimmung der g-Werte wurde das magnetische Feld mit einem externen LiF-Standard kalibriert, der einen g-Wert von 2,002293 aufwies (Stesmans und Van Gorp, 1989).

Zur Spin-Quantifizierung wurde das doppelt integrierte Signal mit dem Signal eines CuSO<sub>4</sub>-Standard bekannter Konzentration verglichen. Basislinienkorrekturen wurden, falls benötigt, durch Subtraktion mit einem Hintergrundspektrum berechnet, das mit der jeweiligen Pufferlösung ohne Protein unter denselben experimentellen Bedingungen aufgenommen wurde. H<sub>2</sub>-reduziert wurden die Proben durch eine mindestens halbstündige Inkubation in einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemperatur in einem gasdichten Zelt.

## **2.24 Elektrochemie**

### **2.24.1 Elektrochemischer Messaufbau**

Durch die Eigenschaft der MBH, an Graphitelektroden zu adsorbieren und mit dieser Elektronen auszutauschen, war es möglich, elektrochemische Untersuchungen mit wenig Proteinmaterial und ohne künstlichen Elektronendonator- und akzeptor durchzuführen. Ferner erlaubte die Adsorption des Enzyms an PGE-Elektroden eine stufenlose Regulierung des Redoxpotentials und eine genaue Kontrolle über die Zusammensetzung der Gasatmosphäre. Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung desselben Enzymfilms für verschiedene aufeinanderfolgende Experimente, zum Beispiel Austausch des Puffers an der Elektrode, solange das Enzym Aktivität zeigte.

Die elektrochemischen Experimente wurden von Annemarie Wait an der Universi-

## Material und Methoden

ty of Oxford unter anaeroben Bedingungen in einer Glovebox ( $O_2 < 2$  ppm; M. Braun, Deutschland) unter  $N_2$ -Atmosphäre durchgeführt. Die rotierenden PGE-Scheibenelektroden (rotating disk electrodes, RDE) mit einer Fläche von  $0,03\text{ cm}^2$  waren an einen Elektrodenrotator (Autolab RDE, EcoChemie, Niederlande) befestigt der in einer speziell gefertigten, gasdichten elektrochemischen Glaszelle mit einer Platindraht-Gegenelektrode eingesetzt war. In einem Seitenarm befand sich eine gesättigte Calomel Referenzelektrode (Saturated Calomel Electrode, SCE) in  $100\text{ mM NaCl}$ , getrennt vom Hauptzellenkompartiment durch eine Haber-Luggin-Kapillare. Potentiale sind angegeben bezogen auf die Standardwasserstoffelektrode (SHE) mit der Angleichung von  $+242\text{ mV}$  ( $E_{SHE} = E_{SCE}$ ) bei  $25\text{ °C}$  (Bard und Faulkner, 2001). Gesteuert wurden die elektrochemischen Experimente mit dem Elektrochemie Analysator Autolab PGSTAT 128N, gekoppelt mit einer computer-gesteuerten NOVA software (EcoChemie, Niederlande).

### 2.24.2 Elektrodenpräparation

Als Vorbereitung für die Proteinfilmbeschichtung wurde die PGE Elektrode für  $30\text{ s}$  mit einer wässrigen  $\alpha$ -Aluminiumoxid-Suspension ( $1\text{ }\mu\text{m}$ , Buehler, Germany) poliert und für  $5\text{ s}$  in UPW (Millipore,  $18,2\text{ megaohm cm}$ ) ultraschallbehandelt. Anschließend wurde  $1,5\text{ }\mu\text{l}$  Enzym in einer Konzentration von  $0,2$  bis  $1\text{ }\mu\text{g}$  auf die Elektrode pipettiert, danach über eine Zeitspanne von  $10\text{ s}$  wiederholt abgenommen und erneut appliziert. Die Lösung wurde später von der Elektrodenoberfläche abgenommen und die Elektrode in enzymfreiem, gepuffertem Elektrolyt gelagert, um alle Enzyme denselben Bedingungen und gleichermaßen der strikten Regulierung des Potentials auszusetzen. In allen Experimenten wurde die Elektrode mit  $2500$  bis  $6000\text{ rpm}$  rotiert, um eine optimale Versorgung an Substrat und eine optimale Entsorgung an Produkt zu gewährleisten. Bei Experimenten mit niedrigen  $H_2$ -Konzentrationen wurde die Elektrodenspitze vorsichtig mit feuchter Baumwolle gereinigt, um die Enzymdichte und den damit zusammenhängenden Stofftransport von  $H_2$  zu reduzieren.

Die Versuche wurden bei konstanter Temperatur in 50 mM Na-PO<sub>4</sub>-Puffer (bei den jeweiligen benötigten pH-Werten) mit 100 mM NaCl (analytischer Grad, Fisher Scientific) als Elektrolyt durchgeführt. Der Gasfluß durch den Gasraum (Headspace) der elektrochemischen Zelle wurde bei jedem Experiment beibehalten. Je nach Bedarf wurden die Versuche unter reiner Gasatmosphäre (H<sub>2</sub>, Premier Grad, Air Products; N<sub>2</sub> O<sub>2</sub>, CO, BOC Gases) oder Mischungen aus den jeweiligen Gasen durch einen Massenflussregler (Smart-Trak Model 100 MFC, Sierra Instruments, USA), durchgeführt. Die Konzentrationen an O<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub> in Lösungen wurden mit dem entsprechenden Henry-Koeffizienten berechnet.

### 2.24.3 K<sub>M</sub>-Wert-Bestimmung

Die K<sub>M</sub>-Wert-Bestimmung mittels Proteinfilmvoltammetrie wurde nach einem modifizierten Protokoll von Léger *et al.* (Léger *et al.*, 2004) durchgeführt. Die mit Protein beschichtete Elektrode wurde in eine versiegelte elektrochemische Zelle, die mit einem bestimmten Puffervolumen befüllt war, gebracht, wobei der Headspace der Kammer mit N<sub>2</sub> geflutet wurde. Die Elektrode wurde mit einer konstanten Umdrehung von 500 bis 8000 rpm rotiert. Zu einer gegebenen Zeit  $t = 0$ , wurde ein bekanntes Volumen an H<sub>2</sub>-gesättigtem Puffer (mit zum Puffer in der elektrochemischen Zelle identischer Zusammensetzung und Temperatur) injiziert, was einen Anstieg des Stromflusses zur Folge hatte, was den Start des Experiments bedingte. Der N<sub>2</sub>-Fluss durch den Headspace verdrängte schließlich das H<sub>2</sub> sukzessive aus der Zelle. Unabhängig davon wurde die O<sub>2</sub>-Reduktion an der Elektrode nach Injektion und Ausspülung von O<sub>2</sub> mit N<sub>2</sub> bestimmt, was zeigte, dass der Gasaustausch einem exponentiellen Zeitverlauf folgte. So konnten die H<sub>2</sub>-Konzentrationen nach  $t = 0$  berechnet werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Multipler Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter [NiFe]-Hydrogenasen

Durch die große Anzahl an verfügbaren Datensätzen von sequenzierten prokaryotischen Hydrogenasen lag es nahe, die Aminosäuresequenz der membrangebundenen Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* mit der von anderen, ähnlich aufgebauten Hydrogenasen zu vergleichen. Insbesondere waren dabei die Differenzen der *R. e.* MBH zu O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen interessant, um Unterschiede in der Primärsequenz herauszustellen, die auf die Ursache der O<sub>2</sub>-Toleranz in der MBH hindeuten könnten.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Dissertation Anfang 2011 waren etwa 800 verschiedene Gene, die für [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppen 1 und 2 kodieren (siehe 1.2.2 und Tabelle 1), sequenziert. Die Auswahl von Aminosäuresequenzen für das multiple Alignment wurde auf diverse, experimentell untersuchte Vertreter von [NiFe]-Hydrogenasen beschränkt. Dabei wurden sowohl O<sub>2</sub>-tolerante Hydrogenasen aus Knallgasbakterien (Aragno und Schlegel, 1992), als auch möglichst viele O<sub>2</sub>-sensitive Standardhydrogenasen mit einbezogen (Abbildung 6). Eingesetzt wurde hierfür das Programm BioEdit, welches zum multiplen Aminosäurevergleich auf ClustalW zurückgreift (siehe 2.21.2). In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die kleine Untereinheit HoxK der MBH gelegt, da die Sequenz der großen Untereinheit HoxG schon in einer früheren Veröffentlichung mit der von anderen Hydrogenasen verglichen wurde (Ludwig, 2008). Der Sequenzvergleich basiert auf der Sequenz der maturen MBH, die um das N-terminale Signalpeptid trunkiert ist. Die Sequenz des C-terminalen, hydrophoben Membranankers wurde bei dem Sequenzvergleich ebenfalls nicht berücksichtigt, da dieser bei periplasmatischen Hydrogenasen z.B. aus Desulfurikanten nicht vorhanden ist, was den Sequenzvergleich der strukturellen Einheit erschweren würde.

# Dissertation, Tobias Goris, 2011

*RalEu\_HoxK* 1 METKP-RTPVLWLHGLECTCCSESFIRSAHPLAKDVVLSMISLDYDDTLMAAAGHQAEAI  
*RalMe\_HoxK* 1 MENKP-RTPVLWLHGLECTCCTEAFIRSAHPLAKDVVLSMISLDYDDTLMAAAGHQAEAI  
*OliCa\_HoxK* 1 METKP-RTPVLWLHGLECTCCSESFIRSAHPLVKDVVLSMISLDYDDTLMAAAGHQAEAA  
*RhoCa\_HupS* 1 METKP-RTPVVVWHGLECTCCSESFIRSAHPLAKDVVLSMISLDYDDTLMAAAGHAAEAAA  
*ParDe\_HydA* 1 METKP-RTPVIWVHGLECTCCSESFIRSAHPLAKDVVLSMISLDYDDTLMAAAGHAAEAAA  
*BraJa\_HupS* 1 LETKP-RVPVIWMHGLECTCCSESFIRSAHPLVKDAVLSMISLDYDDTIMAAAGHQAEAI  
*RhiLe\_HupS* 1 LETKE-RVPVIWMHGLECTCCSESFIRSAHPLVKDVVLSMISLDYDDTIMAAAGHQAESI  
*AquAe\_MbhS1* 1 METKP-RVPVLWIHGLECTCCSESFIRSATPLASDVVLSMISLEYDDTLSSAAAGEAVEKEH  
*EscCo\_HyaA* 1 LENKP-RIPVVWIHGLECTCCTESEFIRSAHPLAKDVILSLISLDYDDTLMAAAGTQAEV  
*AquAe\_MbhS2* 1 LEKKE-KPVVIWLEFODCAGCSESFIRSTLLPTEVLLDYISLEYHETLMAPSGFYAEAAA  
*ThiCa\_HynS* 1 LEQAK-RPSVIWLSFOECTGCTESLTRSHAPTLEDLILDVISLDYHHTLQAAAGDAAEHA  
*AllVi\_HynS* 1 LEQAR-RPSVIWLSFOECTGCTESLTRAHAPTLEDLILDVISLDYHHTLQAAASGEAAEAAA  
*EscCo\_HybO* 1 VTNPQ-RPPVWIHGAOECTGCTESLLRATHPTVENLVLETISLEYHEVLSAAFGHQVEEN  
*DesGi\_HynA* 1 LTAK-KRPSVVYLHNAECTGCSESLLRTPYVDELILDVISMDYHETLMAGAGAEVEEA  
*DesFr\_HynA* 1 LTAK-HRPSVVWLHNAECTGCTEAAIRTKPYIDALILDVISLDYQETIMAAAGDAAEAAA  
*DesVu\_HynA* 1 LMGP-RRPSVVYLHNAECTGCSESVLRAEPYIDTLILDVISLDYHETIMAAAGDAAEAAA  
*DesBa\_NiFeSe* 1 MTEGAKKAPVIWVQGGCTGCSVSLNNAVHPRIKEILLDVISLEPHETVMASEGEMALAH

*RalEu\_HoxK* 60 LEEIMTKYKGNYLAVEGNPPLNQDG-MSCIIIGGR-----PFIEQLKYVAKDAKA  
*RalMe\_HoxK* 60 LEEIMTKYKQYILAVEGNPPLNEDG-MFCIQSGK-----PFIDKLKHVAKDAKA  
*OliCa\_HoxK* 60 LADTIERYKGNYLAVEGNPPLNEDG-MFCIIIGGK-----PFVQDLRYAAKHAKA  
*RhoCa\_HupS* 60 FEETIAKYKGNYLAVEGNPPLNEDG-MFCITGGK-----PFVEKLRHAAEGAKA  
*ParDe\_HydA* 60 FKDTIQYKQYILAVEGNPPLNEDG-MYCITGGK-----PFVEKLRHAAARDAKA  
*BraJa\_HupS* 60 LEETRAKHKQYILAVEGNPPLNEGG-MFCIDGGK-----PFVEKLRKMAEDAMA  
*RhiLe\_HupS* 60 LAETKEKYKGYILAVEGNPPLNEGG-MFCIDGGK-----PFVEKLRKMAEDAMA  
*AquAe\_MbhS1* 60 RERIKEYWGNYLAVEGNPPLGEDG-MYCIIGGR-----PFVEILKESAEGAKA  
*EscCo\_HyaA* 60 FEDIITQYNGKYLAVEGNPPLGEQG-MFCISSGR-----PFIEKLRKRAAGASA  
*AquAe\_MbhS2* 60 REEAIKKYKGYLVVVEGSPPTADGG-VYCTVGGK-----SSVDILRETAEHAAF  
*ThiCa\_HynS* 60 REQAMAANPGEYLVIVDGSIPGDSNPGYSTVAGH-----SNYAMLMEVTENAAA  
*AllVi\_HynS* 60 RLQAMDENRGQYLVIVDGSIPGPDANPGFSTVAGH-----SNYSILMETVEHAAA  
*EscCo\_HybO* 60 KHNALEKYKQYLVVVDGSIPLKDNGLYCMVAGE-----PIVDHIRKAAEGAAA  
*DesGi\_HynA* 60 LHEAIKG-D--FVCGVIEGCIIPMGDGG-YWGKVGRR-----NMYDICAIEVAPKAKA  
*DesFr\_HynA* 60 LHQALEGKDG-YYLVVEGCLPTIDGG-QWGMVAGH-----PMIETTCKKAAAKAG  
*DesVu\_HynA* 60 LEQAVNSPHG-FIAVVEGCIPTAANG-IYGKVANH-----TMLDICSRIPLKAQA  
*DesBa\_NiFeSe* 61 MYEIAEKFNNGFFLLVEGAIPTAKEG-RYCIVGETLDAKGGHHEVTMMELIRDLAPKSLA

## C120

*RalEu\_HoxK* 109 IISWGS~~C~~ASWG~~C~~VQAAKNPTQATPVHKVITDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~AEVMTGVITYML  
*RalMe\_HoxK* 109 IIAWGS~~C~~ASWG~~C~~VQAAKNPTQATPIHKVITDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~PEVMTGVITYML  
*OliCa\_HoxK* 109 IISWGS~~C~~ASHG~~C~~VQAAKNPTQATPVHKVITDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~AEVMTGVITYML  
*RhoCa\_HupS* 109 IISWGA~~C~~ASYG~~C~~VQAAKNPTQATPVHKVITDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~AEVMTGVITYML  
*ParDe\_HydA* 109 IISWGA~~C~~ASYG~~C~~VQAAKNPTQATPVHKVITDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~AEVMTGVITYML  
*BraJa\_HupS* 109 IIAWGA~~C~~ASWG~~C~~VQAAKNPTQATPIDKVITNK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~AEVMTGVVTFIT  
*RhiLe\_HupS* 109 IIAWGA~~C~~ASWG~~C~~VQAAKNPTQATPIDKVITDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~AEVMTGVVTFIT  
*AquAe\_MbhS1* 109 VIAWGS~~C~~ASWG~~C~~VQAAKNPTTAVPIDKVIKDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~AEVMTGVIMYV  
*EscCo\_HyaA* 109 IIAWGT~~C~~ASWG~~C~~VQAAKNPTQATPIDKVIKDK----P~~I~~IKVPG~~C~~PP~~I~~PDVMSAITYMV  
*AquAe\_MbhS2* 109 VIAVGS~~C~~ASWG~~C~~IPKASNPTGAVPVYEVIVKDK----P~~V~~VNVPG~~C~~PP~~I~~GDVMVATIVHFL  
*ThiCa\_HynS* 110 VIAVGT~~C~~ATFG~~C~~LPANPNPTGAMSVMDLVKDK----P~~V~~INVSG~~C~~PP~~I~~PMVITGVIAHYL  
*AllVi\_HynS* 110 VIAVGT~~C~~AAFG~~C~~LPQARENPTGAMSVMDLVKDK----P~~V~~INVPG~~C~~PP~~I~~PMVITGVIAHYL  
*EscCo\_HybO* 109 IIAIGS~~C~~SAWG~~C~~VAAAGVNPTGAVSLQEVLPK----T~~V~~INIPG~~C~~PP~~N~~PHNFLATVAHII  
*DesGi\_HynA* 106 VIAIGT~~C~~ATYG~~C~~VQAAKNPTGTGVNEALGKLG---K~~A~~INIAG~~C~~PP~~N~~PMNFVGTVVHLL  
*DesFr\_HynA* 108 IICIGT~~C~~SAYG~~C~~VQAKPNPSQAKGVSEALG-----K~~T~~INIAG~~C~~PP~~N~~PNFVAVVHVL  
*DesVu\_HynA* 108 VIAVGT~~C~~ATFG~~C~~VQAAKNPTGAKGVNDALKHLG---K~~A~~INIAG~~C~~PP~~N~~PNLVGTIVYYL  
*DesBa\_NiFeSe* 120 TVAVGT~~C~~SAYG~~C~~IPAAEGNVTGSKSVRDFFADEKIEKLLVNVPG~~C~~PP~~H~~PDWVMTLVAAW

## Ergebnisse

		H187									
<i>RalEu_HoxK</i>	165	TFDR-----	IPELDRQGRPKMFYSQR	IEDKCYRRPHFDAGQFV	EEWDD	SARKGF	C	L	Y	K	
<i>RalMe_HoxK</i>	165	TFDR-----	IPELDRQGRPKMFYSQR	IEDKCYRRPHFDAGQFV	EAWDD	SARKGY	C	L	Y	K	
<i>OliCa_HoxK</i>	165	TFGK-----	LPELDRQGRPKMFYSQR	IEDKCYRRPHFDAGQFV	ESFDE	GARRGY	C	L	Y	K	
<i>RhoCa_HupS</i>	165	TFDR-----	MPELDRQGRPKMFYSQR	IEDKCYRRPHFDAGQFV	EHWDD	ENARKGY	C	L	Y	K	
<i>ParDe_HydA</i>	165	TFDR-----	MPELDRQGRPKMFYSQR	IEDKCYRRPHFDAGQFV	EHWDD	ENAKKGY	C	L	Y	K	
<i>BraJa_HupS</i>	165	TFGK-----	LPELDRQGRPKMFYSQR	IEDKCYRRPHFDAGQFV	EEWDD	EAAKGY	C	L	Y	K	
<i>RhiLe_HupS</i>	165	TFGK-----	LPELDRQGRPKMFYSQR	IEDKCYRRPHFDAGQFV	EEWDD	EAGKGY	C	L	Y	K	
<i>AquAe_MbhS1</i>	165	LFDR-----	IPPLDSQGRPKMFYGNRI	EDTCYRRSFFNAGQFV	EQFD	DEGAKK	G	W	C	L	Y
<i>EscCo_HyaA</i>	165	TFDR-----	LPDVRMGRPLMFYGR	IEDKCYRRAHFDAGEFV	QSWDD	DAARKGY	C	L	Y	K	
<i>AquAe_MbhS2</i>	165	ALGK-----	LPPLDELGRPKQFYGET	IEDRCYRRAFYNNSGQFA	ESFD	DEKARKGY	C	L	Y	K	
<i>ThiCa_HynS</i>	166	TFGR-----	LPELDRQGRPKMFYQSI	IEDRCYRRPFYDKGLEFA	KTFD	DEGARL	G	W	C	L	Y
<i>AllVi_HynS</i>	166	VFGR-----	LPELDGYRPLAFYQSI	IEDRCYRRPFYDKGLEFA	ESFD	DEGAKQ	G	W	C	L	Y
<i>EscCo_HybO</i>	165	TYGK-----	PPKLDKNRPTFAYGRI	IEHCERRPHFDAGRFA	EFGD	EGHREG	W	C	L	Y	H
<i>DesGi_HynA</i>	163	TKGM-----	ELDKQGRPVMFFGETV	EDNCPRLKHFEAGEFA	T	SFGS	P	E	A	K	G
<i>DesFr_HynA</i>	162	TKGIP-----	DLDENGRPKLYGELV	EDNCPRLPHFEASEFA	P	SFSE	E	E	A	K	G
<i>DesVu_HynA</i>	165	KNKAA-----	PELDSLNRPTMFFGQ	TEVIEQCPRLPHFDAGEFA	P	SFSE	E	E	A	K	G
<i>DesBa_NiFeSe</i>	180	SHVLNPT	EHPLPELDDGRPLL	FFGDNIE	ENCPYLDKYNSEFA	ETFT	KP	----	G	C	K

		P242																			
<i>RalEu_HoxK</i>	219	MGCKGPTTYNAC	STTRWNE-GTSE	PIQSGHG	CCIC	CS	SE	D	G	F	----	W	D	K	G	-	S	F	Y	D	R
<i>RalMe_HoxK</i>	219	VGCKGPTTYNAC	STVQWNE-GTSE	PIKAGHG	CCIC	CS	SE	D	G	F	----	W	D	K	G	-	S	F	Y	D	R
<i>OliCa_HoxK</i>	219	VGCKGPTTYNAC	STIRWNE-GTSE	PIQAGHG	CCIC	CS	SE	E	G	F	----	W	D	K	G	-	S	W	Y	A	G
<i>RhoCa_HupS</i>	219	MGCKGPTTYNAC	STVPLER-RRHF	PIQSGHG	CCIC	CS	SE	D	G	F	----	W	D	Q	G	-	S	F	Y	D	R
<i>ParDe_HydA</i>	219	MGCKGPTTYNAC	STVRWNE-GVSE	PIQSGHG	CCIC	CS	SE	D	G	F	----	W	D	Q	G	-	S	F	Y	D	R
<i>BraJa_HupS</i>	219	MGCKGPTTYNAC	STVRWNG-GVSE	PIQSGHG	CCIC	CS	SE	D	G	F	----	W	D	K	G	-	S	F	Y	D	R
<i>RhiLe_HupS</i>	219	MGCKGPTTYNAC	STVRWNG-GVSE	PIQSGHG	CCIC	CS	SE	D	G	F	----	W	D	N	G	-	S	F	Y	D	R
<i>AquAe_MbhS1</i>	219	VGCRGPTTYNSC	GNMRWYN-GLS	YPIQSGHG	CCIC	CA	EN	N	F	----	W	D	N	G	-	P	F	Y	E	R	
<i>EscCo_HyaA</i>	219	MGCKGPTTYNAC	SSTRWND-GVSE	PIQSGHG	CCIC	CA	EN	G	F	----	W	D	R	G	-	S	F	Y	S	R	
<i>AquAe_MbhS2</i>	219	LGCKGPITRNAC	ASMRWNG-GLS	YPIQSGH	PCFC	SE	P	D	F	----	W	D	R	G	-	F	I	Y	N	P	
<i>ThiCa_HynS</i>	220	LGCKGPTTYNAC	ATMRWND-GTSE	YVEAGH	PCLC	SE	P	R	F	----	W	D	A	G	-	G	F	Y	N	T	
<i>AllVi_HynS</i>	220	LGCKGPTTYNAC	ATMKWND-GTSE	YVEAGH	PCLC	SE	P	Q	F	----	W	D	A	G	-	G	F	Y	N	T	
<i>EscCo_HybO</i>	219	LGCKGPETYGN	STLQFCDVGGVWV	VAIGH	PCYGC	NE	E	G	I	G	----	F	H	K	G	-	I	H	O	-	
<i>DesGi_HynA</i>	216	LGCKGPDYNN	CPKQLFN--QVN	WVQAGH	PCIA	SE	P	N	F	----	W	D	L	Y	S	P	F	Y	S	A	
<i>DesFr_HynA</i>	215	LGCKGPVTYNN	CPKVLFN--QVN	WVQAGH	PCLC	SE	P	D	F	----	W	D	T	M	T	P	F	Y	E	Q	
<i>DesVu_HynA</i>	219	LGCKGPVTMNN	CPKIKFN--QTN	WVQAGH	PCIA	SE	P	D	F	----	W	D	A	M	T	P	F	Y	Q	N	
<i>DesBa_NiFeSe</i>	235	LGCKGPSTYAD	CAKRRWNN-GIN	WCVEN-AV	CI	CV	E	P	D	F	----	P	D	G	K	S	----				

**Abbildung 6:** Multipler Sequenzvergleich von verschiedenen membrangebundenen und periplasmatischen [NiFe]-Hydrogenasen.

Die oberen neun Zeilen werden von O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen besetzt, die nachfolgenden Zeilen von O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen. In roter Schrift sind dabei mutmaßlich O<sub>2</sub>-tolerante Hydrogenasen aus Knallgasbakterien markiert, in blauer Schrift per Proteinfilmvoltammetrie als O<sub>2</sub>-tolerant charakterisierte Hydrogenasen. Braun hinterlegt sind die vermutlich Fe-S Cluster ligandierenden Cysteine, rot die bei O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen konservierten Aminosäuren, die sich von denen in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen unterscheiden. Hierbei wurden Unterschiede zu funktionell ähnlichen Aminosäuren nicht berücksichtigt. Türkis hervorgehoben sind die zusätzlichen Cysteine bei O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen, hellblau das Prolin im medialen Fe-S Cluster Die N-terminale Leadersequenz und der C-terminale Membrananker von membrangebundenen Hydrogenasen wurden nicht in den Sequenzvergleich einbezogen. Abkürzungen: *RalEu*: *R. eutropha*, *RalMe*: *R. metallidurans*, *AzoVi*: *Azotobacter vinelandii*, *RhoCa*: *Rhodobacter capsulatus*, *ParDe*: *Paracoccus denitrificans*, *BraJa*: *Bradyrhizobium japonicum*, *RhiLe*: *Rhizobium leguminosarum*, *AquAe*: *Aquifex aeolicus*, *EscCo*: *E. coli*, *ThiCa*: *Thiocapsa roseopersicina*, *AllVi*: *Allochromatium vinosum*, *DesGi*: *D. gigas*, *DesFr*: *Desulfovibrio fructosovrans*, *DesVu*: *Desulfovibrio vulgaris*, *DesBa*: *Desulfitobacterium baculatum*

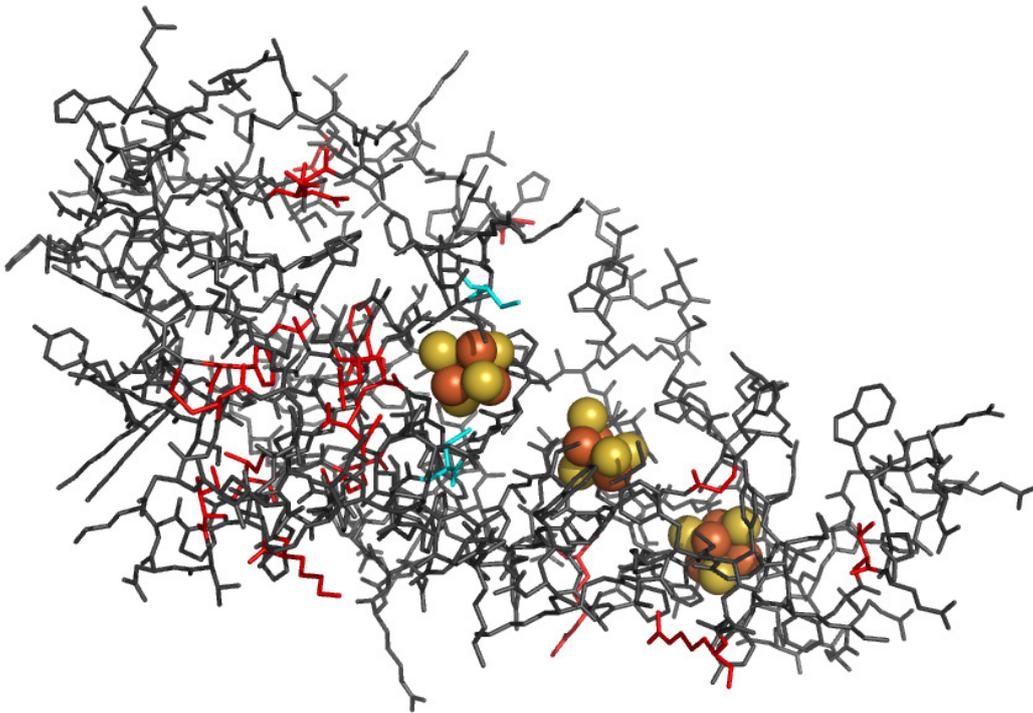
Schon bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen der großen Untereinheit HoxG wurde ein hoher Ähnlichkeitsgrad zwischen den unterschiedlichen [NiFe]-

Hydrogenasen aus Gruppe 1 und 2 festgestellt (Ludwig, 2008). Auch die kleine Untereinheit weist eine hohe Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen Sequenzen auf. Die Sequenz der am wenigsten zu HoxK verwandten Untereinheit, die der [NiFeSe]-Hydrogenase aus *D. baculatum*, besaß eine Sequenzidentität mit HoxK von 36 %. Zwanzig der Aminosäuren, die in O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen konserviert sind, sind in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen durch andere Reste ersetzt. Davon waren Ala74, Ile138, Ile153, Val202 und Gly248 chemisch nah verwandt zu den entsprechenden Aminosäuren bei O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen und wurden deswegen bei der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt, da eine geringe Aussicht auf eine funktionelle Bedeutung dieser Aminosäure bestand. Besonders auffällig waren bei der Betrachtung des Sequenzvergleiches zwei Cysteine, die nur wenige Aminosäurereste Abstand zu den das proximale Fe-S Cluster ligandierenden Cysteinen aufweisen (Abbildung 6). Cystein 19 befindet sich direkt neben dem bei allen Hydrogenasen konservierten Cystein 20, während Cystein 120 durch vier Aminosäuren vom konservierten Cys 115 getrennt ist. Beide Cysteine sind in Standardhydrogenasen jeweils durch Glycin ersetzt. Betrachtet man diese zusätzlichen Cysteine im Strukturmodell der MBH (Abbildung 7), wird deutlich, dass diese sich auch räumlich in unmittelbarer Nähe zum Fe-S Cluster befinden, in einem vergleichbaren Abstand (unter 3 Å) wie die koordinierenden Cysteine. Da in den meisten Standardhydrogenasen an dieser Stelle ein Glycin vorhanden ist, wurde ein Austausch der zusätzlichen Cysteine gegen Glycin vorgenommen, um den Einfluss der zusätzlichen Cysteine auf die O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH zu untersuchen.

Die anderen in O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen konservierten Aminosäuren, die in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen durch andere Reste ersetzt sind, wiesen keine Nähe zu einem der Fe-S Cluster auf und wurden nicht untersucht. Lediglich eine weitere Aminosäure fiel durch ihre räumliche Sonderstellung auf, das Asparagin an Position 78 in der zweiten Sphäre um das proximale Fe-S Cluster. Während das Asparagin in den O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen konserviert ist, steht an der gleichen Position in Standardhydrogenasen ein Serin oder Glycin. Ein Austausch des Asn

## Ergebnisse

78 wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt und physiologisch und biochemisch charakterisiert (Newie, 2010).



**Abbildung 7:** Konservierte Aminosäuren (rot) in kleinen Untereinheiten von O<sub>2</sub>-toleranten membranengebundenen Hydrogenasen. Zusätzliche Cysteine am proximalen Cluster in cyan, Eisenschwefelzentren sind als gelb-oranges Kugelmodell dargestellt. Für Methoden der Modellierung und Darstellung siehe 2.21.4.

Während die Aminosäureumgebung des proximalen Clusters mit zwei zusätzlichen Cysteinen Unterschiede zwischen [NiFe]-Hydrogenasen aufweist, ist die Umgebung des medialen und des distalen Fe-S Clusters bis auf wenige Ausnahmen in allen [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 2 hoch konserviert. Auffällig sind bei den meisten [NiFe]-Hydrogenasen ein Prolin in der Koordinationssphäre des medialen Fe-S Clusters und ein Histidin in der Koordinationssphäre des distalen Fe-S Clusters. Das Prolin ist bei allen [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 2 mit Ausnahme der [NiFeSe]-Hydrogenasen vorhanden. Bei diesen befindet sich an dieser Stelle ein Cystein (Voordouw *et al.*, 1989). Spektroskopische und röntgenkristallographische Untersuchungen ließen mutmaßen, dass das mediale Fe-S

Cluster bei allen Standardhydrogenasen ein [3Fe-4S] Cluster, bei [NiFeSe]-Hydrogenasen hingegen ein [4Fe-4S] Cluster ist (Garcin *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 1990).

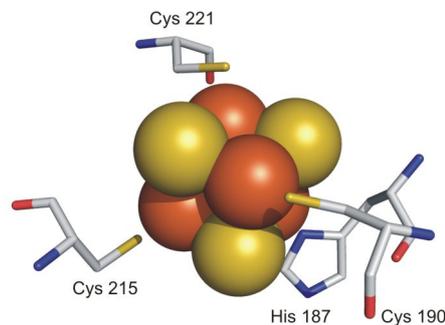
Das Histidin des distalen Clusters ist bei allen bisher kristallographisch untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen als Fe-Ligand des Fe-S Clusters beschrieben worden und es zeigt sich, dass das Histidin in allen Hydrogenasen der Gruppe 1 und 2 (Vignais *et al.*, 2001) konserviert ist. Um die Funktion des Histidins zu überprüfen wurde es in dieser Arbeit gegen Cystein und gegen die nicht Fe-S Cluster koordinierenden Alanin und Glycin ausgetauscht.

### **3.2 Austausch des Histidins des distalen Fe-S Clusters der MBH aus *Ralstonia eutropha* gegen Cystein, Glycin und Alanin**

Erste Untersuchungen des distalen Clusters der MBH aus *R. eutropha* wurden bereits früher durchgeführt (Bernhard, 2000). In diesen wurde das vermutlich koordinierende Histidin am distalen Fe-S Cluster gegen Cystein und Alanin ausgetauscht, um den Einfluss des Histidins auf die physiologische Funktion der MBH zu untersuchen. Diese Stämme wurden bislang nicht durch eine Sequenzierung auf eventuelle unerwünschte Mutationen, die während der PCR mit mutagenisierenden Primern durch Fehler bei der Amplifikation auftreten können, untersucht. Die Sequenzierung dieser Stämme wurde während dieser Dissertation nachgeholt. Während das Ausgangsplasmid pCH772 der HoxK\_H187C-Variante der membrangebundenen Hydrogenase korrekt mutagenisiert vorlag, wurde im Ausgangsplasmid pCH774, das für eine MBH-Variante mit HoxK\_H187A kodiert, eine Leserastermutation innerhalb *hoxK* entdeckt (siehe Abbildung 49). Durch eine erneute Klonierung wurde diese entfernt. Zusätzlich wurde das Histidin 187 gegen Glycin ausgetauscht (MBH<sup>H187G</sup>, im Folgenden wird eine entsprechende Schreibweise für alle MBH-Varianten mit einer Mutation in HoxK angewandt) hergestellt. Dies geschah vor dem Hintergrund, die MBH über einen Dithiolat-Linker als artifiziellen molekularen Draht an die PsaC-Untereinheit des

## Ergebnisse

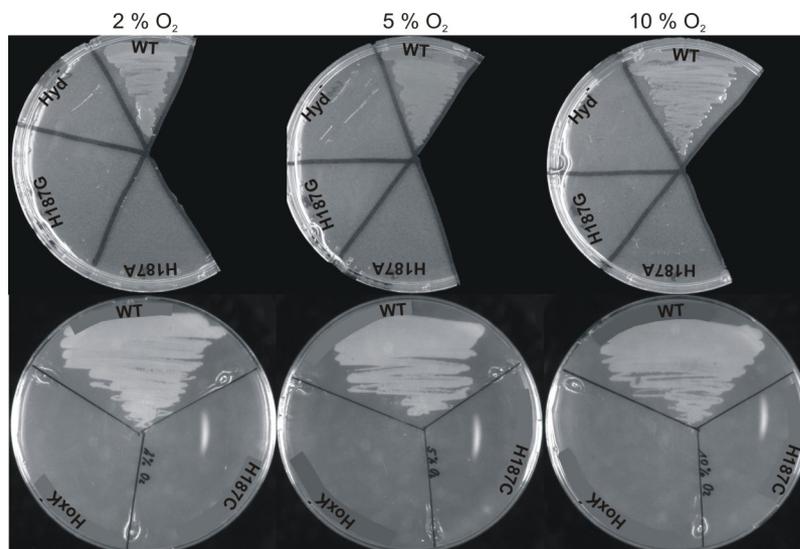
Photosystem I zu koppeln, mit dem Ziel, auf biologischem Weg mit Sonnenlicht und Wasser  $H_2$  herzustellen (Grimme *et al.*, 2009; Lubner *et al.*, 2010a; Lubner *et al.*, 2010b). Die Thiolgruppe sollte dabei das Cystein ersetzen, wodurch ein effizienter Elektronenaustausch möglich wäre. Da die Kopplung der Thiolgruppe des künstlichen Linkers an das Fe-S Cluster durch große Aminosäuren sterisch blockiert werden könnte, schien der Einsatz der MBH<sup>H187G</sup>, wo das Histidin durch die kleinste Aminosäure Glycin ersetzt wurde, für dieses Projekt am Vielversprechendsten.



**Abbildung 8:** Modellstruktur des distalen Fe-S Clusters von HoxK aus *R. eutropha* mit den ligandierenden Aminosäuren und ihrer jeweiligen Nummerierung.

Das lithoautotrophe Wachstum der MBH<sup>H187G/A/C</sup>-Mutanten mit  $H_2$  als Elektronendonator wurde in Gegenwart von 2 %, 5 % und 10 %  $O_2$  getestet. Hierzu wurden Agarplatten aus Minimalmedium in einem Wittschen Topf unter definierter Gasatmosphäre mit 80 %  $H_2$ , 10 %  $CO_2$  und den oben angegebenen Konzentrationen an  $O_2$  inkubiert. Das restliche Volumen wurde mit  $N_2$  aufgefüllt, die Inkubationszeit betrug bis zu eine Woche bei einer Temperatur von 30 °C. Als Positivkontrolle wurde HF388, ein SH-defizienter Stamm verwendet, bei dem sichergestellt ist, dass sein autotrophes Wachstum vollständig von der MBH abhängt (Massanz, 2000). Als Negativkontrolle wurde HF210, ein Stamm ohne das Megaplasmid pHG1, auf dem die Hydrogenasen kodiert werden, verwendet (Kortlüke und Friedrich, 1992). Unter keiner der getesteten  $O_2$ -Konzentrationen konnte lithoautotrophes Wachstum der Mutantensämme nachgewiesen werden

(Abbildung 9), während alle Mutanten bei heterotropher Anzucht das gleiche Wachstum wie der Wildtyp zeigten.



**Abbildung 9:** MBH-abhängiges lithoautotrophes Wachstum auf Mineralmediumagarplatten. Anzucht im Wittschen Topf mit 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und den angegebenen Konzentrationen an O<sub>2</sub>, wobei mit N<sub>2</sub> auf 100 % aufgefüllt wurde. WT: HF388, H187G: HF881, H187A: HF954, H187C: HF543, HoxK<sup>-</sup>: HF532. Die Kulturen wurden 7 Tage bei 30°C unter der angegebenen Atmosphäre inkubiert.

### 3.2.1 Biochemische Charakterisierung der am distalen Cluster veränderten MBH-Varianten

Für die biochemische Charakterisierung wurden die MBH<sup>H187G/A/C</sup> Mutanten zusammen mit dem Wildtyp als Positivkontrolle und einem MBH<sup>-</sup>-Stämmen (HoxK<sup>-</sup> oder Hyd<sup>-</sup>) als Negativkontrolle heterotroph in FGN-Medium angezogen. Das FGN-Medium ermöglicht ein biphasisches Wachstum: In der ersten Wachstumsphase wird der bevorzugte Zucker Fruktose verbraucht, in der zweiten Wachstumsphase auf Glycerin wachsen die Zellen langsamer, es herrschen Hydrogenase dereprimierende Bedingungen (Friedrich *et al.*, 1981a; Friedrich *et al.*, 1981c). Nach dem Aufschluss erfolgte eine Fraktionstrennung in löslichen und Membranextrakt, deren Hydrogenaseaktivität über einen photometrischen und amperometrischen Test mittels Clark Elektrode bestimmt wurde (Tabelle 4). Die

## Ergebnisse

Aktivität im Cytoplasma der MBH<sup>H187G</sup> und MBH<sup>H187A</sup>, die sich hier gleich verhielten, betrug mit 0,02 Units/mg Protein etwa 10 % der Wildtypaktivität, was nur unwesentlich über der Aktivität der Negativkontrolle liegt. In der Membran war ebenfalls eine Aktivität von 0,02 Units feststellbar, was allerdings weniger als 2% der Wildtypaktivität entspricht. Die MBH<sup>H187C</sup> unterschied sich nicht signifikant von den anderen MBH-Varianten. Um zu testen ob die Anwesenheit von H<sub>2</sub> und die gleichzeitige Verringerung des O<sub>2</sub>-Gehalts in der mixotrophen Anzucht mit 80% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub> die Aktivität erhöht, wurde der Aufschluss nach der Anzucht unter diesen Bedingungen wiederholt. Bei der MBH<sup>H187G</sup> wurde eine Steigerung von etwa 0,01 U sowohl im löslichen, als auch im Membranextrakt gemessen, die MBH<sup>H187C</sup> wies nur einen Anstieg von 0,01 U im Membranextrakt auf, während sich die Aktivitäten von MBH<sup>H187A</sup> nicht von denen nach heterotropher Anzucht unterschieden. Im Vergleich zu MBH<sup>Wt</sup>, bei der nach mixotropher Anzucht - wie auch vormals festgestellt (Ludwig, 2008) - eine deutliche Steigerung im Verhältnis zur heterotrophen Anzucht zu beobachten war, entsprach der prozentuale Anteil der Aktivitäten an der Wildtypaktivität 7,5 % im löslichen Extrakt (SE) bzw. 0,9 % im Membranextrakt (ME) der MBH<sup>H187G</sup>. Dies war deutlich weniger als nach heterotropher Anzucht.

**Tabelle 4:** Spezifische H<sub>2</sub>-Oxidationsaktivität der löslichen und Membranextrakte der am distalen Cluster veränderten MBHs mit Methylenblau als Elektronenakzeptor.

MBH-Variante	SE		ME	
	heterotroph	mixotroph	heterotroph	mixotroph
MBH <sup>Wt</sup>	0,2 +/- 0,06	0,4 +/- 0,09	1,4 +/- 0,5	3,4 +/- 0,09
MBH <sup>H187G</sup>	0,02 +/- 0,008	0,03 +/- 0,007	0,02 +/- 0,008	0,03 +/- 0,007
MBH <sup>H187A</sup>	0,02 +/- 0,003	0,02 +/- 0,004	0,02 +/- 0,003	0,02 +/- 0,004
MBH <sup>H187C</sup>	0,03 +/- 0,01	0,03 +/- 0,005	0,02 +/- 0,008	0,03 +/- 0,003
HoxK <sup>-</sup>	0,015 +/- 0,002	0,02 +/- 0,004	0,015 +/- 0,002	0,02 +/- 0,004

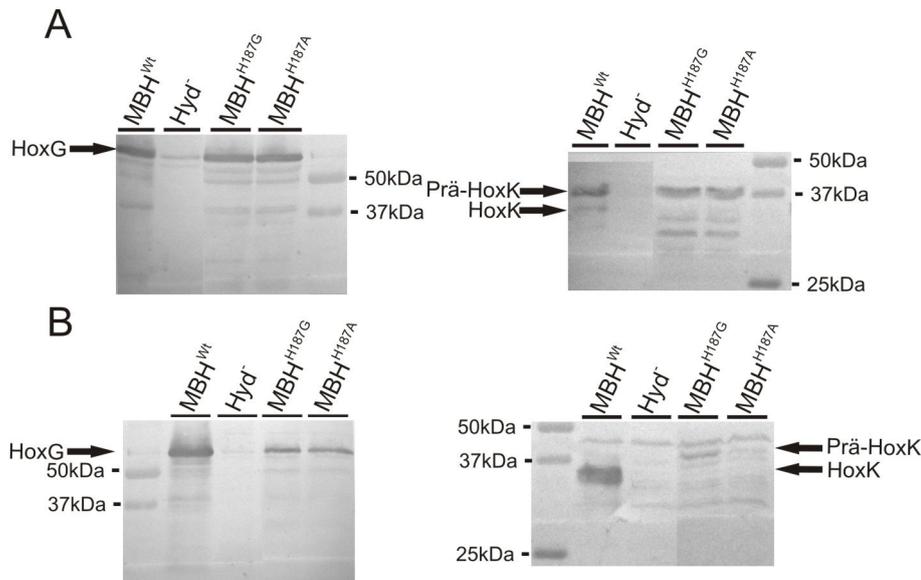
Vergleich nach mixotropher Anzucht mit FGN-Medium im Exsikkator unter 80 % H<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub> und 10% CO<sub>2</sub> und heterotropher Anzucht. Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Für Assay und Statistik siehe 2.8. Genutzte Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>H187G</sup>: HF881, MBH<sup>H187A</sup>: HF954, MBH<sup>H187C</sup>: HF543, HoxK<sup>-</sup>: HF532.

Die geringen Aktivitäten standen im Einklang mit der nicht vorhandenen Fähigkeit der Mutanten, autotroph zu wachsen. Entweder war die Befähigung der Enzyme zum Elektronentransfer verloren gegangen und/oder der Austausch des

Clusterliganden führte zu einem defekten Protein, das nicht maturiert und in die Membran eingebaut werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Maturation der MBH in den Mutanten fehlerfrei ablief und Protein in der Membran vorliegt, wurden Immunoblots vom löslichen und vom Membranextrakt gegen die HoxK und HoxG-Untereinheiten der MBH durchgeführt (Abbildung 10). Die immunologische Analyse der MBH<sup>H187C</sup> erfolgte bereits von Michael Bernhard (Bernhard, 2000). Dessen Ergebnisse konnten hier wiederholt und bestätigt werden: HoxK liegt in dieser MBH-Variante in etwas geringerer Konzentration als der MBH<sup>Wt</sup> sowohl im löslichen, als auch im Membranextrakt vor (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Im löslichen Extrakt der H187-Mutanten (Abbildung 10 A) war HoxG zwar in schwächerer Ausprägung zu detektieren, aber deutlich sichtbar vorhanden. Während HoxK im Wildtyp sowohl in der nicht maturierten prä-HoxK, als auch in der maturierten Form immunologisch nachweisbar war, konnte bei MBH<sup>H187G/A</sup> nur prä-HoxK nachgewiesen werden. Der Immunoblot der Membranfraktion (Abbildung 10 B) belegte die Vermutung, dass kein, bzw. nur Spuren von maturem HoxK in den Zellen vorlag. Während der Wildtyp ein deutliches HoxK-Signal aufwies, fehlte dieses Signal im Blot der Membranfraktion der Mutanten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MBH<sup>H187A/G</sup> nicht korrekt maturiert sind und nicht in die Membran eingebaut wurden. Da HoxG auch in der Membranfraktion der HoxK<sup>-</sup>-Mutante detektiert wird, muss davon ausgegangen werden, dass HoxG in geringer Menge auch in der Membranfraktion von Zellen ohne maturierte MBH vorkommt. Dies rührt wahrscheinlich daher, dass prä-HoxG von der cytoplasmatischen Seite durch die hydrophobe Fläche, die normalerweise mit HoxK interagiert, peripher an der Membran haftet.

## Ergebnisse



**Abbildung 10:** Immunologische Analyse der MBH<sup>H187G/A</sup> im löslichen Extrakt (A) und Membranextrakt (B).

Auf der linken Seite Blots, in denen das Antiserum gegen HoxG eingesetzt wurde, rechts gegen HoxK. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>H187G</sup>: HF881, MBH<sup>H187A</sup>: HF954, Hyd<sup>-</sup>: HF210.

Da das distale Fe-S Cluster der MBH<sup>H187G</sup> wahrscheinlich nicht korrekt ausgebildet werden konnte, weil der Histidin-Ligand nicht vorhanden war, wurde getestet, ob das strukturell der Histidin-Seitenkette entsprechende Imidazol die MBH<sup>H187G</sup> komplementieren kann. Dies hätte eine korrekte Koordination des distalen [4Fe-4S] Clusters zur Folge. Hierzu wurde dem FGN-Medium Imidazol in einer Endkonzentration von 1 mM (aus einer sterilgefilterten Stammlösung mit 1 M Imidazol in UPW) zugefügt.

Sowohl die MBH<sup>H187G</sup>-Mutanten, als auch die Wildtyp-Kulturen erreichten in FGN mit Imidazol eine etwas geringere OD<sub>436</sub> (ungefähr 80 %) im Vergleich zur OD<sub>436</sub> im Medium ohne Imidazol. Die Aktivität der Fraktionen nach Anzucht mit Imidazol unterschied sich nicht von denen nach Anzucht ohne Imidazol (Tabelle 5). Auch das Hinzufügen von Imidazol in den Assay während der Aktivitätsbestimmung in einer Endkonzentration von 100 µM brachte keine Steigerung der Aktivität.

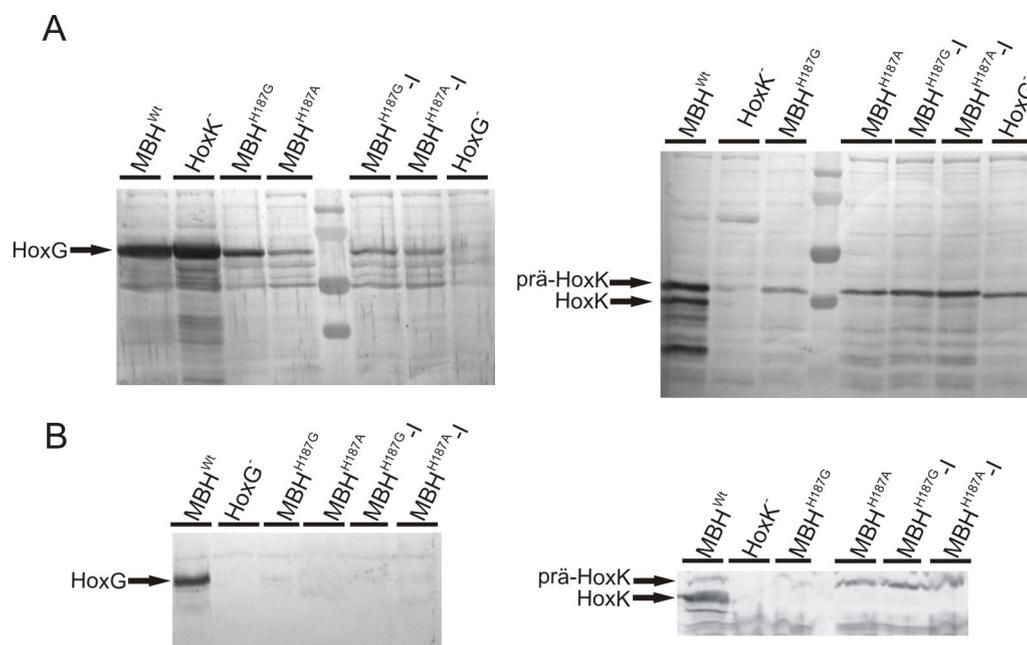
**Tabelle 5:** Spezifische H<sub>2</sub>-Oxidationsaktivität der löslichen und Membranextrakte von HF881 mit MBH<sup>H187G</sup> mit Methylenblau als Elektronenakzeptor.

H187G	SE		ME	
	+ Imidazol	- Imidazol	+ Imidazol	- Imidazol
	0,02 +/- 0,008	0,03 +/- 0,007	0,2 +/- 0,06	0,5 +/- 0,09

Vergleich mit und ohne Imidazol nach mixotropher Anzucht unter 80 % H<sub>2</sub>, 10 % O<sub>2</sub> und 10 % CO<sub>2</sub>. Angegeben ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Für Assay und Statistik siehe 2.8.

Bei den immunologischen Nachweisen von HoxK und HoxG fiel auf, dass prä-HoxK in geringfügig höheren Mengen in den Fraktionen vorlag, die nach Anzucht mit Imidazol gewonnen wurden als in den MBH<sup>H187G</sup>-Präparationen, bei denen kein Imidazol hinzugefügt wurde. Auch war dort eine Bande sichtbar, die auf Höher von maturiertem HoxK lief. Im Membranextrakt war jedoch kein HoxK in den MBH<sup>H187G</sup>-Mutanten, die mit Imidazol angezogen wurden, nachweisbar (Abbildung 11). Auch war die Aktivität in den löslichen Extrakten aus Kulturen mit Imidazol nicht höher als in der Kontrolle ohne Imidazol.

So war der einzige nachweisbare Effekt von Imidazol eine leichte Steigerung des Anteils von prä-HoxK im löslichen Extrakt der MBH<sup>H187G</sup>-Mutante.

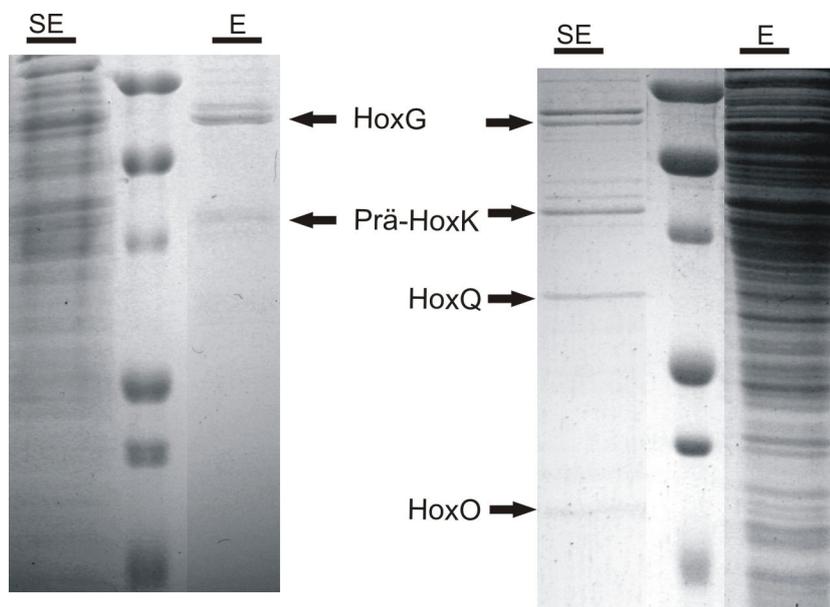


**Abbildung 11:** Immunologische Analyse der MBH<sup>H187G/A</sup> im löslichen Extrakt (A) und Membranextrakt (B) mit und ohne Imidazol.

Auf der linken Seite die Blots gegen HoxG, rechts gegen HoxK. Stämme: MBH<sup>wt</sup>: HF388, MBH<sup>H187G</sup>: HF881, MBH<sup>H187A</sup>: HF954, HoxK<sup>-</sup>: HF532, HoxG<sup>-</sup>: HF531. I: mit Imidazol angezogen.

### 3.2.2 Reinigung der MBH<sup>H187G</sup> aus dem löslichen Extrakt

Da für die elektrische Kopplung von MBH und Photosystem I über einen Dithiolat-Linker reines MBH<sup>H187G</sup>-Protein vorhanden sein musste, wurde *hoxK* mit der Mutation mit einem C-terminalen StrepTag versehen und in ein Überexpressionssystem gebracht. Über Affinitätschromatographie wurde versucht, Protein aus dem Membranextrakt und dem löslichen Extrakt zu gewinnen. Aus dem Membranextrakt konnte auch bei einer Reinigung aus 20 g Zellmaterial kein Protein gereinigt werden, während aus dem löslichen Extrakt ein prä-HoxK/HoxG-Komplex in der Konzentration von 0,032 µg/µl gereinigt werden konnte (Abbildung 12). Entgegen vorheriger Beobachtungen beim Wildtyp (Schubert *et al.*, 2007) war bei der MBH<sup>H187G</sup> kein HoxKOQ-Komplex vorhanden. Aktivität des gereinigten Proteins war sowohl im photometrischen Assay, als auch in der amperometrischen Messung in der modifizierten Clark-Elektrode auch nach einer Konzentration der Proben nicht messbar. Eine Reinigung der MBH<sup>H187C</sup> (aus HF772), die zusammen mit Alexander Schwarze durchgeführt wurde, blieb wegen der Instabilität des Enzyms bei der Reinigung erfolglos (Schwarze, 2010).



**Abbildung 12:** Reinigung von MBH<sup>H187G</sup> (links) und MBH<sup>Wt</sup> aus löslichem Extrakt. Aufgetragen sind 20 µg SE (löslicher Extrakt) und 0,6 µg MBH<sup>H187G</sup> (maximale Befüllung der Tasche) sowie 1 µg MBH<sup>Wt</sup>

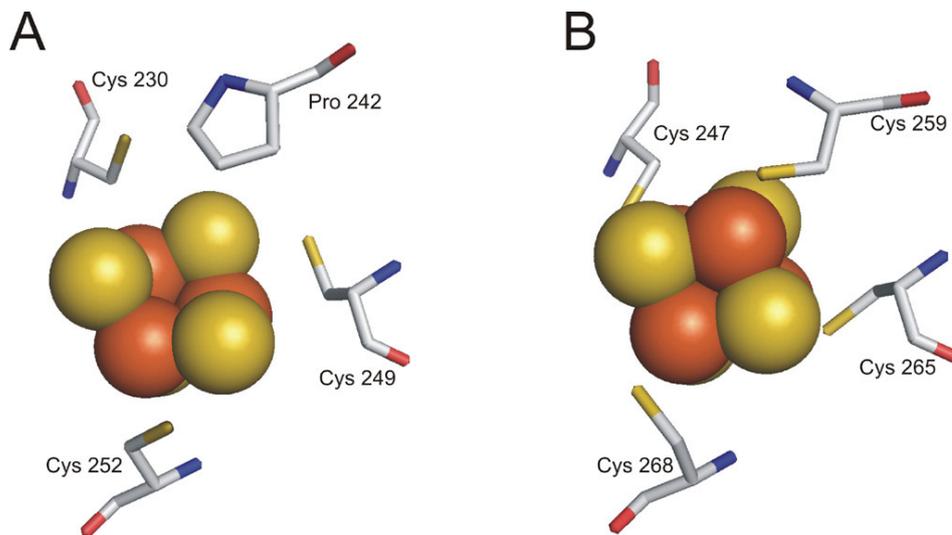
### 3.3 Austausch von Aminosäuren am medialen Cluster

Über EPR- und Mössbauerspektroskopie wurde eines der drei Fe-S Cluster bei Standardhydrogenasen als [3Fe-4S] Cluster bestimmt (Teixeira *et al.*, 1983), welcher später durch Röntgenkristallstrukturuntersuchungen als das mediale Cluster identifiziert wurde (Volbeda *et al.*, 1995). Da die Aminosäurekomposition um dieses Cluster bei der MBH aus *R. eutropha* homolog ist und EPR-Spektren (Saggu *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 1983) ähnliche Signale im oxidierten Zustand des Enzyms lieferten, kann davon ausgegangen werden, dass auch hier das mediale Cluster eine [3Fe-4S] Struktur hat. Ein deutlicher Unterschied des Signals vom Enzym im isolierten Zustand ist allerdings das Vorhandensein von zusätzlichen Signalen um das Spektrum des medialen Clusters, die als Spin-Kopplung mit einem anderen paramagnetischen Zentrum gedeutet werden (Saggu *et al.*, 2009).

[NiFeSe]-Hydrogenasen haben die Besonderheit, dass ihr mediales Cluster ein [4Fe-4S]-Kuban ist. Vergleicht man die Struktur dieses medialen Clusters mit dem [3Fe-4S]-Cluster von Standardhydrogenasen oder der MBH aus *R. eutropha* (Abbildung 13), wird deutlich, dass in letzterem Fall ein Prolin das koordinierende Cystein ersetzt. Warum die mediale Position in der überwiegenden Zahl der [NiFe]-Hydrogenasen von einem [3Fe-4S] Cluster eingenommen wird, ist nicht bekannt. Redox titrationen zeigten, dass das [3Fe-4S] Cluster ein deutlich höheres Redoxpotential (zwischen -75 und -35mV für Standardhydrogenasen, (Adams *et al.*, 1986; Asso *et al.*, 1992; Cammack *et al.*, 1982b; Franco *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1989), zwischen 0 mV und 40 mV für O<sub>2</sub>-tolerante Hydrogenasen) als das [4Fe-4S] Cluster von NiFeSe-Hydrogenasen hat. Daher wurde in Frage gestellt, ob das mediale Cluster überhaupt direkt am Elektronentransport beteiligt ist (Rousset *et al.*, 1998b). Eine Veränderung des medialen [3Fe-4S]-Clusters ist bei der MBH aus *R.e.* so aus zweierlei Gründen interessant. Einerseits können so eventuell Einblicke in die Elektronentransportkette gewonnen werden, welche Rolle das mediale Cluster spielt, andererseits kann so ein paramagnetisches, EPR-aktives Zentrum ([3Fe-4S]-Cluster) in ein diamagnetisches, EPR-inaktives Zent-

## Ergebnisse

rum ([4Fe-4S] Cluster) umgewandelt werden. Somit könnte man das ungewöhnliche EPR-Spektrum der MBH im oxidierten Zustand näher untersuchen, vor allen Dingen ist dabei interessant, ob im oxidierten Zustand überhaupt noch EPR-Signale von Fe-S Clustern nachzuweisen sind.



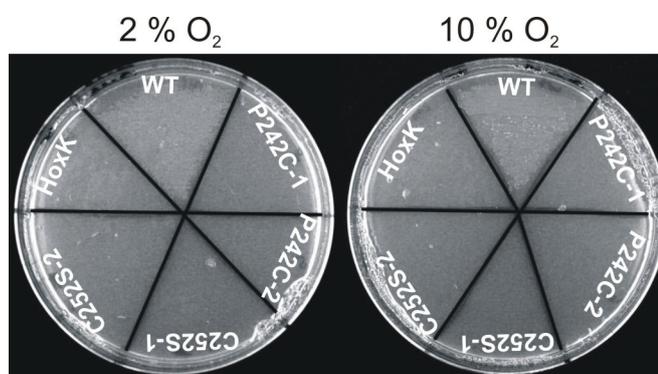
**Abbildung 13:** Das mediale [3Fe-4S] Cluster aus *R. eutropha* (A) im Vergleich mit dem medialen [4Fe-4S] Cluster der [NiFeSe]-Hydrogenase (B) aus *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough.

In dieser Arbeit wurden zwei Punktmutationen am proximalen Cluster durchgeführt: Das Prolin 242 wurde gegen Cystein ausgetauscht und das Fe-S Cluster-kordinierende Cystein 252 wurde gegen Serin ausgetauscht. Der Prolin-Cystein-Austausch führt eine zur Fe-Ligandierung befähigte Aminosäure in die Koordinationssphäre des medialen Clusters ein, die eventuell die Bildung eines [4Fe-4S] Clusters zur Folge hätte. Die Charakterisierung dieser MBH-Varianten und der Vergleich zum Wildtyp könnte dazu beitragen, die Funktion des medialen Clusters aufzuklären und, wie beschrieben, mehr Aufschluss über das EPR-Signal im oxidierten Zustand liefern. Der Austausch des Fe-S Cluster koordinierenden Cysteins 252 wurde auch schon in einer früheren Arbeit durchgeführt (Bernhard, 2000) und die Mutante und deren MBH rudimentär in Wachstumsversuchen und Immunoblots untersucht. Hier wurde die C252S-Mutation durch Sequenzierung überprüft und in einen MBH-Hintergrund gebracht, in dem sowohl die Überpro-

duktion der MBH gewährleistet, als auch einen der Reinigung dienenden C-terminalen Strep-Tag vorhanden war.

### 3.3.1 Physiologische Charakterisierung der am medialen Cluster veränderten Mutanten

Ein lithoautotrophes Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten unter einer Atmosphäre von 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und einer Konzentration von 2 oder 10 % O<sub>2</sub> (jeweils mit N<sub>2</sub> auf 100 % aufgefüllt) war von den Stämmen, die am medialen Cluster verändert wurden, nicht festzustellen (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** MBH-abhängiges lithoautotrophes Wachstum der am medialen Cluster veränderte Mutanten.

Anzucht auf Mineralmediumagarplatten im Wittschen Topf mit 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und den angegebenen Konzentrationen an O<sub>2</sub>, wobei mit N<sub>2</sub> auf 100 % aufgefüllt wurde. WT: HF388, P242C: HF955, C252S: HF542, HoxK: HF532. Die Kulturen wurden 7 Tage bei 30°C unter der angegebenen Atmosphäre inkubiert.

### 3.3.2 Biochemische Charakterisierung der MBHs mit veränderten Aminosäuren am medialen Cluster

Sowohl nach heterotropher Anzucht im FGN-Medium, als auch nach mixotropher Anzucht mit 80 % H<sub>2</sub>, 10 % O<sub>2</sub> und 10 % CO<sub>2</sub> konnte keine Aktivität im Membranextrakt gemessen werden, während die Aktivität im löslichen Extrakt nur geringfügig über dem der Negativkontrolle lag (Tabelle 6). Dies war sowohl für die MBH<sup>C252S</sup> als auch die MBH<sup>P242C</sup> feststellbar.

## Ergebnisse

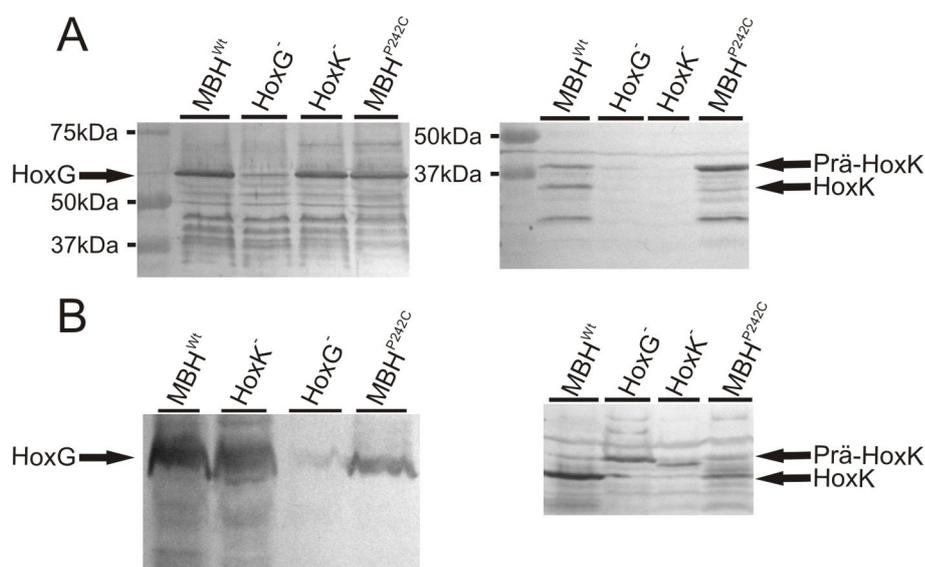
**Tabelle 6:** H<sub>2</sub>-abhängige Methylenblau-Reduzierungsaktivitäten der Membran- und löslichen Fraktion aus mixotroph mit 10 % O<sub>2</sub> gewachsenen Zellen.

MBH-Variante	SE	ME
MBH <sup>Wt</sup>	0,38 +/- 0,07	3,6 +/- 0,08
MBH <sup>P242C</sup>	0,01 +/- 0,004	0
MBH <sup>C252S</sup>	0,02 +/- 0,005	0

Vergleich der Aktivitäten von MBH<sup>Wt</sup> und der am medialen Cluster veränderten MBH-Varianten. Angegeben sind Mittelwert und, mit +/- die Standardabweichung (siehe 2.8). Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>P242C</sup>: HF955, MBH<sup>C252S</sup>: HF542.

Daraufhin wurde über Immunoblots gegen HoxK und HoxG geprüft, ob die MBH in den Mutanten maturiert und über die Membran transportiert wird. HoxG konnte bei beiden MBH-Varianten nachgewiesen werden, sowohl im löslichen, als auch im Membranextrakt, wobei auch hier davon ausgegangen wird, dass das Vorkommen von HoxG im Membranextrakt ein Artefakt darstellt.

Während für die MBH<sup>C252S</sup> weder maturiertes HoxK im Membranextrakt, noch im löslichen Extrakt nachgewiesen werden konnte ((Bernhard, 2000), Daten hier nicht gezeigt), lag HoxK von MBH<sup>P242C</sup> in der maturierten Form im löslichen Extrakt vor. Ferner konnte gezeigt werden, dass HoxK der MBH<sup>P242C</sup> in seiner maturierten Form über die Membran transportiert wird, da eine Bande auf der Höhe von maturiertem HoxK auch im Membranextrakt vorliegt (Abbildung 15). Bereits im löslichen Extrakt war deutlich, dass die Menge an HoxK von MBH<sup>P242C</sup> niedriger als die der MBH<sup>Wt</sup> ist, was auch für HoxK in der Membranfraktion gilt.



**Abbildung 15:** Immunologische Analyse der MBH<sup>P242C</sup> im löslichen Extrakt (A) und Membranextrakt (B). Auf der linken Seite die Abbildungen der Blots, in denen das Antiserum gegen HoxG eingesetzt wurde, rechts gegen HoxK. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>P242C</sup>: HF955, HoxK<sup>-</sup>: HF532, HoxG<sup>-</sup>: HF531

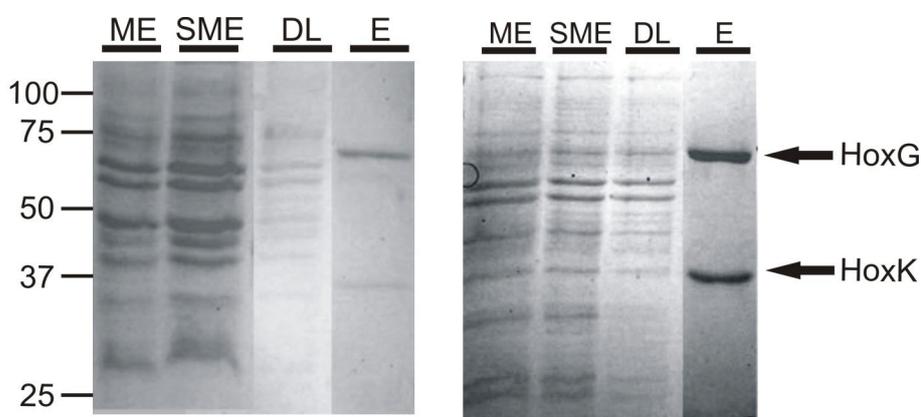
Da die MBH<sup>P242C</sup> in der Membranfraktion deutlich zu detektieren war, wurde versucht, diese MBH-Variante EPR-spektroskopisch zu charakterisieren, um Aussagen über das paramagnetische Zentrum zu erhalten, welches ansonsten vom Signal des [3Fe-4S]-Cluster überlagert wird. Die EPR-spektroskopische Messungen der wurden von Dr. Miguel Saggi in der Arbeitsgruppe Dr. Friedhelm Lenzian und Dr. Peter Hildebrandt im Max-Volmer-Laboratorium des Biophysikalischen Instituts der Technischen Universität Berlin durchgeführt (zur weiteren Erläuterung der Spektroskopie siehe 3.4.4). Zur EPR-Messung wurden Membranextrakte in einer hohen Konzentration, die mit etwa 40 µg/µl Proteinkonzentration noch mit einer 25 µl Hamiltonspritze pipettierbar waren, luftblasenfrei in EPR-Röhrchen überführt und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren, um EPR-Spektren aufzunehmen. Im Temperaturbereich von 10 bis 40 K waren weder Ni-Signale, noch Fe-S Clustersignale zu erkennen. Auch in einer mit H<sub>2</sub> reduzierten Probe waren keine Spektren sichtbar (nicht abgebildet). Um auszuschließen, dass eine zu geringe Konzentration der MBH<sup>P242C</sup> in den Membranfraktionen ausschlaggebend für die nicht detektierbaren EPR-Signale waren, wurde eine Präpa-

## Ergebnisse

ration der inneren Membran vorgenommen. Hierzu wurden die Zellen einem osmotischen Schock unterzogen, wodurch die äußere Membran vor dem Zellaufschluss abgespalten wurde. Die innere Membranfraktion wurde mit einer Proteinkonzentration von 30 mg/ml der EPR-Spektroskopie unterzogen. Auch hier konnten keine Signale im oxidierten und reduzierten Zustand detektiert werden.

### 3.3.3 Die MBH<sup>P242C</sup> lässt sich über Affinitätschromatographie aus der Membran reinigen

Da nachgewiesen werden konnte, dass die MBH<sup>P242C</sup> in der Membranfraktion vorlag, wurde versucht, das Enzym über Solubilisierung aus der Membran zu lösen und über Strep-Tactin zu isolieren. Aus heterotroph angezogenen Zellen konnten nur geringe Mengen des Proteins gereinigt werden, die keine Aktivität zeigten, woraufhin eine Reinigung nach mixotropher Anzucht im Exsikkator unter einer Atmosphäre von 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub> durchgeführt wurde.



**Abbildung 16:** SDS-PAGE nach affinitätschromatographischer Reinigung der MBH<sup>P242C</sup> aus heterotroph angezogenen Zellen (links) und mixotroph angezogenen Zellen (rechts). SE: 20 µg löslicher Extrakt (soluble extract), SME: 20 µg solubilisierter Membranextrakt, DL: 10 µg Durchlauf nach Auftragung des SME auf die Strep-Tactinmatrix, E: Eluat. Zum Vergleich wurden jeweils 10 µl der Eluate aufgetragen, links 0,8 µg, rechts 4 µg.

Das Eluat dieses gereinigten Proteins zeigte mit Methylenblau als Elektronenakzeptor nur eine sehr geringe Aktivität von unter 0,05 U, wobei der Beginn der Aktivität sehr spät, bis zu einer Stunde nach Beginn der Messung, einsetzte. Auch

eine Konzentration des gereinigten Proteins auf 2 µg/ml brachte keine Steigerung der Aktivität.

Das gereinigte Protein wurde nach dem Konzentrieren auf etwa 2 µg/µl (0,02 mM) wie die Membranextrakte einer EPR-Spektroskopischen Untersuchung unterzogen. Jedoch wurden auch hier keine Signale im oxidierten oder mit H<sub>2</sub> reduzierten Zustand detektierbar.

Weitere Arbeiten an der MBH<sup>P242C</sup> wurden unter O<sub>2</sub>-limitierten Wachstumsbedingungen der Kultur im Rahmen einer Studienjahresarbeit (Newie, 2010) durchgeführt, deren Ergebnisse in die Diskussion mit einfließen, die spektroskopischen Studien an dieser MBH-Variante dauern an.

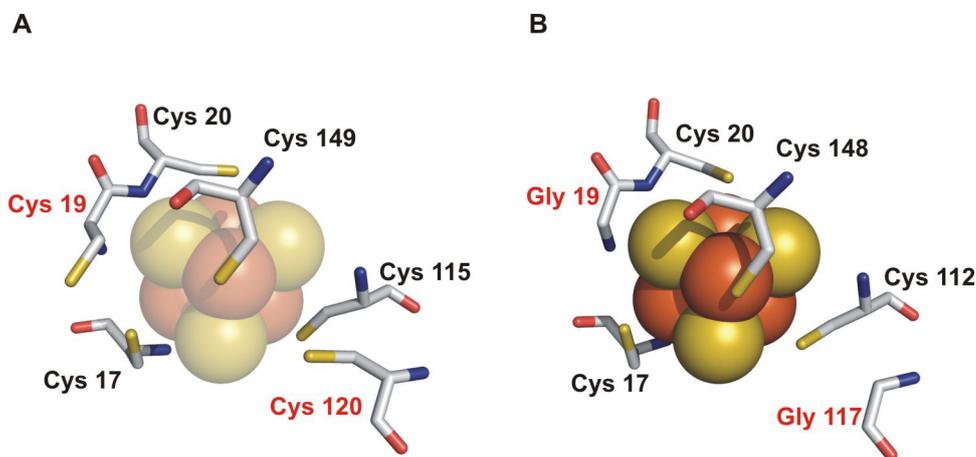
### **3.4 Der Vergleich von Strukturmodellen des proximalen Clusters offenbart Unterschiede zwischen verschiedenen Hydrogenasen**

Über den Vergleich der Aminosäuresequenz von O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen mit Standardhydrogenasen wurden zwei konservierte Cysteine gefunden, die in O<sub>2</sub>-sensitiven Standardhydrogenasen durch ein Glycin ersetzt sind. In einem In-Silico-Modell der MBH, das auf der Kristallstruktur der Hydrogenase aus *D. gigas* beruht (M. Stein, MPI für komplexe Systeme Magdeburg, siehe 2.21.4), wurde deutlich, dass sich diese beiden zusätzlichen Cysteine in direkter Nähe zum proximalen Fe-S Cluster befinden (Abbildung 17). Die mit dem Programm Pymol errechneten Abstände des Cystein-Schwefels im Modell liegen mit etwa 3 Å nur wenig über den Abständen der ligandierenden, konservierten Cysteine im MBH-Modell und in Röntgenkristallstrukturen von Hydrogenasen (Higuchi *et al.*, 1997; Matias *et al.*, 2001; Montet *et al.*, 1997; Ogata *et al.*, 2010; Volbeda *et al.*, 1995). Die zwei zusätzlichen Cysteine wurden durch ortsgerichtete Mutagenese in Glycine geändert, da diese an entsprechender Position in Standardhydrogenasen konserviert sind. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine Mutagenese von Cystein zu Serin durchgeführt, da Serin von Größe und Struktur Cystein sehr ähnlich ist - lediglich die Sulfhydrylgruppe ist durch eine Hydroxylgruppe ersetzt. Ebenfalls

## Ergebnisse

wurden die koordinierenden Cysteine Cys20 und Cys149 durch Serin ersetzt. Die Austausch gegen Serin wurden über Klonierung in das Plasmid pEDY309 und anschließende Konjugation in den megaplasmidfreien Stamm HF210 in einen Stammhintergrund mit MBH-Überexpressionssystem (Lenz *et al.*, 2005) gebracht.

Da es bislang keine Hinweise gibt, dass das proximale Cluster der MBH kein [4Fe-4S] Cluster ist, wurde das Strukturmodell der MBH mit einem [4Fe-4S] Kuban erstellt. Da nicht eindeutig geklärt ist, um welche Art von Eisen-Schwefel-Zentrum es sich beim proximalen Fe-S Cluster handelt, wird in dieser Arbeit allerdings weiterhin die allgemeine Bezeichnung (Fe-S Cluster) verwendet.

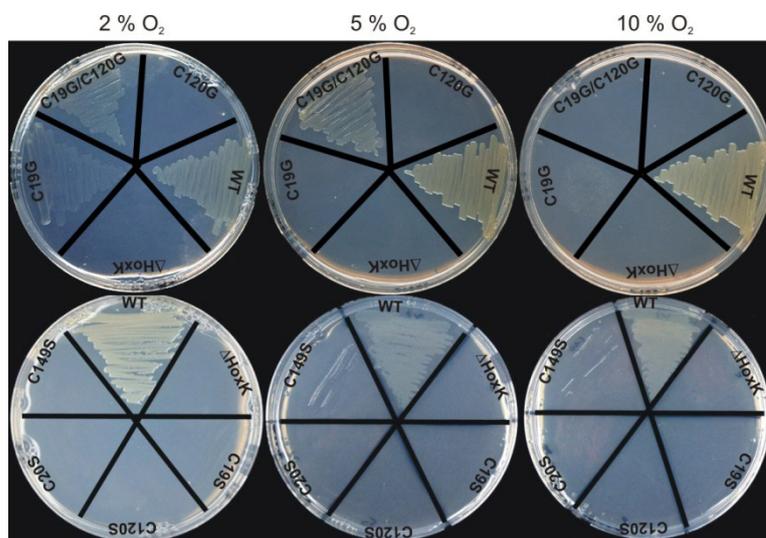


**Abbildung 17:** Anordnung der Cysteine in der Nähe des proximalen Fe-S Clusters. A: Modell des proximalen Clusters von HoxK aus *R. eutropha*, das Fe-S Kuban ist durchscheinend abgebildet, da die Struktur des Clusters nicht bekannt ist. B: Struktur des proximalen Fe-S Clusters der kleinen Untereinheit HydA aus *D. gigas* (nach Volbeda *et al.*, 1995) Die zusätzlichen Cysteine in HoxK aus *R. eutropha* und die entsprechenden Glycine in HydA aus *D. gigas* sind rot beschriftet.

### 3.4.1 Der Austausch von Aminosäuren in der Umgebung des proximalen Fe-S Clusters haben einen Effekt auf das lithoautotrophe Wachstum in Abhängigkeit der O<sub>2</sub>-Konzentration

Um einen Effekt des Cysteinaustausch auf die physiologische Funktion der MBH zu untersuchen, wurden die Mutationen in die SH-freie *R. eutropha* Mutante HF388 gebracht, so dass das lithoautotrophe Wachstum vollständig auf der phy-

siologischen MBH-Aktivität beruht. Das lithoautotrophe Wachstum wurde zuerst auf Mineralmedium-Agarplatten in Wittschen Töpfen unter einer definierten Gasatmosphäre mit variablen O<sub>2</sub>-Konzentrationen getestet. Während MBH-vermitteltes Wachstum des Wildtyps (HF388) bei 2 %, 5 % und 10 % O<sub>2</sub> festzustellen war, zeigte die MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Mutante (HF800) langsames Wachstum (ein um zwei Tage verzögertes Auftreten von sichtbarem Ausstrich) bei 5 % O<sub>2</sub> und kein lithoautotrophes Wachstum (nach 8 Tagen) bei 10 % O<sub>2</sub>. HF801 (MBH<sup>C19G</sup>) zeigte kein Wachstum bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 5 % oder höher, während der Stamm bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 % schwaches Wachstum nach 6 Tagen (optische Kontrolle) zeigte. Die MBH<sup>C120G</sup>-Mutante, HF802, zeigte kein lithoautotrophes Wachstum bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 %. Mutanten, in denen Cystein am proximalen Cluster von HoxK gegen Serin ausgetauscht wurde, zeigten ebenfalls kein lithoautotrophes Wachstum mit O<sub>2</sub> (Abbildung 18, untere Reihe).

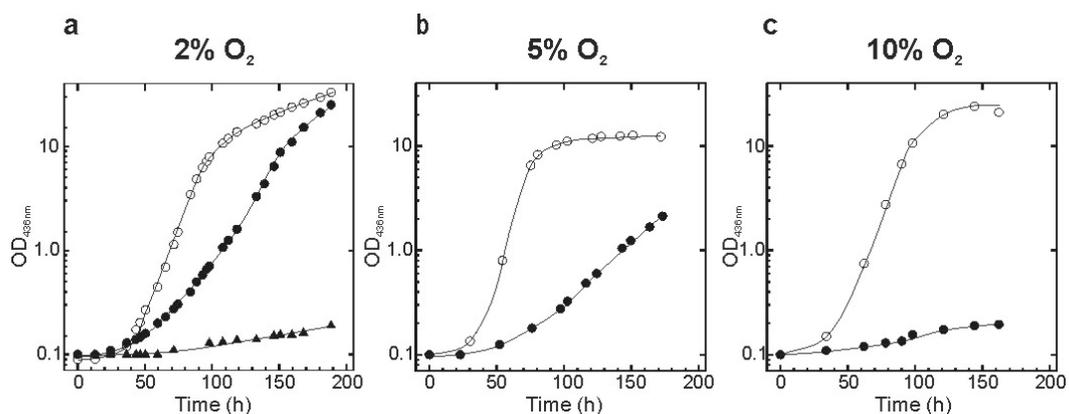


**Abbildung 18:** Test der MBH-Varianten mit verändertem proximalen Cluster auf lithoautotrophes Wachstum mit O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor.

Als Medium diente Standard-H16 Mineralmedium, die Agarplatten wurden unter 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und den über der Abbildung angegebenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen angezogen. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C, das Foto wurde nach 8 Tagen Wachstum aufgenommen. In der oberen Reihe sind die Ausstriche der Stämme mit Cystein-Glycin-Austausch zu sehen. Wt: HF388, HoxK: HF532, C19G: HF801, C120G: HF802, C19G/C120G: HF800. In der unteren Reihe die MBH-Cystein-Serin-Varianten. C19S: HF806, C120S: HF 807, C20S: HF809, C149S: HF808

## Ergebnisse

Um das lithoautotrophe Wachstum unter verschiedenen  $O_2$ -Konzentrationen genauer zu analysieren, wurden Anzuchten in Flüssigmedium durchgeführt und die optische Dichte zu verschiedenen Zeiten während des Wachstums bestimmt (Abbildung 19). Auch bei der geringsten eingesetzten  $O_2$ -Konzentration von 2 % war ein deutlicher Unterschied zwischen HF388 (Wildtyp) und HF800 ( $MBH^{C19G/C120G}$ ) sichtbar, wobei die Verdoppelungszeit der Mutante fast doppelt so hoch war, wie die des Wildtyps (Tabelle 7). HF801 ( $MBH^{C19G}$ ) zeigte ein stark verlangsamtes Wachstum mit einer Verdoppelungszeit von etwa 180 h. Bei 5 % war kein Wachstum von HF801 mehr zu messen, während die  $MBH^{C19G/C120G}$ -Mutante HF800 eine im Vergleich zum Wildtyp dreifache Verdoppelungszeit aufwies.



**Abbildung 19:**  $O_2$ -abhängiges lithoautotrophes Wachstum von HF388 (Wildtyp, leere Kreise), HF801 ( $MBH^{C19G}$ , Dreiecke) und HF800 ( $MBH^{C19G/C120G}$ , gefüllte Kreise) in Flüssigmedium bei einer  $O_2$ -Konzentration von 2, 5 und 10 % (von links nach rechts).

Die Daten zeigen einen physiologischen Effekt nach Austausch der zusätzlichen Cysteine am proximalen Cluster. Bei höheren  $O_2$ -Konzentrationen war das  $MBH$ -vermittelte Wachstum verringert oder nicht mehr möglich, was auf eine erhöhte  $O_2$ -Empfindlichkeit der Hydrogenase schließen lässt, wenn die zusätzlichen Cysteine nicht vorhanden sind. Die Einzelmutanten wuchsen sehr langsam bei sehr geringen  $O_2$ -Konzentrationen ( $MBH^{C19G}$ ) oder nicht mehr lithoautotroph ( $MBH^{C120G}$ , alle Cys-Ser Mutanten), was auf den Verlust der physiologischen Aktivität der  $MBH$  hindeutet.

**Tabelle 7:** Verdopplungsraten der Stämme mit verändertem proximalen Cluster bei verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen anhand der Daten aus Abbildung 19. -: Kein Wachstum

MBH-Variante	2 % O <sub>2</sub>	5 % O <sub>2</sub>	10 % O <sub>2</sub>
MBH <sup>Wt</sup>	9	8	9
MBH <sup>C19G</sup>	180	-	-
MBH <sup>C19G/C120G</sup>	15	24	155
MBH <sup>C120G</sup>	-	-	-

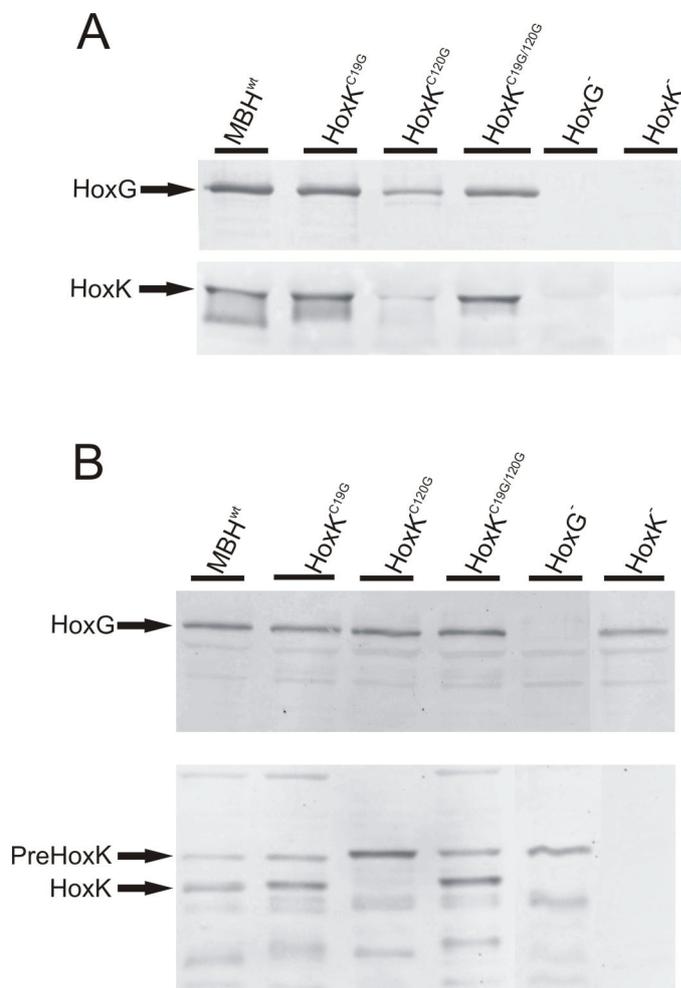
### 3.4.2 Biochemische Charakterisierung der am proximalen Cluster veränderten MBH

Um die Eigenschaften der am proximalen Cluster veränderten MBH biochemisch zu charakterisieren, wurde die Expression und Inkorporation des Enzyms in die Cytoplasmamembran mittels Immunoblots nach Aufschluss der Zellen analysiert. Die Aktivität der MBH in der Membran wurde mit Methylenblau als Elektronenakzeptor im anaeroben Messaufbau gemessen (Tabelle 8). Nach anfänglicher mixotropher Standardanzucht in FGN Medium, in der die Gasatmosphäre (80 % H<sub>2</sub>, 10 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>) in den Exsikkatoren nach initialer Begasung und 24 h Wachstum bei 30 °C ausgetauscht wurde, wurden die Anzuchtbedingungen geändert, um der höheren O<sub>2</sub>-Empfindlichkeit der Mutanten Rechnung zu tragen. Die Gasatmosphäre wurde nun nicht mehr ausgetauscht, damit die Maturation der MBH, die in der Hydrogenase dereprimierenden Glycerinphase nach etwa 24 h abläuft (siehe 3.2.1), unter niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentrationen ablaufen konnte. Untersuchungen zum O<sub>2</sub>-Einfluss auf die Maturation der MBH in den Mutanten erfolgten zu einem späteren Zeitpunkt (Kapitel 3.4.3).

Immunoblots mit Antikörpern gegen HoxG (Abbildung 20) zeigten, dass die Synthese der großen Untereinheit in allen Mutanten in etwa auf dem gleichen Level wie die des Wildtyps ablief. Ferner ließen sich Banden, die von proteolytischem Abbau herrühren, weder bei der MBH<sup>Wt</sup>, noch bei den am proximalen Cluster veränderten MBHs detektieren, was auf eine vergleichbare Stabilität in der cytoplasmatischen Fraktion schließen lässt. Die Menge an prozessierter und in die Membran inkorporierter kleiner Untereinheit HoxK ist hingegen unter-

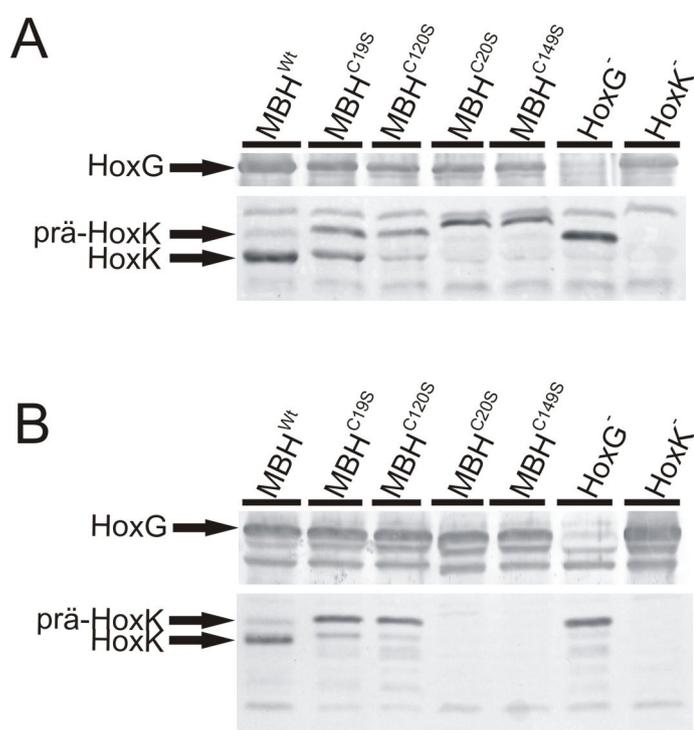
## Ergebnisse

schiedlich hoch: Während HoxK in der Membranfraktion der MBH<sup>C19G/C120G</sup> und MBH<sup>C19G</sup> in ähnlich hohen Mengen wie im Wildtyp detektiert wird, ist MBH<sup>C120G</sup> nicht in der Membranfraktion zu finden. HoxG aus MBH<sup>C120G</sup> wurde hingegen in leicht reduzierter Menge detektiert. In der Cytoplasmafraktion von MBH<sup>C120G</sup> sieht man, dass prä-HoxK nicht oder nur in sehr geringen Mengen zur murenen Form prozessiert wird. Die Beobachtung, dass HoxK der MBH<sup>C120G</sup> nicht in der Membranfraktion vorkommt, korreliert mit dem ausbleibenden lithoautotrophen Wachstum dieser Mutante.



**Abbildung 20:** Immunologische Detektion der am proximalen Cluster veränderten MBH-Varianten im Membran- (A) und löslichen Extrakt (B) nach mixotropher Anzucht (einmal begast). Blot gegen HoxG-Antikörper jeweils oben, darunter der Blot gegen HoxK. Stämme: MBH<sup>WT</sup>: HF388, MBH<sup>C19G</sup>: HF801, MBH<sup>C120G</sup>: HF802, MBH<sup>C19G/C120G</sup>: HF800,  $\Delta$ HoxK: HF532  $\Delta$ HoxG: HF531.

Die Immunoblots der Cys-Ser-MBH-Varianten vermitteln ein ähnliches Bild: Während die MBH<sup>C19S</sup> einen kleinen Anteil an maturer MBH in der Membran aufweist, ist in den Extrakten der MBH<sup>C120S</sup> nahezu ausschließlich die prämaturre Form von HoxK zu finden, wobei ein großer Anteil von präHoxK im Gegensatz zur MBH<sup>C120G</sup> auch im Membranextrakt zu detektieren war (Abbildung 21). Der Austausch der Fe-S Cluster koordinierenden Cys20 und Cys149 gegen Serin liefern im Gegensatz zu den übrigen am proximalen Cluster veränderten MBH-Varianten keine Banden, die eindeutig HoxK zuzuordnen sind. In der Membranfraktion lässt sich weder HoxK, noch prä-HoxK nachweisen, in der cytoplasmatischen Fraktion ist eine Bande zu sehen, die weder HoxK, noch prä-HoxK zuzuordnen ist, da sie höher als die Bande von prä-HoxK detektiert wird.



**Abbildung 21:** Immunologische Analyse der MBH-Varianten in denen die Cysteine des proximalen Clusters gegen Serin ausgetauscht wurde (mixotrophe Anzucht, einmal begast). A: Löslicher Extrakt, B: Membranextrakt. In der oberen Abbildung wurde jeweils das Antiserum gegen HoxG eingesetzt wurde, in der Unteren gegen HoxK. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF632 (MBH-Überexpression), MBH<sup>C19S</sup>: HF806, MBH<sup>C120S</sup>: HF807, MBH<sup>C20S</sup>: HF809, MBH<sup>C149S</sup>, ΔHoxK: HF532 ΔHoxG: HF531.

## Ergebnisse

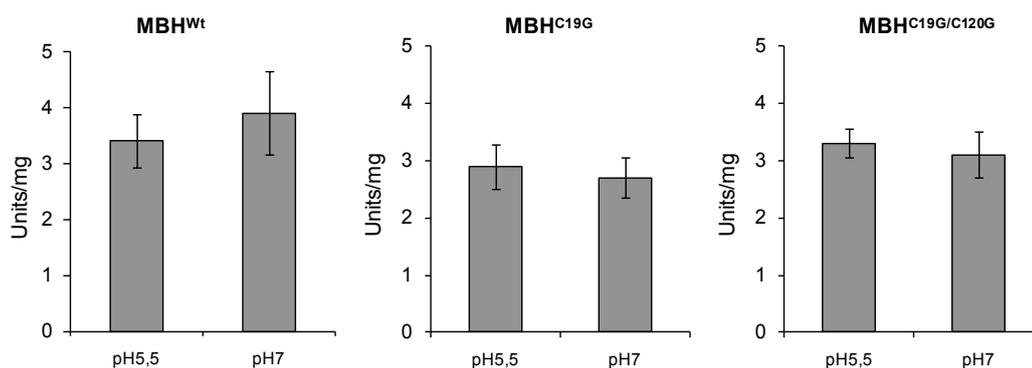
Korrelierend mit der Abwesenheit von HoxK in der Membran wurde bei den MBH-Varianten mit Serin statt Cys 20 und 149 keine Aktivität im Membranextrakt festgestellt (Tabelle 8). Auch bei der MBH<sup>C120S</sup> konnte keine Aktivität festgestellt werden. Die MBH<sup>C19S</sup> besaß eine leichte Restaktivität die allerdings stark unter der C19G-Variante lag (nur etwa 3 % vom Wildtyp und 4 % der C19G-Variante). Davon ausgehend wurden die Serin-Varianten des proximalen Clusters experimentell nicht weiter verfolgt, da sie sich als instabiler als die Glycin-Varianten erwiesen.

**Tabelle 8:** H<sub>2</sub>-abhängige Methylenblau-Reduzierungsaktivitäten der Membranfraktion aus mixotroph mit 10 % O<sub>2</sub> gewachsenen Zellen.

MBH-Variante	H <sub>2</sub> -Oxidationsaktivität ( $\mu\text{mol H}_2 / \text{mg} / \text{min}$ )	
	einmal begast	zweimal begast
MBH <sup>Wt</sup>	4,4 +/- 0,6	3,6 +/- 0,2
MBH <sup>C19G</sup>	3,5 +/- 0,9	0,18 +/- 0,05
MBH <sup>C120G</sup>	0,09 +/- 0,04	0,03 +/- 0,01
MBH <sup>C19G/C120G</sup>	3,2 +/- 0,5	3 +/- 0,4
MBH <sup>Wt+</sup>	7,3 +/- 0,8	4,8 +/- 0,7
MBH <sup>C19S+</sup>	0,12 +/- 0,02	0,08 +/- 0,03
MBH <sup>C120S+</sup>	< 0,03	< 0,03
MBH <sup>C20S+</sup>	< 0,03	< 0,03
MBH <sup>C149S+</sup>	< 0,03	< 0,03

Vergleich zwischen nur anfangs begasten Exsikkatoren und nach 24 h erneut begasten Exsikkatoren. Messung bei pH 7,0. Mit „+“ markiert sind die Enzyme aus Überexpressionshintergrund. Angegeben sind Mittelwert und, mit +/- die Standardabweichung (siehe 2.8). Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>C19G</sup>: HF801, MBH<sup>C120G</sup>: HF802, MBH<sup>C19G/C120G</sup>: HF800, MBH<sup>Wt</sup>: HF632 (MBH-Überexpression), MBH<sup>C19S</sup>: HF806, MBH<sup>C120S</sup>: HF807, MBH<sup>C20S</sup>: HF809, MBH<sup>C149S</sup>

Die pH-Abhängigkeit bei Membranextrakten der MBH<sup>C19G</sup> und MBH<sup>C19G/C120G</sup> unterschieden sich von der des Wildtyps. Der Membranextrakt der MBH<sup>Wt</sup> besaß eine gegenüber der Aktivität bei pH 5,5 um knapp 20 % erhöhte Aktivität bei pH 7 (gegenüber etwa 40 % in den Literaturwerten (Podzuweit *et al.*, 1987)). Sowohl MBH<sup>C19G</sup> und die MBH<sup>C19G/C120G</sup> zeigten hingegen ein umgekehrtes Aktivitätsspektrum mit leicht erhöhter Aktivität bei pH 5,5 (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** pH-Abhängigkeit der Membranextrakte der MBH<sup>C19G</sup> und MBH<sup>C19G/C120G</sup>. Die Aktivitäten wurden über den Assay mit Methylenblau mit K-PO<sub>4</sub>-Puffer bei einem pH-Wert von 5,5 und 7 bestimmt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an (für Statistik siehe 2.8).

Um die Vergleichbarkeit mit dem Wildtyp zu erhalten, wurde auch die Aktivitätsmessung des Membranextrakts der entsprechenden Mutanten weiterhin bei pH 7 durchgeführt.

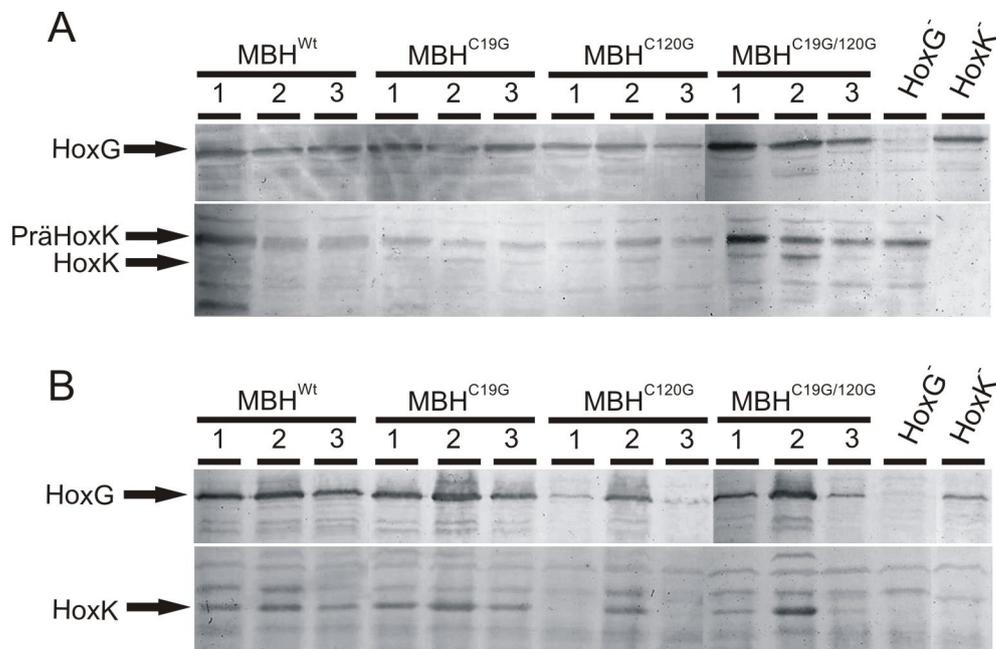
### 3.4.3 Einfluss der O<sub>2</sub>-Konzentration auf die Synthese der am proximalen Cluster veränderten MBH

Um den Einfluss von O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> bei der Anzucht der Mutanten zu untersuchen, wurden drei parallele Anzuchten durchgeführt. Aktivitäten und Immunoblots von einer heterotrophen Anzucht in Luftatmosphäre wurden mit denen von mixotrophen Anzuchten in Exsikkatoren mit 5 und 20 % O<sub>2</sub> verglichen. Da wegen der O<sub>2</sub>-Konzentration von 20 % nur 70% H<sub>2</sub> eingesetzt wurde, diente N<sub>2</sub> als Gas, mit dem das restliche Volumen der Anzucht mit 5 % O<sub>2</sub> aufgefüllt wurde.

Nach Präparation der löslichen und Membranextrakte wurden diese auf SDS-Gele aufgetragen und anschließend Immunoblots gegen HoxK und HoxG durchgeführt. Nebeneinander aufgetragen konnte dadurch die Menge der MBH in den Extrakten abhängig von der Anzucht abgeschätzt werden. Während bei der MBH<sup>wt</sup> bei allen drei Anzuchtsbedingungen HoxK in maturierter Form vorlag, wobei die Menge an maturiertem HoxK nach Anzucht unter 5 % O<sub>2</sub> am höchsten war, war die Reifung der am proximalen Cluster veränderten MBH-Varianten

## Ergebnisse

deutlicher O<sub>2</sub>-abhängig (Abbildung 23). Die MBH<sup>C19G</sup> wurde unter allen drei Anzuchtsbedingungen maturiert, die Menge an maturiertem HoxK war aber, ähnlich wie bei der MBH<sup>Wt</sup>, nach Anzucht mit 5 % O<sub>2</sub> am höchsten. Deutlicher wurde der Effekt von O<sub>2</sub> auf die Reifung bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> und insbesondere der MBH<sup>C120G</sup>. Bei Ersterer war eine Reifung von HoxK sowohl unter Luftatmosphäre, als auch nach mixotropher Anzucht mit 20 % O<sub>2</sub> nahezu vollständig unterdrückt. Bei der MBH<sup>C120G</sup> war, wie nach der fehlenden Maturation bei 10 % O<sub>2</sub> zu erwarten, kein HoxK bei heterotropher Anzucht oder mixotropher Anzucht unter 20 % O<sub>2</sub> vorhanden. Bei mixotropher Anzucht unter 5 % O<sub>2</sub> war hingegen deutlich eine HoxK-Bande im Membranextrakt zu erkennen.



**Abbildung 23:** Immunologische Analyse der am proximalen Cluster veränderten MBH-Varianten in Abhängigkeit von der O<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht.

A: Löslicher Extrakt, B: Membranextrakt. 1: Extrakt nach mixotropher Anzucht mit 20 % O<sub>2</sub>, 2: Extrakt nach Anzucht mit 5 % O<sub>2</sub>, 3: Extrakt nach heterotropher Anzucht (Luft). In der oberen Abbildung wurde jeweils das Antiserum gegen HoxG eingesetzt, in der Unteren gegen HoxK. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>C19G</sup>: HF801, MBH<sup>C120G</sup>: HF802, MBH<sup>C19G/C120G</sup>: HF800, HoxK<sup>-</sup>: HF532 HoxG<sup>-</sup>: HF531.

Die Aktivitäten der Membranextrakte wurde wie beschrieben im photometrischen Test in der luftdicht verschlossenen Küvette mit Methylenblau als Elektro-

nenakzeptor bestimmt (Tabelle 9). Während sich bei 5 % O<sub>2</sub> ähnliche Aktivitäten bestimmen ließen wie nach einer Anzucht mit 10 % O<sub>2</sub> (Tabelle 8), waren die Aktivitäten nach Luftanzucht und nach mixotropher Anzucht mit 20 % O<sub>2</sub> deutlich geringer. Bei der MBH<sup>Wt</sup> zeigten sich Restaktivitäten von ungefähr 20 %, während die MBH<sup>C19G</sup> und die MBH<sup>C19G/C120G</sup> kaum noch Aktivität zeigten, was insbesondere bei ersterer bemerkenswert ist, da die Menge an maturierter MBH in der Membran ähnlich dem Wildtyp ist.

**Tabelle 9:** H<sub>2</sub>-abhängige Methylenblau-Reduzierungsaktivitäten der Membranfraktionen der am proximalen Cluster veränderten MBH.

Enzym	H <sub>2</sub> -Oxidationsaktivität(μmol H <sub>2</sub> /mg/min)		
	70/5/10/10	70/20/10	Luft
WT	3,7 +/- 0,3	0,6 +/- 0,1	0,7 +/- 0,2
MBH <sup>C19G</sup>	4 +/- 0,9	0,05 +/- 0,01	0,14 +/- 0,05
MBH <sup>C120G</sup>	0,06 +/- 0,02	< 0,03	< 0,03
MBH <sup>C19GC120G</sup>	3,3 +/- 0,6	< 0,03	0,2 +/- 0,06

Vergleich zwischen verschiedenen Anzuchtbedingungen: Mixotroph mit 70% H<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> 10% CO<sub>2</sub> und 10% N<sub>2</sub>; 70%H<sub>2</sub>, 20% H<sub>2</sub> und 10% CO<sub>2</sub> und heterotroph. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>C19G</sup>: HF801, MBH<sup>C120G</sup>: HF802, MBH<sup>C19G/C120G</sup>: HF800.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anzucht mit höheren O<sub>2</sub>-Konzentrationen einen negativeren Effekt auf die Aktivität und den Anteil von HoxK in der Membran bei am proximalen Cluster veränderten Mutanten hatte, als beim Wildtyp.

#### 3.4.4 Spektroskopische Charakterisierung der MBH<sup>C19G</sup> und MBH<sup>C19G/C120G</sup> gebunden an die Membran

Durch spektroskopische Untersuchungen von Hydrogenasen lassen sich Strukturvorhersagen der metallischen Zentren und ihrer direkten Umgebung im Protein machen. Insbesondere EPR- und IR-Spektroskopie sind in der Untersuchung von Hydrogenasen etabliert und werden schon seit Ende der 1970er Jahre für die Untersuchung von Metallzentren in Hydrogenasen eingesetzt. Durch EPR-Spektroskopie lassen sich in der Regel Metallzentren mit einem ungepaarten Elektron aufspüren. Diese werden paramagnetisch genannt (im Gegensatz zu diamagnetischen Zentren, die sich EPR-inaktiv verhalten). Durch unterschiedliche

## Ergebnisse

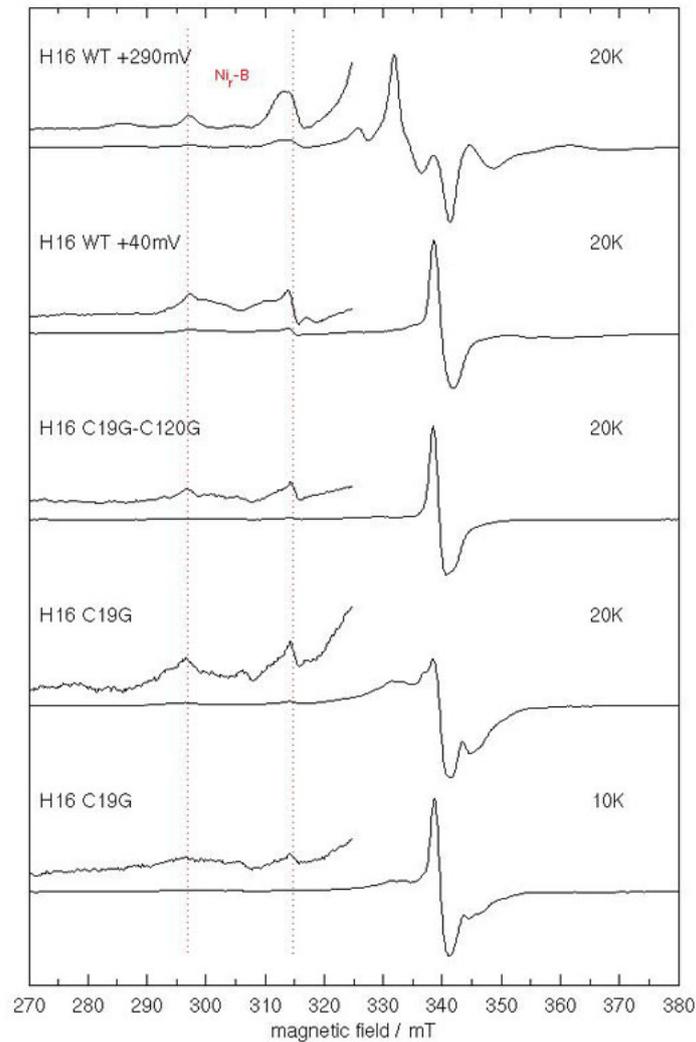
Position und Stärke und die relative Anordnung der EPR-Signale kann die Natur von Metallzentren spezifiziert werden. So wurden auch zum ersten Mal die diversen Nickelzustände von [NiFe]-Hydrogenasen aufgedeckt und unterschieden (Teixeira *et al.*, 1985). Besonders für Fe-S Cluster, die je nach Redoxzustand paramagnetisch oder diamagnetisch sind, lässt sich die EPR-Spektroskopie gut verwenden, da die entstehenden Signale charakteristisch für die Art des Clusters sind. EPR-inaktive Metallzentren, wie z.B. die aktiven Nickel-Zustände lassen sich mit FTIR-Spektroskopie detektieren, wobei die Wellenzahlen der Streck-schwingung der nicht-proteinogenen Liganden, CO und CN<sup>-</sup> vom Nickelzustand abhängen. Die MBH kann sowohl in ihrem nativen Zustand, an die Membran gebunden, als auch in isoliertem Zustand als Dimer oder Trimer, spektroskopisch untersucht werden (Saggu *et al.*, 2009). Für die EPR- und FTIR-Spektroskopie an Gesamtmembranen wurden konzentrierte Membranextrakte mit einem Proteingehalt von mindestens 30 µg/µl hergestellt. Die spektroskopischen Untersuchungen wurden von Nina Heidary, Dr. Ingo Zebger (FTIR) und Dr. Miguel Saggu (EPR) aus der Gruppe von Dr. Peter Hildebrandt am Max-Volmer-Laboratorium für Biophysikalische Chemie / Institut für Chemie der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

Bei den EPR-Spektren der Membranextrakte der MBH<sup>Wt</sup> wurde das Auftauchen des komplexen, verbreiterten Signals symmetrisch um das [3Fe-4S] Clustersignal bei einem g-Wert von 2,02 beobachtet, das auf eine Kopplung dieses Clusters mit einem anderen paramagnetischen Metallzentrum hindeutet (Abbildung 24 erste Reihe, (Saggu *et al.*, 2009)). Zusätzlich sind im vergrößerten Ausschnitt die g<sub>x</sub>- und g<sub>y</sub>-Werte bei 2,31 und 2,17 respektive erkennbar, die für den Ni<sub>r</sub>-B-Zustand charakteristisch sind. Das g<sub>z</sub>-Signal (bei g = 2,01, (Saggu *et al.*, 2009)) wird vom [3Fe-4S] Clustersignal überlagert. Nach Reduktion mit Mercaptoethanol auf ein Redoxpotential von etwa +40 mV verschwindet das verbreiterte Signal und lässt das isolierte [3Fe-4S]-Signal und die Ni<sub>r</sub>-B-Signale zurück (Abbildung 24 Reihe zwei). Mit einer Reduktion mit Ascorbat auf +70 mV,

die im Anschluss an diese Arbeit gemacht wurde, ließ sich das gleiche Spektrum hervorrufen. Die oxidierte Form der  $\text{MBH}^{\text{C19G/C120G}}$  zeigt im Gegensatz zur  $\text{MBH}^{\text{Wt}}$  im isolierten Zustand bei einem Potential von +290 mV kein komplexes Signal, sondern das schmale Signal bei  $g = 2,02$ , das typisch für ein ungekoppeltes [3Fe-4S]-Signal ist (Abbildung 24, Reihe drei). Die Nickelsignale sind schwächer als die der  $\text{MBH}^{\text{Wt}}$ , lassen aber mit denselben  $g$ -Werten dennoch auf einen reinen  $\text{Ni}_\text{r}$ -B-Zustand schließen. Signale, die von anderen Nickel-Zuständen stammen, sind nicht erkennbar, insbesondere ist kein Signal vorhanden, das auf den bei  $\text{O}_2$ -sensitiven Hydrogenasen vorkommenden  $\text{Ni}_\text{u}$ -A-Zustand hindeutet.

Die  $\text{MBH}^{\text{C19G}}$  weist bei einer Temperatur von 20 K ein schwächeres [3Fe-4S]-Signal und ein schwächeres Split Signal auf, was auf ein in Teilen gekoppeltes [3Fe-4S]-Cluster hindeutet (Abbildung 24 Reihe vier). Die  $g$ -Signale des  $\text{Ni}_\text{r}$ -B-Zustandes sind deutlich zu erkennen, wobei zwischen dem  $g_x$ - und  $g_y$ -Signal noch ein weiteres Signal zu erkennen ist, das weder dem  $\text{Ni}_\text{u}$ -A- noch dem  $\text{Ni}_\text{r}$ -B- oder einem anderen Nickel-Zustand eindeutig zuzuordnen ist. Bei einer niedrigeren Temperatur von 10 K verringert sich der Anteil des Split Signals, während sich das [3Fe-4S]-Clustersignal durch die niedrigere Temperatur und der damit verbundenen geringeren Relaxation vergrößert.

## Ergebnisse

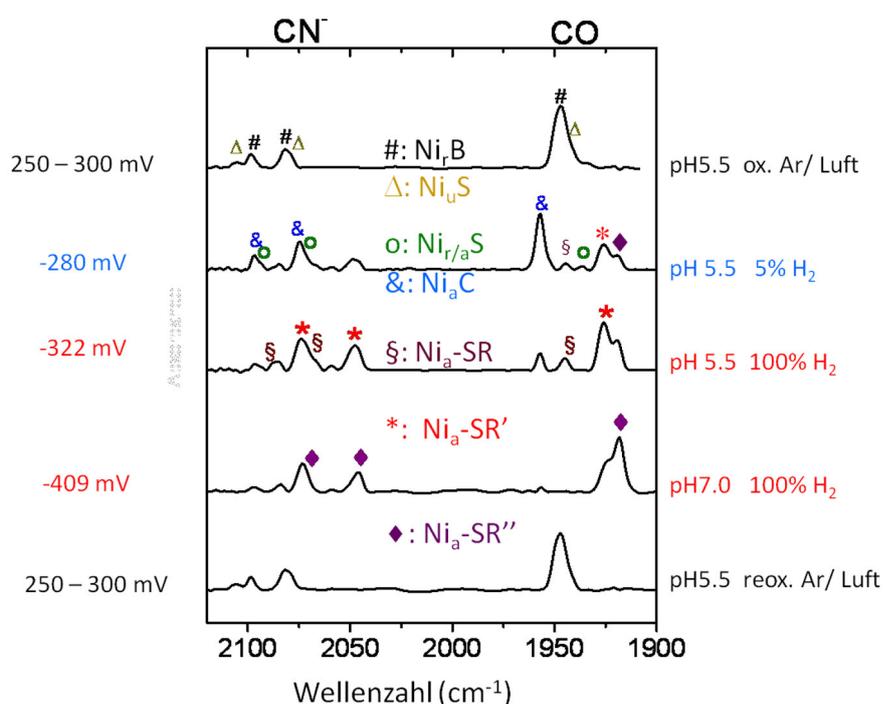


**Abbildung 24:** EPR-Spektroskopie der MBH<sup>Wt</sup>, der MBH<sup>C19G</sup> und der MBH<sup>C19G/C120G</sup>.

Die Spektren der Gesamtmembranextrakte zeigen Signale des Ni-Fe-Zentrums und der Fe-S Cluster. Die vergrößerten Spektren des Ni-Signalbereichs über den linken Teilen des Spektrums sind 5-fach vergrößert. Von oben nach unten: 1. Spektrum: MBH<sup>Wt</sup> im oxidierten Zustand wie isoliert, 2. Spektrum: MBH<sup>Wt</sup> nach Reduktion mit Mercaptoethanol, 3. Spektrum: MBH<sup>C19G/C120G</sup> im oxidierten Zustand (wie isoliert), 4. Spektrum: MBH<sup>C19G</sup> im oxidierten Zustand, 4. Spektrum: MBH<sup>C19G</sup> im oxidierten Zustand bei 10 K. Die gestrichelte Linie zeigt die  $g_x$  und  $g_y$ -Signale des Ni<sub>r</sub>-B-Zustandes. Experimentelle Bedingungen: pH 7,0, 10 mW Mikrowellenleistung, Mikrowellenfrequenz: 9,56 GHz, 1 mT Modulationsamplitude, 12,5 GHz Modulationsfrequenz.

Um weitere Details über die Ni-Zustände zu erhalten, wurde FTIR-Spektroskopie mit Membranextrakten der MBH durchgeführt, wobei die Spektren der MBH<sup>C19G</sup> und der MBH<sup>C19G/C120G</sup> hier als zweite Ableitung dargestellt sind, da die Signale schwächer als bei der MBH<sup>Wt</sup> (Abbildung 25) ausfielen. Für die

MBH<sup>C19G/C120G</sup> ließen sich ähnliche Signale wie im Wildtyp nachweisen. Die für den Ni<sub>r</sub>-B-Zustand charakteristischen CN<sup>-</sup>-Banden waren bei Wellenzahlen von 2078 und 2099 cm<sup>-1</sup> detektierbar, während die CO-Bande bei einer Wellenzahl von 1948 cm<sup>-1</sup> zu sehen war (Abbildung 26 A, oberstes Spektrum, mit # markiert).



**Abbildung 25:** FTIR-Spektrum von cytoplasmatischem Membranextrakt mit MBH<sup>Wt</sup> aus (Saggu *et al.*, 2009).

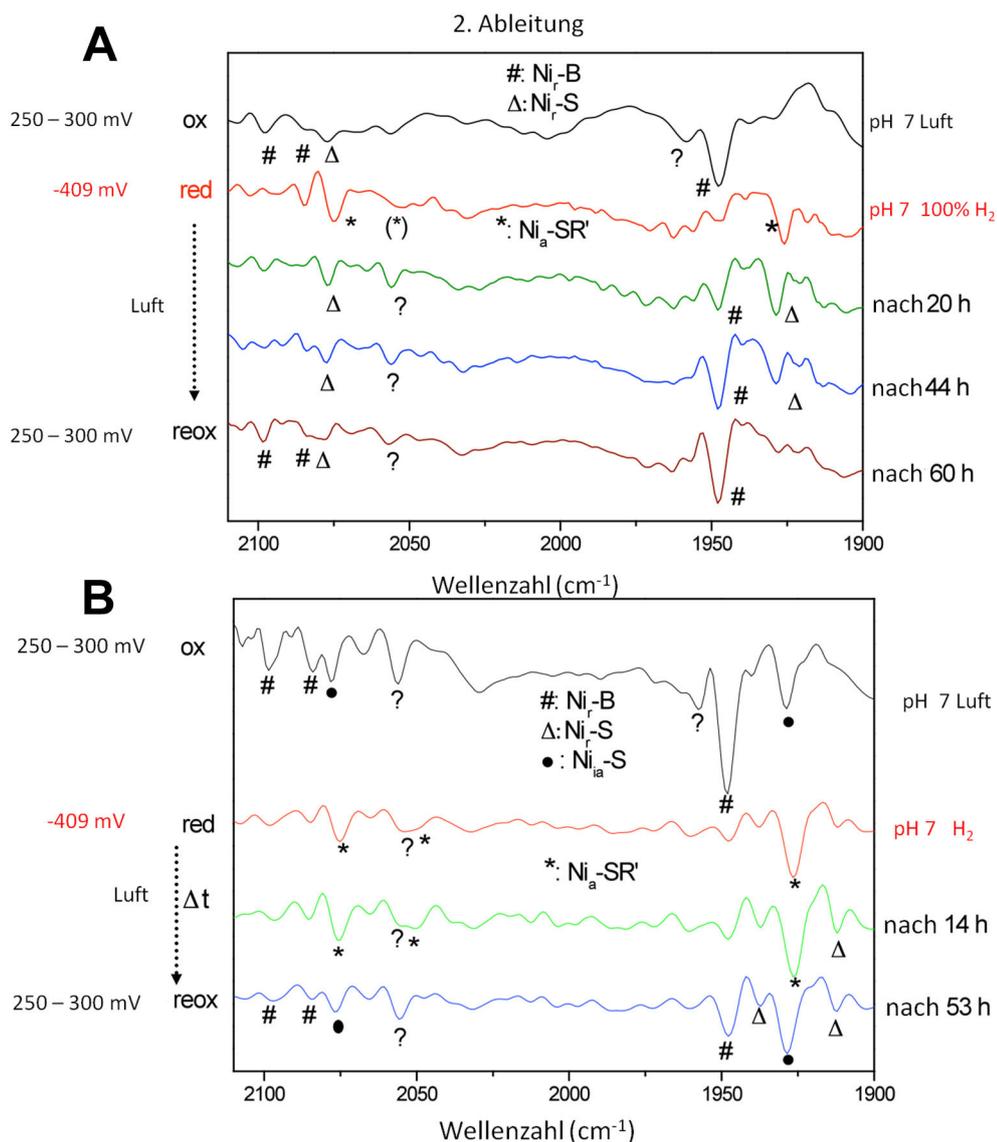
1. Reihe: Oxidiert (wie isoliert). 2. Reihe: mit 0,05 bar H<sub>2</sub> reduziert, 3. Reihe: mit 1 bar H<sub>2</sub> reduziert, 4. Reihe: Mit 1 bar H<sub>2</sub> reduziert, pH 7,0, 5. Reihe: Reoxidiert an Luft, Signale wie in der 1. Reihe. Symbole wie in der Abbildung gelistet.

Nach 1 h Reduktion mit 100 % H<sub>2</sub> (Abbildung 26 A, zweite Reihe) verschoben sich die CO- und CN<sup>-</sup>-Banden zu niedrigeren Wellenzahlen von 1926 cm<sup>-1</sup> für CO und 2049 und 2075 cm<sup>-1</sup> für die CN<sup>-</sup>-Banden, charakteristisch für den Ni<sub>a</sub>-SR'-Zustand (markiert mit \*). Im Unterschied zur MBH<sup>Wt</sup> war die CN<sup>-</sup>-Bande bei 2049 cm<sup>-1</sup> nur sehr schwach ausgeprägt. Nach Reoxidation verschiebt sich die CO-Bande mit der Zeit zu höheren Wellenzahlen. Nach 20 h an Luft splittete sie sich in ein Signal bei 1930 cm<sup>-1</sup>, charakteristisch für den inaktiven Ni<sub>a</sub>-S-Zustand und das Ni<sub>r</sub>-B-Signal bei 1948 cm<sup>-1</sup>. Nach noch längerer Oxidation verschob sich die CO-Bande bei 1930cm<sup>-1</sup> nahezu komplett zu einer Wellenzahl von 1948cm<sup>-1</sup>,

## Ergebnisse

dem Ni<sub>r</sub>-B-Signal. Die CN<sup>-</sup>-Signale wanderten bei der Reoxidation zu Positionen bei 2075 cm<sup>-1</sup>, dem Ni<sub>r</sub>-S-Zustand und einem unbekanntem Zustand bei 2056 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 26 A, Reihen drei bis fünf, ersterer mit Δ, letzterer mit ? markiert), statt zur zweiten CN<sup>-</sup>-Bande des Ni<sub>r</sub>-S-Zustand bei 2093 cm<sup>-1</sup>. Dieses Signal bei 2056 cm<sup>-1</sup> verschwand im Spektrum der MBH<sup>C19G/C120G</sup> selbst nach 60 h Reoxidation nicht gänzlich, obwohl sich die Menge dieses Zustands leicht verringerte. Dies deutete auf einen defekten Zustand des Enzyms hin, der nach Reoxidation zu einer geringen Menge in der Probe enthalten war. Davon abgesehen konnte die MBH<sup>C19G/C120G</sup> fast vollständig reoxidiert werden. Auch die CN<sup>-</sup>-Banden des Ni<sub>r</sub>-B-Zustandes bei 2081 und 2098 cm<sup>-1</sup> konnten wie die CO-Bande bei 1948 cm<sup>-1</sup> nach 60 h Reoxidation detektiert werden.

Die MBH<sup>C19G</sup> zeigte im Gegensatz dazu deutlich mehr inaktives Enzym. Das Spektrum im oxidierten Zustand zeigte ungefähr 70 % Ni<sub>r</sub>-B, 20 % erscheinen hingegen inaktiv mit einer CN<sup>-</sup>-Bande bei 2076 cm<sup>-1</sup> und einer CO-Bande bei 1928 cm<sup>-1</sup> (schwarzer Kreis, Abbildung 26 B, erste Reihe). 80 % der Probe war redoxaktiv. Der Ni<sub>a</sub>-SR'-Zustand konnte wie bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> nach Reoxidation detektiert werden. Das Enzym war nicht komplett reversibel reduzierbar, bei Reoxidation mit Luft kehrten 40 % des Enzyms nicht in den oxidierten Zustand zurück (siehe Abbildung 26, vierte Spur) und verblieben geschädigt.



**Abbildung 26:** FTIR-Spektrum von cytoplasmatischem Membranextrakt mit MBH<sup>C19G/C120G</sup> (A) und MBH<sup>C19G</sup> (B).

1. Reihe: Oxidiert (wie isoliert). 2. Reihe: mit 1 bar H<sub>2</sub> reduziert, 3. bis 5. Reihe: Reoxidation an Luft zu den angegebenen Zeitpunkten. Symbole wie in der Abbildung gelistet. ? = Unidentifiziertes Signal.

### 3.4.5 Das gereinigte MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer offenbart überraschende spektroskopische Eigenschaften

Für die elektrochemische und spektroskopische Charakterisierung des MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimers wurde ein Strep-Tag an das C-terminale Ende fusioniert,

## Ergebnisse

um das Protein über Affinitätschromatographie zu reinigen (Stamm HF805). Die Isolierung erfolgte aus Membranextrakt, gewonnen nach mixotropher Anzucht in 1 l FGN-Medium in Exsikkatoren mit anfänglicher Begasung einer Atmosphäre von 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub>. Die Reinigung wurde durchgängig mit K-PO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,0 vorgenommen, in dem auch die spektroskopischen Messungen durchgeführt wurden.

Das Bandenmuster der gereinigten MBH<sup>C19G/C120G</sup> (Abbildung 27) war identisch mit dem der MBH<sup>Wt</sup>, so waren zum Beispiel keine Banden erkennbar, die von zusätzlichem Abbau aufgrund von instabilem Protein auftreten könnten.



**Abbildung 27:** SDS-PAGE nach Reinigung der MBH<sup>Wt</sup> (HF804, A) und MBH<sup>C19G/C120G</sup> (HF805, B) über Strep Tactin-Affinitätschromatographie. SE: 20 µg löslicher Extrakt (soluble extract), SME: 20 µg solubilisierter Membranextrakt, E: 5 µg Eluat, C: 5 µg konzentriertes Eluat.

Die MBH<sup>C19G/C120G</sup> konnte in vergleichbaren Mengen wie der MBH<sup>Wt</sup> isoliert werden (siehe Tabelle 9), aus etwa 10 g Zellen konnten etwa 0,8 mg Protein gereinigt werden (Wildtyp: 1,1 mg). Sowohl die Aktivität im solubilierten Membranextrakt von MBH<sup>C19G/C120G</sup>, als auch die des gereinigten Enzyms betrug etwa 75 % der MBH<sup>Wt</sup>-Aktivität (Tabelle 10), allerdings ist die Standardabweichung der Aktivität für die gereinigte MBH<sup>C19G/C120G</sup> etwas höher. Auch die Anreicherung und die Ausbeute an Protein sind für die MBH<sup>C19G/C120G</sup> und MBH<sup>Wt</sup> ähnlich. Für die EPR und FTIR-Messungen wurde die MBH auf eine Konzentration von 35 µM in einem Volumen von etwa 150 µl konzentriert.

**Tabelle 10:** Reinigungstabelle MBH<sup>C19G/C120G</sup>

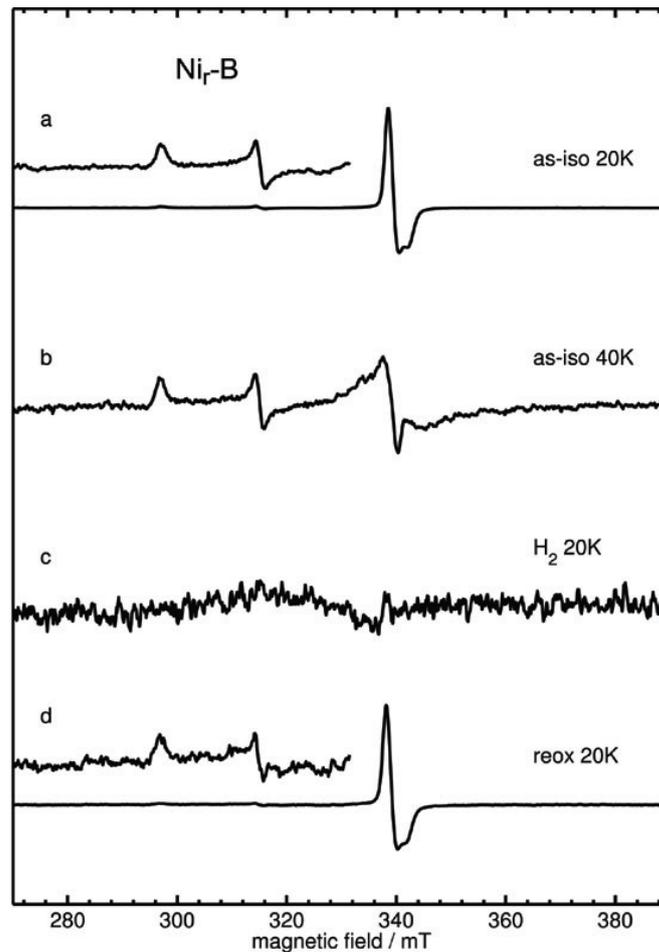
	Volumen (ml)	Proteinkonzentration (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	Spez. Aktivität (U/mg)	Gesamtaktivität (U)	Ausbeute	Anreicherung
<b>MBH<sup>Wt</sup></b>							
SME	10	4,3 +/- 0,9	43 +/- 9	4,1 +/- 0,7	176,3 +/- 6,3	100	1
Gereinigt	0,2	5,5 +/- 0,6	1,1 +/- 0,12	47,8 +/- 5,3	52,58 +/- 0,63	29	11,7
<b>MBH<sup>C19G/C120G</sup></b>							
SME	10	3,6 +/- 1,3	26 +/- 12	2,3 +/- 0,6	59,8 +/- 7,2	100	1
Gereinigt	0,2	4 +/- 0,6	0,8 +/- 0,12	38,5 +/- 4,4	30,8 +/- 0,53	51	16,7

Die H<sub>2</sub>-Reduktionsaktivität wurde mit Metylenblau als Elektronenakzeptor bei einem pH-Wert von 5,5 bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert der Aktivität und die Standardabweichung. Für Statistik und Methoden siehe 2.7 und 2.8. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF804, MBH<sup>C19G/C120G</sup>: HF805.

Das EPR-Spektrum der oxidierten MBH<sup>C19G/C120G</sup> (im isolierten Zustand) zeigt wie erwartet ein typisches [3Fe-4S] Cluster Signal bei  $g = 2,02$ , das sich nicht von dem Signal des Spektrums des Membranextrakts der MBH<sup>Wt</sup> unterscheidet. Ebenfalls sichtbar ist das  $g_x$ - und  $g_y$ -Signale des Ni<sub>r</sub>-B-Signals. Signale, die dem Ni<sub>u</sub>-A-Zustand zugeschrieben werden können, sind auch hier nicht sichtbar. Spektren bei höheren Temperaturen (40 K) zeigen ein für das [3Fe-4S] Cluster typisches Relaxationsverhalten, die Signalintensität sinkt auf einen Bruchteil des 20 K-Signals, während die langsamer relaxierenden Ni<sub>r</sub>-B-Signale in etwa der Signalintensität bei 20 K entsprechen.

Nach halbstündiger Reduktion mit H<sub>2</sub> lässt sich überraschenderweise kein EPR-Signal mehr detektieren. Weder das erwartete [4Fe-4S] Signal, noch ein Nickelsignal ist zu beobachten. Nach Reoxidation mit O<sub>2</sub> lässt sich das Ausgangssignal wie im isolierten Enzym beobachten, was darauf hindeutet, dass die MBH noch funktionell ist und wahrscheinlich kein Abbau erfolgt und kein Fe-S Cluster oxidativ beschädigt ist.

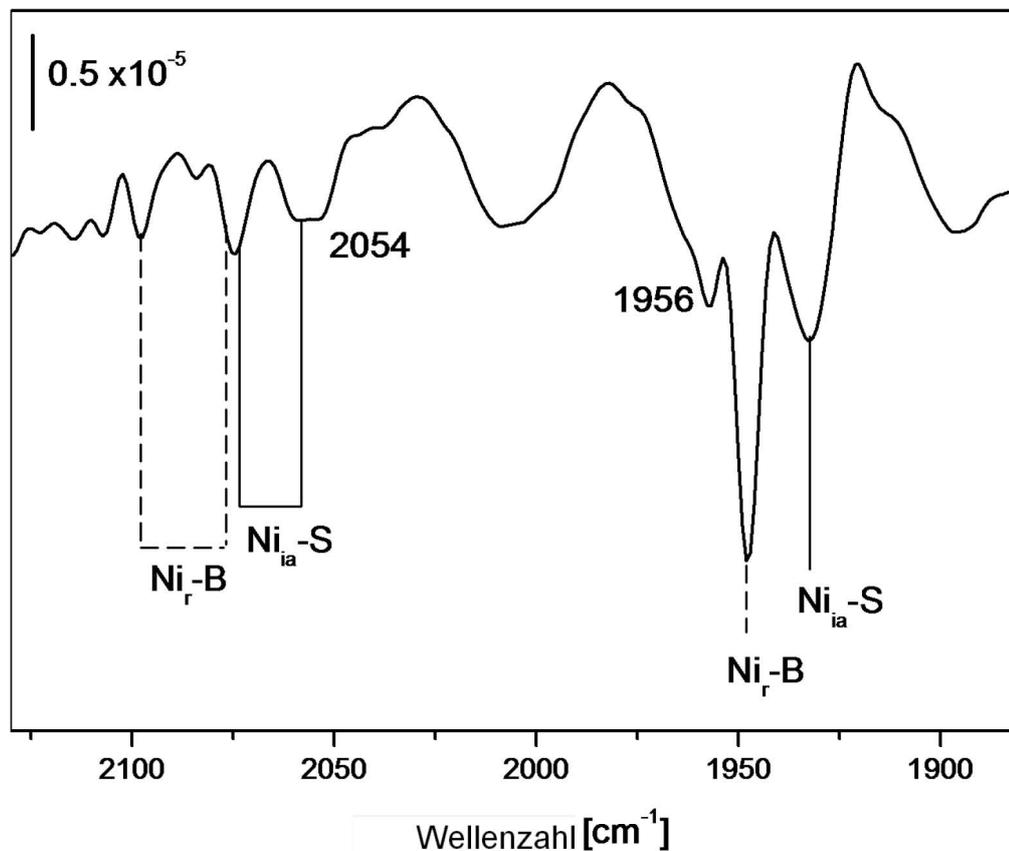
## Ergebnisse



**Abbildung 28:** EPR-Spektroskopie der gereinigten MBH<sup>C19G/C120G</sup>.

Die Spektren zeigen Signale des Ni-Fe-Zentrums (links) und des medialen Fe-S Cluster (Mitte rechts). Die vergrößerten Spektren des Ni-Signals über den linken Teil des Spektrums sind 5-fach vergrößert. Von oben nach unten: 1. Spektrum: MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer im oxidierten Zustand wie isoliert, 2. Spektrum: MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer wie isoliert bei 40 K, 3. Spektrum: MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer nach Reduktion mit 100 % H<sub>2</sub>, 4. Spektrum: MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer an Luft reoxidiert. Experimentelle Bedingungen: pH 7, 10 mW Mikrowellenleistung, Mikrowellenfrequenz: 9,56 GHz, 1 mT Modulationsamplitude, 12,5 GHz Modulationsfrequenz.

Bei den FTIR-Messungen wurden die in der Membran getätigten Beobachtungen bestätigt. Das Enzym verhält sich weitgehend wie die MBH<sup>Wt</sup>, lediglich bei 1956 cm<sup>-1</sup> im oxidierten Zustand, neben der CO-Bande des Ni<sub>r</sub>-B-Zustandes, war ein zusätzliches Signal zu erkennen, das keinem Nickel-Zustand zugeordnet werden kann (Abbildung 29). Etwa 30 % des Enzyms war im inaktiven Ni<sub>ia</sub>-S-Zustand, was charakteristisch für gereinigtes Enzym ist (Saggu *et al.*, 2010).



**Abbildung 29:** FTIR-Spektrum von gereinigter MBH<sup>C19G/C120G</sup>. Spektrum aufgenommen am oxidierten Enzym (wie isoliert). Die Ni-Zustände sind in der Abbildung gelistet. Bei 1956 cm<sup>-1</sup> ist ein unidentifiziertes Ni-Signal zu erkennen. Spektrum aufgenommen bei pH 7.

### 3.4.6 Elektrochemische Charakterisierung der MBH<sup>C19G/C120G</sup>

Bei der Proteinfilmvoltammetrie mit rotierender Elektrode wird die gereinigte MBH auf einer drehbaren Elektrode immobilisiert, mittels dieser dann katalytische Ströme gemessen werden können. Die Experimente werden in einer gasdichten Kammer durchgeführt, die man mit beliebigen Gasen durchströmen kann. Die Methode hat mehrere Vorteile, die man bei sonstigen Aktivitätsmessungen nicht erreichen kann. So interagieren nur aktive Hydrogenasemoleküle mit der Elektrode, was den Vorteil hat, dass beispielsweise unterschiedliche Enzympräparationen trotz ihrer Heterogenität sehr ähnliche Ergebnisse liefern, da inaktive Enzyme

## Ergebnisse

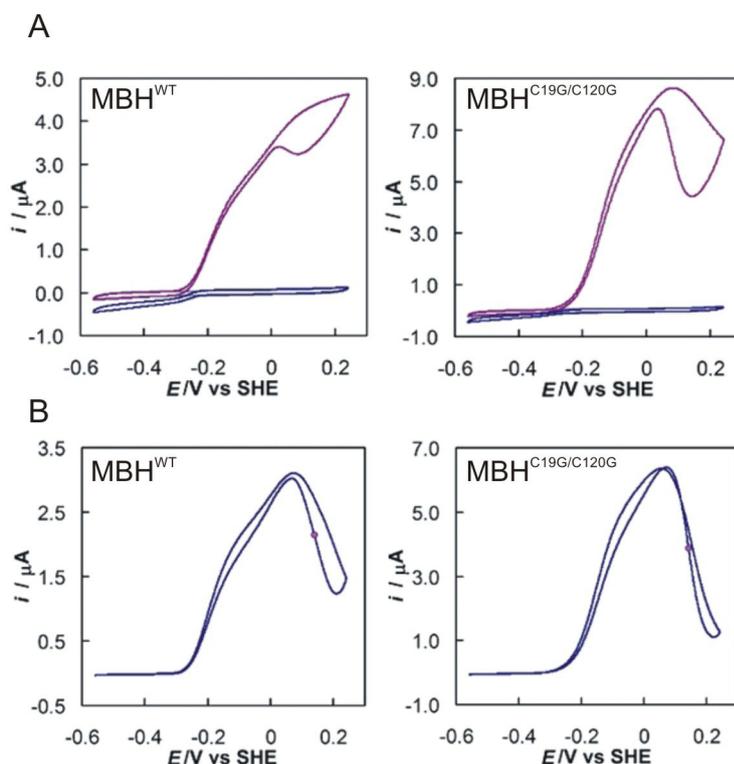
nicht in die Messergebnisse mit einfließen. Der Nachteil dabei ist, dass die Dichte des Proteinfilms in unterschiedlichen Messungen sehr heterogen ist, so dass aus dem Stromfluss nicht auf die spezifische Aktivität geschlossen werden kann. Dafür lässt sich die Hydrogenaseaktivität über einen breiten Bereich von Redoxpotentialen messen und es muss kein spezifischer Elektronenakzeptor eingesetzt werden, der die Ergebnisse verfälschen kann. Durch die Elektrodenrotation ist eine permanente Durchmischung der Lösung gegeben, wodurch sich das Produkt und das Substrat schneller als durch Diffusion im Gleichgewicht befinden. Schließlich gewährt die gasdichte Kammer, die in Kontakt zur enzymbeschichteten Elektrode steht, die Möglichkeit, das Verhalten des Enzyms unter verschiedenen Gasgemischen untersuchen zu können. So kann auch der direkte Einfluss von verschiedenen  $O_2$ -Konzentrationen auf die Enzymaktivität beobachtet werden.

Zur elektrochemischen Charakterisierung der MBH wurde das Protein auf eine Konzentration von ungefähr  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  gebracht. Die Proben wurden von Annemarie Wait in der Arbeitsgruppe von Fraser Armstrong am Institut für anorganische Chemie der Universität Oxford mit Proteinfilmvoltammetrie auf der Graphitelektrode untersucht. Hierbei wird das Enzym als Proteinfilm auf eine rotierende Elektrode aufgetragen. Zur Untersuchung der Aktivität der MBH bei verschiedenen Redoxpotentialen wurde ein zyklisches Voltammogramm aufgenommen. Hierbei handelt es sich um die Messung der Stromstärke, die mit der Aktivität des Enzyms direkt korreliert, aufgetragen gegen das Redoxpotential zwischen etwa  $-600$  bis  $+300$  mV, bezogen auf die Standard- $H_2$ -Elektrode. Der Scan wird dabei in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung durchgeführt, so dass das Voltammogramm zyklisch ausfällt. Die Rate mit der die Redoxpotentiale geändert werden, kann dabei frei gewählt werden. Üblich sind zwischen  $1 \text{ mVs}^{-1}$  und  $1 \text{ Vs}^{-1}$ . Die Reaktion der Hydrogenase läuft je nach Redoxpotential in die Richtung der  $H_2$ -Oxidation oder der  $H^+$ -Reduktion ( $H_2$ -Produktion) ab. Bei niedrigem Redoxpotential werden Elektronen von der Elektrode an die Hydrogenase abgegeben ( $H_2$ -Produktion), bei

höherem Redoxpotential wird  $\text{H}_2$  oxidiert, wobei die Elektrode als Elektronenakzeptor fungiert (Vincent *et al.*, 2007).

Anhand eines zyklischen Voltamogramms kann der katalytische Bias (die Rate der  $\text{H}_2$ -Produktion relativ zur  $\text{H}_2$ -Oxidation), das Überpotential (das Redoxpotential, bei dem die Hydrogenase von  $\text{H}_2$ -Produktion auf  $\text{H}_2$ -Oxidation umspringt) und der  $E_{\text{switch}}$  bestimmt werden. Bei hohen Redoxpotentialen werden Hydrogenasen deaktiviert, die Aktivität sinkt (anaerobe oxidative Inaktivierung), was am besten bei langsamen Aufnahmezeiten nachvollzogen werden kann, da diese Deaktivierung relativ langsam abläuft. Bei sinkenden Redoxpotentialen während des Scans in die Rückwärtsrichtung steigt die Aktivität wieder an, die sogenannte reduktive Reaktivierung. Der  $E_{\text{switch}}$  ist der Punkt im Voltamogramm, bei dem die reduktive Reaktivierung halbmaximal ist. Er ist charakteristisch für verschiedene Arten von Hydrogenasen, so hat die MBH aus *R.e.* mit etwa +100 mV einen für [Ni-Fe]-Hydrogenasen sehr hohen Wert, was auffällig mit der  $\text{O}_2$ -Toleranz dieser Moleküle korreliert. Abbildung 30 zeigt Voltamogramme bei verschiedenen Scanraten für die MBH<sup>Wt</sup> und für die MBH<sup>C19G/C120G</sup>. Das zyklische Voltamogramm der MBH<sup>C19G/C120G</sup> unter  $\text{N}_2$  ist dem Wildtyp in grundlegenden Dingen sehr ähnlich. Bei einem Redoxpotential an der Elektrode von unter etwa -300 mV wird  $\text{H}_2$  (in geringem Maße) produziert, bei einem positiveren Potential oxidiert. Die Rate des Anstiegs auf die maximale Aktivität und das Redoxpotential bei der höchsten Aktivität vor der anaeroben Inaktivierung unterscheiden sich nicht. Kleine Unterschiede gibt es im Kurvenverlauf, die aber nicht bei jeder Messung gleichermaßen stark beobachtet wurden. Der größte Unterschied war bei der anaeroben oxidativen Inaktivierung zu beobachten, die typisch für den Ni<sub>r</sub>-B-Zustand der MBH ist. Hier sieht man bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> eine weitaus schnellere und stärkere Inaktivierung, während der  $E_{\text{switch}}$  etwa gleich bleibt. Bei einer höheren Scanrate tritt die anaerobe Inaktivierung stärker in Erscheinung, während sich die Kurven der Hin- und Rückrichtung bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> sogar überschneiden.

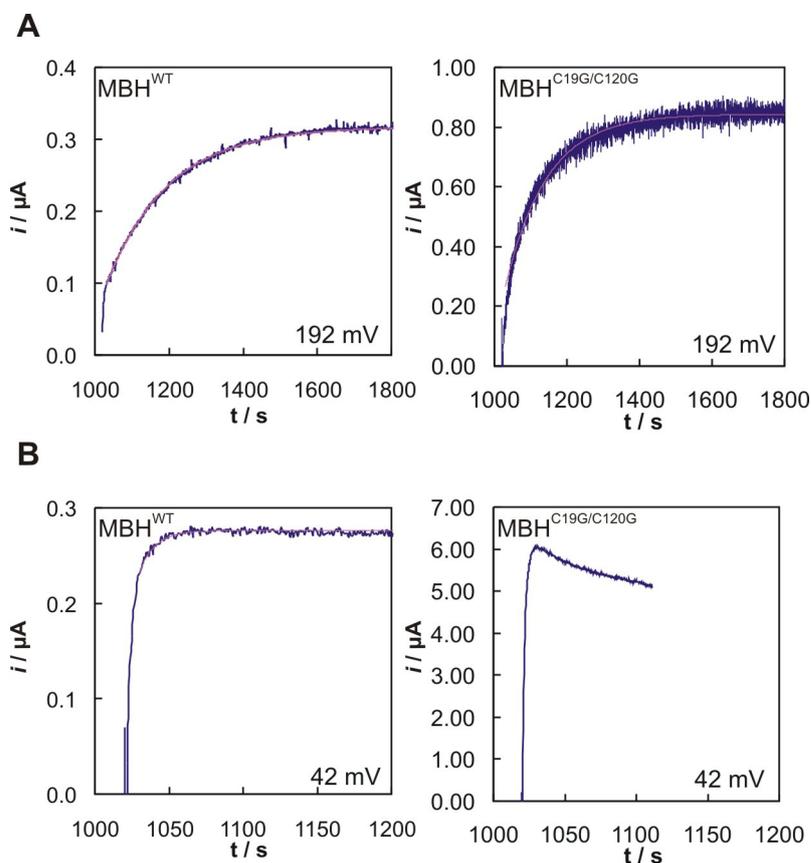
## Ergebnisse



**Abbildung 30:** A: Zyklisches Voltammogramm der MBH<sup>WT</sup> und der MBH<sup>C19G/C120G</sup>. Scan unter 100 % N<sub>2</sub> (blau) gefolgt von einem Scan unter 100 % H<sub>2</sub> (violett). Temperatur 30 °C, pH 5,5, 2500 rpm, 20 mV/s). B: Zyklisches Voltammogramm mit langsamerer Scanrate (1mV/s) zur näheren Betrachtung der oxidativen Reaktivierung. Der E<sub>switch</sub> (rosa Punkt in den unteren Kurven) liegt für beide Enzyme bei etwa 140 mV.

Um die anaerobe Inaktivierung zwischen MBH<sup>WT</sup> und MBH<sup>C19G/C120G</sup> genauer zu untersuchen, wurde ein sehr hohes initiales Redoxpotential (442 mV) angelegt, von dem aus dann das Redoxpotential des Reaktivierungsbeginns (192 mV) eingestellt wurde. Vom Kurvenverlauf lässt sich ablesen, wie schnell die Reaktivierung abläuft und ob diese normal abläuft, worauf eine exponentielle Kurve schließen lässt. Sowohl für die MBH<sup>WT</sup>, als auch für die MBH<sup>C19G/C120G</sup> ist eine typische, langsame exponentielle Steigerung der Aktivität erkennbar, was auf eine ähnliche Reaktivierung bei hohen Redoxpotentialen spricht. Wird von dem hohen initialen Redoxpotential auf ein niedriges Redoxpotential, das negativer als der E<sub>switch</sub> ist (Abbildung 32 B), umgeschaltet, wird ein Unterschied der MBH<sup>C19G/C120G</sup> zur MBH<sup>WT</sup> sichtbar. Während beide Enzyme unter diesen Messbedingungen einen sehr viel schnelleren Anstieg zur maximalen Aktivität aufweisen (weniger als 10 s

im Vergleich zu mehr als 10 min), zeigt die MBH<sup>C19G/C120G</sup> einen Aktivitätsabfall nach Erreichen des Maximums, während die MBH<sup>Wt</sup> das typische Plateau erreicht.

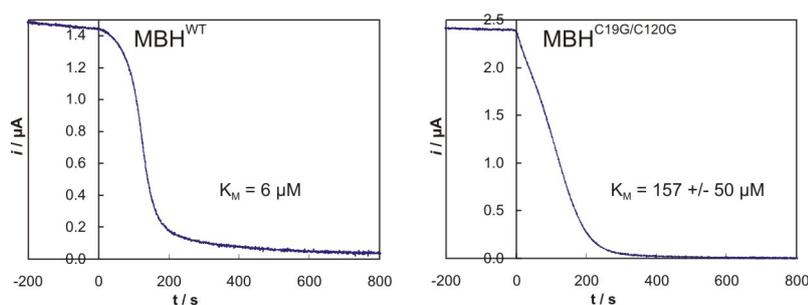


**Abbildung 31:** A: Anaerobe Inaktivierung bei 100 % H<sub>2</sub> bei einem Anfangspotential von 442 mV gefolgt von einer Änderung des Potentials auf die Stufe der Reaktivierungsinitiation (192 mV). B: Reaktivierung bei einem niedrigeren Potential (42 mV)

Zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes durch Proteinfilmvoltammetrie (Abbildung 32) wurde die Zelle mit der MBH-beschichteten Elektrode mit N<sub>2</sub> gefüllt, um danach bei  $t = 0$  s mit einer bestimmten Menge an H<sub>2</sub>-gesättigtem Puffer befüllt zu werden, was in einer Anfangskonzentration von 400  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub> resultierte. Die Befüllung mit H<sub>2</sub> hatte einen Anstieg der Aktivität auf den Anfangswert zur Folge, die danach aufgrund des N<sub>2</sub>-Durchflusses im Laufe der Zeit sank. Die Abnahme der H<sub>2</sub>-Konzentration folgt dabei einem exponentiellen Verlauf mit der Zeitkonstante  $\tau$ .

## Ergebnisse

Wie in Abbildung 32 zu sehen, ist die MBH<sup>C19G/C120G</sup> zum Zeitpunkt Null auch bei höherer H<sub>2</sub>-Konzentration im Medium nicht gesättigt. Während für den Wildtyp ein K<sub>M</sub> von 6 μM berechnet wurde, der mit den Literaturwerten übereinstimmt (Cracknell *et al.*, 2009), besaß die MBH<sup>C19G/C120G</sup> einen um etwa den Faktor 30 höheren K<sub>M</sub>-Wert von etwa 160 μM und damit eine wesentlich geringere Affinität zu H<sub>2</sub> als der Wildtyp. Hierbei ist zu beachten, dass der K<sub>M</sub> nur mit einer relativ hohen Fehlerquote von +/- 50 μM bestimmt werden konnte, da keine Sättigung mit H<sub>2</sub> erreicht werden konnte. So musste die Affinität über eine sigmoidale Kurve durch einen extrapolierten Sättigungspunkt *i*<sub>lim</sub> bestimmt werden. Die Inhibierungskonstante für O<sub>2</sub> konnte bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> nicht bestimmt werden, da diese bei sättigender H<sub>2</sub>-Konzentration durchgeführt werden muss.



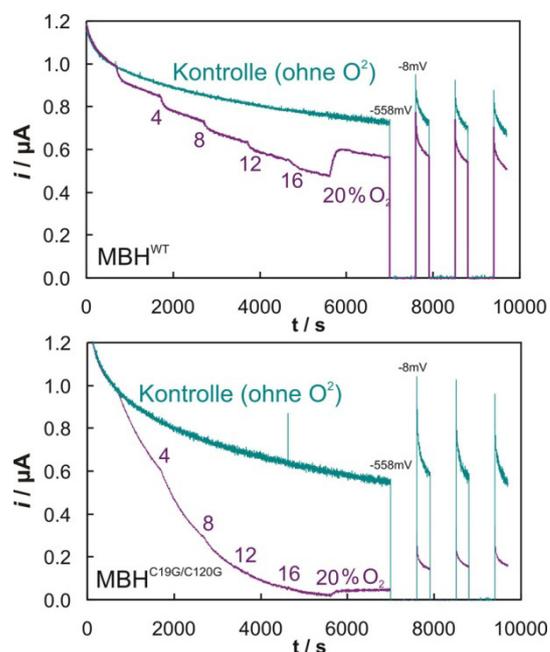
**Abbildung 32:** Bestimmung des K<sub>M</sub> für H<sub>2</sub> von MBH<sup>WT</sup> (links) und MBH<sup>C19G/C120G</sup> (rechts). Die MBH<sup>C19G/C120G</sup> war selbst unter 100 % H<sub>2</sub> nicht gesättigt (zur Berechnung des K<sub>M</sub> siehe 2.24.3). Die Messungen wurden bei 30 °C und -108 mV durchgeführt, der pH-Wert betrug 5,5, die Elektrode wurde mit 4500 rpm rotiert.

Die Proteinfilmvoltammetrie ist die einzige Methode, mit der man verlässlich die Katalyse von Hydrogenasen in Gegenwart von O<sub>2</sub> messen kann. Hierzu wurde der Hydrogenasefilm auf der Elektrode einer konstanten Konzentration an H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> ausgesetzt, wobei letzteres Gas nach und nach durch höhere Konzentrationen von O<sub>2</sub> ersetzt wurde. Als konstantes Redoxpotential wurde ein Wert von -8 mV gewählt, der nahe am Aktivitätsmaximum kurz vor Beginn der anaeroben oxidativen Inaktivierung liegt. Sukzessive wurde der O<sub>2</sub>-Anteil dann nach jeweils 15 min um 4 % bis auf 20 % erhöht. Die Ergebnisse für MBH<sup>WT</sup> und MBH<sup>C19G/C120G</sup> sind in Abbildung 33 dargestellt. Schon bei niedrigen O<sub>2</sub>-

Konzentrationen von 4 % war ein deutlicher Abfall der MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Aktivität feststellbar, der Stromfluss sank innerhalb von etwa 15 Minuten im Vergleich zur Kontrolle ohne O<sub>2</sub> auf etwa 70 %. Nach derselben Zeit konnte nach Injektion von 4 % O<sub>2</sub> bei der MBH<sup>Wt</sup> noch 90 % der ursprünglichen Aktivität gemessen werden. Jede zusätzliche Injektion von 4 % O<sub>2</sub> führte bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> innerhalb dieser Zeitspanne zu einem erneuten Aktivitätsverlust auf etwa die Hälfte der vorherigen Stromstärke, während die MBH<sup>Wt</sup> nur jeweils etwa 5 % ihrer Aktivität verlor. Bei 20 % O<sub>2</sub> sank die Aktivität der MBH<sup>C19G/C120G</sup> schließlich auf nahezu Null, die MBH<sup>Wt</sup> zeigte bei diesen atmosphärischen O<sub>2</sub>-Konzentrationen eine Restaktivität von etwa 60 %. Eine leichte Reaktivierung erfolgte nach Entfernung von O<sub>2</sub> sowohl bei der MBH<sup>Wt</sup>, als auch bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup>, wobei in ersterem Fall ein größerer Anteil des Enzyms reaktiviert wurde.

Bei der höheren O<sub>2</sub>-Sensitivität der MBH<sup>C19G/C120G</sup> ist zu beachten, dass die Inaktivierung nur langsam stattfindet. Anders als bei O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen, deren Aktivität direkt nach Einströmen von O<sub>2</sub> auf Null sinkt, benötigte die MBH<sup>C19G/C120G</sup> etwa 15 Minuten bis die Aktivität auf die Hälfte abgesunken ist.

## Ergebnisse

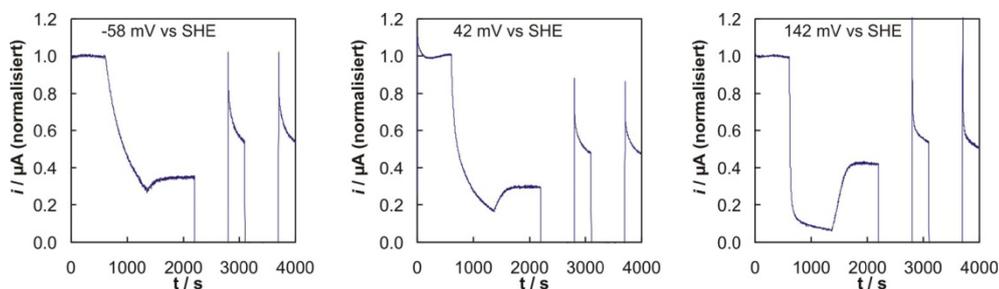


**Abbildung 33:** Schrittweise Injektion von  $\text{O}_2$  zur Demonstration der Unterschiede in der  $\text{O}_2$ -Toleranz zwischen Wildtyp und  $\text{MBH}^{\text{C19G/C120G}}$ .

Die  $\text{H}_2$ -Konzentration betrug konstant 80 %, während die  $\text{O}_2$ -Injektionen von jeweils 4 % nach und nach den  $\text{N}_2$  ersetzt, bis zur Konzentration von 20 %  $\text{O}_2$ . Diese wurden anschließend durch 20 %  $\text{N}_2$  ersetzt. Dies wurde alles bei 30 °C, pH 5,5, 2500 rpm und einem Potential von -8 mV durchgeführt. Anschließend wurden drei Schritte bei -558 mV durchgeführt, nach jedem wurde das Potential auf -8 mV erhöht.

Die  $\text{O}_2$ -Toleranz wurde anschließend für verschiedene Redoxpotentiale untersucht (Abbildung 34), insbesondere zur Überprüfung, ob die  $\text{MBH}^{\text{C19G/C120G}}$  einen Zustand hat, der im Reaktivierungsverhalten  $\text{Ni}_u\text{-A}$  ähnelt. Hierzu wurde die Reaktivierung nach Inkubation unter  $\text{O}_2$ -Atmosphäre (20 %  $\text{O}_2$ ) bei verschiedenen Potentialen untersucht. Nach einer 10-minütigen initialen Inkubation unter 80 %  $\text{H}_2$  und 20 %  $\text{N}_2$  und dem in Abbildung 34 angegebenen Redoxpotential wurden die 20 %  $\text{N}_2$  gegen 20 %  $\text{O}_2$  ausgetauscht und nach mehr als 10 Minuten wurde das  $\text{O}_2$  entfernt. Anschließend wurde das Potential wie in Abbildung 33 auf -558 mV gesenkt um dann auf das Ursprungspotential angehoben zu werden. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Es zeigte sich, dass der Anteil des Proteins, der für die Reaktivierung ein niedriges Potential benötigt, mit abnehmendem Potential bei der vorherigen Inaktivierung mit  $\text{O}_2$  zunahm. Dies steht im Gegensatz zur  $\text{MBH}^{\text{WT}}$ , wo die  $\text{O}_2$ -Toleranz unabhängig vom Potential ist (Cracknell *et al.*,

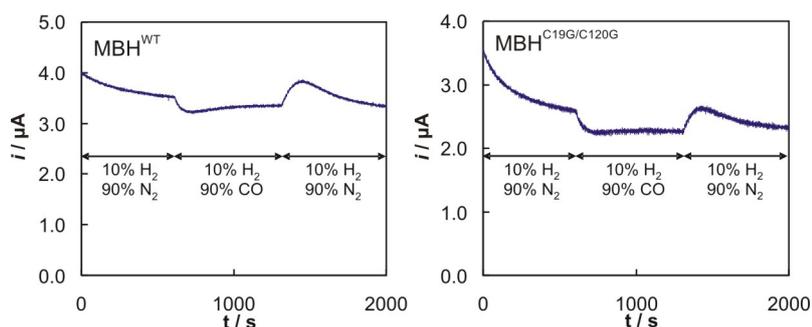
2009). Parallel dazu war die unmittelbare Reaktivierung nach der Entfernung von  $O_2$  bei höherem Potential größer.



**Abbildung 34:** Abhängigkeit der Reaktion der  $MBH^{C19G/C120G}$  mit  $O_2$  vom Redoxpotential. Gemessen wurde bei 80 %  $H_2$ , die Messung startete mit 20 %  $N_2$ , welches nach 10 Minuten durch 20 %  $O_2$  ersetzt wurde, worauf die Aktivität nachließ. Nach weiteren 10 Minuten wurde  $O_2$  wieder gegen 20 %  $N_2$  getauscht. Daraufhin wurde das Potential wie in der vorherigen Abbildung 33 wiederholt auf -558 mV gesenkt und anschließend wieder auf den Ursprungswert gebracht. Bedingungen wie in Abbildung 33. Die Stromstärke wurde auf einen Betrag von 1  $\mu A$  normalisiert.

Neben der Sensitivität gegenüber  $O_2$  besitzen die meisten [NiFe]-Hydrogenasen auch eine Sensitivität gegenüber  $CO$ , welches auch an das aktive Zentrum bindet. Bei  $O_2$ -toleranten Hydrogenasen scheint  $CO$  im Gegensatz zu  $O_2$  nicht an das aktive Zentrum zu binden, da die Aktivität nicht beeinflusst wird (Vincent *et al.*, 2005a). Aufgrund der Beobachtung, dass der Austausch der beiden Cysteine am proximalen Cluster die  $O_2$ -Sensitivität der MBH erhöht, war von Interesse, inwieweit  $CO$  die katalytische Aktivität der  $MBH^{C19G/C120G}$  auf der Elektrode beeinflusst. Hierzu wurde der Stromfluss in Gegenwart von 10 %  $H_2$  und 90%  $N_2$  bei einem Potential von -8 mV gemessen.  $N_2$  wurde nach ungefähr 10 Minuten gegen 90 %  $CO$  ausgetauscht und die Stromstärke über einen Zeitraum von 15 Minuten beobachtet, bevor das  $CO$  wieder gegen  $N_2$  ausgetauscht wurde (Abbildung 35). Es zeigte sich, dass zwischen der  $MBH^{C19G/C120G}$  und dem Wildtyp keine nennenswerten Unterschiede messbar waren. Auch die  $MBH^{C19G/C120G}$  wird nicht durch  $CO$  inhibiert. Der geringe Unterschied der Aktivitätsabnahme, von 4 auf 3  $\mu A$  bei  $MBH^{Wt}$ , von 3,5 auf 2 bei  $MBH^{C19G/C120G}$  ist durch den höheren Proteinfilmverlust bei der letzteren zu erklären.

## Ergebnisse

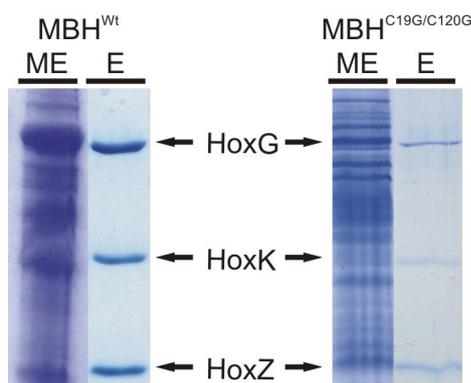


**Abbildung 35:** Inhibierung durch CO bei der MBH<sup>WT</sup> und der MBH<sup>C19G/C120G</sup>. Die anfängliche Reaktion lief unter 10 % H<sub>2</sub> und 90 % N<sub>2</sub> ab, nach 10 min wurde das N<sub>2</sub> durch CO ersetzt, nach weiteren 15 min wurde diese wieder durch N<sub>2</sub> ersetzt. Bedingungen: 30 °C, pH 5,5, 2500 rpm, -58 mV.

Die größten Unterschiede, die sich in den Ergebnissen der elektrochemischen Untersuchungen zwischen der MBH<sup>C19G/C120G</sup> und der MBH<sup>WT</sup> zeigen, sind also die Sensitivität der MBH<sup>C19G/C120G</sup> gegenüber O<sub>2</sub> und die geringere Affinität zu H<sub>2</sub>, während andere markante Punkte, wie der E<sub>switch</sub>, die Relation von H<sub>2</sub>-Oxidation und -Produktion und die Toleranz gegenüber CO mit denen der MBH<sup>WT</sup> identisch sind.

### 3.4.7 Reinigung der MBH<sup>C19G/C120G</sup> als Trimer

Vor kurzem wurde eine Methode gefunden, die es ermöglicht, die MBH als Heterotrimer (im Folgenden als Trimer bezeichnet) aus der Membran zu isolieren (Stefan Frielingsdorf, Manuskript in Vorbereitung). Hierfür wurde zur Solubilisierung der MBH aus der Membran das Detergens Digitonin genutzt. Den besten Ertrag der MBH in trimerer Form lieferte eine affinitätschromatographische Reinigung über einen C-terminal an HoxZ fusionierten Strep-Tag. Zur Untersuchung der MBH<sup>C19C/C120G</sup> in der trimeren Form wurde eine Strep-Tag-Version von HoxZ (pCH1289) mit HF800 gekreuzt und eine an die Solubilisierung mit Digitonin anschließende Affinitätschromatographie wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. In Abbildung 36 ist die als Trimer gereinigte MBH<sup>C19G/C120G</sup> (siehe auch Tabelle 11) nach einer SDS-PAGE im Vergleich zur aus dem MBH-Überexpressionsstamm HF655 gereinigten MBH<sup>WT</sup> (von Stefan Frielingsdorf durchgeführt) zu sehen.



**Abbildung 36:** SDS-PAGE des gereinigten Trimers der MBH<sup>Wt</sup> (links, Stefan Frielingsdorf) und der MBH<sup>C19G/C120G</sup> (rechts) nach heterotropher Anzucht.  
ME: Membranextrakt (20µg), E: Eluat (gereinigte MBH). Bei MBH<sup>Wt</sup> wurde 5µg Eluat aufgetragen, bei MBH<sup>C19G/C120G</sup> 1µg. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF655, MBH<sup>C19G/C120G</sup>: HF953.

Die MBH<sup>C19G/C120G</sup> lässt sich wie das Wildtypprotein auch als Trimer reinigen, wobei der Ertrag im Verhältnis zum Ertrag bei der Reinigung des Dimers ähnlich dem der MBH<sup>Wt</sup> ist. Auch das stöchiometrische Verhältnis der Untereinheiten HoxG, K und Z bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> entspricht dem der MBH<sup>Wt</sup>. Da die MBH<sup>Wt</sup> aus einem Stamm mit MBH-Überexpressionssystem gereinigt wurde, unterschied sich die Menge an MBH-Trimer deutlich, was sich auch in Abbildung 36 zeigt, wo das gleiche Probenvolumen aufgetragen wurde. Aufgrund des unterschiedlichen Stammhintergrundes wurde kein Vergleich der Reinigungserträge durchgeführt.

**Tabelle 11:** Reinigungstabelle MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Trimer (HF953).

	Volumen (ml)	Proteinkonzentration (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	Ausbeute
SME	10	2	26	100
Gereinigt	3	0,08	0,24	0,9

Für Methoden siehe 2.7 und 2.8, die Werte sind Bestimmungen einer einzigen Anzucht.

Die wohl größte Frage bei der Untersuchung des gereinigten Trimers der MBH stellt die nach dem physiologischen Elektronakzeptor dar. Methylenblau, Benzylviologen und Methylviologen, die drei in der Regel bei der Aktivitätsmessung von Hydrogenasen genutzten Elektronenakzeptoren, kommen in der Zelle nicht vor und sind dementsprechend künstliche Redoxmediatoren. In der Zelle wird diese Aufgabe im Falle einer MBH in der Regel von Chinonen übernommen, die sich in der Membran frei bewegen können. Daher wurden für

## Ergebnisse

das MBH-Trimer im photometrischen Test diverse Chinonderivate als Elektronenakzeptoren bei der H<sub>2</sub>-Oxidation getestet. Das MBH<sup>Wt</sup>-Trimer reagierte in vergleichbarer Aktivität zum Methylenblauassay mit Menadion, während sowohl Durochinon, als auch Ubichinon schlechte Elektronenakzeptoren darstellten, da sie nur ca. 10 bis 20 % der Aktivität mit Methylenblau erreichten. Für das MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Trimer ergab sich ein anderes Bild. Hier wurde keine Aktivität mit Menadion und eine extrem geringe Aktivität von Ubichinon festgestellt, hingegen konnte eine sehr geringe Aktivität von 1 % der Aktivität vom Methylenblauassay mit Durochinon nachgewiesen werden (Tabelle 12). Ein Problem für Aktivitätsmessungen mit dem MBH-Trimer besteht darin, dass auch das MBH-Dimer mit Methylenblau, aber auch mit allen verwendeten Chinonderivaten reagiert. Da nicht auszuschließen ist, dass durch die große Verdünnung des Enzyms im Reaktionsansatz das HoxKG vom Cytochrom dissoziiert und so seine Aktivität als Dimer entfaltet, kann keine Aussage getroffen werden, ob wirklich die Aktivität des Trimers gemessen wird. Daher wurde auf weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Aktivität des MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Trimers an dieser Stelle verzichtet.

**Tabelle 12:** H<sub>2</sub>-abhängige Reduktionsaktivitäten des MBH-Trimers mit verschiedenen Elektronenakzeptoren bei pH 5,5.

Elektronen-akzeptor	MBH <sup>Wt</sup>		MBH <sup>C19G/C120G</sup>	
	- Digitonin	+ Digitonin	- Digitonin	+ Digitonin
Methylenblau	18,4	11,5	5,8	2,2
Menadion	14,2	8,5	< 0,01	< 0,01
Durochinon	2,2	0,8	0,07	< 0,01
Ubichinon Q <sub>0</sub>	3,2	1,8	< 0,03	< 0,03

Bei Ansätzen mit Digitonin (+ Digitonin) wurde eine Digitoninkonzentration von 0,07 % eingesetzt. Die Messungen mit MBH<sup>Wt</sup> wurden von Stefan Frielingsdorf durchgeführt. Konzentrationen der Elektronenakzeptoren: Menadion: 0,7 mM, Methylenblau, Durochinon, Ubichinon Q<sub>0</sub>: 0,2 mM. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF655, MBH<sup>C19G/C120G</sup>: HF953. Mittelwert in U/mg aus einer Doppelmessung von nur einer Anzucht, daher keine Standardabweichung angegeben.

Zur elektrochemischen Untersuchung wurde das gereinigte MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Trimer als Proteinfilm auf die rotierende Elektrode gebracht um den katalytischen Strom zu messen. Auch nach wiederholtem Versuch, mit dem MBH<sup>Wt</sup> und MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Trimer einen Proteinfilm zu etablieren, gelang es allerdings nicht, auch nur einen geringen katalytischen Strom zu messen. Wahrscheinlich konnte in

der Form des MBH-Trimers als Bestandteil von Digitoninmicellen kein Proteinfilm auf der Elektrode hergestellt werden, bei dem die Übertragung der Elektronen des Enzyms auf die Elektrode und *vice versa* gelang. Dies ist vermutlich auf eine starke Interaktion der Graphitoberfläche mit dem in Überschuss vorhandenen Detergens zu erklären. Die elektrochemischen Versuche mit dem MBH-Trimer wurden daraufhin eingestellt.

#### **3.4.8 Der Austausch des Cysteins 17 in Analogie zur Complex I-Untereinheit führte zu Verlust der MBH-Aktivität**

In Analogie zu einem Fe-S Cluster mit Tandemcysteinen, wie er zum Beispiel in NuoB, einer Untereinheit der NADH:Ubichinon Oxidoreductase (Komplex I) der Atmungskette vorkommt (Berrisford und Sazanov, 2009), sind die Cysteine in Tandemstellung an HoxK-Position 19 und 20 konserviert. Diese auffallende Ähnlichkeit zwischen dem N-terminalen Bereich der NuoB-Untereinheit und der MBH gab Anlass zu der Annahme, dass eventuell auch das Cys17 eines der Tandemcysteine ersetzt werden kann, da dieses Cystein in NuoB nicht konserviert ist (Abbildung 37). Angesichts der geringen sonstigen Ähnlichkeit zwischen NuoB und HoxK und weil die Aminosäure analog zu HoxK\_Cys17 in NuoB nicht konserviert ist (es kommen Leucin, Isoleucin und Threonin vor, siehe Abbildung 37), wurde gegen das strukturell zu Cystein ähnliche Serin ausgetauscht.

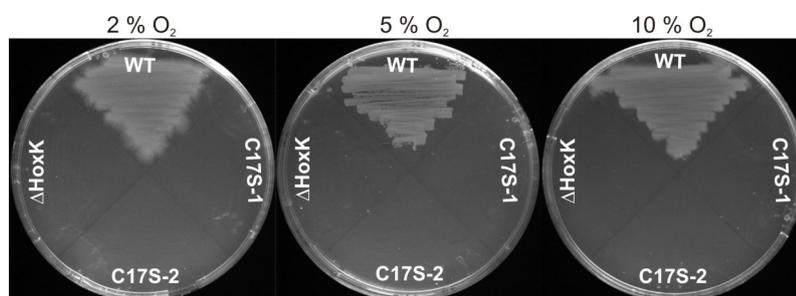
## Ergebnisse

	C19	C120	C149
Ral_eu HoxK	15 ~LECTCCSES~	114 ~WGSASWGCVQAAKPNPTQAT~	140 ~DKPIIKVPGCPPI~
Ral_me HoxK	15 ~LECTCCFEA~	114 ~WGSASWGCVQAAKPNPTQAT~	140 ~DKPIIKVPGCPPI~
Bra_ja HupS	15 ~LECTCCSES~	114 ~WGACASWGCVQAAKPNPTQAT~	140 ~NKPIIKVPGCPPI~
Rhi_le HupS	15 ~LECTCCSES~	114 ~WGACASWGCVQAAKPNPTQAT~	140 ~DKPIIKVPGCPPI~
Aqu_ae Hyd1	15 ~LECTCCSES~	114 ~WGSASWGCVQAAKPNPTAV~	140 ~DKPIIKVPGCPPI~
All_vi HupS	15 ~LECTCCSES~	114 ~WGTCASWGCVQAAHNPPTQAV~	140 ~DKPIIKVPGCPPI~
Esc_co HyaA	15 ~LECTCCSES~	114 ~WGTCASWGCVQAAHNPPTQAT~	140 ~DKPIIKVPGCPPI~
All_vi HynS	15 ~QECTGCTES~	115 ~VGTCAAFGLPQARNPTGAM~	141 ~DKPVINVPGCPPI~
Aqu_ae HyaA	15 ~QDCAGCSSES~	114 ~VGSASWGGIPKASNPPTGAV~	140 ~DKPVINVPGCPPI~
Des_gi HynA	15 ~AECTGCSSES~	110 ~IGTCATYGGVQAAKPNPTGTV~	138 ~KLKAINIACPPN~
Des_fr HynA	15 ~AECTGCTEA~	112 ~IGTCASAYGGVQAKPNPSQAK~	112 ~--KTINIPGCPPN~
Des_vu HynA	15 ~AECTGCSSES~	112 ~YGTCAATFGGVQAAKPNPTGAK~	112 ~HLKAINIACPPN~
Esc_co HybO	15 ~QECTGCTES~	114 ~IGSCSAWGGVAAAGVNPPTGAV~	114 ~GKTVINIPGCPPN~
Wol_su HydA	15 ~AECTGCSSES~	115 ~IGSCSFFGGVQAAHNPPTNAQ~	140 ~KP-VINVPGCPPS~
Des_ba NiFeSe	16 ~QGCTGCSVS~	125 ~VGTCSAYGGIPAAEGNVTGSK~	155 ~DELLVNVPGCPPI~
Ral_eu HoxY	11 ~--CWGCTLS~	82 ~VGCAVWGGVPMR~	107 ~NS-ATAVPGAKAV~
Esc_co NuoB	17 ~FGLSCCYVE~	86 ~MGACANSGGMYDIYSVVQGV~	107 ~VD--VYIPGCPPR~
Ral_eu HoxB	6 ~GGCGCSMS~	80 ~VGTCAAYGITAGGGNPTDAC~	120 ~QPPVINVAGCPPI~
The_th NuoB	17 ~FGLACCAIE~	86 ~MGACASSGGMFNNYAIIVQNV~	107 ~VD--VYVPGCPPI~
Aer_ve NuoB	17 ~FGTSCCYVE~	86 ~MGACANSGGMYDIYSVVQGV~	107 ~VD--VYIPGCPPR~
Ac_i_sp NuoB	17 ~FGTSCCYVE~	86 ~MGACANSGGMYDIYSVVQGV~	107 ~VD--VYVPGCPPI~

**Abbildung 37:** Alignment der Aminosäureumgebung des proximalen Clusters mit einer Auswahl von Hydrogenase- und NuoB-Sequenzen.

Die bei allen MBHs konservierten Cysteine sind rot markiert, während die zusätzlichen Cysteine blau hinterlegt sind, deren Glycingegenstücke in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen, das Leucin, bzw. Isoleucin und Threonin in NuoB und das Alanin in HoxY der SH sind gelb markiert. Abkürzungen: *Ral\_eu*: *Ralstonia eutropha*, *Ral\_me*: *Ralstonia metallidurans*, *Bra\_ja*: *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhi\_le*: *Rhizobium leguminosarum*, *Aqu\_ae*: *Aquifex aeolicus*, *All\_vi*: *Allochromatium vinosum*, *Esc\_co*: *Escherichia coli*, *Des\_gi*: *Desulfovibrio gigas*, *Des\_fr*: *Desulfovibrio fructosovorans*, *Des\_vu*: *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki, *Wol\_su*: *Wolinella succinogenes*, *Des\_ba*: *Desulfomicrobium baculatum*, *The\_th*: *Thermus thermophilus*, *Aer\_ve*: *Aeromonas veronii*, *Ac\_i\_sp*: *Acinetobacter* sp. SH024

Da durch neue Sicherheitsrichtlinien gegen Ende dieser Arbeit eine lithoautotrophe Anzucht nur noch mit Konzentrationen von 3 % H<sub>2</sub> durchgeführt werden konnte, wurden das Gas in den Wittschen Töpfe nach jeweils zwei Tagen Inkubation ausgetauscht. MBH-vermitteltes lithoautotrophes Wachstum wurde auch bei einer geringen O<sub>2</sub>-Konzentration von 2 % nicht festgestellt (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** MBH-abhängiges lithoautotrophes Wachstum der C17S-Mutante auf Mineralmediumagarplatten.

Anzucht im Wittschen Topf mit 3 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und den angegebenen Konzentrationen an O<sub>2</sub>, wobei mit N<sub>2</sub> auf 100 % aufgefüllt wurde. WT: HF388, C17S: HF899, HoxK<sup>-</sup>: HF532. Die Kulturen wurden 9 Tage bei 30°C unter der angegebenen Atmosphäre inkubiert, wobei nach jeweils 2 Tagen neu begast wurde.

Da auch die mixotrophe Anzucht nicht mehr mit 80 % H<sub>2</sub> durchgeführt werden konnte, wurden die Stämme heterotroph und mikroaerob mit speziellem Medium (Fritsch *et al.*, 2011) angezogen. Bei dieser Anzucht wurden die Kolben zu 80 % gefüllt, im Gegensatz zu maximal 33 % bei normaler Anzucht, wodurch eine Limitation von O<sub>2</sub> erreicht wird, da der Gasaustausch des Mediums mit der Atmosphäre geringer ist. Das Wachstum der Zellen ist unter diesen Bedingungen insbesondere in späteren Phasen langsamer; um das Wachstum in der Glycerinphase, in der die Hydrogenase hauptsächlich produziert wird, zu verlängern, wurde ein Viertel der Fruktose eingesetzt, während der Glycerinanteil im Medium verdoppelt wurde. Die H<sub>2</sub>-abhängigen Aktivitäten der Membranextrakte wurden anschließend verglichen (Tabelle 13). Die MBH<sup>C17S</sup> zeigte nur eine geringe Restaktivität von 3,3 % der MBH<sup>Wt</sup>, die sich auch nicht deutlich durch Anzucht unter O<sub>2</sub>-limitierten Bedingungen steigern ließ und im Verhältnis zur Aktivität der MBH<sup>Wt</sup> (0,5 %) sogar wesentlich geringer war.

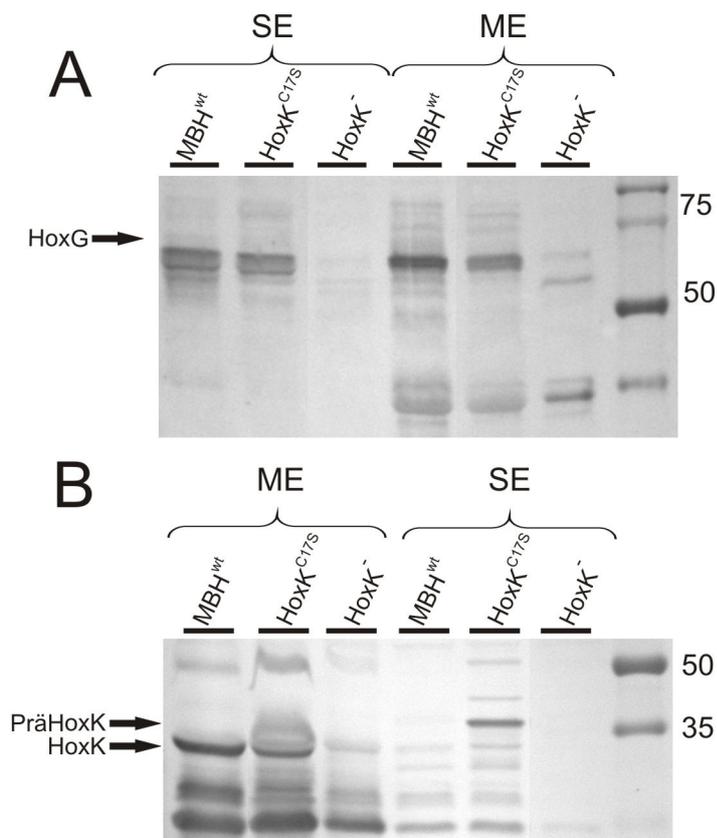
**Tabelle 13:** H<sub>2</sub>-abhängige Methylenblau-Reduzierungsaktivitäten der Membranfraktion der MBH<sup>C17S</sup> im Vergleich zur MBH<sup>Wt</sup> und als Vergleich zwischen verschiedenen Anzuchtbedingungen.

MBH-Variante	heterotroph	mikroaerob
MBH <sup>Wt</sup>	0,6 +/- 0,06	6,9 +/- 0,2
MBH <sup>C17S</sup>	0,02 +/- 0,005	0,035 +/- 0,007

Aktivitäten in U/mg Extraktprotein. Für Statistik und Methoden siehe 2.7 und 2.8.

Ein Immunoblot gegen HoxK-Antiserum zeigte jedoch, dass die MBH<sup>C17S</sup> im Membranextrakt vorliegt (Abbildung 39 B). Zwar ist die Menge an HoxK und HoxG geringer als im Membranextrakt der MBH<sup>Wt</sup>, doch die Bande ist deutlich zu sehen. Im löslichen Extrakt ist die prä-HoxK-Bande sehr viel deutlicher, als bei der MBH<sup>Wt</sup>.

## Ergebnisse



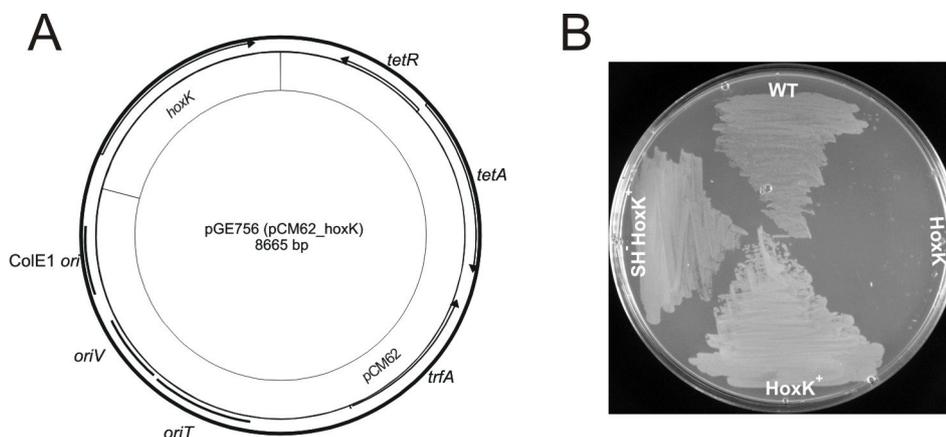
**Abbildung 39:** Immunologische Analyse der MBH<sup>C17S</sup>. A: Blot gegen HoxG, B: Blot gegen HoxK.

In der linken Hälfte der Abbildung wurde der Membranextrakt aufgetragen, in der rechten Hälfte der lösliche Extrakt. Stämme: MBH<sup>Wt</sup>: HF388, MBH<sup>C17S</sup>: HF899, HoxK<sup>-</sup>: HF532

### 3.5 Eine gerichtete Evolution der MBH? Die Entwicklung eines genetischen Konstrukts zur zufälligen Mutagenese von HoxK

Für die Optimierung der MBH hinsichtlich ihrer Katalyse ist ortsgerichtete Mutagenese ungeeignet. Durch den Austausch von einzelnen Aminosäuren ist der zeitliche und experimentelle Aufwand zu groß, um positive Ergebnisse zu erzielen. Die Methode der Wahl, um Enzyme biotechnologisch hinsichtlich ihres katalytischen Durchsatzes zu optimieren, ist eine gerichtete Evolution, der eine zufällige Mutagenese des Enzyms auf genetischer Ebene zugrunde liegt (Antikainen und Martin, 2005; Jackel *et al.*, 2008; Turner, 2009). In der Regel werden dafür spezielle Polymerasen und besondere Bedingungen bei der PCR (sogenannten

fehlerbehaftete, „error prone“ PCR) angewandt, um zufällig Mutationen in der Gensequenz zu bedingen. Im optimalen Fall wird das gewünschte Enzym plasmidbasiert überproduziert. Diese Plasmide sollten experimentell gut zu handhaben sein (geringe Größe, viele Schnittstellen). Die momentan bei der MBH angewandten Plasmide zur Überproduktion haben für die gerichtete Evolution mehrere Nachteile. Sie sind relativ groß, die vollständige Sequenz ist nicht bekannt und es gibt wenige Schnittstellen zur Klonierung. Aus diesem Grund wurde ein Überproduktionsplasmid von HoxK auf der Basis von pCM62 konstruiert, welches sich zur Komplementierung der MBH in einem  $\Delta hoxK$ -Stamm eignet (Abbildung 40 A). Es wurde bewusst nur HoxK auf das Plasmid gebracht um ein kleineres Plasmid zu konstruieren und die gerichtete Evolution wissenschaftlich besser anwendbar zu gestalten, indem nur die kleine Untereinheit HoxK mittels gerichteter Evolution optimiert werden soll. Die erfolgreiche Komplementation wurde mit einem Wachstumstest unter lithoautotrophen Bedingungen mit 10 % O<sub>2</sub> getestet. Da der mit pGE756 komplementierte  $\Delta hoxK$ -Stamm ein dem Wildtyp vergleichbares lithoautotrophes Wachstum zeigte, konnte darauf geschlossen werden, dass die komplementierte MBH funktionell ist (Abbildung 40 B).

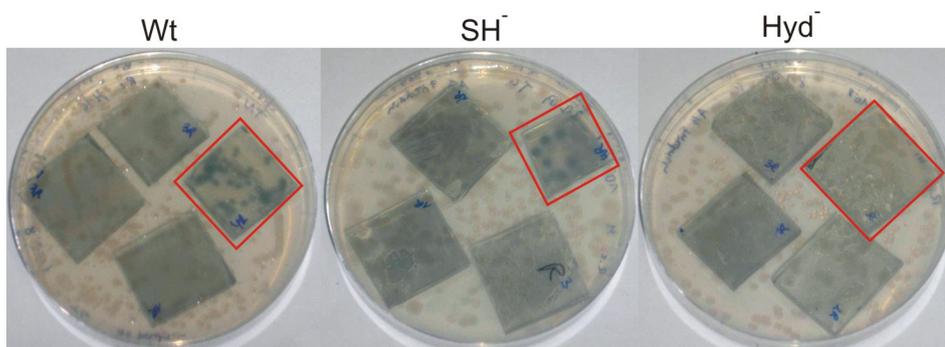


**Abbildung 40:** A: HoxK-Überexpressionsplasmid pGE756 auf der Basis von pCM62. B: Test auf lithoautotrophes Wachstum mit komplementiertem HoxK (HoxK<sup>+</sup>).  
 Stämme: WT: HF632, HoxK<sup>-</sup>: HF532, HoxK<sup>+</sup>: HF957, SH-HoxK<sup>+</sup>: 956

Bei einer gerichteten Evolution ist das größte Problem, ein geeignetes Screening zu entwickeln, was angewandt wird, um erfolgversprechende Mutanten zu

## Ergebnisse

finden. Bei der MBH bietet sich eine Evolution hin zu einer höheren O<sub>2</sub>-Toleranz an, da das Screening leicht durchzuführen ist: Eine autotrophe Inkubation auf Minimalmedium unter hohen O<sub>2</sub>-Konzentrationen würde Mutanten selektieren, die eine MBH besitzen, die auch bei hohen O<sub>2</sub>-Konzentrationen aktiv ist. Ein Screening auf erhöhte H<sub>2</sub>-Produktion ist sehr wünschenswert, aber mit mehreren Problemen verbunden. Bisher ist als Test auf eine höhere H<sub>2</sub>-Produktion ein chromogenes Screening mit Wolframoxid/Platinfilmen (WO<sub>3</sub>/Pt) etabliert (Hemschemeier *et al.*, 2009). Dieses Testsystem wurde in erster Linie für Algen eingesetzt, die eine relativ hohe H<sub>2</sub>-Produktionsrate besitzen. Hier wurde zum ersten Mal getestet, ob dieses System auch für *R. eutropha* und im speziellen die MBH anwendbar ist. Dazu wurde ein Wildtypstamm, ein SH-Deletionsstamm und ein Megaplasmiddeletionsstamm auf FN-Platten inkubiert. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass die Kolonien auf einen Durchmesser von 5 mm wachsen konnten, ohne sich zu oft zu berühren. Optimal stellte sich eine Kolonienzahl von etwa 50 bis 100 heraus. Nach einem Anaerobenshift wurde die chromogene Membran auf die Platte appliziert und dort, wo H<sub>2</sub> produziert wurde, verfärbte sich das Material blau (Abbildung 41). Da die WO<sub>3</sub>-Filme sehr empfindlich sind, sind oft nicht alle reaktiv, bei dem Versuch mit *R. e.* Kolonien zeigte jeder vierte Film eine Reaktion. Sowohl der Wildtyp, als auch die SH-Deletionsmutante zeigten blaue Verfärbungen, wobei die Intensität der Färbung beim Wildtyp leicht erhöht ist. Der Megaplasmid-Deletionsstamm zeigt auch beim reaktiven Film keine Färbung.



**Abbildung 41:** Test auf H<sub>2</sub>-Produktion mit chromogenen Platten.

H<sub>2</sub>-produzierende Kolonien sind dunkel (blau) verfärbt. Rot umrandet ist die positiv reagierende Wolframatplatte. Die Agarplatte rechts ist die Negativkontrolle, ein megaplasmidfreier Stamm. Wt: H16, SH: HF388, ΔpHG1 (Megaplasmid-Deletionsmutante): HF210.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die drei Fe-S Cluster der kleinen Untereinheit der MBH aus *R. eutropha* auf die Eigenschaften des Enzyms haben. Dazu wurden Aminosäuren der Koordinationssphäre der Fe-S Cluster ausgetauscht und die entstandenen Mutanten und MBH-Varianten physiologisch, spektroskopisch durch EPR und FTIR-Spektroskopie, biochemisch und elektrochemisch untersucht. Insbesondere zwei zusätzliche Cysteine am proximalen Fe-S Cluster der MBH, die in O<sub>2</sub>-sensitiven [NiFe]-Hydrogenasen nicht vorhanden sind, waren dabei interessant. Es wurde nachgewiesen, dass diese zusätzlichen potentiellen Fe-S-Cluster-liganden einen Einfluss auf die O<sub>2</sub>-Toleranz und auf die ungewöhnlichen EPR-spektroskopischen Eigenschaften der MBH haben. Ein Mechanismus wurde postuliert, in dem eine molekulare Basis für die O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH aufgestellt wurde. Ferner wurde gezeigt, dass die anderen Fe-S-Cluster sehr empfindlich gegenüber einem Austausch von Aminosäuren ihrer Koordinationssphäre sind, was teilweise im Gegensatz zu Beobachtungen bei O<sub>2</sub>-sensitiven Standardhydrogenasen steht.

Die Ergebnisse sind auch von biotechnologischer Bedeutung, da die O<sub>2</sub>-Toleranz von Hydrogenasen Relevanz in der Nutzung von biologischen H<sub>2</sub>-Systemen hat.

### 4.1 O<sub>2</sub>-tolerante und O<sub>2</sub>-sensitive Hydrogenasen: Wo ist der Unterschied?

Toleranz gegenüber O<sub>2</sub>, das heißt, die katalytische Aktivität des Enzyms in Gegenwart von O<sub>2</sub>, wurde bislang nur in wenigen [Ni-Fe] Hydrogenasen festgestellt (Buhrke *et al.*, 2005a; Guiral *et al.*, 2006; Lenz *et al.*, 2010). Zwar gelten auch [Fe]-Hydrogenasen als O<sub>2</sub>-tolerant (Lyon *et al.*, 2004; Shima und Thauer, 2007), doch werden diese wegen ihrer Sonderstellung unter den Hydrogenasen (sie benötigen zur Katalyse das O<sub>2</sub>-empfindliche Kosubstrat N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methenyltetrahydro-methanopterin (Zirngibl *et al.*, 1990)), hier nicht diskutiert. Während [FeFe]-

Hydrogenasen in der Gegenwart von O<sub>2</sub> in der Regel inaktiviert werden (Adams, 1990; King *et al.*, 2006), wird bei den meisten [NiFe]-Hydrogenasen lediglich die katalytische Aktivität gehemmt. Diese Inhibierung ist reversibel, nach einigen Minuten bis mehreren Stunden unter H<sub>2</sub> oder unter anderen elektronenreichen Bedingungen erfolgt eine Reaktivierung dieser Hydrogenasen (De Lacey *et al.*, 2007; Lamle *et al.*, 2004; Lissolo *et al.*, 1984). Die O<sub>2</sub>-Toleranz von bestimmten [NiFe]-Hydrogenasen, die insbesondere in sogenannten Knallgasbakterien vorkommen, wurde bislang unterschiedlich erklärt (Buhrke *et al.*, 2005a; Cracknell *et al.*, 2009; van der Linden *et al.*, 2004a). Das  $\beta$ -Proteobakterium *R. eutropha*, ein mesophiles Knallgasbakterium, dient seit den 1980er Jahren als Modellorganismus für O<sub>2</sub>-tolerante Hydrogenasen, von denen es mindestens drei verschiedene besitzt (Burgdorf *et al.*, 2005a). Der Mechanismus der O<sub>2</sub>-Toleranz scheint dabei in den drei verschiedenen Hydrogenasen unterschiedlich zu sein. Ein verengter Gaskanal, wie im Falle der regulatorischen Hydrogenase postuliert (Buhrke *et al.*, 2005a), konnte bei der MBH durch Mutationsstudien ausgeschlossen werden (Saggu *et al.*, 2010). Allen bisher untersuchten O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen gemeinsam ist die Abwesenheit des paramagnetischen Ni<sub>II</sub>-A-Zustands. Bei O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen tritt dieser Ni<sub>II</sub>-A-Zustand unter elektronenarmen Bedingungen stets auf (De Lacey *et al.*, 2007; Fontecilla-Camps *et al.*, 2007). Dieser ist EPR-spektroskopisch zu beobachten, wobei sich die g-Werte des Nickelsignals von denen im Ni<sub>II</sub>-B-Zustand unterscheiden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass ein anderer Brückenligand zwischen dem Nickel- und dem Eisenatom vorhanden ist. Für den Ni<sub>II</sub>-A-Zustand wird ein Peroxo-Ligand (Lubitz *et al.*, 2007; Volbeda *et al.*, 2005) diskutiert. Spuren dieses Ni<sub>II</sub>-A-Zustandes wurden auch in einer Variante der *Re* MBH gefunden, bei der ein Cystein nahe des aktiven Zentrums gegen Alanin ausgetauscht war (Saggu *et al.*, 2010), eine verminderte Aktivität dieser MBH-Variante in Gegenwart von O<sub>2</sub> wurde jedoch nicht festgestellt (Ludwig, 2008).

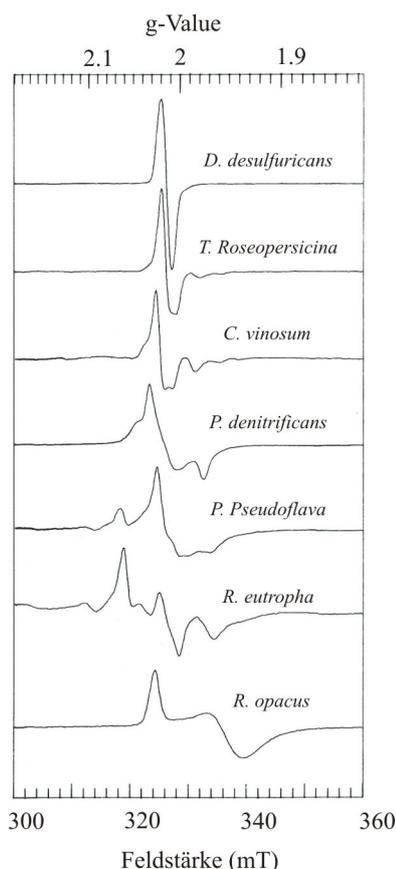
Neben der Abwesenheit des Ni<sub>II</sub>-A-Zustandes wird ein weiterer Unterschied zwischen O<sub>2</sub>-sensitiven und O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen bei der EPR-Spektroskopie

## Diskussion

deutlich. Schon früh wurde bei O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen ein charakteristisch verbreitertes Signal eines [3Fe-4S] Clusters entdeckt (Cammack *et al.*, 1982a). In der Literatur als verbreitertes, komplexes oder aufgesplittetes („Split“) Signal beschrieben, tritt dieses neben einem typischen [3Fe-4S]-Clustersignal bei g-Werten zwischen 1,96 und 2,1 bei bestimmten Hydrogenasen im oxidierten Zustand auf (siehe Abbildung 42). Das Signal verschwindet bei einer Reduktion mit Mercaptoethanol oder Ascorbat auf ein Redoxpotential von etwa +50 mV. Es wird als paramagnetische Kopplung des [3Fe-4S] Clusters mit einem anderen paramagnetischen Zentrum gedeutet (Saggu *et al.*, 2009). Beobachtet wurde das Signal bei [NiFe]-Hydrogenasen aus *A. aeolicus* (Guiral *et al.*, 2006; Pandelia *et al.*, 2011), *A. vinosum* (Albracht *et al.*, 1983; Surerus *et al.*, 1994; van Heerikhuizen *et al.*, 1981), *T. roseopersicina* (Cammack *et al.*, 1989; Cammack *et al.*, 1986a), *R. eutropha* H16 (Saggu *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 1983), *R. metallidurans* CH34 (Knüttel *et al.*, 1994), *Paracoccus denitrificans* und *Hydrogenophaga pseudoflava* (Albracht, 1985; Cammack *et al.*, 1988). Ferner wurde eine stark verminderte Kopplung auch in einer cyanobakteriellen Uptake-Hydrogenase festgestellt (Schröder *et al.*, 2007). Bei der Hydrogenase III aus *A. aeolicus* wurde kein verbreitertes [3Fe-4S]-Signal detektiert, allerdings eine Kopplung von Ni<sub>r</sub>-B mit dem proximalen Cluster entdeckt, die ebenfalls bei oben genannten Hydrogenasen auftritt (Brugna-Guiral *et al.*, 2003). Fast alle dieser Hydrogenasen gelten als O<sub>2</sub>-tolerant und sind aus Knallgasbakterien isoliert. Lediglich die zueinander eng verwandten Hydrogenasen aus *A. vinosum* und *T. roseopersicina* sind nicht, bzw. nur sehr eingeschränkt O<sub>2</sub>-tolerant, auch können die Organismen nicht autotroph mit H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wachsen. Zwar wurde für Hyn aus *T. roseopersicina* eine gewisse Toleranz gegenüber O<sub>2</sub> festgestellt, wenn das Enzym sich als Proteinfilm auf der Elektrode befindet (Morozov *et al.*, 2006), die O<sub>2</sub>-Toleranz konnte allerdings nur bei sehr hohen Potentialen (+200mV) gezeigt werden. Bei einem Vergleich der verbreiterten EPR-Spektren der [3Fe-4S] Cluster der Hyn-Enzyme mit denen von O<sub>2</sub>-toleranten MBHs, kann man einen deutlichen Unterschied in der Dominanz dieser zusätzlichen Signale (Abbildung 42) feststellen. Hier wird deut-

lich, dass die Flügel um das [3Fe-4S] Clustersignal weniger intensiv sind, als bei O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen. Auch traten diese Spektren nicht bei allen Präparationen auf (Albracht, 1994; Albracht *et al.*, 1985; Albracht *et al.*, 1984; Coremans *et al.*, 1992; van Heerikhuizen *et al.*, 1981), so dass diese EPR-Spektren zwar auf ein Vorhandensein einer paramagnetischen Kopplung schließen lassen, die aber eventuell nicht durch eine natürliche Modifikation, sondern auf ein Artefakt bei der Reinigung durch hydrophobe Interaktionschromatographie hindeuten. So könnte eine oxidative Konversion eines der [4Fe-4S] Cluster zu einem paramagnetischen [3Fe-4S]-Cluster erfolgen, was durch die Abwesenheit eines [4Fe-4S]-Cluster-Signals in der reduzierten Form des Enzyms (Cammack *et al.*, 1988) untermauert wird. Ferner ist die für O<sub>2</sub>-sensitive Hydrogenasen mit einem nicht modifizierten proximalen Cluster beobachtete Kopplung des Ni<sub>a</sub>-C-Zustandes mit einem [4Fe4S]-Cluster im reduzierten Zustand vorhanden (Bleijlevens *et al.*, 2004). In der kürzlich veröffentlichten Struktur der Hydrogenase aus *A. vinosum* deuten die Elektronendichten rund um das proximale Cluster offensichtlich auf Heterogenitäten des proximalen Clusters hin (Ogata *et al.*, 2010). Auch möglich ist die Etablierung einer Art Zwischenform von O<sub>2</sub>-toleranten und O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen in diesen Hyn-Hydrogenasen, die über eine leichte Modifikation des proximalen Clusters zu einer leichten O<sub>2</sub>-Toleranz führt.

## Diskussion



**Abbildung 42:** [3Fe-4S]-Clustersignale in EPR-Spektren von gereinigten [NiFe]-Hydrogenasen im oxidierten Zustand.

*T. roseopersicina* und *C. vinosum* zeigen ein geringer ausgeprägtes Split Signal. Das Signal der löslichen Hydrogenase aus *Rhodococcus opacus* in oxidierte Form ist als Vergleich abgebildet (Schneider *et al.*, 1984). *D. desulfuricans*: *Desulfovibrio desulfuricans*, *P. pseudoflava*: *Pseudomonas pseudoflava*, *C. vinosum*: *Allochromatium vinosum*. EPR-Spektren aufgenommen bei einer Temperatur von 20 K. Aus (Cammack *et al.*, 1988).

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Mutationsstudien an allen drei Fe-S Clustern der kleinen Untereinheit der MBH aus *R. eutropha* durchgeführt. Als Basis für die Auswahl der ausgetauschten Aminosäuren in der Nähe des proximalen, medialen und distalen Eisen-Schwefel-Clusters dienten Sequenzvergleiche von O<sub>2</sub>-toleranten und O<sub>2</sub>-sensitiven [NiFe]-Hydrogenasen sowie ein Modell einer Proteinstruktur auf Basis der Kristallstruktur von *D. gigas* und der Aminosäuresequenz der *R. eutropha* MBH. Insbesondere wurde bei O<sub>2</sub>-toleranten, membrangebundenen Hydrogenasen eine Modifikation der Aminosäureumgebung um das proximale Cluster gefunden. Gezeigt wurde, dass die dort vorhan-

denen zusätzlichen Cysteine ein Grund für die O<sub>2</sub>-Toleranz und die ungewöhnlichen EPR-Signale des Enzyms sind.

## **4.2 Der Einfluss des modifizierten proximalen Clusters auf die Eigenschaften der MBH**

### **4.2.1 Lithoautotrophes Wachstum mit O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor liefert erste Hinweise für den Einfluss der zusätzlichen Cysteine am proximalen Cluster auf die O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH**

Der Austausch der zusätzlichen Cysteine 19 und 120 am proximalen Fe-S Cluster gegen Glycin hatte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* eine erhöhte O<sub>2</sub>-Sensitivität zur Folge. *In vivo* wurde diese durch verringertes autotrophes Wachstum in Minimalmedium bei steigenden O<sub>2</sub>-Konzentrationen festgestellt. Während bei geringen O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 2 % annähernd gleiches Wachstum im Vergleich zum Wildtyp festzustellen war, stieg die Verdoppelungszeit bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 5 und 10 % stark an (Abbildung 19). Da durch die genetische Deletion der ebenfalls energiekonservierenden SH in dem verwendeten Stammhintergrund das Wachstum der *R. eutropha* Derivate mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator allein auf der Aktivität der MBH beruhte, konnte auf eine erhöhte O<sub>2</sub>-Sensitivität der MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Mutante geschlossen werden. Die im Vergleich zum Wildtyp höhere Verdoppelungszeit dieser Mutante, die bei höheren O<sub>2</sub>-Konzentrationen deutlich steigt, kann auf verschiedenen Faktoren beruhen. Die offensichtliche Ursache ist die geringere Aktivität der MBH<sup>C19G/C120G</sup> insbesondere bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen von mehr als 2 % und die infolgedessen niedrigere Bereitstellung an Energie. Neben der geringeren Aktivität musste allerdings auch eine Störung durch O<sub>2</sub> bei der Reifung der MBH in Betracht gezogen werden. Hierbei könnte die Maturation des proximalen Fe-S Clusters in HoxK gestört sein. Auch der Transport über die Cytoplasmamembran kann durch die Mutation gehemmt sein, so wurde berichtet, dass bei einer inkorrekten Maturation von Fe-S Clustern der Transport über die Membran gehemmt ist, da eine Korrekturlese-

## Diskussion

funktion des TAT-Apparats greift (Matos *et al.*, 2008). Zur Untersuchung, ob die MBH<sup>C19G/C120G</sup> als maturiertes Enzym in der Membran in ähnlichen Mengen wie im Wildtyp vorhanden ist, wurden Immunoblots mit HoxK-Antikörper genutzt. Blots gegen HoxG-Antikörper waren hierfür ungeeignet, da HoxG oft auch in HoxK-Deletionsmutanten in der Membran vorliegt, was darauf hin deutet, dass die Reifung des Proteins membranassoziiert verläuft, wobei HoxG durch seine hydrophobe Interaktionsfläche von der cytoplasmatischen Seite an die Membran bindet. Ein Export von HoxG über die Membran, ohne dass der HoxKG-Komplex gebildet wird, kann ausgeschlossen werden (Schubert *et al.*, 2007). In den Blots der Membranfraktion gegen HoxK-Antikörper wurde deutlich, dass die Konzentration an MBH<sup>C19G/C120G</sup> in der Membran ähnlich der des Wildtyps ist. Zumindest bis zu einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 10 % waren die Unterschiede an maturiertem HoxK in der Membran von Wildtyp und Mutante allenfalls marginal. Anders sind die Ergebnisse bei der MBH<sup>C19G</sup> und MBH<sup>C120G</sup>. Letztere zeigt kein lithoautotrophes Wachstum mit H<sub>2</sub> und selbst geringen Konzentrationen von O<sub>2</sub>, was darauf zurückzuführen ist, dass die MBH in nur geringen Mengen in der Membran vorliegt. Die prä-HoxK Form der MBH<sup>C120G</sup> hingegen liegt in höherer Konzentration als im Wildtyp im Cytoplasma vor, was auf eine Akkumulation des nicht prozessierten Enzyms schließen lässt. Da kaum MBH in der Membran vorliegt, muss eine gestörte Maturation oder ein gestörter Transport über die Membran vorliegen, was auch das nicht vorhandene Wachstum mit O<sub>2</sub> bedingt. Die MBH<sup>C19G</sup> wiederum liegt in der Membran vor und ermöglicht bei geringen O<sub>2</sub>-Konzentrationen noch schwaches Wachstum. Hier muss unterschieden werden zwischen dem Wachstum in Flüssigmedium und dem Wachstum auf Minimalagarplatten. Während auf Agarplatten mit 2% O<sub>2</sub> deutliches Koloniewachstum nach etwa einer Woche erkennbar ist, ist das Wachstum in Flüssigmedium mit einer Verdoppelungsrate von über 180 h extrem gering, was wahrscheinlich mit der veränderten O<sub>2</sub>-Konzentration innerhalb der Kolonien und des Flüssigmediums zusammenhängt. Die immunologische Detektion der MBH<sup>C19G</sup> zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine ähnliche Menge an Enzym in der Membran,

so dass das stark verringerte lithoautotrophe Wachstum mit O<sub>2</sub> nicht durch eine gestörte Maturation oder verringerte Translokation durch die Membran erklärt werden kann. Da die Aktivität im photometrischen, anaeroben Assay sich nicht deutlich von der Aktivität der MBH<sup>Wt</sup> unterscheidet, muss davon ausgegangen werden, dass geringe Mengen an O<sub>2</sub> das Enzym deaktivieren. Zur Kontrolle, ob der Austausch des Cysteins gegen das deutlich kleinere Glycin durch strukturelle Verzerrungen die Maturation oder Stabilität des Proteins beeinflusst, erfolgte ein Austausch der einzelnen Cysteine 19 und 120 gegen das strukturell ähnlichere Serin. Diese Enzyme zeigen ähnliche Ergebnisse wie die Cys-Gly-Varianten: Während MBH<sup>C19S</sup> eine Restaktivität zeigt und eine geringe Konzentration an MBH im Membranextrakt vorliegt, ist bei MBH<sup>C120S</sup> hingegen kaum Protein in der Membran detektierbar und im Aktivitätsassay mit Methylenblau ist keine Aktivität messbar. MBH<sup>C19S</sup> weist sogar im Gegensatz zu MBH<sup>C19G</sup> deutlich weniger Aktivität mit Methylenblau als Elektronenakzeptor auf, was darauf schließen lässt, dass das Serin auf die Struktur des proximalen Fe-S Cluster verzerrend wirkt, was eventuell auf eine funktionelle Störung durch die Hydroxylgruppe des Serins hindeutet. So ligandiert diese Hydroxylgruppe ein Eisenatom im [7Fe-8S] Cluster im Nitrogenase MoFe-Protein aus *Azotobacter vinelandii* (Peters *et al.*, 1997). Ferner wurde Serin in diversen Mutagenesestudien von Fe-S Clustern als ligandierend beschrieben (Fujinaga *et al.*, 1993; Kowal *et al.*, 1995; Mehari *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2002). Im Falle der MBH<sup>C19S</sup> könnte das Serin eine das Fe-S Cluster verzerrende Ligation ausbilden die das Protein destabilisiert. Auch bei der Kristallstrukturanalyse von Cystein-Serin-Varianten eines Ferredoxins aus *Aquifex aeolicus* wurden Verzerrungen hinsichtlich der Geometrie eines Serin-ligandierten [2Fe-2S] Clusters gefunden (Yeh *et al.*, 2002).

Neben den zusätzlichen Cysteinen wurden auch zwei der in Standardhydrogenasen ligandierenden Cysteine ausgetauscht. Hierzu wurden Cys 20 und Cys 149 ausgewählt. Cys 20 ist die in [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 2 konservierte Aminosäure im Tandemcysteinmotiv C19/C20 von HoxK, von Interesse war da-

her, ob Cys 19 in der Lage ist, diese in der MBH<sup>C20S</sup> zu ersetzen. Cys 149 wurde ausgewählt, weil dessen Sulfhydrylgruppe im HoxK-Modell (Abbildung 17) am weitesten entfernt von den zusätzlichen Cysteine liegt. So diente MBH<sup>C149S</sup> als Kontrolle, ob eines der konservierten Cysteine durch ein Serin ersetzt werden kann, ohne dass eines der zusätzlichen Cysteine eine Rolle spielt. Es zeigte sich, dass der Austausch der konservierten Cysteine nichtfunktionelle MBH-Varianten generierte. Die Ergebnisse der Immunoblots zeigen, dass sowohl Cys20, als auch Cys149 essentiell für die Ausbildung von stabilem HoxK ist. Matures HoxK ist weder in der Membran zu finden, noch prä-HoxK in der löslichen Fraktion detektierbar, was auf eine rasche Degradation schließen lässt. Eine Bande bei ungefähr 41 kDa wurde bei diesen beiden MBH-Varianten detektiert, die weder beim Wildtypprotein, noch bei der Negativkontrolle oder anderen MBH-Varianten auftrat. Eine unspezifische Antikörperreaktion ist daher sehr fraglich. Eine Erklärung dafür wäre eine alternative Faltung des prä-HoxK, zum Beispiel durch den Cysteinaustausch entstehende Disulfidbrücken und eine ungenügende Reduktion durch den eingesetzten Probenpuffer bei der SDS-PAGE.

Das Cystein 17 in HoxK wurde in Analogie zum N2 Cluster von Complex I gegen Serin ausgetauscht (siehe Abbildung 37). Diese MBH-Variante zeigte keine physiologische Aktivität, wohl aber eine geringe Restaktivität mit Methylenblau als Elektronenakzeptor, die *in vivo* vermutlich zu gering ist, um lithoautotrophes Wachstum zu ermöglichen. Im Immunoblot zeigte sich die MBH<sup>C17S</sup> als präsent im Membranextrakt, wobei weitergehende Experimente zeigen müssen, welche Eigenschaften diese MBH-Variante hat.

### **4.2.2 Die O<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht hat einen Effekt insbesondere auf MBHs mit verändertem proximalem Cluster**

Wie in 3.4.3 beschrieben wurde der Einfluss der O<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht auf die Stabilität und Aktivität der MBH-Varianten untersucht. Der Anteil an maturierter MBH in der Membranfraktion der am proximalen Cluster veränderten MBH änderte sich teils deutlich mit dem Anteil an O<sub>2</sub> in der Atmosphäre

während der Anzucht. Bei allen MBH-Derivaten war die Konzentration an HoxK in der Membran nach Anzucht mit der geringsten Konzentration an O<sub>2</sub> am höchsten (Abbildung 23). Hingegen ändert sich durch die Anwesenheit von H<sub>2</sub> während der mixotrophen Anzucht wenig. O<sub>2</sub> scheint also sowohl beim Wildtyp, als auch bei den Mutanten, der alleinige Hydrogenase-destabilisierende Faktor während der Anzucht zu sein.

Bei der MBH<sup>C19G</sup> zeigt sich im Gegensatz zu den anderen MBH-Varianten eine geringere Abhängigkeit der HoxK-Konzentration in der Membran von der O<sub>2</sub>-Konzentration. Der Transport der MBH<sup>C19G</sup> über die Membran wird also kaum durch O<sub>2</sub> beeinflusst. Die Aktivität schwankt hingegen stark und ist erst bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen von weniger als 10 % bei der Anzucht mit der MBH<sup>Wt</sup>-Aktivität vergleichbar. Die Maturationsmaschinerie scheint bei der MBH<sup>C19G</sup> bei höheren O<sub>2</sub>-Konzentration also ein stabiles proximales Cluster einzubauen, welches aber den Elektronentransport behindert. Die MBH<sup>C120G</sup> hingegen ist bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen von mehr als 5 % in ihrer Stabilität beeinflusst, offenbar führt hier ein labiler proximaler Cluster zu einem verhinderten Transport über die Membran.

Die Ergebnisse deuten auf eine hohe Empfindlichkeit insbesondere der am proximalen Cluster veränderten MBH-Varianten gegenüber O<sub>2</sub> während der Maturation hin. Denkbar ist, dass insbesondere das proximale Cluster der MBH<sup>C120G</sup> sterisch so verzerrt ist, dass es durch Oxidation leicht zerfällt und so die Maturation des Enzyms behindert.

#### **4.2.3 Die zusätzlichen Cysteine am proximalen Cluster sind verantwortlich für das ungewöhnliche EPR-Signal der MBH im oxidierten Zustand**

Um die MBH-Varianten im nativen, trimeren Zustand zu untersuchen, wurden EPR-Untersuchungen an der Membranfraktion durchgeführt. Da das EPR-Signal der MBH<sup>C19G/C120G</sup> im oxidierten Zustand bei einem Redoxpotential von +290 mV nahezu identisch zu den EPR-Signalen aus Standardhydrogenasen und der mit Mercaptoethanol auf +40 mV reduzierten MBH ist, kann davon ausgegangen

## Diskussion

werden, dass die zusätzlichen Cysteine für die Kopplung des proximalen Clusters mit dem medialen [3Fe-4S] Cluster verantwortlich sind. Diskutiert werden muss jedoch die Möglichkeit, dass das proximale Fe-S Cluster durch den Doppelcysteinaustausch nicht ausgebildet wird und aus diesem Grund keine paramagnetische Interaktion mit dem medialen Fe-S Cluster detektierbar ist. Dagegen spricht das lithoautotrophe Wachstum mit geringen O<sub>2</sub>-Konzentrationen, wobei zumindest die Oxidation von H<sub>2</sub> und der Weiterleitung von Elektronen vom aktiven Zentrum über Cytochrom *b* auf die Atmungskette in der MBH möglich sein muss, was ohne ein proximales Fe-S Cluster sehr unwahrscheinlich ist. Auch die mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivität mit Methylenblau als Elektronenakzeptor deutet auf das Vorhandensein eines proximalen Fe-S Cluster hin. Ein weiterer Punkt, der dagegen spricht, dass in MBH<sup>C19G/C120G</sup> kein proximales Fe-S Cluster gebildet wird, ist der, dass die C149S und C20S-Mutationen, die voraussichtlich die Folge haben, dass kein proximales Fe-S Cluster ausgebildet wird, einen schnellen Abbau von prä-HoxK bedingen, was im Gegensatz zu den übrigen MBH-Varianten steht. So kann auf das Vorhandensein eines Fe-S Cluster in der proximalen Position geschlossen werden.

Die MBH<sup>C19G</sup> zeigte EPR-Signale, die als eine Art Zwischenform der MBH<sup>Wt</sup> und der MBH<sup>C19G/C120G</sup> interpretiert werden können, da Signale mit geringerer Intensität aber an der gleichen Position wie die Split Signale beim Wildtyp auftreten. Das EPR-Signal des [3Fe-4S] Clusters ist verzerrt, was auf heterogene Zustände der Moleküle hindeuten könnte. Bei einer tieferen Temperatur von 10 K ist das EPR-Signal von MBH<sup>C19G</sup> dem ungekoppelten [3Fe-4S] Signal von MBH<sup>C19G/C120G</sup> ähnlicher als dem des Wildtyps. Bei einer tieferen Temperatur scheinen also die proximalen Cluster eher die Geometrie eines Standard [4Fe-4S] Clusters Position anzunehmen was dafür spricht, dass eine paramagnetische Kopplung nur in wenigen Molekülen vorhanden ist und diese eine höhere Relaxationszeit hat. Wahrscheinlich besetzt das Cys19 eine Position im proximalen Cluster, die bis zu einem gewissen Grad auch durch ein anderes Cystein, z.B. die nahen C17 oder C20 ersetzt werden kann.

Das EPR-Signal des paramagnetischen Nickelzustandes von MBH<sup>C19G/C120G</sup> ist dem des Wildtyps ähnlich. So sind die Signale bei  $g = 2,17$  und  $g = 2,30$  (und das beim Wildtyp überdeckte Signal bei  $g = 2,01$ ) dem Ni-B-Zustand zuzuordnen. Ein anderer paramagnetischer Nickel-Zustand wird in MBH<sup>C19G/C120G</sup> nicht detektiert. Nachdem das EPR-Signal des [3Fe-4S] Clusters wie in Standardhydrogenasen nicht an ein anderes paramagnetisches Zentrum gekoppelt zu sein scheint, war damit zu rechnen, dass auch in der MBH<sup>C19G/C120G</sup> der Ni<sub>u</sub>-A-Zustand mit  $g$ -Werten bei  $g_x = 2,32$   $g_y = 2,24$  und  $g_z = 2,01$  zu detektieren ist, was aber nicht der Fall ist.

Zur genaueren Untersuchung der Nickel-Zustände wurde die MBH<sup>C19G/C120G</sup> einer FTIR-spektroskopischen Untersuchung unterzogen. Die Spektren im oxidierten Zustand glichen denen vom Wildtyp, ein Ni<sub>u</sub>-A-Signal mit einer CN<sup>-</sup>-Bande bei  $1999\text{ cm}^{-1}$  war nicht detektierbar. Zusammen mit den Ergebnissen, dass die MBH<sup>C19G/C120G</sup> auch mit H<sub>2</sub> reduzierbar ist, die typischen Ni-S-Zustände (Ni<sub>r</sub>-S und Ni<sub>a</sub>-SR<sup>'</sup>) und die volle Reversibilität der Reduktion bei Reoxidation mit O<sub>2</sub> aufweist, deutet dies darauf hin, dass das NiFe-Zentrum sehr ähnlich der MBH<sup>Wt</sup> ist. Lediglich zwei Signale mit geringer Intensität, von denen eins nur nach Reduktion auftritt und bei einer Reoxidation nicht verschwindet, deuten auf Unterschiede zur MBH<sup>Wt</sup> hin. Es könnte sich hierbei um einen alternativen inaktiven Zustand handeln, der ebenfalls durch einen O<sub>2</sub>-Liganden am aktiven Zentrum hervorgerufen wird und der für die Sauerstoffsensitivität der MBH<sup>C19G/C120G</sup> verantwortlich ist.

Bei Standardhydrogenasen wird der Ni<sub>u</sub>-A-Zustand durch einen mutmaßlichen Peroxoligand im aktiven Zentrum erklärt (Lubitz *et al.*, 2007). Bislang konnte lediglich in der MBH-HoxG<sup>C81A</sup> Ni<sub>u</sub>-A detektiert werden (Ludwig, 2008; Saggiu *et al.*, 2010), dort wurde ein Cystein der zweiten Sphäre um das aktive Zentrum in Alanin umgewandelt. Interessanterweise ist die MBH-HoxG<sup>C81A</sup> aber nicht O<sub>2</sub>-sensitiver als der Wildtyp, ein Ni<sub>u</sub>-A-Signal deutet in der MBH also nicht unbedingt auf eine erhöhte O<sub>2</sub>-Sensitivität hin.

Bei der MBH<sup>C19G</sup> zeigen die FTIR-Spektroskopie-Ergebnisse schon im oxidierten Zustand eine große Menge an inaktivem Protein, charakterisiert durch den inaktiven Ni<sub>ia</sub>-S-Zustand, der sich durch Reduktion aktivieren lässt. Die nicht zuordenbare Signalbande bei 2045 cm<sup>-1</sup> tritt hier etwas deutlicher auf als bei MBH<sup>C19G/C120G</sup>. Zusätzlich fällt auf, dass sich das Enzym nicht zu 100 % reoxidieren lässt, ein Teil des Enzyms bleibt im inaktiven Zustand zurück. All diese Ergebnisse korrelieren mit dem Ergebnis, dass die MBH<sup>C19G</sup> sehr O<sub>2</sub>-empfindlich zu sein scheint. Offenbar ist hier ein nicht geringer Teil des aktiven Zentrums in einem inaktiven Zustand, insbesondere unter O<sub>2</sub>-reichen Bedingungen. Dieser inaktive Zustand scheint nach mehreren katalytischen Zyklen häufiger aufzutreten.

#### **4.2.4 MBH<sup>C19G/C120G</sup> lässt sich über Affinitätschromatographie ähnlich effizient wie der Wildtyp reinigen und offenbart überraschende EPR-spektroskopische Eigenschaften**

Da die MBH<sup>C19G/C120G</sup> in ähnlichen Mengen wie der Wildtyp in Membranextrakten vorlag und eine Reinigung aussichtsreich erschien, wurde ein Strep-Tag C-terminal an das Protein fusioniert. Sowohl die Aktivität, als auch der Ertrag an gereinigtem Protein war mit dem Wildtyp vergleichbar (Tabelle 10). Daraus kann geschlossen werden, dass die MBH<sup>C19G/C120G</sup> ähnlich stabil wie die Wildtyp-MBH ist und sich auch in gereinigter Form für elektrochemische und spektroskopische Untersuchungen eignet. Eine leichte Verschiebung konnte beim pH-Wert-Optimum festgestellt werden. Während der Wildtyp das pH-Optimum in gereinigter Form bei etwa 5,5 bis 6 hat (Ludwig, 2008), ist die MBH<sup>C19G/C120G</sup> bei etwa pH 7 aktiver. Hervorzuheben ist, dass im Vergleich zum pH-Optimum der Membranaktivität die Verschiebung des pH-Optimums von pH 7 in der Membran auf pH 5,5 in der gelösten Variante, die beim Wildtyp beobachtet wird, kaum zu beobachten ist. Das könnte ein Hinweis sein, dass das proximale Cluster mit verantwortlich für den pH-Shift ist. Ein verändertes Redoxpotential an proximaler Stelle könnte die Redoxkette so ändern, dass ein pH-abhängiges Fe-S Cluster sein

Redoxpotential ändert und so die Aktivität des Enzyms beeinflusst. In der Membran könnte dieser Effekt durch HoxZ und die redoxaktiven Moleküle in der Cytoplasmamembran gepuffert sein.

Durch die kürzlich erfolgte Reinigung des MBH-Trimers über eine Solubilisierung aus der Membran mit Digitonin (Frielingsdorf, Manuskript in Vorbereitung) ergab sich auch für die MBH<sup>C19G/C120G</sup> die Möglichkeit das Enzym zusammen mit seiner Cytochrom *b*-Untereinheit zu reinigen. Im Unterschied zum Wildtyp konnte mit alternativen Elektronenakzeptoren, die eine größere Ähnlichkeit mit dem vermuteten physiologischen Elektronenakzeptor Ubichinon besaßen, keine oder nur sehr geringe Aktivität gemessen werden. Dies ist eventuell bedingt durch die Änderung des Redoxpotentials des proximalen Clusters, was die Weiterleitung der Elektronen auf das relativ hohe Potential der Chinonderivate erschwert. Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass die Aktivitätsmessungen mit dem Trimer problematisch sind, da nicht nachgewiesen ist, dass über Digitoninmicellen ein effektiver Elektronentransport *in vitro* auf Elektronenakzeptoren geschieht. Alternativ wäre auch denkbar, dass die vorhandenen MBH-Dimere für die Restaktivität verantwortlich sind.

Proteinfilmvoltammetrie war weder mit der trimeren Form der MBH<sup>Wt</sup>, noch mit der MBH<sup>C19G/C120G</sup> möglich, was wahrscheinlich an einer schlechten Ausbildung des Proteinfilms auf der Elektrode lag. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist, dass die Digitoninmicellen, in denen das gereinigte MBH-Trimer vorliegt, eine effiziente Bindung an die Elektrode verhindern oder zumindest die Elektronenübertragung der MBH auf die Elektrode unterbinden. Daher wurden mit dem MBH-Trimer keine weiteren elektrochemischen Experimente durchgeführt.

Die spektroskopischen Untersuchungen am gereinigten MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer bestätigen im Allgemeinen die Ergebnisse, die mit dem in der Membran verankerten Enzym gewonnen wurden. Zusätzlich wurde die Reduktion des Enzyms mit H<sub>2</sub> durchgeführt, die in der Membran zwar möglich ist, aufgrund der deutlichen Hintergrundsignale von anderen cytoplasmatischen Enzymen mit im reduzierten

## Diskussion

Zustand paramagnetischen FeS-Clustern aber wenig auswertbare Ergebnisse liefert. Die gereinigte MBH<sup>C19G/C120G</sup> zeigte im mit H<sub>2</sub> reduzierten Zustand weder Signale eines Fe-S Cluster noch des NiFe-Zentrums, was ungewöhnlich ist, da im reduzierten Zustand die Signale des Ni<sub>a</sub>-C-Zustandes und zumindest eines [4Fe4S]-Signals erwartet wurden. Das Signal der MBH<sup>C19G/C120G</sup> erinnert im reduzierten Zustand an die EPR-Spektren der RH aus *R. eutropha*, bei der weder im oxidierten, noch im reduzierten Zustand Signale der Fe-S Cluster detektiert werden konnten (Buhrke *et al.*, 2005b). Dort ist der Grund für die EPR-inaktiven Zustände unbekannt und auch bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> kann nur gemutmaßt werden, warum keine Signale der reduzierten Metallzentren gemessen werden. Bei der Reoxidation mit O<sub>2</sub> nach der Reduzierung mit H<sub>2</sub> sind die Signale der oxidierten MBH<sup>C19G/C120G</sup> so wie im isolierten Zustand zu sehen, so dass das Ausbleiben der EPR-Signale nicht auf defektem Enzym beruhen kann, da in diesem Falle ein Redoxzyklus mit H<sub>2</sub> als Reduktionsmittel ausbleiben würde. Selbst bei defekten Fe-S Zentren wären zumindest die EPR-Signale des Ni<sub>a</sub>-C-Zustandes sichtbar. Bei der FTIR-Spektroskopie sind die Ni<sub>a</sub>-C-Signale im reduzierten MBH<sup>C19G/C120G</sup> ähnlich wie im Wildtyp detektierbar. Daraus kann geschlossen werden, dass im reduzierten MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer keine paramagnetischen Zentren zu finden sind. Eventuell findet bei der Reduktion eine spezielle Kopplung der (im reduzierten Zustand) paramagnetischen Zentren statt, die eine Auslöschung der EPR-Signale zur Folge haben. Eine derartige Kopplung könnte zum Beispiel zwischen dem Ni-Zentrum und dem proximalen Fe-S Cluster erfolgen, so dass diese beiden im reduzierten Zustand paramagnetischen Zentren keine Signale liefern. Unklar würde bei diesem Szenario die Rolle des distalen Clusters bleiben, der auch in diesem Szenario paramagnetisch wäre und ein Signale liefern könnte. Vorstellbar ist, dass der distale Cluster bei einem großen Teil der MBH<sup>C19G/C120G</sup> während der EPR-Spektroskopie zerfällt. Gesehen den Fall, dass im Falle der photometrischen Aktivitätsmessung mit Methylenblau als Elektronenakzeptor, dieses die Elektronen am distalen Cluster aufnimmt, wäre dies aufgrund der mit der MBH<sup>Wt</sup> vergleichbaren Aktivität allerdings nicht plausibel. Möglich wäre ein Zerfall des distalen Clusters

demnach höchstens im Moment der Reduktion mit  $H_2$  vor der EPR-Spektroskopie - was sehr unwahrscheinlich ist. Ferner ist es fraglich, ob ein vollständiger Redoxzyklus mit einem defekten distalen Cluster möglich ist. Um die elektronischen Zustände der reduzierten  $MBH^{C19G/C120G}$  aufzudecken müssen weitere spektroskopische Messungen (Pulse-EPR, Hyscore, Mössbauer) erfolgen. Ergebnisse an gereinigter Hydrogenase 1 aus *E. coli* offenbaren ein ähnliches EPR-Verhalten der reduzierten C19G/C120G-Variante des Enzyms (Fraser Armstrong, persönliche Kommunikation). Dort wurden offenbar lediglich sehr geringe Signale der reduzierten Metallzentren in der Mössbauerspektroskopie beobachtet.

#### **4.2.5 Die Proteinfilmvoltammetrie bestätigt eine Rolle der zusätzlichen Cysteine bei der $O_2$ -Toleranz der MBH**

Eine Etablierung eines Proteinfilms auf der Elektrode war auch mit der gereinigten  $MBH^{C19G/C120G}$  vergleichbar mit der  $MBH^{Wt}$  (Vincent *et al.*, 2005b) durchführbar. Das zyklische Voltamogramm zeigte unerwarteterweise eine hohe Übereinstimmung zwischen  $MBH^{Wt}$  und  $MBH^{C19G/C120G}$ . Durch das mutmaßlich voneinander abweichende Redoxverhalten des proximalen Clusters der  $MBH^{C19G/C120G}$  und der  $MBH^{Wt}$  lag nahe, dass sich eine Abweichung der zyklischen Voltamogramme bezüglich der Redoxpotentiale ergibt, insbesondere beim  $E_{switch}$ , da es mutmaßlich durch die Kinetik der Elektronentransportkette im Enzym beeinflusst wird. Außerdem wird es als Charakteristik für die  $O_2$ -Toleranz von Hydrogenasen diskutiert, so besitzen sämtliche  $O_2$ -tolerante [NiFe]-Hydrogenasen einen sehr positiven  $E_{switch}$ ,  $O_2$ -sensitive Hydrogenasen hingegen einen negativen  $E_{switch}$  - allerdings besitzen auch die  $O_2$ -sensitiven [FeFe]-Hydrogenasen, deren aktives Zentrum sich von dem [NiFe]-Hydrogenasen unterscheidet, einen deutlich positiven  $E_{switch}$  (Vincent *et al.*, 2007). Warum das Umkehrpotential der  $MBH^{C19G/C120G}$  in etwa gleich dem der  $MBH^{Wt}$  ist, muss offen bleiben. Eventuell hängt das redoxaktive Verhalten im zyklischen Voltamogramm in erster Linie von den Prozessen am aktiven Zentrum ab. Der einzige Unterschied zwischen den zyklischen Voltamogrammen der  $MBH^{C19G/C120G}$  und der  $MBH^{Wt}$  ist

## Diskussion

die ausgeprägtere anaerobe oxidative Inaktivierung bei hohen Redoxpotentialen. Diese war bei späteren, nach Anzucht unter O<sub>2</sub>-limitierenden Bedingungen gereinigten MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Proben, deutlich weniger stark ausgeprägt. Eventuell könnte diese ausgeprägtere anaerobe Inaktivierung von einem Ni<sub>r</sub>-B ähnlichen, aber länger anhaltenden Zustand der MBH<sup>C19G/C120G</sup> hervorgerufen werden, der hauptsächlich nach Anzucht mit O<sub>2</sub> auftritt.

Deutlich höher fällt bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> der K<sub>m</sub> für H<sub>2</sub> aus. Die Affinität des Enzyms gegenüber H<sub>2</sub> ist gegenüber der MBH<sup>Wt</sup> damit deutlich niedriger. Der Austausch der beiden zusätzlichen Cysteine beeinflusst also das aktive Zentrum derart, dass H<sub>2</sub> schlechter gebunden wird, was die Aktivität aber nur bei geringem H<sub>2</sub>-Partialdruck beeinflusst, wie er bei normalen Aktivitätstests nicht vorkommt. Eine Erklärung für die geringere Affinität zu H<sub>2</sub> ist eine behinderte Weiterleitung von Elektronen im aktiven Ni<sub>a</sub>-C-Zustand durch die Veränderung des Redoxpotentials des proximalen Clusters. Das würde dazu führen, dass neu in das aktive Zentrum vorstoßender H<sub>2</sub> langsamer gespalten werden kann.

Bei der Messung der katalytischen Aktivität unter verschiedenen O<sub>2</sub>-Partialdrücken zeigt das gereinigte MBH<sup>C19G/C120G</sup>-Dimer eine sehr viel deutlichere Empfindlichkeit gegenüber höheren O<sub>2</sub>-Konzentrationen als der MBH<sup>Wt</sup>. Das proximale Cluster bedingt also, zumindest zum Teil, die O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH. Interessant ist, dass sich ein Teil der Aktivität durch ein schnelles Verschieben des Redoxpotentials auf eine sehr niedrige Spannung reaktivieren lässt. Auch sinkt die O<sub>2</sub>-Toleranz mit positiverem Redoxpotential, während der Anteil an reaktivierbarem Enzym steigt (Abbildung 34). Letzteres ist auch bei Standardhydrogenasen zu beobachten und deutet dort auf die langsame (Re)aktivierbarkeit des Ni<sub>u</sub>-A-Zustandes hin. Da weder in der EPR-, noch in der FTIR-Spektroskopie aber ein Ni<sub>u</sub>-A-Zustand in der MBH<sup>C19G/C120G</sup> beobachtet werden konnte, kann in diesem Enzym nicht von einem Ni<sub>u</sub>-A-Zustand gesprochen werden. Denkbar ist stattdessen ein in der katalytischen Effektivität ähnlicher Zustand wie Ni<sub>u</sub>-A, der sich eventuell durch einen alternativen Brückenligand oder ein anderes strukturelles Detail im aktiven Zentrum auszeichnet.

### 4.3 Die Rolle des medialen und distalen Fe-S Clusters in O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen

Die Ergebnisse der MBH-Derivate mit Veränderungen am medialen und distalen Fe-S Cluster deuten darauf hin, dass auch die Aminosäurezusammensetzung um diese Metallzentren extrem wichtig für die Funktion der MBH ist. So sind alle Mutanten auch bei sehr geringen O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 2 % nicht mehr zum lithoautotrophen Wachstum mit H<sub>2</sub> als Energiequelle fähig. Schon die Maturation und der Transport der MBH über die Cytoplasmamembran scheint bei der MBH<sup>C252S</sup> und den MBH<sup>H187G/A</sup> gestört zu sein, da matures HoxK weder in der Membran, noch im löslichen Extrakt vorliegt. Aufgrund der Detektion von prä-HoxK im löslichen Extrakt muss aber davon ausgegangen werden, dass die jeweiligen Proteine zumindest synthetisiert werden, ohne im Cytoplasma zeitnah abgebaut zu werden. Aktiv war die im Cytoplasma akkumulierte, prämaturo MBH<sup>H187G/A</sup> oder MBH<sup>C252S</sup> nicht. Ähnliche Ergebnisse mit einer am Histidin des distalen Clusters veränderte Hydrogenase wurden mit dem periplasmatischen Enzym aus *D. fructosovorans* erzielt (Dementin *et al.*, 2006). Hier wurde ein minimaler Teil der Hydrogenase allerdings über die Membran transportiert, aus dem Periplasma ließen sich geringe Mengen an Hydrogenase reinigen, was bei der MBH<sup>H187G</sup> aus *R. eutropha* nicht gelang. Der Versuch, das distale Cluster bei der MBH<sup>H187G</sup> mit Imidazol zu rekonstituieren, schlug fehl, sowohl nach Zugabe von Imidazol im Medium, als auch nach Zugabe im Aktivitätsassay. Dies ist insofern interessant, als dass es mit der Standardhydrogenase aus *D. fructosovorans* gelang, zumindest einen Teil des Proteins zu rekonstituieren und eine geringe Aktivität im photometrischen Assay mit Methylenblau wiederherzustellen (Dementin *et al.*, 2006). Eventuell deutet diese Diskrepanz darauf hin, dass entweder der C-terminale, hydrophobe Anker Imidazol sterisch daran hindert, in die neu entstandene Lücke am distalen Cluster zu dringen, oder dass das distale Cluster nicht korrekt eingebaut wird und auch Imidazol nicht dazu beiträgt ein natives [4Fe-4S]-Cluster in die MBH zu integrieren. Ein weiterer Einblick in die Charak-

## Diskussion

teristika der MBH<sup>H187G/A</sup> über Experimente mit gereinigtem Protein konnte durch die extrem geringen Ausbeuten bei der Reinigung durch Affinitätschromatographie - sowohl aus dem Cytoplasma, als auch aus dem Membranextrakt - nicht gewonnen werden. Einen interessanten Einblick in die Maturation der MBH gab allerdings die Reinigung der MBH<sup>H187G</sup> aus dem Cytoplasma. Hier wurde ein nicht dem Wildtyp entsprechendes Bandenmuster an akzessorischen Proteinen gefunden - offenbar bindet die MBH<sup>H187G</sup> weder HoxO, noch HoxQ, die an der Maturation der kleinen Untereinheit beteiligt sind. Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine C-terminal an der MBH binden und offensichtlich das distale Cluster schützen oder zumindest mit ihm interagieren, was bei einem Austausch des Histidins gegen Glycin nicht mehr, beziehungsweise nur noch in geringem Maße möglich ist. Bisher wurde angenommen, dass HoxO und HoxQ das N-terminale Signalpeptid vor der Assemblierung mit HoxG maskiert (Schubert *et al.*, 2007). Alternativ wurde diskutiert, dass HoxO und HoxQ das proximale und mediale Cluster bei der Maturation von HoxK schützen, da diese Cluster in prä-HoxK an der Interaktionsfläche zu HoxG liegen, die während des Maturationsprozesses noch nicht an HoxG gebunden ist und dadurch offen liegt (Schubert *et al.*, 2007). Bei der Maturation des proximalen Clusters wird allerdings auch eine Rolle von HoxR diskutiert (Fritsch *et al.*, 2011).

Bei der Untersuchung der MBH<sup>P242C</sup> zeigte sich, dass diese MBH zwar stabil in der Membran vorliegt, der entsprechende *R. eutropha*-Stamm aber kein lithoautotrophes Wachstum zeigt und, korrelierend dazu, keine Aktivität im Methylblau-Assay des Membranextraktes. Dies deutet darauf hin, dass zwar ein mediales Fe-S Cluster vorliegt, der Elektronentransport über die Fe-S Cluster der kleinen Untereinheit aber gestört ist. Anders als bei den Veränderungen am proximalen Fe-S Cluster scheint dies unabhängig von der O<sub>2</sub>-Konzentration, da auch bei niedrigsten Konzentrationen kein lithoautotrophes Wachstum und im anaeroben Aktivitätsassay keine Aktivität feststellbar war. Denkbar ist, dass ein [4Fe-4S]-Cluster ausgebildet wird, das ein deutlich anderes Redoxpotential be-

sitzt, als das [3Fe-4S]-Cluster und so die Elektronen nach der Reduktion des proximalen Clusters nicht mehr weitergeleitet werden können. Eine solche Clusterkonversion wurde in einer O<sub>2</sub>-sensitiven Standardhydrogenase von *D. fructosovorans* über eine zum P242-Austausch analoge P238C-Mutation durchgeführt und durch die Kristallstruktur bestätigt (Rousset *et al.*, 1998b). Hier sank das Redoxpotential des medialen Clusters von +65 mV auf -250 mV. Die Aktivität des Enzyms im Methylenblau-Assay war in dieser Hyd<sup>P238C</sup> nur unwesentlich geringer als die des Wildtyps. Diese Diskrepanz zwischen den Aktivitäten dieser am medialen Cluster veränderten Hydrogenasen kann durch die Unterschiede der Redoxpotentiale der Fe-S Clustern erklärt werden (siehe Kapitel 4.3.1). Insbesondere dem distalen Cluster muss hierbei eine große Rolle zugewiesen werden, da es in der Hydrogenase aus *D. fructosovorans* ein Redoxpotential von -340 mV hat (Rousset *et al.*, 1998b), in der MBH jedoch ein deutlich positiveres Potential zwischen -90 und -180 mV (siehe Tabelle 14). Die Redoxpotentiale des medialen und distalen Cluster sind in der *D. fructosovorans* Hydrogenase identisch (-340 mV), während die MBH<sup>P242C</sup> - angenommen das Redoxpotential des medialen Clusters würde sich nach der Pro-Cys-Mutation in ähnlicher Weise verschieben - recht weit auseinander liegende Redoxpotentiale zwischen distalem und medialem Cluster vorweist (-350 und um -100 mV) wäre ein Elektronentransfer vom medialen auf das distale Cluster in der MBH<sup>P242C</sup> thermodynamisch ungünstig - die Elektronentransportkette wäre unterbrochen und eine H<sub>2</sub>-Oxidation könnte nicht stattfinden. Die EPR-Spektroskopie der MBH<sup>P242C</sup> ließ weder im oxidierten, noch im reduzierten Zustand Signale von paramagnetischen Zentren erkennen. Dies deutet höchstwahrscheinlich auf eine Instabilität des Enzyms, insbesondere der Fe-S Cluster hin. Eventuell ist dies bedingt durch den O<sub>2</sub> bei der Anzucht, da eine O<sub>2</sub>-limitierende Kultivierung, die mit einem MBH<sup>P242C</sup>-Überexpressionsstamm während einer Projektarbeit durchgeführt wurde (Newie, 2010), deutliche Aktivität, etwa ein Viertel der MBH<sup>Wt</sup>, zeigte. Erste spektroskopische Untersuchungen nach diesen Anzuchten zeigten eine deutlich geringere Intensität der Signale als

bei der MBH<sup>Wt</sup> und ein hohes Maß an Heterogenitäten, so dass man zu diesem Zeitpunkt noch keine Schlüsse aus diesen Ergebnissen ziehen kann.

### **4.3.1 Ein Vergleich der Redoxpotentiale der drei Fe-S Cluster zeigt große Unterschiede zwischen verschiedenen [NiFe]-Hydrogenasen**

Durch EPR-Redoxtitration ist es möglich, die Redoxübergänge von Fe-S Clustern zu bestimmen. Dabei wird die Signalintensität der Fe-S Clustersignale bei charakteristischen g-Werten für verschiedene Potentiale, die über ein Gemisch aus verschiedenen Redoxmediatoren und einem Potentiostaten herbeigeführt werden, quantifiziert (Cammack *et al.*, 1976; Dutton, 1978; Tiede *et al.*, 1976). Metallzentren mit ähnlichem Redoxpotential und gleichem elektromagnetischem Verhalten können dabei nicht oder nur schwer auseinander gehalten werden. Dies wird erst möglich, wenn magnetische Kopplungen von Metallzentren vorliegen. Dies ist der Fall bei Standardhydrogenasen, wo das proximale Cluster nach Reduktion eine Kopplung mit dem NiFe-Zentrum eingeht (Guigliarelli *et al.*, 1995). Da das distale Cluster für eine magnetische Kopplung zu weit vom aktiven Zentrum entfernt liegt, kann dieses Signal eindeutig dem proximalen Cluster zugeordnet werden, wobei die Intensität der betreffenden Signale bei g-werten um 2,21 und 2,10 quantifiziert wird.

In Tabelle 14 sind die Literaturwerte der bislang gemessenen Redoxpotentiale von [NiFe]-Hydrogenasen zusammengefasst. Das Redoxpotential des medialen [3Fe-4S]-Clusters ist deutlich höher als das der [4Fe-4S]-Cluster. Bei Standardhydrogenasen, liegt das Redoxpotential des medialen Clusters mit -75 bis +55mV 200 bis 300 mV über denen des proximalen und distalen Clusters.

Die Redoxpotentiale der Fe-S Cluster in O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen sind höher als von Standardhydrogenasen. Besonders deutlich wird der Unterschied bei den (mutmaßlichen) [4Fe-4S] Clustern, wo Redoxpotentiale von -60 bis +90 mV für das proximale Cluster und -180 bis -70 mV für das distale Cluster gemessen wurden. Beide Werte liegen ~ 200 mV über denen von O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen.

**Tabelle 14:** Vergleich von Redoxpotentialen der Fe-S Cluster von [NiFe]-Hydrogenasen in der Literatur (gemessen bei pH 7, außer anders markiert, Werte auf 5 mV gerundet).

Cluster	<i>R.e.</i>	<i>R.m.</i>	<i>A.a.</i> <sup>(ph6,4)</sup>	<i>E.c.</i>	<i>P.d.</i>	<i>A.v.</i>	<i>T.r.</i>	<i>D.g.</i>	<i>D.d.</i>	<i>D.f.</i>	<i>D.v.</i>	<i>M.f.</i>
[3Fe4S]	-20 <sup>1</sup> +40 <sup>8</sup> +25 <sup>2,13</sup>	+100 <sup>2</sup> , +10 <sup>12</sup>	+70 <sup>11</sup>	+25 <sup>1</sup>		+10 <sup>3</sup> , - 10 <sup>3(ph8)</sup> -20 <sup>9</sup> -30 <sup>17</sup>	+25 <sup>4</sup>	-70 <sup>3,7</sup> -30 <sup>1</sup> -35 <sup>6</sup>	-15 <sup>1</sup> -75 <sup>15</sup>	+65 <sup>14</sup>	-70 <sup>16</sup>	-75 <sup>10</sup>
[xFe <sub>x</sub> S]	-60 <sup>2</sup>	+50 <sup>2</sup>	+90 <sup>11</sup>		-20 <sup>2</sup>	-300 <sup>17*</sup>		-290 <sup>5</sup>		- 340 <sup>14</sup>		
[4Fe4S]	-180 <sup>2,13</sup> -90 <sup>8</sup>	-80 <sup>2,13</sup> -160 <sup>12</sup>	-80 <sup>11</sup>		-120 <sup>2</sup>	-300 <sup>17*</sup>		-340 <sup>5</sup>		- 340 <sup>14</sup>		
HP	+160 <sup>8</sup>	+240 <sup>2</sup> , +275 <sup>12</sup>	+230 <sup>11</sup>			+220 <sup>3</sup>	+105 <sup>4</sup>					

Die zwei [4Fe-4S]-Cluster sind mit I und II bezeichnet, wobei die Zuordnung aus der Literatur übernommen wurde. Bei Hydrogenasen, in denen keine Zuordnung erfolgte, wurde eine Eingliederung aufgrund des Redoxpotentials vorgenommen. Distales und proximales Cluster können teilweise aufgrund von paramagnetischen Kopplungen zum NiFe-Zentrum zugewiesen werden. Hier entspricht [xFe<sub>x</sub>S] dem proximalen und [4Fe-4S] dem distalen Cluster. HP bezeichnet die Hochpotentialspezies, charakterisiert durch das verbreiterte [3Fe-4S]-EPR-Signal im oxidierten Enzym, welches bei milder Reduktion auf etwa +40 mV nicht mehr nachweisbar ist.

Referenzen: <sup>1</sup>: (Cammack *et al.*, 1982a), <sup>2</sup>: (Knüttel *et al.*, 1994), <sup>3</sup>: (Coremans *et al.*, 1992), <sup>4</sup>: (Cammack *et al.*, 1989), <sup>5</sup>: (Teixeira *et al.*, 1989), <sup>6</sup>: (Cammack *et al.*, 1982b), <sup>7</sup>: (Teixeira *et al.*, 1983), <sup>8</sup>: (Schneider *et al.*, 1983), <sup>9</sup>: (Cammack *et al.*, 1986b), <sup>10</sup>: (Adams *et al.*, 1986), <sup>11</sup>: (Pandelia *et al.*, 2011), <sup>12</sup>: (Lorenz, 1989) <sup>13</sup>: (Knüttel, 1988), <sup>14</sup>: (Rousset *et al.*, 1998b), <sup>15</sup>: (Franco *et al.*, 1993), <sup>16</sup>: (Asso *et al.*, 1992), <sup>17</sup>: (Perashad *et al.*, 1999). \*: Konnte nicht unterschieden werden.

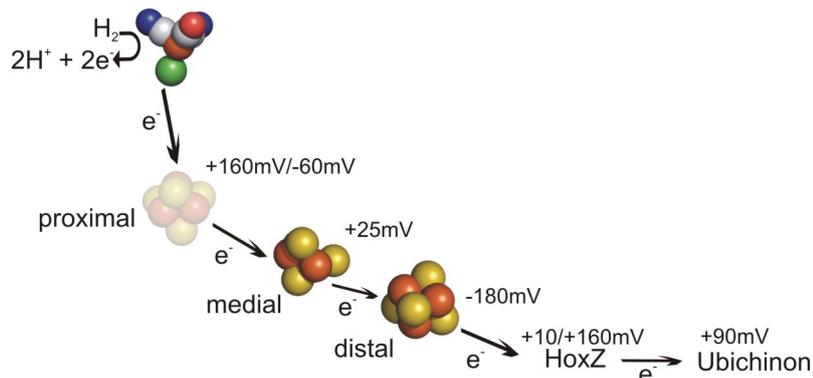
Abkürzungen: *R.e.*: *R. eutropha*, *R.m.*: *R. metallidurans* CH34, *A.v.*: *Allochromatium vinosum*, *D.g.*: *Desulfovibrio gigas*, *E.c.I.*: *E. coli* Hydrogenase I, *D.d.*: *Desulfovibrio desulfuricans* Norway strain, bzw.: <sup>15</sup>: ATCC 27774 strain, *T.r.*: *T. roseopersicina*, *P.d.*: *Paracoccus denitrificans*, *M.f.*: *Methanobacterium formicicum*, *A.a.*: *A. aeolicus*, *D.f.*: *D. fructosovorans*, *D.v.*: *D. vulgaris*

Ein weiterer Unterschied zwischen den Redoxpotentialen von O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen, bzw. Hydrogenasen mit einem verbreiterten EPR-Signal des [3Fe-4S] Clusters, ist das durchgehende Auftreten eines zusätzlichen Redoxpotentials in Form einer Hochpotential-Spezies (HP, (Knüttel *et al.*, 1994; Pandelia *et al.*, 2011)). Dieses Redoxpotential, welches durch das Verschwinden der Flügel bei dem verbreiterten EPR-Signal des [3Fe-4S] Cluster milder Reduktion charakterisiert ist, liegt bei +105 mV bis +275 mV. Auch die [NiFe]-Hydrogenasen aus *T. roseopersicina* und *A. vinosum* zeigen dieses Split-Signal, wie unter 4.1 beschrieben. Da das Split Signal bei diesen O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen aber nicht von einem durch zusätzliche Cysteine modifizierten Cluster stammen, sollten diese Werte separat betrachtet werden (siehe auch Diskussion in 4.1). Auffällig bei die-

## Diskussion

sen Hydrogenasen sind auch die den Standardhydrogenasen entsprechenden Redoxpotentiale der [4Fe-4S] Cluster.

Während leichte Unterschiede der Redoxpotentiale (bis 40 mV) von Messungenauigkeiten herrühren oder als Präparationsartefakte diskutiert werden (Asso *et al.*, 1992), können die teils eklatanten Unterschiede zwischen den Fe-S Clustern von unterschiedlichen [NiFe]-Hydrogenasen (bis etwa 200 mV) nicht als Messfehler ignoriert werden. Ein Grund für diese differenzierte Entwicklung der Redoxpotentiale ist sicherlich der unterschiedliche Elektronenakzeptor, der die bei der H<sub>2</sub>-Spaltung am aktiven Zentrum freiwerdenden und anschließend an das distale Cluster transferierten Elektronen aufnimmt. Dieser ist bei membran gebundenen Hydrogenasen ein Cytochrom *b*, das die Elektronen weiter an den membranständigen Chinonpool leitet, während bei periplasmatischen, Standardhydrogenasen ein Cytochrom *c* mit einem Redoxpotential von um -250mV (Bianco und Haladjian, 1994) die Elektronen weiterleitet. Das Cytochrom *b* von *R. eutropha* (HoxZ) besitzt zwei Hämgruppen, die unterschiedliche Redoxpotentiale, +10 mV und +160 mV besitzen (Bernhard *et al.*, 1997). Die sich ergebende Elektronentransportkette für die *R.e.* MBH ist im Modell in Abbildung 43 gezeigt.



**Abbildung 43:** Schematische Elektronentransportkette der *Re* MBH.

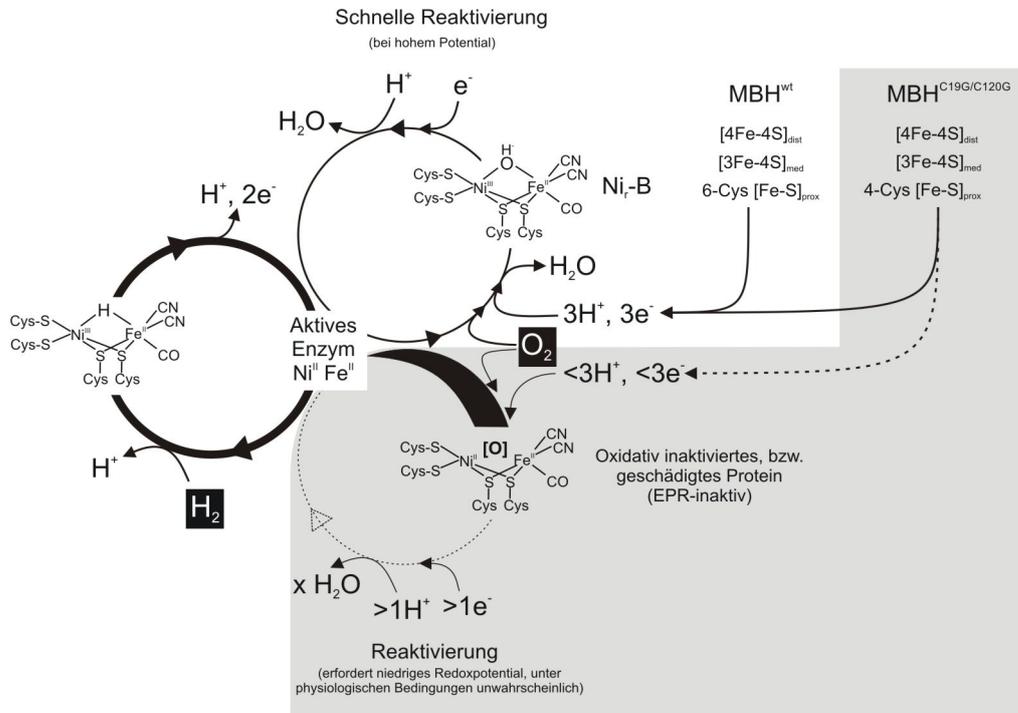
Die bei der H<sub>2</sub>-Oxidation am aktiven Zentrum freiwerdenden Elektronen werden über die elektronentransferierenden FeS-Cluster an das transmembrale Cytochrom *b* HoxZ transportiert, wo zwei Hämgruppen die Elektronen aufnehmen und an den membranständigen Ubichinonpool weitergeben. Man beachte die relativ angeglichenen Redoxpotentiale aller Redoxpartner. Die Redoxpotentiale des aktiven NiFe-Zentrum sind nicht angegeben, da sie stark abhängig vom Brückenliganden zwischen dem Ni- und Fe-Atom sind. Sie schwanken zwischen etwa -400mV (Ni<sub>I</sub>-C) und -110mV (Ni<sub>a</sub>-B). Potentiale nach (Knüttel *et al.*, 1994) und (Bernhard *et al.*, 1997).

#### **4.4 Ein Modell der Beeinflussung der O<sub>2</sub>-Toleranz der MBH durch die Fe-S Cluster in der kleinen Untereinheit**

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass die speziellen Eigenschaften der Fe-S Cluster in der kleinen Untereinheit der MBH aus *R. eutropha* neben anderen, noch unbekanntem Faktoren die O<sub>2</sub>-Toleranz des Enzyms hervorrufen. Eine besondere Rolle kommt dabei dem modifizierten proximalen Fe-S Cluster mit zwei zusätzlichen Cysteinen zu. Diese O<sub>2</sub>-Toleranz könnte einerseits durch die schnelle Entfernung von inaktivierenden Oxo-Liganden am NiFe-Zentrum hervorgerufen werden, denkbar ist aber auch ein Schutz der Fe-S Cluster vor O<sub>2</sub>. Ersteres könnte auf einem reversen Elektronentransport über die Fe-S Cluster hin zum aktiven Zentrum beruhen. Dies wäre bedingt durch die spezielle Anordnung der Clusterpotentiale, die im Falle eines deaktivierenden Sauerstoff-Brückenligands im aktiven Zentrum Elektronen dorthin leiten. Im Regelfall werden die Elektronen hingegen zu HoxZ transferiert. Da die Affinität zu H<sub>2</sub> um ein vielfaches höher ist, als die Affinität zu O<sub>2</sub>, dürfte der erstere Fall sehr selten eintreten und die Aktivität des Enzyms kaum beeinträchtigen, was auch Ergebnisse und Berechnungen bestätigen, die über die Proteinfilmvoltammetrie gewonnen wurden. (Cracknell *et al.*, 2008; Goldet *et al.*, 2008). Durch weitere Experimente und Berechnungen konnte ein katalytischer Zyklus modelliert werden, der die verschiedenen Nickelzustände und die Reaktionen mit O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> beschreibt (Cracknell *et al.*, 2009). Ist das Enzym im aktiven Zustand, wird der katalytische H<sub>2</sub>-Oxidationszyklus nicht verlassen. Das im aktiven Zentrum gebundene Hydrid-Ion verlässt das aktive Zentrum als Proton, zwei Elektronen werden gleichzeitig auf die kleine Untereinheit transferiert. Nachdem ein neues H<sub>2</sub> das aktive Zentrum erreicht hat, wird es unter Abgabe eines Protons gespalten, während ein neues Hydrid-Ion das aktive Zentrum besetzt. Gelangt O<sub>2</sub> an das aktive Zentrum, bildet ein Hydroxid den Brückenligand zwischen Nickel und Eisen. Dieser verlässt das aktive Zentrum durch ankommende Elektronen als H<sub>2</sub>O. Da vier Elektronen nötig sind, um O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O zu reduzieren, muss eine elekt-

## Diskussion

ronenreiche Umgebung gewährleistet sein. Dies könnte in der MBH durch das hohe Potential des proximalen Clusters in dessen zusätzlicher Redoxstufe bedingt sein. Dabei ist nicht klar, woher die Elektronen kommen.



**Abbildung 44:** Schema der katalytischen Zyklen der MBH im Vergleich mit denen der MBH<sup>C19G/C120G</sup>.

Links ist der normale katalytische H<sub>2</sub>-Oxidationszyklus (nach (Cracknell *et al.*, 2009)) abgebildet, in dem ein Hydridion im aktiven Zentrum gebunden ist, das durch H<sub>2</sub>-Spaltung stets erneuert wird. Verlassen wird dieser katalytische Zyklus in der MBH<sup>wt</sup> (oben rechts), wenn ein O<sub>2</sub>-Molekül an das aktive Zentrum bindet (Mitte oben). O<sub>2</sub> wird in der elektronenreichen Umgebung, durch das proximale Cluster mediiert, direkt bei Bindung zu einem Hydroxidligand und anschließend zu H<sub>2</sub>O reduziert, welches so das aktive Zentrum verlässt. Die MBH<sup>C19G/C120G</sup> (oben ganz rechts) ist nicht in der Lage, viele Elektronen zu liefern und so den Sauerstoffligand im aktiven Zentrum schnell zu entfernen, oxidativ inaktiviertes Protein akkumuliert, während eine Reaktivierung unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich nicht oder nur sehr langsam abläuft.

Wahrscheinlich ist, dass die Elektronen über die Fe-S Zentren der kleinen Untereinheit auf das aktive Zentrum transferiert werden. Dabei könnte der Chinonpool als Elektronenreservoir dienen, wobei die Elektronen über das Cytochrom *b* auf das distale Cluster übertragen werden, von wo aus es über die übrigen Fe-S Cluster zum NiFe-Zentrum transferiert wird. Das initiale Elektron zur schnellen Reduktion des aktiven Zentrums kann dabei vom proximalen Clus-

ter in seiner  $[\text{Fe-S}]^+$ -Form (ausgehend von den Redoxzahlen der  $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster) bereitgestellt werden. Für diesen rückläufigen Elektronentransport sind die relativ hohen Redoxpotentiale der Fe-S Cluster unabdingbar, damit die Cluster sowohl mit dem aktiven Zentrum, als auch mit dem Cytochrom *b* und dem Chinonpool in einem Elektronenaustausch stehen können. Bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> kann das proximale Cluster die  $[\text{Fe-S}]^+$ -Oxidationsstufe nicht annehmen, was die Ergebnisse der EPR-Spektroskopie belegen. Dort ist im oxidierten Zustand des Enzyms kein Signal detektierbar, das auf die paramagnetische Kopplung des proximalen mit dem medialen Cluster hindeutet. Somit wäre eine schnelle Elektronenbereitstellung im Falle eines O<sub>2</sub>-Brückenligandes nicht gewährleistet, nur der langsamere Elektronenrücktransport über die Fe-S Cluster der kleinen Untereinheit funktioniert. So gelangen, in Abhängigkeit der Zeit und der O<sub>2</sub>-Konzentration, immer mehr MBH-Moleküle in den langsam reaktivierbaren, Ni<sub>u</sub>-A-ähnlichen Zustand, der nur unter niedrigen Redoxpotentialen, also hoher Elektronendichte, aktivierbar ist. Zusätzlich erhält man oxidativ geschädigtes Enzym, was in den FTIR-Studien nach mehreren Redoxzyklen deutlich wird. Da kein Ni<sub>u</sub>-A-Zustand detektiert wurde, muss angenommen werden, dass bei der MBH<sup>C19G/C120G</sup> ein diamagnetischer, inaktiver Zustand akkumuliert, wie auch den FTIR-Messungen zu entnehmen ist.

#### 4.5 Ein Modell des proximalen Clusters mit zusätzlichen Cysteinen

Anhand der vorhandenen Daten ist es nur schwer möglich, ein strukturelles Modell des proximalen Clusters der MBH zu entwerfen. Mehrere Möglichkeiten müssen in Betracht gezogen werden. Da in der Literatur keine Untersuchungen eines Proteins mit einer vergleichbaren Fe-S Cluster-Umgebung vorhanden sind, müssen entfernt ähnliche Fe-S Cluster mit den Daten der MBH aus *R.e.* verglichen werden. Eine Röntgenkristallstrukturanalyse der MBH, die wesentlich zur Aufklärung der besonderen Merkmale der MBH beitragen würde, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen und erste Ergebnisse können hier diskutiert werden.

#### 4.5.1 Vorkommen und Funktion von zusätzlichen Cysteinen und Tandemcysteinen bei Fe-S Clustern von anderen Proteinen

Es sind nur wenige Proteine bekannt, die neben den koordinierenden Aminosäuren zusätzliche Cysteine in der Koordinationssphäre um ein Fe-S Cluster besitzen. Der Einfluss dieser Reste auf die Funktion des Proteins und des Fe-S Clusters sind bislang kaum beschrieben. Eine Fe-S Cluster-koordinierende Domäne, mit einem zusätzlichen Cystein und ein das Fe-S Cluster koordinierendes Tandemcystein enthält (Ruprecht *et al.*, 2009), wird als „CCG“-Domäne bezeichnet. Beschriebene Proteine mit dieser Domäne sind die Heterodisulfid-Reduktase (Hamann *et al.*, 2007), die Succinat-Chinon-Oxidoreduktase (Hamann *et al.*, 2009), und diverse sekretorische Nematodenproteine (Gare *et al.*, 2004). Eindeutige Hinweise zur Funktion des zusätzlichen Cysteins sind bislang nicht gewonnen worden, eine Ligandierung des Fe-S Clusters wird angezweifelt (Hamann, 2007). Stattdessen wird dem Cystein eine Rolle beim katalytischen Prozess zugeschrieben, in dem die Heterodisulfidreduktase ein Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) an der Disulfidbrücke spaltet.

Ein Protein, in dem ein zusätzliches Cystein als Fe-S Cluster-ligandierend beschrieben wird, ist die Ferredoxin-Thioredoxin Reduktase. Dort wurde über Kristallstrukturaufklärungen mit artifiziellen Liganden gezeigt, dass ein Eisenatom des [4Fe-4S] Clusters je nach Zustand des Enzyms während des katalytischen Zyklus von zwei Cysteinen ligandiert wird (Dai *et al.*, 2007). Ähnlich wie bei der Heterodisulfidreduktase wird für das Cystein eine Rolle bei der Katalyse beschrieben. Das Cystein scheint eine reversible Disulfidbrücke mit dem Substrat Thioredoxin einzugehen und so die Ligandierung zum [4Fe-4S] Cluster zu verlieren. Bei dem proximalen Cluster der MBH ist eine direkte Beteiligung des Cysteins bei der Katalyse unwahrscheinlich. Die Entfernung des proximalen Clusters zum aktiven Zentrum ist mit über 10 Å hoch und die katalytische Umwandlung von H<sub>2</sub> läuft bei Hydrogenasen ohne zusätzliches Cystein im Zentrum wahrscheinlich sehr ähnlich ab. Zusätzlich unterscheiden sich die auftretenden

Redoxpotentiale bei der Thioredoxinreduktase stark von denen der MBH - die Form des Proteins mit zwei Liganden an einem Eisenatom besitzt ein mit -500 mV sehr negatives Redoxpotential, das proximale Cluster der MBH ein recht hohes Redoxpotential. So scheint es keine Parallelen zwischen der Modifikation des proximalen Clusters der MBH und bereits bekannten modifizierten Fe-S Clustern zu geben. Gezeigt ist indes, dass eine Pentakoordination eines Eisenatoms möglich ist und somit auch für das proximale Fe-S Cluster der MBH, wo theoretisch zwei der Fe-Atome pentakoordiniert sein könnten, in Frage kommt.

Ein weiteres Phänomen, das sich aus der Aminosäuresequenz um das proximale Cluster der MBH ableitet, ist das Tandemcystein an Position 19 und 20. Bei dem Auftreten von aneinander angrenzenden Cysteinen ist man lange Zeit davon ausgegangen, dass es aufgrund sterischer Hinderungen nicht möglich ist, dass beide das Fe-S Cluster koordinieren. In silico-Analysen (Gurrath und Friedrich, 2004) und Kristallstrukturen von Komplex I aus *Thermus thermophilus* (Sazanov und Hinchliffe, 2006), sowie der Adenosin-Phosphosulfat-Reduktase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Chartron *et al.*, 2006) und der Sulfid Reduktase aus *D. vulgaris* (Oliveira *et al.*, 2008) widerlegten diese These. Auch in manchen Proteinen mit CCG-Domäne wird eine Ligation von zwei nebeneinander liegenden Cysteinen erwartet (Hamann *et al.*, 2009; Hamann *et al.*, 2007). Besonders der Aminosäuresequenzvergleich zwischen der NuoB-Untereinheit von Komplex I (Nqo6), wo die zwei nebeneinander liegenden Cysteine in einer Röntgenkristallstruktur als ligandierend beschrieben werden (Berrisford und Sazanov, 2009) und HoxK verdeutlicht, dass eine Ligandierung des Fe-S Clusters durch die Tandemcysteine nicht unwahrscheinlich ist. Analog zu Cystein 19 und 20 in der MBH sind die Tandemcysteine 22 und 23 im [4Fe-4S] Cluster von NuoB konserviert (siehe Abbildung 37). Hervorzuheben ist der Einfluss dieser Tandemcysteine auf das Fe-S Cluster, so scheint bei NuoB das [4Fe-4S] Kuban eine höhere konformelle Flexibilität hervorzurufen. Dies könnte auch bei der MBH eine Rolle spielen. Denkbar wäre, dass die Tandemcysteine in Zusammenspiel mit den zu-

sätzlichen Cysteinen eine große Flexibilität induzieren, die bei einer Redoxreaktion am Cluster strukturelle Änderungen des Fe-S Clusters zulässt, was eine zusätzliche Redoxstufe bei physiologischem Redoxpotential ermöglicht.

### 4.5.2 Einflüsse von Aminosäuren auf das Redoxpotential von Fe-S Clustern

Fe-S Cluster decken einen sehr großen Redoxpotentialbereich von etwa -700 bis +450 mV ab (Bian und Cowan, 1999; Capozzi *et al.*, 1998; Koay *et al.*, 2008), wovon die größte Gruppe der Fe-S Cluster, die [4Fe-4S] Cluster, nahezu den gesamten Bereich abdecken. Die einzige Lücke in diesem großen Bereich entsteht zwischen etwa -70 mV und +50 mV - vorausgesetzt, man zieht die Redoxpotentiale des distalen [4Fe-4S] Cluster von O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen mit einem Potential zwischen -180 mV und -70 mV hinzu (Tabelle 14). Diese Lücke im Redoxpotentialbereich wird von [3Fe-4S] Clustern und dem 2Fe-Rieske-Zentrum ausgefüllt. Neben der Fe-S-Clustergeometrie hängt das Redoxpotential zu einem großen Teil auch von der proteinogenen Umgebung der Cluster ab. Die meisten der [4Fe-4S] Cluster mit hohem Redoxpotential finden sich in HiPiPs (High Potential Iron Sulfur Proteins). Die überwiegende Anzahl dieser Ferredoxine mit einem oder mehreren [4Fe-4S]-Clustern, die Potentiale zwischen +50 und +500 mV besitzen, kommen in photosynthetischen Bakterien als Elektronentransporter zum Einsatz (van Driessche *et al.*, 2003), aber auch in anderen Organismen und in anderen Rollen wurden HiPiPs gefunden (Stelter *et al.*, 2009). Eine genaue Aufschlüsselung, welche Faktoren eine Rolle für diese hohen Redoxpotentiale spielen, erfolgte bislang nicht. Die meisten Untersuchungen stützen sich auf Redoxpotentialvergleiche zwischen Enzymen, deren Struktur bekannt ist und Punktmutanten, deren Fe-S Cluster-Redoxpotentiale bestimmt wurden. So wurde eine Vielzahl von Einflüssen gefunden, von denen die meisten sich jedoch nicht in allen Proteinen reproduzieren lassen und sich teilweise widersprechen. Als bisher allgemeingültige Effekte der Aminosäureumgebung von Clustern können nur wenige genannt werden: Eine höhere Durchlässigkeit für Lösemittelmoleküle, die H<sub>2</sub>-Brückenbindungen eingehen (in der Regel H<sub>2</sub>O) vermittelt ein höhe-

res Redoxpotential (Dey *et al.*, 2007). Beispielsweise verhindern größere (hydrophobe) Aminosäurereste um das Cluster das Eindringen von Wassermolekülen und können so ein negativeres Redoxpotential mediieren - und umgekehrt (Duderstadt *et al.*, 1999; Eidsness *et al.*, 1999; Kyritsis *et al.*, 1998). Der gleiche Effekt kann bei polaren Aminosäuren beobachtet werden, die ebenfalls die Durchlässigkeit gegenüber H<sub>2</sub>O erhöhen und so das Redoxpotential erhöhen (Chen *et al.*, 2002b), was sich auch umgekehrt beobachten lässt (Denke *et al.*, 1998).

Insbesondere der Einfluss von Cysteinen in der zweiten Sphäre um Fe-S Cluster auf das Redoxpotential ist umstritten. So gibt es eine Arbeit, die die Auswirkung eines neu eingebrachten Cysteins und eines gegen Serin ausgetauschten Cysteins nahe eines [4Fe-4S] Clusters untersuchte (Beck *et al.*, 2001). Entgegen der Beobachtungen, in denen die Nähe von polaren Aminosäuren zu einer Erhöhung des Redoxpotentials führt, wurde das Potential in der +Cys-Variante um 50 mV erniedrigt, während die Änderung eines dem Cluster nahen Cysteins in ein Serin das Potential um 50 mV erhöhte. Dabei spielen offenbar die Proteinerückgratstruktur und die leichte strukturelle Verschiebung von oft an Cysteinen angrenzenden Glycinen zu einer Änderung im H<sub>2</sub>-Brückenbindungs- und SH-S-Bindungsumfeld des Fe-S Clusters eine große Rolle, weniger der Einfluss der Seitenketten. Ein Austausch eines Cysteins gegen Alanin erniedrigte das Redoxpotential um 50 mV in einem clostridialen Rubredoxin (Maher *et al.*, 1999).

Nahezu generalisieren lässt sich hingegen, dass ein negatives Aminosäureumfeld ein negativeres Redoxpotential zur Folge hat (Swartz *et al.*, 1996), vor allem offenbar bei [3Fe-4S] Clustern (Tyr-Glutamat/Aspartat Austausch, (Cheng *et al.*, 2005)). Den größten Effekt auf das Redoxpotential scheinen Histidine in der Nähe von Fe-S Clustern auszulösen. Der Austausch einer Aminosäure im Umfeld zu Histidin, wie z.B. der Austausch von Phenylalanin zu Histidin im Ferredoxin von *A. vinelandii* bewirkt eine Steigerung des Redoxpotentials um 100 bis 200 mV (Chen *et al.*, 2002a). Dies ist aber nicht in jedem Fall so. Ein Austausch von Aminosäuren in der Succinat-Dehydrogenase aus *E. coli* zeigte, dass auch eine Änderung von Isoleucin in Histidin und Serin ein negativeres Redoxpotential zur Folge

haben kann (Cheng *et al.*, 2006). In der MBH aus *R. e.* finden sich keine offensichtlichen Seitenketten in der Umgebung um die Fe-S Cluster (insbesondere um das proximale Cluster), die eine Erhöhung des Redoxpotentials im Vergleich zu Standardhydrogenasen zur Folge hätten, daher, und wegen der zusätzlichen Redoxstufe, dürfte ausgeschlossen sein, dass das proximale Cluster ein „Standard“-Hochpotential Fe-S Cluster wie in HiPiPs besitzt.

### 4.5.3 [4Fe-4S] Cluster, die von der Standard-Kubanstruktur abweichen

Da das proximale Cluster der MBH mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Nichtstandard-[4Fe-4S] Cluster ist, wird in diesem Kapitel auf bereits charakterisierte, ungewöhnliche Fe-S Cluster eingegangen, um Auswirkungen von und die Möglichkeiten der Modifikationen zu diskutieren. Große Abweichungen vom Standard-[4Fe-4S]-Kuban sind bislang nicht entdeckt worden. Die Unterschiede zum Standardkuban beziehen sich meist auf zu Cystein alternative Aminosäureseitenketten, die das Fe-Atom ligandieren (neben Histidin auch Glutamin (Meyer, 2008)) oder Clusterkonversionen, die unter bestimmten Umständen auftreten. Ein besonderer Fall von [4Fe4S] Kubanen liegt allerdings im P-Cluster der FeMoCo-Untereinheit der Nitrogenase vor, wo zwei [4Fe-4S] Kubane über Ausschluss eines, bzw. ein gemeinsam genutztes anorganisches Schwefel ein [8Fe-7S] Cluster bilden. Dieser wird von sechs Cysteinen ligandiert (Einsle *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2008). Interessanterweise findet hier eine Ligationsänderung zwischen oxidiertem und reduziertem Cluster statt (Peters *et al.*, 1997), wobei die Oxidationsreaktion durch Abgabe von 2 Elektronen charakterisiert ist. Beide (Sub-)Cluster sind sterisch verzerrt und könnten einen Hinweis darauf liefern, inwieweit sterische Verzerrungen als Abweichungen vom Standardkuban möglich sind.

Streng genommen kein [4Fe-4S] Cluster, aber eng mit diesen verwandt ist der Hybrid Cluster aus dem sogenannten Hybrid Cluster Protein aus *Desulfovibrio* spezie. Dieses Protein, dessen physiologische Funktion unbekannt ist, wurde zuerst ein neuartiges [6Fe-6S]-Cluster, ligandiert über 6 Cysteine, zugeschrieben (Stokkermans *et al.*, 1992a; Stokkermans *et al.*, 1992b). Später wurde die Struk-

tur eines dieser Proteine gelöst und ein [4Fe-2S-3O] Cluster postuliert (Aragao *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2002). Auffällig ist, dass sich die reduzierten und oxidierten Strukturen des Clusters unterscheiden (Macedo *et al.*, 2003) und dass vier verschiedene Oxidationsstufen festgestellt wurden (Tavares *et al.*, 1998). Ähnlich zu diesem Cluster ist das [Ni-4Fe-5S] Cluster der CO-Dehydrogenase (Dobbek *et al.*, 2001), welches hier jedoch durch die aus dem Rahmen fallende Einbindung des Nickels nicht weiter diskutiert wird.

In der Aconitase ist ein [4Fe-4S]-Cluster Teil des aktiven Zentrums und an der Katalyse von Citrat zu Isocitrat beteiligt. Eines der Fe-Atome der [4Fe-4S]-Form ist nicht durch ein Cysteinyl-Ligand gebunden, sondern durch H<sub>2</sub>O. Dieses Fe-Atom kann aber während des katalytischen Zyklus durch Bindung zum Substrat fünf- oder sechsfach ligandiert sein (Beinert *et al.*, 1996).

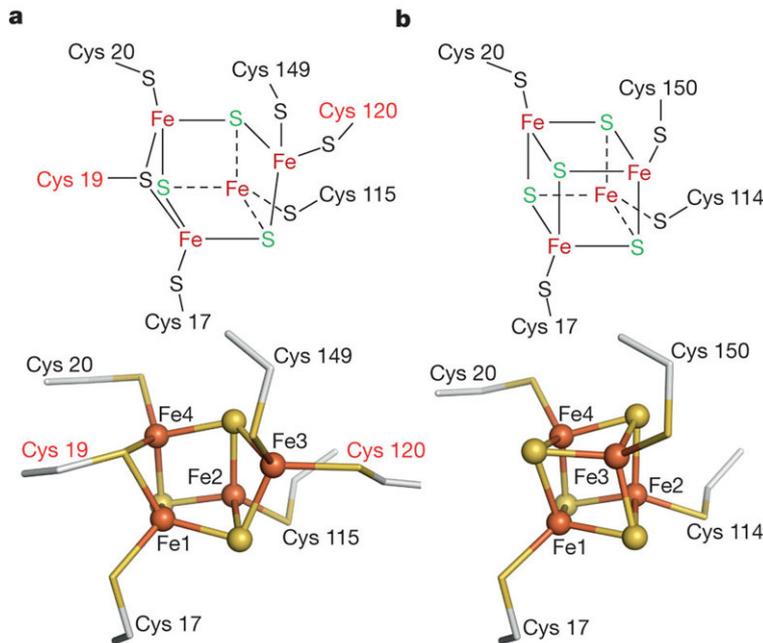
Durch die sterische Abweichung vom normalen [4Fe-4S] Kuban können also spezielle Eigenschaften der Cluster hervorgerufen werden, wobei insbesondere die zusätzlichen Redoxstufen des Nitrogenase [8Fe-7S]-Clusters und des [4Fe-2S-3O] Hybrid-Clusters eine Verwandtschaft zum proximalen Cluster der MBH nahelegen. Die unterschiedlichen EPR-Eigenschaften und Cysteinymotive hingegen lassen doch auf ein bedeutend anderes Fe-S Cluster schließen, sodass das proximale Cluster der MBH tatsächlich ein Novum darstellt.

#### **4.5.4 Röntgenstrukturanalysen der MBH zeigen die Struktur des proximalen Fe-S Clusters**

Nach O<sub>2</sub>-limitierter Anzucht wurde das MBH-Dimer nach Reinigung kristallisiert und in Zusammenarbeit mit der AG Spahn der Charité (Berlin) röntgenkristallographisch untersucht. Die Struktur der MBH konnte so im reduzierten Zustand bis auf eine Auflösung von 1,5 Å aufgelöst werden (Manuskript eingereicht). Während die Gesamtstruktur der MBH weitgehend identisch mit den schon vorhandenen Strukturen von [NiFe]-Hydrogenasen ist, zeigt sich das proximale Cluster als [4Fe-3S]-Cluster, das einem [4Fe-4S]-Kuban ähnelt, aber

## Diskussion

sterisch verzerrt ist (Abbildung 45). Das Sulfid des Cys19 koordiniert Fe 4 und Fe 1 und ersetzt somit ein anorganisches Schwefel. Cys120 koordiniert das von Cys149 koordinierte Fe-Atom, so dass dieses ebenfalls vierfach koordiniert ist. Das Kuban ist verzerrt, die Fe-S-Abstände sind länger als in einem normalen Kuban.



**Abbildung 45:** Struktur des proximalen Clusters der *R.e.* MBH (links) im Vergleich zum proximalen Cluster aus Standardhydrogenasen (rechts). (Fritsch et al., 2011, Manuskript eingereicht.)

### 4.6 Ein multipler Vergleich der Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen zeigt Unterschiede der Fe-S Clustermotive

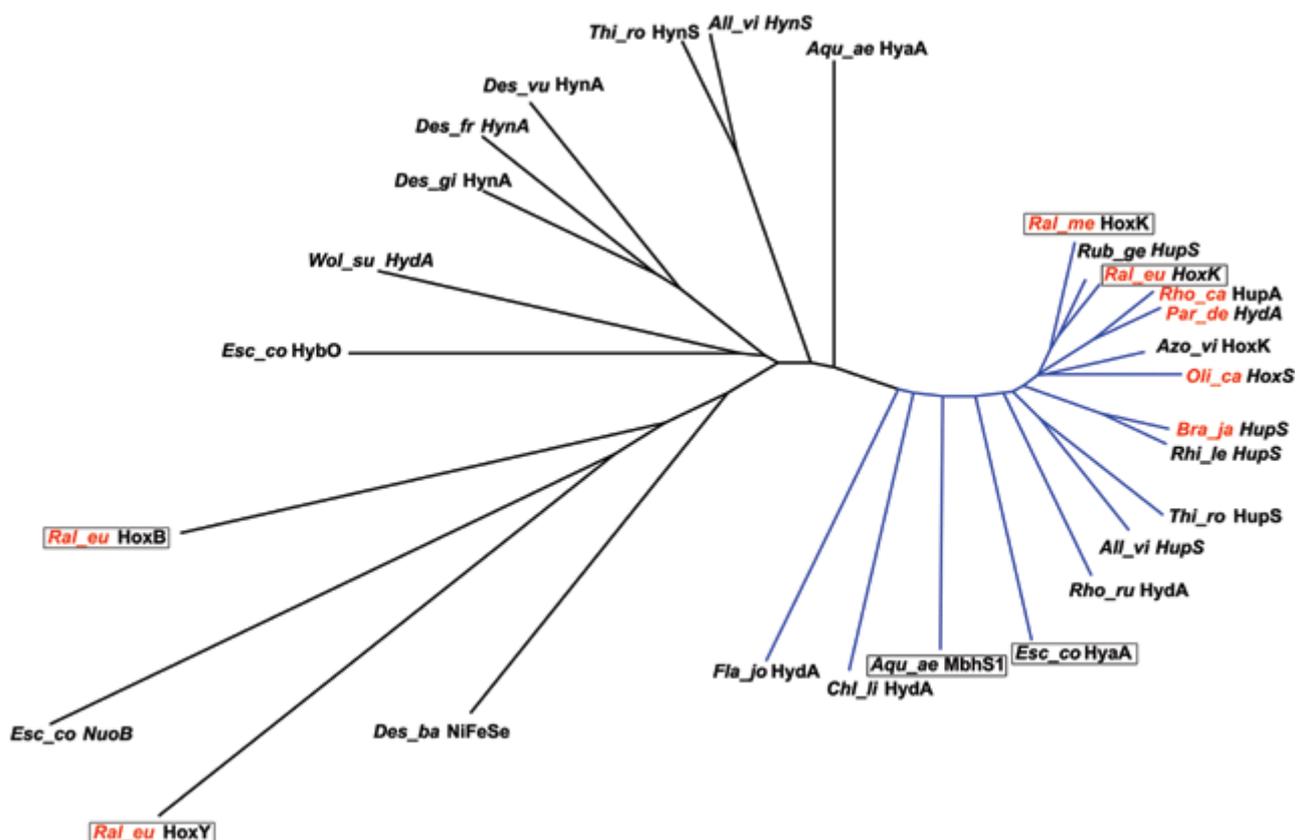
Eine weitere Unterstützung der These, dass das proximale Cluster zur O<sub>2</sub>-Toleranz beiträgt, ist das Vorkommen der zusätzlichen Cysteine um das proximale Cluster nur in O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen. In diesem Kapitel wird eine phylogenetische Analyse von kleinen Untereinheiten von Hydrogenasen mit Fokussierung auf die Aminosäureumgebung der Fe-S Cluster durchgeführt. Dazu wurden Aminosäuresequenzen von [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 1 und 2

(Tabelle 1) verglichen, deren Strukturkern aus zwei Untereinheiten besteht. Dabei wurden die in Abbildung 47 dargestellten verschiedenen Signatursequenzen für die drei Fe-S Cluster festgestellt. Am höchsten konserviert ist das distale Cluster, in dem lediglich bei cyanobakteriellen Aufnahme-Hydrogenasen das Histidin gegen ein Glutamat ausgetauscht wird. Diskutiert wird hier ein Fehlen des distalen Clusters oder ein durch eine andere Aminosäure (z.B. durch besagtes Glutamat) ligandiertes Cluster (Schröder *et al.*, 2007). Das mediale Cluster ist weniger stark konserviert, so ist das Prolin in den meisten Hydrogenasen konserviert, während [NiFeSe]-Hydrogenasen, deren Verwandte, sowie Sensor-Hydrogenasen ein Cystein an dieser Stelle besitzen, was auf ein [4Fe-4S] Cluster schließen lässt. Dies wurde in der Kristallstruktur zumindest für [NiFeSe]-Hydrogenasen bestätigt (Garcin *et al.*, 1999). Streptomycceten-Hydrogenasen und Verwandte hingegen besitzen zwar ein viertes Cystein im Motiv des medialen Clusters, aufgrund eines um zwei Aminosäuren verschobenen Cysteins im 6S-Motiv (Bezeichnung nach (Albracht, 1994), siehe Abbildung 47) kann man aber nur mit Einschränkung auf ein [4Fe-4S]-Cluster schließen - da sich an der ansonsten konservierten Position des 6S-Cysteins ein Valin befindet. Cyanobakterielle Aufnahme-Hydrogenasen und Hydrogenasen, die wahrscheinlich an den TCA-Cyclus gekoppelt sind, wie z.B. die Hydrogenase 3 aus *A. aeolicus* (Guiral *et al.*, 2005b; Ishii *et al.*, 2000) besitzen an Stelle des Prolins im 7S-Motiv ein Lysin und somit wahrscheinlich ebenfalls ein - eventuell leicht modifiziertes - [3Fe-4S] Cluster. Die Signale aus der EPR-Spektroskopie entsprechen denen von Standard [3Fe-4S]-Cluster (Guiral *et al.*, 2005a; Schröder *et al.*, 2007).

Das 1S-Motiv des proximalen Clusters zeigt die größten Variationen. Während das „Standard“-motiv CXGC bei den meisten Hydrogenasen konserviert ist und auch die Sensorhydrogenasen ein dementsprechendes Motiv besitzen (allerdings stets mit Glycin an zweiter Position, während der überwiegende Teil der Standardhydrogenasen ein Threonin an dieser Stelle besitzt), weisen viele andere Hydrogenasen ein deutlich abgewandeltes Motiv auf. O<sub>2</sub>-tolerante Hydrogenasen besitzen wie erwähnt ein zusätzliches Cystein an Position 3 des 1S-Motivs, bei

## Diskussion

vielen anderen Hydrogenasen ist das ansonsten konservierte zweite Cystein des 1S-Motivs durch ein Aspartat oder Asparagin ersetzt. Bei diesen Hydrogenasen ist fraglich, ob das proximale Fe-S Cluster vom [4Fe-4S]-Typ ist. Als Fe-S Clusterligandierende Aminosäure käme Aspartat in Frage (Calzolari *et al.*, 1995; Zhou und Adams, 1997), Asparagin hingegen ist bisher noch nicht als Fe-S Clusterligandierende Aminosäure bekannt. Die 2S- und 3S-Motive des proximalen Clusters sind im Gegensatz zum 1S-Motiv hoch konserviert. Lediglich die Hydrogenasen mit zusätzlichen Cysteinen besitzen statt des konservierten Glycins im 2S-Motiv das zweite zusätzliche Cystein. Die Länge der Aminosäuresequenz zwischen den drei Motiven ist im Gegensatz zur Längenvariabilität zwischen den anderen Clustermotiven sehr variabel, was auf eine heterogene Sekundärstruktur um das Cluster von verschiedenen Hydrogenasen schließen lässt.



**Abbildung 46:** Phylogenetischer Baum der kleinen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen mit der NuoB-Untereinheit des Komplex I (aus *E. coli*).

Als Außengruppe wurde HoxB festgelegt. In blau markiert sind alle Hydrogenasen mit zusätzlichen Cysteinen am proximalen Cluster, Rot markierte Speziesnamen sind Knallgasbakterien, eingekastelt sind alle elektrochemisch als O<sub>2</sub>-tolerant charakterisierte Hydrogenasen. Abkürzungen: *All\_vi*: *Allochromatium vinosum*, *Aqu\_ae*: *Aquifex aeolicus*, *Ral\_me*: *Ralstonia metallidurans*, *Rub\_ge*: *Rubrivivax gelatinosus*, *Ral\_eu*: *Ralstonia eutropha*, *Rho\_ca*: *Rhodobacter capsulatus*, *Par\_de*: *Paracoccus denitrificans*, *Azo\_vi*: *Azotobacter vinelandii*, *Oli\_ca*: *Oligotropha carboxidovorans*, *Bra\_ja*: *Bradyrhizobium japonicum*, *Thi\_ro*: *Thiocapsa roseopersicina*, *Rho\_ru*: *Rhodospirillum rubrum*, *Esc\_co*: *Escherichia coli*, *Fla\_jo*: *Flavobacterium johnsoniae*, *Des\_ba*: *Desulfomicrobium baculatum*, *Wol\_su*: *Wolinella succinogenes*, *Des\_gi*: *Desulfovibrio gigas*, *Des\_fr*: *Desulfovibrio fructosovorans*, *Des\_vu*: *Desulfovibrio vulgaris*.

In Knallgasbakterien sind bis jetzt nur Hydrogenasen mit modifiziertem proximalen Cluster gefunden worden - meist der Typ mit zwei zusätzlichen Cysteinen. Zu beachten dabei ist, dass thermophile Knallgasbakterien mikroaerophil sind, wohl auch, da diese aufgrund der geringeren Löslichkeit von O<sub>2</sub> in Wasser mit höherer Temperatur nur mit geringen Konzentrationen an O<sub>2</sub> in Berührung kommen. Dennoch besitzen alle bisher sequenzierten thermophilen Knallgasbakterien mindestens eine membranassoziierte Hydrogenase mit einem

## Diskussion

modifiziertem proximalen Cluster (siehe Tabelle 16). Neben den MBHs mit zusätzlichen Cysteinen am proximalen Cluster kommen dort - wenn auch weitaus seltener - die Hydrogenasen der außerordentlich kleinen Gruppe 7 vor. Diese Gruppe ist bemerkenswert, da hier der N-terminale Bereich eine hohe Ähnlichkeit zu cyanobakteriellen Uptake-Hydrogenasen besteht, während der C-terminale Teil ähnlich zu membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenasen des *Wolinella succinogenes*-Typ ist. Die kleine Untereinheit ist außerdem sowohl von den Signaturmotiven der Fe-S Cluster, als auch von der vollständigen Aminosäuresequenz her, nah verwandt zu den Hydrogenasen aus *Geobacter*. Bei letzteren wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Reduzierung von eisenhaltigen Stoffen einnehmen (Coppi, 2005; Coppi *et al.*, 2004). Die große Untereinheit ist hingegen lediglich zu membrangebundenen Hydrogenasen des *Wolinella*-Typs verwandt. So ist zu vermuten, dass diese MBHs die zweite Klasse an O<sub>2</sub>-toleranten NiFe-Hydrogenasen stellt. Auch hier könnte das modifizierte proximale Cluster eine Rolle spielen.

Proximales Cluster					Mediales Cluster			Distales Cluster			
1S		2S		3S	6S		7S	4S		5S	
1	CXGC	X <sub>93-94</sub>	CX <sub>4</sub> G	X <sub>26-29</sub>	CP	C	X <sub>11</sub>	PX <sub>6</sub> CXXC	HXXC	X <sub>22</sub>	CX <sub>5</sub> C
2	CXCC	X <sub>93-94</sub>	CX <sub>4</sub> C	X <sub>27</sub>	CP	C	X <sub>10-12</sub>	PX <sub>6</sub> CXXC	HXXC	X <sub>24</sub>	CX <sub>5</sub> C
3	CXGC	X <sub>99-100</sub>	CX <sub>4</sub> G	X <sub>33-37</sub>	CP	C	X <sub>11-13</sub>	CX <sub>5-6</sub> CXXC	HXXC	X <sub>19-20</sub>	CX <sub>5</sub> C
4	CXGD	X <sub>109-114</sub>	CX <sub>4</sub> G	X <sub>35</sub>	CP	C*	X <sub>13</sub>	CX <sub>6</sub> CXXC	HXXC	X <sub>18</sub>	CX <sub>5</sub> C
5	CXGN	X <sub>97</sub>	CX <sub>4</sub> G	X <sub>43</sub>	CP	C	X <sub>10</sub>	KX <sub>5</sub> CXXC	QXXC	X <sub>20</sub>	CX <sub>6</sub> C
6	CGGC	X <sub>99</sub>	CX <sub>4</sub> G	X <sub>42</sub>	CP	C	X <sub>11</sub>	CX <sub>6</sub> CXXC	HXXC	X <sub>19</sub>	CX <sub>6</sub> C
7	CXXD/N	X <sub>94-97</sub>	CX <sub>4</sub> G	X <sub>33-34</sub>	CP	C	X <sub>11</sub>	PX <sub>6</sub> CXXC	HXXC	X <sub>19</sub>	CX <sub>5</sub> C
8	CXXN	X <sub>74-89</sub>	CX <sub>3</sub> G	X <sub>40-45</sub>	CP	C	X <sub>10</sub>	KX <sub>6</sub> CXXC	HXXC	X <sub>20</sub>	CX <sub>6</sub> C

**Abbildung 47:** Signaturmotive der Fe-S Cluster in kleinen Untereinheiten von [NiFe]-Hydrogenasen mit zwei Untereinheiten.

Die Motive sind anhand der genetischen Reihenfolge mit 1S bis 7S bezeichnet. 1: Standardhydrogenasen, 2: Hydrogenasen mit zusätzlichen Cysteinen am proximalen Cluster, 3: NiFeSe-ähnliche Hydrogenasen, 4: Streptomyceten-ähnliche Hydrogenasen, 5: Cyanobakterielle Aufnahme-Hydrogenasen, 6: Sensor-Hydrogenasen, 7: *Geobacter*-ähnliche, eisenstoffwechsellozierte Hydrogenasen, 8: Lösliche, CO<sub>2</sub>-fixierungsassozierte Hydrogenasen (*Aquifex* Hyd 3-ähnlich). \*: Im Alignment um zwei Aminosäuren versetzt - unklar, ob ligierend

Alle [NiFe]-Hydrogenasen mit zusätzlichen Cysteinen am proximalen Cluster besitzen ein N-terminales

Signalpeptid mit Twin-Arginin-Motiv und eine C-terminale Verlängerung, die vermutlich als Membrananker und zur Interaktion mit der dritten Untereinheit, einem Cytochrom *b* interagiert, welches auf dem Operon aller MBHs kodiert ist. Aufgrund dieser Beobachtungen empfiehlt sich eine neue Subklassifizierung der [NiFe]-Hydrogenase-Gruppen 1 und 2 (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Neue Untergruppierung der NiFe-Hydrogenasen anhand von Signaturvergleichen der Fe-S Cluster der kleinen Untereinheit basierend auf (Vignais und Billoud, 2007).

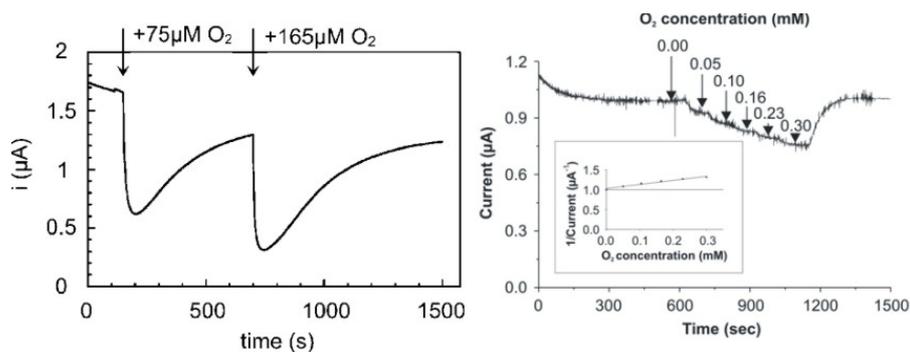
Gruppe	Bezeichnung	Charakteristika
1a	Standardhydrogenasen	periplasmatische Aufnahmehydrogenasen
1b	NiFeSe-Hydrogenasen	periplasmatische Aufnahmehydrogenasen, Selenocystein am aktiven Zentrum
1c	O <sub>2</sub> -sensitive MBHs	membrangebundene Aufnahmehydrogenasen
1d	Geobacter/Fe-Stoffwechsel-Hydrogenasen	membrangebundene, an den Eisenstoffwechsel gekoppelte NiFe-Hydrogenasen
1e	O <sub>2</sub> -tolerante MBHs mit zusätzlichen Cysteinen am proximalen Cluster	Membrangebundene Aufnahmehydrogenasen, O <sub>2</sub> -tolerant
2a	Cyanobakterielle Aufnahme Hydrogenasen	cytoplasmatische Aufnahmehydrogenasen
2b	H <sub>2</sub> -Sensor Hydrogenasen	Hydrogenasen für H <sub>2</sub> -Sensierung und Signalweiterleitung
2c	TCA-assoziierte Hydrogenasen (vormals 2a)	cytoplasmatische Hydrogenasen, die Reduktionsäquivalente für den reversen TCA-Zyklus liefern
2d	Streptomyceten-Hydrogenasen	Funktion unbekannt, cytoplasmatische Hydrogenasen mit einer hohen H <sub>2</sub> -Affinität

#### 4.6.1 Das Vorkommen der zusätzlichen Cysteine und die O<sub>2</sub>-Toleranz von Hydrogenasen korreliert mit dem Vorhandensein bestimmter akzessorischer Proteine

Vergleicht man die auf Hydrogenase-Operons liegenden Gene von verschiedenen [NiFe]-Hydrogenasen, fällt auf, dass bestimmte akzessorische Proteine nur auf Operons von O<sub>2</sub>-toleranten MBHs kodiert werden. Die höchste Anzahl dieser akzessorischen Proteine wird von Knallgasbakterien kodiert, die in O<sub>2</sub>-reichen Umgebungen vorkommen. Es handelt sich um die Proteine HoxOQRTV, die im Operon der *R. e.* MBH direkt stromabwärts von HoxZ, liegen. HoxOQ kommen bei nahezu allen Organismen vor, die für eine MBH mit zusätzlichen Cysteinen kodieren. Damit sind diese Proteine Kandidaten für Chaperone, die die Maturation

## Diskussion

des proximalen Clusters unterstützen. HoxRTV hingegen fehlen bei mikroaerophilen Knallgasbakterien - eventuell könnte dies die Ursache für eine geringere O<sub>2</sub>-Toleranz dieser Hydrogenasen sein: In elektrochemischen Experimenten offenbart die MBH aus *A. aeolicus* nur etwa 30 % der katalytischen Aktivität der *R.e.* MBH (siehe Abbildung 48), wobei man beachten sollte, dass diese Ergebnisse wegen der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (insbesondere das angelegte Redoxpotential) nicht einwandfrei miteinander zu vergleichen sind. Die unterschiedliche Ausprägung der O<sub>2</sub>-Toleranz der MBHs entspricht aber auch den Umweltbedingungen in denen beide Bakterien vorkommen: *A. aeolicus* bewohnt 85 bis 90 °C heiße Quellen, in denen lediglich 25 bis 30 % der O<sub>2</sub>-Menge gelöst ist, die bei 30 °C (maximale Umgebungstemperatur von *R.e.*) in Lösung vorliegt. HoxV besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zur großen MBH-Untereinheit HoxG und wird als Chaperon beschrieben, dass für den Nickeleinbau unter O<sub>2</sub> zuständig ist (Ludwig *et al.*, 2009b). HoxR ist homolog zu Rubredoxinen, während HoxT eine Rolle im TAT-medierten Transport über die Membran zugesprochen wird (Fritsch *et al.*, 2011) Diese beiden Proteine sind wahrscheinlich - analog zu HoxV bei der großen Untereinheit- am Schutz der Fe-S Cluster der kleinen Untereinheit bei hohen O<sub>2</sub>-Konzentrationen beteiligt sein.



**Abbildung 48:** Vergleich der O<sub>2</sub>-Toleranz der *A. aeolicus* Hydrogenase I (links) und *R. eutropha* MBH adsorbiert auf einer Graphitelektrode.

Der Stromfluss, analog zur katalytischen Aktivität, wird bei schrittweiser Injektion von O<sub>2</sub> in die elektrochemische Zelle gemessen. Die Experimente wurden bei eigenständigen Bedingungen für jedes Enzym durchgeführt: *Aa* Hydrogenase I: +210 mV Potential, pH 7, 40° C, 1 bar H<sub>2</sub>; *Re* MBH: -8mV, pH 5,5, 30 °C. Nach (Ludwig *et al.*, 2009a; Pandelia *et al.*, 2010a).

Tabelle 16 fasst die Ergebnisse des Vergleichs von verschiedenen Hydrogenase-Operons in sequenzierten Bakterien mit [NiFe]-Hydrogenasen zusammen. Die überwiegende Anzahl der bis jetzt sequenzierten Knallgasbakterien (für eine vollständige Übersicht aller als Knallgasbakterien identifizierten Bakterien siehe Anhang, Tabelle 18) besitzt eine membranständige Hydrogenase mit den zwei zusätzlichen Cysteinen am proximalen Cluster. *Rhodococcus opacus* und *Bacillus tusciae* sind Knallgasbakterien, denen eine membrangebundene Hydrogenase fehlt, diese Bakterien besitzen stattdessen eine cytoplasmatische Hydrogenase, die für die Energiebereitstellung sorgt. Ersterer besitzt eine bidirektionelle Hydrogenase des HoxFUYH-Typs, die eine große Ähnlichkeit mit der SH aus *R. eutropha* besitzt, während *B. tusciae* eine Hydrogenase des cyanobakteriellen Aufnahmetyps (Gruppe 2a) besitzt, die Ähnlichkeit mit der Hydrogenase aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* hat (Schröder *et al.*, 2007). Diese Hydrogenasen besitzen ein für O<sub>2</sub>-tolerante Sensor-Hydrogenasen charakteristisches Isoleucin in der großen Untereinheit, was eventuell den Zugang von O<sub>2</sub> zum aktiven Zentrum erschwert. Auch enthalten die cyanobakteriellen Aufnahmehydrogenasen Signaturen von Nichtstandard-Fe-S Cluster (siehe 4.6 und Abbildung 47).

Bisher sind zwei membranassoziierte Hydrogenasen von Knallgasbakterien sequenziert, denen die zusätzlichen Cysteine fehlen. Diese Hydrogenasen der mikroaerophilen *Persephonella marina* und *Sulfurihydrogenibium azorense* können in die Gruppe 1d, den *Geobacter*-ähnlichen Hydrogenasen, eingeordnet werden (Tabelle 15). Diese [NiFe]-Hydrogenasen, die daher zumindest eine geringe O<sub>2</sub>-Toleranz aufweisen müssen, sind bislang nicht charakterisiert, das proximale Cluster besitzt keine Standardsignatur und weist Ähnlichkeiten zu den cyanobakteriellen Aufnahmehydrogenasen auf (Abbildung 47). Einige Hydrogenasen mit zusätzlichen Cysteinen tauchen in Bakterien auf, die bislang nicht als Knallgasbakterien beschrieben sind (Tabelle 16). Bei einigen ist nachgewiesen, dass die Expression dieser Hydrogenasen unter aeroben Bedingungen nicht stattfindet (*E. coli*, *R. leguminosarum*, *S. enterica*), die meisten dieser Bakterien sind

## Diskussion

fakultative Anaerobier. Viele dieser Hydrogenasen (aus *Rubrivivax gelatinosus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Flavobacterium johnsoniae*) sind nicht mit einem Cytochrom *b* als primärem Elektronenakzeptor assoziiert und die akzessorischen Proteine HoxOQRTV fehlen. Dies könnte darauf hin deuten, dass diese Hydrogenasen nicht funktionell sind oder nicht exprimiert werden. Spezies des Genus *Azotobacter* wiederum fehlen die Gene, die für die CO<sub>2</sub>-Fixierung nötig sind, so dass sie nicht in der Lage sind, autotroph zu wachsen und somit - wenn überhaupt - nur eingeschränkt als Knallgasbakterien eingeordnet werden können.

## Diskussion

**Tabelle 16:** Übersicht über [NiFe]-Hydrogenasen und ihre membranständige Cytochrom-Untereinheit, sowie eine Auswahl von akzessorischen Proteinen.

Spezies	Klasse	Bezeichnung	Cysteine	O <sub>2</sub>	Anmerkungen	Hox						
						Z	O	Q	R	T	V-Homologe	
<b>Knallgasbakterien</b>												
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <sup>1</sup>	α-Proteobacteria	HupSL	+	A	Symbiont	+	+	+	+	+	+	(HupCGHIJK)
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> <sup>2</sup>	α-Proteobacteria	HoxSL	+	A		+	+	+	+	+	+	(HoxZHupGHI <sup>A</sup> JK)
<i>Paracoccus denitrificans</i>	α-Proteobacteria	HydAB	+	A		+	+	+	[+]	+	+	(HupCGH [J] K <sup>A</sup> )
<i>Rhodobacter capsulatus</i> <sup>3</sup>	α-Proteobacteria	HupAB	+	A	Phototroph	+	+	+	[+]	+	+	(HupCGH [J] K)
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	α-Proteobacteria	HydAB	+	A		+	+	+	[+]	+	+	(HupCG <sup>B</sup> H [J] <sup>B</sup> K)
<i>Azorhizobium caulinodans</i> <sup>4</sup>	α-Proteobacteria	HydAB	+	A	Symbiont	+	+	+	[+]	+	+	(HupCGH [J] K)
<i>Alcaligenes hydrogenophilus</i> <sup>5</sup>	β-Proteobacteria	HupSL	+	A		n.s.						
<i>Hydrogenophilus hirschii</i> <sup>G</sup>	β-Proteobacteria	HoxKG	+	MA	Thermophil	n.s.						
<i>Ralstonia eutropha</i> <sup>6</sup>	β-Proteobacteria	HoxKG	+	A		+	+	+	+	+	+	(HoxZOQRTV)
<i>Ralstonia metallidurans</i>	β-Proteobacteria	HoxKG	+	A		+	+	+	+	+	+	(HoxZOQRTV)
<i>Pseudomonas hydrogenvora</i> <sup>7</sup>	γ-Proteobacteria	HupSL	+	A		+	+	+	+	+	+	(HupCGHIJK)
<i>Aquifex aeolicus</i> <sup>8</sup>	Aquificae	MbhSL1	+	MA	Thermophil	+	(+)	+	-	-	-	(HoxZHyaEF)
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Aquificae	HydAB	+	MA	ThermoAcido	+	+	+	-	-	-	(HupCGH)
<i>Hydrogenobaculum acidophilum</i> <sup>9</sup>	Aquificae	HydAB	+	MA	Thermophil	+	-	+	-	-	-	(HupCH)
<i>Hydrogenivirga caldilitoris</i> <sup>9</sup>	Aquificae	MbhSL1	+	MA	Thermophil	+	(+)	+	-	-	-	(HoxZHyaEF <sup>B</sup> )
<i>Persephonella marina</i> <sup>9</sup>	Aquificae	MbhSL	- <sup>D</sup>	MA	Thermophil	+	-	-	+	-	-	(HupCI <sup>B</sup> )
<i>Sulfurihydrogenibium azorense</i> <sup>9</sup>	Aquificae	HydAB	- <sup>D</sup>	MA	Thermophil	+	-	-	+	-	-	(HupCI <sup>B</sup> )
<i>Thermocrinis albus</i> <sup>10</sup>	Aquificae	HydAB	+	MA	Thermophil	+	+	+	-	-	-	(HupCG <sup>B</sup> H)
<i>Rhodococcus opacus</i>	Actinobacteria	HoxHY	- <sup>E</sup>	A		-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus tusciae</i>	Bacilli	HydAB	- <sup>C</sup>	A	Thermophil	-	-	-	-	-	-	
<b>Hydrogenasen mit zusätzlichen Cysteinen aus sonstigen (Nichtknallgas-) Bakterien</b>												
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	α-Proteobacteria	HupSL	+	MA	Symbiont	+	+	+	+	+	+	(HupCGHIJK)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	α-Proteobacteria	HydAB	+	FA	Phototroph	+	-	+	-	-	+	(HupC <sup>B</sup> HK)
<i>Azotobacter vinelandii</i> <sup>11</sup>	α-Proteobacteria	HupSL	+	A	N <sub>2</sub> -Fix	+	+	+	+	+	+	(Hup
<i>Azotobacter chroococcum</i> <sup>12</sup>	α-Proteobacteria	HupSL	+	A	N <sub>2</sub> -Fix	+	+	+	+	+	+	
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	β-Proteobacteria	HupSL	+	FA	Phototroph	-	-	-	-	-	-	
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> <sup>13</sup>	γ-Proteobacteria	HupSL	+	FA	Phototroph	+	-	+	+	-	+	(HupCHIK)
<i>Allochromatium vinosum</i>	γ-Proteobacteria	HupSL	+	FA	Phototroph	+	-	+	+	-	+	(HupCHIK)
<i>Escherichia coli</i>	γ-Proteobacteria	Hyd1	+	FA		+	+	+	-	-	-	(HyaCEF)

## Diskussion

Spezies	Klasse	Bezeichnung	Cysteine	O <sub>2</sub>	Anmerkungen	Hox						
						Z	O	Q	R	T	V-Homologe	
<i>Salmonella enterica</i>	γ-Proteobacteria	Hyd1	+	FA		+	[+]	+	-	-	-	(HyaCF2)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	δ-Proteobacteria	HydAB	+	An		+	-	-	-	-	-	
<i>Chlorobium limicola</i>	Chlorobia	HydAB	+	An	Phototroph	+	-	-	-	-	-	(HydC)
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Flavobacteria	HydAB	+	MA		-	-	-	-	-	-	
<i>Methylacidiphilum infernorum</i> <sup>14</sup>	Verruromicrobia	HyaAB	+	A	ThermoAcido	+	-	+	-	-	-	(HyaCHupH)
<b>Standardhydrogenasen und Verwandte</b>												
<i>Escherichia coli</i>	γ-Proteobacteria	Hyd2	-	FA		- <sup>F</sup>	-	-	-	+	-	(HybE)
<i>Salmonella enterica</i>	γ-Proteobacteria	Hyd2	-	FA		- <sup>F</sup>	-	-	-	+	-	(HybE)
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> <sup>13</sup>	γ-Proteobacteria	HynSL	-	FA	Phototroph	- <sup>F</sup>	-	-	-	-	+	(HupK)
<i>Allochromatium vinosum</i>	γ-Proteobacteria	HynSL	-	FA	Phototroph	- <sup>F</sup>	-	-	-	-	+	(HupK)
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i> <sup>15</sup>	δ-Proteobacteria	HynAB	-	An		-	-	-	-	-	-	
<i>Desulfovibrio gigas</i>	δ-Proteobacteria	HynAB	-	An		-	-	-	-	-	-	
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	δ-Proteobacteria	HynAB	-	An		-	-	-	-	-	-	
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	δ-Proteobacteria	HySAB	-	An		-	-	-	-	-	-	
<i>Wolinella succinogenes</i> <sup>16</sup>	ε-Proteobacteria	HydAB	-	MA		+	-	-	-	-	-	(HydC)
<i>Aquifex aeolicus</i> <sup>8</sup>	Aquificae	HyaAB	-	MA	Thermophil	-	-	-	-	-	-	

+: Homologes Protein vorhanden, (+): Geringe Sequenzidentität zum entsprechenden *R. eutropha* Protein. [++]: Entsprechende Proteine sind im jeweiligen Organismus fusioniert, n.s.: Operonabschnitt nicht sequenziert, <sup>A</sup>: Protein nicht als ORF erkannt, <sup>B</sup>: Protein anders benannt, <sup>C</sup>: Cyanobakterielle, Aufnahme-Hydrogenase, <sup>D</sup>: Eisenstoffwechsel-gekoppelte MBH, <sup>E</sup>: Lösliche Hydrogenase des HoxEFUYH-Typs, <sup>F</sup>: Das mutmaßliche Cytochrom (Isp1 und HybB) hat keine Ähnlichkeit zu HoxZ und anderen Cytochrom *b*-Sequenzen, bei *in silico*-Analysen wurde allerdings eine Häm *b*-Bindestelle gefunden (Palagyi-Meszaros *et al.*, 2009). <sup>G</sup>: Persönliche Auskunft, Stefan Frielingsdorf. A: Aerob, MA: Mikroaerophil, FA: Fakultativ aerob, An: Anaerob. Veröffentlichung der Sequenzen, <sup>1</sup>: (Kaneko *et al.*, 2002), <sup>2</sup>: (Fuhrmann *et al.*, 2003), <sup>3</sup>: (Strnad *et al.*, 2010), <sup>4</sup>: (Baginsky *et al.*, 2004), <sup>5</sup>: (Yagi *et al.*, 1992), <sup>6</sup>: (Pohlmann *et al.*, 2006), <sup>7</sup>: (Ohtsuki *et al.*, 1995) <sup>8</sup>: (Deckert *et al.*, 1998), <sup>9</sup>: (Reysenbach *et al.*, 2009), <sup>10</sup>: (Wirth *et al.*, 2010), <sup>11</sup>: (Chen und Mortenson, 1992), <sup>12</sup>: (Du *et al.*, 1994), <sup>13</sup>: (Maroti *et al.*, 2003), <sup>14</sup>: (Hou *et al.*, 2008), <sup>15</sup>: (Rousset *et al.*, 1990), <sup>16</sup>: (Baar *et al.*, 2003)

#### 4.7 Ausblick: Der biotechnologische Nutzen dieser Arbeit

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der O<sub>2</sub>-Toleranz von Hydrogenasen bietet verschiedene Möglichkeiten, die Ergebnisse dieser Arbeit in anwendungsorientierte Prozesse einfließen zu lassen. Der Einsatz von Hydrogenasen in der biologischen H<sub>2</sub>-Produktion und die energetische Nutzung von H<sub>2</sub> in biologischen Systemen wird mittlerweile in vielen Projekten erforscht (Krassen *et al.*, 2009; Lubner *et al.*, 2010a; Vincent *et al.*, 2006). Dass der Einsatz von regenerativen Energien in naher Zukunft erforderlich sein wird, ist unzweifelhaft; die Produktion und Verwertung von H<sub>2</sub> ist dabei nur eine von vielen möglichen Alternativen. Momentan ist sowohl die Produktion, als auch die Umwandlung von H<sub>2</sub> in Energie problematisch, da beides ressourcenintensive Prozesse sind. Es sind kostengünstigere und ressourcenschonendere Verfahren nötig, wobei die biologische Produktion von H<sub>2</sub> für die Zukunft eine viel versprechende Option ist: Im günstigsten Fall wird H<sub>2</sub> kostengünstig aus Sonnenlicht, Wasser und Biomasse erzeugt. Im umgekehrten Fall könnten enzymbasierte Systeme die klassische platinbasierte Brennstoffzelle ersetzen oder ergänzen. Die O<sub>2</sub>-Toleranz von Hydrogenasen ist in beiden Fällen von herausragender Bedeutung: Bei der Nutzung von Sonnenlicht über das Photosystem I und II entsteht unweigerlich O<sub>2</sub>, während bei dem Prozess der Energieumwandlung von H<sub>2</sub> mit Hydrogenasen O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O reduziert wird, was möglichst im selben Kompartiment ablaufen soll (Vincent *et al.*, 2006). Die Hydrogenasen kommen bei der biotechnologischen Nutzung höchstwahrscheinlich mit O<sub>2</sub> in Kontakt, was die überwiegende Anzahl der momentan charakterisierten Hydrogenasen katalytisch inaktiviert oder, im Fall der [FeFe]-Hydrogenasen irreversibel deaktiviert. Problematisch ist dabei, dass die O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen eine relativ geringe H<sub>2</sub>-Produktionsrate besitzen, die zum Teil auf Substrathemmung beruht (Goldet *et al.*, 2008). Die Enzyme mit der höchsten H<sub>2</sub>-Produktionsrate, die [FeFe]-Hydrogenasen, werden schon bei geringsten O<sub>2</sub>-Mengen inaktiviert und sind so höchstens für Systeme brauchbar, die auf einer kompartmentären oder zeitlichen Trennung der Hydrogenasen von O<sub>2</sub>

## Diskussion

beruhen. Die Aufklärung von Faktoren, die zur O<sub>2</sub>-Toleranz beitragen, kann einerseits dazu beitragen, Enzyme zu modellieren, die sowohl eine hohe H<sub>2</sub>-Produktionsrate, als auch eine O<sub>2</sub>-Toleranz aufweisen. Andererseits könnten auch künstliche Moleküle nach dem Vorbild von Hydrogenasen hergestellt werden, die diese beiden Eigenschaften kombinieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass ein großer Beitrag der O<sub>2</sub>-Toleranz in Hydrogenasen von der elektronentransferierenden Untereinheit abhängt. Den größten Anteil an dem Mechanismus der O<sub>2</sub>-Toleranz hat das proximale Cluster, das durch eine Modifikation des Standard-[4Fe-4S] Kubans, an der zwei zusätzliche Cysteine beteiligt sind, eine zusätzliche, hohe Redoxstufe erreicht. Dadurch kann eine hohe Elektronendichte am aktiven Zentrum bereitgestellt werden, die bei O<sub>2</sub> am aktiven Zentrum dazu führen, dass dieser O<sub>2</sub> durch Reduktion schnell wieder entfernt werden kann. Wenn es gelingt, eine ähnliche Struktur in O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen einzuführen, könnte das Produkt sowohl O<sub>2</sub>-tolerant sein, als auch eine hohe H<sub>2</sub>-Produktionsrate zu besitzen. Dabei sind aber diverse Dinge zu beachten. Wegen der anderen Umgebung des proximalen Clusters in Standardhydrogenasen, dürfte es problematisch sein, dort zusätzliche Cysteine einzuführen. Alleine durch die größere Struktur der Cysteine wird es zu sterischen Behinderungen führen, die die Faltung des Enzyms beeinträchtigen können. Auch die Abwesenheit der akzessorischen Proteine ist problematisch. So könnte die Reifung von proximalen Fe-S Clustern bestimmte Maturationsfaktoren benötigen, die in Operons von O<sub>2</sub>-sensitiven Hydrogenasen nicht kodiert sind. Essentiell scheint mindestens HoxQ zu sein, welches auf den MBH-Operons aller Knallgasbakterien kodiert ist. Letztendlich sind auch das distale und das mediale Cluster der MBH zumindest hinsichtlich des Redoxpotentials gegenüber anderen Hydrogenasen verändert. Auch diese Redoxpotentiale müssten eventuell angepasst werden, um einen optimalen rückwärtigen Elektronenfluss zu gewährleisten. Da noch nicht einwandfrei geklärt ist, wie das Redoxpotential von Fe-S Clustern durch die Aminosäureumgebung im Protein modifiziert wird, ist diese Arbeit nicht vielversprechend. Insgesamt erscheint es daher und wegen der vorher besproche-

nen Probleme naheliegender, O<sub>2</sub>-sensitive Hydrogenasen durch gerichtete Evolution und Massenmutagenese in die gewünschte Richtung zu bringen. Dennoch können aber die hier gewonnenen Erkenntnisse in diese Arbeiten mit einfließen: So könnten Hydrogenasevarianten hergestellt werden, bei denen die Glycine am proximalen Cluster durch Cysteine ersetzt sind. In diesen Stämmen könnten zusätzlich HoxOQRTV heterolog exprimiert werden. Dann müsste eine Massenmutagenese an der kleinen Untereinheit erfolgen wobei der Selektionsdruck und die so gerichtete Evolution durch ein lithoautotrophes Wachstum bei langsam erhöhten O<sub>2</sub>-Konzentrationen aufgebaut werden. Dies wäre der schwierige Schritt - es müssen Bakterien gefunden werden, die eine erfolgversprechende Hydrogenase besitzen, prinzipiell zu lithoautotrophem Wachstum fähig sind und genetisch zugänglich sind. Falls erfolgversprechende Mutanten gefunden werden, müssten diese auf H<sub>2</sub>-Produktion getestet werden (Schnelltest auf H<sub>2</sub>-Produktion auf Agarplatten mittels chromogenen Filtern). Auch könnten diese Mutanten mit Gaskanalmutanten kombiniert werden, die bereits eine gewisse O<sub>2</sub>-Toleranz aufweisen (Dementin *et al.*, 2009; Lieb Gott *et al.*, 2010a; Lieb Gott *et al.*, 2010b).

Das Bewusstsein, dass auch die kleine Untereinheit von Hydrogenasen und insbesondere das proximale Fe-S Cluster, für die O<sub>2</sub>-Toleranz von großer Bedeutung ist, kann bei der Suche nach biotechnologisch besser nutzbaren Hydrogenasen helfen. Der multiple Sequenzvergleich von Hydrogenasen machte deutlich, dass die überwiegende Mehrzahl der O<sub>2</sub>-toleranten Hydrogenasen zwei zusätzliche Cysteine um das proximale Cluster besitzt. So kann durch die Aminosäuresequenz auf die O<sub>2</sub>-Toleranz einer noch unbekanntes [NiFe]-Hydrogenase geschlossen werden. Dabei sind auch die akzessorischen Proteine HoxOQRTV interessant: Bislang sind O<sub>2</sub>-hochtolerante Hydrogenasen nur mit dem vollständigen Set dieser Proteine gefunden worden. So kann aus einer Gensequenz eines Organismus schnell und mit einer hohen Trefferquote auf eine Hydrogenase mit einer hohen O<sub>2</sub>-Toleranz geschlossen werden.

## 5 Anhang

**Tabelle 17:** Verbreitung von membrangebundenen Hydrogenasen mit zusätzlichen Cysteinen am proximalen Cluster (Stand: Februar 2011). Nicht als Charakteristika angegeben sind folgende, bei der Mehrheit zutreffenden Merkmale: Aerob, mesophil, gramnegativ

Organismus	Charakteristika
<b><math>\alpha</math>-Proteobakterien</b>	
<i>Acidiphilium multivorum</i>	
<i>Acidiphilium cryptum</i>	Acidophiler, fakultativer Fe(III)-Reduzierer
<i>Beijerinckia indica</i> ATCC 9039	Acidophiler Stickstofffixierer
<i>Methylosinus trichosporium</i>	Methanoxidierer
<i>Bradyrhizobium</i> sp. UPM1167 + ORS278 +BTAi1	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Rhizobium tropici</i>	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Azorhizobium</i> sp. UPM1161	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	Nichtschwefelpurpurbakterium, Phototroph, mikroaerophil, N <sub>2</sub> -Fixierer
<i>Oligotropha carboxidovorans</i>	CO-Oxidierer
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	Thermophil, phototropher Fe(II)-Oxidierer
<i>Citricella</i> sp. SE45	Schwefeloxidierer
<i>Pelagibaca bermudensis</i>	Denitrifikant
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Denitrifikant
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	N <sub>2</sub> -Fixierer, phototrophes Nichtschwefelpurpurbakterium
<i>Rhodobacter</i> sp. SW2	N <sub>2</sub> -Fixierer, phototrophes Nichtschwefelpurpurbakterium
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	N <sub>2</sub> -Fixierer, phototrophes Nichtschwefelpurpurbakterium
<i>Roseovarius</i> sp. TM1035 + HTCC2601	N <sub>2</sub> -Fixierer, phototrophes Nichtschwefelpurpurbakterium
<i>Sagittula stellata</i> E-37	N <sub>2</sub> -Fixierer, phototrophes Nichtschwefelpurpurbakterium
<i>Stappia aggregata</i>	CO-Oxidierer, Denitrifikant
<i>Azospirillum</i> sp. B510	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Nichtschwefelpurpurbakterium, Phototroph, N <sub>2</sub> -Fixierer
<b><math>\beta</math>-Proteobakterien</b>	
<i>Alcaligenes hydrogenophilus</i>	Knallgasbakterium
<i>Sutterella wadsworthensis</i> 3_1_45B	Nitrat-reduzierer, pathogen
<i>Burkholderia phymatum</i>	N <sub>2</sub> -fixierender (fakultativer) Symbiont (Elliott <sup>2006</sup> )
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	N <sub>2</sub> -fixierender (fakultativer) Symbiont, pathogen
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	Schwermetallresistentes Knallgasbakterium, Nitratreduzent
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Knallgasbakterium, Nitratreduzent
<i>Burkholderiales</i> bacterium 1_1_47	opportun pathogen, Gastrointestinalbewohner
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	Methanotropher, Aromatenabbauend
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	Phototrophes Purpurbakterium, CO-Fixierer
<i>Thiomonas intermedia</i>	Schwefelreduzierer
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	psychrophil
<i>Azoarcus</i> sp. BH72	N <sub>2</sub> -fixierender Symbiont
<i>Dechloromonas aromatica</i>	Aromatenabbauend, Fe(II) Oxidierer

<b><math>\gamma</math>-Proteobakterien</b>	
<i>Allochromatium vinosum</i>	Schwefelpurpurbakterium, mikroaerotolerant
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	Schwefelpurpurbakterium, mikroaerotolerant
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i>	Alkaliphil, halophil, Knallgasbakterium
<i>Citrobacter</i> sp. 30_2	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Citrobacter freundii</i>	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Citrobacter youngae</i>	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Escherichia albertii</i>	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Escherichia coli</i> (diverse Subspezies)	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Edwardsiella ictaluri</i> 93-146	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Edwardsiella tarda</i> (diverse Stämme)	opportunist pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Salmonella enterica</i> (diverse Subspezies)	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Shigella dysenteriae</i> 1012	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Shigella flexneri</i> 2a	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	pathogen (Coliformes Enterobakterium)
<i>Methylococcus capsulatus</i>	Methanotroph
<i>Methylobacter tundripaludum</i>	Methanotroph, psychrophil
<i>Neptuniibacter caesariensis</i>	leicht halophil
<i>Azotobacter chroococcum</i>	N <sub>2</sub> -Fixierer
<i>Azotobacter vinelandii</i>	N <sub>2</sub> -Fixierer
<i>Hydrogenovibrio marinus</i>	Knallgasbakterium
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	Knallgasbakterium
<b><math>\delta</math>-Proteobakterien</b>	
<i>Bilophila wadsworthia</i>	Intratestinales Bakterium, anaerob
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> str. ATCC 27774	Aerotolerant, Sulfatreduzierer, Nitratreduzent
<i>Desulfovibrio</i> sp. 3_1_syn3	Aerotolerant, Sulfatreduzierer
<i>Lawsonia intracellularis</i>	
<b>Aquificae</b>	
<i>Aquifex aeolicus</i>	Thermophil, mikroaerophil, Knallgasbakterium
<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-	Thermophil, mikroaerophil, Knallgasbakterium, Schwefeloxidierer
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Thermophil, mikroaerophil, Knallgasbakterium
<i>Hydrogenobaculum</i> sp. Y04AAS1	Thermophil, mikroaerophil, Knallgasbakterium
<i>Thermocrinis albus</i>	Thermophil, mikroaerophil, Knallgasbakterium, Schwefeloxidierer
<b>Bacteroidetes</b>	
<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	Anaerob
<i>Parabacteroides johnsonii</i> DSM 18315	Anaerob, Intestinal
<i>Parabacteroides</i> sp. D13	Anaerob
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Anaerob
<b>Chlorobia</b>	
<i>Chlorobaculum parvum</i>	Phototroph, anaerob
<i>Chlorobium ferrooxidans</i>	Phototroph, anaerob
<i>Chlorobium limicola</i>	Phototroph, anaerob
<i>Chlorobium luteolum</i>	Phototroph, anaerob
<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	Phototroph, anaerob
<i>Chloroherpeton thalassium</i>	Phototroph, anaerob
<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i>	Phototroph, anaerob

## Anhang

<i>Prosthecochloris aestuarii</i>	Phototroph, anaerob
<b>Clostridia</b>	
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51	Anaerob, grampositiv
<i>Heliobacterium modesticaldum</i>	Anaerob, grampositiv
<b>Flavobacteria</b>	
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Opportunistisch pathogen
<b>Sphingobacteria</b>	
<i>Mucilaginibacter paludis</i>	psychrotolerant
<b>Verrumicrobia</b>	
<i>Methylacidiphilum infernorum</i>	Acidophiler, thermophiler Methanotropher

pCH774\_M13\_rev

```

Query 101 TCGACATTACCTCGCAGCGCATATGACCCTCGATGCGGGTGACGGGATCGACGACAATG
|
Sbjct 1345 TCGACATTACCTCGCAGCGCATATGACCCTCGATGCGGGTGACGGGATCGACGACAATG

Query 161 CGACGGCCGCGGTTCGTCAGATTGAAGCCTTGGGTTGCGTAAGCTGACATTATTCGATC
|
Sbjct 1285 CGACGGCCGCGGTTCGTCAGATTGAAGCCTTGGGTTGCGTAAGCTGACATTATTCGATC

Query 221 TTCCTGATTAGTCGTTTCCCGGCGGCTTAGTGTTCACTGCCGCTGGTTTCGTTCTTCT
|
Sbjct 1225 TTCCTGATTAGTCGTTTCCCGGCGGCTTAGTGTTCACTGCCGCTGGTTTCGTTCTTCT

Query 281 TCGACGCACGCTTGATCGCAGACGCTGCGGCATGCGCCGTACGGCCGCCCCACCACGA
|
Sbjct 1165 TCGACGCACGCTTGATCGCAGACGCTGCGGCATGCGCCGTACGGCCGCCCCACCACGA

Query 341 CGGAGGCCGTTCCGCCAATCTGTGCGGCTTGGCCTCAACGCCGAAGTGGCTGATGCCGG
|
Sbjct 1105 CGGAGGCCGTTCCGCCAATCTGTGCGGCTTGGCCTCAACGCCGAAGTGGCTGATGCCGG

Query 401 TCAGACGATCGTAGAATGAGCCTTTGTCCAAAAGCCATCCTCGGAGCAACCAATGCAAC
|
Sbjct 1045 TCAGACGATCGTAGAATGAGCCTTTGTCCAAAAGCCATCCTCGGAGCAACCAATGCAAC

Query 461 CGTGGCCCGACTGAATGGGAAACTCGTCCCCTCGTTCAGCGCGTGGTGGAGCAGGCGT
|
Sbjct 985 CGTGGCCCGACTGAATGGGAAACTCGTCCCCTCGTTCAGCGCGTGGTGGAGCAGGCGT

Query 521 TGTACGTGGTCGGGCCTTTACAGCCCATCTTGTATAAGCAGAAGCCTTTGCGGGCTGATT
|
Sbjct 925 TGTACGTGGTCGGGCCTTTACAGCCCATCTTGTATAAGCAGAAGCCTTTGCGGGCTGATT

Query 581 CGTCGTCCCATTCCTCGACGAACTGGCCGGCATCGAAGTGTGGACGCCGGTAGCATTTGT
|
Sbjct 865 CGTCGTCCCATTCCTCGACGAACTGGCCGGCATCGAAGTGTGGACGCCGGTAGCATTTGT

Query 641 GGGGATCCGCTGGCTATAGAACATCTTCGGCCGACCCTGTGATCCAGTTCGGGATAC
|
Sbjct 805 GGGGATCCGCTGGCTATAGAACATCTTCGGCCGACCCTGTGATCCAGTTCGGGATAC

Query 700 GATCGAAGGTGAGCATGTAGGTAATGACACCCGTCATCACTTCGGCTATCGGAGGGCACC
|
Sbjct 745 GATCGAAGGTGAGCATGTAGGTAATGACACCCGTCATCACTTCGGCAATCGGAGGGCACC

Query 757 CCGGG 761
|
Sbjct 685 CCGGG 681

```

**Abbildung 49:** Sequenzierung des HoxK-Bereichs aus pCH774. Rotbraun unterlegt sind die durch ortserichtete Mutagenese eingeführten Sequenzen, schwarz unterlegt mit roter Schrift die unbeabsichtigt entstandene Leserastermutation. Generiert über BLAST. Query: Abfragesequenz (pCH774), Sbjct: *R. eutropha* H16 Sequenz der Datenbank.

## Anhang

**Tabelle 18:** Als Knallgasbakterien identifizierte Prokaryoten,

Spezies	Ordnung	Anmerkungen
<i>Acidovorax delafieldii</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Acidovorax facilis</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Alcaligenes hydrogenophilus</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Achromobacter ruhlandii</i> <sup>2</sup>	Proteobacteria	
<i>Aquifex aeolicus</i> <sup>3</sup>	Aquificales	Thermophil, sequenziert, +Cys
<i>Aquifex pyrophilus</i> <sup>4</sup>	Aquificales	Thermophil
<i>Arthrobacter sp.</i> <sup>1</sup>	Actinobacteria	
<i>Alcaligenes latus</i> <sup>2</sup>	Proteobacteria	
<i>Ancylobacter aquaticus</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>5</sup>	Proteobacteria	
<i>Azospirillum lipoferum</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Bacillus schlegelii</i> <sup>2</sup>	Firmicutes	Thermophil
<i>Bacillus tusciae</i> <sup>6</sup>	Firmicutes	Thermophil
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Derxia gummosa</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Herbaspirillum autotrophicum</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Hydrogenobacter hydrogenophilus</i> <sup>7</sup>	Aquificales	Thermophil
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i> <sup>8</sup>	Aquificales	Thermophil, Acidophil, sequenziert, +Cys
<i>Hydrogenobaculum acidophilum</i> <sup>9</sup>	Aquificales	Thermophil, sequenziert, +Cys
<i>Hydrogenophaga flava</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Hydrogenophaga palleronii</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Hydrogenovibrio marinus</i> <sup>4</sup>	Proteobacteria	
<i>Hydrogenophilus hirschi</i> <sup>10</sup>	Proteobacteria	Thermophil, sequenziert, +Cys (50-68°C), 2,5% O <sub>2</sub>
<i>Hydrogenophilus islandicus</i> <sup>11</sup>	Proteobacteria	
<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> <sup>2</sup>	Proteobacteria	Thermophil (50-52°C)
<i>Hydrogenothermus marinus</i> <sup>12</sup>	Aquificales	
<i>Hydrogenivirga caldilitoris</i> <sup>13</sup>	Aquificales	Thermophil
<i>Mycobacterium gordonae</i> <sup>1</sup>	Actinobacteria	
<i>Oligotropha carboxydovorans</i> <sup>4</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Paracoccus denitrificans</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Paracoccus denitrificans</i> <sup>14</sup>	Proteobacteria	
<i>Pelomonas saccharophila</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Persephonella guaymasensis</i> <sup>15</sup>	Aquificales	Sequenziert, nur SH
<i>Persephonella hydrogeniphila</i> <sup>16</sup>	Aquificales	
<i>Persephonella marina</i> <sup>7</sup>	Aquificales	
<i>Polaromonas hydrogenivorans</i> <sup>17</sup>	Proteobacteria	Psychrotolerant
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Pseudonocardia autotrophica</i> <sup>1</sup>	Actinobacteria	
<i>Ralstonia eutropha</i> <sup>18</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Ralstonia metallidurans</i> <sup>19</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Renobacter vaculatum</i> <sup>2</sup>	Proteobacteria	
<i>Rhodobacter capsulatus</i> <sup>2</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Rhodococcus opacus</i> <sup>1</sup>	Actinobacteria	Sequenziert, nur SH
<i>Streptomyces thermoautotrophicus</i> <sup>20</sup>	Actinobacteria	Thermophil
<i>Sulfurihydrogenibium azureense</i> <sup>21</sup>	Aquificales	Thermophil, sequenziert, nur SH
<i>Sulfurihydrogenibium kristjanssonii</i> <sup>22</sup>	Aquificales	Thermophil

<i>Sulfurihydrogenibium subterraneum</i> <sup>23</sup>	Aquificales	Thermophil
<i>Thiobacillus plumbophilus</i> <sup>4</sup>	Proteobacteria	
<i>Thiomonas islandica</i> <sup>24</sup>		
<i>Xanthobacter agilis</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	Sequenziert, +Cys
<i>Xanthobacter flavus</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Variovorax paradoxus</i> <sup>1</sup>	Proteobacteria	
<i>Venenivibrio stagnispumantis</i> <sup>25</sup>	Aquificales	Thermophil

“+Cys” (nur bei sequenzierten Organismen): Organismus mit einer MBH, in der die zusätzlichen Cysteine am proximalen Cluster vorkommen. “nur SH”: Sequenzierte Organismen, auf deren Genom nur für eine lösliche Hydrogenase, keine MBH kodiert wird. Referenzen: <sup>1</sup>: (Aragno und Schlegel, 1992), <sup>2</sup>: (Bowien und Schlegel, 1981), <sup>15</sup>: (Deckert *et al.*, 1998), <sup>3</sup>: (Schwartz und Friedrich, 2006), <sup>5</sup>: (Drobner *et al.*, 1990), <sup>6</sup>: (Bonjour und Aragno, 1984), <sup>7</sup>: (Kryukov *et al.*, 1983), <sup>8</sup>: (Bonjour und Aragno, 1986), <sup>9</sup>: (Shima und Suzuki, 1993), <sup>10</sup>: (Stöhr *et al.*, 2001a), <sup>11</sup>: (Vesteinsdottir *et al.*, 2010a), <sup>12</sup>: (Stöhr *et al.*, 2001b), <sup>13</sup>: (Nakagawa *et al.*, 2004), <sup>14</sup>: (Schneider und Schlegel, 1977), <sup>15</sup>: (Götz *et al.*, 2002), <sup>16</sup>: (Nakagawa *et al.*, 2003), <sup>17</sup>: (Sizova und Panikov, 2007), <sup>18</sup>: (Wilde, 1962), <sup>19</sup>: (Mergeay *et al.*, 1985), <sup>20</sup>: (Gadkari *et al.*, 1992), <sup>21</sup>: (Aguiar *et al.*, 2004), <sup>22</sup>: (Hetzler *et al.*, 2008), <sup>23</sup>: (Takai *et al.*, 2003), <sup>24</sup>: (Vesteinsdottir *et al.*, 2010b), <sup>25</sup>: (Flores *et al.*, 2008)

## Literaturverzeichnis

- Adams, M. W. (1990): The structure and mechanism of iron-hydrogenases, *Biochim Biophys Acta* (1020 1020), Nr. 2, S. 115-45. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2173950>.
- Adams, M. W. W.; Jin, S. L. C.; Chen, J. S. und Mortenson, L. E. (1986): The Redox Properties and Activation of the F420-Non-Reactive Hydrogenase of *Methanobacterium Formicum*, *Biochim Biophys Acta* (869 869), Nr. 1, S. 37-47. In Eng.
- Aguiar, P.; Beveridge, T. J. und Reysenbach, A. L. (2004): *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores, *Int J Syst Evol Microbiol* (54 54), Nr. Pt 1, S. 33-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742456>.
- Albracht, S. P. (1985): The use of electron-paramagnetic-resonance spectroscopy to establish the properties of nickel and the iron-sulphur cluster in hydrogenase from *Chromatium vinosum*, *Biochem Soc Trans* (13 13), Nr. 3, S. 582-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2993066>.
- Albracht, S. P. (1994): Nickel hydrogenases: in search of the active site, *Biochim Biophys Acta* (1188 1188), Nr. 3, S. 167-204. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7803444>.
- Albracht, S. P. J.; Fontijn, R. D. und van der Zwaan, J. W. (1985): Destruction and reconstitution of the activity of hydrogenase from *Chromatium vinosum*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* (832 832), Nr. 1, S. 89-97. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T21-47RSC3Y-V1/2/a6b707b6acb527dd6acdc69549160865>.
- Albracht, S. P. J.; Van Der Zwaan, J. W. und Fontijn, R. D. (1984): EPR Spectrum at 4, 9 and 35 GHz of hydrogenase from *Chromatium vinosum*. Direct evidence for spin-spin interaction between Ni(III) and the ironsulphur cluster, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (766 766), Nr. 1, S. 245-258. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T1S-47T8RNH-72/2/216915622ed0a4573c87273aeec09dc>.
- Albracht, S. P.; Kalkman, ML. und Slater, EC. (1983): Magnetic interaction of nickel(III) and the iron-sulphur cluster in hydrogenase from *Chromatium vinosum*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (724 724), Nr. 3, S. 309-16.
- Antikainen, N. M. und Martin, S. F. (2005): Altering protein specificity: techniques and applications, *Bioorg Med Chem* (13 13), Nr. 8, S. 2701-16. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781382>.
- Appel, J.; Phunpruch, S.; Steinmüller, K. und Schulz, R. (2000): The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis, *Arch Microbiol* (173 173), Nr. 5-6, S. 333-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10896211>.

- Aragao, D.; Mitchell, E. P.; Frazao, C. F.; Carrondo, M. A. und Lindley, P. F. (2008): Structural and functional relationships in the hybrid cluster protein family: structure of the anaerobically purified hybrid cluster protein from *Desulfovibrio vulgaris* at 1.35 Å resolution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (64 64), Nr. Pt 6, S. 665-74. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18560155>.
- Aragno, M. und Schlegel, H.G. (1992). The mesophilic hydrogen-oxidizing (knallgas) bacteria. In Balows, A.; Trüper, HG. ; Dworkin, M.; Harder, W. und Schleifer, K.-H. (Hrsg.), *The Prokaryotes* (S. 344–384). Springer-Verlag.
- Asso, M.; Guigliarelli, B.; Yagi, T. und Bertrand, P. (1992): EPR and redox properties of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki hydrogenase: comparison with the Ni-Fe enzyme from *Desulfovibrio gigas*, *Biochim Biophys Acta* (1122 1122), Nr. 1, S. 50-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321673>.
- Baar, C.; Eppinger, M.; Raddatz, G.; Simon, J.; Lanz, C.; Klimmek, O.; Nandakumar, R.; Gross, R.; Rosinus, A.; Keller, H.; Jagtap, P.; Linke, B.; Meyer, F.; Lederer, H. und Schuster, S. C. (2003): Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (100 100), Nr. 20, S. 11690-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500908>.
- Baginsky, C.; Palacios, J. M.; Imperial, J.; Ruiz-Argueso, T. und Brito, B. (2004): Molecular and functional characterization of the *Azorhizobium caulinodans* ORS571 hydrogenase gene cluster, *FEMS Microbiol Lett* (237 237), Nr. 2, S. 399-405. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321689>.
- Bagramyan, K. und Trchounian, A. (2003): Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*, *Biochemistry (Mosc)* (68 68), Nr. 11, S. 1159-70. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640957>.
- Bard, A. J. und Faulkner, L. R. (2001): *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2. 2., Wiley VCH.
- Barz, M.; Beimgraben, C.; Staller, T.; Germer, F.; Opitz, F.; Marquardt, C.; Schwarz, C.; Gutekunst, K.; Vanselow, K. H.; Schmitz, R.; LaRoche, J.; Schulz, R. und Appel, J. (2010): Distribution analysis of hydrogenases in surface waters of marine and freshwater environments, *PLoS One* (5 5), Nr. 11, S. e13846. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079771>.
- Beck, B. W.; Xie, Q. und Ichiye, T. (2001): Sequence determination of reduction potentials by cysteinyl hydrogen bonds and peptide dipoles in [4Fe-4S] ferredoxins, *Biophys J* (81 81), Nr. 2, S. 601-13. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463610>.
- Beinert, H.; Kennedy, M. C. und Stout, C. D. (1996): Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein, *Chem Rev* (96 96), Nr. 7, S. 2335-2374. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848830>.
- Berkessel, A. (2001): Activation of dihydrogen without transition metals, *Curr Opin Chem Biol* (5 5), Nr. 5, S. 486-90. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578920>.

## Anhang

- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000): The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res* (28 28), Nr. 1, S. 235-42. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10592235>.
- Bernhard, M. (2000): Maturationswege oligomerer kofaktorhaltiger Redoxenzyme am Beispiel der drei [NiFe] Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha*. , Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Bernhard, M.; Benelli, B.; Hochkoeppler, A.; Zannoni, D. und Friedrich, B. (1997): Functional and structural role of the cytochrome b subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16, *Eur J Biochem* (248 248), Nr. 1, S. 179-86. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310376>.
- Bernhard, M.; Friedrich, B. und Siddiqui, R. A. (2000): *Ralstonia eutropha* TF93 is blocked in tat-mediated protein export, *J Bacteriol* (182 182), Nr. 3, S. 581-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10633089>
- Bernhard, M.; Schwartz, E.; Rietdorf, J. und Friedrich, B. (1996): The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling, *J Bacteriol* (178 178), Nr. 15, S. 4522-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755880>.
- Berrisford, J. M. und Sazanov, L. A. (2009): Structural basis for the mechanism of respiratory complex I, *J Biol Chem* (284 284), Nr. 43, S. 29773-83. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635800>.
- Bian, S. M. und Cowan, J. A. (1999): Protein-bound iron-sulfur centers. Form, function, and assembly, *Coordination Chemistry Reviews* (192 192), S. 1049-1066. In English.
- Bianco, P. und Haladjian, J. (1994): Recent progress in the electrochemistry of c-type cytochromes, *Biochimie* (76 76), Nr. 7, S. 605-13. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7893812>.
- Bleijlevens, B.; van Broekhuizen, F. A.; De Lacey, A. L.; Roseboom, W.; Fernandez, V. M. und Albracht, S. P. (2004): The activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study, *J Biol Inorg Chem* (9 9), Nr. 6, S. 743-52. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15243788>.
- Blokesch, M.; Paschos, A.; Bauer, A.; Reissmann, S.; Drapal, N. und Böck, A. (2004): Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE, *Eur J Biochem* (271 271), Nr. 16, S. 3428-36. In eng. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15291820](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15291820).
- Bonjour, F. und Aragno, M. (1984): *Bacillus Tusciae*, a New Species of Thermoacidophilic, Facultatively Chemolithoautotrophic, Hydrogen Oxidizing Sporeformer from a Geothermal Area, *Arch Microbiol* (139 139), Nr. 4, S. 397-401. In Eng.
- Bonjour, F. und Aragno, M. (1986): Growth of Thermophilic, Obligatorily Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacteria Related to *Hydrogenobacter* with Thiosulfate and Elemental Sulfur as Electron and Energy-Source, *Fems Microbiology Letters* (35 35), Nr. 1, S. 11-15. In English.

- Bowien, B. und Schlegel, H. G. (1981): Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria, *Annu Rev Microbiol* (35 35), S. 405-52. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6271040>.
- Brecht, M.; van Gastel, M.; Buhrke, T.; Friedrich, B. und Lubitz, W. (2003): Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H<sub>2</sub>-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy, *J Am Chem Soc* (125 125), Nr. 43, S. 13075-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14570480>
- Brugna-Guiral, M. ; Tron, P.; Nitschke, W.; Stetter, K.O.; Burlat, B.; Guigliarelli, B.; Bruschi, M. und Giudici-Ortoni, M.T. (2003): [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics., *Extremophiles* (7 7), Nr. 2, S. 145-57. URL: <http://www.springerlink.com/content/tbqt7qprlraa3kbp/>.
- Buhrke, T.; Lenz, O.; Krauss, N. und Friedrich, B. (2005a): Oxygen tolerance of the H<sub>2</sub>-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site, *J Biol Chem* (280 280), Nr. 25, S. 23791-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849358>.
- Buhrke, T.; Lenz, O.; Porthun, A. und Friedrich, B. (2004): The H<sub>2</sub>-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase, *Mol Microbiol* (51 51), Nr. 6, S. 1677-89. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009894>
- Buhrke, T.; Loscher, S.; Lenz, O.; Schlodder, E.; Zebger, I.; Andersen, L. K.; Hildebrandt, P.; Meyer-Klaucke, W.; Dau, H.; Friedrich, B. und Haumann, M. (2005b): Reduction of unusual iron-sulfur clusters in the H<sub>2</sub>-sensing regulatory Ni-Fe hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16, *J Biol Chem* (280 280), Nr. 20, S. 19488-95. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764814>.
- Burgdorf, T.; Lenz, O.; Buhrke, T.; van der Linden, E.; Jones, A. K.; Albracht, S. P. und Friedrich, B. (2005a): [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation, *J Mol Microbiol Biotechnol* (10 10), Nr. 2-4, S. 181-96. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16645314>.
- Burgdorf, T.; Loscher, S.; Liebisch, P.; Van der Linden, E.; Galander, M.; Lenzian, F.; Meyer-Klaucke, W.; Albracht, S. P.; Friedrich, B.; Dau, H. und Haumann, M. (2005b): Structural and oxidation-state changes at its nonstandard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy, *J Am Chem Soc* (127 127), Nr. 2, S. 576-92. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643882>.
- Burgdorf, T.; van der Linden, E.; Bernhard, M.; Yin, Q. Y.; Back, J. W.; Hartog, A. F.; Muijsers, A. O.; de Koster, C. G.; Albracht, S. P. und Friedrich, B. (2005c): The soluble NAD<sup>+</sup>-Reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH, *J Bacteriol* (187 187), Nr. 9, S. 3122-32. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838039>.
- Calzolari, L.; Gorst, C. M.; Zhao, Z. H.; Teng, Q.; Adams, M. W. und La Mar, G. N. (1995): 1H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a clus-

## Anhang

- ter ligand in each of the four redox states, *Biochemistry* (34 34), Nr. 36, S. 11373-84. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7547865>.
- Cammack, R.; Bagyinka, C. und Kovacs, K. L. (1989): Spectroscopic characterization of the nickel and iron-sulphur clusters of hydrogenase from the purple photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. 1. Electron spin resonance spectroscopy, *Eur J Biochem* (182 182), Nr. 2, S. 357-62. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2544424>.
- Cammack, R.; Barber, M. J. und Bray, R. C. (1976): Oxidation-reduction potentials of molybdenum, flavin and iron-sulphur centres in milk xanthine oxidase, *Biochem J* (157 157), Nr. 2, S. 469-78. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/183752>.
- Cammack, R.; Fernandez, V. M. und Schneider, K. (1986a): Activation and active sites of nickel-containing hydrogenases, *Biochimie* (68 68), Nr. 1, S. 85-91. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3015251>
- Cammack, R.; Fernandez, VM. und Schneider, K. (1988). Nickel in Hydrogenases from Sulfate-Reducing, Photosynthetic, and Hydrogen-Oxidizing Bacteria. In Lancaster, JR. (Hrsg.), *The Bioinorganic Chemistry of Nickel* (S. 167-190). VCH Wiley.
- Cammack, R.; Lalla-Maharajh, WV. und Schneider, K. (1982a). EPR Studies of Some Oxygen-Stable Hydrogenases. In Ho, C (Hrsg.), *Electron Transport and Oxygen Utilization* (S. 411-15). Elsevier.
- Cammack, R.; Patil, D.; Aguirre, R. und Hatchikian, E. C. (1982b): Redox Properties of the ESR-Detectable Nickel in Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *FEBS Lett* (142 142), Nr. 2, S. 289-292. In Eng.
- Cammack, R.; Rao, K. K.; Serra, J. und Llama, M. J. (1986b): The redox properties of the iron-sulphur cluster in hydrogenase from *Chromatium vinosum*, strain D, *Biochimie* (68 68), Nr. 1, S. 93-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3015252>.
- Capozzi, F.; Ciurli, S. und Luchinat, C. (1998): Coordination sphere versus protein environment as determinants of electronic and functional properties of iron-sulfur proteins, *Metal Sites in Proteins and Models* (90 90), S. 127-160. In English.
- Chartron, J.; Carroll, K. S.; Shiau, C.; Gao, H.; Leary, J. A.; Bertozzi, C. R. und Stout, C. D. (2006): Substrate recognition, protein dynamics, and iron-sulfur cluster in *Pseudomonas aeruginosa* adenosine 5'-phosphosulfate reductase, *J Mol Biol* (364 364), Nr. 2, S. 152-69. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010373>.
- Chen, J. C. und Mortenson, L. E. (1992): Identification of six open reading frames from a region of the *Azotobacter vinelandii* genome likely involved in dihydrogen metabolism, *Biochim Biophys Acta* (1131 1131), Nr. 2, S. 199-202. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1610901>.
- Chen, K.; Bonagura, C. A.; Tilley, G. J.; McEvoy, J. P.; Jung, Y. S.; Armstrong, F. A.; Stout, C. D. und Burgess, B. K. (2002a): Crystal structures of ferredoxin variants exhibiting large changes in [Fe-S] reduction potential, *Nat Struct Biol* (9 9), Nr. 3, S. 188-92. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11875515>.

- Chen, K.; Jung, Y. S.; Bonagura, C. A.; Tilley, G. J.; Prasad, G. S.; Sridhar, V.; Armstrong, F. A.; Stout, C. D. und Burgess, B. K. (2002b): *Azotobacter vinelandii* ferredoxin I: a sequence and structure comparison approach to alteration of [4Fe-4S]<sup>2+/+</sup> reduction potential, *J Biol Chem* (277 277), Nr. 7, S. 5603-10. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704670>.
- Cheng, V. W.; Ma, E.; Zhao, Z.; Rothery, R. A. und Weiner, J. H. (2006): The iron-sulfur clusters in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase direct electron flow, *J Biol Chem* (281 281), Nr. 37, S. 27662-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864590>.
- Cheng, V. W.; Rothery, R. A.; Bertero, M. G.; Strynadka, N. C. und Weiner, J. H. (2005): Investigation of the environment surrounding iron-sulfur cluster 4 of *Escherichia coli* dimethyl-sulfoxide reductase, *Biochemistry* (44 44), Nr. 22, S. 8068-77. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15924426>.
- Constant, P.; Chowdhury, S. P.; Pratscher, J. und Conrad, R. (2010): *Streptomyces* contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase, *Environ Microbiol* (12 12), Nr. 3, S. 821-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20050876>.
- Coppi, M. V. (2005): The hydrogenases of *Geobacter sulfurreducens*: a comparative genomic perspective, *Microbiology* (151 151), Nr. Pt 4, S. 1239-54. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817791>.
- Coppi, M. V.; O'Neil, R. A. und Lovley, D. R. (2004): Identification of an uptake hydrogenase required for hydrogen-dependent reduction of Fe(III) and other electron acceptors by *Geobacter sulfurreducens*, *J Bacteriol* (186 186), Nr. 10, S. 3022-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126463>.
- Coremans, J. M. C. C.; Vanderzwaan, J. W. und Albracht, S. P. J. (1992): Distinct Redox Behavior of Prosthetic Groups in Ready and Unready Hydrogenase from *Chromatium vinosum*, *Biochim Biophys Acta* (1119 1119), Nr. 2, S. 157-168. In Eng.
- Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B. und Armstrong, F. A. (2008): Enzymatic oxidation of H<sub>2</sub> in atmospheric O<sub>2</sub>: the electrochemistry of energy generation from trace H<sub>2</sub> by aerobic microorganisms, *J Am Chem Soc* (130 130), Nr. 2, S. 424-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088128>
- Cracknell, J. A.; Wait, A. F.; Lenz, O.; Friedrich, B. und Armstrong, F. A. (2009): A kinetic and thermodynamic understanding of O<sub>2</sub> tolerance in [NiFe]-hydrogenases, *Proc Natl Acad Sci U S A*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934053>.
- Cramm, R. (2009): Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16, *J Mol Microbiol Biotechnol* (16 16), Nr. 1-2, S. 38-52. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957861>.
- Dai, S.; Friemann, R.; Glauser, D. A.; Bourquin, F.; Manieri, W.; Schurmann, P. und Eklund, H. (2007): Structural snapshots along the reaction pathway of ferredoxin-thioredoxin reductase, *Nature* (448 448), Nr. 7149, S. 92-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611542>.

## Anhang

- De Lacey, AL. ; Fernández, VM. ; Rousset, M. und Cammack, R. (2007): Activation and Inactivation of Hydrogenase Function and the Catalytic Cycle: Spectroelectrochemical Studies, *Chem Rev*, Nr. Pre-Webrelease.
- Deckert, G.; Warren, P. V.; Gaasterland, T.; Young, W. G.; Lenox, A. L.; Graham, D. E.; Overbeek, R.; Snead, M. A.; Keller, M.; Aujay, M.; Huber, R.; Feldman, R. A.; Short, J. M.; Olsen, G. J. und Swanson, R. V. (1998): The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Nature* (392 392), Nr. 6674, S. 353-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537320>.
- Dementin, S.; Belle, V.; Bertrand, P.; Guigliarelli, B.; Adryanczyk-Perrier, G.; De Lacey, AL.; Fernandez, VM.; Rousset, M. und Léger, C. (2006): Changing the Ligation of the Distal [4Fe4S] Cluster in NiFe Hydrogenase Impairs Inter- and Intramolecular Electron Transfers, *J Am Chem Soc* (128 128), Nr. 15, S. 5209 -5218. URL: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/jacsat/2006/128/i15/abs/ja060233b.html>.
- Dementin, S.; Leroux, F.; Cournac, L.; de Lacey, A. L.; Volbeda, A.; Leger, C.; Burlat, B.; Martinez, N.; Champ, S.; Martin, L.; Sanganas, O.; Haumann, M.; Fernandez, V. M.; Guigliarelli, B.; Fontecilla-Camps, J. C. und Rousset, M. (2009): Introduction of methionines in the gas channel makes [NiFe] hydrogenase aero-tolerant, *J Am Chem Soc* (131 131), Nr. 29, S. 10156-64. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19580279>.
- Denke, E.; Merbitz-Zahradnik, T.; Hatzfeld, O. M.; Snyder, C. H.; Link, T. A. und Trumppower, B. L. (1998): Alteration of the midpoint potential and catalytic activity of the rieske iron-sulfur protein by changes of amino acids forming hydrogen bonds to the iron-sulfur cluster, *J Biol Chem* (273 273), Nr. 15, S. 9085-93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535897>.
- Desper, R. und Gascuel, O. (2004): Theoretical foundation of the balanced minimum evolution method of phylogenetic inference and its relationship to weighted least-squares tree fitting, *Mol Biol Evol* (21 21), Nr. 3, S. 587-98. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14694080>.
- Dey, A.; Jenney, F. E., Jr.; Adams, M. W.; Babini, E.; Takahashi, Y.; Fukuyama, K.; Hodgson, K. O.; Hedman, B. und Solomon, E. I. (2007): Solvent tuning of electrochemical potentials in the active sites of HiPIP versus ferredoxin, *Science* (318 318), Nr. 5855, S. 1464-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048692>.
- Dobbek, H.; Svetlitchnyi, V.; Gremer, L.; Huber, R. und Meyer, O. (2001): Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster, *Science* (293 293), Nr. 5533, S. 1281-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509720>.
- Drobner, E.; Huber, H. und Stetter, K. O. (1990): *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer, *Appl Environ Microbiol* (56 56), Nr. 9, S. 2922-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2275538>.
- Du, L.; Tibelius, K. H.; Souza, E. M.; Garg, R. P. und Yates, M. G. (1994): Sequences, organization and analysis of the hupZMNOQRTV genes from the *Azotobacter chroococcum* hydrogenase gene cluster, *J Mol Biol* (243 243), Nr. 4, S. 549-57. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7966281>.

- Duderstadt, R. E.; Brereton, P. S.; Adams, M. W. und Johnson, M. K. (1999): A pure  $S = 3/2$   $[4Fe4S]^+$  cluster in the A33Y variant of *Pyrococcus furiosus* ferredoxin, *FEBS Lett* (454 454), Nr. 1-2, S. 21-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413088>.
- Dutton, P. L. (1978): Redox potentiometry: determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems, *Methods Enzymol* (54 54), S. 411-35. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/732578>.
- Eidsness, M. K.; Burden, A. E.; Richie, K. A.; Kurtz, D. M., Jr.; Scott, R. A.; Smith, E. T.; Ichiye, T.; Beard, B.; Min, T. und Kang, C. (1999): Modulation of the redox potential of the  $[Fe(SCys)(4)]$  site in rubredoxin by the orientation of a peptide dipole, *Biochemistry* (38 38), Nr. 45, S. 14803-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555962>.
- Einsle, O.; Tezcan, F. A.; Andrade, S. L.; Schmid, B.; Yoshida, M.; Howard, J. B. und Rees, D. C. (2002): Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor, *Science* (297 297), Nr. 5587, S. 1696-700. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215645>.
- Fernandez, V. M.; Aguirre, R. und Hatchikian, E. C. (1984): Reductive Activation and Redox Properties of Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Biochim Biophys Acta* (790 790), Nr. 1, S. 1-7. In Eng.
- Fernandez, V. M.; Rao, K. K.; Fernandez, M. A. und Cammack, R. (1986): Activation and deactivation of the membrane-bound hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*, Norway strain, *Biochimie* (68 68), Nr. 1, S. 43-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3015248>.
- Flores, G. E.; Liu, Y.; Ferrera, I.; Beveridge, T. J. und Reysenbach, A. L. (2008): *Sulfurihydrogenibium kristjanssonii* sp. nov., a hydrogen- and sulfur-oxidizing thermophile isolated from a terrestrial Icelandic hot spring, *Int J Syst Evol Microbiol* (58 58), Nr. Pt 5, S. 1153-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18450705>.
- Foerster, S.; van Gastel, M.; Brecht, M. und Lubitz, W. (2005): An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni-C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F hydrogenase, *J Biol Inorg Chem* (10 10), Nr. 1, S. 51-62. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611882>.
- Fontecilla-Camps, J. C.; Volbeda, A.; Cavazza, C. und Nicolet, Y. (2007): Structure/function relationships of  $[NiFe]$ - and  $[FeFe]$ -hydrogenases, *Chem Rev* (107 107), Nr. 10, S. 4273-4303. In Eng.
- Fournier, M.; Dermoun, Z.; Durand, M. C. und Dolla, A. (2004): A new function of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough  $[Fe]$  hydrogenase in the protection against oxidative stress, *J Biol Chem* (279 279), Nr. 3, S. 1787-93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14594815>.
- Franco, R.; Moura, I.; LeGall, J.; Peck, H. D., Jr.; Huynh, B. H. und Moura, J. J. (1993): Characterization of *D. desulfuricans* (ATCC 27774)  $[NiFe]$  hydrogenase EPR and redox properties of the native and the dihydrogen reacted states, *Biochim Biophys Acta* (1144 1144), Nr. 3, S. 302-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8399280>.

## Anhang

- Friedrich, B.; Buhrke, T.; Burgdorf, T. und Lenz, O. (2005): A hydrogen-sensing multiprotein complex controls aerobic hydrogen metabolism in *Ralstonia eutropha*, *Biochem Soc Trans* (33 33), Nr. Pt 1, S. 97-101. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15667276>.
- Friedrich, B.; Fritsch, J. und Lenz, O. (2011): Oxygen-tolerant hydrogenases in hydrogen-based technologies, *Curr Opin Biotechnol*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334190>.
- Friedrich, B.; Heine, E.; Finck, A. und Friedrich, C. G. (1981a): Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*, *J Bacteriol* (145 145), Nr. 3, S. 1144-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6782086>.
- Friedrich, B.; Hogrefe, C. und Schlegel, H. G. (1981b): Naturally occurring genetic transfer of hydrogen-oxidizing ability between strains of *Alcaligenes eutrophus*, *J Bacteriol* (147 147), Nr. 1, S. 198-205. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6787025>.
- Friedrich, C. G.; Friedrich, B. und Bowien, B. (1981c): Formation of Enzymes of Autotrophic Metabolism during Heterotrophic Growth of *Alcaligenes-Eutrophus*, *Journal of General Microbiology* (122 122), Nr. Jan, S. 69-78. In English.
- Fritsch, J.; Lenz, O. und Friedrich, B. (2011): The maturation factors HoxR and HoxT contribute to oxygen tolerance of membrane-bound [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha* H16, *J Bacteriol*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441514>.
- Fuhrmann, S.; Ferner, M.; Jeffke, T.; Henne, A.; Gottschalk, G. und Meyer, O. (2003): Complete nucleotide sequence of the circular megaplasmid pHCG3 of *Oligotropha carboxidovorans*: function in the chemolithoautotrophic utilization of CO, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, *Gene* (322 322), S. 67-75. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644498>.
- Fujinaga, J.; Gaillard, J. und Meyer, J. (1993): Mutated forms of a [2Fe-2S] ferredoxin with serine ligands to the iron-sulfur cluster, *Biochem Biophys Res Commun* (194 194), Nr. 1, S. 104-11. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392833>.
- Gabdoulline, R. R.; Stein, M. und Wade, R. C. (2007): qPIPSA: relating enzymatic kinetic parameters and interaction fields, *BMC Bioinformatics* (8 8), S. 373. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919319>.
- Gadkari, D.; Morsdorf, G. und Meyer, O. (1992): Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: identification of an unusual N<sub>2</sub>-fixing system, *J Bacteriol* (174 174), Nr. 21, S. 6840-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400234>.
- Garcin, E.; Vernede, X.; Hatchikian, E. C.; Volbeda, A.; Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. C. (1999): The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center, *Structure* (7 7), Nr. 5, S. 557-66. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10378275>.
- Gare, D.; Boyd, J. und Connolly, B. (2004): Developmental regulation and secretion of nematode-specific cysteine-glycine domain proteins in *Trichinella spiralis*, *Mol Biochem Parasitol* (134 134), Nr. 2, S. 257-66. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003845>.

- Ghirardi, M. L.; Dubini, A.; Yu, J. und Maness, P. C. (2009): Photobiological hydrogen-producing systems, *Chem Soc Rev* (38 38), Nr. 1, S. 52-61. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088964>.
- Goldet, G.; Wait, A. F.; Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B. und Armstrong, F. A. (2008): Hydrogen production under aerobic conditions by membrane-bound hydrogenases from *Ralstonia* species, *J Am Chem Soc* (130 130), Nr. 33, S. 11106-13. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18661984>.
- Götz, D.; Banta, A.; Beveridge, T. J.; Rushdi, A. I.; Simoneit, B. R. und Reysenbach, A. L. (2002): *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents, *Int J Syst Evol Microbiol* (52 52), Nr. Pt 4, S. 1349-59. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148650>.
- Grimme, R. A.; Lubner, C. E. und Golbeck, J. H. (2009): Maximizing H<sub>2</sub> production in Photosystem I/dithiol molecular wire/platinum nanoparticle bioconjugates, *Dalton Trans*, Nr. 45, S. 10106-13. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19904438>.
- Grishin, N. V. (1995): Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites, *J Mol Evol* (41 41), Nr. 5, S. 675-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18345592>.
- Gross, R.; Simon, J.; Theis, F. und Kröger, A. (1998): Two membrane anchors of *Wolinella succinogenes* hydrogenase and their function in fumarate and polysulfide respiration, *Arch Microbiol* (170 170), Nr. 1, S. 50-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639603>.
- Grüniger, H. R.; Sulzberger, B. und Calzaferri, G. (1978): Clark-ähnlicher Wasserstoffdetektor, *Helvetica Chimica Acta* (61 61), Nr. 7, S. 2375-2380. In Deu.
- Guigliarelli, B.; More, C.; Fournel, A.; Asso, M.; Hatchikian, E. C.; Williams, R.; Cammack, R. und Bertrand, P. (1995): Structural organization of the Ni and (4Fe-4S) centers in the active form of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Analysis of the magnetic interactions by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Biochemistry* (34 34), Nr. 14, S. 4781-90. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7718585>.
- Guiral, M. ; Aubert, C. und Giudici-Ortoni, M.T. (2005a): Hydrogen metabolism in the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*., *Biochem Soc Trans.* (33 33), Nr. Pt 1, S. 22-24. URL: <http://www.biochemsoctrans.org/bst/033/0022/bst0330022.htm>.
- Guiral, M.; Tron, P.; Aubert, C.; Gloter, A.; Iobbi-Nivol, C. und Giudici-Ortoni, M.T. (2005b): A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*., *J Biol Chem.* (280 280), Nr. 51, S. 42004-15. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236714>.
- Guiral, M.; Tron, P.; Belle, V.; Aubert, C.; Leger, C.; Guigliarelli, B. und Giudici-Ortoni, M. T. (2006): Hyperthermostable and oxygen resistant hydrogenases from a hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: Physicochemical properties, *International Journal of Hydrogen Energy* (31 31), Nr. 11, S. 1424-1431. In Eng.

## Anhang

- Gurrath, M. und Friedrich, T. (2004): Adjacent cysteines are capable of ligating the same tetranuclear iron-sulfur cluster, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (56 56), Nr. 3, S. 556 - 563. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/108565453>.
- Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl. Acids Symp. Ser.* (41 41), S. 95-98.
- Hamann, N. (2007): Identifizierung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit von Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea, Dissertation, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität, Marburg. URL: <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2007/0677/pdf/dnh.pdf>.
- Hamann, N.; Bill, E.; Shokes, J. E.; Scott, R. A.; Bennati, M. und Hedderich, R. (2009): The CCG-domain-containing subunit SdhE of succinate:quinone oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus* P2 binds a [4Fe-4S] cluster, *J Biol Inorg Chem* (14 14), Nr. 3, S. 457-70. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19085017>.
- Hamann, N.; Mander, G. J.; Shokes, J. E.; Scott, R. A.; Bennati, M. und Hedderich, R. (2007): A cysteine-rich CCG domain contains a novel [4Fe-4S] cluster binding motif as deduced from studies with subunit B of heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis*, *Biochemistry* (46 46), Nr. 44, S. 12875-85. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17929940>.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* (166 166), Nr. 4, S. 557-80. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>.
- Happe, R. P.; Roseboom, W.; Egert, G.; Friedrich, C. G.; Massanz, C.; Friedrich, B. und Albracht, S. P. (2000): Unusual FTIR and EPR properties of the H<sub>2</sub>-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*, *FEBS Lett* (466 466), Nr. 2-3, S. 259-63. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10682839>.
- Hemschemeier, A.; Melis, A. und Happe, T. (2009): Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae, *Photosynth Res* (102 102), Nr. 2-3, S. 523-40. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19291418>.
- Hendrickson, E. L. und Leigh, J. A. (2008): Roles of coenzyme F420-reducing hydrogenases and hydrogen- and F420-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases in reduction of F420 and production of hydrogen during methanogenesis, *J Bacteriol* (190 190), Nr. 14, S. 4818-21. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487331>.
- Hetzer, A.; McDonald, I. R. und Morgan, H. W. (2008): *Venenivibrio stagnispumantis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium isolated from Champagne Pool, Waiotapu, New Zealand, *Int J Syst Evol Microbiol* (58 58), Nr. Pt 2, S. 398-403. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218938>.
- Higuchi, Y.; Yagi, T. und Yasuoka, N. (1997): Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis, *Structure* (5 5), Nr. 12, S. 1671-80. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438867>.
- Horch, M.; Lauterbach, L.; Saggi, M.; Hildebrandt, P.; Lenzian, F.; Bittl, R.; Lenz, O. und Zebger, I. (2010): Probing the active site of an O<sub>2</sub>-tolerant NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-

- hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by in situ EPR and FTIR spectroscopy, *Angew Chem Int Ed Engl* (49 49), Nr. 43, S. 8026-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20857465>.
- Horner, D. S.; Heil, B.; Happe, T. und Embley, T. M. (2002): Iron hydrogenases--ancient enzymes in modern eukaryotes, *Trends Biochem Sci* (27 27), Nr. 3, S. 148-53. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893512>.
- Hou, S.; Makarova, K. S.; Saw, J. H.; Senin, P.; Ly, B. V.; Zhou, Z.; Ren, Y.; Wang, J.; Galperin, M. Y.; Omelchenko, M. V.; Wolf, Y. I.; Yutin, N.; Koonin, E. V.; Stott, M. B.; Mountain, B. W.; Crowe, M. A.; Smirnova, A. V.; Dunfield, P. F.; Feng, L.; Wang, L. und Alam, M. (2008): Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylococcus thermophilus*, a representative of the bacterial phylum *Verrucomicrobia*, *Biol Direct* (3 3), S. 26. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593465>.
- Hu, Y.; Fay, A. W.; Lee, C. C.; Yoshizawa, J. und Ribbe, M. W. (2008): Assembly of nitrogenase MoFe protein, *Biochemistry* (47 47), Nr. 13, S. 3973-81. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314963>.
- Huson, D. H.; Richter, D. C.; Rausch, C.; DeZulian, T.; Franz, M. und Rupp, R. (2007): Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees, *BMC Bioinformatics* (8 8), S. 460. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034891>.
- Ishii, M.; Takishita, S.; Iwasaki, T.; Peerapornpisal, Y.; Yoshino, J.; Kodama, T. und Igarashi, Y. (2000): Purification and characterization of membrane-bound hydrogenase from *Hydrogenobacter thermophilus* strain TK-6, an obligately autotrophic, thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium, *Biosci Biotechnol Biochem* (64 64), Nr. 3, S. 492-502. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803945>.
- Jackel, C.; Kast, P. und Hilvert, D. (2008): Protein design by directed evolution, *Annu Rev Biophys* (37 37), S. 153-73. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573077>.
- Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Minamisawa, K.; Uchiumi, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Idesawa, K.; Iriguchi, M.; Kawashima, K.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Shimpo, S.; Tsuruoka, H.; Wada, T.; Yamada, M. und Tabata, S. (2002): Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *DNA Res* (9 9), Nr. 6, S. 189-97. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597275>.
- King, P. W.; Posewitz, M. C.; Ghirardi, M. L. und Seibert, M. (2006): Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system, *J Bacteriol* (188 188), Nr. 6, S. 2163-72. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16513746>.
- Kleihues, L.; Lenz, O.; Bernhard, M.; Buhrke, T. und Friedrich, B. (2000): The H<sub>2</sub> sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases, *J Bacteriol* (182 182), Nr. 10, S. 2716-24. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781538>.
- Knüttel, K. (1988): Molekulare und immunologische Eigenschaften von membrangebundenen Hydrogenasen aus Wasserstoffbakterien sowie Charakterisierung ihrer Metallzentren durch Elektronen-Spin, Resonanz- und Mössbauerspektroskopie, Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

## Anhang

- Knüttel, K.; Schneider, K.; Ereken, A.; Plass, W.; Müller, A.; Bill, E. und Trautwein, AX. (1994): Redox Properties of the Metal Centres in the Membrane-Bound Hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* CH34, *Bull Polish Acad Sci Chem* (42 42), Nr. 4, S. 495-511.
- Koay, M. S.; Antonkine, M. L.; Gartner, W. und Lubitz, W. (2008): Modelling low-potential [4Fe4S] clusters in proteins, *Chem Biodivers* (5 5), Nr. 8, S. 1571-87. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18729093>.
- Kortlüke, C. und Friedrich, B. (1992): Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16, *J Bacteriol* (174 174), Nr. 19, S. 6290-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400179>.
- Kortlüke, C.; Horstmann, K.; Schwartz, E.; Rohde, M.; Binsack, R. und Friedrich, B. (1992): A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16, *J Bacteriol* (174 174), Nr. 19, S. 6277-89. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383192>.
- Kovacs, KL.; Kovacs, AT.; Maroti, G.; Meszaros, LS.; Balogh, J.; Latinovics, D.; Fulop, A.; David, R.; Doroghazi, E. und Rakhely, G. (2005): The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*., *Biochem Soc Trans.* (33 33), S. 61-63. URL: <http://www.biochemsoctrans.org/bst/033/0061/bst0330061.htm>.
- Kowal, A. T.; Werth, M. T.; Manodori, A.; Cecchini, G.; Schroder, I.; Gunsalus, R. P. und Johnson, M. K. (1995): Effect of cysteine to serine mutations on the properties of the [4Fe-4S] center in *Escherichia coli* fumarate reductase, *Biochemistry* (34 34), Nr. 38, S. 12284-93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7547971>.
- Krasna, AI. und Rittenberg, D. (1954): The Mechanism of Action of the Enzyme Hydrogenase, *J Am Chem Soc* (76 76), Nr. 11, S. 3015-20. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01640a045>.
- Krassen, H.; Schwarze, A.; Friedrich, B.; Ataka, K.; Lenz, O. und Heberle, J. (2009): Photosynthetic hydrogen production by a hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase, *ACS Nano* (3 3), Nr. 12, S. 4055-61. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19947646>.
- Kryukov, V. R.; Savelyeva, N. D. und Pusheva, M. A. (1983): *Calderobacterium hydrogenophilum* nov.gen. nov.sp., an extreme thermophilic hydrogen bacterium, and its hydrogenase activity., *MIKROBIOLOGIYA* (52 52), Nr. 5, S. 781-788.
- Kyhse-Andersen, J. (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* (10 10), Nr. 3-4, S. 203-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6530509>.
- Kyritsis, P.; Hatzfeld, O. M.; Link, T. A. und Moulis, J. M. (1998): The two [4Fe-4S] clusters in *Chromatium vinosum* ferredoxin have largely different reduction potentials. Structural origin and functional consequences, *J Biol Chem* (273 273), Nr. 25, S. 15404-11. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624123>.

- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (227 227), Nr. 5259, S. 680-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>.
- Lamle, S. E.; Albracht, S. P. und Armstrong, F. A. (2004): Electrochemical potential-step investigations of the aerobic interconversions of [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*: insights into the puzzling difference between unready and ready oxidized inactive states, *J Am Chem Soc* (126 126), Nr. 45, S. 14899-909. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15535717>.
- Lee, H. S.; Vermaas, W. F. und Rittmann, B. E. (2010): Biological hydrogen production: prospects and challenges, *Trends Biotechnol* (28 28), Nr. 5, S. 262-71. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189666>.
- Léger, C.; Dementin, S.; Bertrand, P.; Rousset, M. und Guigliarelli, B. (2004): Inhibition and aerobic inactivation kinetics of *Desulfovibrio fructosovorans* NiFe hydrogenase studied by protein film voltammetry, *J Am Chem Soc* (126 126), Nr. 38, S. 12162-72. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15382953>.
- Lenz, O. und Friedrich, B. (1998): A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (95 95), Nr. 21, S. 12474-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9770510>.
- Lenz, O.; Gleiche, A.; Strack, A. und Friedrich, B. (2005): Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase, *J Bacteriol* (187 187), Nr. 18, S. 6590-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16159796>.
- Lenz, O.; Ludwig, M.; Schubert, T.; Bürstel, I.; Ganskow, S.; Goris, T.; Schwarze, A. und Friedrich, B. (2010): H<sub>2</sub> conversion in the presence of O<sub>2</sub> as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*., *ChemPhysChem* (11 11), Nr. 6, S. 1107-1119. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200901002>.
- Lenz, O.; Schwartz, E.; Dervede, J.; Eitinger, M. und Friedrich, B. (1994): The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation, *J Bacteriol* (176 176), Nr. 14, S. 4385-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021224>
- Lenz, O.; Strack, A.; Tran-Betcke, A. und Friedrich, B. (1997): A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species, *J Bacteriol* (179 179), Nr. 5, S. 1655-63. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9045826>.
- Leroux, F.; Dementin, S.; Burlat, B.; Cournac, L.; Volbeda, A.; Champ, S.; Martin, L.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Fontecilla-Camps, J.; Rousset, M. und Leger, C. (2008): Experimental approaches to kinetics of gas diffusion in hydrogenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* (105 105), Nr. 32, S. 11188-93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18685111>.
- Lieb Gott, P. P.; de Lacey, A. L.; Burlat, B.; Cournac, L.; Richaud, P.; Brugna, M.; Fernandez, V. M.; Guigliarelli, B.; Rousset, M.; Leger, C. und Dementin, S. (2010a): Original Design of an Oxygen-Tolerant [NiFe] Hydrogenase: Major Effect of a Valine-to-Cysteine Mutation near the Active Site, *J Am Chem Soc*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175174>.

## Anhang

- Liebrott, P. P.; Leroux, F.; Burlat, B.; Dementin, S.; Baffert, C.; Lautier, T.; Fourmond, V.; Ceccaldi, P.; Cavazza, C.; Meynial-Salles, I.; Soucaille, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Rousset, M. und Leger, C. (2010b): Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase, *Nat Chem Biol* (6 6), Nr. 1, S. 63-70. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966788>.
- Lissolo, T.; Pulvin, S. und Thomas, D. (1984): Reactivation of the hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* by hydrogen. Influence of redox potential, *J Biol Chem* (259 259), Nr. 19, S. 11725-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6384213>.
- Long, M.; Liu, J.; Chen, Z.; Bleijlevens, B.; Roseboom, W. und Albracht, S. P. (2007): Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* and some EPR and IR properties of the hydrogenase module., *J Biol Inorg Chem* (12 12), Nr. 1, S. 62-78. URL: <http://www.springerlink.com/content/t217701482584951/>.
- Lorenz, B. (1989): Immunologische Verwandtschaft von isolierten Untereinheiten membrangebundener Hydrogenasen und spektroskopische Metallzentren-Charakterisierung der Hydrogenasen von *Alcaligenes eutrophus* H16 und *Alcaligenes eutrophus* CH34. , Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlicher Fachbereich Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
- Lubitz, W.; Reijerse, E. und van Gestel, M. (2007): [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques, *Chem Rev* (107 107), Nr. 10, S. 4331-65. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17845059>.
- Lubner, C. E.; Grimme, R.; Bryant, D. A. und Golbeck, J. H. (2010a): Wiring photosystem I for direct solar hydrogen production, *Biochemistry* (49 49), Nr. 3, S. 404-14. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19947649>.
- Lubner, C. E.; Knorz, P.; Silva, P. J.; Vincent, K. A.; Happe, T.; Bryant, D. A. und Golbeck, J. H. (2010b): Wiring an [FeFe]-hydrogenase with photosystem I for light-induced hydrogen production, *Biochemistry* (49 49), Nr. 48, S. 10264-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21058656>.
- Ludwig, M. (2008): The oxygen-tolerant, membrane-bound hydrogenase of *Ralstonia* species: variations in the active site structure, the Fe-S cluster composition and maturation., Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt Universität zu Berlin, Berlin.
- Ludwig, M.; Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. und Lenz, O. (2009a): Oxygen-tolerant H<sub>2</sub> oxidation by membrane-bound [NiFe] hydrogenases of *ralstonia* species. Coping with low level H<sub>2</sub> in air, *J Biol Chem* (284 284), Nr. 1, S. 465-77. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990688>.
- Ludwig, M.; Schubert, T.; Zebger, I.; Wisitruangsakul, N.; Saggi, M.; Strack, A.; Lenz, O.; Hildebrandt, P. und Friedrich, B. (2009b): Concerted action of two novel auxiliary proteins in assembly of the active site in a membrane-bound [NiFe] hydrogenase, *J Biol Chem* (284 284), Nr. 4, S. 2159-68. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017638>.
- Lyon, E. J.; Shima, S.; Buurman, G.; Chowdhuri, S.; Batschauer, A.; Steinbach, K. und Thauer, R. K. (2004): UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from me-

- thanogenic archaea - The enzyme contains functional iron after all, *Eur J Biochem* (271 271), Nr. 1, S. 195-204. In Eng.
- Ma, K.; Schicho, R. N.; Kelly, R. M. und Adams, M. W. (1993): Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor, *Proc Natl Acad Sci U S A* (90 90), Nr. 11, S. 5341-4. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389482>.
- Macedo, S.; Aragao, D.; Mitchell, E. P. und Lindley, P. (2003): Structure of the hybrid cluster protein (HCP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 containing molecules in the oxidized and reduced states, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (59 59), Nr. Pt 12, S. 2065-71. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14646063>.
- Macedo, S.; Mitchell, E. P.; Romao, C. V.; Cooper, S. J.; Coelho, R.; Liu, M. Y.; Xavier, A. V.; LeGall, J.; Bailey, S.; Garner, D. C.; Hagen, W. R.; Teixeira, M.; Carrondo, M. A. und Lindley, P. (2002): Hybrid cluster proteins (HCPs) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 and *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): X-ray structures at 1.25 Å resolution using synchrotron radiation, *J Biol Inorg Chem* (7 7), Nr. 4-5, S. 514-25. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11941509>.
- Maher, M. J.; Xiao, Z.; Wilce, M. C.; Guss, J. M. und Wedd, A. G. (1999): Rubredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Structures of G10A, G43A and G10VG43A mutant proteins. Mutation of conserved glycine 10 to valine causes the 9-10 peptide link to invert, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (55 55), Nr. Pt 5, S. 962-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216292>.
- Maroti, G.; Fodor, B. D.; Rakhely, G.; Kovacs, A. T.; Arvani, S. und Kovacs, K. L. (2003): Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*, *Eur J Biochem* (270 270), Nr. 10, S. 2218-27. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752441>.
- Massanz, C. (2000): Nucleotid-Coenzym-reduzierende Hydrogenasen: Biologische Systeme zur wasserstoffabhängigen Energieumwandlung, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Matias, P. M.; Soares, C. M.; Saraiva, L. M.; Coelho, R.; Morais, J.; Le Gall, J. und Carrondo, M. A. (2001): [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modeling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3, *J Biol Inorg Chem* (6 6), Nr. 1, S. 63-81. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11191224>.
- Matos, C. F.; Robinson, C. und Di Cola, A. (2008): The Tat system proofreads FeS protein substrates and directly initiates the disposal of rejected molecules, *EMBO J* (27 27), Nr. 15, S. 2055-63. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615097>.
- Mehari, T.; Qiao, F.; Scott, M. P.; Nellis, D. F.; Zhao, J.; Bryant, D. A. und Golbeck, J. H. (1995): Modified ligands to FA and FB in photosystem I. I. Structural constraints for the formation of iron-sulfur clusters in free and rebound PsaC, *J Biol Chem* (270 270), Nr. 47, S. 28108-17. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7499299>.

## Anhang

- Melis, A. (2007): Photosynthetic H<sub>2</sub> metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae), *Planta* (226 226), Nr. 5, S. 1075-86. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721788>.
- Mergeay, M.; Nies, D.; Schlegel, H. G.; Gerits, J.; Charles, P. und Van Gijsegem, F. (1985): *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals, *J Bacteriol* (162 162), Nr. 1, S. 328-34. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3884593>.
- Meuer, J.; Bartoschek, S.; Koch, J.; Kunkel, A. und Hedderich, R. (1999): Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*, *Eur J Biochem* (265 265), Nr. 1, S. 325-35. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491189>.
- Meyer, J. (2007): [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective, *Cell Mol Life Sci* (64 64), Nr. 9, S. 1063-84. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17353991>.
- Meyer, J. (2008): Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution, *J Biol Inorg Chem* (13 13), Nr. 2, S. 157-70. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992543>.
- Montet, Y.; Amara, P.; Volbeda, A.; Vernede, X.; Hatchikian, E. C.; Field, M. J.; Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. C. (1997): Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics, *Nat Struct Biol* (4 4), Nr. 7, S. 523-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228943>.
- Morozov, S. V.; Voronin, O. G.; Karyakina, E. E.; Zorin, N. A.; Cosnier, S. und Karyakin, A. A. (2006): Tolerance to oxygen of hydrogen enzyme electrodes, *Electrochemistry Communications* (8 8), Nr. 5, S. 851-854. In Eng.
- Nakagawa, S.; Nakamura, S.; Inagaki, F.; Takai, K.; Shirai, N. und Sako, Y. (2004): *Hydrogenivirga caldilitoris* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing bacterium from a coastal hydrothermal field, *Int J Syst Evol Microbiol* (54 54), Nr. Pt 6, S. 2079-84. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545438>.
- Nakagawa, S.; Takai, K.; Horikoshi, K. und Sako, Y. (2003): *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney, *Int J Syst Evol Microbiol* (53 53), Nr. Pt 3, S. 863-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807214>.
- Newie, J (2010): Einfluss der Aminosäure-Umgebung der Eisen-Schwefel-Cluster auf die O<sub>2</sub>-Toleranz der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* H16, Bachelorarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt Universität zu Berlin.
- Nicolet, Y.; Cavazza, C. und Fontecilla-Camps, J. C. (2002): Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution, *J Inorg Biochem* (91 91), Nr. 1, S. 1-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121756>.
- Niu, S. und Hall, N. B. (2001): Modeling the active sites in metalloenzymes 5. The heterolytic bond cleavage of H<sub>2</sub> in the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas* by a nucleophilic addition mechanism, *Inorganic Chemistry* (40 40), Nr. 24, S. 6201-6203. In English. URL: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ic0107274>.

- Ogata, H.; Hirota, S.; Nakahara, A.; Komori, H.; Shibata, N.; Kato, T.; Kano, K. und Higuchi, Y. (2005): Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state, *Structure* (13 13), Nr. 11, S. 1635-42. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271886>.
- Ogata, H.; Kellers, P. und Lubitz, W. (2010): The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum*: Characterization of the oxidized enzyme (Ni-A state), *J Mol Biol.* In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673834>.
- Ogata, H.; Lubitz, W. und Higuchi, Y. (2009): [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism, *Dalton Trans*, Nr. 37, S. 7577-87. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759926>.
- Ohtsuki, T.; Okazaki, T.; Endo, Y.; Kita, Y.; Shimosaka, M. und Okazaki, M. (1995): Cloning and sequencing of the membrane-bound hydrogenase-encoding genes (hupS and hupL) from *Pseudomonas hydrogenovora*, *Gene* (166 166), Nr. 1, S. 89-93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529899>.
- Oliveira, T. F.; Vonrhein, C.; Matias, P. M.; Venceslau, S. S.; Pereira, I. A. und Archer, M. (2008): The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration, *J Biol Chem* (283 283), Nr. 49, S. 34141-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829451>.
- Palagyi-Meszaros, L. S.; Maroti, J.; Latinovics, D.; Balogh, T.; Klement, E.; Medzihradzky, K. F.; Rakhely, G. und Kovacs, K. L. (2009): Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS, *FEBS J* (276 276), Nr. 1, S. 164-74. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019079>.
- Pandelia, M. (2009): [NiFe] hydrogenases from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F and *Aquifex aeolicus* studied by FTIR, EPR and electrochemical techniques: Redox intermediates, O<sub>2</sub>/CO sensitivity and light-induced effects, Dissertation, Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften, TU Berlin, Berlin.
- Pandelia, M. E.; Fourmond, V.; Tron-Infossi, P.; Lojou, E.; Bertrand, P.; Leger, C.; Giudici-Ortoni, M. T. und Lubitz, W. (2010a): Membrane-Bound Hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: Enzyme Activation, Redox Intermediates and Oxygen Tolerance, *J Am Chem Soc.* In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20441192>.
- Pandelia, M. E.; Nitschke, W.; Infossi, P.; Giudici-Ortoni, M. T.; Bill, E. und Lubitz, W. (2011): Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21444783>.
- Pandelia, M. E.; Ogata, H. und Lubitz, W. (2010b): Intermediates in the catalytic cycle of [NiFe] hydrogenase: functional spectroscopy of the active site, *ChemPhysChem* (11 11), Nr. 6, S. 1127-40. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301175>.
- Pardo, A.; De Lacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Fan, H. J.; Fan, Y. B. und Hall, M. B. (2006): Density functional study of the catalytic cycle of nickel-iron [NiFe] hydrogenases and the involvement of high-spin nickel(II), *J Biol Inorg Chem* (11 11), Nr. 3, S. 286-306. In Eng.

## Anhang

- Pardo, A.; De Lacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Fan, Y. und Hall, M.B. (2007): Characterization of the active site of catalytically inactive forms of [NiFe] hydrogenases by density functional theory., *J Biol Inorg Chem*. URL: <http://www.springerlink.com/link.asp?id=p54r556131508u07>.
- Pavlov, M.; Siegbahn, P. E. M.; Blomberg, M. R. A. und Crabtree, R. H. (1998): Mechanism of H-H activation by nickel-iron hydrogenase, *J Am Chem Soc* (120 120), Nr. 3, S. 548-555. In English. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja971681%2B>.
- Pershad, H. R.; Duff, J. L.; Heering, H. A.; Duin, E. C.; Albracht, S. P. und Armstrong, F. A. (1999): Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub> value, *Biochemistry* (38 38), Nr. 28, S. 8992-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413472>.
- Peters, J. W.; Lanzilotta, W. N.; Lemon, B. J. und Seefeldt, L. C. (1998): X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution, *Science* (282 282), Nr. 5395, S. 1853-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9836629>.
- Peters, J. W.; Stowell, M. H.; 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 36), Nr. 6, S. 1181-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063865>.
- Pilak, O.; Mamat, B.; Vogt, S.; Hagemeyer, C. H.; Thauer, R. K.; Shima, S.; Vonrhein, C.; Warkentin, E. und Ermler, U. (2006): The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase, *J Mol Biol* (358 358), Nr. 3, S. 798-809. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540118>.
- Podzuweit, H. G.; Schneider, K. und Knüttel, H. (1987): Comparison of the membrane-bound hydrogenases from *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Alcaligenes eutrophus* type strain, *Biochim Biophys Acta* (905 905), Nr. 2, S. 435-46. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3689787>
- Pohlmann, A.; Fricke, W. F.; Reinecke, F.; Kusian, B.; Liesegang, H.; Cramm, R.; Eitinger, T.; Ewering, C.; Potter, M.; Schwartz, E.; Strittmatter, A.; Voss, I.; Gottschalk, G.; Steinbüchel, A.; Friedrich, B. und Bowion, B. (2006): Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16, *Nat Biotechnol* (24 24), Nr. 10, S. 1257-62. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16964242>.
- Redinbaugh, M. G. und Turley, R. B. (1986): Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions, *Anal Biochem* (153 153), Nr. 2, S. 267-71. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3706710>.
- Reissmann, S.; Hochleitner, E.; Wang, H.; Paschos, A.; Lottspeich, F.; Glass, R. S. und Böck, A. (2003): Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands, *Science* (299 299), Nr. 5609, S. 1067-70. In eng. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12586941](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12586941).
- Reysenbach, A. L.; Hamamura, N.; Podar, M.; Griffiths, E.; Ferreira, S.; Hochstein, R.; Heidelberg, J.; Johnson, J.; Mead, D.; Pohorille, A.; Sarmiento, M.; Schweighofer, K.; Seshadri,

- R. und Voytek, M. A. (2009): Complete and draft genome sequences of six members of the *Aquificales*, *J Bacteriol* (191 191), Nr. 6, S. 1992-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136599>.
- Roseboom, W.; Blokesch, M.; Böck, A. und Albracht, S. P. (2005): The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different, *FEBS Lett* (579 579), Nr. 2, S. 469-72. In eng. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15642360](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15642360).
- Rousset, M.; Dermoun, Z.; Hatchikian, C. E. und Belaich, J. P. (1990): Cloning and sequencing of the locus encoding the large and small subunit genes of the periplasmic [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio fructosovorans*, *Gene* (94 94), Nr. 1, S. 95-101. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2227457>.
- Rousset, M.; Magro, V.; Forget, N.; Guigliarelli, B.; Belaich, J. P. und Hatchikian, E. C. (1998a): Heterologous expression of the *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans* MR400, *J Bacteriol* (180 180), Nr. 18, S. 4982-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733707>.
- Rousset, M.; Montet, Y.; Guigliarelli, B.; Forget, N.; Asso, M.; Bertrand, P.; Fontecilla-Camps, J. C. und Hatchikian, E. C. (1998b): [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (95 95), Nr. 20, S. 11625-30. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751716>.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Methods Mol Biol* (132 132), S. 365-86. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547847>.
- Ruprecht, J.; Yankovskaya, V.; Maklashina, E.; Iwata, S. und Cecchini, G. (2009): Structure of *Escherichia coli* succinate:quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site, *J Biol Chem* (284 284), Nr. 43, S. 29836-46. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19710024>.
- Saggu, M.; Ludwig, M.; Friedrich, B.; Hildebrandt, P.; Bittl, R.; Lenzian, F.; Lenz, O. und Zebger, I. (2010): Impact of amino acid substitutions near the catalytic site on the spectral properties of an O<sub>2</sub>-tolerant membrane-bound [NiFe] hydrogenase, *ChemPhysChem* (11 11), Nr. 6, S. 1215-24. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376875>.
- Saggu, M.; Zebger, I.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Hildebrandt, P. und Lenzian, F. (2009): Spectroscopic insights into the oxygen-tolerant membrane-associated [NiFe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16, *J Biol Chem* (284 284), Nr. 24, S. 16264-76. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19304663>.
- Sali, A. und Blundell, T. L. (1993): Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J Mol Biol* (234 234), Nr. 3, S. 779-815. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254673>.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001): *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 3rd. 3rd, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, ISBN: 0879695773

## Anhang

- Sawers, R. G.; Ballantine, S. P. und Boxer, D. H. (1985): Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme, *J Bacteriol* (164 164), Nr. 3, S. 1324-31. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905769>.
- Sazanov, L. A. und Hinchliffe, P. (2006): Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*, *Science* (311 311), Nr. 5766, S. 1430-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469879>.
- Schink, B. und Schlegel, H. G. (1979): The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties, *Biochim Biophys Acta* (567 567), Nr. 2, S. 315-24. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36155>
- Schlegel, H. G.; Kaltwasser, H. und Gottschalk, G. (1961): Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen, *Arch Mikrobiol* (38 38), S. 209-22. In ger. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13747777>.
- Schmitz, O.; Boison, G.; Salzmann, H.; Bothe, H.; Schutz, K.; Wang, S. H. und Happe, T. (2002): HoxE - a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (Hox-EFUYH) of cyanobacteria, *Biochim Biophys Acta* (1554 1554), Nr. 1-2, S. 66-74. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034472>.
- Schneider, K.; Cammack, R. und Schlegel, H. G. (1984): Content and Localization of FMN, Fe-S Clusters and Nickel in the NAD-linked Hydrogenase of *Nocardia Opaca* 1b, *Eur J Biochem* (142 142), Nr. 1, S. 75-84. In English. URL: <Go to ISI>://A1984TC17900011.
- Schneider, K.; Patil, DS. und Cammack, R. (1983): ESR properties of membrane-bound hydrogenases from aerobic hydrogen bacteria, *Biochim Biophys Acta* (748 748), Nr. 3, S. 353-361.
- Schneider, K. und Schlegel, H. G. (1977): Localization and stability of hydrogenases from aerobic hydrogen bacteria, *Arch Microbiol* (112 112), Nr. 3, S. 229-38. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/871226>
- Schröder, O.; Bleijlevens, B.; de Jongh, T. E.; Chen, Z.; Li, T.; Fischer, J.; Forster, J.; Friedrich, C. G.; Bagley, K. A.; Albracht, S. P. und Lubitz, W. (2007): Characterization of a cyanobacterial-like uptake [NiFe] hydrogenase: EPR and FTIR spectroscopic studies of the enzyme from *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *J Biol Inorg Chem* (12 12), Nr. 2, S. 212-33. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082918>.
- Schubert, T. (2007): Spezifische Reifungsfaktoren eines Tat-abhängig translozierten Eisen-Schwefel-Proteins, der O<sub>2</sub>-toleranten membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase (MBH), Doctoral, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität, Berlin.
- Schubert, T.; Lenz, O.; Krause, E.; Volkmer, R. und Friedrich, B. (2007): Chaperones specific for the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase interact with the Tat signal peptide of the small subunit precursor in *Ralstonia eutropha* H16, *Mol Microbiol* (66 66), Nr. 2, S. 453-67. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850259>
- Schwartz, E. und Friedrich, B. (2006). The H<sub>2</sub>-Metabolizing Prokaryotes. In Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (Hrsg.), *The Prokaryotes* (S. 496-563). Springer-Verlag. URL: [http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30742-7\\_17](http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30742-7_17).

- Schwartz, E.; Gerischer, U. und Friedrich, B. (1998): Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes, *J Bacteriol* (180 180), Nr. 12, S. 3197-204. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620971>.
- Schwartz, E.; Henne, A.; Cramm, R.; Eitinger, T.; Friedrich, B. und Gottschalk, G. (2003): Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H<sub>2</sub>-based lithoautotrophy and anaerobiosis, *J Mol Biol* (332 332), Nr. 2, S. 369-83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948488>
- Schwarze, A. (2010): Light-driven H<sub>2</sub> production by connecting O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe]-hydrogenases from *Ralstonia eutropha* H16 with the cyanobacterial photosystem I, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt-Universität, Berlin.
- Schwarze, A.; Kopczak, M. J.; Rögner, M. und Lenz, O. (2010): Requirements for the construction of a functional hybrid complex between photosystem I and [NiFe]-hydrogenase, *Appl Environ Microbiol*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154103>.
- Shima, S.; Pilak, O.; Vogt, S.; Schick, M.; Stagni, M. S.; Meyer-Klaucke, W.; Warkentin, E.; Thauer, R. K. und Ermiler, U. (2008): The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site, *Science* (321 321), Nr. 5888, S. 572-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653896>.
- Shima, S. und Suzuki, K. I. (1993): *Hydrogenobacter acidophilus* sp. nov., a Thermoacidophilic, Aerobic, Hydrogen-Oxidizing Bacterium Requiring Elemental Sulfur for Growth, *International Journal of Systematic Bacteriology* (43 43), Nr. 4, S. 703-708. In Eng.
- Shima, S. und Thauer, R. K. (2007): A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation, *Chem Rec* (7 7), Nr. 1, S. 37-46. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304591>.
- Simon, R.; Prierer, U. und Puhler, A. (1983): A Broad Host Range Mobilization System for In vivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria, *Bio-Technology* (1 1), Nr. 9, S. 784-791. In Eng.
- Sizova, M. und Panikov, N. (2007): *Polaromonas hydrogenivorans* sp nov., a psychrotolerant hydrogen-oxidizing bacterium from Alaskan soil, *Int J Syst Evol Microbiol* (57 57), S. 616-619. In Eng.
- Skerra, A. und Schmidt, T. G. (2000): Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins, *Methods Enzymol* (326 326), S. 271-304. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036648>.
- Stein, M. und Lubitz, W. (2004): Relativistic DFT calculation of the reaction cycle intermediates of [NiFe] hydrogenase: a contribution to understanding the enzymatic mechanism, *J Inorg Biochem* (98 98), Nr. 5, S. 862-877. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134933>.
- Stein, M.; van Lenthe, E.; Baerends, E. J. und Lubitz, W. (2001): Relativistic DFT calculations of the paramagnetic intermediates of [NiFe] hydrogenase. Implications for the enzymatic mechanism, *J Am Chem Soc* (123 123), Nr. 24, S. 5839-40. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403633>.

## Anhang

- Stelter, M.; Melo, A. M.; Hreggvidsson, G. O.; Hjorleifsdottir, S.; Saraiva, L. M.; Teixeira, M. und Archer, M. (2009): Structure at 1.0 Å resolution of a high-potential iron-sulfur protein involved in the aerobic respiratory chain of *Rhodothermus marinus*, *J Biol Inorg Chem*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19921524>.
- Stephenson, M. und Stickland, L. H. (1931): Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen, *Biochem J* (25 25), Nr. 1, S. 205–214. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16744569>.
- Stesmans, A. und Van Gorp, G. (1989): Observation of the localized Si dangling-bond P<sub>b</sub> defect at the Si/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> interface, *Phys Rev B Condens Matter* (39 39), Nr. 4, S. 2864–2867. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9948564>.
- Stöhr, R.; Waberski, A.; Liesack, W.; Volker, H.; Wehmeyer, U. und Thomm, M. (2001a): *Hydrogenophilus hirschii* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing beta-proteobacterium isolated from Yellowstone National Park, *Int J Syst Evol Microbiol* (51 51), Nr. Pt 2, S. 481–8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11321094>.
- Stöhr, R.; Waberski, A.; Volker, H.; Tindall, B. J. und Thomm, M. (2001b): *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobacterium acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum 'Hydrogenobacter/Aquifex', *Int J Syst Evol Microbiol* (51 51), S. 1853–1862. In Eng.
- Stokkermans, J. P.; Pierik, A. J.; Wolbert, R. B.; Hagen, W. R.; Van Dongen, W. M. und Veeger, C. (1992a): The primary structure of a protein containing a putative [6Fe-6S] prismatic cluster from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), *Eur J Biochem* (208 208), Nr. 2, S. 435–42. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1339351>.
- Stokkermans, J. P.; van den Berg, W. A.; van Dongen, W. M. und Veeger, C. (1992b): The primary structure of a protein containing a putative [6Fe-6S] prismatic cluster from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774), *Biochim Biophys Acta* (1132 1132), Nr. 1, S. 83–7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511014>.
- Strnad, H.; Lapidus, A.; Paces, J.; Ulbrich, P.; Vlcek, C.; Paces, V. und Haselkorn, R. (2010): Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003, *J Bacteriol* (192 192), Nr. 13, S. 3545–6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418398>.
- Surerus, K. K.; Chen, M.; van der Zwaan, J. W.; Rusnak, F. M.; Kolk, M.; Duin, E. C.; Albracht, S. P. und Munck, E. (1994): Further characterization of the spin coupling observed in oxidized hydrogenase from *Chromatium vinosum*. A Mossbauer and multifrequency EPR study, *Biochemistry* (33 33), Nr. 16, S. 4980–93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161560>.
- Swartz, P. D.; Beck, B. W. und Ichiye, T. (1996): Structural origins of redox potentials in Fe-S proteins: electrostatic potentials of crystal structures, *Biophys J* (71 71), Nr. 6, S. 2958–69. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968568>.

- Takai, K.; Kobayashi, H.; Nealson, K. H. und Horikoshi, K. (2003): *Sulfurihydrogenibium subterraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer, *Int J Syst Evol Microbiol* (53 53), Nr. Pt 3, S. 823-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807207>.
- Tamagnini, P.; Leitao, E.; Oliveira, P.; Ferreira, D.; Pinto, F.; Harris, D. J.; Heidorn, T. und Lindblad, P. (2007): Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications, *FEMS Microbiol Rev* (31 31), Nr. 6, S. 692-720. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17903205>.
- Tavares, P.; Pereira, A. S.; Krebs, C.; Ravi, N.; Moura, J. J.; Moura, I. und Huynh, B. H. (1998): Spectroscopic characterization of a novel tetranuclear Fe cluster in an iron-sulfur protein isolated from *Desulfovibrio desulfuricans*, *Biochemistry* (37 37), Nr. 9, S. 2830-42. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9485434>.
- Teixeira, M.; Moura, I.; Fauque, G.; Dervartanian, D. V.; Legall, J.; Peck, H. D., Jr.; Moura, J. J. und Huynh, B. H. (1990): The iron-sulfur centers of the soluble [NiFeSe] hydrogenase, from *Desulfovibrio baculatus* (DSM 1743). EPR and Mossbauer characterization, *Eur J Biochem* (189 189), Nr. 2, S. 381-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2159882>.
- Teixeira, M.; Moura, I.; Xavier, A. V.; Dervartanian, D. V.; Legall, J.; Peck, H. D., Jr.; Huynh, B. H. und Moura, J. J. (1983): *Desulfovibrio gigas* hydrogenase: redox properties of the nickel and iron-sulfur centers, *Eur J Biochem* (130 130), Nr. 3, S. 481-4. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297907>.
- Teixeira, M.; Moura, I.; Xavier, A. V.; Huynh, B. H.; DerVartanian, D. V.; Peck, H. D., Jr.; LeGall, J. und Moura, J. J. (1985): Electron paramagnetic resonance studies on the mechanism of activation and the catalytic cycle of the nickel-containing hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *J Biol Chem* (260 260), Nr. 15, S. 8942-50. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2991227>.
- Teixeira, M.; Moura, I.; Xavier, A. V.; Moura, J. J.; LeGall, J.; DerVartanian, D. V.; Peck, H. D., Jr. und Huynh, B. H. (1989): Redox intermediates of *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hydrogenase generated under hydrogen. Mossbauer and EPR characterization of the metal centers, *J Biol Chem* (264 264), Nr. 28, S. 16435-50. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550443>.
- Thiemermann, S.; Dervede, J.; Bernhard, M.; Schroeder, W.; Massanz, C. und Friedrich, B. (1996): Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* requires the hoxW gene product, *J Bacteriol* (178 178), Nr. 8, S. 2368-74. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636040>.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res* (22 22), Nr. 22, S. 4673-80. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984417>.
- Tiede, D. M.; Prince, R. C. und Dutton, P. L. (1976): EPR and optical spectroscopic properties of the electron carrier intermediate between the reaction center bacteriochlorophylls and the primary acceptor in *Chromatium vinosum*, *Biochim Biophys Acta* (449 449), Nr. 3, S. 447-67. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/187221>.

## Anhang

- 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 U S A* (76 76), Nr. 9, S. 4350-4. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439>.
- Tran, P. D.; Artero, V. und Fontecave, M. (2010): Water electrolysis and photoelectrolysis on electrodes engineered using biological and bio-inspired molecular systems, *Energy & Environmental Science* (3 3), Nr. 6, S. 727-747. In English.
- Turner, N. J. (2009): Directed evolution drives the next generation of biocatalysts, *Nat Chem Biol* (5 5), Nr. 8, S. 567-73. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620998>.
- van der Linden, E.; Burgdorf, T.; Bernhard, M.; Bleijlevens, B.; Friedrich, B. und Albracht, S. P. (2004a): The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen, *J Biol Inorg Chem* (9 9), Nr. 5, S. 616-26. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15164270>.
- van der Linden, E.; Faber, B. W.; Bleijlevens, B.; Burgdorf, T.; Bernhard, M.; Friedrich, B. und Albracht, S. P. (2004b): Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*, *Eur J Biochem* (271 271), Nr. 4, S. 801-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764097>.
- van Driessche, G.; Vandenberghe, I.; Devreese, B.; Samyn, B.; Meyer, T. E.; Leigh, R.; Cusanovich, M. A.; Bartsch, R. G.; Fischer, U. und Van Beeumen, J. J. (2003): Amino acid sequences and distribution of high-potential iron-sulfur proteins that donate electrons to the photosynthetic reaction center in phototropic proteobacteria, *J Mol Evol* (57 57), Nr. 2, S. 181-99. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562962>.
- van Gastel, M.; Stein, M.; Brecht, M.; Schroder, O.; Lendzian, F.; Bittl, R.; Ogata, H.; Higuchi, Y. und Lubitz, W. (2006): A single-crystal ENDOR and density functional theory study of the oxidized states of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, *J Biol Inorg Chem* (11 11), Nr. 1, S. 41-51. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16292669>.
- van Heerikhuizen, H.; Albracht, S. P.; Slater, E. C. und van Rheeunen, P. S. (1981): Purification and some properties of the soluble hydrogenase from *Chromatium vinosum*, *Biochim Biophys Acta* (657 657), Nr. 1, S. 26-39. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6260199>.
- Vesteinsdottir, H.; Reynisdottir, D. B. und Orlygsson, J. (2010a): *Hydrogenophilus islandicus* sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an Icelandic hot spring, *Int J Syst Evol Microbiol*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228213>.
- Vesteinsdottir, H.; Reynisdottir, D. B. und Orlygsson, J. (2010b): *Thiomonas islandica* sp. nov., a novel moderately thermophilic hydrogen and sulfur oxidizing betaproteobacterium isolated from an Icelandic hot spring, *Int J Syst Evol Microbiol*. In Eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173005>.

- Vignais, P. M. und Billoud, B. (2007): Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview, *Chem Rev* (107 107), Nr. 10, S. 4206-72. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17927159>.
- Vignais, P. M.; Billoud, B. und Meyer, J. (2001): Classification and phylogeny of hydrogenases, *FEMS Microbiol Rev* (25 25), Nr. 4, S. 455-501. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524134>.
- Vignais, P. M.; Elsen, S. und Colbeau, A. (2005): Transcriptional regulation of the uptake [NiFe]hydrogenase genes in *Rhodobacter capsulatus*, *Biochem Soc Trans* (33 33), Nr. Pt 1, S. 28-32. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15667256>.
- Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Clark, J. R.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B. und Armstrong, F. A. (2006): Electricity from low-level H<sub>2</sub> in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase, *Chem Commun (Camb)*, Nr. 48, S. 5033-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146518>
- Vincent, K. A.; Cracknell, J. A.; Lenz, O.; Zebger, I.; Friedrich, B. und Armstrong, F. A. (2005a): Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels, *Proc Natl Acad Sci U S A* (102 102), Nr. 47, S. 16951-4. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16260746>.
- Vincent, K. A.; Parkin, A. und Armstrong, F. A. (2007): Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases, *Chem Rev* (107 107), Nr. 10, S. 4366-413. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17845060>.
- Vincent, K. A.; Parkin, A.; Lenz, O.; Albracht, S. P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Cammack, R.; Friedrich, B. und Armstrong, F. A. (2005b): Electrochemical definitions of O<sub>2</sub> sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases, *J Am Chem Soc* (127 127), Nr. 51, S. 18179-89. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16366571>.
- Volbeda, A.; Charon, M. H.; Piras, C.; Hatchikian, E. C.; Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. C. (1995): Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Nature* (373 373), Nr. 6515, S. 580-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7854413>.
- Volbeda, A.; Garcin, E.; Piras, C.; deLacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Hatchikian, E. C.; Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. C. (1996): Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands, *J Am Chem Soc* (118 118), Nr. 51, S. 12989-12996. In Eng.
- Volbeda, A.; Martin, L.; Cavazza, C.; Matho, M.; Faber, B. W.; Roseboom, W.; Albracht, S. P. J.; Garcin, E.; Rousset, M. und Fontecilla-Camps, J. C. (2005): Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases, *J Biol Inorg Chem* (10 10), Nr. 3, S. 239-249. In Eng.
- Voordouw, G.; Menon, N. K.; LeGall, J.; Choi, E. S.; Peck, H. D., Jr. und Przybyla, A. E. (1989): Analysis and comparison of nucleotide sequences encoding the genes for [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenases from *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio baculatus*, *J Bacteriol* (171 171), Nr. 5, S. 2894-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2651421>.

## Anhang

- Wang, R.; Healey, F. P. und Myers, J. (1971): Amperometric measurement of hydrogen evolution in *chlamydomonas*, *Plant Physiol* (48 48), Nr. 1, S. 108-10. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16657724>.
- Wiebe, R. und Gaddy, V. L. (1934): The solubility of hydrogen in water at 0, 50, 75 and 100°C from 25 to 1000 atmospheres, *J Am Chem Soc* (56 56), S. 76-79. In English.
- Wiebe, R.; Gaddy, V. L. und Heins, C. (1932): Solubility of hydrogen in water at 25 degrees C. 25 to 1000 atmospheres, *Industrial and Engineering Chemistry* (24 24), S. 823-825. In English.
- Wilde, E. (1962): Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*, *Arch Microbiol* (43 43), Nr. 2, S. 109-137. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00406429>.
- Wilson, C. M. (1983): Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures, *Methods Enzymol* (91 91), S. 236-47. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6190068>.
- Wirth, R.; Sikorski, J.; Brambilla, E.; Misra, M.; Lapidus, A.; Copeland, A.; Nolan, M.; Lucas, S.; Chen, F.; Tice, H.; Cheng, J. F.; Han, C.; Detter, J. C.; Tapia, R.; Bruce, D.; Goodwin, L.; Pitluck, S.; Pati, A.; Anderson, I.; Ivanova, N.; Mavromatis, K.; Mikhailova, N.; Chen, A.; Palaniappan, K.; Bilek, Y.; Hader, T.; Land, M.; Hauser, L.; Chang, Y. J.; Jeffries, C. D.; Tindall, B. J.; Rohde, M.; Goker, M.; Bristow, J.; Eisen, J. A.; Markowitz, V.; Hugenholtz, P.; Kyrpides, N. C. und Klenk, H. P. (2010): Complete genome sequence of *Thermocrinis albus* type strain (HI 11/12), *Stand Genomic Sci* (2 2), Nr. 2, S. 194-202. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304702>.
- Xia, X. und Xie, Z. (2001): DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution, *J Hered* (92 92), Nr. 4, S. 371-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535656>.
- Yagi, K.; Seto, T.; Terakado, M.; Umeda, F.; Doi, T.; Imanishi, T. und Miura, Y. (1992): Nucleotide sequences of membrane-bound hydrogenase gene in *Alcaligenes hydrogenophilus*, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* (40 40), Nr. 12, S. 3292-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1294332>.
- Yahata, N.; Saitoh, T.; Takayama, Y.; Ozawa, K.; Ogata, H.; Higuchi, Y. und Akutsu, H. (2006): Redox interaction of cytochrome c3 with [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, *Biochemistry* (45 45), Nr. 6, S. 1653-62. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460012>.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. und Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* (33 33), Nr. 1, S. 103-19. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2985470>.
- Yeh, A. P.; Ambroggio, X. I.; Andrade, S. L.; Einsle, O.; Chatelet, C.; Meyer, J. und Rees, D. C. (2002): High resolution crystal structures of the wild type and Cys-55-->Ser and Cys-59-->Ser variants of the thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*, *J Biol Chem* (277 277), Nr. 37, S. 34499-507. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089152>.

Zhou, Z. H. und Adams, M. W. (1997): Site-directed mutations of the 4Fe-ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: role of the cluster-coordinating aspartate in physiological electron transfer reactions, *Biochemistry* (36 36), Nr. 36, S. 10892-900. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9283079>.

Zirngibl, C.; Hedderich, R. und Thauer, R. K. (1990): N5,N10-Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase from *Methanobacterium Thermoautotrophicum* has Hydrogenase Activity, *FEBS Lett* (261 261), Nr. 1, S. 112-116. In Eng.

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Bärbel Friedrich für die Möglichkeit danken, an diesem spannenden Thema arbeiten zu können. Ihr und Dr. Oliver Lenz danke ich auch für die Betreuung während meiner Dissertation.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Kooperationspartner im spektroskopischen und elektrochemischen Bereich: Vielen Dank an Annemarie Wait und Prof. Dr. Fraser Armstrong am Institut für Anorganische Chemie an der University of Oxford; vielen Dank an Dr. Miguel Saggi, Nina Heidary, Dr. Ingo Zebger und Dr. Friedhelm Lenzian vom Max-Volmer-Institut für biophysikalische Chemie der TU Berlin.

Ganz herzlichen Dank an Prof. Dr. Wolfgang Lubitz vom Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie in Mülheim und Prof. Dr. Holger Dobbek vom Institut für Strukturbiologie/Biochemie an der HU Berlin für die Übernahme des Gutachtens.

Für exzellente Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit danke ich vielfach: Josta Hamann und Angelika Strack.

Für die Hilfe bei allen bürokratischen Hürden danke ich Claudia Lehmann.

Dankesehr allen Personen, die mich während wissenschaftlichen Diskussionen mit Denkstoff versorgt haben und mir stets Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen waren: Ingmar Bürstel, Dr. Rainer Cramm, Prof. Dr. Thomas Eitinger, Dr. Stefan Frielingsdorf, Johannes Fritsch, Lars Lauterbach, Dr. Anne Pohlmann, Dr. Edward Schwartz, Dr. Alexander Schwarze, Dr. Kylie Vincent und insbesondere denen, die mir - neben Dr. Oliver Lenz - die membrangebundene Hydrogenase nahe gebracht haben: Dr. Marcus Ludwig und Dr. Torsten Schubert.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Tobias Goris