

**Die pleiotrope Maturation der sauerstofftoleranten  
[NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha***

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

**d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Dipl. Biol. Ingmar Bürstel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Stefan Hecht PhD

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. B. Friedrich
2. Prof. Dr. R. G. Sawers
3. Prof. Dr. H. Dobbek

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2013

*„Wenn du verstehen willst, wie wir Dinge bauen,  
musst du uns erst beim Bauen zuschauen.“*

- Lewis Wolpert, 1999

## Publikationsliste

Diese Arbeit wurde in der AG Mikrobiologie bei Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt. Diese Studie wurde aus Mitteln der DFG-Exzellenzinitiative "Unifying Concepts in Catalysis" und des Stipendiatenprogramms „Berlin International Graduate School of Natural Science and Engineering“ gefördert.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in Teilen, wie folgt, veröffentlicht:

### 1. Patentanmeldungen:

**Bürstel I.** „*Dialyse- und Applikationskapsel*“; Schutzrecht Nr. 20 2012 000 398.4 gemäß GebrMG erteilt durch das *Deutsche Patent- und Markenamt*.

### 2. Wissenschaftliche Originalarbeiten:

**Bürstel I.,** Hummel P., Siebert E., Wisintruangsakul N., Zebger I., Friedrich B., Lenz O. (2011) Probing the Nature of the Metabolic Precursor of the CO Ligand in the Catalytic Center of [NiFe]-Hydrogenase. *J Biol Chem* 286(52): 44937-44.

**Bürstel I.,** Winter G., Siebert E., Hummel P., Zebger I., Friedrich B., Lenz O. (2012) A universal scaffold for synthesis of the Fe(CN)<sub>2</sub>(CO) moiety of [NiFe]-hydrogenase. *J Biol Chem* 287(46): 38845-53.

### 3. Übersichtsartikel:

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* 11(6):1107-19. *Review*

## Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Hydrogenasen, das sind komplexe Enzyme, welche die reversible Oxidation von  $H_2$  zu Protonen und Elektronen katalysieren. Der Modellorganismus *Ralstonia eutropha* besitzt drei gut charakterisierte Hydrogenasen, die der [NiFe]-Klasse angehören. Diese Enzyme erlauben dem Organismus das Wachstum unter chemolithoautotrophen Bedingungen. Ihr aktives Zentrum besteht aus einer komplexen prosthetischen Gruppe, welche aus einem Nickel- und einem Eisenatom besteht. Letzteres koordiniert drei diatomare Liganden, zwei Cyanide und ein CO. Die Synthese der gesamten  $Ni(SR)_2(\mu-SR)_2Fe(CN)_2(CO)$ -Gruppe ist ein komplexer Prozess. Dieser Maturationsprozess benötigt wenigstens sechs akzessorische Proteine, die sogenannten Hyp-Proteine. Die vorliegende Arbeit untersucht diese Maturation, insbesondere die Synthese des Carbonylliganden, auf molekularbiologischer Ebene.

In dieser Studie konnte - in Kombination mit infrarotspektroskopischen Analysen - erstmalig der Beweis erbracht werden, dass die gesamte  $Fe(CN)_2(CO)$ -Gruppe als komplette Einheit auf einem intermediären Komplex aus den Gerüstproteinen HypC und HypD zusammgebaut wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Reihenfolge, in der die Liganden an das Eisen in diesem Komplex binden, *in vivo* determiniert ist. So ist die Synthese der  $CN^-$ -Liganden Voraussetzung für die nachfolgende Ligandierung mit CO. Somit liefert diese Studie auch wichtige Impulse für künftige synthetische, eisenbasierte  $H_2$ -Katalysatoren.

Daneben konnte mittels Isotopenmarkierung nachgewiesen werden, dass die Synthese des Carbonylliganden eine metabolische Leistung des jeweiligen Wirtsorganismus ist. Gleichzeitig konnte die Konzentration des CO-Liganden durch  $^{13}C$ -Titration quantifiziert werden. Mit Hilfe eines neu entwickelten Systems zur selektiven Eliminierung von Gasen konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass es mehrere Synthesewege für den CO-Liganden geben muss.

Auf der Suche nach konkreten CO-produzierenden Reaktionen wurde zunächst HypX, ein akzessorisches Protein mit bisher unbekannter Funktion, identifiziert. Bereits im Vorfeld dieser Studie war bekannt, dass HypX für die Sauerstofftoleranz der Reifung wichtig ist. Hier konnte gezeigt werden, dass HypX für die effektive Biosynthese des Carbonylliganden unter aeroben Bedingungen erforderlich ist. Mittels Isotopenmarkierung konnte in Mutanten, die ihren  $C_1$ -Metabolismus nur durch extern appliziertes Glycin auffüllen können, gezeigt werden, dass die Formylgruppe von  $N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat (10-FTHF) zu CO dehydratisiert wird, wobei Formylsäure als Zwischenprodukt postuliert wird. Weitere *hypX*-Homologe konnten auch in Organismen identifiziert werden, welche keine Hydrogenasen besitzen. Dies verweist auf eine globale Bedeutung dieser Genfamilie im Rahmen des  $C_1$ -Metabolismus von Prokaryoten und niederen Eukaryoten.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zudem, dass es ein Netzwerk von CO-Quellen gibt, die – zusätzlich zu HypX - an der CO-Synthese beteiligt sind. Als erster konkreter Kandidat für diese basale CO-Synthese wurde in *Ralstonia eutropha* ein Operon identifiziert, welches als CO-Dehydrogenase (CODH) annotiert wurde. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen jedoch, dass es sich nicht um eine CODH handeln kann. Vielmehr handelt es sich um ein Enzym aus der Familie der Mo-Hydroxylasen, zu der auch die CODHs gehören. Durch Titrationsexperimente mit  $^{13}C$  konnte nachgewiesen werden, dass dieses Enzym an der CO-Synthese beteiligt ist, wobei das entsprechende Substrat noch unbekannt ist.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE BEDEUTUNG VON WASSERSTOFF IN DER BIOTISCHEN WELT.....	1
1.2	HYDROGENASEN – SCHLÜSSELENZYME DES LITHOTROPHEN LEBENSSTILS.....	2
1.2.1	[Fe]-Hydrogenasen.....	3
1.2.2	[FeFe]-Hydrogenasen.....	3
1.2.3	[NiFe]-Hydrogenasen.....	4
1.3	DIE FUNKTIONEN DER DIATOMAREN LIGANDEN IM AKTIVEN ZENTRUM VON [NiFe]-HYDROGENASEN.....	5
1.3.1	Koordinationschemie von molekularem Wasserstoff.....	5
1.3.2	Funktion des CO-Liganden in Hydrogenasen.....	7
1.3.3	Funktion der CN <sup>-</sup> -Liganden in [NiFe]-Hydrogenasen.....	7
1.4	DER KATALYTISCHE ZYKLUS VON [NiFe]-HYDROGENASEN.....	9
1.5	DIE SAUERSTOFFTOLERANTEN [NiFe]-HYDROGENASEN AUS RALSTONIA EUTROPHA H16.....	10
1.6	MATURATION VON [NiFe]-HYDROGENASEN.....	13
1.6.1	Synthese der Cyanidliganden.....	15
1.6.2	Der HypCD-Komplex – Zentrales Element der Maturation.....	15
1.6.3	Nickel-Einbau.....	17
1.6.4	Die Synthese des Carbonylliganden.....	18
1.6.5	Die Funktion von HypX in der pleiotropen Maturation.....	19
1.6.6	Proteolytische Spaltung.....	20
1.6.7	Einbau der Eisen-Schwefel-Cluster in die kleine Untereinheit.....	21
1.6.8	MBH-spezifische Reifung.....	21
1.6.9	Export der membrangebundenen Hydrogenase.....	22
1.7	ZIELSETZUNG UND METHODIK DIESER DOKTORARBEIT.....	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
2.1	VERWENDETE PLASMIDE UND BAKTERIENSTÄMME.....	24
2.2	KULTIVIERUNG DER BAKTERIEN.....	26
2.2.1	Anzuchtmedien.....	26
2.2.2	Kultivierung bakterieller Zellen.....	29
2.2.3	Anzucht unter CO-Mangelbedingungen (CO-Limitation).....	29
2.2.4	<sup>13</sup> C-Markierungsexperimente.....	30
2.2.5	Bestimmung von Wachstumsparametern.....	30
2.2.6	Zellernte.....	30
2.2.7	Konservierung von Bakterienstämmen.....	31
2.3	ZELLFRAKTIONIERUNG UND PROTEINREINIGUNG.....	31
2.3.1	Zellaufschluss und Präparation des löslichen Extrakts.....	31
2.3.2	Präparation der inneren Membran.....	31
2.3.3	Affinitätschromatographie.....	32
2.3.4	Größenausschlusschromatographie.....	33
2.3.5	Proteolytische Spaltung des MBP::HypX-Fusionsproteins.....	33
2.4	PROBENANALYTIK.....	34
2.4.1	Photometrische Proteinquantifizierung mittels BCA-Test.....	34
2.4.2	Fourier transformierte Infrarot (FTIR)- Spektroskopie.....	34
2.4.3	Photometrische Bestimmung der Hydrogenaseaktivität der SH in ganzen Zellen.....	34
2.4.4	MBH-Aktivität an präparierter Membranfraktion.....	35
2.4.5	Aufnahme von UV-Vis-Absorptionsspektren.....	35
2.4.6	Bestimmung des Metallgehaltes von Proteinen (ICP-OES).....	35
2.5	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	36
2.5.1	Denaturierende Gelelektrophorese.....	36
2.5.2	Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel.....	36
2.6	IMMUNOLOGISCHE DETEKTION VON PROTEINEN.....	36
2.6.1	Proteintransfer.....	37
2.6.2	Antikörperfärbung.....	37
2.7	QUANTITATIVE BESTIMMUNG FREIER UND GELÖSTER GASE.....	38
2.7.1	Nicht-invasive Sauerstoffmessung.....	38
2.7.2	Quantifizierung der produzierten CO-Menge mittels <sup>13</sup> CO-Titration.....	38
2.7.3	Quantitative Gaschromatographie.....	39
2.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE GRUNDTECHNIKEN.....	39

2.8.1	Präparation genomischer DNS aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	39
2.8.2	Plasmidisolierung .....	40
2.8.3	Bestimmung der DNS-Konzentration .....	40
2.8.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	40
2.8.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.8.6	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen .....	41
2.8.7	Restriktionsverdau .....	41
2.8.8	Klenow-Behandlung von 5'-Überhängen der DNS-Fragmente .....	41
2.8.9	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren .....	41
2.8.10	Ligation von DNS-Fragmenten .....	42
2.8.11	Rekombination überlappender DNS-Stränge mittels <i>In-Fusion</i> <sup>®</sup> .....	42
2.8.12	Sequenzierungen .....	42
2.9	GENTECHNISCHE KONSTRUKTIONEN .....	42
2.9.1	Überexpressionsplasmide für HypCD-Komplexe aus <i>R. eutropha</i> .....	44
2.9.2	Suizidplasmid zur Deletion von <i>glyA</i> .....	45
2.9.3	Suizidplasmide zur Herstellung von Nukleotidaustauschen in <i>hypX</i> .....	45
2.9.4	MBP::HypX-Überexpressionsplasmid .....	46
2.9.5	Suizidplasmid zur Deletion von <i>coxL1</i> .....	46
2.10	GENETISCHE GRUNDTECHNIKEN .....	46
2.10.1	Lysogenisierung von Zellen .....	46
2.10.2	Herstellung kompetenter Zellen .....	46
2.10.3	Transformation .....	47
2.10.4	Transkonjugation .....	47
2.10.5	Allelaustausch mittels doppelt-homologer Rekombination .....	47
2.11	METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER DIALYSEKAPSEL .....	48
2.11.1	Dichtheitsprüfung .....	48
2.11.2	Bestimmung der Dialyserate .....	48
2.12	CHEMIKALIEN UND ENZYME .....	48
2.13	EDV UND WEB-BASIERTE DIENSTE .....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
3.1	ENTWICKLUNG EINER NEUARTIGEN KAPSEL ZUM ZWECHE DER DIALYSE UND APPLIKATION .....	50
3.1.1	Beschreibung der Dialyse- und Applikationskapsel .....	50
3.1.2	Verwendung .....	52
3.1.3	Dialyse-Charakteristika der neu entwickelten Kapsel im Vergleich zum Stand der Technik .....	53
3.1.4	Dichtheitsprüfung .....	54
3.2	DER HYPD-KOMPLEX .....	56
3.2.1	Ein neu identifiziertes HypD-Homolog in <i>Ralstonia eutropha</i> zeigt Ähnlichkeiten zu <i>E. coli</i> HypD56 .....	60
3.2.2	Sequenzvergleich mit 448 HypD-Isoformen aus verschiedenen Organismen .....	60
3.2.3	Identifikation neuer, hochkonservierter struktureller Merkmale in HypD .....	61
3.2.4	Konstruktion und Komplementation von HypCD-Expressions-plasmiden .....	63
3.2.5	Expression und Reinigung des HypCD-Komplexes aus <i>Ralstonia eutropha</i> und <i>Escherichia coli</i> .....	65
3.2.6	Nachweis der diatomaren Liganden am HypCD-Komplex aus <i>Ralstonia eutropha</i> mittels IR-Spektroskopie .....	67
3.2.7	Nachweis der diatomaren Liganden am HypCD-Komplex aus <i>Escherichia coli</i> mittels IR-Spektroskopie .....	69
3.2.8	Reduzierende Bedingungen beeinflussen die Streckfrequenz der Liganden im HypCD-Komplex. ..	71
3.3	CHARAKTERISIERUNG DES VORLÄUFERS DES CARBONYLLIGANDEN IM AKTIVEN ZENTRUM VON [NiFe]-HYDROGENASEN AUS <i>R. EUTROPHA</i> .....	73
3.3.1	Der Carbonylligand im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen stammt aus dem Metabolismus .....	74
3.3.2	Die Carbonylliganden werden unter heterotrophen Bedingungen exklusiv aus den Kohlenstoffatomen des Glycerols synthetisiert .....	75
3.3.3	Quantifizierung der biologischen Vorstufe des CO-Liganden unter heterotrophen Bedingungen .....	77
3.3.4	Entwicklung eines Systems zur spezifischen Eliminierung von gasförmigem Kohlenmonoxid .....	79
3.4	HYPX, EINE ANPASSUNG DER PLEIOTROPEN MATURATION AN EIN AEROBES UMFELD .....	86
3.4.1	Komplementation des HypX-Phänotyps durch Applikation geringer Mengen gasförmigen Kohlenmonoxids .....	86
3.4.2	Sequenzvergleich von HypX/HoxX-Homologen .....	88
3.4.3	Extern appliziertes <sup>13</sup> C-Formiat ist kein Substrat in der HypX-abhängigen CO-Synthese .....	91
3.4.4	Herstellung einer Deletionsmutante im Serin-Hydroxymethyl-Transferase-Gen .....	92
3.4.5	Charakterisierung der Glycin-Bedürftigkeit der SHMT-Mutante .....	93

3.4.6	<i>In vivo</i> Markierung der MBH mit <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -Glycin unter chemolithoautotrophen Bedingungen .....	94
3.4.7	<i>In vivo</i> Markierung der regulatorischen Hydrogenase mit <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -Glycin unter heterotrophen Standardbedingungen .....	95
3.4.8	Vergleichende Analyse der HypX-Funktion unter verschiedenen heterotrophen Bedingungen .....	97
3.4.9	Der HypX abhängige Einfluss von Serin und Glycin auf die Hydrogenase Aktivität verweisen auf die Beteiligung des C <sub>1</sub> -Metabolismus .....	100
3.4.10	Konzentration des gelösten Sauerstoffs in Korrelation zur Zelldichte .....	102
3.4.11	<i>In vivo</i> Markierung der MBH mit <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -Glycin unter modifizierten heterotrophen (GN)-Bedingungen .....	103
3.4.12	<i>In vivo</i> Markierung der RH mit <sup>13</sup> C-Glycin-Derivaten unter GN-Bedingungen .....	104
3.4.13	Struktur-Funktionsanalysen an HypX .....	106
3.4.14	<i>In silico</i> -Studie der N <sup>10</sup> -Formyl-Tetrahydrofolat-Bindestelle von HypX .....	107
3.4.15	<i>In silico</i> -Studie der putativen Enoyl-CoA-Hydratase-Domäne von HypX .....	109
3.4.16	Charakterisierung der C-terminalen Domäne von HypX mittels ortsspezifischer Mutagenese .....	112
3.4.17	Beide Domänen agieren konzertiert bei der Synthese des Carbonylliganden .....	116
3.4.18	HypX enthält einen unerwarteten mononuklearen Kofaktor .....	118
3.5	EINE PUTATIVE CO-DEHYDROGENASE AUS RALSTONIA EUTROPHA ALS ALTERNATIVER WEG IN DER BIOSYNTHESE DES CARBONYLLIGANDEN .....	123
3.5.1	Keine der putativen CODHs aus <i>Ralstonia eutropha</i> ist in der Lage Carboxydotrophie vermitteln	123
3.5.2	Relative Quantifizierung von Cox-Proteinen unter lithoautotrophen Bedingungen und Konstruktion einer CODH-Mutante .....	125
3.5.3	Einfluss der putativen CO-Dehydrogenase auf das chemolithoautotrophe Wachstum .....	127
3.5.4	Acetat als potentielle Vorstufe in der Synthese der Carbonylliganden .....	128
3.5.5	Kohlenstoffdioxid als Substrat für die Biosynthese des Carbonylliganden in <i>R. eutropha</i> .....	130
3.5.6	Bicarbonat als mögliches Substrat für die Biosynthese des Carbonylliganden in <i>R. eutropha</i> .....	133
3.5.7	COXI abhängige Produktion von CO-Liganden .....	134
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>136</b>
4.1	EINE NEUARTIGE DIALYSEKAPSEL BIETET DIE MÖGLICHKEIT ZUR SPEZIFISCHEN ENTFERNUNG UNTERSCHIEDLICHER GASE MITTELS GASWÄSCHE .....	136
4.2	DER ZUSAMMENBAU DER KATALYTISCHEN Fe(CN) <sub>2</sub> (CO)-GRUPPE AUS [NiFe]-HYDROGENASEN FINDET IM HYP-CD-KOMPLEX STATT .....	137
4.3	DIE BIOSYNTHESE DES CO-LIGAND IN [NiFe]-HYDROGENASEN IST DIE LEISTUNG MEHRERER REAKTIONEN DES WIRTSMETABOLISMUS .....	143
4.4	HYPX, EINE SPEZIFISCHE ANPASSUNG DER HYDROGENASEREIFUNG AN EINEN AEROBEN LEBENSSTIL .....	146
4.5	EINE VERMEINTLICHE CODH IST ALS TEIL DES WIRTSMETABOLISMUS AN DER SYNTHESE DES CARBONYLLIGANDEN BETEILIGT .....	166
4.6	FAZIT UND PERSPEKTIVEN .....	170
<b>5</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>I</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>XVIII</b>
6.1	TYPISCHE REINIGUNG DER RH <sub>STOPSTREP</sub> .....	XVIII
6.2	EINFLUSS VERSCHIEDENER AMINOSÄUREN AUF DIE HYPX-ABHÄNGIGE HYDROGENASE-MATURATION .....	XIX
6.3	STRUKTURELLES „ALIGNMENT“ DER N-TERMINALEN DOMÄNE AUS HYPX .....	XX
6.4	STRUKTURELLES „ALIGNMENT“ DER C-TERMINALEN DOMÄNE AUS HYPX .....	XXI
6.5	PHYLOGENETISCHE VERTEILUNG VON HYPX-HOMOLOGEN .....	XXII
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XXVIII</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>XXX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACP	Acylphosphatase
ACS	Acetyl-CoA-Synthase
AdoMet	S-Adenosylmethionin (auch SAM genannt)
AK	Antikörper
A/N	<i>Accession-Number</i> (Inventarnummer zur Identifikation von Genen und Proteinen)
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American type culture collection</i>
AU	Absorptionseinheit (engl.: <i>absorption unit</i> ), dimensionslose Größe für Extinktion
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Carboanhydrase
CoA	Koenzym A
CODH	CO-Dehydrogenase
CP	Carbamoylphosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Schichtdicke
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EPR-Spektroskopie	Elektronenspinresonanz (engl.: <i>Electron paramagnetic resonance</i> )
FA	Ameisensäure (engl.: <i>formic acid</i> )
FTHFD	10-Formyl-Tetrahydrofolat Dehydrogenase
FGN	Fruktose-Glycerol-Ammonium-Medium ( Tabelle 3)
FID	Flammenionisationsdetektor
FMT	Methionyl-tRNA Formyltransferase
FN	Fruktose-Ammonium-Medium ( Tabelle 3)
FTIR-Spektroskopie	Fourier transformierte Infrarotspektroskopie
FTR	Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase
GART	Glycinamid-Ribonukleotid-Transformylase
GN	Glycerol-Ammonium-Medium ( Tabelle 3)
HABA	Hydroxy-Azophenylbenzoyl-Säure (eng.: <i>Hydroxy-Azophenylbenzoic Acid</i> )
ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma with optical emission spectroscopy</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasen (1000 Bp)
(k)Da	(Kilo-) Dalton
LSLB	Niedrigsalz-Luria-Bertani Medium ( Tabelle 3)
MBH	Membrangebundene Hydrogenase
MBP	Maltose-Binde-Protein ( <i>malE</i> )
MCS	<i>Multiple-Cloning-Site</i>
MCD	Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid
MoCo	Molybdän-Kofaktor
MWCO	engl.: <i>Molecular Weight Cut Off</i> (Ausschlussgrenze)
$N^{10}$ -CHO-THF	$N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NB	Nutrient-Broth Medium ( Tabelle 3)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHase	Nitril-Hydratasen
NC-(Membran)	Nitrozellulose-(Membran)
OD	OD (Maßeinheit für Lichtstreuung)
PDB	<i>Protein Database</i>
ppm(v)	Teile von einer Millionen (engl.: <i>parts per million</i> )
PTFE	Polytetrafluorethylen
RH	Regulatorische Hydrogenase
RT	Raumtemperatur
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SH	Lösliche Hydrogenase
SHMT	Serinehydroxymethyltransferase
SI	Stabile(s) Isotop(en)
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> -Medium
SV	Säulenvolumen
THF	Tetrahydrofolat
TGYEP	<i>Tryptone-Glucose-Yeast extract-Phosphate</i> -Medium ( Tabelle 3)
U	Einheit (engl.: <i>Unit</i> )
ÜN	übernacht
upm	Umdrehungen pro Minute
x g	Vielfaches der Erdschwerebeschleunigung ( $9.81 \text{ m} \cdot \text{sec}^{-1}$ )
v/v	Volumenanteil pro Volumen (engl.: <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i> )
WT	Wildtyp
XDH	Xanthin-Dehydrogenase



# 1 Einleitung

Molekularer Wasserstoff besteht aus zwei Wasseratomen und ist ein farbloses, ungiftiges, brennbares Gas. Entdeckt wurde der Wasserstoff im Jahre 1766 von dem englischen Chemiker Henry Cavendish (Schwenk 1998). In jüngerer Vergangenheit wurde Wasserstoff als Energieträger bzw. Energiespeicher ein enormes öffentliches Interesse zuteil.

Bei der Oxidation von Wasserstoff mit Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor entstehen große Mengen freier Energie ( $\Delta G^0 = -237,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Dabei entstehen keine schädlichen Nebenprodukte wie bei der Verbrennung von z. B. Kohlenwasserstoffen (fossile Brennstoffe) oder wie bei der Verwendung von Kernbrennstoffen.

Zur kommerziellen Herstellung von Wasserstoff gibt es gegenwärtig im Wesentlichen zwei Verfahren. Bei der Dampfreformation reagieren Kohlenwasserstoffe mit Wasser, bei der partiellen Oxidation reagiert Erdgas mit Sauerstoff (Häussinger, Lohmüller *et al.* 2000). Das Endprodukt beider Synthesen ist das sogenannte Synthesegas, eine Mischung aus Wasserstoff und Kohlenmonoxid. Diese Art der Wasserstoffgewinnung hat allerdings enorme Nachteile. Zum einen geht mit ihr immer auch die Produktion von klimaschädlichem Kohlenmonoxid einher, zum anderen müssen Kohlenmonoxid und Wasserstoff aufwendig getrennt werden, da CO für die meisten Wasserstoffkatalysatoren toxisch ist (Vincent, Cracknell *et al.* 2005).

Verschiedene physikalische Eigenschaften machen  $\text{H}_2$  zu einer recht stabilen chemischen Verbindung; (I)  $\text{H}_2$  hat eine sehr hohe Dissoziationsenergie, (II)  $\text{H}_2$  ist komplett unpolar und (III)  $\text{H}_2$  ist eine äußerst schwache Säure (Siegbahn, Tye *et al.* 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften läuft die Wasserstoffspaltung regelmäßig nur mittels eines Katalysators ab. Der beste bekannte Katalysator für Bindung und Spaltung von Wasserstoff ist das Edelmetall Platin (Grove 1839; Schönbein 1839). Platin ist jedoch so knapp und teuer, dass es nicht für den kommerziellen Einsatz in Massenprodukten geeignet ist. Die Suche nach billigen und reichlich verfügbaren Alternativen für diese Edelmetallkatalysatoren ist folglich eine der Grundvoraussetzung für die Etablierung einer wasserstoffbasierten Energiewirtschaft. Vorbilder für solche alternativen, preisgünstigen Katalysatoren sind in der Natur zu finden (Cammack R. 2001).

## 1.1 Die Bedeutung von Wasserstoff in der biotischen Welt

Neben zu vernachlässigenden anthropogenen Ursachen für Wasserstoffentwicklung spielen vor allem geochemische Prozesse, aber auch biologische Faktoren bei der Bildung und Erhaltung der atmosphärischen Wasserstoffkonzentration eine wichtige Rolle. Durch geochemische Prozesse, wie z. B. der sogenannten *Serpentinization* (engl.) kommt es in den tieferen Schichten

der Erdkruste zur Bildung großer Mengen Wasserstoffs (Sleep, Meibom *et al.* 2004). Diese gelangen u. a. durch vulkanische Ausgasung in die Erdatmosphäre. Neben diesen abiotischen Ursachen für Wasserstoffentwicklung sind als biotischen Ursachen vor allem die Stickstofffixierung, aber auch anaerobe Gärungsprozesse zu nennen. Während heutzutage der meiste molekulare Wasserstoff durch mikrobielle Lebensgemeinschaften verbraucht wird und nur noch geringe Menge in aerobe Habitate bzw. die Atmosphäre gelangt (Conrad 1996; Cammack R. 2001; Vignais und Billoud 2007), kam es in früheren, präbiotischen Epochen der Erdgeschichte zu einer Anreicherung von H<sub>2</sub> auf bis zu 30 % (v/v) in der Atmosphäre (Tian, Toon *et al.* 2005). Solche Bedingungen in der Atmosphäre stellten eine ideale Energiequelle für biologische Prozesse dar. Wegen des äußerst geringen Normalpotentials von Wasserstoff von  $2H^+/H_2$ ,  $E^0 = -420 \text{ mV}$  kann er für die Reduktion aller Komponenten der Atmungskette sowie der meisten anderen Elektronenakzeptoren verwendet werden.

Da Mikroorganismen Energie nur mittelbar in Form von H<sub>2</sub> nutzen bzw. speichern können, muss der Wasserstoff zunächst oxidiert werden. Die resultierende, freie Energie kann dann in Form von Reduktionsäquivalenten gespeichert oder die Elektronen in die Atmungskette eingespeist werden. Über die Atmungskette wiederum wird ein Protonengradient über die Cytoplasmamembran aufgebaut. Die erzeugte protonenmotorische Kraft treibt ATP-Synthasen an und generiert so ATP (Mitchell 1961). ATP wiederum treibt eine Vielzahl von biologischen Prozessen an.

Für die biologische Oxidation von H<sub>2</sub> mussten sich zunächst Katalysatoren ausbilden, die den Zellen die Aktivierung von H<sub>2</sub> ermöglichten. Da Edelmetalle wie Platin zu selten sind, um eine bedeutende Rolle in der Evolution solcher Enzyme einzunehmen, mussten diese als Katalysatoren ersetzt werden. Die „Erfindung“ von Enzymen mit neuartigen katalytischen Eigenschaften war somit ein notwendiger Schritt zur Nutzbarmachung dieses wertvollen Energiereservoirs. Diese Enzyme, die in der Lage sind H<sub>2</sub> zu aktivieren, heißen Hydrogenasen.

## **1.2 Hydrogenasen – Schlüsselenzyme des lithotropen Lebensstils**

Hydrogenasen sind die Schlüsselenzyme im Wasserstoffmetabolismus. Der Begriff „Hydrogenase“ wurde erstmals 1931 von M. Stephenson für H<sub>2</sub>-produzierende Enzyme definiert (Stephenson und Stickland 1931). Mittlerweile sind drei, phylogenetisch nicht verwandte, Klassen von Hydrogenasen bekannt. Im Allgemeinen katalysieren Hydrogenasen die Oxidation von H<sub>2</sub> bzw. die Reduktion von zwei Protonen,



wobei es allerdings signifikante Unterschiede im Reaktionsgleichgewicht zwischen den verschiedenen Klassen gibt. Die drei Klassen werden anhand der Metall-Kofaktoren in ihren aktiven Zentren unterschieden. Man kennt [NiFe]-, [FeFe]- und [Fe]-Hydrogenasen (Fontecilla-Camps, Volbeda *et al.* 2007; Vignais und Billoud 2007).

### 1.2.1 [Fe]-Hydrogenasen

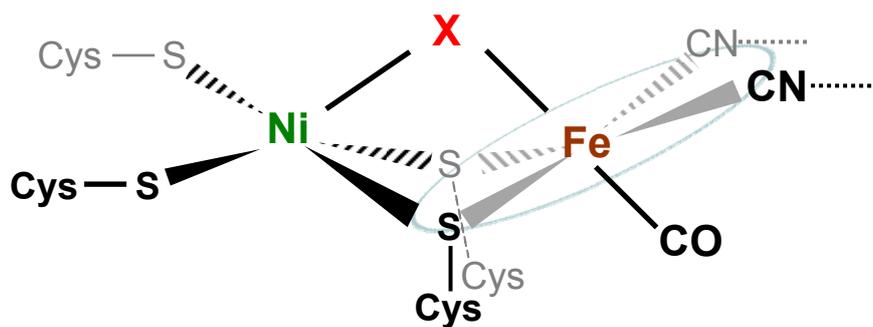
Die Klasse der [Fe]-Hydrogenasen, vormals auch eisenfreie Hydrogenasen genannt, wurde in *Methanothermobacter marburgensis* entdeckt und charakterisiert (Zirngibl, Van Dongen *et al.* 1992). Als Ausnahme von der obigen Definition übertragen [Fe]-Hydrogenasen Hydride von Wasserstoff auf einen gebundenen Kofaktor, wobei durch die reversible Oxidation von H<sub>2</sub> gleichzeitig Methenyl-Tetrahydromethanopterin (Methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup>) zu Methylen-H<sub>4</sub>MPT und H<sub>2</sub> reduziert wird (Vogt, Lyon *et al.* 2008). Dieser Prozess dient der Eliminierung überschüssiger Reduktionsäquivalente und ist Teil der wasserstoffabhängigen CO<sub>2</sub>-Reduktion zu Methan (Thauer 1998). Bis *dato* konnten [Fe]-Hydrogenasen nur in einigen Methanogenen identifiziert werden. Dieser Hydrogenasetyp besteht aus zwei identischen, ca. 38 kDa großen Untereinheiten. Anders als ursprünglich gedacht enthält auch diese Hydrogenase einen eisenhaltigen Kofaktor, allerdings keine FeS-Zentren (Zirngibl, Van Dongen *et al.* 1992; Thauer, Klein *et al.* 1996). Mittlerweile konnte die Kristallstruktur der [Fe]-Hydrogenase mit und ohne Kofaktor gelöst werden (Pilak, Mamat *et al.* 2006; Shima, Pilak *et al.* 2008).

### 1.2.2 [FeFe]-Hydrogenasen

Die zweite Klasse von Hydrogenasen, die [FeFe]-Hydrogenasen, findet man in anaeroben Prokaryoten, aber auch in einigen niedrigen Eukaryoten (Akhmanova, Voncken *et al.* 1998; Atta and Meyer 2000; Voncken, Boxma *et al.* 2002; Vignais and Billoud 2007). Diese Hydrogenasen sind damit die Einzigen, die auch in Eukaryoten zu finden sind (Vignais and Billoud 2007). [FeFe]-Hydrogenasen sind vornehmlich H<sub>2</sub>-produzierende Hydrogenasen (Produktionsrate: 10.000 s<sup>-1</sup>) (Vincent, Parkin *et al.* 2007), ihre primäre physiologische Funktion ist die Freisetzung von überschüssigen Reduktionsäquivalenten. [FeFe]-Hydrogenasen besitzen ein komplexes aktives Zentrum, den sogenannten *H-Cluster*. Der *H-Cluster* besteht aus einem binuklearen [FeFe]-Zentrum, welches über ein verbrückendes Cystein an ein [4Fe4S]-Zentrum gekoppelt ist. Beide Eisenatome sind darüber hinaus über die zwei Schwefelatome und einen verbrückenden Carbonylliganden miteinander verbunden. Jedes dieser Eisenatome besitzt überdies noch jeweils einen CN<sup>-</sup>-Liganden und einen CO-Liganden.

### 1.2.3 [NiFe]-Hydrogenasen

Die vielfältigste Hydrogenaseklasse ist die Klasse der [NiFe]-Hydrogenasen. Das Basismodul dieser Enzyme ist ein Heterodimer. Dieses besteht aus einer kleinen (bis zu 30 kDa) und einer großen Untereinheit (ca. 50 - 60 kDa). [NiFe]-Hydrogenasen sind oft mit anderen Untereinheiten assoziiert und bilden mit diesen multimere Komplexe mit diversen Funktionen. Während die große Untereinheit das aktive Zentrum beherbergt, sind in der kleinen Untereinheit bis zu drei [FeS]-Zentren koordiniert. Diese dienen dem reversiblen Elektronentransport auf die Elektronenakzeptoren (Pinske, Kruger *et al.* 2011). Die Eisen-Schwefel-Zentren sind zumeist [4Fe4S]-Zentren (Garcin, Vernede *et al.* 1999; Valente, Oliveira *et al.* 2005), allerdings sind auch modifizierte [3Fe4S]-Zentren (Volbeda, Charon *et al.* 1995; Fontecilla-Camps, Frey *et al.* 1997; Rousset, Montet *et al.* 1998) und auch [4Fe3S]-Zentren (Fritsch, Scheerer *et al.* 2011; Goris, Wait *et al.* 2011; Shomura, Yoon *et al.* 2011) bekannt.



**Abbildung 1-1: Das aktive Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen.** Das binukleare Zentrum wird über zwei verbrückenden und zwei endständige Thiolliganden (Cysteine) im Protein koordiniert. Das Eisen wird darüber hinaus noch durch drei diatomare Liganden koordiniert. Die Cyanidliganden bilden Wasserstoffbrücken mit dem Proteinerückgrat aus, welche die gesamte prosthetische Gruppe zusätzlich stabilisieren. Die verbrückenden Thiolgruppen und die CN-Liganden liegen in einer äquatorialen Ebene. Im Gegensatz dazu liegt der CO-Ligand *in trans*-Position zur Koordinierungsstelle des H<sub>2</sub>-Moleküls (X). Nach Gordon und Kubas (2010).

Das aktive Zentrum besteht aus zwei Übergangsmetallen, einem Nickel und einem Eisen. Das Nickel wird über insgesamt über vier Cystein-Schwefel im Protein gebunden. Während zwei dieser Cysteine exklusiv das Nickel koordinieren, dienen die beiden verbrückenden Cysteine gleichzeitig der Koordinierung des Eisenatoms. Darüber hinaus koordiniert das Eisen drei diatomare Liganden, zwei Cyanide (CN<sup>-</sup>) und einen Carbonylliganden (CO), deren Funktion im Folgenden erklärt wird.

Die Klasse der [NiFe]-Hydrogenasen wird traditionell in vier Gruppen unterteilt (Wu und Mandrand 1993; Vignais, Billoud *et al.* 2001; Vignais und Billoud 2007); die membrangebundenen, wasserstoffoxidierenden Hydrogenasen (Bernhard, Schwartz *et al.* 1996; Bernhard, Friedrich *et al.* 2000) (Gruppe 1), die cyanobakteriellen H<sub>2</sub>-oxidierenden (Ludwig,

Schulz-Friedrich *et al.* 2006; Tamagnini, Leitao *et al.* 2007) und regulatorischen Hydrogenasen (Lenz, Strack *et al.* 1997; Lenz und Friedrich 1998; Kleihues, Lenz *et al.* 2000; Buhrke, Brecht *et al.* 2002; Buhrke, Lenz *et al.* 2004) (Gruppe 2), die bidirektionalen, heteromultimeren, cytoplasmatischen Hydrogenasen (Schneider und Schlegel 1976; Schwartz, Henne *et al.* 2003; Van der Linden, Burgdorf *et al.* 2004; Burgdorf, van der Linden *et al.* 2005) (Gruppe 3) und die H<sub>2</sub>-produzierenden, membranassoziierten, multimeren Hydrogenasen (Sawers 2005) (Gruppe 4).

Jüngst konnte eine fünfte Gruppe von [NiFe]-Hydrogenasen identifiziert werden. Diese Gruppe besteht aus – vermutlich löslichen – hochaffinen Hydrogenasen, die in der Lage sind den energetischen Grundumsatz des Wirtsorganismus ausschließlich durch die Oxidation von atmosphärischem Wasserstoff zu sichern. Diese Klasse der Hydrogenasen kommt vorzugsweise in Stämmen der Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria und Chloroflexi vor (Constant, Chowdhury *et al.* 2010; Constant, Chowdhury *et al.* 2011).

Mittlerweile existiert eine Vielzahl von Kristallstrukturen von [NiFe]-Hydrogenasen aus verschiedensten Organismen (Volbeda, Charon *et al.* 1995; Volbeda, Garcin *et al.* 1996; Rousset, Montet *et al.* 1998; Higuchi, Ogata *et al.* 1999; Ogata, Hirota *et al.* 2005; Volbeda, Martin *et al.* 2005; Ogata, Lubitz *et al.* 2009; Ogata, Kellers *et al.* 2010; Fritsch, Scheerer *et al.* 2011; Shomura, Yoon *et al.* 2011).

### **1.3 Die Funktionen der diatomaren Liganden im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen**

Obwohl sich die drei Hydrogenaseklassen phylogenetisch unabhängig voneinander entwickelt haben, weisen alle Hydrogenasen gemeinsame Merkmale auf. Neben einem *low-spin* Eisen besitzen alle drei Klassen einen am Eisen koordinierten Carbonylliganden, der *in trans* zur vermuteten Koordinierungsstelle des Wasserstoffs liegt. Neben diesen universalen Komponenten weisen zwei der drei Klassen zusätzlich noch jeweils zwei Cyanidliganden auf. Interessanterweise konnten die in Hydrogenasen beobachteten diatomaren Liganden (CN<sup>-</sup>- und Carbonylliganden) bis *dato* in keinem anderen H<sub>2</sub>-unabhängigen, biologischen System beobachtet werden (Gordon und Kubas 2010).

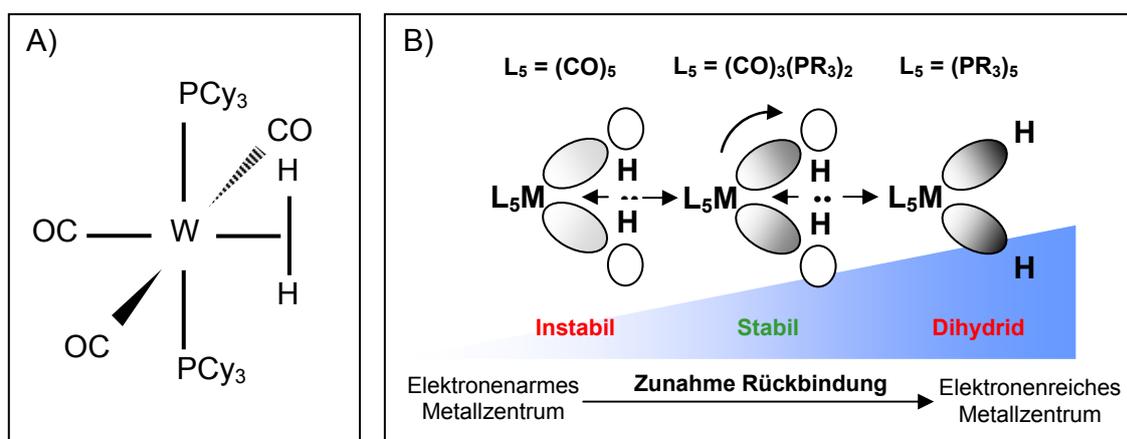
Diese Beobachtungen legen eine essentielle Funktion dieser Komponenten im Rahmen der heterolytischen Spaltung von Wasserstoff nahe. Im Folgenden soll die Funktion der jeweiligen Komponenten erörtert werden.

#### **1.3.1 Koordinationschemie von molekularem Wasserstoff**

Molekularer Wasserstoff, H<sub>2</sub>, besitzt keine Valenzelektronen, welche das Metall-Ion binden könnten. Zwischen beiden Wasserstoffatomen besteht eine starke  $\sigma$ -Bindung von ca. 102

kcal/mol (Gordon und Kubas 2010). Es war daher lange Zeit unklar wie Wasserstoff durch einen organometallischen Komplex aktiviert werden kann.

Erstmals 1984 wurde ein echter  $H_2$ -Komplex zwischen einem  $H_2$  und einem ligandierten Metall-Ion  $W(CO)_3(PR_3)_2$  isoliert. Dieser zeigte, dass der Wasserstoff über eine  $M-\eta^2-H_2$ -Bindung seitlich an das Metall-Ion gebunden ist (Abbildung 1-2 A), was bedeutet, dass es keine direkte Bindungsachse zwischen den Protonen und dem Metall-Ion gibt (Kubas, Ryan *et al.* 1984). Diese Art der Komplexbildung wird  $\sigma$ -Komplex genannt. Bemerkenswert ist, dass die Bindungsstärke zwischen dem Metall-Ion und dem bindenden Elektronenpaar nahezu so stark ausfallen kann wie mit einem freien Valenzelektron (Kubas 2007).



**Abbildung 1-2:  $H_2$ -Koordination und Stabilisierung in einem  $H_2$ -Modellkomplex.** A) Erster echter, synthetischer  $H_2$ -Komplex zwischen  $H_2$  und  $W(CO)_3(PR_3)_2$ . Darstellung entliehen aus (Kubas, Ryan *et al.* 1984). B) Der Einfluss der Rückbindung durch Übertragung von Elektronen aus den gefüllten d-Orbitalen des Metall-Ions auf die antibindenden Orbitale des  $H_2$ . Erklärt am Beispiel des  $W(CO)_3(PR_3)_2-H_2$ . Liegt der prozentuale Anteil der Rückbindung bei  $\leq 30\%$  ist die Bindung sehr schwach und der Komplex ist instabil, liegt der Anteil bei  $\sim 50\%$  ist die Bindung stabil und eine heterolytische Spaltung wird bevorzugt. Darstellung modifiziert nach Kubas (2007).

Die Bindung von Wasserstoff an einen Metallkomplex hängt entscheidend von dem Maß an Rückbindung ab. Diese entsteht, wenn Elektronen aus den gefüllten d-Orbitalen des Übergangsmetalls auf das antibindende Orbital des  $H_2$  ( $\sigma^*$ ) übertragen werden (Abbildung 1-2 B).

Dabei ist das Gleichgewicht der rückbindenden Kräfte von enormer Bedeutung für die Stabilität bzw. die Art und Weise der Wasserstoffaktivierung. Elektronenarme Metall-Ionen bringen nicht genug Rückbindung auf, um einen stabilen  $\sigma$ -Komplex auszubilden. Im Gegensatz dazu ermöglichen elektronenreiche Metall-Ionen nicht nur die Ausbildung einer stabilen  $M-\eta^2-H_2$ -Bindung, sondern führen darüber hinaus zu einer unerwünschten, oxidativen Addition der Hydride und zur Ausbildung eines Dihydridkomplexes (Kubas 2001). Folglich ist eine gemäßigte Rückbindung zu bevorzugen, da sich unter diesen Bedingungen nicht nur ein stabiler  $M-\eta^2-H_2$ -Komplex bildet - ohne dass es zur Bildung eines Dihydridkomplexes kommt, sondern unter solchen Bedingungen wird auch eine heterolytische Spaltung des  $H_2$  favorisiert. Ferner ist

ein ausgeglichenes Maß an Rückbindung entscheidend für hohe Umsatzraten der Katalyse (Gordon und Kubas 2010). Das Maß an Rückbindung wird dabei maßgeblich über die übrigen Liganden des Metall-Ions determiniert.

### 1.3.2 Funktion des CO-Liganden in Hydrogenasen

Wie bereits erwähnt, ist der CO-Ligand neben dem Eisen-Ion der einzige universale Bestandteil in allen drei Hydrogenaseklassen. Der Grund warum CO als ubiquitärer Ligand in allen Hydrogenasen vorkommt sind seine ausbalancierten  $\sigma$ -Donor/ $\pi$ -Akzeptor-Eigenschaften sowie seine intrinsische Stabilität (Radius, Bickelhaupt *et al.* 1998). Die unkonventionellen CO-Liganden entziehen dem Übergangsmetall Elektronen, was zu einer erhöhten Elektrophilie am Metall führt. Dabei ist eine Wirkung durch die Erhöhung der Lewis-Acidität am ausgeprägtesten, wenn sich der starke  $\pi$ -Akzeptor-Ligand (CO) *in trans* zur Koordinierungsstelle des H<sub>2</sub> befindet (Crabtree 2009). Der Verlust des Elektronenüberschusses am Metall-Ion hat zur Folge, dass die entstandene Rückbindung schwächer wird. So wird eine allzu starke Bindung oder gar die homolytische Spaltung des H<sub>2</sub> und folglich die Bildung eines Dihydridkomplexes vermieden (vergleiche dazu Kapitel 1.3.1).

Die Eigenschaften der verschiedenen Liganden bestimmen die Zusammensetzung der Liganden in Hydrogenasen; so sind z. B. CO-Liganden gute  $\sigma$ -Donoren und starke  $\pi$ -Akzeptoren. Cyanide hingegen sind sehr starke  $\sigma$ -Donoren aber nur schwache  $\pi$ -Akzeptoren und sind demnach unzureichend geeignet, um dem zentralen Metall-Ion die notwendige Lewis-Acidität zu verleihen.

### 1.3.3 Funktion der CN<sup>-</sup>-Liganden in [NiFe]-Hydrogenasen

Die Funktion der CN<sup>-</sup>-Liganden ist weit weniger genau verstanden als die Funktion des Carbonylliganden. Eine augenscheinliche Funktion scheint die Koordination der prosthetischen Gruppe, mittels Wasserstoffbrücken, im Protein zu sein. Allerdings kann diese Funktion allein die Verwendung der Cyanidliganden nur unzureichend erklären (Gordon und Kubas 2010).

Vielmehr scheint die Wahl der Cyanidliganden darin begründet zu sein, dass sie, gemäß der spektrochemischen Reihe, besonders starke Liganden sind (Lippard und Berg 1995).

Bei der Verteilung der d-Elektronen eines Übergangsmetalls in einem Komplex sind prinzipiell zwei Modi möglich; (I) alle Orbitale werden zunächst einfach besetzt, mit den verbleibenden Elektronen werden dann die energetisch niederen, stabilisierenden Orbitale aufgefüllt oder (II) es werden zunächst alle stabilisierenden Orbitale paarweise besetzt, bevor die destabilisierenden Orbitale einzeln besetzt werden. Der Zustand des Übergangsmetalls mit der größtmöglichen Anzahl

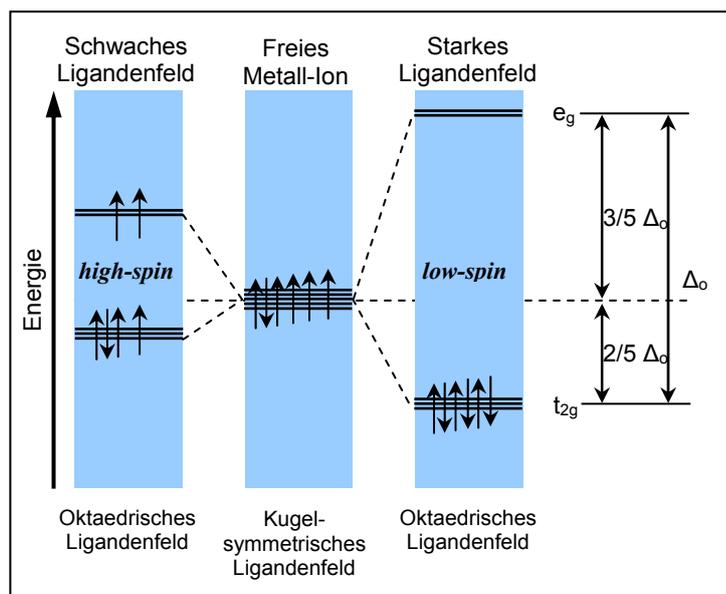


Abbildung 1-3: Die Effekte von starken und schwachen Liganden auf die Elektronenverteilung in  $d^6$ -Komplexen.

an ungepaarten Elektronen wird *high-spin* genannt, der mit der minimalen Anzahl an ungepaarten Elektronen, *low-spin* (Abbildung 1-3). Für das paarweise Besetzen eines Orbitals muss Energie, die Spinpaarungsenergie, aufgebracht werden. Übersteigt diese Energie die Stärke der Ligandenfeldaufspaltung nicht, lohnt sich der *Spin-crossover* energetisch nicht. Demnach fördern starke Liganden, wie  $\text{CN}^-$  aber auch  $\text{CO}$ , den Übergang bzw. die Aufrechterhaltung eines *low-spin* Zustandes (Atkins, Overton *et al.* 2009).

Obwohl  $\text{CO}$  an nahezu jeden ungesättigten Metall-Komplex binden kann, ist diese Bindung – insbesondere zu *high-spin* Metall-Ionen – nicht zwingend stark ausgeprägt (Calderazzo, Fachinetti *et al.* 1974; Wong und Brintzinger 1975). Eine solche Instabilität der Liganden im aktiven Zentrum von Hydrogenasen wäre nicht nur für die Aktivität des Enzyms nachteilig, aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften wäre eine Freisetzung der  $\text{CO}$ - bzw.  $\text{CN}^-$ -Liganden fatal für das biologische System. Anhand von Modellkomplexen konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Cyanide an ein *low-spin* Eisen Voraussetzung für die nachfolgende, stabile Bindung eines  $\text{CO}$ -Liganden ist (Moreland und Rauchfuss 2000; Rauchfuss, Contakes *et al.* 2001; Gordon und Kubas 2010).

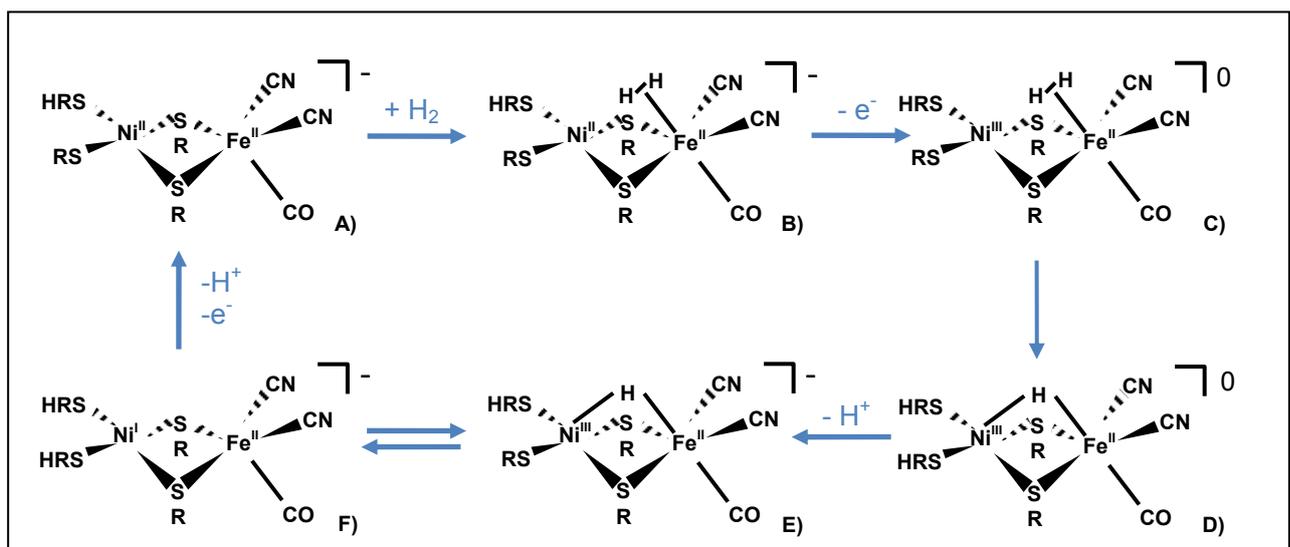
Es scheint somit klar zu sein, dass  $\text{CN}^-$ -Liganden die Stärke des Ligandenfeldes soweit erhöhen, dass ein *spin-crossover* am  $\text{Fe}^{\text{II}}$  möglich wird. Da, im Unterschied zu  $\text{CO}$ , die  $\text{CN}^-$ -Liganden ihre Bindungsstabilität nicht aus der Rückbindung der d-Orbitale in antibindende Orbitale der Liganden beziehen, sondern ihre stabile Bindung vielmehr auf den guten  $\sigma$ -Donor-Eigenschaften von  $\text{CN}^-$  beruht (Gordon und Kubas 2010), kann der *low-spin* Zustand über ein breites Spektrum an Redoxzuständen (Niu, Thomson *et al.* 1999; Volbeda und Fontecilla-Camps

2003; Greco, Zampella *et al.* 2006; Fontecilla-Camps, Amara *et al.* 2009) hinweg aufrecht erhalten werden.

In der Klasse der [Fe]-Hydrogenasen kennt man keine CN<sup>-</sup>-Liganden. Jüngere Untersuchungen lassen vermuten, dass ihre Funktion durch einen Guanylylpyridinol-Liganden übernommen wird (Shima, Pilak *et al.* 2008).

### 1.4 Der katalytische Zyklus von [NiFe]-Hydrogenasen

Im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen mit seinen diatomaren Liganden findet im Holoenzym die enzymatische Wasserstoffoxidation bzw. die Reduktion von Protonen statt. Es sei erwähnt, dass der genaue katalytische Zyklus von [NiFe]-Hydrogenasen derzeit nicht abschließend geklärt ist. Der im Folgenden umrissene Mechanismus der heterolytischen Wasserstoffspaltung in [NiFe]-Hydrogenasen stellt nur eines der gegenwärtig diskutierten Modelle dar.



**Abbildung 1-4: Postulierter katalytischer Zyklus in [NiFe]-Hydrogenasen.** Vereinfacht dargestellt nach Niu *et al.* Inaktive Zustände werden hier nicht gezeigt. R = Cysteinrest. (Niu, Thomson *et al.* 1999; Fontecilla-Camps, Amara *et al.* 2009).

Damit es zur Oxidation des H<sub>2</sub> kommen kann, muss es zunächst zum aktiven Zentrum gelangen. Dies geschieht in [NiFe]-Hydrogenasen über einen hydrophoben Gaskanal, welcher von der Oberfläche des Enzyms bis zum aktiven Zentrum reicht (Montet, Amara *et al.* 1997). Es wird angenommen, dass in allen Hydrogenasen das Eisen-Ion der Ort der Wasserstoffaktivierung ist. Dafür spricht die Tatsache, dass mindestens ein Eisen-Ion in jeder Hydrogenase präsent ist. Die mögliche Alternative, Ni, ist wie andere Übergangsmetalle mit einer höheren Ladungszahl ein schlechter „Rückbinder“, und konnte bisher niemals in einem stabilen Ni-η<sup>2</sup>-H<sub>2</sub>-Komplex isoliert werden (Gordon und Kubas 2010).

Als potentiell H<sub>2</sub>-aktivierendes Element wird das aktive Eisen über insgesamt vier Liganden mit dem Protein verbunden, zwei verbrückende Cysteine und die Wasserstoffbrücken zwischen den zwei Cyaniden und dem Protein. Berücksichtigt man zudem noch eine unbesetzte Koordinierungsstelle und den Carbonylliganden kommt für die Geometrie des Eisens und seiner Liganden nur die oktaedrische Geometrie eines d<sup>6</sup>-Komplexes in Frage. Diese Überlegung sieht sich durch zahlreiche Kristallstrukturen von [NiFe]-Hydrogenasen gestützt (Kapitel 1.2.3). Tatsächlich gibt es nur wenige Übergangsmetalle, die in der bioanorganischen Chemie von Bedeutung sind und 6 d-Elektronen besitzen, also eine oktaedrische Geometrie annehmen können; Tc<sup>I</sup>, Fe<sup>II</sup> und Co<sup>III</sup> (Lippard und Berg 1995). Ungeachtet seines geringen Vorkommens ist Technetium vollkommen ungeeignet, da alle seine Isotope instabil sind. Kobalt indes besitzt, wie Nickel, eine – im Vergleich zum Eisen – höhere Kernladungszahl, was die Bildung eines stabilen Co-η<sup>2</sup>-H<sub>2</sub>-Komplexes erschwert (siehe oben).

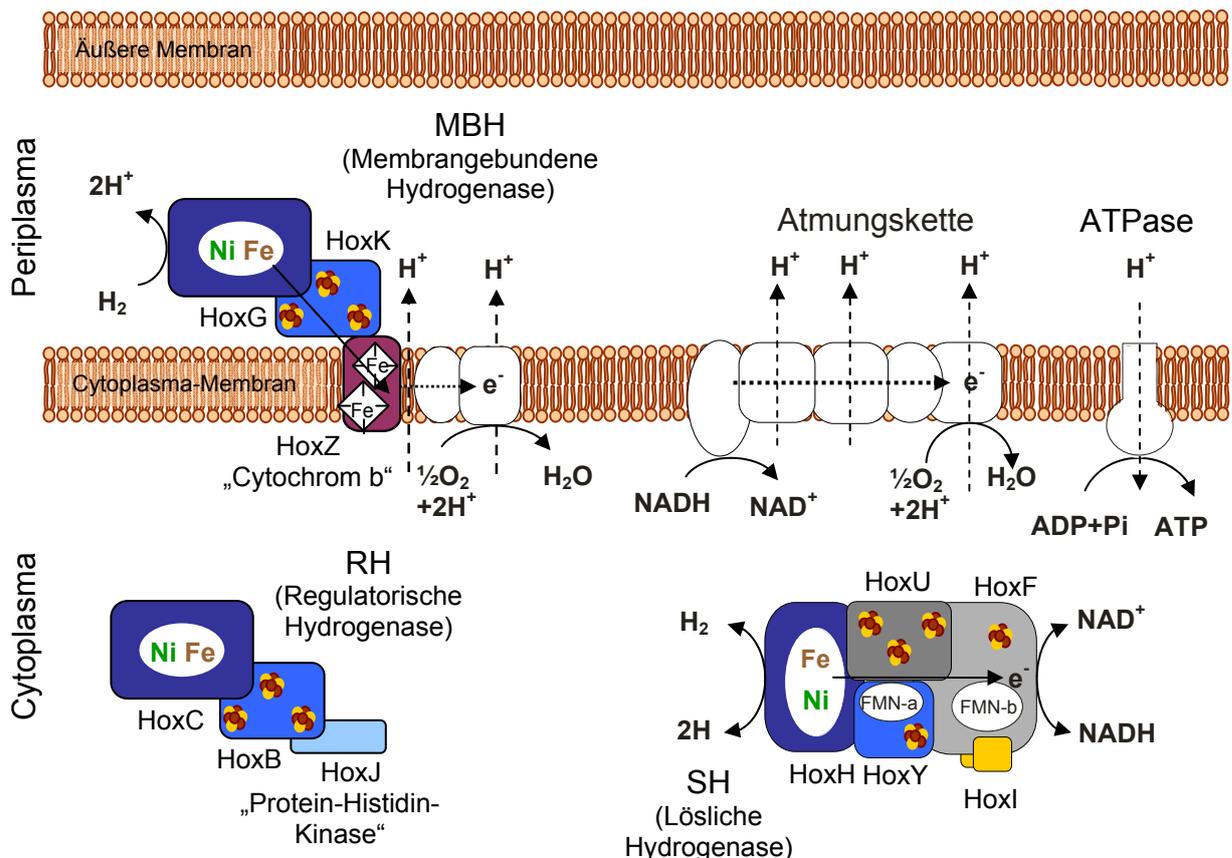
Während des katalytischen Zyklus durchläuft das aktive Zentrum eine Reihe von kleinen konformationellen Änderungen (Abbildung 1-4). In einem solchen Zyklus verbleibt das Eisen in der Oxidationsstufe +2, im Gegensatz dazu ändert das Nickel seine Oxidationsstufen im Laufe eines Zyklus von Ni<sup>2+</sup> über Ni<sup>3+</sup> zu Ni<sup>1+</sup> und wieder in den Ausgangszustand. Nach Bindung von H<sub>2</sub> an den „Ausgangszustand“ (A) kommt es zur Bildung des initialen Fe-η<sup>2</sup>-H<sub>2</sub>-Komplexes (B). Nach erfolgter Oxidation wechselt die Oxidationsstufe des Ni-Atoms von Ni<sup>2+</sup> zu Ni<sup>3+</sup> (C). Nachfolgend aktiviert dieser reaktive Nickelzustand das H<sub>2</sub>, worauf hin sich ein Hydrid als verbrückender Ligand zwischen Ni und Fe bildet (D). Nach der sich anschließenden Deprotonierung eines terminalen Cysteins bildet sich ein Intermediat mit einem verbrückenden Hydrid (E), welches reversibel in den Ni<sup>1+</sup>-Zustand (F) überführt wird, wobei der Hydridligand auf einen Cysteinrest übertragen wird. In einer zweiten formalen Oxidationsreaktion und einem damit einhergehenden Protonentransfer wird der „Ausgangszustand“ (A) wieder hergestellt. Kommt es im Anschluss zu einer zweiten Deprotonierung wird ein inaktiver, jedoch schnell reaktivierbarer Zustand hergestellt (Niu, Thomson *et al.* 1999).

## **1.5 Die sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* H16**

Die vorliegende Studie behandelt die Reifung des aktiven Zentrums von [NiFe]-Hydrogenasen, insbesondere die Biosynthese der diatomaren Liganden, im bakteriellen Modellsystem *Ralstonia eutropha* H16. *R. eutropha* ist ein fakultativ chemolithoautotrophes β-Proteobakterium und wurde im Jahr 1962 erstmalig isoliert und charakterisiert. *R. eutropha* vermag in einem Mineralsalzmedium sowohl chemolithoautotroph als auch heterotroph mit diversen Substraten wie Fruktose, Glycerol oder organischen Säuren als Kohlenstoff- und

Energiequellen zu wachsen (Wilde 1962). Dieser Mikroorganismus zählt zu den Knallgasbakterien. Das bedeutet, dass *R. eutropha* in der Lage ist  $H_2$  mit  $O_2$  als terminalen Elektronenakzeptor zu oxidieren (Friedrich und Schwartz 1993). Diese Art der Wasserstoffoxidation ermöglicht ein Maximum an Energieausbeute (siehe oben). Die Gegenwart von  $O_2$  stellt jedoch auch eine enorme Herausforderung sowohl an den katalytischen Mechanismus dieser [NiFe]-Hydrogenasen als auch die Reifung dieser Enzyme dar. Die hohe Toleranz seiner Hydrogenasen gegenüber molekularem Sauerstoff macht *Ralstonia eutropha* zu einem geeigneten Modellsystem zur Untersuchung der Mechanismen dieser Sauerstofftoleranz (Burgdorf, Lenz *et al.* 2005; Vincent, Cracknell *et al.* 2005; Vincent, Parkin *et al.* 2005; Lenz, Ludwig *et al.* 2010).

In *R. eutropha* gibt es drei verschiedene, gut charakterisierte [NiFe]-Hydrogenasen. Eine membranständige, zum Periplasma hin ausgerichtete Hydrogenase (MBH), eine lösliche cytoplasmatische Hydrogenase (SH) sowie eine ebenfalls cytoplasmatische, regulatorische Hydrogenase (RH) (Abbildung 1-5).

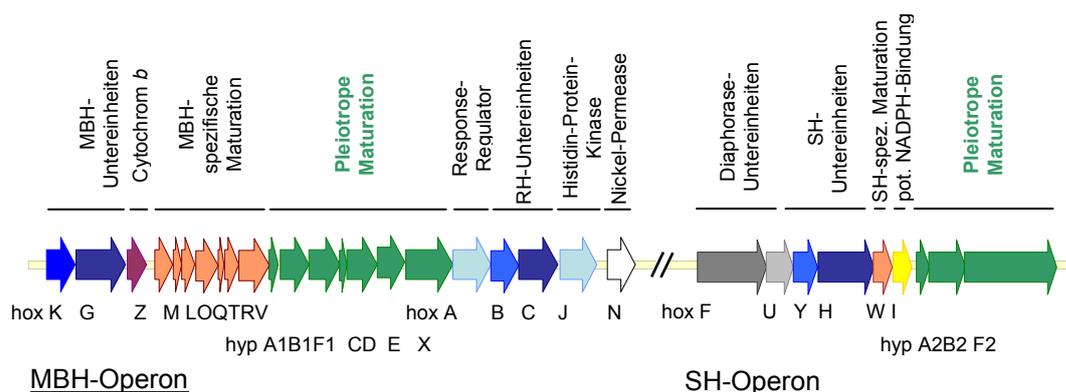


**Abbildung 1-5: Die drei [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha*.** Die Lokalisation der Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* im Aufriss einer Zelle. Die vierte Hydrogenase, die sogenannte AH (Actinomyceten-Hydrogenase) ist in diesem Schaubild nicht enthalten (Burgdorf, Lenz *et al.* 2005).

In seiner nativen Form ist die MBH ein Heterotrimer, bestehend aus der großen Untereinheit (HoxG), der kleinen Untereinheit (HoxK) sowie einem Cytochrom *b* (HoxZ). Die Elektronen, die bei der Oxidation von H<sub>2</sub> freigesetzt werden, werden entlang der Eisen-Schwefel-Zentren der kleinen Untereinheit über HoxZ in den Chinon-*Pool* eingespeist. Über die Atmungskette wird eine protonenmotorische Kraft aufgebaut, die zur ATP-Synthese verwendet werden kann (Schink und Schlegel 1979; Bernhard, Schwartz *et al.* 1996).

Die SH ist eine lösliche, heterohexamere Hydrogenase (HoxFUYHI<sub>2</sub>). Das Hydrogenase-Modul (HoxHY) stellt hier die Energie bereit, die das Diaphorase-Modul (HoxFU) benötigt, um durch die Reduktion eines Kofaktors (NAD<sup>+</sup>) Reduktionsäquivalente bereitzustellen (Burgdorf, Lenz *et al.* 2005; Burgdorf, van der Linden *et al.* 2005), wobei HoxI eine mutmaßliche Bindestelle für NADPH bildet (Burgdorf, van der Linden *et al.* 2005).

Die dritte Hydrogenase ist die regulatorische Hydrogenase (RH). Diese ist keine energie-konservierende Hydrogenase und ist folglich nicht in der Lage eigenständig autotrophes Wachstum zu vermitteln. In ihrer nativen Form ist die RH ein Doppel-Heterodimer (HoxBC)<sub>2</sub>. Die Dimerisierung der beiden Heterodimere bedarf einer 55 Aminosäure langen C-terminale Extension (Kleihues, Lenz *et al.* 2000). In ihrer Funktion als H<sub>2</sub>-Sensor liegt die RH in einem multimeren Komplex mit der Histidin-Protein-Kinase (HoxJ) vor. Dieser Komplex bildet mit dem *Response*-Regulator (HoxA) ein Zwei-Komponenten-System. In Gegenwart von H<sub>2</sub> aktiviert HoxA die Transkription der Hydrogenaseoperone (siehe Abbildung 1-6). Beide Operone werden durch  $\sigma^{54}$ -abhängige Promotoren reguliert (Lenz, Bernhard *et al.* 2002). In *Ralstonia eutropha* sind alle Hydrogenasegene auf dem Megaplasmid (pHG1) lokalisiert. Dieses ist für heterotrophes Wachstum entbehrlich.



**Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des MBH- und SH-Operons.** Das MBH-Operon umfasst 23012 Bp das SH-Operon ist 9845 Bp lang. Beide Transkriptionseinheiten sind auf dem Megaplasmid pHG1 lokalisiert (Schwartz, Henne *et al.* 2003).

Im Wildtyp H16 ist diese H<sub>2</sub>-abhängige Regulation jedoch durch eine Punktmutation (G422S) in der Histidin-Protein-Kinase HoxJ unterdrückt (Lenz und Friedrich 1998). Die

Expression wird nur über eine globale Katabolitkontrolle gesteuert, deren epistatischer Mechanismus weitgehend unaufgeklärt ist. Es scheint jedoch klar zu sein, dass das Wachstum auf schlecht verwertbaren Substraten (z.B. Glycerol) die Expression aktiviert (Friedrich 1981; Friedrich 1982).

Es sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass unlängst eine weitere Hydrogenase in *Ralstonia eutropha* identifiziert werden konnte (Schwartz, Henne *et al.* 2003; Pohlmann, Fricke *et al.* 2006). Diese vierte Hydrogenase, kodiert durch das *hof*-Operon, zeigt signifikante Ähnlichkeiten zu Hydrogenasen aus Actinomyceten. Da diese Hydrogenase derzeit noch nicht umfassend charakterisiert ist, soll an dieser Stelle nicht weiter auf sie eingegangen werden.

## 1.6 Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen

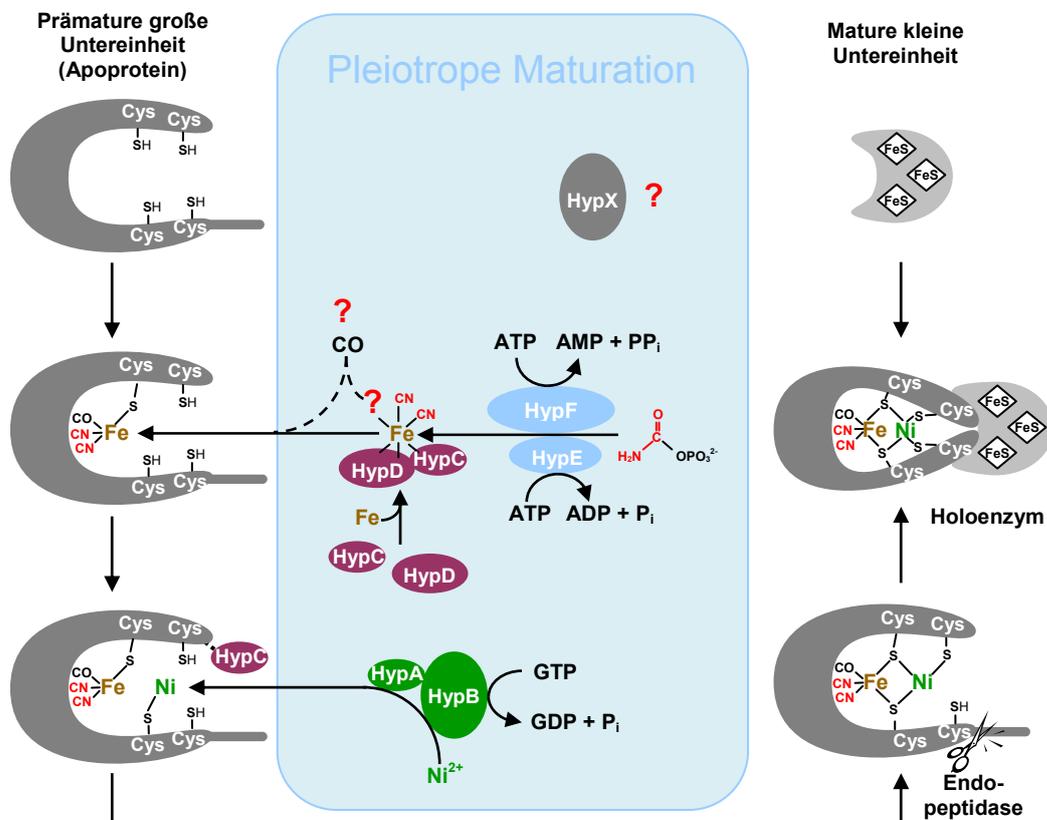
Als Maturation oder Reifung bezeichnet man die umfangreichen posttranslationalen Modifikationen, die ein Apoprotein unterlaufen muss, damit es zu einem funktionalen Holoenzym werden kann. In der Maturation der großen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen unterscheidet man dabei zwei Phasen.

Die frühe Phase ist für alle Hydrogenasen eines Organismus gleich, sie befasst sich mit dem Einbau der prosthetischen Gruppe im aktiven Zentrum (Abbildung 1-7). Dazu zählen die Biosynthese der diatomaren Liganden, der Zusammenbau des prosthetischen  $\text{Fe}(\text{R})_2(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Clusters sowie die Insertion des Nickel-Kofaktors in das Apoprotein. Die akzessorischen Proteine, die für die Modifikationen notwendig sind, werden durch die *hyp*-Gene (von engl.: *hydrogenase pleiotropic*) kodiert und sind in allen Hydrogenase-exprimierenden Organismen anzutreffen. Diese werden koordiniert in einem Operon reguliert und exprimiert.

In *R. eutropha* kennt man zwei gut charakterisierte *hyp*-Transkriptionseinheiten. Im MBH-Operon findet sich ein kompletter Satz mit sieben *hyp*-Genen. Frühe Deletionsstudien zur Funktion von *hypA1B1F1CDEX* im MBH-Operon zeigten, dass drei dieser akzessorischen Gene Duplikate im SH-Operon besitzen, *hypA2B2F2* (siehe Abbildung 1-6). Dabei kann der Verlust jedes Hyp-Proteins durch die Funktion seines Homologs komplementiert werden (Dernedde, Eitinger *et al.* 1993; Dernedde, Eitinger *et al.* 1996; Wolf, Buhrke *et al.* 1998).

Unter dem Aspekt einer zukünftigen biotechnologischen Anwendung von Hydrogenasen kommt der pleiotropen Maturation besondere Bedeutung zu. Zum einem sind umfangreiche Kenntnisse dieser Prozesse für eine heterologe Expression von Hydrogenasen notwendig, zum anderen sind sie auch für die Synthese von künstlichen Wasserstoffkatalysatoren wertvoll. So lassen sich auch die enormen Anstrengungen erklären, die für dieses Teilgebiet der

Hydrogenaseforschung in den letzten Jahrzehnten aufgewandt wurden (Sawers 1994; Böck, King *et al.* 2006; Forzi und Sawers 2007).



**Abbildung 1-7: Die pleiotrope Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen.** Nach Synthese des Apoproteins unterläuft dieses noch zahlreiche posttranslationale Modifikationen. Diese werden als Maturation oder Reifung bezeichnet. Die *pleiotrope Maturation*, welche sich mit der Synthese und dem Einbau der prosthetischen Gruppe befasst, wird durch die sogenannten *hyp*-Genprodukte (engl.: *hydrogenase pleiotropic*) katalysiert. In *Ralstonia eutropha* sind sieben unterschiedliche *hyp*-Gene bekannt. Die mit einem Fragezeichen gekennzeichneten Schritte; die Funktion von HypX, die Synthese des Carbonylliganden, sowie der exakte Punkt der Assemblierung sind Gegenstand dieser Studie. Modifiziert nach Forzi und Sawers (2007).

Die zweite, spätere Phase der Maturation umfasst eine Reihe von Modifikationen, die für jede Hydrogenase spezifisch sind. Sie werden von spezifischen akzessorischen Proteinen katalysiert und sind nicht bei allen Hydrogenasen zu finden. Zu dieser Phase zählen unter anderem der proteolytische Abbau einer C-terminalen Extension, zusätzliche Zwischenschritte beim Einbau der prosthetischen Fe(CN)<sub>2</sub>(CO)-Gruppe in die große Untereinheit und der TAT-vermittelte Export von periplasmatischen Hydrogenasen.

Das Apoprotein der kleinen Untereinheit hingegen wird im Laufe der Maturation mit Eisen-Schwefel-Clustern bestückt. Diese übernehmen im fertigen Holoenzym die Funktion des Elektronentransfers.

Basierend auf Erkenntnissen aus verschiedenen Modellorganismen konnte ein detailliertes Modell der Maturation erstellt werden. Die einzelnen Schritte dieses Modells sind in Abbildung 1-7 dargestellt und sollen nachfolgend detailliert besprochen werden.

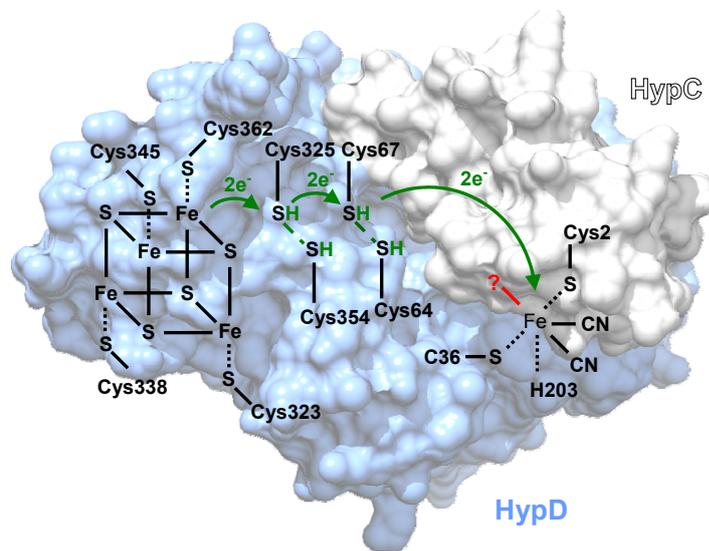
### 1.6.1 Synthese der Cyanidliganden

Die ersten Schritte in der Synthese des aktiven Zentrums werden von den akzessorischen Proteinen HypE und HypF katalysiert. Untersuchungen zeigten, dass Carbamoylphosphat (CP) als Substrat für die Synthese des CN<sup>-</sup>-Liganden dient (Paschos, Glass *et al.* 2001; Paschos, Bauer *et al.* 2002). Die ersten wichtigen Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismus lieferten Sequenzanalysen an HypF. Diese zeigten, dass HypF mehrere distinkte und hochkonservierte Motive enthält. Neben einer Acylphosphatase-Domäne im N-Terminus wurden zwei Zink-Finger-Motive und ein Ornithin-Carbamoyltransferase-Motiv identifiziert. Carbamoylphosphat wird in einer ATP-abhängigen Reaktion durch HypF aktiviert. Die Carbamoylgruppe des dabei entstehenden Carbamoyladenylat-Intermediats (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Petkun, Shi *et al.* 2011) wird im Zuge der Synthese auf die Thiolgruppe des C-terminalen Cysteins in HypE transferiert. Das resultierende Thiocarbamat wird durch die enzymatische Aktivität von HypE in einer weiteren ATP-abhängigen Reaktion dehydratisiert (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Blokesch, Paschos *et al.* 2004; Rangarajan, Asinas *et al.* 2008), dies führt zur Bildung eines Thiocyanats. Sowohl die Acylphosphatase-Domäne aus HypF als auch eine ACP-freie Variante des HypF aus *E. coli* wurden kristallisiert (Rosano, Zuccotti *et al.* 2002; Petkun, Shi *et al.* 2011). Darüber hinaus existieren noch Kristallstrukturen von HypE aus *Thermococcus kodakarensis* und *Desulfofibrio vulgaris* (Shomura, Komori *et al.* 2007; Watanabe, Arai *et al.* 2009).

### 1.6.2 Der HypCD-Komplex – Zentrales Element der Maturation

In der Sequenz der einzelnen Maturationsschritte folgt als Nächstes der Transfer der kovalent an HypE gebundenen Nitrilgruppe auf den HypCD-Komplex (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Blokesch, Paschos *et al.* 2004; Roseboom, Blokesch *et al.* 2005). Dieser Komplex ist ein zentrales Element der pleiotropen Maturation. Komplexstudien erbrachten sowohl den Nachweis für einen Komplex zwischen HypE, HypD und HypC auf der einen Seite als auch zwischen HypC und den großen Untereinheiten der Hydrogenasen auf der anderen Seite (Magalon und Bock 2000; Blokesch und Böck 2002; Blokesch, Albracht *et al.* 2004; Jones, Lenz *et al.* 2004). Radioaktive <sup>14</sup>C-Markierungsexperimente zeigten, dass das Cyanid des kovalent gebundenen Thiocyanats von HypE auf den Komplex übertragen wird (Blokesch, Paschos *et al.* 2004). Watanabe *et al.* konnten anhand von Kristallstrukturen von HypC, HypD und HypE aus *Thermococcus kodakarensis* und biochemischen Untersuchungen aus *E. coli* ein Modell

herleiten, welches die Prozesse im HypCD-Komplex beleuchtet (siehe Abbildung 1-8) (Blokesh und Böck 2006; Watanabe, Matsumi *et al.* 2007). So werden die Elektronen, die für die nukleophile Übertragung des Cyanidliganden auf das designierte „katalytische“ Eisen notwendig sind, durch die Oxidation von zwei freien Thiolgruppen freigesetzt. Die Regeneration der resultierenden Disulfidbrücken soll dabei durch Elektronen bewerkstelligt werden, die - nach Art der Ferredoxin:Thioedoxin Reduktase (FTR) - durch den [4Fe-4S]-Cluster in HypD bereitgestellt werden (Dai, Schwendtmayer *et al.* 2000). So fundamental die Rolle des HypCD-Komplexes innerhalb der Reifung auch sein mag, so vielfältig sind auch die offenen Fragen im Zusammenhang mit diesem Komplex. Aufgrund der vorliegenden Daten aus radioaktiven Markierungsexperimenten konnte zweifelsfrei nur eine qualitative Aussage über das



**Abbildung 1-8: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Ligandierung des „katalytischen“ Eisens im HypCD-Komplex.** Die Nummerierung der AS bezieht sich auf *R.e.*HypC und *R.e.*HypD1. Die postulierten Elektronentransfers sind in Grün gekennzeichnet. Die entsprechenden Thiolgruppen sind durch grüne H-Atome markiert. Das rote Fragezeichen markiert die mögliche Bindestelle des Carbonylliganden. Im Hintergrund sind die Kristallstrukturen von HypC (2Z1C) und HypD (2Z1D) aus *Thermococcus kodakarensis* abgebildet. Weitere Informationen im Text. Die räumliche Zuordnung der abgebildeten Strukturen entspricht nicht ihrer Position im jeweiligen Protein. Adaptiert aus Watanabe, Matsumi *et al.* (2007).

Vorhandensein eines CN<sup>-</sup>-Liganden im Komplex getroffen werden (Blokesh, Albracht *et al.* 2004). Auch ist die Herkunft dieses Eisens noch unklar. Aber eine der wohl vordringlichsten Fragen betrifft den Carbonylliganden. Obgleich es keinerlei biochemische oder spektroskopische Beweise für die Existenz des CO-Liganden im HypCD-Komplex gibt, wird dessen Präsenz in diesem Komplex antizipiert (Watanabe, Matsumi *et al.* 2007).

<sup>1</sup> Gemeint ist das Eisen im HypCD-Komplex, welches die diatomaren Liganden koordiniert und mutmaßlich in die großen Untereinheiten der Hydrogenase transferiert wird, um dort integraler Bestandteil des aktiven Zentrums zu werden.

### 1.6.3 Nickel-Einbau

Für den Einbau von Nickel sind zwei weitere akzessorische Proteine, HypA und HypB, notwendig. Es konnte eine Akkumulation von nickelfreien großen Untereinheiten in verschiedenen *hyp*-Mutanten beobachtet werden (Maier, Jacobi *et al.* 1993; Magalon und Bock 2000). Die Deletion von *hypB* (Lutz, Jacobi *et al.* 1991; Jacobi, Rossmann *et al.* 1992; Maier, Lottspeich *et al.* 1995) und *hypA* (Hube, Blokesch *et al.* 2002) kann durch die Gabe großer Mengen Ni<sup>II</sup> in das Medium komplementiert werden (Waugh und Boxer 1986).

Durch Untersuchungen an Nickeltransportmutanten konnte die Reihenfolge ermittelt werden, in der die beiden Übergangsmetalle - Nickel und Eisen - in die prämaturre große Untereinheit eingebaut werden. Dabei geht der Einbau des Eisens dem Einbau des Nickels voran (Maier und Bock 1996; Chung und Zamble 2011). HypA erfüllt dabei für den Nickeleinbau die Funktion eines Gerüstproteins und ist für die Bildung des Komplexes zwischen der großen Untereinheit und den akzessorischen Proteinen HypA, HypB (und SlyD) erforderlich (Jacobi, Rossmann *et al.* 1992; Hube, Blokesch *et al.* 2002; Blokesch, Rohrmoser *et al.* 2004; Atanassova und Zamble 2005; Kaluarachchi, Chan Chung *et al.* 2010; Chung und Zamble 2011). HypB, ein akzessorisches Protein, das für den effizienten Einbau von Nickel erforderlich ist, besitzt GTPase-Aktivität. Diese ist notwendig für die erfolgreiche Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen und initiiert vermutlich den Ni-Transfer bzw. die Auflösung des intermediären (SlyD)/HypB/HypA-Komplexes (Maier, Lottspeich *et al.* 1995; Olson und Maier 2000; Mehta, Benoit *et al.* 2003).

In *E. coli*, welches ein HypB-Homolog ohne eine charakteristische Poly-Histidin-Region zur Speicherung von Metall-Ionen besitzt, ist noch ein zusätzliches Protein, SlyD, für den effektiven Nickeleinbau erforderlich. Dieses Protein, eine mutmaßliche Peptidyl-prolyl *cis/trans*-Isomerase (PPIase) (Hottenrott, Schumann *et al.* 1997; Zhang, Butland *et al.* 2005), ist kein Bestandteil des *hyp*-Operons. Dennoch sind pleiotrope Effekte auf die Hydrogenaseaktivität in *E. coli* nachweisbar. Es wird angenommen, dass SlyD nicht nur zur hochaffinen Bindung und Speicherung von Ni<sup>II</sup>-Ionen notwendig ist, sondern auch die GTPase-Aktivität von HypB unterstützt, die den Transfer von Ni in die prämaturre große Untereinheit initiiert (Hottenrott, Schumann *et al.* 1997; Zhang, Butland *et al.* 2005; Leach, Zhang *et al.* 2007; Kaluarachchi, Zhang *et al.* 2011).

### 1.6.4 Die Synthese des Carbonylliganden

Über die Synthese des Carbonylliganden in [NiFe]-Hydrogenasen war zu Beginn dieser Studie nur wenig bekannt. Es gibt nur sehr wenige Indizien auf den Vorläufer des Carbonylliganden.

Frühe Überlegungen zur Synthese des CO-Liganden favorisierten die Möglichkeit, dass Carbamoylphosphat die gemeinsame Quelle sowohl des CO als auch der CN<sup>-</sup>-Liganden sein könnte (Paschos, Glass *et al.* 2001; Blokesch 2004). Diese These konnte mittlerweile allerdings schlüssig widerlegt werden, indem gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von SI-markiertem Carbamoylphosphat in *E. coli* lediglich zur Markierung der CN<sup>-</sup>-Liganden führt (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005; Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007).

Laut einer anderen Hypothese sollte CO durch die Reduktion von CO<sub>2</sub> hergestellt werden. Roseboom *et al.* verwiesen in diesem Zusammenhang auf HypD, welches aufgrund seines außergewöhnlichen [4Fe4S]-Zentrums als möglicher Kandidat für eine entsprechende enzymvermittelte Katalyse in Betracht gezogen wurde (Blokesch, Albracht *et al.* 2004; Roseboom, Blokesch *et al.* 2005). Jedoch konnte auch diese Hypothese, *zumindest* für *E. coli*, experimentell widerlegt werden (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007).

Markierungsexperimente mit <sup>13</sup>C-Kohlenmonoxid zeigten eine quantitative, spezifische Markierung des Carbonylliganden im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007). Die Tatsache, dass gasförmiges CO nicht nur von den Zellen aufgenommen werden kann, sondern auch in dieser Form in das aktive Zentrum eingebaut wird, eröffnet die Möglichkeit, dass atmosphärisches Kohlenmonoxid unmittelbar Verwendung findet. Darüber hinaus konnte in *Allochromatium vinosum* nach Zugabe von CH<sub>3</sub><sup>13</sup>COOH eine spezifische aber unvollständige Markierung des Carbonylliganden beobachtet werden (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005).

Auch für [Fe]-Hydrogenasen ist nur wenig über die Biosynthese des CO-Liganden bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der CO-Ligand unter chemolithoautotrophen Bedingungen aus Kohlendioxid stammt. Da auch gasförmiges CO quantitativ eingebaut wird, wird angenommen, dass die Biosynthese des Carbonylliganden über CO als Intermediat verläuft. Weder Acetat, Pyruvat, Glycin, noch Formiat erzeugten eine Markierung des CO-Liganden. Da auch die direkte Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CO ausgeschlossen wird, bleibt die exakte Biosynthese des Carbonylliganden auch hier weiterhin unklar (Schick, Xie *et al.* 2012).

Im Gegensatz zu [NiFe]-Hydrogenasen ist die Synthese der diatomaren Liganden in [FeFe]-Hydrogenasen weitestgehend geklärt (Mulder, Shepard *et al.* 2011). Für die Reifung von [FeFe]-Hydrogenasen sind drei akzessorische Proteine notwendig. Zwei dieser Proteine sind SAM-

Radikalenzyme (HydE und HydG), ein Protein besitzt GTPase-Aktivität (HydF). Verschiedene Studien zeigten, dass sowohl die Cyanid- als auch die Carbonylliganden durch HydG synthetisiert werden. Mittels eines AdoMet-Radikalmechanismus werden die beiden diatomaren Liganden aus Tyrosin synthetisiert (Driesener, Challand *et al.* 2010; Shepard, Duffus *et al.* 2010). Während für HydE eine Funktion im Rahmen der Synthese des Dithiolliganden postuliert wird, zeigten Untersuchungen, dass HydF eine Funktion als Gerüstprotein für den Zusammenbau der prosthetischen Gruppe besitzt (Shepard, McGlynn *et al.* 2010). Eine vergleichbare Synthese in *R. eutropha* scheint ausgeschlossen, da keines der maturationsassoziierten Proteine ein für AdoMet-Enzyme charakteristisches Motiv (CX<sub>3,5</sub>CX<sub>2</sub>C) enthält (McGlynn, Boyd *et al.* 2010).

In unserem Modellsystem für [NiFe]-Hydrogenasen, *R. eutropha*, sind keine Radikal-SAM-Enzyme bekannt, die an deren Reifung beteiligt sind. Dies mag unter anderem auch an den aeroben Lebensbedingungen liegen, unter denen in diesem Organismus Hydrogenasen gebildet werden.

### 1.6.5 Die Funktion von HypX in der pleiotropen Maturation

Ein besonders interessantes, weil enigmasches, akzessorisches Protein ist HypX. HypX, vormals auch HoxX genannt, gehört wie die übrigen Proteine des *hyp*-Genclusters zu den pleiotropen, akzessorischen Proteinen. Erstmals 1993 für *Bradyrhizobium japonicum* (Van Soom, Verreth *et al.* 1993) komplett sequenziert und beschrieben<sup>2</sup>, ist HypX auch nach nahezu zwei Dekaden immer noch das pleiotrope Reifungsprotein, über das am wenigsten bekannt ist. Ungeachtet dessen weiß man heute, dass es für die sauerstofftolerante Reifung von Hydrogenasen von Bedeutung ist und demzufolge von Wichtigkeit für ein umfassendes Verständnis derselben ist (Buhrke und Friedrich 1998).

Frühe Deletionsstudien in *R. eutropha* und *B. japonicum* legten eine regulatorische Funktion des Proteins nahe. In diesem Kontext wurde das betreffende Gen folgerichtig zunächst auch als *hoxX* annotiert (Van Soom, Verreth *et al.* 1993; Lenz, Schwartz *et al.* 1994). Weitergehende Untersuchungen kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass der beobachtete Phänotyp; stark verminderte Hydrogenaseaktivität und ein stark verzögertes Wachstum unter lithoautotrophen Bedingungen, auf einem polaren Effekt auf die Expression des Transkriptionsaktivators HoxA beruht (Buhrke und Friedrich 1998). Ursächlich dafür ist die Tatsache, dass zusammen mit den 71 % des *hypX*-Gens am C-terminalen Ende ( $\Delta hypX_1$ ) auch ein darin enthaltener konstitutiver Promotor entfernt wurde, welcher die Transkription des stromabwärts gelegenen *hoxA*-Gens

<sup>2</sup> Zuvor wurden lediglich 261 Nucleotide am 3'-Ende des *hypX*-Leserasters aus *R. eutropha* veröffentlicht (Eberz, G. and B. Friedrich (1991). "Three trans-acting regulatory functions control hydrogenase synthesis in *Alcaligenes eutrophus*." *J Bacteriol* **173**(6): 1845-1854.

steuert (Buhrke und Friedrich 1998; Schwartz, Buhrke *et al.* 1999). In einer zweiten Deletionsmutante ( $\Delta hypX_2$ ) wurden lediglich 24 % in der N-terminalen Hälfte von *hypX* entfernt. Hier trat ein völlig anderer Phänotyp auf, bei dem die Reduktion der Aktivität nicht auf eine verringerte Expression von *HoxA* und nachfolgend der Strukturgene zurückzuführen ist, sondern auf eine drastisch verminderte Prozessierung der prämaturen großen Untereinheiten (Rey, Fernandez *et al.* 1996; Buhrke und Friedrich 1998). Diese Ergebnisse implizierten eine Funktion von HypX im Rahmen der Maturation. Ausgehend von dem Befund, dass es sich bei HypX um ein akzessorisches Protein handeln muss, wurde für HypX aus *Rhizobium leguminosarum* eine Funktion im Rahmen der Insertion des katalytisch aktiven Nickels postuliert (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu legten weitergehende Untersuchungen an der SH aus *R. eutropha* nahe, dass HypX die Synthese zusätzlicher Cyanidliganden an den Übergangsmetallen des aktiven Zentrums katalysiert (Bleijlevens, Buhrke *et al.* 2004). Während die erstgenannte Option nie weiter verfolgt wurde, hatte die zweite These lange Bestand und konnte erst jüngst widerlegt werden. Horch *et al.* konnten mittels *in situ* FTIR-Spektroskopie zeigen, dass die SH ebenfalls nur zwei Cyanidliganden besitzt (Horch, Lauterbach *et al.* 2010).

Diese jüngsten Befunde werfen den Stand des Wissens um die Funktion von HypX wieder weit zurück. Gesichert scheint somit lediglich die Tatsache, dass *hypX* ein Bestandteil des *hyp*-Operons ist und eine Funktion innerhalb der Reifung der großen Untereinheiten der SH und der MBH erfüllt. Diese muss in der zeitlichen Abfolge der Maturationsschritte vor der finalen proteolytischen Prozessierung der jeweiligen großen Untereinheit angesiedelt sein. Die starke Abhängigkeit des Wachstums vom Sauerstoffpartialdruck muss als Indiz verstanden werden das nicht nur die katalytische Aktivität von Hydrogenasen (Vincent, Cracknell *et al.* 2005), sondern auch deren Maturation sensitiv gegenüber O<sub>2</sub> ist (Lenz, Ludwig *et al.* 2010).

### 1.6.6 Proteolytische Spaltung

Der erste Schritt, der definitiv nicht mehr als der pleiotropen Reifung zugehörig angesehen werden kann, ist die Abspaltung einer C-terminalen Extension der großen Untereinheit. Erst nach erfolgreicher Abspaltung dieser Extension kann es zur Dimerisierung mit der kleinen Untereinheit kommen. Diese Modifikation wird durch eine spezifische Endopeptidase hervorgerufen, die jeweils im Kontext der Strukturgene der beiden energiekonservierenden Hydrogenasen kodiert sind (*hoxM* im MBH-Operon und *hoxW* im SH-Operon) (Kortlüke und Friedrich 1992; Bernhard, Schwartz *et al.* 1996; Thiemermann, Dervedde *et al.* 1996). Zur Bestätigung der erfolgreich abgeschlossenen Insertion der prosthetischen Gruppe wird dabei die Präsenz von Nickel sensiert. Dieses Prinzip konnte auch bei anderen [NiFe]-Hydrogenasen in

*Thiocapsa roseopersicina* und *Escherichia coli* bestätigt werden (Magalon, Blokesch *et al.* 2001; Maróti, Rákhely *et al.* 2010). Jedoch gibt es auch Beispiele für Hydrogenasen, die keiner proteolytischen Spaltung unterzogen werden. Neben der regulatorischen Hydrogenase aus *R. eutropha* sind hier z. B. auch die Ech-Hydrogenasen aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* und *Methanosarcina bakeri* zu nennen (Soboh, Linder *et al.* 2004).

### 1.6.7 Einbau der Eisen-Schwefel-Cluster in die kleine Untereinheit

Es wird allgemein angenommen, dass die Eisen-Schwefel-Cluster der kleinen Untereinheit durch die Standardmaschinerien der FeS-Cluster-Synthese, das ISC- und SUF-System, generiert werden (Lill 2009; Py und Barras 2010; Shepard, Boyd *et al.* 2011).

Dabei wird zunächst ein Sulfid aus einem Cystein freigesetzt, welches dadurch in ein Alanin konvertiert wird. Dieser Schritt wird durch eine Cystein-Desulfurase katalysiert (Zheng, White *et al.* 1994). Der Schwefel verbleibt zunächst als Persulfid am Enzym gebunden, bevor er im Anschluss auf ein Gerüstprotein transferiert wird. Durch einen Ferredoxin vermittelten Schritt werden die gebundenen  $S^{2-}$  mit den  $Fe^{2+}$  zu einem [2Fe-2S]-Clustern vereinigt. Je nach Art des benötigten FeS-Clusters kann es durch Dimerisierung zweier Gerüstproteine zur Bildung eines [4Fe4S]-Clusters kommen (Agar, Krebs *et al.* 2000).

Im Falle der [NiFe]-Hydrogenasen, bei denen neben [4Fe4S]-Clustern auch [3Fe4S]-, sowie [4Fe3S]-Cluster vorkommen (vergleiche Kapitel 1.2.3), wird angenommen, dass akzessorische Proteine den [4Fe4S]-Grundtyp *in situ* modifizieren (siehe unten).

### 1.6.8 MBH-spezifische Reifung

Die MBH nimmt unter den Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha* insofern eine Sonderstellung ein, als dass zu ihrer Maturation noch eine Vielzahl weiterer Gene (*hoxL*, *hoxO*, *hoxQ*, *hoxT*, *hoxR*, *hoxV*) notwendig sind (Bernhard, Schwartz *et al.* 1996). Der Verlust dieser Gene wirkt sich jedoch nicht auf die Aktivitäten der SH und RH aus. Bei der Untersuchung der Funktion der einzelnen Genprodukte konnten in jüngerer Vergangenheit große Fortschritte erzielt werden. So konnte gezeigt werden, dass HoxL und HoxV für die Insertion der  $Fe(CN)_2(CO)$ -Einheit in die große Hydrogenaseuntereinheit der MBH (HoxG) notwendig sind. HoxL ist ein HypC-Homolog (Kortlüke, Horstmann *et al.* 1992), wohingegen HoxV als Homolog der großen Untereinheit angesehen wird. Gemäß dem aktuellen Modell übernimmt HoxV die prosthetische Gruppe zunächst in einem transienten HoxV/HypC-Komplex von HypC. Analog zur Funktion von HypC in den übrigen Hydrogenasen, vermittelt HoxL den Transfer der  $Fe(CN)_2(CO)$ -Einheit von HoxV in die prämaturo große Untereinheit präHoxG. Der Grund für diese aufwändigen Zwischenschritte ist nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch angenommen,

dass ein solcher Zwischenschritt ein allgemeines Prinzip bei der Reifung von membrangebundenen, *Cytochrom b*-assoziierten [NiFe]-Hydrogenasen unter aeroben Bedingungen darstellt (Ludwig, Schubert *et al.* 2009).

Systematische Untersuchungen an *hoxO* und *hoxQ* haben gezeigt, dass die Deletion dieser Gene zu einer Destabilisierung der prämaternen kleinen Untereinheit führt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Genprodukte unmittelbar mit der prämaternen kleinen Untereinheit (präHoxK) interagieren und einen stabilen Komplex bilden können. Man nimmt an, dass sie eine doppelte Funktion im Rahmen der Reifung von HoxK einnehmen; (I) Schutz der FeS-Cluster und (II) Schutz vor einem vorzeitigen, TAT-vermittelten Export (Schubert, Lenz *et al.* 2007).

Für HoxR wurde, aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zu Rubredoxinen, schon früh eine Funktion im Rahmen einer Redoxreaktion postuliert (Kortlüke, Horstmann *et al.* 1992). Kürzlich konnte für HoxR und HoxT eine deutlich reduzierte Hydrogenaseaktivität bei hohen O<sub>2</sub>-Partialdrücken beobachtet werden. Für HoxT wurde dabei eine Rolle im Rahmen des TAT-vermittelten Exports postuliert (siehe unten). Im Vergleich dazu wurde für HoxR eine Funktion innerhalb der Reifung von HoxK vermutet, womöglich ist HoxR für die Modifikation des ungewöhnlichen proximalen FeS-Clusters notwendig (Fritsch, Lenz *et al.* 2011; Goris, Wait *et al.* 2011).

### 1.6.9 Export der membrangebundenen Hydrogenase

Da die MBH eine membranständige, zum Periplasma hin ausgerichtete Hydrogenase ist, muss sie nach ihrer Translation und Dimerisierung über die Cytoplasmamembran ins Periplasma ausgeschleust werden (Rodrigue, Chanal *et al.* 1999). Da das Holoenzym eine komplexe prosthetische Gruppe - das aktive Zentrum - enthält, für dessen Zusammenbau eine Vielzahl von akzessorischen Proteinen notwendig ist - welche im Cytoplasma lokalisiert sind - kommt für die Translokation nur der sogenannte TAT-Transport (engl.: *twin-arginine-transporter*) in Frage. Dieser Exportmechanismus ist in der Lage Holoenzyme als intakte Einheit zu exportieren. Proteine, die für den TAT-vermittelten Transport bestimmt sind, zeichnen sich durch ein 30-50 AS langes Signalpeptid aus (Sargent 2007), welches anhand seines charakteristischen „Doppel-Arginins“ leicht zu erkennen ist. Eine solche TAT-*Leader*-Sequenz findet sich am N-Terminus der kleinen Untereinheit der MBH (HoxK). Es wird vermutet, dass ein vorzeitiger Export - vor der Dimerisierung von HoxK und HoxG - vermieden wird, indem diese Sequenz während der Reifung von HoxQ verdeckt wird (Schubert, Lenz *et al.* 2007).

## 1.7 Zielsetzung und Methodik dieser Doktorarbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung der Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha*. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Synthese und dem Einbau der C<sub>1</sub>-Liganden am Fe des Kofaktors. Im Zusammenhang mit dem Carbonylliganden sollte insbesondere geklärt werden, ob dieser unter nativen Bedingungen aus der Umgebung aufgenommen wird, wie es Untersuchungen mit extern appliziertem <sup>13</sup>CO als Möglichkeit erscheinen ließen (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007), oder ob seine Synthese eine Leistung des Wirtsmetabolismus ist. Ferner sollte untersucht werden, ob CO bereits in dem transienten Komplex aus HypD und HypC zu finden ist und welche metabolischen Funktionen an der Synthese dieses Liganden beteiligt sind.

Als weitere zentrale Fragestellung sollte die Funktion von HypX untersucht werden. Im Vorfeld dieser Studie existierten mehrere, scheinbar widersprüchliche Thesen zur möglichen Funktion von HypX (Rey, Fernandez *et al.* 1996; Bleijlevens, Buhrke *et al.* 2004). Eine neuerliche Untersuchung der HypX-Funktion war daher angezeigt. Zudem war bekannt, dass sich die pleiotrope Maturation in *R. eutropha* deutlich toleranter gegenüber hohen Sauerstoffpartialdrücken verhält (Lenz, Ludwig *et al.* 2010) als die Reifung in anderen Organismen, z. B. *E. coli* (Soboh, Krüger *et al.* 2010), und dass diese Sauerstofftoleranz durch HypX vermittelt wird. Deshalb sollte die molekulare Basis dieser HypX-vermittelten Sauerstofftoleranz untersucht werden.

Neben klassischen molekularbiologischen und biochemischen Methoden wurde vor allem die *Fourier transformierte Infrarotspektroskopie* in Verbindung mit SI-Markierung eingesetzt. Diese Methodik ermöglicht die gezielte Untersuchung von Metall-Liganden-Komplexen. Anhand der charakteristischen Streckschwingungen lassen sich mit dieser Technik qualitative Aussagen über Art und Anzahl der metallgebundenen Liganden (CN<sup>-</sup>- und CO-Liganden) treffen. Durch die Zugabe von stabilen Isotopenverbindungen lassen sich so mögliche Vorstufen in der Synthese dieser Liganden verifizieren, da das höhere Atomgewicht der Ligandenatome zu einer charakteristischen Verschiebung des Absorptionsmaximums des jeweiligen Liganden führt. Diese Technik hat sich in der Vergangenheit bereits als geeignetes Werkzeug zur Analyse des aktiven Zentrums bzw. der Hydrogenasereifung bewährt (Pierik, Roseboom *et al.* 1999). Die Infrarotspektroskopie wurde in Kooperation mit der AG Hildebrandt vom Institut für Biophysikalische Chemie der TU Berlin durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stammmname	Relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<b><i>R. eutropha</i>:</b>		
H16	Wildtyp, MBH <sup>+</sup> , SH <sup>+</sup> , RH <sup>+</sup> , HoxJ <sup>+</sup>	DSM428, ATCC17699
HB1	$\Delta can$ , HoxJ <sup>-</sup>	(Kusian, Sultemeyer <i>et al.</i> 2002)
HB14	$\Delta P_{cbbR}$ , HoxJ <sup>-</sup>	(Jeffke, Gropp <i>et al.</i> 1999)
HB60	$\Delta caa$ , HoxJ <sup>-</sup>	Kusian B., unveröffentlicht
HF210	pHG1 <sup>-</sup> ; MBH <sup>-</sup> , SH <sup>-</sup> , RH <sup>-</sup> , HoxJ <sup>-</sup>	(Srivastava, Urban <i>et al.</i> 1982)
HF338	$\Delta hypD$ , HoxJ <sup>-</sup>	(Dernedde, Eitinger <i>et al.</i> 1996)
HF340	$\Delta hypC$ , HoxJ <sup>-</sup>	(Dernedde, Eitinger <i>et al.</i> 1996)
HF469	$\Delta hypX_2$ , HoxJ <sup>-</sup>	(Buhrke und Friedrich 1998)
HF485	HypX D109N, HoxJ <sup>-</sup>	(Buhrke 2006)
HF499	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta hypX_2$ , HoxJ <sup>-</sup>	Buhrke T., unveröffentlicht
HF574	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , HoxJ <sup>-</sup>	(Buhrke, Brecht <i>et al.</i> 2002)
HF575	$hyp1\Delta$ ( $hyp[A1B1F1CDEX]$ $\Delta$ ), $hyp2\Delta$ ( $hyp[A2B2F2]$ $\Delta$ ), HoxJ <sup>-</sup>	(Buhrke 2006)
HF962	pHG1 <sup>-</sup> , $\Delta P_{acoX}$ , HoxJ <sup>-</sup>	(Bürstel, Siebert <i>et al.</i> 2012)
HF965	$\Delta glyA$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF966	pHG1 <sup>-</sup> , $\Delta glyA$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF967	$\Delta glyA$ , $\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF968	$\Delta hypX_2$ , $\Delta coxLI$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF969	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta coxLI$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF970	$\Delta glyA$ , HypX D109N, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF971	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta hypX_2$ , $\Delta glyA$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF972	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta hypX_2$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF973	$hyp1\Delta$ ( $hyp[A1B1F1CDEX]$ $\Delta$ ), $hyp2\Delta$ ( $hyp[A2B2F2]$ $\Delta$ ), $\Delta P_{acoX}$ , HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF974	HypX Y439F, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF975	HypX Y439A, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF976	HypX Y439E, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF977	HypX D425A, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF978	HypX D425N, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF979	HypX D425E, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF980	HypX Y453F, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF981	HypX Y453H, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF982	HypX W451H, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF983	HypX W451F, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF984	HypX E449Q, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF985	HypX E449D, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF986	HypX S448A, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF987	HypX S448G, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF988	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta glyA$ , HypX Y439F, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF989	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta glyA$ , HypX Y439A, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF990	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta glyA$ , HypX Y439E, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF991	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta glyA$ , HypX W451F, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit
HF992	$\Delta hoxH$ , $\Delta hoxG$ , $\Delta hoxB$ , $\Delta hoxC$ , $\Delta glyA$ , HypX E449Q, HoxJ <sup>-</sup>	Diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

Stamname	Relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<b><i>E. coli</i>:</b>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub> m<sub>B</sub></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	(Yanisch-Perron, Vieira <i>et al.</i> 1985)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , ( $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub> m<sub>K</sub> r<sup>+</sup> k<sub>K</sub></i> ); <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 (DE3)	(Studier und Moffatt 1986)
MC4100	F <sup>-</sup> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U169, <i>ptsF25</i> , <i>deoC1</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>rpsL150</i> , $\lambda$	(Casadaban 1976)
MI54	MC4100; $\Delta$ <i>carAB</i>	(Paschos, Glass <i>et al.</i> 2001)
MI59	MC4100; $\Delta$ <i>carAB</i> , $\Delta$ <i>hypF</i>	(Paschos, Glass <i>et al.</i> 2001)
YU051	MC4100 (DE3); $\Delta$ <i>carAB</i>	Diese Arbeit
YU053	MC4100 (DE3); $\Delta$ <i>carAB</i> , $\Delta$ <i>hypF</i>	Diese Arbeit
JM109	F <sup>+</sup> <i>traD36 lacI<sub>q</sub></i> , $\Delta$ ( <i>lacZ</i> ) M15 <i>proA+B+e14-</i> ( <i>McrA-</i> ) $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>thi gyrA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>endA1 hsdR17</i> (rk-mk <sup>+</sup> ) <i>relA1 supE44 recA1</i>	(Yanisch-Perron, Vieira <i>et al.</i> 1985)
NEB 10-beta	<i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>fhuA lacX74 galK</i> ( $\phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15) <i>mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )	New England Biolabs
S17-1	TpR SmR <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M</i> <sup>+</sup> RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 $\lambda$ pir	(Simon, Priefer <i>et al.</i> 1983)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
Litmus28	Ap <sup>r</sup> , ColE1 <i>ori</i> , <i>lacZ</i>	New England Biolabs
pCH301	2,2 kB <i>PstI-KpI</i> Fragment ( <i>hypC</i> ) in pBluescript KS <sup>+</sup>	(Dernedde, Eitinger <i>et al.</i> 1996)
pCH328	2,2 kB <i>BamHI/EcoRI</i> -Fragment (enthält <i>hypX</i> ) in pBluescript KS <sup>+</sup>	(Lenz, Schwartz <i>et al.</i> 1994)
pCH630	1.3 kB <i>NsiI</i> -Fragment (enthält <i>hypX</i> $\Delta$ <sub>2</sub> ) aus pCH629 in pLO2	(Buhrke und Friedrich 1998)
pCH631	(P <sub>lacI-malE</sub> :: <i>hypX</i> ) in pMal-c2	Diese Arbeit
pCH783	<i>hypA1B1F1C1D1E1X hoxABC</i> , <i>hoxJ</i> <sup>g1264a</sup> (HoxJ) in Litmus28(-SacI)	(Lenz, Gleiche <i>et al.</i> 2005)
pCH2765	1,72 kB PCR-Amplikon ( <i>glyA</i> ) in Sall geschnittenem pLO1	Diese Arbeit
pCH2771	pCH2765, Sall geschnitten und religiert, enthält 384Bp <i>in frame</i> -Deletion in <i>glyA</i> .	Diese Arbeit
pEDY309	Tc <sup>R</sup> , RK2, <i>ori</i> , Mob <sup>+</sup>	(Kleihues, Lenz <i>et al.</i> 2000)
pGE567 (pRH)	(P <sub>SH-hoxB</sub> <i>StopStrep-hoxC</i> ) in pEDY309	(Buhrke, Lenz <i>et al.</i> 2005)
pGE1626	MBH-Operon ( <i>hoxK</i> <sub>Strep</sub> ) in pEDY309	Lenz O., unveröffentlicht
pGE2799	MBH-Operon ( <i>hoxK</i> <sub>Strep</sub> , $\Delta$ <i>hypX</i> <sub>2</sub> ) in pEDY309	Lenz O., unveröffentlicht
pIB01	pLO11 mit GGA $\rightarrow$ CAT-Austausch in 5' - Richtung von SacI	Diese Arbeit
pIB02	pIB01, <i>hypA1B1F1E1D1E1X</i>	Diese Arbeit
pIB08	750 Bp <i>AscI</i> -Fragment ( <i>hypC-hypD'</i> ) aus pCH301 in pNEB193,	Diese Arbeit
pIB09	324 Bp PCR-Amplikon ( <i>hypC-CS</i> Strep) in NaeI geschnittenem pIB08	Diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pIB10	324 Bp PCR-Amplikon ( <i>hypD</i> -NStrep) in NaeI geschnittenem pIB08	Diese Arbeit
pIB11	pIB02-05, <i>hypA1B1F1C1</i> <sub>CStrep</sub> <i>DIEIX</i>	Diese Arbeit
pIB12	pIB02-05, <i>hypA1B1F1C1D1</i> <sub>NStrep</sub> <i>EIX</i>	Diese Arbeit
pIB15	pIB01-03, <i>hypC1D1</i> <sub>CStrep</sub>	Diese Arbeit
pIB18	3,4 kB PCR-Amplikon (' <i>coxM1-coxS1</i> ') in pLO2	Diese Arbeit
pIB19	pIB18, SexAI verdaut und religiert ( <i>coxL1Δ</i> )	Diese Arbeit
pIF39.1	HypX Y439F in pLO2	Diese Arbeit
pIF40.4	HypX Y439A in pLO2	Diese Arbeit
pIF41.1	HypX Y439E in pLO2	Diese Arbeit
pIF42.13	HypX D425A in pLO2	Diese Arbeit
pIF43.2	HypX D425N in pLO2	Diese Arbeit
pIF47.3	HypX D425E in pLO2	Diese Arbeit
pIF49.5	HypX Y453F in pLO2	Diese Arbeit
pIF50.5	HypX Y453H in pLO2	Diese Arbeit
pIF51.1	HypX W451H in pLO2	Diese Arbeit
pIF52.1	HypX W451F in pLO2	Diese Arbeit
pIF53.5	HypX E449Q in pLO2	Diese Arbeit
pIF54.5	HypX E449D in pLO2	Diese Arbeit
pIF55.5	HypX S448A in pLO2	Diese Arbeit
pIF56.4	HypX S448G in pLO2	Diese Arbeit
pLO1/pLO2	Km <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i>	(Lenz, Schwartz <i>et al.</i> 1994)
pLO11	Tc <sup>R</sup> , RK2 <i>ori</i> , Mob <sup>+</sup> , <i>PacoX</i> -C-terminal Strep-Tag <sup>®</sup>	(Schwarze, Kopczak <i>et al.</i> 2010)
pMal-c2	Ap <sup>R</sup> , M13 <i>ori</i> , pBR <i>ori</i> , <i>lacZ</i> , P <sub><i>lacI</i></sub> - <i>malE</i>	New England Biolabs
pNEB193	Ap <sup>R</sup> , M13 <i>ori</i> , <i>lacZ</i>	New England Biolabs
pT-HypDC <sub>Strep</sub>	pT7-7, <i>hypD</i> , <i>hypC</i> <sub>Strep</sub> , Ap <sup>R</sup>	(Blokesch, Albracht <i>et al.</i> 2004)
pT-HypDEC <sub>Strep</sub>	pT7-7, <i>hypD</i> , <i>hypE</i> , <i>hypC</i> <sub>Strep</sub> , Ap <sup>R</sup>	(Blokesch, Albracht <i>et al.</i> 2004)
pT-HypDEFC <sub>Strep</sub>	pT7-7, <i>hypD</i> , <i>hypE</i> , <i>hypF</i> , <i>hypC</i> <sub>Strep</sub> , Ap <sup>R</sup>	(Blokesch, Albracht <i>et al.</i> 2004)

## 2.2 Kultivierung der Bakterien

Anzucht, Konservierung und Handhabung von Bakterienstämmen erfolgten grundsätzlich unter sterilen Bedingungen und gemäß den geltenden Richtlinien für S1-Bereiche. Alle verwendeten Gerätschaften, Medien, Verbrauchsmaterialien und Anzuchtgefäße wurden grundsätzlich sterilisiert. Bei Glaswaren, hitzeresistenten Medien und Verbrauchsmaterialien (siehe Herstellerangaben) wurde ein Autoklav zur Sterilisation verwendet (mindestens 20 Min. bei 120 °C und 1bar Druck). Hitzelabile Chemikalien und Lösungen (z. B. Antibiotika) wurden über verschiedene Filtereinheiten mit einer Ausschlussgröße von 0,2 µm (Bottle Top-Filter, Corning, Corning, USA; Spritzenaufsatzfilter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) sterilfiltriert. Hände und hitzempfindliche Gerätschaften wurden mit Ethanol sterilisiert.

### 2.2.1 Anzuchtmedien

*Ralstonia eutropha* wurde in Mineralmedium angezogen (Schlegel, Kaltwasser *et al.* 1961; Friedrich, Schneider *et al.* 1982). Bei chemolithoautotrophen Anzuchten von *R. eutropha* wurde AutN als Medium und ein definiertes Gasgemisch aus N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> (Volumenanteile siehe Text) verwendet. Bei heterotropher Anzucht wurde FGN- oder GN-Medium (siehe Tabelle 3) an Luft verwendet. FN-Medium

wurde regelmäßig nur zur Anzucht von Vorkulturen verwendet (Ausnahmen im Text angegeben). Für den Plasmidtransfer wurde NB-Medium verwendet.

*Escherichia coli*-Stämme wurden in LSLB- (Low-Salt Luria-Broth) und LB-PSI-Medium angezogen. Für die Überexpression des HypCD-Komplexes wurden entsprechende Expressionsstämme in TGYEP-Medium kultiviert (siehe Tabelle 3).

Antibiotika wurden als Stammlösung angesetzt und bei -20 °C gelagert. Die Endkonzentrationen der einzelnen Antibiotika lag bei; Tetracyclin 10 µg • ml<sup>-1</sup> (in 70 % Ethanol), Kanamycin 50 µg • ml<sup>-1</sup> für *E. coli*-Kulturen bzw. 400 µg • ml<sup>-1</sup> für *R. eutropha*-Kulturen und Ampicillin 100 µg • ml<sup>-1</sup>.

Für Agarplatten wurden dem Flüssigmedium zusätzlich 1,2 % (w/v) Agar-Agar (Carl Roth®) bzw. Reinstagar (DIFCO® BactoAgar) zugegeben.

Bei Verwendung von *ΔglyA*-Mutanten wurden jeweils noch 5 mM Glycin ins Medium gegeben.

**Tabelle 3: Verwendete Nährmedien**

Name	Substanz	Konzentration*	Referenz
H16-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11 mM	
	Auf 1L mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt; pH eingestellt auf 7.0 bei RT		
AutN, FN <sup>1</sup> , GN <sup>2</sup> , FGN <sup>3</sup>	NH <sub>4</sub> Cl	37,4 mM	(Schlegel, Kaltwasser <i>et al.</i> 1961)
	NiCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0,001 mM	
	FeCl <sub>3</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	18 mM	(Friedrich 1982)
	CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0,068 mM	(Friedrich, Heine <i>et al.</i> 1981)
	MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	0,81 mM	
		<sup>1</sup> Fruktose	0,4 % (w/v)
	<sup>2</sup> Glycerol	0,4 % (w/v)	
	<sup>3</sup> Fruktose	0,2 % (w/v)	
	<sup>3</sup> Glycerol	0,2 % (w/v)	
	Auf 1L mit H16-Puffer aufgefüllt		
LSLB	Trypton <sup>#</sup>	1,0 % (w/v)	(Bertani 2004)
	Hefeextrakt <sup>#</sup>	0,5 % (w/v)	
	NaCl	0,25 % (w/v)	
	Auf 1L mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt		
LSLB <sub>Sacc</sub> (wie LSLB, jedoch mit)	Saccharose	15 % (w/v)	
SOC	Trypton <sup>#</sup>	2,0 % (w/v)	(Hanahan 1983)
	Hefeextrakt <sup>#</sup>	0,5 % (w/v)	
	NaCl	10 mM	
	KCl	2,5 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM	
	Glucose	20 mM	
		Auf 1L mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt	
NB	Nutrient Broth	0,8 % (w/v)	
	Auf 1L mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt		

Fortsetzung Tabelle 3: Verwendete Nährmedien

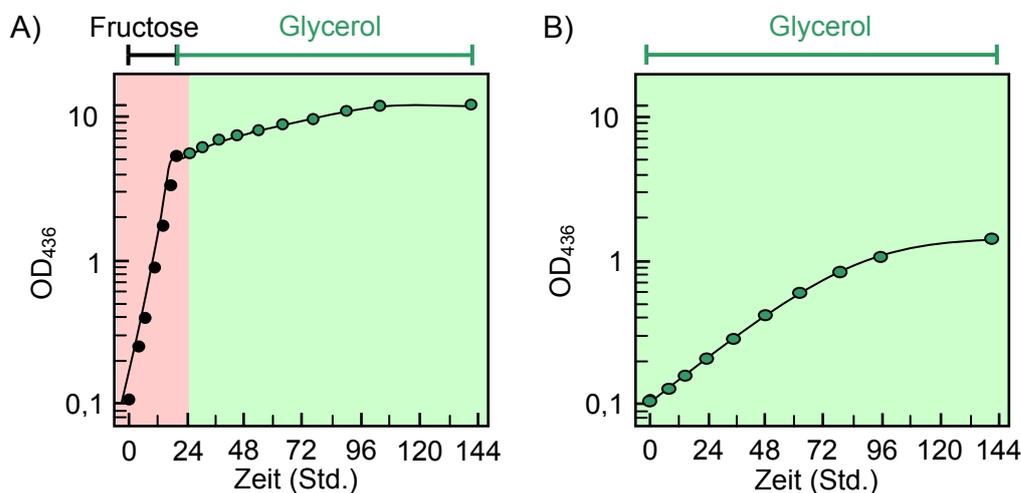
Name	Substanz	Konzentration*	Referenz
TGYEP	Trypton <sup>#</sup>	1 % (w/v)	(Blokesch 2004)
	Hefeextrakt <sup>#</sup>	0,5 % (w/v)	
	Glucose	0,8 % (w/v)	
	Na-Formiat	15 mM	
	Auf 1L mit 0,1M KPO <sub>4</sub> -Puffer; pH 6,5		

\* Endkonzentration bezogen auf 1L; <sup>#</sup> Produkt der Firma DIFCO<sup>®</sup>,

Die Induktion der Überexpression (z. B. *E.c.HypCD*-Komplexe und MBP::*HypX*) fand in *E.coli* in der logarithmischen Phase, bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5, mit einer IPTG-Endkonzentration von 0,1-0,5 mM statt.

Die Überexpression der HypCD-Komplexe aus *R. eutropha* fand in FGN-Medium statt. Die Überexpression wurde hier nach etwa 24 Stunden, bei einer OD<sub>436</sub> ≥ 6,0, mit 10-15 mM Acetoin induziert.

Die Überexpression der RH (pRH) wurde durch den endogenen SH-Promotor gesteuert. Dieser wird, ohne Zugabe eines Induktors, bei energiearmen Wachstumsbedingungen (z. B. GN-Medium aber auch unter chemolithoautotrophen Bedingungen) hochreguliert. Demnach beginnt die Expression der Hydrogenase assoziierten Gene in GN-Medium umgehend nach der Volladaptation. Im Gegensatz dazu bildet sich in FGN-Medium ein zweiphasiges Wachstum aus (siehe Abbildung 2-1 A), bei dem zunächst die Fruktose metabolisiert wird und erst im Anschluss das Glycerol. Hydrogenaseexpression findet nur in der Glycerolphase statt (Friedrich, Heine *et al.* 1981; Friedrich 1981; Friedrich 1982).



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des heterotrophen Wachstums von *Ralstonia eutropha* in verschiedenen Medien in Korrelation zur Hydrogenaseexpression.** A) Wachstum auf FGN-Medium (mit 0,2 % Fruktose, 0,2 % Glycerol). Das biphasische Wachstum zeigt rasches Wachstum auf Fruktose (schwarze Kreise) und langsames Wachstum auf Glycerol (grüne Kreise). Während des Wachstums auf Fruktose findet keine Expression der Hydrogenasen statt (rote Fläche), während des Wachstums auf Glycerol findet Hydrogenaseexpression statt (grüne Fläche). B) Wachstum auf GN-Medium (mit 0,4 % Glycerol). Auf Glycerol beginnt die Hydrogenaseexpression direkt nach der Volladaptation (grüne Fläche). Adaptiert aus Friedrich, Heine *et al.* (1981).

## 2.2.2 Kultivierung bakterieller Zellen

Agarplatten wurden bei 37 °C bzw. 30 °C (bei chemolithoautotrophen Bedingungen) unter aeroben Bedingungen (Luft) oder in Exsikkatoren unter definierten Gasgemischen (siehe Text) angezogen.

Für gentechnische Zwecke bzw. als Vorkulturen für größere Flüssigkulturen wurden 10 ml-Flüssigkulturen (in sterilen 100 ml-Erlenmeyerkolben) wahlweise mit einer Einzelkolonie von Platte oder aus einer Glycerolkultur (siehe Kapitel 2.2.7) beimpft. *Ralstonia eutropha*-Vorkulturen wurden in FN-Medium bei 37 °C und 200 upm für 72 Stunden angezogen. *E. coli*-Vorkulturen wurden 24 Stunden bei 37 °C und 200 upm in LSLB-Medium kultiviert. Die Hauptkulturen wurden mit 1 % (v/v) der Vorkultur inokuliert.

Für Anzuchten mit geringen bis mittleren Volumen wurde *R. eutropha* in mehreren 500 ml-Schikanekolben (gefüllt mit 166 ml Medium) bei 30 °C und 100 upm kultiviert. Je nach verwendetem Medium schwankte die Kultivierungsdauer in der Regel zwischen 48 Stunden (FGN) und ≤ 9 Tagen (GN-Medium). Für *R. eutropha*-Kulturen, die unter chemolithoautotrophen Bedingungen angezogen wurden, wurden die Schikanekolben mit AutN-Medium befüllt und (6 Stück max.) in 21L-Exsikkatoren platziert. Der Exsikkator wurde mit einem Gasgemisch, bestehend aus 65-75 % N<sub>2</sub>, 5-15 % O<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub> und 10 % CO<sub>2</sub>, (genaue Volumenanteile im Text; Gase werden immer in v/v angegeben) befüllt. Gegebenenfalls wurden noch 5000 ppmv CO zugegeben.

Bei großen Kulturvolumen unter heterotrophen Bedingungen (z. B. *R.e.HypCD*-Komplexe) wurden bis zu (2x) 10L-FGN-Kulturen in einem Fermenter (Biostat MD, B.Braun, Melsungen, Deutschland) bei 30 °C und einer Rührergeschwindigkeit von 400 upm angezogen. Die Kulturen wurden mit einer Flussrate von 4 l/min mit sterilfiltrierter Luft (Millidisk 10, Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland) durchgast. Nach Erreichen einer OD<sub>436</sub> von ~10 ± 1, wurden die Zellen abgeschöpft, auf Eis gestellt und - wie unten erläutert - geerntet.

Zur Überexpression des *E.c.HypCD*-Komplexes wurden sechs 5L-Erlenmeyerkolben bis zum Rand mit sterilem TGYEP-Medium befüllt und mit einem Silikonstopfen und Parafilm<sup>TM</sup> luftdicht verschlossen. Nachdem das Medium sich bei 37 °C äquilibriert hatte, wurde die Hauptkultur mit 1 % einer LSLB-Vorkultur inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von ~0,5 erreicht war. Nach Adaption auf eine Temperatur von 22 °C wurden diese mit 0,1-0,2 mM IPTG induziert. Nach weiteren 12 Stunden bei 22 °C wurden die Zellen auf Eis gestellt und wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben geerntet.

Die Überexpression von MBP::HypX fand in *E. coli* JM109 (pCH631) in aeroben Kulturen in 150 ml LSLB (in 500 ml-Schikanekolben) statt. Nach Inokulation mit 1 % einer entsprechenden Vorkultur wurden die Zellen bei 37 °C und 200 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 kultiviert. Die Induktion erfolgte mit 0,3-0,5 mM IPTG. Nach weiteren 6-8 Stunden wurden die Zellen bei einer OD<sub>600</sub> von 3 ± 0,5 geerntet.

## 2.2.3 Anzucht unter CO-Mangelbedingungen (CO-Limitation)

Die Anzucht unter CO-Limitation erfolgte in 500 ml-Schikanekolben. Bei chemolithoautotrophen Anzuchten wurden diese Kolben mit je 166 ml AutN-Medium, bei heterotrophen Anzuchten mit FGN-Medium gefüllt. Die Kulturen wurden mit 1 % einer H16-Vorkultur inokuliert. Die Anzucht fand anschließend bei 30 °C und 100 upm statt. Jedoch wurden in beiden Fällen die Kulturen in Exsikkatoren (bis zu 6 Kolben) mit künstlicher Atmosphäre kultiviert (autotroph: 10 %H<sub>2</sub>, 10 %CO<sub>2</sub>, 5 %O<sub>2</sub>, und 75 % N<sub>2</sub>; heterotroph: 85 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> sowie nach Beendigung der CO-Limitation 5000 ppmv CO).

Zur Realisierung der CO-Limitation wurden die neu entwickelten Dialysekapseln (siehe Kapitel 3.1) mit 70 %-igem Ethanol sterilisiert und getrocknet. Anschließend wurden sie mit 1 mM PdCl<sub>2</sub>-Lösung

(bezogen auf das absolute Kulturvolumen, gelöst in H16-Puffer) befüllt und mit einer gasdurchlässigen, 125 nm dicken PTFE-Membran (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland) verschlossen. Die montierten Kapseln wurden direkt im Kulturmedium versenkt. Nach Beendigung der anfänglichen CO-Limitation wurden die PdCl<sub>2</sub>-gefüllten Dialysekapseln entnommen und 5000 ppmv des Antagonisten CO wurden zugegeben.

#### 2.2.4 <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente

Sofern nicht anders angegeben wurden die <sup>13</sup>C-Markierungsexperimente aerob, mit jeweils 166 ml FGN-Medium, in sterilen 500ml-Schikanekolben durchgeführt. Bei Experimenten mit <sup>13</sup>C-Fruktose und <sup>13</sup>C-Glycerol wurden 250-800 ml Kulturvolumen eingesetzt. Bei Markierungsexperimenten mit <sup>13</sup>C-Acetat, <sup>13</sup>C-Bicarbonat wurden Kulturvolumina von 330-500 ml verwendet. Die Anzucht erfolgte wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

Markierungsexperimente mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> erfolgten in Exsikkatoren mit einer künstlichen Atmosphäre von 10 % <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, 80 % N<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub>. Die Exsikkatoren wurden mit sechs 500ml-Schikanekolben, mit je 166 ml FGN-Medium, bestückt und, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, kultiviert.

Die <sup>13</sup>CO-Markierungsexperimente erfolgten wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben.

Markierungsexperimente zur Untersuchung der Funktion von HypX mit <sup>13</sup>C-Glycin und <sup>13</sup>C-Formiat wurden aerob unter modifizierten Bedingungen in GN-Medium durchgeführt. Dazu wurden 4-10 sterile 500ml-Schikanekolben mit 166 ml GN-Medium befüllt und mit 0,5-1 % einer entsprechenden Vorkultur inokuliert. Die Kulturen wurden anschließend für mehrere Tage bei 30 °C und 100 upm kultiviert. Nach Erreichen einer OD<sub>436</sub> von 1,0 ± 0,2 wurden die Zellen sequentiell geerntet. Dazu wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in sterilisierten Zentrifugenbechern bei RT und 6.750 x g für 15 Min. (Sorvall RC-6+, Thermo Fischer Kendro, Schwerte, Deutschland) zentrifugiert. Das Medium wurde nach der Zentrifugation wieder in die Anzuchtkolben gegeben und die Kultivierung wurde fortgesetzt. Das Zellpellet wurde in H16-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 °C, 6.000 x g, 5 Min.). Bis zur weiteren Verwendung wurde das Pellet in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Der Erntevorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Die Zellpellets aller Ernten wurden vereinigt und, wie in den Kapiteln 2.3.1 und 2.3.3 beschrieben, aufgeschlossen, gereinigt und durch FTIR-Spektroskopie analysiert (Kapitel 2.4.2).

#### 2.2.5 Bestimmung von Wachstumsparametern

Für analytische Zwecke bzw. zur Bestimmung des Erntezeitpunktes wurde das Wachstum von *Ralstonia eutropha* als Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen. Bei *Escherichia coli* wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Messung der optische Dichte (OD) erfolgte in einer 1 ml-Einwegküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm (Photometer: Libra S12, Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Zur Ermittlung des Nullwertes wurde frisches Medium verwendet. Die OD wurde in einem Bereich von 0,0 – 0,3 gemessen, bei höheren ODs wurde die Probe entsprechend verdünnt.

#### 2.2.6 Zellernte

Nach Beendigung der Anzucht wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Je nach Volumen der Anzucht wurden die Zellen anschließend in 50 ml Falcon®-Tubes oder in 1L-Bechern geerntet. Die Falcon®-Tubes wurden bei 4 °C und 4300 x g (Megafuge 1.0, Thermo Fischer Kendro, Schwerte, Deutschland) für 10 Min. zentrifugiert. Die 1L-Becher wurden bei 4 °C und 6750 x g für 15 Min. (Sorvall RC6+ mit F9S-4x1000y Rotor, Thermo Fischer Kendro, Schwerte, Deutschland) zentrifugiert. Die Zellpellets wurden nach der Ernte, bis zur weiteren Verwendung, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

## 2.2.7 Konservierung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme können als Einzelkolonien auf Agarplatten bei 4 °C und Dunkelheit für bis zu vier Wochen gelagert werden. Für eine dauerhafte Konservierung wurden die Bakterienstämme in LB- (bei *Escherichia coli*) bzw. FN- (bei *Ralstonia eutropha*) Medium mit entsprechenden Additiven (Antibiotika bzw. Glycin) bei 37 °C und 200 upm kultiviert. Nach 24 Stunden wurden 1,6 ml der Kultur in ein steriles Glasröhrchen überführt und steriles Glycerol mit einer Endkonzentration von 15 % (v/v) zugegeben. Die Röhrchen wurden bei -80 °C gelagert. Die Stämme wurden wiedererweckt, indem ein Stückchen der tiefgefrorenen Glycerolkultur mittels einer sterilen Impföse in 10 ml eines entsprechenden Mediums (zumeist LSLB- bzw. FN-Medium) überführt wurde.

## 2.3 Zellfraktionierung und Proteinreinigung

### 2.3.1 Zellaufschluss und Präparation des löslichen Extrakts

Die gefrorenen Zellen wurden im Verhältnis 1:1 (w/v) mit Resuspensionspuffer (siehe unten) gemischt und auf Eis unter ständigem Rühren resuspendiert. Nach vollständiger Resuspension wurden noch DNase I und „Complete EDTA-free“ Proteaseinhibitorcocktail (1Tablette / 50 ml) (beide Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), optional auch 0,1-1 mM DTT, zugegeben. Während des weiteren Zellaufschlusses wurden die Zellen stets auf Eis gekühlt.

Für kleine und mittlere Volumina (bis 30 ml) wurde eine „French Pressure Cell“-Apparatur (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden in zwei Passagen in einer vorgekühlten Druckzelle bei 62,1 bar (6,21 MPa / in einer kleinen Zelle) bzw. bei 75,8 bar (7,58 MPa / in einer großen Zelle) zerstört. Bei großen Volumina ( $\geq 30$  ml) erfolgte der Aufschluss durch zwei Passagen im Basic-Z Aufschlussgerät (Constant Systems Limited, Northants, UK) bei einem Druck von 1,6 kbar.

Der Rohextrakt wurde im Anschluss an den Zellaufschluss für 45 Min. bei 90.000 x g und 4 °C zentrifugiert, um den löslichen Extrakt von Zelldebris und Membranfragmenten zu trennen. Unmittelbar nach der Ultrazentrifugation wurde der lösliche Extrakt in ein frisches Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.3.2 Präparation der inneren Membran

Basierend auf einem Protokoll zur Präparation von *E. coli*-Sphäroplasten nach Witholt *et al.* (Witholt, Boekhout *et al.* 1976) wurde die Fraktion der inneren Membran mittels eines osmotischen Schocks präpariert. Dazu wurden mindestens 3-5g frisch geerntete Zellen (ohne vorheriges Einfrieren und Auftauen!!) in 1000 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,8 @ RT) gewaschen und erneut für 20 Min. bei 4800 x g und 4 °C sedimentiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 400 ml Saccharosepuffer (192 g Saccharose in 500 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer; pH7,8 @ RT) und 1 mM EDTA resuspendiert und für 5 Min. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 20 Min. bei 15.100 x g und 4 °C (Sorvall RC5C mit SS34 Rotor, Thermo Fischer Kendro, Schwerte, Deutschland) abzentrifugiert. Durch erneute Resuspension des Pellets in 200 ml ddH<sub>2</sub>O platzte die äußere Membran ab, dies legte die Sphäroplasten frei. Diese wurden durch Zentrifugation (20 Min., 4000 x g, 4 °C, Megafuge 1.0, Thermo Fischer Kendro, Schwerte, Deutschland) geerntet. Der Überstand mit der äußeren Membranfraktion wurde verworfen, die Sphäroplasten wurden in Flüssigstickstoff schockgefrostet und konnten so bei -80 °C gelagert werden. Zur weiteren Verwendung wurde das Pellet aufgetaut und in 10 ml gekühltem 50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0 @ RT) resuspendiert. Die Sphäroplasten wurden dann wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben aufgeschlossen und abzentrifugiert. Der Überstand mit dem Cytoplasmaextrakt wurde verworfen und das Zellpellet in ca. 1 ml 50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0 @ RT) resuspendiert und durch eine

Ultraschallbehandlung auf Eis (2 Min. Level 2,5, 75 %; Sonifier W-250 mit 5 mm Standardspitze, Branson Ultrasonics, Danbury, USA) vollständig homogenisiert. Diese homogenisierte innere Membran konnte so direkt für die Aktivitätsmessung bzw. für die Infrarotspektroskopie verwendet werden.

### 2.3.3 Affinitätschromatographie

Zur Anreicherung rekombinanter Proteine aus löslichen Extrakten wurde die Affinitätschromatographie eingesetzt. Dazu wurden zwei verschiedene Systeme verwendet.

Bei der Reinigung über einen *Strep-TagII*<sup>®</sup> wurde eine rekombinante Variante des Zielproteins konstruiert, bei der der N- oder C-Terminus mit einem zusätzlichen Oligopeptid (WSHPQFEK) versehen wurde. Dieses bindet spezifisch und hochaffin an das *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Granulat, welches eine modifizierte Variante des Streptavidin ist (Schmidt, Koepke *et al.* 1996; Voss und Skerra 1997).

Bei der Anreicherung über Amylosegranulat wurde das Zielprotein mit MBP (*Maltose Binding Protein*) fusioniert, welches spezifisch an Amylose bindet, jedoch mit 42,5 kDa recht groß ist und zur Beeinträchtigung der Aktivität des Zielproteins führen kann. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Proben selbst wurden ständig mit Eis gekühlt.

#### Proteinreinigung über *Strep-TagII*

Zur Reinigung kleiner Anzuchten (3-5 g Nassgewicht) wurden vorwiegend *Strep-Tactin Spin Columns* verwendet (IBA, Göttingen, Deutschland). Dieses Verfahren wurde zumeist bei der RH-Reinigung (u. a. bei Markierungsexperimenten) angewendet. Die Säulen wurden mit 2 x 500 µl Resuspensionspuffer (Puffer W: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0 @ 4 °C) äquilibriert. Dazu wurden die Säulen mit einem Festwinkelrotor bei 700 x g und 4 °C für 1 Min. zentrifugiert (Fresco 21, Thermo Fischer, Schwerte Deutschland). Anschließend wurde der präparierte lösliche Extrakt (siehe Kapitel 2.3.1) in Aliquots von 700 µl auf die äquilibrierten Säulen gegeben. Jedes Aliquot wurde wiederum für 1 Min. mit 700 x g und bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Durchfluss ein zweites Mal appliziert. Zuvor wurde die Säule jedoch mit 2 x 700 µl Puffer W gewaschen. Nach dem zweiten Durchgang wurde die Säule viermal mit 100 µl Puffer W gewaschen. Es wurde jeweils mit voller Geschwindigkeit bei 4 °C für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurde das gebundene Protein mit vier Aliquots á 150 µl Elutionspuffer (Puffer BE: wie Puffer W, jedoch mit 5 mM d-Biotin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland)) eluiert. Dazu wurde für 1 Min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Eluat wurde vereinigt und mittels Amicon Ultra-15 bzw. Amicon Ultra-0.5 mit Ultracel 30K bzw. 10K (Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben auf ein Volumen zwischen 10-30 µl eingengt. Durch einen gleichzeitigen Pufferaustausch wurde der Elutionspuffer gegen einen Lagerungspuffer mit 5 % Glycerol (Puffer S: 10 mM Tris-HCl, 5 % (w/v) Glycerol pH 8,0 @ 4 °C) ausgetauscht. Die Proben wurden, bis zur weiteren Verwendung, in Flüssigstickstoff eingefroren und gelagert. Abbildung 6-1 zeigt exemplarisch eine RH<sub>StopStrep</sub>-Reinigung.

Zur Reinigung großer Zellmengen (bis zu 80 g Nassgewicht), u. a. bei Reinigung des HypCD-Komplexes aus *R. eutropha* und *E. coli* wurde *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Superflow<sup>®</sup>-Matrix (IBA, Göttingen, Deutschland) verwendet. Dazu wurden Chromatographiesäulen mit 0,5-1 ml *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Superflow<sup>®</sup> gestopft. Nach Äquilibration der Säule mit dem verwendeten Aufschlusspuffer (Puffer A: 50 mM Tris-HCl, 0,1 mM DTT, pH 7,5 @ 4 °C; 1 Tablette *Complete* EDTA-free/50ml) wurden die Säulen mit dem löslichen Extrakt beladen. Nach einem Waschschrift mit 40 SV Puffer B (Puffer B: 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5 @ 4 °C) wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben. Nach einem zweiten Waschschrift (40 SV Puffer B) wurde das gebundene Protein mit 6 x 1,5 SV Elutionspuffer (Puffer C: 50 mM Tris-HCl, 0,1 mM DTT, 5 mM d-Desthiobiotin, pH 7,5 @ 4 °C) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mittels Amicon Ultra-15 bzw. Amicon Ultra-0.5 mit Ultracel 30K bzw. 10K

(MWCO) (Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben auf ein Volumen zwischen 10-30 µl eingengt. Durch einen gleichzeitigen Pufferaustausch wurde der Elutionspuffer gegen einen Lagerungspuffer mit 5 % Glycerol (Puffer S: 10 mM Tris-HCl, 5 % (w/v) Glycerol pH 8,0 @ 4 °C) ausgetauscht. Die Proben, bis zur weiteren Verwendung (z. B. FTIR-Spektroskopie), in Flüssigstickstoff eingefroren und gelagert. Die Säulen konnten durch Applikation von 8 SV des Regenerationspuffers (Puffer C: 100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM HABA, pH 8,0 @ 4 °C) regeneriert werden. Abschließend wurde die Säule mit Puffer A solange äquilibriert, bis keine Reste des HABA mehr sichtbar waren.

### **Proteinreinigung über MBP (*Maltose-Binding-Protein*)**

Zur Reinigung eines MBP-Fusionsproteins (MBP::HypX) wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 0,5 ml Amylosematrix (NEB, Frankfurt a. M., Deutschland) gegossen. Diese Säule wurde mit 10 Säulenvolumen (SV) Resuspensionspuffer (*Column Buffer*: 20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,4 @ 4 °C) äquilibriert. Der lösliche Extrakt (siehe Kapitel 2.3.1) wurde zweimal hintereinander über die Säule geben und zwischendurch mit 10 SV Resuspensionspuffer gewaschen. Nach dem zweiten Durchgang wurde mit 10 SV Resuspensionspuffer gewaschen. Anschließend wurde sechs Mal mit 1 SV Elutionspuffer (wie Resuspensionspuffer mit zusätzlich 10 mM Maltose) eluiert.

Nach erfolgter Elution konnte die Säule regeneriert werden. Dazu wurden der Reihe nach mit 3 SV Resuspensionspuffer, 3 SV 0,1 % SDS, 1 SV dH<sub>2</sub>O und 5 SV Resuspensionspuffer äquilibriert. Abschließend wurden die Säulen in 20 %-igem Ethanol bei 4 °C gelagert. Das Eluat wurde vereinigt und mittels Amicon Ultra-15 mit Ultracel-30 (Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben auf ein Volumen von 200 µl eingengt.

### **2.3.4 Größenausschlusschromatographie**

Zur Konzentration von Proben, bzw. zur weiteren Trennung von Proteinfraction, sowie zur Analyse von Proben wurden diese einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Nachdem die Proteinproben, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, gereinigt und auf ein Volumen von 200 µl eingengt wurden, wurden sie in einem Äkta *purifier* (GE Healthcare, München, Deutschland) über eine *HiLoad 16/60 Superdex Prep grade*-Säule (Code: 17-1069-01; Säulenvolumen: 120,637 ml, V<sub>0</sub>: 39,8, Flussrate: 1,0 ml/Min.; GE Healthcare, München, Deutschland) gereinigt. Diese Säule wurde UN mit *Column Buffer* (20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,4 @ 4 °C) äquilibriert. Anschließend wurde der Äkta über einen 500 µl-*Loop* mit der Probe befüllt. Dieser *Loop* wurde zu Beginn der Äkta-Reinigung mit 1,5 ml Puffer geleert. Der gesamte Lauf wurde mit 1,2 SV *Column Buffer* durchgeführt. Die Fraktionierung begann nach 0,1 SV, die Fraktionsgröße betrug 1,0 ml. Während der Äkta-Reinigung wurden zwei UV-Vis-Spektren bei 280nm und 415 nm aufgenommen. Nach Analyse der Fraktionen mittels denaturierender SDS-PAGE wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und entsprechend den Herstellerangaben mittels Amicon Ultra-15 mit Ultracel-30 (Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland) auf ein Volumen von 500 µl eingengt. Zur Ermittlung der Größe wurde das *Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12-200 kDa* (MWGF200-1KT; Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) verwendet.

### **2.3.5 Proteolytische Spaltung des MBP::HypX-Fusionsproteins**

Zur Spaltung des MBP-Fusionsproteins wurde das konzentrierte und gereinigte MBP::HypX-Protein mit 1 % (1 mg Protease / 100 mg Fusionsprotein) *Factor Xa Protease* (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) versetzt und gemischt. Anschließend wurde das Protein für 4 - 48 Stunden bei 4 °C inkubiert und der Verdau mittels SDS-PAGE überprüft.

## 2.4 Probenanalytik

### 2.4.1 Photometrische Proteinquantifizierung mittels BCA-Test

Die Proteinquantifizierung mittels BCA (Bicinchoninsäure) nach Smith *et al.* basiert auf dem quantitativen Umsatz von zweiwertigen Kupfer-Ionen mit Protein zu einwertigen Kupfer-Ionen (Biuret-Reaktion). Diese reagieren in einem zweiten Schritt mit Bicinchoninsäure. Der entstandene Kupfer-BCA-Komplex besitzt eine intensive violette Färbung und lässt sich anhand seiner Absorption bei 562 nm photometrisch auswerten (Smith, Krohn *et al.* 1985).

Für die Messung wurde das *BCA Protein Assay Kit* von Pierce (Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet. Die beiden Stammlösungen müssen vor Beginn der Messung im Verhältnis 50:1 (BCA A : BCA B) zur gebrauchsfertigen Arbeitslösung gemischt werden. Nachfolgend wurden je 25 µl der verdünnten Proben (linearer Bereich 20-2.000 µg/ml) und der definierten BSA-Proteinstandards (jeweils Dreifachbestimmung) in eine 96-Well-Platte pipettiert und jeweils 200 µl der Arbeitslösung zugegeben. Anschließend wurden die Proben für mindestens 30 Min. bei 37 °C inkubiert und in einem *SpectraMax 340* Plattenlesegerät (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) ausgewertet.

### 2.4.2 Fourier transformierte Infrarot (FTIR)- Spektroskopie

Die FTIR-Spektroskopie wurde am Max-Volmer-Labor für Biophysikalische Chemie an der TU Berlin in der AG Hildebrandt durchgeführt. Die Spektren wurden mit einem *Bruker Tensor 27* FT-IR-Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland) mit einem, mit Flüssigstickstoff gekühlten, Quecksilber-Cadmium-Tellurid- (MCT)-Detektor aufgenommen. Die spektrale Auflösung betrug dabei 2 cm<sup>-1</sup>. Der Probenraum wurde mit getrockneter Druckluft gespült. Die Probe wurde in einer gasdichten, temperaturkontrollierten IR-Flüssigkeitszelle (Zellvolumen ~ 7 µl, optische Weglänge = 50 µm) mit CaF<sub>2</sub>-Fenstern bei einer konstanten Temperatur von 10 °C gemessen. Die Konzentration der Proben lag bei der RH bei 50-300 µM und beim HypCD-Komplex bei 0,24-1,9 mM. Für ein Spektrum wurden wenigstens 200 *Scans* addiert. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden bis zu 30 Spektren gemittelt. Die Hintergrundspektren wurden mit Lagerpuffer (Puffer S: 10mM Tris-HCl, 5 % (w/v) Glycerol pH 8,0 @ 4 °C) aufgenommen. Bei Proben mit einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis wurde die Probe, nach der ersten Messung, über mehrere Tage bei Raumtemperatur denaturiert und erneut gemessen. Aus beiden Spektren wurde ein Differenzspektrum gebildet. Bei ausreichend großem Signal-Rausch-Verhältnis wurden die Spektren mittels einer *Spline*-Funktion aus der OPUS 6.5 Software-Suite von Bruker auf eine Basislinie normiert.

### 2.4.3 Photometrische Bestimmung der Hydrogenaseaktivität der SH in ganzen Zellen

Die Bestimmung der Hydrogenaseaktivität der SH (EC 1.12.1.2) erfolgte, basierend auf einem Protokoll von Friedrich *et al.*, mittels einer photometrischen Methode in permeabilisierten Zellen (Friedrich, Heine *et al.* 1981). Die Zellen, die zur Messung verwendet wurden, wurden abzentrifugiert (15 min. bei 4 °C und 4300 x g; Megafuge 1.0, Thermo Fischer Kendro, Schwerte, Deutschland), einmal mit K-PO<sub>4</sub>-Puffer (50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,0 @ RT) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in K-PO<sub>4</sub>-Puffer resuspendiert (das Volumen entspricht dabei einer OD<sub>436</sub> = 30,0). Die Messung erfolgte in einer 3 ml-Anaerobenküvette aus Quarzglas, versiegelt mit einem Gummistopfen. Zum H<sub>2</sub>-gesättigten Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 @ RT, temperiert auf 30 °C) wurden je Probe 30 µl der Zellsuspension (OD<sub>436</sub> = 30,0, entspricht 3,16 mg/ml – unveröffentlichte Ergebnisse Dr. O. Lenz) zugegeben und mindestens für 1 Min. mit H<sub>2</sub> begast. Nach einer Vorinkubation von *exakt* 1 Min. mit 10µl einer 0,5 %-igen CTAB-Lösung wurde die Messung durch die Zugabe von 20 µl NAD<sup>+</sup>-Lösung

(48 mM NAD<sup>+</sup>) initiiert. Die Bildung der H<sub>2</sub>-abhängigen NADH-Bildung wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm, in einem auf 30 °C temperierten Photometer (Cary 50, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), beobachtet. Unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADH ( $\Sigma_{365\text{ nm}} = 3.3\text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) wurde die gebildete Menge NADH quantifiziert und auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen. Angegeben wurden die spezifischen SH-Aktivitäten (*Units/mg Protein*). Eine *Unit* ist definiert als die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  NADH pro Min.

#### 2.4.4 MBH-Aktivität an präparierter Membranfraktion

Die MBH-Aktivität von Membranfraktionen (siehe Kapitel 2.3.2) wurde gemäß einem Protokoll, modifiziert nach Schink & Schlegel (1979), quantifiziert (Schink und Schlegel 1979). Dazu wurden die Zellen geerntet (4.300 x g, 4 °C) und einmal mit 50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer (pH7,0 @ RT) gewaschen. Nach erneutem abzentrifugieren wurden die Zellen 1:1 (Gewicht:Volumen) mit 50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer resuspendiert und in zwei Passagen durch die French Pressure Cell (900 PSI; G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland) aufgeschlossen. Die Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 4.800 x g (20 Min. bei 4 °C) entfernt. Im Anschluss wurde der Überstand 45 Min. bei 90.000 x g zentrifugiert. Die sedimentierte Membranfraktion wurde in 50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer resuspendiert und mit Hilfe eines *Potter*-Gerätes homogenisiert. Zur Messung wurden 1,9 ml eines H<sub>2</sub>-gesättigten Reaktionspuffers (30 °C, 50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer, pH7,0 @ RT) sowie 7,5  $\mu\text{l}$  einer Methylenblau-Lösung (50 mM Methylenblau in 50 mM K-PO<sub>4</sub>-Puffer, pH7,0 @ RT) in einer 3ml-Anaerobenküvette, versiegelt durch einen Gummistopfen, vorgelegt. Nach *exakt* 1 Min. Begasung mit H<sub>2</sub> wurden 5  $\mu\text{l}$  einer Na-Dithionit-Lösung (30 mM, in ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit H<sub>2</sub> anaerobisiert) zugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Proteins (15-50  $\mu\text{l}$ ) initiiert. Der H<sub>2</sub>-abhängige Umsatz von Methylenblau wurde in einem Spektrophotometer (*Cary 300*, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bei einer Wellenlänge von 570 nm und 30 °C aufgenommen. Mittels des molaren Extinktionskoeffizienten von Methylenblau ( $\Sigma_{570\text{ nm}} = 13,1\text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und der eingesetzten Proteinmenge wurde die Enzymaktivität bestimmt. 1 *Unit* ist dabei definiert als die Reduktion von 1  $\mu\text{mol}$  Methylenblau pro Min.

#### 2.4.5 Aufnahme von UV-Vis-Absorptionsspektren

Die UV-VIS-Spektren des MBP::HypX-Fusionsproteins und des MBP wurden in einem Zweistrahl-UV-VIS-NIR-Spektrophotometer *Cary 5000* (Varian Inc., Palo Alto, USA) aufgenommen. Die Messung erfolgte in 100 $\mu\text{l}$ -Quarzküvetten (d= 10 mm, Varian Inc., Palo Alto, USA) bei 12 °C, in einem Wellenlängenbereich von 800 – 200 nm und einer Scangeschwindigkeit von 600 nm/Minute. Als Referenz diente der Aufschlusspuffer (20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,4 @ 4 °C), welcher zuvor bereits für die Affinitäts- (Kapitel 2.3.3) und die Größenausschlusschromatographie (Kapitel 2.3.4) verwendet worden war. Für Messungen wurden jeweils frische, oxidierte (*as isolated*) Proben verwendet.

#### 2.4.6 Bestimmung des Metallgehaltes von Proteinen (ICP-OES)

Der Metallgehalt des MBP und des MBP::HypX-Fusionproteins wurde durch optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Hochfrequenzplasma quantifiziert. Dazu wurde ein Optima 2100 ICP-OES (Perkin Elmer, Waltham, USA) verwendet. Es wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  der Probe ( $\geq 10\text{ }\mu\text{M}$ ) und des Puffers (20 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,4 @ 4 °C) mit 500 $\mu\text{l}$  65 %-iger Salpetersäure versetzt und ÜN bei 100 °C verascht. Anschließend wurden die Proben mit 5 ml ddH<sub>2</sub>O verdünnt und im ICP vermessen. Der Einsatz von Polychromatoren erlaubte die parallele Messung verschiedener spezifischer Emissionswellenlängen. Dabei wurden für jedes Ion je drei spezifische Wellenlängen gemessen (Fe: 238,204 nm, 239,562 nm, 259,939 nm; Co: 228,616 nm,

238,892 nm, 230,786 nm; Ni: 231,604 nm, 221,648 nm, 232,003 nm; Zn: 206,200 nm, 213,857 nm, 202,548 nm). Die Quantifizierung fand über die ICP-Mehrelementstandardlösung XVI (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) statt.

## 2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 2.5.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen (mit 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat; engl.: *sodium dodecyl sulfate*) durch diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese voneinander getrennt (Laemmli 1970). Es wurden zwei Arten vertikaler Gelkammern verwendet. Für Minigele (80 x 100 x 1 mm) wurde die MTV1 (CTI GmbH, Idstein, Deutschland) verwendet. Zur Trennung von gereiften und ungereiften großen Hydrogenaseuntereinheiten wurde die *SE600 series Electrophoresis Unit* (160 x 180 x 1,5 mm; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) verwendet.

Die Sammelgele besaßen eine 4 %-ige Konzentration an Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30, Car Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 125 mM Tris-HCl Puffer (pH 6,8 @ RT), sowie 0,1 % (w/v) SDS (Detergenz), 0,2 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat, Radikaldonor) und 0,05 % (v/v) TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin, Polymerisationskatalysator). Die Trenngele besaßen eine 12-16 %-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration in 750 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,8 @ RT) sowie die zuvor genannten Additive in gleicher Konzentration.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte in Minigelen für ca. 45 Min. bei 35 mA pro Gel, in Maxigelen erfolgte die Elektrophorese ÜN bei 8 °C und 50-60 mA pro Gel (Stromquelle EPS 600; vormals Pharmacia Biotech). Als Laufpuffer diente SDS-haltiger Tris/Glycin-Puffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % w/v SDS, pH 8,3). Als Größenstandards dienten der *Dual Color Precision Plus Protein™* Standard (Bio-Rad, München, Deutschland) oder der *Color Plus Prestained Protein Ladder Broad Range* (10-230 kDa; NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Proteinproben wurden mit 0,2 Volumen SDS-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, 40 % w/v Glycerol, 500 mM DTT, 0,1 % Bromphenolblau, 5 % w/v SDS; pH 6,8) vermischt und für 7 min bei 100 °C denaturiert. Für die SDS-PAGE bzw. Western-Blot-Analysen von Rohextrakten wurde ein Äquivalent von 1 ml Kultur mit  $OD_{436} = 2,5$  geerntet (2 min, 13.000 x g), das Zellpellet anschließend in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min gekocht.

### 2.5.2 Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Proteine wurden im Polyacrylamidgel mittels einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Wilson 1983; Borejdo und Flynn 1984). Die Gele wurden mit Hilfe einer Schwenkapparatur für ca. 30 Min. in der Färbelösung (425 ml 96 % (v/v) Ethanol, 100 ml Eisessig, 50 ml Methanol, 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 und 2,0 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland)) inkubiert. Das gefärbte Gel wurde zwei bis dreimal unter fließendem Wasser gespült und anschließend über Nacht in Entfärber (250 ml Methanol, 46 ml Eisessig, auf 1L mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt) gelegt. Mehrfacher Wechsel des Entfärbers beschleunigt diesen Vorgang.

## 2.6 Immunologische Detektion von Proteinen

Sofern nicht gereinigtes Protein verwendet wurde (siehe Text), wurde für den immunologischen Nachweis von Proteinen Gesamtzellextrakt hergestellt. Dazu wurden die Zellen bis zu einer  $OD_{436}$  von 30 konzentriert und zwei Mal für sieben Minuten gekocht. Im Anschluss wurden die Proteine, wie im Folgenden beschrieben, immunologisch nachgewiesen.

### 2.6.1 Proteintransfer

Nach der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine in einem modifizierten *Semi-Dry*-Verfahren nach Towbin (1979) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose- (NC)- Membran (Biotrace NT, Pall, Port Washington, USA) übertragen (Towbin, Staehelin *et al.* 1979). Dabei wurden Gel und Membran in einem horizontalen Aufbau (PerfectBlue Semi-Dry Electrobloetter, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) durch zwei mit Blot-Puffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin; pH 8,3) getränkte, 3mm-starke *Whatman*-Papiere (Blotting Paper Sheet BF4, Munktell & Filtrak GmbH, Bärnstein, Deutschland) von Anode und Kathode getrennt. Der Proteintransfer erfolgte bei 0,7 A/pro Gel und dauerte ca. 36 Min. In Vorbereitung wurden NC-Membran und *Whatman*-Papiere für mindestens 30 Min. in Blot-Puffer geschwenkt.

Der Erfolg des Proteintransfers konnte nach Beendigung mittels einer transienten Färbung mit Ponceau S (0,2 % w/v Ponceau S in 3 % w/v TCA / Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland) überprüft werden. Das Ponceau S konnte im Anschluss durch mehrmaliges, vorsichtiges Spülen mit dH<sub>2</sub>O entfernt werden. Unbesetzte Bindestellen der NC-Membran wurden mit Milchprotein abgesättigt. Dazu wurde die Membran bis zur weiteren Verwendung, mindestens aber für eine Stunde, in einem Blockpuffer gelagert (3 % (w/v) Magermilchpulver, 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin; pH 8,3).

### 2.6.2 Antikörperfärbung

Die Detektion bestimmter Proteine in Zellextrakten und Eluaten erfolgte über einen immunologischen Nachweis. Dazu wurden diverse polyklonale Antikörper (AK) aus Kaninchensera gewonnen (Buhrke 2006). In dieser Studie wurden verschiedene AK verwendet, die zuvor mit TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20, pH 7,5 @ RT) auf ihre Endkonzentration verdünnt wurden;  $\alpha$ -HypC (AK82, 1:500),  $\alpha$ -HypD (AK79, 1:1.000)  $\alpha$ -HypX (AK89, 1:500),  $\alpha$ -HoxG (AK88, 1:10.000),  $\alpha$ -HoxH (AK59, 1:10.000),  $\alpha$ -RH (AK 105, 1:5.000). Des Weiteren wurden zwei monoklonale Maus-Antikörper verwendet. Proteine mit *StrepTagII*<sup>®</sup> wurde mit *StrepMAB*-Classic (1:1.000; IBA, Göttingen, Deutschland), das MBP mit *Anti-MBP Monoclonal Antibody* (1:2.000; NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) nachgewiesen. Diese ersten AK wurden in einem zweiten Schritt durch ein Konjugat aus der Meerrettich-Peroxidase und einem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-AK (Dianova, Hamburg, Deutschland) bzw.  $\alpha$ -Maus-IgG-AK (BioRad, München, Deutschland) gebunden.

Nach dem Proteintransfer auf eine NC-Membran und einer Inkubation in Blockpuffer (Kapitel 2.6.1) wurde diese dreimal für 15 Min. in TBST gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem ersten AK gegen die nachzuweisenden Proteine (120 Min. auf Schwenkinkubator; Celloshaker, Rennner, Dannstadt, Deutschland). Nach weiteren drei Waschschritten wurden die Membranen für 60 Min. mit dem zweiten AK inkubiert. Nachdem der zweite AK entfernt worden war, wurde abermals in TBST gewaschen (3x) und ein weiteres Mal mit TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 @ RT).

Die Färbung erfolgt über den enzymkatalysierten Umsatz von BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) zu 5-Brom-4-chlor-indolyl, welches in Gegenwart von O<sub>2</sub> zu Indigoblau oxidiert und blau-violette Banden auf der Membran hinterlässt. Dazu wurden BCIP (50 mg/ml in 100 % (v/v) Dimethylformamid) und NBT (100 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid) im Verhältnis 1:2000 in Entwicklungspuffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5 @ RT) verdünnt und auf die Membranen gegeben. Die Färbung erfolgte innerhalb der nächsten 15-30 Min. bei RT und Dunkelheit. Nach Abschluss der Färbung wurde die enzymatische Reaktion durch ddH<sub>2</sub>O unterbrochen.

## 2.7 Quantitative Bestimmung freier und gelöster Gase

### 2.7.1 Nicht-invasive Sauerstoffmessung

Zur Messung des im Medium gelösten Sauerstoffs wurde eine nicht-invasive Sauerstoffsonde der Firma PreSens verwendet (Fibox 3 mit Sensor Spot Typ PSt3, PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland). Die Messung basiert auf einem photometrischen Verfahren, bei dem die Konzentration des Sauerstoffs (gelöst und gasförmig) von außen durch die transparente Glaswandung gemessen werden kann, ohne dass die Kultur kontaminiert wird. Die *Sensor Spots* werden innen an den Kulturgefäßen befestigt. Das blaue LED-Licht der Sonde regt die Fluoreszenz des *Sensor Spots* an. Die Emission wird über eine Photozelle des Sensors registriert und ausgewertet. In Gegenwart von Sauerstoff wird die Reaktivität des Materials reversibel unterdrückt, so dass die Fluoreszenz herabgesetzt wird. Die Menge des gebundenen Sauerstoffs verhält sich dabei antiproportional zum Fluoreszenzsignal. Gebundener Sauerstoff und Medium befinden sich in einem Equilibrium zueinander.

Zur Messung wurden sterile 500ml-Schikanekolben mit einem PSt3 *Sensor Spot* ausgestattet. Im Anschluss wurden die Kolben mit 70 %-igem Ethanol sterilisiert und für 48 Stunden bei 70 °C getrocknet. Die sterilen Kolben wurden mit 166 ml GN-Medium (auf 30 °C äquilibriert) befüllt und mit 1 % einer H16-Vorkultur inokuliert (72 Stunden, FN-Medium, 37 °C, 200 upm). Nach Inokulation wurden die Kulturen bei 30 °C und 100 upm kultiviert.

Die Zwei-Punkt-Kalibrierung der Sonde erfolgte mit H16-Puffer bei 30 °C. Für die Messung des gesättigten Puffers wurde ein 500ml-Schikanekolben mit 166 ml H16-Puffer für mindestens 30 Minuten bei 30 °C und 100 upm geschüttelt. Für die Messung von sauerstofffreiem Puffer wurden 166 ml einer 1 %-igen Natriumsulfitlösung (in H16-Puffer) in einen 500ml-Schikanekolben mit *Sensor Spot* geschüttelt, anschließend wurden 50 µl einer 500 mM Kobalt(II)nitratlösung zu der Natriumsulfitlösung pipettiert. Nach 5-minütiger Ruhephase wurde die anaerobisierte Lösung zur Messung des Nullpunktes verwendet.

Da die *Sensor Spots* sowohl auf gelösten als auch auf gasförmigen Sauerstoff reagieren, muss eine *Supersaturation* des Mediums vermieden werden. Um nicht gelösten Sauerstoff ausperlen zu lassen, wurden die Kulturen *exakt* 5 Minuten vor den Messungen vom Schüttelinkubator genommen und ruhen gelassen. Im Anschluss an die Sauerstoffmessung wurde von jeder Probe 1 ml für die OD-Messung abgenommen.

Der Temperaturfühler wurde während der Messung in H16-Puffer (166 ml in 500ml-Schikanekolben) gelegt um temperaturabhängige Schwankungen der Sauerstoffkonzentration zu kompensieren. Während und vor der Messung wurden alle Lösungen im Brutraum (bei 30 °C) äquilibriert. Auch während der Messung wurden alle Arbeitsschritte bei 30 °C durchgeführt. Die Werte der Sauerstoffkonzentration sind Mittelwerte von drei Experimenten mit jeweils vier technischen Replikaten.

### 2.7.2 Quantifizierung der produzierten CO-Menge mittels <sup>13</sup>CO-Titration

Zur Bestimmung des Äquimolaritätspunktes wurde *Ralstonia eutropha* HF574 (pGE1102) unter heterotrophen Bedingungen angezogen. Dazu wurden pro CO-Konzentration und Einzelmessung vier bis sechs sterile 1100ml-Serumflaschen mit jeweils 200 ml FGN<sub>Tc</sub>-Medium befüllt und mit 1 % einer Vorkultur inokuliert. Anschließend wurden die Serumflaschen mit einem Gummistopfen gasdicht versiegelt und eine definierte Gasatmosphäre von 70 % N<sub>2</sub> und 30 % O<sub>2</sub> wurde eingestellt. Zusätzlich wurde <sup>13</sup>CO (99 % <sup>13</sup>C, Eurisotop, Saarbrücken, Deutschland) in variierenden Mengen, von 0,0053-530 ppmv, zugegeben. Die Zellen wurden bei 30 °C und 100 upm für 72 Stunden kultiviert. Bei einer OD von 10 ± 2 wurden die Kulturen auf Eis gestellt und, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, geerntet. Die Zellen aller biologischen Replikate wurden vor der weiteren Verarbeitung vereinigt. Die exprimierte

RH<sub>StopStrep</sub> aus diesen Zellen wurde, wie in Kapitel 2.3.1 und Kapitel 2.3.3 beschrieben, isoliert und mittels FTIR-Spektroskopie (Kapitel 2.4.2) evaluiert. Der relative Anteil von <sup>13</sup>CO am <sup>12/13</sup>CO-Gesamtpool beträgt am Äquimolaritätspunkt 50 % und entspricht hier der Menge an - durch die Zellen produziertem - <sup>12</sup>CO.

### 2.7.3 Quantitative Gaschromatographie

Zur Messung der von *Ralstonia eutropha*, unter heterotrophen Bedingungen, produzierten CO<sub>2</sub>-Menge wurde ein Verfahren der quantitativen Gaschromatographie eingesetzt. Diese Messungen wurden in der AG Conrad am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie durchgeführt.

Im Vorfeld der Messung wurden die zu untersuchenden Stämme, H16 und HF469, in gasdicht verschlossenen 1100 ml-Serumflaschen über einen Zeitraum von 96 Stunden bei 30 °C und 100 upm kultiviert. Zu Beginn der Anzucht wurden die sterile Serumflaschen mit 200 ml GN-Medium befüllt und mit 1 % einer entsprechende Vorkultur inokuliert. Im Anschluss wurde eine artifizielle Atmosphäre von 70 % N<sub>2</sub> (v/v) und 30 % O<sub>2</sub> (v/v) eingestellt.

Die Proben wurden in einem Abstand von 24 Stunden, ab Beginn der Kultivierung, entnommen. Dazu wurden 0,3 ml Chromatographie-Phiolen (03-FIV, Chromacol Ltd., Herts, UK) vollständig – ohne Lufteinschlüsse – mit einer gesättigten NaCl-Lösung befüllt und mit Quetschhülsen (11-AC7, Chromacol Ltd., Herts, UK) gasdicht verschlossen. Die Proben (250 µl) wurden mittels einer gasdichten *Pressure Lock*-Mikroliter-Spritze (SGE Analytical Science Pty. Ltd., Ringwood, Australien) aus den Serumflaschen entnommen und kopfüber in die Chromatographie-Phiolen gefüllt. Überschüssige Sperrflüssigkeit konnte dabei durch eine separate Kanüle entweichen. Nach Befüllung wurden die Phiolen nur noch kopfüber transportiert und gelagert.

Die Messung der Gaskonzentrationen erfolgte unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID) in einem Gaschromatographen (GC-8A mit 20 cm-Edelstahlsäule und einem Innendurchmesser von 1/8“, befüllt mit Poropack QS 50/100 Mesh; Betriebstemperatur: Injektor und Detektor 160 °C, Säule 120 °C, Shimadzu, Kyoto, Japan). Das Funktionsprinzip basiert auf der Messung der Leitfähigkeit einer Knallgasflamme in einem elektrischen Feld. Die zu messenden Gase werden thermisch ionisiert und die freiwerdenden Ionen detektiert. Um oxidierte Gase, wie CO<sub>2</sub> und CO, zu detektieren, wurde nach der Auftrennung ein *Methanizer* (Eigenbau, 20 cm-Edelstahlsäule mit einem Innendurchmesser von 1/8“, befüllt mit einem NiCr-Ni-Katalysator (Chrompack, Middleburg, Niederlande)) zwischengeschaltet. Dieser reduziert oxidierte Gase bei einer Temperatur von 350 °C in einem Strom aus Trägergas (Wasserstoff 5.0 und synthetischer Luft; Löschgas: Stickstoff 5.0, Messer Industriegase GmbH, Siegen, Deutschland) zu CH<sub>4</sub>. Zur Kalibrierung wurde ein definiertes Gasmisch (1000 ppmv CH<sub>4</sub> und 1000ppmv CO<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, Messer Industriegase GmbH, Siegen, Deutschland) verwendet. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 200 µl. Die angegebene CO<sub>2</sub>-Konzentration ist der Mittelwert einer Doppelbestimmung von jeweils drei biologischen Replikaten. Die Auswertung erfolgte mittels *Peak Simple* 2.83 (SRI Instruments, Torrance, USA).

## 2.8 Molekularbiologische Grundtechniken

### 2.8.1 Präparation genomischer DNS aus *Ralstonia eutropha*

Die Isolierung von Gesamt-DNS aus *R. eutropha* erfolgte nach der Methode von Chen & Kuo (Chen und Kuo 1993). Von einer in NB-Medium gewachsenen Übernachtskultur wurden 3 ml in einem Reaktionsgefäß durch Zentrifugation geerntet (8.000 x g, 1 Min., 4 °C). Das Zellpellet wurde in 200 µl Lysispuffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, pH 7.8, mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert und für 5 Min. bei RT inkubiert. Proteine wurden durch Zugabe von 66 µl 5 M NaCl gefällt. Der DNS-haltige Überstand wurde nach einer Zentrifugation (19.000 x g,

10 Min., 4 °C) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Die Mischung wurde ausgeschüttelt, bis sich eine milchig trübe Suspension gebildet hatte. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 19.000 x g (4 °C) wurde die obere, wässrige, DNS-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei musste genau darauf geachtet werden, dass die untere Alkoholphase sauber abgetrennt wurde, da sonst nachfolgende, enzymatische Reaktionen inhibiert wären. Die DNS wurde durch Zugabe von zwei Volumenteilen 96 %-igem Ethanol und mittels Zentrifugation für 20 Min. bei 4 °C und 19.000 x g gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet, bevor es in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. RNS wurde durch eine 30-minütige Behandlung mit RNase I bei 37 °C entfernt.

## 2.8.2 Plasmidisoliation

Plasmid-DNS wurde über *Spin Columns* mit einer Silicamatrix gereinigt (Invitex GmbH, Berlin, Deutschland). Das *Invisorb Spin Plasmid Mini Two* Kit (Invitex GmbH, Berlin, Deutschland) dient zur Reinigung von bis zu 20 µg hochreiner pDNS aus 2 ml *E. coli* oder 5 ml *Ralstonia eutropha*. Die Reinigung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte wahlweise mit angewärmtem (50 °C) Elutionspuffer oder ddH<sub>2</sub>O.

## 2.8.3 Bestimmung der DNS-Konzentration

Die Konzentration von präparierter pDNS bzw. gereinigten PCR-Produkten wurde mittels eines µl-Spektralphotometers mit dem Namen *Nanodrop ND-1000* (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) direkt als Absorption bei 260 nm ermittelt. Als Leerwert wurde Elutionspuffer bzw. ddH<sub>2</sub>O gemessen. Die Reinheit der Probe wurde als Koeffizient der Extinktion bei 260/280 nm ermittelt.

## 2.8.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Amplifikation von doppelsträngiger DNS, gemäß der Methode von Mullis und Faloona, erfolgte in einem *Thermocycler C1000Touch + S1000* (BioRad, München, Deutschland) (Mullis und Faloona 1987). Für die PCR wurde ein 40 mM dNTP-PräMix (10 mM je dNTP) verwendet (dNTP-Mix, Bionline, Luckenwalde, Deutschland).

Für Klonierungen wurde die *Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase* von Finnzymes (Vantaa, Finnland) verwendet. Dieses Enzym erreicht Fehlerraten von  $9,5 \times 10^{-7}$  in GC-Puffer (für GC-reiche DNS-Matrizen). Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 25 bzw. 50 µl. Für einen 50 µl-Reaktionsansatz wurden 31,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 10 µl GC-Puffer 1 µl dNTP-Mix, 1 µl je Primer (100 µM), 3 µl DMSO, 2 µl DNS-Matrize, sowie 0,5 µl *Phusion<sup>®</sup>*-Polymerase – in genannter Reihenfolge – in ein 0,2ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Bei Verwendung dieser Polymerase wurden folgende Schritte im *Thermocycler* durchlaufen: 30“ @ 98 °C (1x Initiale Denaturierung); 10“ @ 98 °C, 30“ @ 54-72 °C (je nach Schmelzpunkt der Primer), 30“ / kB (25-36 x wiederholen); 5' @ 72 °C (finale Extension); ∞ @ 10 °C.

Bei PCR-Reaktionen, die für Testverdaue bzw. Sequenzierungen eingesetzt wurden, wurde *MangoTaq<sup>TM</sup>* Polymerase (Bionline, Luckenwalde, Deutschland) verwendet. Zu diesem Zweck wurden in folgender Reihenfolge 21 µl ddH<sub>2</sub>O, 25 µl *MangoMix<sup>TM</sup>*, 2 µl DNS-Matrizen, 1 µl je Primer (100 µM) in ein 0,2ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde ein PCR-Programm - dasselbe Programm wie bei der *Phusion<sup>®</sup>*-Polymerase - verwendet (jedoch maximal 96 °C zur Denaturierung).

Bei Hochdurchsatzverfahren wurde die sogenannte Kolonie-PCR eingesetzt. Dazu wurde mit einer Pippettenspitze Zellmaterial von einer Kolonie abgenommen und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O (in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß) resuspendiert. Die Suspension wurde zweimalig für 7 Min. gekocht und zwischendurch kurz mit einem Vortex gemischt. Anschließend wurde die Suspension für 5 Min. bei maximaler

Geschwindigkeit (Fresco 21, Thermo Fischer, Schwerte, Deutschland) zentrifugiert. Je 2 µl des Überstandes wurden als Matrize für die nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 gelistet.

### 2.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNS-Fragmente und PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in Agarosegelen getrennt und analysiert. Je nach Größe der zu erwartenden Fragmente reichte die Konzentration hochreiner Agarose (UltraPure Agarose, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) von 0,8 - 3,0 % (w/v) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA; 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, pH 8,0 @ RT). Die Gelelektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern (Eigenbau) bei einer Spannung von 90 V. Als Größenstandard wurde *2-log Ladder* (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels im Verhältnis 1:5 (Puffer : Probe) mit Probenpuffer (33 % (v/v) Glycerol, 0,1 % Bromphenolblau in TAE-Puffer) vermischt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm (UVT-28S, Herolab, Wiesloch, Deutschland) und wurde mittels einer CCD-Kamera (E.A.S.Y. 429K, Herolab, Wiesloch, Deutschland / Easy Win 3.2) dokumentiert.

### 2.8.6 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

In einem präparativen Gel, wie oben (Kapitel 2.8.5) beschrieben, jedoch mit Taschen von bis zu 30µl Volumen, wurden die zu isolierenden Banden von Kontaminanten getrennt. Im Anschluss wurde die gewünschte Bande auf einem UV-Transilluminator, mit einer Emissionswellenlänge von 366 nm, mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten. Das Stück Gel wurde in ein sauberes 2ml-Reaktionsgefäß überführt und mittels des *Invisorb Spin DNA Extraction Kit* (Invitex GmbH, Berlin, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte wahlweise mit angewärmten Elutionspuffer bzw. ddH<sub>2</sub>O.

### 2.8.7 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau erfolgte je nach Anwendung in einem 25µl- (Analyse) bzw. 50µl- (Präparation) Maßstab. Für den Verdau wurden sequenzspezifische Endonukleasen der Firmen NEB (Frankfurt am Main, Deutschland) und Fermentas GmbH (St.Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Je nach eingesetztem Enzym wurden für 1 µg DNS 2-10 *Units* Enzym eingesetzt. Verwendete Puffer, Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen richteten sich nach den jeweiligen Herstellerangaben. Doppel-Restriktionsverdaue wurden, wenn möglich, im gleichen Ansatz oder aufeinander folgend bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Die Inkubationszeit lag bei 4-16 Stunden. Partielle Restriktionsverdaue wurden mit maximal 1 U/10µg DNS und bei 16 °C für 1-5 Min. inkubiert.

### 2.8.8 Klenow-Behandlung von 5'-Überhängen der DNS-Fragmente

Zur Ligation inkompatibler Enden wurden die 5'-Überhänge der DNS-Fragmente aufgefüllt. Dazu wurde das große Fragment der DNS-Polymerase I (Klenow-Fragment) aus *E. coli* eingesetzt (Jacobsen, Klenow *et al.* 1974). Ein 50µl-Reaktionsansatz (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 mM Dithiothreitol pH 7.9 @ RT) enthielt dabei bis zu 10 µg DNS, je 5 µl der vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (je 25 mM in bidest. H<sub>2</sub>O, pH 7.0) und 2-4 *Units* Klenow-Polymerase (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). Inkubiert wurde für 30 min bei Raumtemperatur.

### 2.8.9 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Um ungewollte inter- und intramolekulare Religation der Vektoren zu unterbinden, wurden diesen die 5'-Phosphatgruppen entfernt (Rina, Pozidis *et al.* 2000). Diese Dephosphorylierung erfolgte durch eine

30-minütige Inkubation bei 37 °C mit *Antarctic Phosphatase* (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland), gefolgt von 5 Min. bei 65 °C zur Hitzeinaktivierung des Enzyms.

### 2.8.10 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation von DNS-Fragmenten wurde im 25µl-Maßstab durchgeführt und erfolgte mittels *T4 DNA Ligase* (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). Vektor und *Insert* wurden in einem Verhältnis von 2:1 in Ligase-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, pH 7.5 @ RT) und 1,5 µl Ligase für 4-16 Stunden bei 16 °C in einem Thermo-Inkubator (Thriller Thermo-Inkubator, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) inkubiert. Vor einer weiteren Verwendung der DNS wurde die Ligase durch eine 5-minütige Inkubation bei 65 °C hitzeinaktiviert.

### 2.8.11 Rekombination überlappender DNS-Stränge mittels *In-Fusion*<sup>®</sup>

Für besonders anspruchsvolle und effektive Klonierungen sowie Klonierungen ohne geeignete Restriktionsschnittstellen oder bei punktgenauen Deletionen bzw. ortsspezifischer Mutagenese wurde das *In-Fusion*<sup>®</sup>-PCR Cloning Kit (Takara Bio Europe SAS., Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Dieses Klonierungssystem basiert auf der Rekombination eines PCR-Amplikons mit einem endständigen, homologen Bereichs des Vektors. Dazu werden an jeder Seite lediglich 15 Basen Sequenz-übereinstimmung benötigt, welche durch geeignetes Primerdesign erzeugt werden. Ausgehend von einem modifizierten Klonierungsprotokoll können mehrere PCR-Fragmente gleichzeitig in den gewünschten Vektor ligiert werden (Bürstel 2006). Somit können punktgenaue Deletionen oder Nukleotid-austauschmutanten an jeder beliebigen Stelle eingebracht werden, ohne Subklonierungen.

Für „einfache“ Klonierungen wurde das gereinigte PCR-Fragment (Kapitel 2.8.6) sowie linearisierter Vektor in einem *exakten* molaren Verhältnis von 2:1 (Amplikon:Vektor) in einem 0,2ml-Reaktionsgefäß gemischt. Bei zwei oder mehr *Inserts* sollte das molare Verhältnis 2:2:1 (Amplikon:Amplikon:Vektor) betragen. Die gesamte DNS-Menge sollte dabei 200-400 ng betragen. Für einen 10µl-Ansatz wurden anschließend 2 µl *5x In-Fusion Reaction Buffer* und 1 µl *In-Fusion Enzyme* zugegeben. Falls erforderlich wurde das Restvolumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Beim Einsatz größerer Volumina wurden die Reaktionsansätze verdoppelt. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Reaktionsansatz für 15 Min. bei 37 °C in einem Thermo-Inkubator (Thriller Thermo-Inkubator, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde im Anschluss durch eine 15-minütige Inkubation bei 50 °C gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gelagert und mit 40 µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0 @ RT) verdünnt. Jeweils 5 µl des verdünnten Reaktionsansatzes wurden dann, wie in Kapitel 2.10.3 beschrieben, in chemisch-kompetente Zellen transformiert.

### 2.8.12 Sequenzierungen

Die Richtigkeit der hergestellten Klone und Nukleotidaustauschmutanten wurde mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* überprüft (Sanger, Nicklen *et al.* 1977). Für die Sequenzierung der verwendeten Plasmide wurden Standardprimer verwendet, zur Überprüfung der Nukleotid-austauschmutanten in *hypX* wurde mittels PCR (Primer 22 und 23) ein DNS-Abschnitt amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierungen wurden extern von der Firma Sequenzierservice ABI BigDye-Terminator-Chemie SMB Services in Molecular Biology durchgeführt.

## 2.9 Gentechnische Konstruktionen

Im Rahmen dieser Studie wurde eine Reihe Expressions- und Suizidplasmide zur Überexpression rekombinanter Proteine bzw. Erzeugung mutanter *Ralstonia eutropha*-Stämme konstruiert. Die

durchgeführten gentechnischen Konstruktionen werden nachfolgend erläutert. Verwendete Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Verwendete Primer**

Primer	Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)*
1	pLO11 fwd #1	CTA TGG AAA AAC GCC AGC
2	pLO11 hypA1 SacI	GCT GAG CTC ATG <b>CAT</b> GGG GTC TCC TCC TTA CTC GTT GCT
3	IB14 - hypC-Strep F	GGA GCC GGC ATC TGC <b>TTG GAG CCA CCC GCA GTT CGA AAA</b> ATG AAA TAC ATC GAA GAA TTT C
4	IB15 - Strep-hypD F	GGA GCC GGC ATG AGC GCT <b>TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA</b> TCT GCT ATG AAA TAC ATC GAA GAA TTT C
5	IB16 - hypDStart 2	GGC CCG AAT CAA CGA CAT GC
6	IB36 - (NcoI) hypCD-Strep F	TCA TAC ATG TGC CTA GCG ATT CCC GCA CG
7	IB37 - (BglII) hypCD-Strep R	ATT AAG ATC TTG CTG CCA CCA AGG GGA TAT CCT TG
8	glyA fwd (+XhoI)	AGA CTC GAG TAC ACC CGC AGG GTC CAG ACA AAG TTT GTC ATG G
9	glyA rev (+XhoI)	GGC CTC GAG GCA TCA GCC GTA GAC CGG GAA ACG CTT GGT CAG G
10	IB78 – CoxLM1 (InFusion/XbaI) F	<b>AAC AGT CGA CTC TAG</b> AGC GGA TCT CGG CCA TGC CGG
11	IB79 – CoxLM1 (InFusion/XbaI) R	<b>CTT AAT TAA GTC TAG</b> AGG CCA TTC TAG CAG CGG CCC
12	IB154 – HypX 5' fwd	<b>TAA ACA GTC GAC TCT</b> AGA TCG AGA CGA ACG AAG TTG GGG TG
13	IB155 – HoxA 5' rev	<b>TCC TTA ATT AAG TCT</b> AGA TCG AAA TTG AAT GCC CTC TGC G
14	IB156 - HypX Y439F fwd	<b>GTA CTC GTG AAT CCG CAC</b> <b>ATT</b> AAG AAC ATG GGC AAT CTG TAT GGT TC
15	IB157 - HypX Y439A fwd	<b>GTA CTC GTG AAT CCG CAC</b> <b>GCT</b> AAG AAC ATG GGC AAT CTG TAT GGT TC
16	IB158 - HypX Y439E fwd	<b>GTA CTC GTG AAT CCG CAC</b> <b>GAG</b> AAG AAC ATG GGC AAT CTG TAT GGT TC
17	IB 159 – HypX 5' rev	<b>CGG ATT CAC GAG TAC</b> ACC TTC GCG CG
18	IB 161 – HypX D425A fwd	<b>TTG GCG CTG GCG GCC</b> <b>GCA</b> CAG GTA TGG GCG CGC GAA GGT GTA C
19	IB 162 – HypX D425N fwd	<b>TTG GCG CTG GCG GCC</b> <b>AAC</b> CAG GTA TGG GCG CGC GAA GGT GTA C
20	IB 163 – HypX D425Q fwd	<b>TTG GCG CTG GCG GCC</b> <b>CAG</b> CAG GTA TGG GCG CGC GAA GGT GTA C
21	IB 164 – HypX 5' rev	<b>GGC CGC CAG CGC</b> CAA GAA CAC GCC GCC CGC TC
22	IB 165 – HypX-Mut Seq fwd	TCA TCT GCA CCA AAT CGA GGC G
23	IB 166 - HypX-Mut Seq rev	TGT CAA TAT GCG CAG CAT AGT CTG
24	IB 168 – HypX D425E2 fwd	<b>TTC TTG GCG CTG GCG GCC</b> <b>GAG</b> CAG GTA TGG GCG CGC GAA GGT GTA C
25	IB 170 – HypX Y453F fwd	<b>GGC AAT CTG TAT GGT</b> TCG GAA TAC TGG ACC <b>TTT</b> CTG TTG CCG CAA CGC GTC G
26	IB 171 – HypX Y453H fwd	<b>GGC AAT CTG TAT GGT</b> TCG GAA TAC TGG ACC <b>CAT</b> CTG TTG CCG CAA CGC GTC G

Tabelle 4: Verwendete Primer (Fortsetzung)

Primer	Bezeichnung	Sequenz (5'-3'-Richtung)*
27	IB 172 – HypX W451H fwd	GGC AAT CTG TAT GGT TCG GAA TAC CAC ACC TAT CTG TTG CCG CAA CGC GTC G
28	IB 173 – HypX W451F fwd	GGC AAT CTG TAT GGT TCG GAA TAC TTC ACC TAT CTG TTG CCG CAA CGC GTC G
29	IB 174 – HypX E449Q fwd	GGC AAT CTG TAT GGT TCG CAG TAC TGG ACC TAT CTG TTG CCG CAA CGC GTC G
30	IB 175 – HypX E449D fwd	GGC AAT CTG TAT GGT TCG GAC TAC TGG ACC TAT CTG TTG CCG CAA CGC GTC G
31	IB 176– HypX S448A fwd	GGC AAT CTG TAT GGT GCC GAA TAC TGG ACC TAT CTG TTG CCG CAA CGC GTC G
32	IB 177– HypX S448G fwd	GGC AAT CTG TAT GGT GGC GAA TAC TGG ACC TAT CTG TTG CCG CAA CGC GTC G
33	IB 178– HypX 5'-rev	ACC ATA CAG ATT GCC CAT GTT C

\* Von der Originalsequenz abweichende Nukleotide sind rot hervorgehoben. Die *Strep*-TagII®-Sequenz ist blau markiert. Die jeweilige Extension zur Rekombination ist grün markiert.

### 2.9.1 Überexpressionsplasmide für HypCD-Komplexe aus *R. eutropha*

Basierend auf einem bestehenden Weitbrechtsvektor, pLO11, wurde zunächst eine Variante mit einer modifizierten MCS (engl.: *multiple cloning site*) konstruiert. In dieser Variante wurde das Codon an Position 2 (nach dem Start-Codon) in ein Histidin umgewandelt (GGA → CAT). Dazu wurde unter Verwendung der Primer 1 und 2 (Tabelle 4) ein 674 Bp großes Fragment mittels PCR amplifiziert und *AflIII/SacI*-verdaut. Dieses Fragment wurde in einen *AflIII/SacI*-linearisierten pLO11-Vektor ligiert. In dieser modifizierten Variante des pLO11-Vektors, pIB01 genannt, sollten *hypCD* unter der Kontrolle des starken, induzierbaren *acoX*-Promotors überexprimiert werden.

Ausgehend von pIB01 wurden pIB11 und pIB12 in gleicher Weise konstruiert. Die komplette *hypI*-Region aus dem MBH-Operon wurde in pIB01 kloniert. Dazu wurde pCH783 *SacI/HindIII* verdaut und ein 7,8 kB großes Fragment, welches '*hypA-hoxA*' enthielt, in einen *SacI/HindIII*-linearisierten pIB01-Vektor ligiert. Das entstandene Konstrukt, pIB02, enthielt ein vollständiges Set an *hyp*-Genen unter Kontrolle des *acoX*-Promotors. Parallel wurde ein 750 Bp großes *AscI*-Fragment aus pCH301 in den Vektor pNEB193 subkloniert. Dadurch entstand Plasmid pIB08. Die Integration einer *Strep*-TagII®-Sequenz wurde mittels PCR realisiert. Zur Integration eines *Strep*-TagII® am C-Terminus von *hypC* wurde, unter Verwendung der Primer 3 und 5 (Tabelle 4), ein 324 Bp großes Fragment von pIB08 amplifiziert. In gleicher Weise wurde mit Hilfe der Primer 4 und 5 (Tabelle 4) ein Fragment gleicher Größe amplifiziert, das einen *Strep*-TagII® am N-Terminus von *hypD* erzeugen sollte. Beide Amplikons wurden *NaeI* verdaut und in einen *NaeI*-linearisierten pIB08-Vektor kloniert. Die dabei entstandenen Klone pIB09 und pIB10 wurden *AscI* verdaut und jeweils ein 750 Bp großes Fragment wurde isoliert. Beide 750 Bp-Fragmente wurden mit dem *AscI*-linearisierten pIB02-Vektor ligiert. Daraus entstanden letztendlich zwei Plasmide, pIB11, mit einem C-terminalen *Strep*-TagII® in *hypC* und pIB12, mit einem N-terminalen *Strep*-TagII® in *hypD*.

Plasmid pIB15 wurde konstruiert, indem zunächst ein 1,4 kB-Fragment (*hypC-hypD*) von genomischer DNS aus *R. eutropha* H16 amplifiziert wurde. Dies geschah unter Verwendung der Primer 6 und 7 (Tabelle 4). Das gereinigte Fragment wurde *PciI/Bg/II*-verdaut und in *NcoI/Bg/III*-linearisierten pLO11-Vektor kloniert.

Die verwendeten *E.coli*-Plasmide zur Überexpression von *E.c.HypC<sub>StrepD</sub>*, *E.c.HyC<sub>StrepDE</sub>* und *E.c.HypC<sub>StrepDEF</sub>* wurden wie von Blokesch *et al.* beschrieben konstruiert (Blokesch, Albracht *et al.* 2004) und uns dankenswerter Weise von der Gruppe von A. Böck aus München überlassen.

### 2.9.2 Suizidplasmid zur Deletion von *glyA*

Unter Verwendung der Primer 8 und 9 wurde ein 1,72 kB-Fragment, welches das *glyA*-Gen enthielt, mittels PCR von genomischer DNS aus *Ralstonia eutropha* H16 amplifiziert. Das Amplikon wurde mit *XhoI* geschnitten. Das resultierende 1714 Bp-Fragment wurde mit einem *SalI*-linearisierten pLO1-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid, pCH2765, wurde erneut *SalI* geschnitten. Nach Religation entstand ein Plasmid mit einer mit einer 384 Bp großen *in frame*-Deletion in HypX (pCH2771).

### 2.9.3 Suizidplasmide zur Herstellung von Nukleotidaustauschen in *hypX*

Die konditional-letalen Suizidplasmide zur Substitution verschiedener AS in der C-terminalen Region von HypX wurden mittels eines neuartigen Klonierungssystems zur restriktionsfreien Klonierung hergestellt. Durch dieses System können punktgenau Nukleotidaustauschmutanten sowie Deletionen in ein Gen eingebracht werden, ohne dass es dazu passender Restriktionsstellen bedarf (Bürstel 2006). Dieses System basiert auf einer rekombinanten Cre-Rekombinase, die in Lage ist die Enden zweier DNS-Stränge mittels Rekombination zu verschmelzen. Einzige Voraussetzung ist dabei eine mindestens 15 Bp lange Homologie beider Sequenzen zueinander (*Fusion<sup>®</sup>-PCR Cloning Kit*, Takara Bio Europe SAS., Saint-Germain-en-Laye, Frankreich).

**Tabelle 5: Suizidplasmide und Primer-Paarungen für die AS-Austauschmutanten in HypX.**

Mutation (Suizidplasmid)	5'-Amplikon		3'-Amplikon	
	Primer-Paarung*	Größe (~ kB)	Primer-Paarung*	Größe (~ kB)
Y439F (pIF39)	IB154/IB159	1,04	IB155/IB156	0,96
Y439A (pIF40)	IB154/IB159	1,04	IB155/IB157	0,96
Y439E (pIF41)	IB154/IB159	1,04	IB155/IB158	0,96
D425A (pIF42)	IB154/IB164	1,0	IB155/IB161	1,0
D425N (pIF43)	IB154/IB164	1,0	IB155/IB162	1,0
D425E (pIF47)	IB154/IB164	1,0	IB155/IB168	1,0
Y453F (pIF49)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB170	0,95
Y453H (pIF50)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB171	0,95
W451H (pIF51)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB172	0,95
W451F (pIF52)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB173	0,95
E449Q (pIF53)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB174	0,95
E449D (pIF54)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB175	0,95
S448A (pIF55)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB176	0,95
S448G (pIF56)	IB154/IB178	1,07	IB155/IB177	0,95

\*Die Sequenz der benannten Primer ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Zu diesem Zwecke wurden jeweils links und rechts von der zu mutierenden AS etwa 1000 Bp von genomischer H16-DNS amplifiziert. Die Zusammenstellung der einzelnen Primer-Paarungen für die jeweiligen Amplikons, welche die Mutation in 5'- bzw. 3'-Richtung flankieren, sowie die Größe des jeweiligen Amplikons sind Tabelle 5 zu entnehmen. Die PCR-Ansätze wurden zunächst mit *DpnI* verdaut und anschließend über ein präparatives Agarosegel (Kapitel 2.8.6) gereinigt. Die gereinigten Amplikons

wurden paarweise mit *XbaI*-linearisierten pLO2-Vektor rekombiniert. So entstand eine Reihe Suizidplasmide (siehe Tabelle 2) die in verschiedene Hintergründe HF965 (H16  $\Delta glyA$ ) und HF967 ( $\Delta hoxBCGH \Delta glyA$ ) eingebracht wurden, um die Effekte der jeweiligen Aminosäureaustausche auf die Funktion von HypX zu untersuchen (Kapitel 3.4.16 und 3.4.17).

### 2.9.4 MBP::*HypX*-Überexpressionsplasmid

Das Expressionsplasmid pCH631, zur Überexpression des MBP::*HypX*-Fusionsproteins, wurde wie folgt konstruiert. Zunächst wurde das Plasmid pCH328 mit *PleI* verdaut. Überhängende Enden des isolierten 0,2 kB-Fragments wurden mittels Klenow-Fragment aufgefüllt. Im Anschluss wurde das Fragment in einen *XmnI*-linearisierten pMal-c2-Vektor ligiert. Daraus resultierte ein Plasmid, in dem der 5'-Terminus von *hypX* mit *malE* fusioniert war (*malE::hypX'*). Um *hypX* zu vervollständigen, wurde ein 1,8 kB-(*DraIII-EcoRI*)-Fragment aus pCH328 in das aus dem ersten Schritt resultierende Plasmid inseriert, welches zuvor mit *EcoRI* und partiell mit *DraIII* geschnitten worden war.

### 2.9.5 Suizidplasmid zur Deletion von *coxL1*

Unter Verwendung der Primer 10 und 11 wurde ein 3,4 kB-Fragment mittels PCR von genomischer DNS aus *Ralstonia eutropha* H16 amplifiziert. Dieses Fragment enthielt einen Genomabschnitt ('*coxM1-coxL1-coxS1'*) aus dem *coxL1*-Operon. Im nächsten Schritt wurde dieses Fragment mit einem *XbaI*-linearisierten Vektor (pLO2) zu einem neuen Plasmid, pIB18, ligiert. Dieser Vektor wurde mit *SexA1* verdaut und religiert. Das resultierende Plasmid, pIB19, enthielt eine 1239 Bp große *in frame*-Deletion im *coxL1*-Gen.

## 2.10 Genetische Grundtechniken

### 2.10.1 Lysogenisierung von Zellen

Für die Expression von Genen in einem T7 Expressionsvektor wurde ein rekombinanter  $\lambda$ DE3 Prophage in das Genom der Wirtsstämme (MI54 und MI59, siehe Tabelle 1) eingebracht. Dieser kodiert die T7-RNA Polymerase, die für Expression der plasmidstämmigen Gene benötigt wird (Tabor und Richardson 1985). Dazu wurde ein  $\lambda$ DE3 *Lysogenization Kit* (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) verwendet. Das Prinzip basiert dabei auf einer Dreifach-Infektion mit  $\lambda$ DE3, einem Helferphagen (B10) und dem Selektionsphagen (B482).  $\lambda$ DE3 trägt eine Störung in der *int*-Genkassette und ist nicht in der Lage sich selbst zu integrieren, bzw. sich aus dem Wirtsgenom herauszulösen. B10 führt dabei die Integration der Prophagen herbei, ohne dabei selbst integrieren zu können. Der Selektionsphage tötet alle potentiellen Wirte die keinen  $\lambda$ -Prophagen tragen, kann befallene Zellen allerdings nicht befallen, da er derselben Immunitätsgruppe wie  $\lambda$ DE3 angehört. So entstanden zwei Varianten der vorgenannten Stämme, YU051 und YU053, welche die T7-RNA Polymerase unter *lacUV5*-Kontrolle exprimieren.

### 2.10.2 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 10ml-Kultur des entsprechenden Stammes in LSLB-Medium angesetzt. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Eine auf 37 °C vorgewärmte Hauptkultur (150 ml LSLB-Medium) wurde mit 1 % (v/v) Vorkultur inokuliert und bei 120 upm und 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,8 (~3 Stunden) wurden die Zellen für 5 Min. auf Eis gestellt und in einem sterilen Gefäß geerntet (4.000 x g, 5 Min. 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 45 ml kaltem (4 °C) TFB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl, 15 % (v/v) Glycerol, pH 5,8, sterilfiltriert) resuspendiert und für weitere 90 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation

(4.000 x g, 5 Min. 4 °C) wurde der Überstand wiederum verworfen und die Zellen in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerol, pH6,8 eingestellt mit KOH, sterilfiltriert) resuspendiert. Aliquots von 50-100 µl wurden in vorgekühlte Reaktionsröhrchen pipettiert, die *umgehend* in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

### 2.10.3 Transformation

Zur Transformation von Plasmiden und Klonierungsansätzen wurden die chemisch-kompetenten Zellen für etwa 10 Min. auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1 µg bis 100 ng der pDNS (entspricht 1-5 µl) wurden die Zellen sanft gemischt. Nach einer Inkubation im Eisbad für 30 Min. wurden die Zellen einem Hitzeschock unterzogen. Dazu wurden die Zellen für *exakt* 30 Sekunden bei *exakt* 42 °C inkubiert und für weitere 5 Min. auf Eis gelagert. Anschließend wurden 950 µl steriles SOC-Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden unter ständigem Schütteln (200 upm) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden diese Zellen 2 Min. bei RT und 4.000 x g abzentrifugiert und 800µl des Überstandes wurden abgenommen. Im verbleibenden Volumen wurden die Zellen resuspendiert und auf jeweils zwei LSLB-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum ausgelegt, wo sie ÜN bei 37 °C auswachsen konnten.

### 2.10.4 Transkonjugation

Ein Plasmidtransfer zwischen *E. coli* S17-1 (Donor) und *Ralstonia eutropha* (Rezipient) wird dadurch ermöglicht, dass der Donor die *tra*-Gene von pRP4 besitzt und demzufolge mobilisierbare Plasmide mittels *Spot mating* transferieren kann (Friedrich, Hogrefe *et al.* 1981; Simon, Priefer *et al.* 1983). Zur Durchführung der Transkonjugation wurde von beiden zu kreuzenden Stämmen eine 10ml-Kultur in LSLB (*E. coli*), bzw. NB (*R. eutropha*) angeimpft. Nach 24-stündiger Inkubation bei 30 °C und 100 upm wurde die Zelle in sterilen Zentrifugenröhrchen geerntet (4.000 x g, 5 Min. 4 °C) und mit 5 ml sterilem H16-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4.000 x g, 5 Min. 4 °C) wurde das Zellpellet in 1 ml H16-Puffer resuspendiert. Je 200µl beider Zellsuspensionen wurden auf LSB-Agarplatten ausgelegt und ÜN bei 37 °C inkubiert. Das Zellmaterial wurde mit einem sterilen Spachtel abgehoben und in 1 ml H16-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe (10<sup>-1</sup>-10<sup>-4</sup>) angelegt und jeweils 200µl auf eine FN-Agarplatte mit einem geeigneten Antibiotikum ausplattiert. Nach 48 Stunden bei 37 °C konnten Transkonjuganten beobachtet werden.

### 2.10.5 Allelaustausch mittels doppelt-homologer Rekombination

Um bestimmte Genorte zu mutagenisieren bzw. zu deletieren, wurden zwei aufeinanderfolgende homologe Rekombinationen durchgeführt. Auf Basis der Vektoren pLO1 und pLO2 (Lenz, Schwartz *et al.* 1994) wurden verschiedene Suizidplasmide (Tabelle 2) konstruiert (siehe Kapitel 2.9). Diese Suizidplasmide enthielten neben dem mutagenisierten Allel/Deletion auch etwa 1 kB flankierender Gensequenz zu jeder Seite der Modifikation. Die Vektoren pLO1/2 sind in S17-1 mobilisierbar (*mob*<sup>+</sup>) und besitzen einen ColE1-*ori*, welcher u. a. von *Ralstonia eutropha* nicht erkannt wird. Ein übertragenes Plasmid kann sich somit nur etablieren, wenn es über eine homologe Gensequenz stabil in das Genom integriert wird. Neben dem Resistenzmarker *neo* (Kanamycinresistenz), welches zur positiven Selektion von Heterogenoten führt, ist auch das konditional-letale *sacB*-Gen auf diesen Vektoren vorhanden. Dieses Gen kodiert für das Exoenzym Laevan-Saccharase aus *Bacillus subtilis*, welches in Gegenwart von Saccharose im Medium zur Akkumulation von Laevan-Polymeren im Periplasma gramnegativer Bakterien und letztlich zum Zelltod führt (Gay, Le Coq *et al.* 1985).

Für den Allelaustausch wurden die Suizidplasmide zunächst in *E. coli* transformiert (Kapitel 2.10.3) und anschließend, wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben, in den *Ralstonia eutropha*-Rezipienten übertragen. Nach einem Reinigungsausstrich auf Kanamycin-haltigen FN-Platten wurden je zwei heterogenote Isolate ÜN

bei 30 °C in 10 ml LSLB-Medium ohne Antibiotikum inkubiert. Nach Zentrifugation (4.000 x g, 5 Min. 4 °C) und Resuspension in sterilem H16-Puffer wurde eine Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$ - $10^{-3}$ ) angelegt und jeweils 200 µl auf Selektivplatten (LSLB<sub>Sacc</sub> mit 15 % (w/v) Saccharose) ausgelegt. Vermeintlich homogenote Mutanten wurden im Anschluss (parallel) auf FN- und FN<sub>Kan</sub>-Platten ausgelegt. Homogenoten wachsen *nicht* in Gegenwart von Kanamycin. Bei Deletion von *glyA* wurden FN<sub>+5mM Glycin</sub>- und FN<sub>Kan</sub>-Platten verwendet. Alle Deletionen/Nukleotidaustausche wurden zudem mittels Kolonie-PCR (Kapitel 2.8.4) und unter Umständen durch Sequenzierung (Kapitel 2.8.12) bestätigt.

## **2.11 Methoden zur Charakterisierung der Dialysekapsel**

Die hier neu entwickelten Dialysekapseln mussten zunächst zeigen, dass sie absolut dicht waren und ähnliche Dialysecharakteristika wie die kommerziell erhältlichen Zellen vorweisen konnten. Diese Parameter wurden für die neuartigen Dialysekapseln in einfachen Experimenten und im direkten Vergleich zu den Referenzkapseln (QuixSep<sup>®</sup>; Membrane Filtration Products Inc., Seguin, USA) ermittelt.

### **2.11.1 Dichtheitsprüfung**

Zur Prüfung der Dichtheit wurden die Dialysezellen mit Wasser gefüllt (ein kleiner Lufteinschluss war erwünscht) und mit einer PTFE-Membran (0,125 µm Stärke; Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) verschlossen. Zu Beginn des Experiments wurde die gefüllte Kapsel gewogen und die Wassermenge ermittelt. Anschließend wurden die Zellen in einem Exsikkator für Zeiträume von 5 Minuten bis zu 6 Stunden einem Vakuum ausgesetzt. Nach Ablauf des Experiments wurde von allen Zellen erneut das Gewicht und somit die verbleibende Restfüllung ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus insgesamt 60 Einzelmessungen mit unterschiedlichen Kapseln und unterschiedlichen Inkubationszeiten.

### **2.11.2 Bestimmung der Dialyserate**

Um die verbesserte Dialysekapsel zu charakterisieren, wurden die Dialyseraten beider Kapseltypen direkt und unter einheitlichen Bedingungen verglichen. Ausgehend von einem Protokoll, dass bereits zur Charakterisierung der QuixSep<sup>®</sup>-Kapseln gedient hatte (Membrane Filtration Products Inc., Seguin, USA), wurde die Diffusion von NaCl über eine Membran (ZelluTrans F3-Flachmembran, d=22,9µm, 12.000-14.000 MWCO; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) untersucht. Als Maß für die erfolgte Diffusion wurde die Leitfähigkeit (mS) des Lösemittels festgehalten (PT-20C Tragbares Leitfähigkeitsmeter, Sartorius mechatronics, Göttingen, Deutschland). Da Salinität und Leitfähigkeit einer Lösung linear proportional zusammenhängen, kann das umgesetzte Salz unmittelbar aus der Leitfähigkeit der Lösung abgeleitet werden.

Im Versuch wurden die Kapseln mit einer Hochsalzlösung (3M NaCl, 25mM Tris/HCl, pH 7.4 @ RT) befüllt und unter ständigem Rühren gegen einen 273-fachen Überschuss an Lösungsmittel (ddH<sub>2</sub>O) dialysiert. Die steigende Leitfähigkeit (Salinität) wurde als Funktion der Zeit abgebildet. Der Puffer wurde während eines Experiments nicht gewechselt. Die Dialyse wurde bei einer konstanten Temperatur von 22 °C durchgeführt.

## **2.12 Chemikalien und Enzyme**

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und DIFCO (Detroit, USA) bezogen. Glaswaren und Laborgeräte wurden über A. Hartenstein (Würzburg, Deutschland), Glasgerätebau Ochs (Bovenden, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Ultrafiltrationseinheiten lieferte die Firma Millipore (Eschborn,

Deutschland). Die eingesetzten Primer wurden von Operon (Köln, Deutschland) und Metabion (München, Deutschland) synthetisiert. Des Weiteren wurden alle eingesetzten SI von Eurisotop (Saarbrücken, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Gase stammten von Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland). Restriktionsendonukleasen und andere DNS-modifizierende Enzyme lieferten die Firmen New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und Roche (Mannheim, Deutschland). Wasser wurde unter Verwendung eines MembraPure Aquintus (Bodenheim, Deutschland) gereinigt und deionisiert (Spezifischer Widerstand 18,2 M $\Omega$ •cm).

### **2.13 EDV und web-basierte Dienste**

Diese Arbeit sowie die darin enthaltenen Abbildungen wurde mit MS Office XP, Adobe Creative Suite 3, Inkscape und Endnote X4 erstellt. Nicht lineare Regressionen, Datenanalyse und -visualisierung wurden mit GraphPad Prism 5 ([www.graphpad.com/prism](http://www.graphpad.com/prism)) und Origin 8.5 ([www.originlab.de](http://www.originlab.de)) durchgeführt. FTIR-Spektren wurden mit der OPUS 6.5 Software-Suite erstellt und ausgewertet.

Bioinformatische Arbeiten wurden unter Verwendung von GeneSOAP (Dr. R. Cramm, unveröffentlicht) oder Vector NTI 9.0 (Invitrogen) durchgeführt. Für Sequenzvergleiche und -analysen wurden folgende Programme verwendet; BLAST (Altschul, Gish *et al.* 1990), COBALT (Papadopoulos und Agarwala 2007) und ClustalW2 (Thompson, Higgins *et al.* 1994).

Charakteristische Aminosäuresequenz-Signaturen wurden mit Expasy PROSITE (Sigrist, Cerutti *et al.* 2002; Sigrist, Cerutti *et al.* 2010) und durch einen Abgleich mit der Conserved Domain Database (CDD) (Marchler-Bauer, Anderson *et al.* 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.* 2011) identifiziert.

Zur Ableitung sekundärer Strukturmerkmale und homologer Strukturen wurden HHPred und HHSearch verwendet (Soding 2005; Soding, Biegert *et al.* 2005). Die Strukturmodelle wurden mittels der web-basierten SwissModel-Suite (Automated Mode, Wildcard-Search) erstellt (Arnold, Bordoli *et al.* 2006; Kiefer, Arnold *et al.* 2009). Das Protein-Protein-Docking wurde mittels ClusPro 2.0 (Advanced Options > Structure Modification > Ligand: Ja; Receptor: Ja ) (Comeau, Gatchell *et al.* 2004; Kozakov, Clodfelter *et al.* 2005; Kozakov, Brenke *et al.* 2006) bzw. RosettaDock (ClusPro Output-File, No Settings; Auswertung gemäß Dokumentation) (Gray, Moughon *et al.* 2003; Wang, Schueler-Furman *et al.* 2005) durchgeführt. Kristallstrukturen wurden der Protein Database (PDB, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) entnommen, Proteinstrukturen und Protein-Protein-Dockings wurden mit dem Stand-alone-Programm Chimera v1.5.3 visualisiert (Pettersen, Goddard *et al.* 2004).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung einer neuartigen Kapsel zum Zwecke der Dialyse und Applikation

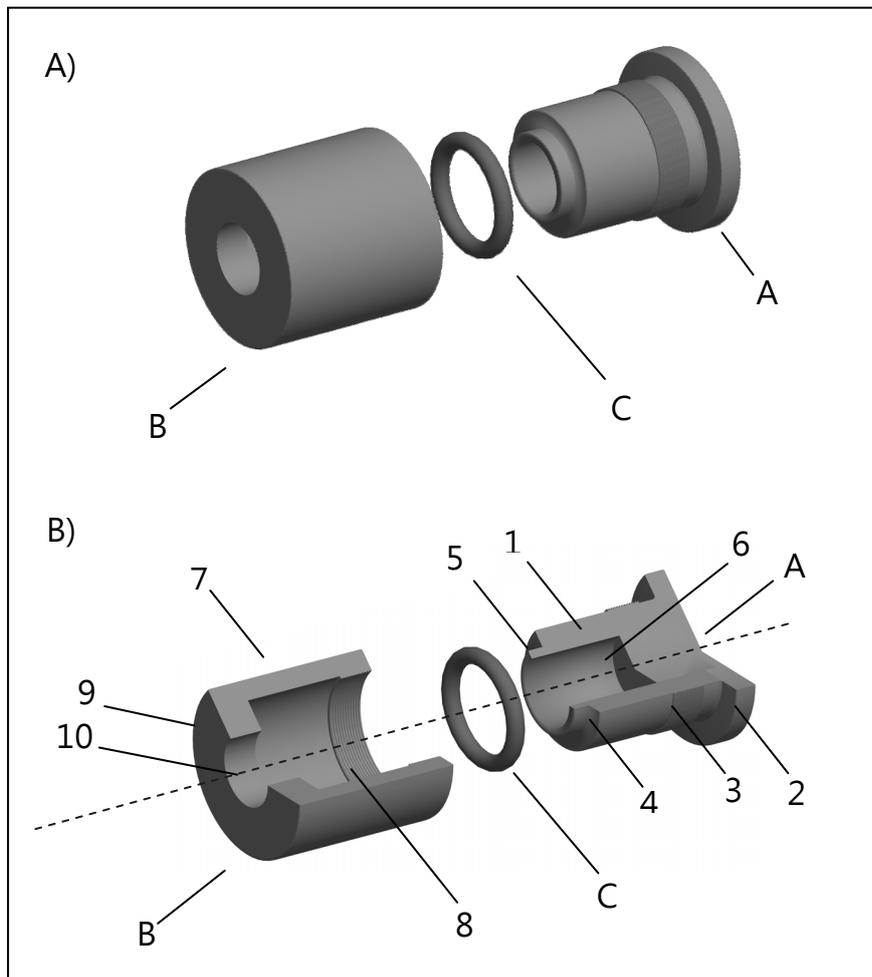
Im Rahmen der Charakterisierung des direkten Vorläufers des Carbonylliganden sind prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar durch die der CO-Ligand zum „katalytischen“ Eisen gelangen kann. Auf der einen Seite ist es möglich, dass der CO-Ligand, analog dem Mechanismus der Synthese der CN<sup>-</sup>-Liganden, als gebundene Carbonylgruppe angeliefert wird und vor Ort übertragen wird. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur des Öfteren eine funktionelle Beteiligung von HypE antizipiert (Watanabe, Matsumi *et al.* 2007). Die andere Möglichkeit wäre, dass gasförmiges Kohlenmonoxid durch eine unbestimmte metabolische Aktivität freigesetzt wird und dieses unmittelbar an das komplexgebundene Eisen bindet. Eine solche Möglichkeit legen Experimente mit markiertem, gasförmigem <sup>13</sup>CO in *Escherichia coli* nahe. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Markierung aufgrund des hohen CO-Partialdrucks artifiziell ist (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007). Daneben besteht zudem die Möglichkeit, dass beide Mechanismen parallel nebeneinander existieren.

Da die Natur des nativen CO-Vorläufers nicht bekannt ist, musste eine Möglichkeit gefunden werden beide Synthesewege anhand der physikalischen Eigenschaften der jeweiligen Vorstufe zu unterscheiden. Eine Möglichkeit dieser Frage nachzugehen ist das in der Zelle produzierte, gasförmige CO zu eliminieren und einen etwaigen Einfluss auf die Hydrogenaseaktivität zu untersuchen. Da ein derartiges System zur spezifischen Eliminierung bisher nicht bekannt ist, musste ein neuartiges System entwickelt werden (detaillierte Informationen in Kapitel 3.3.4). Zentrales Element dieses Systems ist eine Dialysekapsel, die - ausgestattet mit einer speziellen Membran - im Kulturmedium versenkt wird. Das einzige, scheinbar brauchbare System mit Namen QuixSep<sup>®</sup> (Membrane Filtration Products Inc., Seguin, USA) erwies sich jedoch als unzureichend geeignet, um den harten Bedingungen einer lang anhaltenden Kultivierung standzuhalten. Leckagen führten wiederholt zur Vergiftung der Kulturen. Demzufolge musste eine vollkommen neuartige Dialyse- und Applikationskapsel, mit einem bisher nicht gekannten Maß an Dichtheit und Zuverlässigkeit, konzipiert und bis zur Patentreife weiterentwickelt werden (DE 20 2012 000 398.4 gem. GebrMG).

#### 3.1.1 Beschreibung der Dialyse- und Applikationskapsel

Ein Ausführungsbeispiel dieser Kapsel wird anhand Abbildung 3-1 erläutert. Es zeigen Abbildung 3-1 A eine Explosionszeichnung und Abbildung 3-1 B eine Schnittzeichnung der

Kapsel im demontierten Zustand. Die Dialyse- und Applikationskapsel besteht aus drei Teilen; dem Korpus (A), dem Deckel (B) und einem Dichtring (C).



**Abbildung 3-1: Technische Zeichnungen der neu entwickelten Dialyse- und Applikationskapsel.** A) Explosionszeichnung der Dialyse- und Applikationskapsel, bestehend aus drei Teilen. Der Korpus (A) wird mit dem Deckel (B) über ein Schraubgewinde verbunden, wobei der Dichtring (C) zwischen beiden Elementen arretiert wird. B) Schnittzeichnung der Dialyse- und Applikationskapsel. Erläuterungen im Text.

Der Korpus (A) besteht aus einem Zylinder (1), an dessen Fuß sich eine verbreiterte Basis (2) befindet. An diesem Zylinder (1) befindet sich, etwas abgesetzt, oberhalb der Basis (2) ein Außengewinde (3). Dieses Außengewinde (3) dient der Aufnahme und Arretierung des Deckels (B). Am oberen Ende des Zylinders (1) sitzt die Krone (4). Nach innen wird die Krone (4) durch einen konzentrisch umlaufenden Steg (5) begrenzt. Der Dichtring (C) wird zwischen Krone (4) und Steg (5) fixiert. Mittig in diesem Zylinder (1) befindet sich entlang der Längsachse eine konzentrische Bohrung (6), die von der Krone (4) zur Basis (2) verläuft. Diese Bohrung (6) stellt den Probenraum dar. Die Bohrtiefe kann variieren und ermöglicht somit unterschiedliche Probenvolumina.

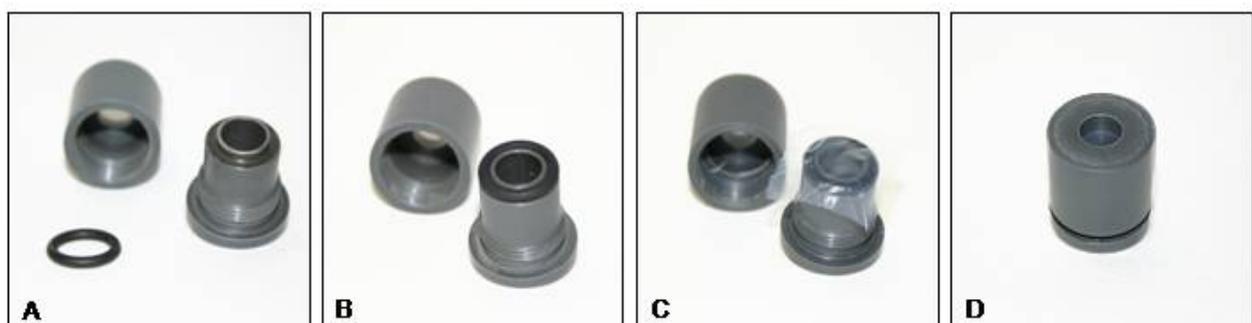
Der Deckel (B) ist ein gerader Hohlzylinder. Dessen Mantel (7) besitzt einen Innendurchmesser, der es ermöglicht, ihn über den Zylinder (1) des Korpus (A) zu stülpen. Dabei bleibt zwischen dem Zylinder (1) und der Innenseite des Mantels (7) ein geringer Zwischenraum frei, der im montierten Zustand die überstehende Membran aufnimmt. Am

unteren Ende des Deckels (B) befindet sich auf der Innenseite des Mantels (7) ein Innengewinde (8). Mittels dieses Innengewindes (8) kann der Deckel (B) am Außengewinde (3) des Korpus (A) festgeschraubt werden. Am oberen Ende des Deckels (B) befindet sich ein Lid (9), in dessen Mitte sich eine Öffnung (10) befindet. Diese Öffnung (10) sitzt dabei genau über dem Probenraum (6). Zwischen dem Probenraum (6) und dem Lid (9) spannt sich die semipermeable Membran und ermöglicht die Dialyse. Deckel und Korpus besitzen eine Materialstärke von mindestens 2,5 mm und bieten dadurch genug Widerstandskraft, um verformungsfrei im Vakuum zu funktionieren.

Der Dichtring (C) wird dabei an der Krone (4) über den Steg (5) gezogen und dort fixiert. Dabei überragt der Dichtring den Steg geringfügig, so dass die aufgelegte Membran nur auf dem Dichtring aufliegt. Während der Deckel (B) auf den Korpus (A) geschraubt wird, drückt das Lid (9) auf den Dichtring (C). Dieser wird dadurch gequetscht, dabei spannt sich die Membran dicht über den Probenraum und bildet eine faltenfreie, absolut dichte Barriere zwischen Probenraum (6) und Medium.

### 3.1.2 Verwendung

Die Dialysekapsel ist mit wenigen Handgriffen bereit zur Anwendung. Im ersten Schritt kann die Kapsel, sofern erforderlich, sterilisiert werden (Abbildung 3-2 A). Nachdem der Dichtring in seine Arretierung an der Krone eingesetzt wurde (Abbildung 3-2 B), kann der Probenraum mit dem entsprechenden Dialysier- bzw. Applikationsgut befüllt werden. Sollte das Volumen des Probenraums zu groß für die Menge der Probe sein, hat es sich in der Praxis bewährt das Volumen der Kapseln durch Zugabe von niedrigschmelzendem Paraffin zu reduzieren. Da Paraffin unter den gegebenen Bedingungen weitestgehend inert ist, sind Wechselwirkungen mit dem Applikationsgut nicht zu befürchten. Das Paraffin kann anschließend wieder rückstandsfrei entfernt werden, indem man die Kapseln in ein ca. 60 °C heißes Wasserbad legt.



**Abbildung 3-2: Anwendung der Dialysekapseln.** A) Kapsel im demontierten Zustand. B) Dichtring liegt auf der Krone des Korpus. C) Nachdem der Probenraum befüllt wurde, wird die Membran (ca. 20mm x 20mm) aufgelegt. D) Kapsel mit aufgeschraubtem Deckel. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Membran wird mittig auf den Dichtring aufgelegt (Abbildung 3-2 C). Der Deckel wird handfest auf den Korpus geschraubt. Dabei spannt sich die Membran mit den letzten Drehungen selbst (Abbildung 3-2 D). Die Kapsel wird nun in den Puffer/das Medium gelegt und mittels Schüttelinkubator in Bewegung gehalten. Nach Beendigung des Experiments kann die Membran mit einer Spritze durchstoßen werden und die Probe abgezogen werden.

### 3.1.3 Dialyse-Charakteristika der neu entwickelten Kapsel im Vergleich zum Stand der Technik

Um die verbesserte Dialysekapsel zu charakterisieren, sollte die maximale Dialyserate im direkten Vergleich zum Konkurrenzprodukt ermittelt werden. Diese sollte sich im Bereich dessen bewegen was durch die QuixSep<sup>®</sup>-Kapseln erreicht wird, welche den Stand der Technik darstellen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die experimentellen Parameter beider Versuchsreihen vergleichbar waren. Eine 3M NaCl-Lösung (25mM Tris/HCl, pH 7.4 @ RT) wurde gegen einen 273-fachen Überschuss an Puffer (ddH<sub>2</sub>O) dialysiert. Der Puffer wurde während eines Experiments nicht gewechselt. Als Dialysemembran wurde die ZelluTrans F3-Flachmembran verwendet. Die Dialyse wurde bei einer konstanten Temperatur von 22 °C durchgeführt.

Als Maß für die umgesetzte Stoffmenge und der sich daraus ergebenden maximalen Dialyserate wurde die Veränderung des Leitwertes des Puffers in Abhängigkeit zur Salzkonzentration ermittelt.

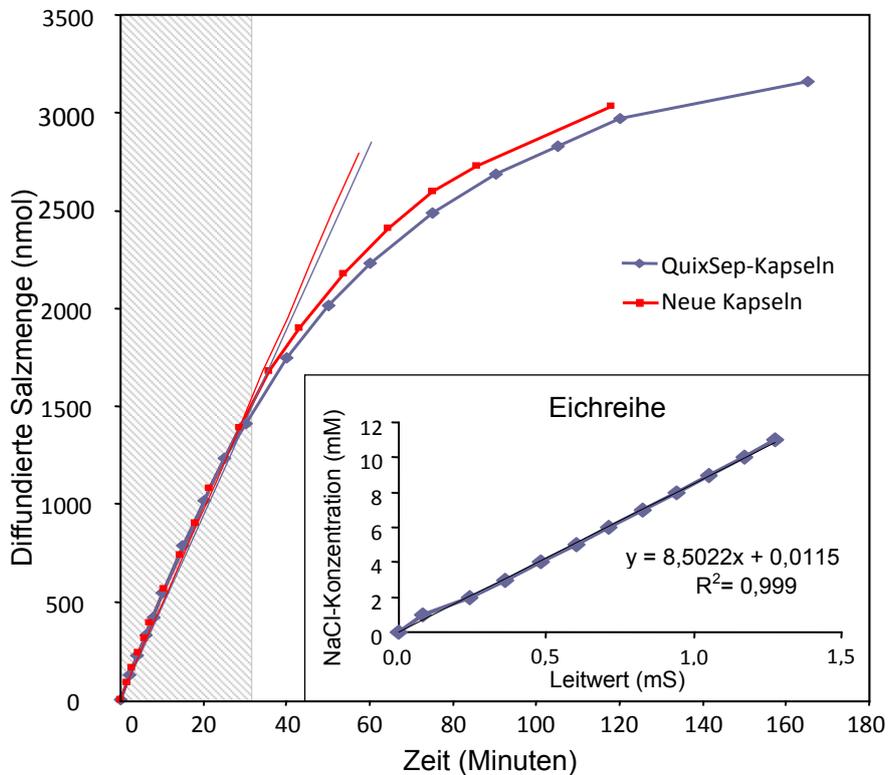
Aus technischen Gründen konnte die Durchtrittsfläche der Dialyseöffnung nicht angepasst werden. Da dieser Parameter kritisch für die Vergleichbarkeit der beiden Systeme ist, musste ein entsprechender Korrekturfaktor ermittelt und angewendet werden. Entsprechend dem Gesetz für die Diffusion über eine Membran gilt;

$$(2) \quad \frac{\partial n}{\partial t} = -D \cdot A \cdot \frac{(c_i - c_a)}{z} \quad (\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$$

mit  $n_{QS}=n_{EV}$  (Stoffmenge),  $t_{QS}=t_{EV}$  (Zeit),  $c_{iQS}=c_{iEV}$ ,  $c_{aQS}=c_{aEV}$  (Stoffkonzentration innen und außen) und  $z_{QS}=z_{EV}$  (Membranstärke) und  $D$  (Diffusionskonstante). Die gezeigten Indizes verweisen dabei jeweils auf die Referenzkapsel QuixSep<sup>®</sup> (QS) bzw. hier vorgestellte Testkapsel (EV). Dazu sollte der Teilchenstrom beider Systeme über die Membran hinweg ermittelt werden. Da die Durchtrittsfläche die einzige Variable zwischen Referenz- und Testkapsel ist, ergibt sich der benötigte Korrekturfaktor  $F_K$  als Koeffizient der Radien beider Durchtrittsflächen, es gilt demnach;

$$(3) \quad F_K = \frac{r_{EV}}{r_{QS}}$$

Dieser Korrekturfaktor wird auf die zeitabhängige Achse der Dialysekurve angewendet werden. Die gemessenen Dialysekurven sind unten dargestellt (Abbildung 3-3).



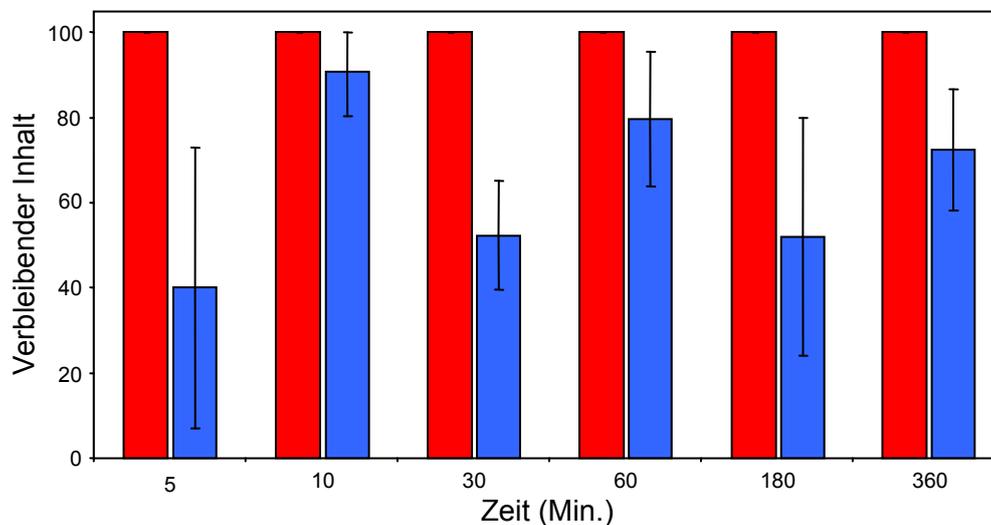
**Abbildung 3-3: Dialysekurven im Vergleich.** Als Maß für die Menge des umgesetzten Dialysegutes wurde die Leitfähigkeit eines Elektrolyts in Lösung herangezogen. A) Stoffumsatz der neu entwickelten Dialyse- und Applikationskapsel (■) und der Referenzkapsel (QuixSep) (◆) in Abhängigkeit zur Zeit. Der grau schraffierte Bereich markierte den Zeitraum zu Beginn der Dialyse, in dem die maximale Diffusion erreicht wird. B) Die Eichreihe zeigt, dass sich Salzkonzentration und Leitwert linear proportional zueinander verhalten. Somit kann der Leitwert als Maß für die Dialyse herangezogen werden. Die abgebildete Geradengleichung dient zur Umrechnung des Leitwertes in die Salzkonzentration. Das Bestimmtheitsmaß der Eichkurve liegt bei  $R^2=0,999$ .

Zu Beginn war der Anstieg der Kurve linear, hier erreichte der Teilchenstrom über die Membran sein Maximum. Mit schwindendem Konzentrationsunterschied zwischen Dialysat und Puffer sank die Diffusionsrate, so dass die Kurve abfiel. Mittels einer linearen Regression konnte die Diffusionsrate für den Bereich der maximalen Diffusion ermittelt werden. Der Teilchenstrom über die Membran ergibt sich als Steigung im linearen Bereich und betrug bei der Referenzkapsel (QuixSep<sup>®</sup>)  $47,5 \pm 0,1$  nmol/min und bei der hier entwickelten Kapsel  $48,6 \pm 0,1$  nmol/min. Im Bereich der maximalen Diffusion konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kapseln festgestellt werden. Im weiteren Verlauf sank die Diffusion der Referenzkapseln sogar stärker als die der hier entwickelten Kapsel. Somit konnte belegt werden, dass unter vergleichbaren Bedingungen, beide Kapseln vergleichbare Dialyseraten erzielen. Folglich ist die getestete Kapsel *in puncto* Dialyserate ebenso leistungsfähig wie der derzeitige Stand der Technik.

### 3.1.4 Dichtheitsprüfung

Neben den unverhältnismäßig hohen Kosten des kommerziellen Pendant, ergaben Praxisversuche, dass die Unzuverlässigkeit des kommerziellen Systems häufig zu Vergiftungs-

erscheinungen in den Bakterienkulturen führte. Um die Zuverlässigkeit der hier entwickelten Kapsel zu belegen, wurden beide Kapseln komplett mit Wasser gefüllt und anschließend mit einer PTFE-Membran mit einer Materialstärke von 125 nm verschlossen.



**Abbildung 3-4: Dichtheitsprüfung der Kapseln.** Gemessen wurde der Flüssigkeitsverlust der Referenzkapseln (blau) sowie der neu entwickelten Kapseln (rot) nach einer bestimmten Inkubationszeit unter Vakuum. Anders als bei seinem kommerziell erworbenen Pendant, konnte, selbst unter diesen extremen Bedingungen, bei den hier vorgestellten Kapseln kein Flüssigkeitsverlust festgestellt werden. Die abgebildeten Mittelwerte ergeben sich pro Kapseltyp und Zeitpunkt aus 4-7 Einzelmessungen.

Durch die stark hydrophoben Eigenschaften des PTFE ist gewährleistet, dass keine Diffusion der Flüssigkeit – auch nicht bei Innendruck – durch die Membran stattfindet. Gleichzeitig ist PTFE widerstandsfähig genug, um dem Innendruck, der durch das äußere Vakuum erzeugt wird, stand zu halten. Dabei wurde der Verlust der Flüssigkeit unter den Versuchsbedingungen in zahlreichen, vergleichenden Versuchen untersucht (siehe Abbildung 3-4). Wie in der obigen Abbildung zu erkennen, verlieren die Referenzkapseln der Marke QuixSep<sup>®</sup> bereits nach wenigen Minuten – zum Teil – erhebliche Mengen ihres Probenvolumens. In 93,3% aller Tests trat bei den Referenzkapseln eine Leckage auf. Der Flüssigkeitsverlust lag bei bis zu 97% des ursprünglichen Volumens. Bereits während der Evakuierung konnte vereinzelt ein Flüssigkeitsverlust festgestellt werden. Die Zeit im Vakuum stellte dabei keinen Parameter dar, der die Menge des Flüssigkeitsverlustes beeinflusste. Es konnte kein Trend in Abhängigkeit zur Zeit festgestellt werden. Vielmehr traten Leckagen von Versuch zu Versuch vollkommen sporadisch auf. Im Gegensatz dazu zeigten die neuen Kapseln eine hundertprozentige Zuverlässigkeit. Das bedeutet, dass nie, auch nicht bei maximaler Testdauer von bis zu sechs Stunden im Vakuum, ein Verlust des „Dialysegutes“ festgestellt werden konnte. Diese Dichtheit und Zuverlässigkeit lieferte die Reproduzierbarkeit, die erforderlich ist für die Evaluierung der Hydrogenaseaktivität unter CO-Limitation (siehe Kapitel 3.3.4).

## 3.2 Der HypCD-Komplex

Vorangegangene Untersuchungen an HypC und HypD in *E. coli* haben gezeigt, dass beide akzessorischen Proteine einen Komplex bilden, welcher eine zentrale Rolle in der Reifung des aktiven Zentrums von [NiFe]-Hydrogenasen einnimmt. Gemäß einem Postulat dient ein im HypCD-Komplex gebundenes Eisen dabei als Rezipient von wenigstens einem CN<sup>-</sup>-Liganden (Blokesch, Albracht *et al.* 2004). In dieser Arbeit sollte dieser Komplex hinsichtlich des Ligandierungsmechanismus und seiner vollständigen Ligandenausstattung untersucht werden.

### 3.2.1 Ein neu identifiziertes HypD-Homolog in *Ralstonia eutropha* zeigt Ähnlichkeiten zu *E. coli* HypD

Neben dem gut charakterisierten HypCD-Komplex aus *E. coli* konnte ein solcher Komplex auch in *Ralstonia eutropha* nachgewiesen werden (Jones, Lenz *et al.* 2004). Hier wurde unlängst, neben dem vergleichsweise gut charakterisierten HypD1 aus dem MBH-Operon, ein weiteres HypD-Homolog (A/N: NP\_942714, nachfolgend HypD2 genannt) identifiziert. Diese Isoform von HypD wird in einem zusätzlichen *hyp*-Operon, welches 5,7 kB in 5'-Richtung vor dem SH-Operon liegt, auf dem Megaplasmid pHG1 kodiert (Schwartz, Henne *et al.* 2003). Im Umfeld dieses *hyp*-Operons befinden sich auch die Strukturgene für eine vierte [NiFe]-Hydrogenase, die bis *dato* noch weitestgehend uncharakterisiert ist.

Deletionen in HypD1 bewiesen, dass HypD2 den Verlust eines funktionsfähigen HypD1 nicht komplementieren kann (Dernedde, Eitinger *et al.* 1996). Umgekehrt zeigten Untersuchungen an der vierten Hydrogenase aber auch, dass weder das *hyp1*-Operon noch das *hyp2*-Operon für die Reifung der vierten Hydrogenase notwendig sind. Demzufolge scheint dieses *hyp*-Operon inkompatibel zu den *hyp*-Genen aus MBH- und SH-Operon sein (unveröffentlichte Ergebnisse C. Schäfer).

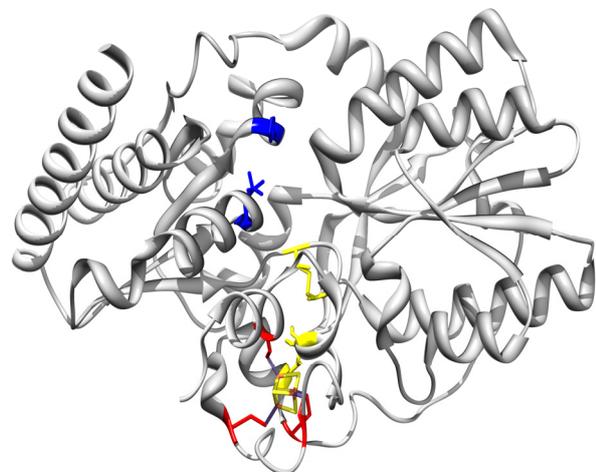
Die hier durchgeführten Sequenzanalysen zeigten, dass HypD2 eine höhere Homologie zu HypD aus *E. coli* (51,9 % Identität) aufweist, als zu *R.e.*HypD1 (48,8 % Identität) (Abbildung 3-5). Darüber hinaus ist in HypD2 eine hochkonservierte Aminosäure, C354<sup>3</sup>, ebenso wie in *E. coli*, durch ein Leucin substituiert. Demzufolge kann hier lediglich eine der Disulfidbrücken gebildet werden, denen eine essentielle Funktion innerhalb des Ligandierungsprozesses nachgesagt wird (siehe hierzu Abbildung 3-6). Es wird vermutet, dass die Oxidation dieser Thiolgruppen zu den entsprechenden Disulfidbrücken die Elektronen für den nukleophilen

---

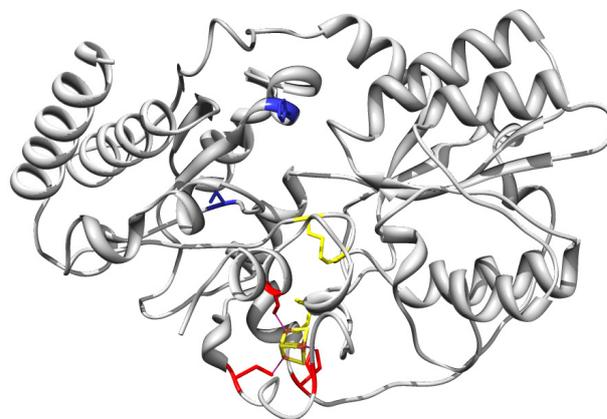
<sup>3</sup> Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die Aminosäurekoordinaten, zwecks Vereinheitlichung, auf HypD1.



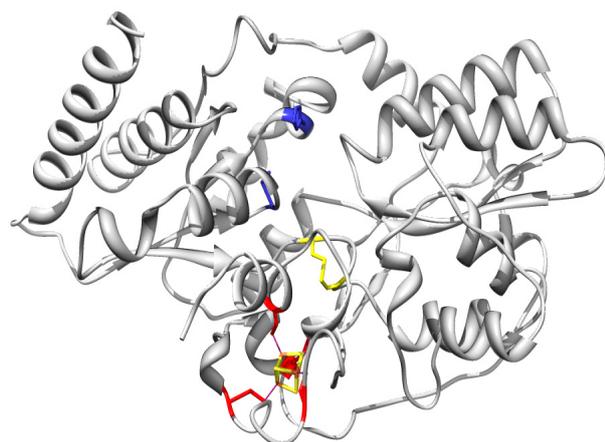
Disulfidbrücken ausbilden. Zu diesem Typ gehören u. a. auch HypD1 aus *Ralstonia eutropha* und HypD aus *Thermococcus kodakarensis*.



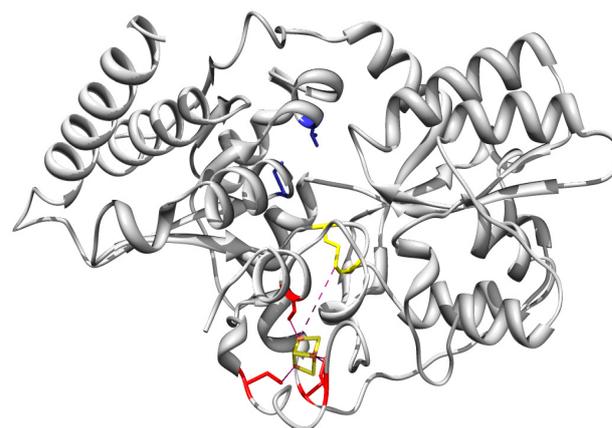
A) *Thermococcus kodakarensis* HypD



B) *Ralstonia eutropha* HypD1



C) *Escherichia coli* HypD

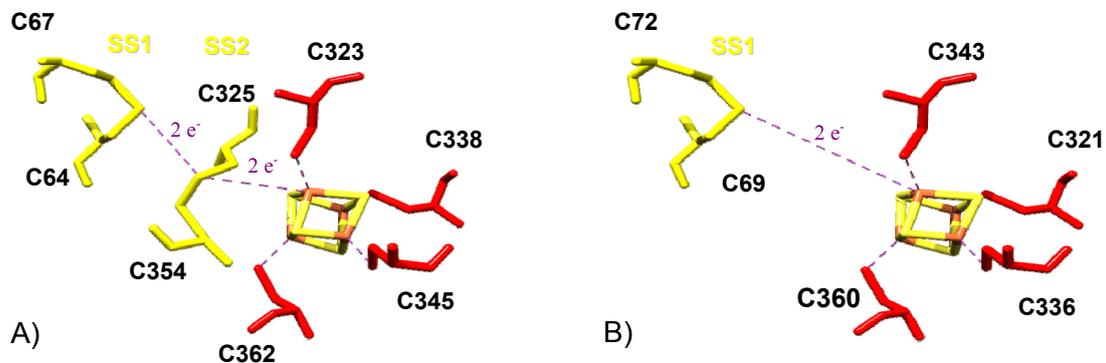


D) *Ralstonia eutropha* HypD2

**Abbildung 3-6: Strukturmodelle verschiedener HypD-Isoformen aus verschiedenen Spezies.** A) Kristallstruktur des Maturationsproteins HypD aus *Thermococcus kodakarensis* KOD1 (2Z1D). B) Strukturmodell (40,3 % / RMSD 0,66) von HypD1 aus *Ralstonia eutropha* H16. C) Strukturmodell von HypD aus *Escherichia coli* K12 (38,6 % / RMSD 0,67). D) Strukturmodell von HypD2 aus *Ralstonia eutropha* H16 (35,8 % / RMSD 0,94). Konservierte Cysteine, die an der Koordinierung des [4Fe4S]-Clusters beteiligt sind, sind in Rot dargestellt. Aminosäuren, die an der Bildung des HypCD-Komplexes beteiligt sind bzw. für die Koordinierung des „katalytischen“ Eisens notwendig sind, sind blau eingefärbt. Die Disulfidbrücken sind in Gelb dargestellt. Die angegebene Sequenzidentität und der RMSD-Wert der C $\alpha$ -Atome beziehen sich auf *T.k.*HypD als Referenz. Die Darstellungen der HypD-Strukturen wurden mit Hilfe von UCSF Chimera 1.5.3 (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) erstellt. Die Modelle wurden mittels SwissModel erstellt (Arnold, Bordoli *et al.* 2006; Kiefer, Arnold *et al.* 2009).

Der zweite Typ, nachfolgend *SDB*-Typ (*Single-Disulfide-Bond*) genannt, besitzt zumeist nur die beiden Cysteine, welche die proximale Disulfidbrücke bilden. Zu diesem Typ gehören u. a. HypD2 aus *Ralstonia eutropha* und HypD aus *Escherichia coli*.

Sollte die postulierte Funktion des Elektronentransfers zutreffend sein, dann müsste die Distanz zwischen dem [4Fe4S]-Zentrum und der proximalen Disulfidbrücke innerhalb der für den intramolekularen Elektronentransfer üblichen Entfernungen liegen.

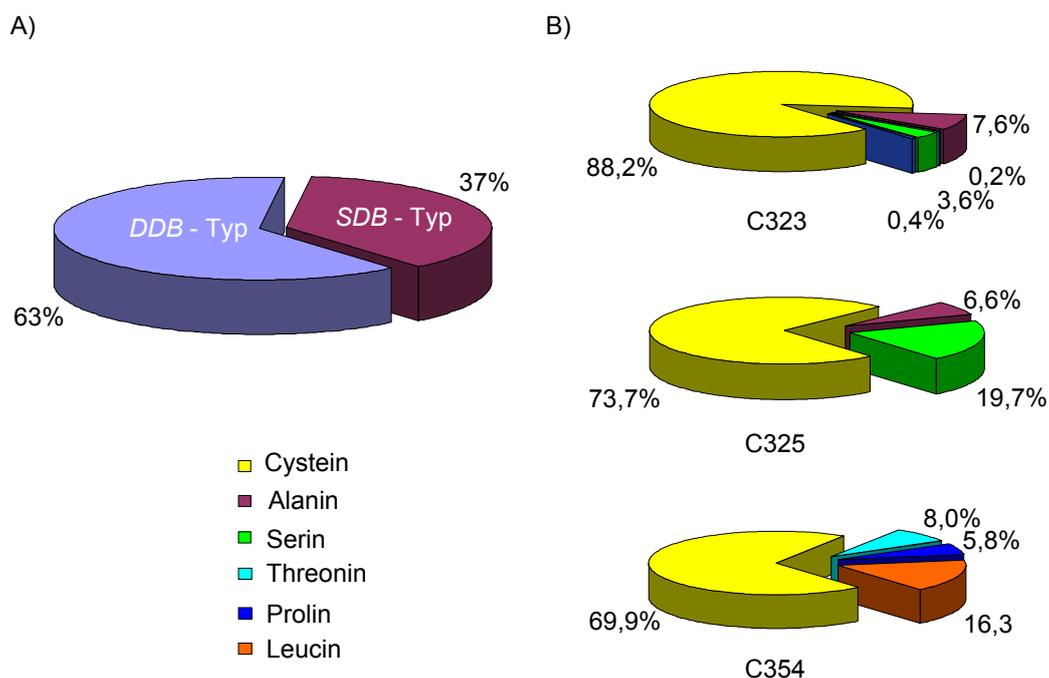


**Abbildung 3-7: Die beiden funktionalen Varianten von HypD aus *Ralstonia eutropha*.** A) HypD1 aus *Ralstonia eutropha* ist notwendig für die Reifung der RH, SH und MBH; *DDB*-Typ. B) HypD2 aus *Ralstonia eutropha* ist mutmaßlich notwendig für die Reifung der vierten Hydrogenase; *SDB*-Typ. Die gelb dargestellten Cysteine bilden die Disulfidbrücken, die in rot dargestellten Cysteine koordinieren das abgebildete [4Fe4S]-Zentrum. Anhand der Homologiemodelle für HypD1 bzw. HypD2 ergeben sich in etwa folgende Distanzen für den Elektronentransfer: HypD1  $\sim 4,6$  Å ([4Fe4S]  $\leftrightarrow$  SS2) und  $\sim 5,5$  Å (SS2  $\leftrightarrow$  SS1) bzw. HypD2  $\sim 8,8$  Å ([4Fe4S]  $\leftrightarrow$  SS1). Die angegebenen Positionen der Cysteine beziehen sich auf die jeweiligen Proteine. Die Darstellungen der HypD-Strukturen wurden mit Hilfe von UCSF Chimera 1.5.3 erstellt (Pettersen, Goddard *et al.* 2004).

Basierend auf den Strukturmodellen der HypD-Proteine konnten die räumlichen Entfernungen zwischen den Eisen-Schwefel-Zentren und den distalen (SS2) bzw. den proximalen (SS1) Disulfidbrücken ermittelt werden (Abbildungen 3-7). Die direkte Maximaldistanz ([4Fe4S]  $\leftrightarrow$  SS1) unterscheidet sich dabei in den verschiedenen HypD-Varianten nicht. Mit einer mittleren Entfernung von  $8,8$  Å zwischen [4Fe4S]-Zentrum und proximaler Disulfidbrücke liegen die zu überbrückenden Distanzen deutlich unter den dokumentierten Spitzenwerten (Lippard und Berg 1995). Daraus muss gefolgert werden, dass die distale Disulfidbrücke für einen Elektronentransfer und somit die Funktion von HypD nicht zwingend erforderlich ist.

### 3.2.2 Sequenzvergleich mit 448 HypD-Isoformen aus verschiedenen Organismen

Anhand eines Sequenzvergleichs von insgesamt 448 HypD-Isoformen aus verschiedenen Hydrogenase-exprimierenden Organismen sollte, mittels einer statistischen Untersuchung geklärt werden, ob eine der beiden HypD-Varianten quasi eine Grundform darstellt und der jeweils andere Typ nur eine Ausnahme bildet. Tatsächlich waren die Isoformen die beide Disulfidbrücken besitzen (*DDB*-Typ) mit 63 Prozent häufiger vertreten. Allerdings kann der *SDB*-Typ, der lediglich die proximale Disulfidbrücke enthält, mit einem Anteil von 37 Prozent nicht als „Ausnahmeerscheinung“ gewertet werden (Abbildung 3-8 A). Beide Typen kommen weit verstreut vor, ohne dass dabei - in phylogenetischer Hinsicht - ein Muster ersichtlich wird. Die statistische Auswertung des Sequenzvergleichs aller 448 HypD-Homologe zeigte, dass die Aminosäuren C338, C345 und C362 durchgehend konserviert sind. Diese AS sind an der Koordinierung des [4Fe4S]-Zentrums beteiligt. Andere Cysteine an den Positionen C323, C325 und C354 zeigten hingegen gewisse Enzym polymorphismen (Abbildung 3-8 B).



**Abbildung 3-8: Statistische Analyse von HypD.** 448 Isoformen von HypD wurden mittels Multi-Sequenz-Alignment untersucht. A) Prozentuale Anteile des *SDB*- (nur proximale Disulfidbrücke) bzw. *DDB*- (beide Disulfidbrücken) Typs an der untersuchten Stichprobe von HypD-Homologen. B) Prozentuale Häufigkeit verschiedener (substituierender) Aminosäuren an den Positionen der hochkonservierten Cysteine in HypD. Untersucht wurden die variablen Positionen 323, 325 und 354 (Nomenklatur bezieht sich auf *R.e.HypD1*). Die übrigen Positionen sind invariant.

Die Analyse des Sequenzvergleichs ermöglichte die Ableitung einiger Grundregeln für die Substitution der Cysteinreste. So konnte zum Beispiel niemals ein doppelter Aminosäureaustausch in C323 und C325 beobachtet werden. Gemäß dem gegenwärtigen Modell

ist in HypD-Isoformen mit zwei Disulfidbrücken (*DDB*-Typ) C323 an der Koordination des [4Fe4S]-Zentrums beteiligt. Im Gegensatz dazu sind C325 und C354 an der Ausbildung der distalen Disulfidbrücke beteiligt (Abbildung 3-7). Diese Beobachtung untermauert die These, dass in HypD-Isoformen mit nur einer einzigen Disulfidbrücke, C325 – im Falle der Substitution von C323 – die Funktion der Koordination des [4Fe4S]-Zentrums übernehmen kann. Experimentell wird diese These durch den Austausch von C323 zu Serin gestützt. So konnte in der entsprechenden Mutante gegenüber der Negativkontrolle (HF338;  $\Delta hypD$ ) eine etwa 3,5-fach höhere Restaktivität der löslichen Hydrogenase nachgewiesen werden (Bürstel, Siebert *et al.* 2012).

Darüber hinaus fiel auf, dass die Polymorphismen in Art und Anzahl der substituierenden Aminosäuren stark eingeschränkt sind (Abbildung 3-8 B). So ist ein Austausch von C323 (fast) immer mit einem Austausch von C354 assoziiert (Es sind drei Ausnahmen bekannt (0,66 %); YP\_004436673, AEE25405, AEA96489). Auf der anderen Seite werden C354L-Substitutionen in 94,6 % aller Fälle von einer Substitution von C323 begleitet. C354T- und C354P-Austausche hingegen gehen immer mit einem Austausch von C325 einher (Zwei Ausnahmen bekannt (0,44 %); ABP95102, ADX82239). Obgleich die Sinnhaftigkeit der beobachteten Restriktionen nicht vollständig verstanden ist, zeigten diese Ergebnisse, dass die Substitutionen der variablen Cysteine nicht willkürlich sind, sondern bestimmten Regeln unterliegen. Beim Vergleich der Eigenschaften der Aminosäuren an den jeweiligen Positionen konnte festgestellt werden, dass bestimmte Eigenschaften der Cysteine auch in den Substituenten erhalten geblieben sind. An den Positionen C323 und C325 sind alle Substituenten ebenfalls kleine bzw. winzige AS, an Position C354 sind alle identifizierten Substituenten klein und hydrophob (Livingstone und Barton 1993). Auch wenn augenscheinlich hier sterische Aspekte eine große Rolle spielen, kann nicht erklärt werden, warum andere AS mit vergleichbaren Eigenschaften nicht vorkommen.

### **3.2.3 Identifikation neuer, hochkonservierter struktureller Merkmale in HypD**

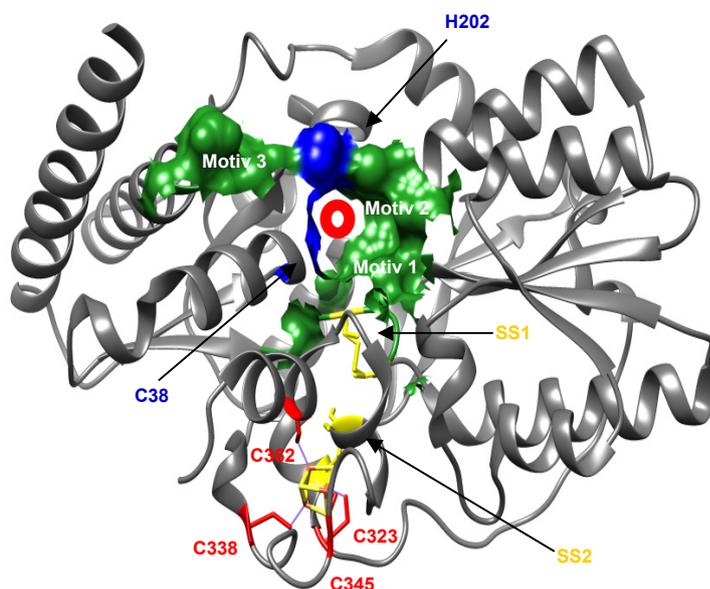
Im Rahmen des erwähnten, umfassenden Sequenzvergleichs von 448 HypD-Homologen konnten, neben den bereits diskutierten Cysteinen, weitere Aminosäuremotive identifiziert werden, die hoch bzw. durchgehend konserviert sind. Diesen hochkonservierten Motiven konnte bisher noch keine bestimmte Funktion zugeordnet werden. Interessanterweise zeigte der Vergleich mit der Struktur von *R.e.HypD1*, dass alle diese Motive beinahe die gesamte Oberfläche eines röhrenförmigen Hohlraums bilden, in dem die mutmaßliche Assemblierung der  $Fe(CN)_2(CO)$ -Einheit stattfindet. Neben den beiden AS C36 und H203, für die bereits eine Funktion bei der Koordinierung des designierten „katalytischen“ Eisens postuliert wurde

(Blokesch und Böck 2006; Watanabe, Matsumi *et al.* 2007), konnten insgesamt drei auffallend hoch konservierte Motive identifiziert werden, die in erheblichem Maße an der Bildung dieser Kavität beteiligt sind.

Das erste dieser Motive (Motiv 1; Abbildung 3-9) war das durchgehend konservierte  $_{61}\text{GPGCPVC}_{67}$ -Motiv, das bisher nur wegen der beiden Cysteine Beachtung gefunden hat (siehe Abbildung 3-5). Diese Cysteine bilden die proximale Disulfidbrücke (SS1; Abbildung 3-9), die in allen HypD-Homologen vorhanden ist. Interessanterweise tragen auch bei diesem Motiv alle übrigen AS in hohem Maße zur Oberflächenbildung der Kavität bei.

Das zweite Motiv (Motiv 2, siehe Abbildung 3-9) war das  $_{142}\text{GFETT}_{146}$ -Motiv (siehe Abbildung 3-5). Wie das  $_{61}\text{GPGCPVC}_{67}$ -Motiv ist auch dieses in allen bekannten Isoformen durchgehend konserviert.

Einen ebenfalls hohen Konservierungsgrad zeigte auch das  $_{227}\text{AGFEP}_{231}$ -Motiv (Motiv 3, siehe Abbildung 3-9 und Abbildung 3-5). Allerdings sind hier in der Gesamtpopulation aller HypD-Homologe nur G228 und F229 durchgehend konserviert. Die übrigen Positionen weisen hingegen eine gewisse Variabilität auf. Allerdings stellen in diesem Motiv nur die beiden genannten AS einen Anteil an der Oberfläche der Kavität.



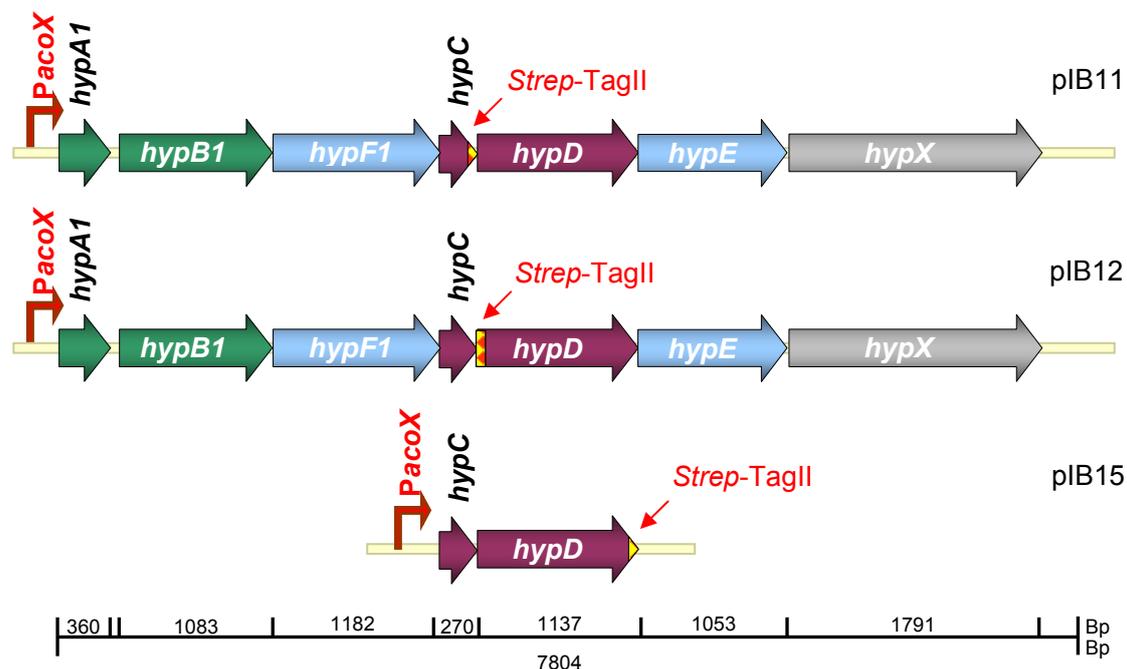
**Abbildung 3-9: Hochkonservierte strukturelle Merkmale von HypD.** Modell des HypD aus *Thermococcus kodakarensis* (Aufsicht). SS1, proximale Disulfidbrücke bestehend aus C66 und C69; SS2, distale Disulfidbrücke bestehend aus C325 und C354 (gelb). Die rot hervorgehobenen AS sind an der Koordination des [4Fe4S]-Zentrums beteiligt. Aminosäuren, die mutmaßlich an der Koordination des katalytischen Eisens beteiligt sind, werden blau dargestellt. Die Oberflächen die von den hochkonservierten Motiven gebildet werden, sind in Grün dargestellt. Die potentielle Position des katalytischen Eisens ist durch einen roten Ring markiert.

Da somit nahezu die gesamte Oberfläche der Kavität durch hochgradig konservierte AS gebildet wird, ist anzunehmen, dass diese Kavität bestimmte funktionale bzw. strukturelle Funktionen erfüllt. Denkbar sind in diesem Zusammenhang prinzipiell zwei Aufgaben, die ein solches Maß an Restriktivität in der Struktur erfordern, zum einen die Komplexbildung von HypC und HypD, zum anderen der Prozess der Ligandierung des koordinierten Eisens.

### 3.2.4 Konstruktion und Komplementation von HypCD-Expressionsplasmiden

Hinsichtlich des HypCD-Komplexes ist die mit Abstand wichtigste Frage, ob sich der Carbonylligand bereits in diesem Stadium am „katalytischen“ Eisen befindet und die  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Einheit demzufolge als Gesamtheit in die großen Untereinheiten transferiert wird oder als teilmontierte Vorstufe.

Ogleich die Anwesenheit des Carbonylliganden im HypCD-Komplex regelmäßig antizipiert wird (z. B. Watanabe, Arai *et al.* 2009), konnte noch nie ein Beweis für die Präsenz des CO-Liganden erbracht werden. Zudem wäre diese Erkenntnis wichtig für die Suche nach dem bzw. den Synthesewegen des Carbonylliganden, da man so gezielt nach potentiellen Interaktionspartnern suchen könnte. Da bisherige Untersuchungen auf der Markierung der CN-Liganden mit  $^{14}\text{C}$ -CP basierten, konnten diese lediglich einen qualitativen Nachweis für die Existenz von mindestens einem Cyanidliganden erbringen (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Blokesch, Albracht *et al.* 2004). Aufgrund der kumulativen Natur des verwendeten Assays kann keine Quantifizierung der diatomaren Liganden im HypCD-Komplex vorgenommen werden.



**Abbildung 3-10: Überexpressionsplasmide zur Expression und Reinigung verschiedener HypCD-Komplexe aus *Ralstonia eutropha*.** Abgebildet sind zwei Konstrukte zur Gewinnung eines gereiften HypCD-Komplexes. Das Plasmid pIB11 enthält dabei ein C-terminal „getagtes“ *hypC*. In pIB12 wurde ein *Strep-TagII*<sup>®</sup> am N-Terminus von *hypD* eingefügt. Beide Gene werden mit den übrigen *hyp*-Genen des MBH-Operons ko-exprimiert. Das dritte Konstrukt, pIB15, wurde für die Überexpression eines ungereiften HypCD-Komplexes konstruiert. Es enthält ausschließlich die Gene *hypC* und *hypD*. Dabei wurde in diesem Falle der C-Terminus von *hypD* mit dem *Strep-TagII* versehen. Die Expression aller drei Plasmide wird durch den starken, induzierbaren *acoX*-Promotor kontrolliert. Die Expression wurde durch Zugabe von 15 mM Acetoin induziert.

Um Art und Anzahl der diatomaren Liganden im HypCD-Komplex näher zu bestimmen, sollte der Komplex mittels FTIR-Spektroskopie detailliert untersucht werden. Da diese Methode noch nie zuvor auf eine der transienten Zwischenstufen der pleiotropen Reifungen angewendet wurde, musste zunächst untersucht werden, ob die FTIR-Spektroskopie überhaupt auf die labilen Zwischenprodukte der frühen Reifung anwendbar ist. Im Anschluss sollte der HypCD-Komplex in unterschiedlichen Reifestadien isoliert und analysiert werden, um einen detaillierteren Einblick in die Ligandenausstattung und die im HypCD-Komplex ablaufenden Prozesse zu erhalten.

Um den HypCD-Komplex aus *Ralstonia eutropha* (nachfolgend auch *R.e.HypCD*) in verschiedenen Stadien zu isolieren, wurden verschiedene, mit einem *Strep*-TagII<sup>®</sup> modifizierte, Versionen von *hypC* und *hypD* konstruiert. Beide Gene werden nur im MBH-Operon kodiert, daher wurde das gesamte MBH-assoziierte *hyp*-Operon in den Überexpressionsvektor pIB01 kloniert, um das Spektrum eines reifen *R.e.HypCD*-Komplexes zu bekommen.

Ausgehend von diesem neuen Überexpressionsplasmid, pIB02, wurde zunächst, in Analogie zu den Überexpressionssystemen aus *E. coli*, versucht *hypC* mit einem C-terminalen „Tag“ zu versehen. Dieses Expressionsplasmid erhielt den Namen pIB11 (Abbildung 3-10; oben). Darüber hinaus wurde eine weitere Variante konstruiert, pIB12. In dieser Variante wurde *hypD* N-terminal mit einem *Strep*-TagII<sup>®</sup> versehen (Abbildung 3-10; mittig).

**Tabelle 6: Komplementationstest der *R.e.HypCD*-Überexpressionsplasmide.** Dabei entspricht die Wildtypaktivität im Falle der MB<sup>a</sup> reduzierenden Aktivität der MBH  $0,8 \pm 0,1$  U/mg und im Falle der NAD<sup>+</sup> reduzierenden Aktivität der SH  $4,0 \pm 0,2$  U/mg.

Plasmid / Genotyp	Stamm / Genotyp	MB <sup>a</sup> reduzierende Aktivität [%]	NAD <sup>+</sup> reduzierende Aktivität [%]
-	H16 / Wildtyp	100	100
pIB01	HF575 / $\Delta hyp1$ und $\Delta hyp2$	0	n.v.
pIB02; P <sub>acoX</sub> - <i>hypAIBIF1CDEX</i>	HF575 / $\Delta hyp1$ und $\Delta hyp2$	199	n.v.
pIB11; P <sub>acoX</sub> - <i>hypAIBIF1(C<sub>Strep</sub>)DEX</i>	HF340 / $\Delta hypC$	227	n.v.
pIB11; P <sub>acoX</sub> - <i>hypAIBIF1(C<sub>Strep</sub>)DEX</i>	HF575 / $\Delta hyp1$ und $\Delta hyp2$	0	n.v.
pIB12; P <sub>acoX</sub> - <i>hypAIBIF1(C<sub>StrepD</sub>)EX</i>	HF338 / $\Delta hypD$	212	n.v.
pIB12; P <sub>acoX</sub> - <i>hypAIBIF1(C<sub>StrepD</sub>)EX</i>	HF575 / $\Delta hyp1$ und $\Delta hyp2$	58	n.v.
pIB15; P <sub>acoX</sub> - <i>hypC(StrepD)</i>	HF338 / $\Delta hypD$	n.v.	108
pIB15; P <sub>acoX</sub> - <i>hypC(StrepD)</i>	HF340 / $\Delta hypC$	n.v.	113

a = Methylenblau; n.v. = nicht verfügbar

Zur Überexpression des ungereiften Komplexes wurden lediglich *hypC* und *hypD* in das Überexpressionsplasmid, pLO11, kloniert. Dabei wurde von der intrinsischen *Strep*-TagII<sup>®</sup>-

Sequenz in pLO11 Gebrauch gemacht, so dass in diesem Fall HypD mit einem C-terminalen *Strep*-TagII<sup>®</sup> entstand. Dieses Plasmid wurde pIB15 genannt (Abbildung 3-10; unten).

Die Funktionalität dieser modifizierten *hyp*-Gene wurde durch einen Komplementationstest überprüft. Als Maß für eine erfolgreich komplementierte Maturation wurde wahlweise die Methylenblau reduzierende Aktivität der MBH bzw. die NAD<sup>+</sup> reduzierende Aktivität der SH herangezogen (siehe Tabelle 6). Dazu wurden die Zellen unter heterotrophen Bedingungen auf FGN-Medium angezogen (siehe Kapitel 2.2.2), anschließend wurde die Hydrogenaseaktivität, wie in Kapitel 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben, bestimmt.

Die MBH-Aktivität der Positivkontrolle pIB02, einem Plasmid von dem das gesamte *hyp1*-Operon exprimiert wird, zeigte dabei etwa die doppelte Aktivität bzgl. des Wildtyps H16. Als Hintergrund diente HF575. In diesem Stamm wurde sowohl das *hyp1*-Operon als auch das *hyp2*-Operon deletiert.

Zunächst sollte pIB12 auf seine Funktionalität hin untersucht werden. Dieses Plasmid enthält eine *Strep*-TagII<sup>®</sup>-Sequenz am 5'-Ende von *hypD*. In einer  $\Delta$ *hypD*-Mutante (HF338) konnte pIB12 MBH-Aktivität auf dem Niveau der Positivkontrolle (pIB02) wiederherstellen. In HF575 (H16  $\Delta$ *hyp1*,  $\Delta$ *hyp2*) wurden noch 58 % MBH-Aktivität des Wildtyps festgestellt. Das Plasmid pIB11, bei dem der *Strep*-TagII<sup>®</sup> mit dem C-Terminus von HypC fusioniert wurde, konnte in einem Stamm mit einer *in frame*-Deletion in *hypC* (HF340) Hydrogenaseaktivität auf dem Niveau der Positivkontrolle generieren. Interessanterweise konnte mit demselben Plasmid in HF575 keine Hydrogenaseaktivität festgestellt werden. Folglich ist pIB11 zwar in der Lage den Verlust von *hypC* zu komplementieren, jedoch muss durch die *Strep*-TagII<sup>®</sup>-Sequenz am 3'-Ende von *hypC* die Expression der nachfolgenden Gene gestört sein.

Der ungeriffte HypCD-Komplex von pIB15 zeigte sowohl in HF338 ( $\Delta$ *hypD*) und HF340 ( $\Delta$ *hypC*) eine Hydrogenaseaktivität auf Wildtyp-Niveau.

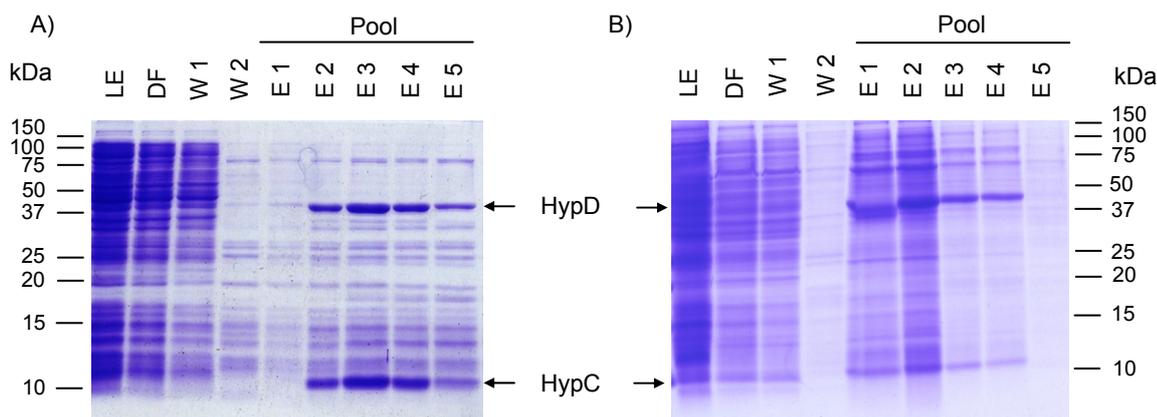
### **3.2.5 Expression und Reinigung des HypCD-Komplexes aus *Ralstonia eutropha* und *Escherichia coli***

Zur Isolierung des gereinigten Komplexes wurden die konstruierten Expressionsplasmide in den Überexpressionsstamm HF962 (HF210  $\Delta$ P<sub>*acoX*</sub>) konjugiert. Diesem Überexpressionsstamm, einem Derivat von *Ralstonia eutropha* H16, fehlt das Megaplasmid pHG1. Diesem Stamm fehlen somit nicht nur sämtliche *hyp*-Gene, sondern auch die großen Hydrogenaseuntereinheiten als Rezipienten der putativen Fe(CN)<sub>2</sub>(CO)-Einheiten, was die Akkumulation des HypCD-Komplexes unterstützt. Zudem wurde in diesem Stamm der endogene Promotor von *acoX* deletiert. Diese Deletion verhindert die Expression des *aco*-Operons. Die Genprodukte dieses Clusters sind für den Acetoin-Katabolismus erforderlich. Demzufolge kann Acetoin für die

Induktion der Überexpression verwendet werden, ohne dass es gleichzeitig über den Metabolismus abgebaut werden kann.

Zur Überexpression der HypCD-Komplexe wurden die erzeugten Expressionsstämme unter aeroben Bedingungen im heterotrophen Fermenter auf Fruktose-Glycerol-Ammonium- (FGN-) Medium angezogen (Kapitel 2.2.2). Zur Induktion der Expression wurde nach 24 Stunden, nach Volladaption auf Glycerol, jeweils 10 - 15 mM Acetoin zugegeben. Geerntet wurde nach weiteren 24 Stunden (Kapitel 2.2.6).

Für die Überexpression der verschiedenen HypCD-Komplexe aus *Escherichia coli* (nachfolgend auch *E.c.HypCD*) konnte auf etablierte Plasmide zurückgegriffen werden. Die Expression fand unter anaeroben, fermentativen Bedingungen in 5L-Erlenmeyerkolben, die bis zum Rand mit TGYEP-Medium gefüllt wurden, statt. Ab einer  $OD_{600}$  von 0,5 wurde mit 0,2 - 1,0 mM IPTG induziert und nach weiteren 12 Stunden bei 22 °C geerntet (Blokesch, Albracht *et al.* 2004).

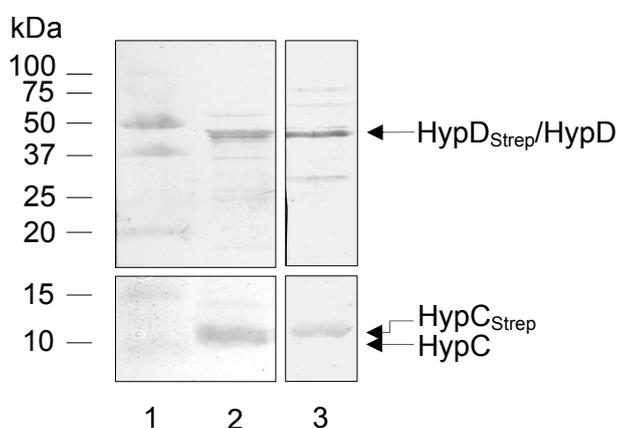


**Abbildung 3-11: Anreicherung des reifen HypCD-Komplexes.** A) HypCD-Komplex aus *Escherichia coli*. HypD besitzt eine molekulare Masse von 41,4 kDa und HypC<sub>Strep</sub> 10,6 kDa. B) HypCD-Komplex aus *Ralstonia eutropha*. HypD<sub>Strep</sub> besitzt eine molekulare Masse von 43,1 kDa und HypC 9,8 kDa. Die Fraktionen wurden mit einem denaturierenden 16%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Färbung mit Coomassie. LE, *S30*-Extrakt; DF, Durchflussfraktion; W1-2, Waschfraktionen; E1-5, Elutionsfraktionen.

Für die FTIR-Spektroskopie sind Volumina von 10 - 20  $\mu$ l mit einer Proteinkonzentration von nicht weniger als 0,2 mM erforderlich. Aufgrund der schlechten Expression des HypCD-Komplexes in beiden Systemen mussten für eine Messung zwischen 20 g und 80 g Zellmaterial aufgeschlossen werden (Kapitel 2.3.1).

Mittels Affinitätschromatographie wurden die HypCD-Komplexe beider untersuchten Spezies aus dem löslichen Extrakt angereichert (siehe Kapitel 2.3.3). Im Unterschied zu den Herstellerangaben der *Strep*-Tactin<sup>®</sup> Matrix wurde dazu ein Puffersystem mit einem pH-Wert von 7,5 (4 °C) und einer maximalen NaCl-Konzentration von 50 mM verwendet.

Abbildung 3-11 zeigt den Verlauf einer typischen Anreicherung des HypCD-Komplexes aus *E. coli* (A) und *R. eutropha* (B). Deutlich zu erkennen sind die dominanten Banden bei 41,4 kDa (*E.c.*HypD) und 10,6 kDa (*E.c.*HypC<sub>Strep</sub>) bzw. 43,1 kDa (*R.e.*HypD<sub>Strep</sub>) und 9,8 kDa (*R.e.*HypC). Diese belegen die erfolgreiche Reinigung von HypC und HypD als Komplex. Es muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass neben dem HypCD-Komplex sicherlich sowohl *E.c.*HypC<sub>Strep</sub> als auch *R.e.*HypD<sub>Strep</sub> auch als Monomer vorliegen. Die Identität dieser Banden konnte durch eine immunologische Färbung mit wirtsspezifischen Antikörpern bestätigt werden (Abbildung 3-12). Die verwendeten Proben hatten eine Konzentration von 0,3-1,9 mM (vergleiche Abbildungsbeschreibungen) und ein Volumen von 10 – 20 µl. Kontaminante Proteine, die aufgrund der niedrigen eingesetzten Ionenstärke im Reinigungspuffer nicht vollständig entfernt wurden, bleiben in der FTIR-Spektroskopie „unsichtbar“.



**Abbildung 3-12: Immunologischer Nachweis von HypC und HypD.** Vereinigtes Eluat des HypCD-Komplexes nach *Strep*-TagII®-Affinitätschromatographie. Proteine wurden durch SDS-PAGE auf einem 16%-igen Polyacrylamidgel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Bestandteile des Komplexes wurden mittels wirtsspezifischer  $\alpha$ -HypC (untere Reihe) und  $\alpha$ -HypD (obere Reihe) Antikörper identifiziert. Spur 1, Standard (kDa); Spur 2, konzentriertes Eluat mit *R.e.*HypCD-Komplex; Spur 3, konzentriertes Eluat mit *E.c.*HypCD-Komplex. Pro Spur wurden 5µg Protein aufgetragen.

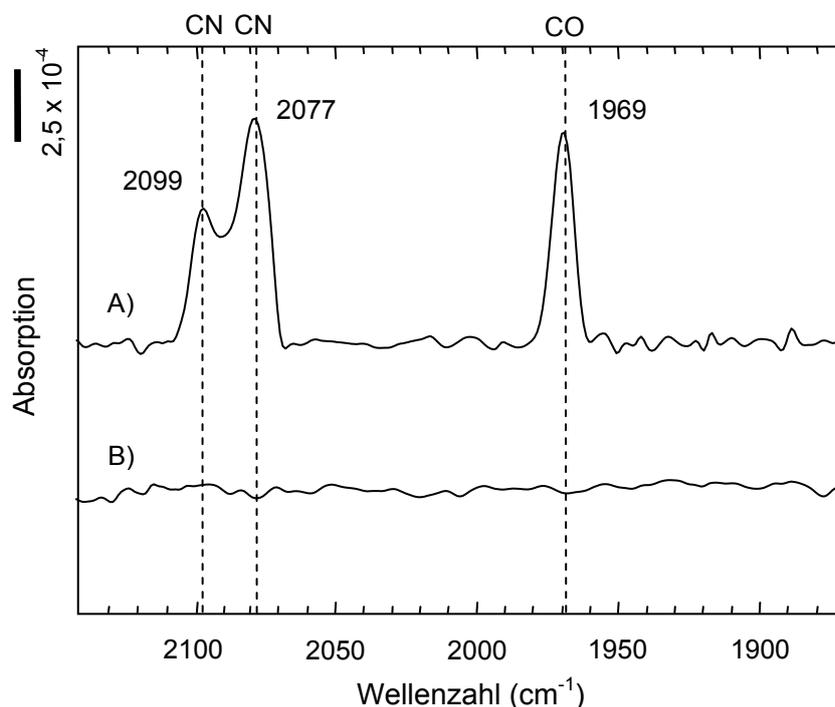
### 3.2.6 Nachweis der diatomaren Liganden am HypCD-Komplex aus *Ralstonia eutropha* mittels IR-Spektroskopie

Wie bereits erwähnt, sollte zunächst die Frage untersucht werden, ob der CO-Ligand bereits in dieser frühen Phase der Reifung, im Komplex aus HypC und HypD, am designierten „katalytischen“ Eisen gebunden ist oder ob der Carbonylligand erst in der großen Untereinheit an das „katalytische“ Eisen gelangt.

Um belastbare Informationen über die Art und Anzahl der diatomaren Liganden am designierten „katalytischen“ Eisen zu erhalten, sollte - in Zusammenarbeit mit der AG Hildebrandt an der TU Berlin - die Ligandierung isolierter HypCD-Komplexe mittels FTIR-Spektroskopie untersucht werden (Kapitel 2.4.2). Dabei sollte zwischen einem „reifen“ HypCD-Komplex und einem unreifen HypCD-Komplex unterschieden werden. Wobei der reife Komplex einen vollständigen Satz an diatomaren Liganden enthalten würde (sofern diese den vorhandenen

sind), der unreife Komplex hingegen könnte potentiell keinen oder aber eine Teilmenge aller drei Liganden enthalten.

Zunächst wurden reife HypCD-Komplexe aus *Ralstonia eutropha* untersucht. Dazu wurde eine „getagte“ Variante von *hypD* im Kontext der übrigen *hyp*-Gene, unter heterotrophen Bedingungen, überexprimiert (pIB12). Wie in Abbildung 3-13 A zu sehen ist, sind drei deutliche Absorptionsmaxima zu erkennen. Zwei Maxima finden sich im Bereich der CN<sup>-</sup>-Bande bei 2099 cm<sup>-1</sup> und 2077 cm<sup>-1</sup>. Etwas abgesetzt findet sich bei 1969 cm<sup>-1</sup> ein weiteres deutliches Maximum. Dieses Maximum wird dem Carbonylliganden zugeordnet.



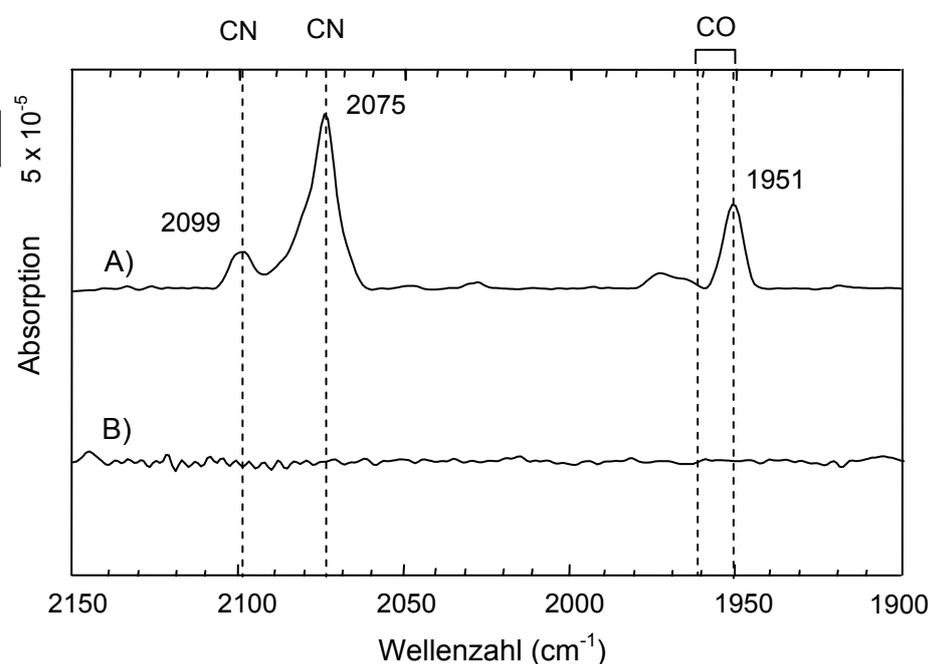
**Abbildung 3-13: FTIR-Spektren des HypCD-Komplexes aus *Ralstonia eutropha*.** A) HypCD-Komplex koexprimiert mit den akzessorischen *hyp*-Genen des MBH-Operons; isoliert aus HF962 (HF210  $\Delta P_{acoX}$ ). Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 353  $\mu$ M. B) HypCD-Komplex isoliert aus HF962 (HF210  $\Delta P_{acoX}$ ). Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 287  $\mu$ M. Die gezeigten Spektren wurden einer Basislinienkorrektur unterzogen.

Um zu diskriminieren, ob es sich bei den beobachteten Maxima nicht um unspezifische Absorptionen durch den Proteinkomplex handelte, sollte als Nächstes prämatuere, also unreife, *R.e.*HypCD-Komplexe untersucht werden. Dazu wurde das Überexpressionsplasmid pIB15, welches nur die Gene für HypC und HypD<sub>Strep</sub> enthält, in HF962 (HF210  $\Delta P_{acoX}$ ) konjugiert. Bei vergleichbarer Proteinkonzentration konnten keine Absorptionsmaxima detektiert werden (Abbildung 3-13 B). Die beobachteten Liganden im *R.e.*HypCD-Komplex sind also abhängig von der Aktivität der übrigen *hyp*-Gene. Hierbei sind vor allem die Gene für *hypE* und *hypF* zu nennen, deren Produkte für die Synthese und den Transfer der CN<sup>-</sup>-Liganden essentiell sind (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Blokesch, Paschos *et al.* 2004; Petkun, Shi *et al.* 2011).

### 3.2.7 Nachweis der diatomaren Liganden am HypCD-Komplex aus *Escherichia coli* mittels IR-Spektroskopie

Die obigen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Funktion weiterer Hyp-Proteine für die Ligandierung des HypCD-Komplexes notwendig ist. Im Falle der CN-Liganden sind es die Genprodukte von *hypE* und *hypF* (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Blokesch, Albracht *et al.* 2004; Blokesch, Paschos *et al.* 2004). Für HypA und HypB ist eine Funktion beim Einbau des Nickels belegt (Atanassova und Zamble 2005; Leach, Sandal *et al.* 2005; Leach, Zhang *et al.* 2007; Kaluarachchi, Zhang *et al.* 2011), daher scheint eine Funktion innerhalb der Ligandierungskaskade unwahrscheinlich. Inwieweit *hypEF* auch für die Ligandierung des HypCD-Komplexes mit dem CO-Liganden notwendig und hinreichend sind, sollte im Folgenden untersucht werden.

Zur Isolierung des reifen HypCD-Komplexes aus *E. coli* wurden *hypCDEF* gemeinsam vom Expressionsplasmid pT-HypDEFCStrep überexprimiert. Der *E. coli*-„Wildtyp“-Stamm BL21(DE3) wurde mit diesem Überexpressionsplasmid transformiert, und wie von Blokesch *et al.* beschrieben, unter anaeroben, fermentativen Bedingungen, kultiviert (Blokesch, Albracht *et al.* 2004).



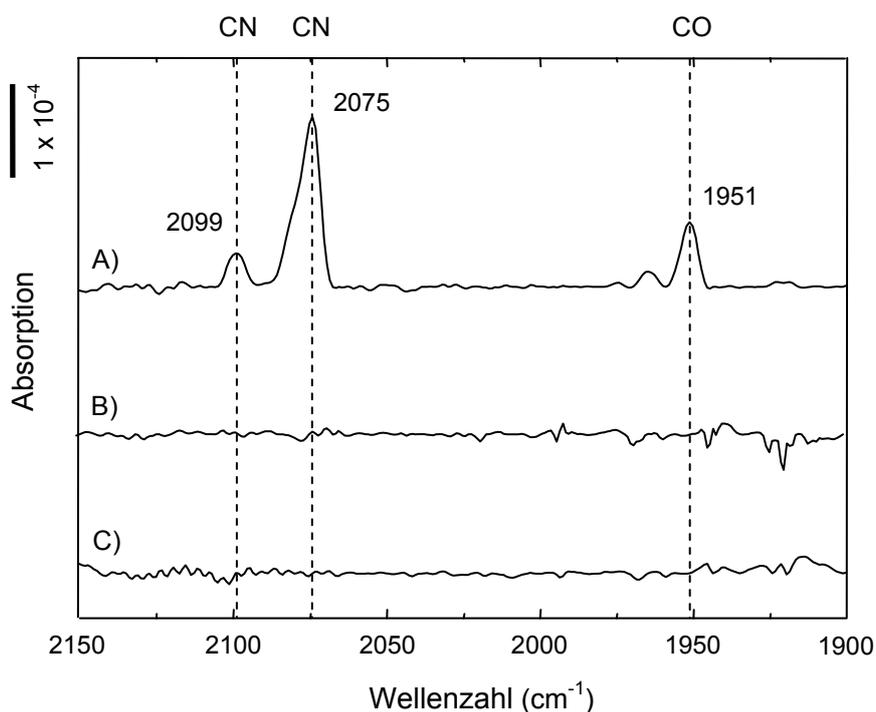
**Abbildung 3-14: FTIR-Spektren des HypCD-Komplexes aus *E. coli*.** A) HypCD-Komplex ko-exprimiert mit den akzessorischen Genen *hypE* und *hypF*, isoliert aus BL21(DE3). Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 300  $\mu\text{M}$ . B) HypCD-Komplex ohne die begleitende Überexpression von *hypEF*; isoliert aus BL21(DE3). Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 242  $\mu\text{M}$ . Alle Spektren wurden einer Basislinienkorrektur unterzogen.

Wie in Abbildung 3-14 A zu erkennen ist zeichnen sich im Spektrum des muren *E.c.*HypCD-Komplexes drei Absorptionsmaxima ab. Die Maxima bei 2099  $\text{cm}^{-1}$  und 2075  $\text{cm}^{-1}$  repräsentieren die CN-Liganden. Diese Wellenzahlen sind in guter Übereinstimmung zu den CN-Streckschwingungen aus *Ralstonia eutropha*. In der CO-Bande findet sich ein Absorptionsmaximum bei 1951  $\text{cm}^{-1}$ . Damit unterscheidet es sich signifikant von der Position

des Carbonylliganden im HypCD-Komplex aus *R. eutropha*. Worauf genau diese Veränderung beruht ist unklar. Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass das Proteinumfeld einen gewissen Einfluss die Position der Liganden hat und das insbesondere der Carbonylligand sensibel auf geringste Veränderungen der Elektronendichte am Eisen reagiert. Mit Hilfe dieser Experimente konnte jedoch zweifelsfrei belegt werden, dass auch der reife *E.c.*HypCD-Komplex bereits alle drei diatomaren Liganden trägt.

Der immature *E.c.*HypCD-Komplex wurde vom Überexpressionsplasmid pT-HypDCStrep transkribiert. Das Plasmid wurde wiederum im „Wildtyp“-Hintergrund exprimiert. Obwohl dieser Stamm noch die endogenen Kopien sämtlicher *hyp*-Gene besaß, enthielt das Spektrum keine Absorptionsmaxima und folglich auch keine Liganden (Abbildung 3-14 B).

Diese Beobachtung könnte ein Indiz dafür sein, dass für eine erfolgreiche Ligandierung eine essentielle Stöchiometrie zwischen HypCD und HypEF gewährleistet sein muss. In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Ko-Expression von *hypEF* und *hypCD* sich positiv auf die Stabilität eines ternären HypCDE-Komplexes und den *in vitro*-Cyanid-Transfer auswirkt (Blokesch, Albracht *et al.* 2004).



**Abbildung 3-15: FTIR-Spektren des HypCD-Komplexes aus *E. coli*-Mutanten.** A) HypCD-Komplex koexprimiert mit dem akzessorischen Gen *hypE*, isoliert aus BL21(DE3). Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 290  $\mu$ M. B) HypCD-Komplex koexprimiert mit dem akzessorischen Gen *hypE*, isoliert aus MC4100(DE3)  $\Delta$ *carAB*  $\Delta$ *hypF*. Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 1,93 mM. C) HypCD-Komplex koexprimiert mit dem akzessorischen Gen *hypE*, isoliert aus MC4100 (DE3)  $\Delta$ *carAB*. Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 2,38 mM. Alle Spektren wurden einer Basislinienkorrektur unterzogen.

Insbesondere für HypE wird in der Literatur eine Funktion beim Transfer des Carbonylliganden auf den HypCD-Komplex postuliert (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Blokesch, Albracht *et al.* 2004; Watanabe, Matsumi *et al.* 2007).

Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob die Koexpression von *hypCD* und *hypE* alleine bereits hinreichend ist, um die vollständige bzw. teilweise Ligandierung des Eisens im

HypCD-Komplex zu bewirken. Dazu wurden zunächst die Gene *hypCD* gemeinsam mit *hypE* vom Plasmid pT-HypDECStrep in verschiedenen Hintergründen überexprimiert und mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Das FTIR-Spektrum des entsprechenden HypCD-Komplexes, isoliert aus einem Wildtyp-Stamm, zeigte dasselbe Muster wie der reife HypCD-Komplex in Abbildung 3-14 A (Abbildung 3-15 A). Somit kann festgehalten werden, dass für eine effiziente Ligandierung des katalytischen Eisens im HypCD-Komplex zumindest HypE ebenfalls überexprimiert werden muss. Im Gegensatz dazu waren die substöchiometrischen Mengen von HypF, die von der endogenen Kopie des Wirtsstammes exprimiert werden, bereits hinreichend um eine vollständige Ligandierung zu gewährleisten.

FTIR-Spektren von HypCD-Komplexen, die aus  $\Delta hypF/\Delta carAB$ - und  $\Delta carAB$ -Mutanten isoliert wurden, wiesen keinerlei Absorptionsmaxima auf (Abbildung 3-15 B und C). Da bereits hinlänglich bewiesen werden konnte, dass die Synthese des Carbonylliganden nicht von Carbamoylphosphat abhängig ist (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007), zeigte insbesondere das letztgenannte Spektrum (Abbildung 3-15 C), bei dem durch die Deletion der Carbamoylphosphat-Synthetase (*carAB*) lediglich kein Carbamoylphosphat mehr produziert werden kann, dass eine funktionierende Synthese des CN-Liganden auch für die erfolgreiche Ligandierung mit dem Carbonylliganden gegeben sein muss. Allerdings konnte anhand dieser Daten noch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass HypE keine Funktion innerhalb des Transfers der Carbonylliganden übernimmt.

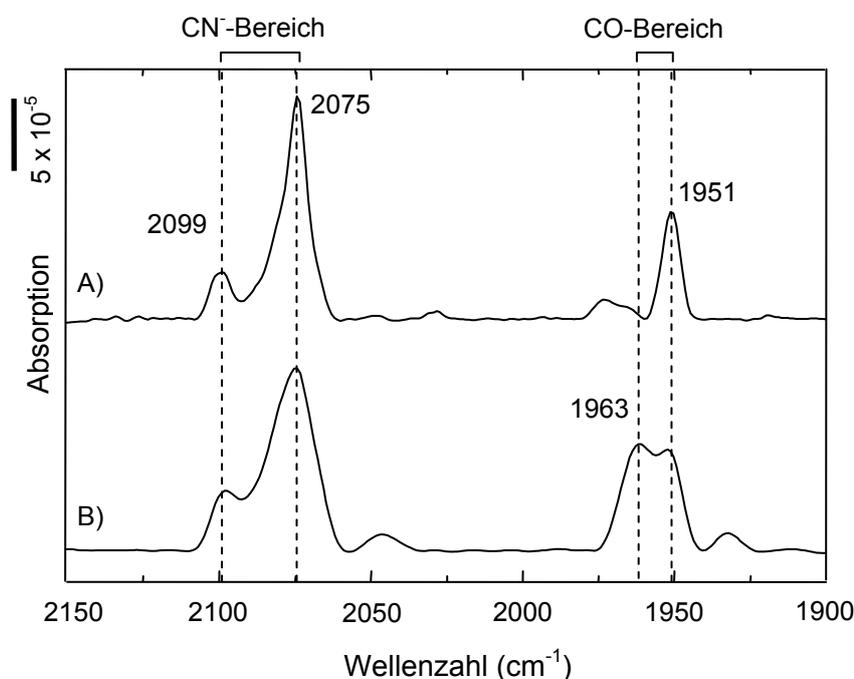
Der Vergleich zwischen *E. coli* und *R. eutropha* zeigte jedoch eindeutig, dass die Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen in diesen beiden, nicht miteinander verwandten, Spezies auch in diesem wichtigen Schritt vergleichbar ist. Bereits im HypCD-Komplex ist ein vollständiger Satz diatomarer Liganden vorhanden.

### **3.2.8 Reduzierende Bedingungen beeinflussen die Streckfrequenz der Liganden im HypCD-Komplex.**

Anders als die maturen [NiFe]-Hydrogenasen zeigte die  $Fe(R)_2(CN)_2CO$ -Gruppe, gebunden an HoxV, keinerlei Veränderungen der Absorptionsmaxima der diatomaren Liganden. HoxV, ein Homolog der großen Untereinheit der MBH, dient als Intermediat beim MBH-spezifischen Transfer der prosthetischen Gruppe von HypC auf das MBH-spezifische HypC-Homolog, HoxL. Ähnlich wie im HypCD-Komplex konnten in HoxV weder Ni noch verbrückenden Cysteine nachgewiesen werden (Ludwig, Schubert *et al.* 2009).

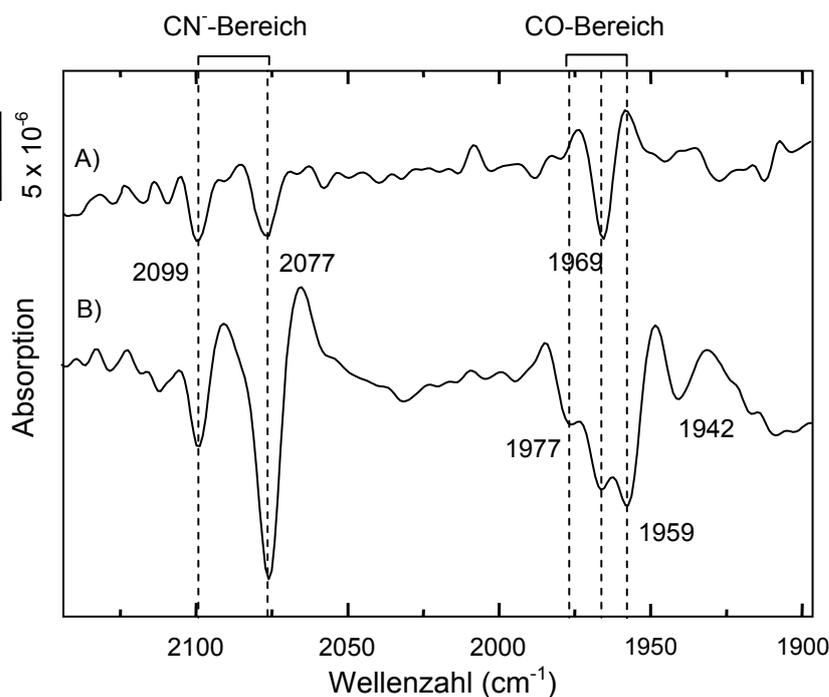
Vorangegangene UV-Vis-Studien an gereinigtem HypD aus *E. coli* ergaben Indizien dafür, dass sich der [4Fe4S]-Cluster durch die Zugabe eines Überschusses an Dithionit reduzieren lässt. Begleitende Untersuchungen mittels EPR-Spektroskopie zeigten, dass der Cluster EPR-inaktiv

ist und sich somit eine entsprechende Reduktion nicht bestätigen ließ. *In vitro*-Untersuchungen zum Transfer von CN<sup>-</sup>-Liganden auf den HypCD-Komplex konnten nachweisen, dass dieser nur in reduziertem Zustand in der Lage ist die Cyanidliganden aufzunehmen. Die Stabilität des Komplexes wurde jedoch durch Disulfidbrücken-bildende Agenzien erhöht bzw. durch reduzierende Agenzien (DTT) destabilisiert (Blokesch, Albracht *et al.* 2004).



**Abbildung 3-16: FTIR-Spektren eines reduzierten HypCD-Komplexes aus *E. coli*.** A) HypCD-Komplex koexprimiert mit den akzessorischen Genen *hypE* und *hypF*, isoliert aus BL21(DE3). Die Reinigung fand standardmäßig in Gegenwart von 0,1 mM DTT statt. Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 300  $\mu$ M. B) HypCD-Komplex koexprimiert mit den akzessorischen Genen *hypE* und *hypF*, isoliert aus BL21 (DE3). Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 353  $\mu$ M. Reinigung unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 1 mM DTT. Alle Spektren wurden einer Basislinienkorrektur unterzogen.

Auf Grundlage dieser augenscheinlich widersprüchlichen Befunde sollte deshalb nachfolgend untersucht werden, ob sich die Liganden in einem muren HypCD-Komplex durch die Zugabe von milden Reduktionsmitteln, hinsichtlich ihrer Absorptionsmaxima, modifizieren lassen. Der HypCD-Komplex aus *Escherichia coli* wurde standardmäßig in Gegenwart von 0,1 mM DTT gereinigt (vergleiche Kapitel 2.3.3; sowie Blokesch, Albracht *et al.* 2004). Ein entsprechendes Spektrum (Abbildung 3-16 A) zeigte die drei bereits erwähnten Maxima bei 2099  $\text{cm}^{-1}$ , 2075  $\text{cm}^{-1}$  und 1951  $\text{cm}^{-1}$ . Das Spektrum eines, mit 1 mM DTT im Reinigungspuffer, gereinigten muren HypCD-Komplexes (Abbildung 3-16 B) zeigte hingegen vier Absorptionsmaxima. Die beiden Cyanidliganden blieben dabei unverändert. Im CO-Bereich hingegen kam es zu einem Signal-, „Splitting“. Neben dem bereits beobachteten Maximum bei 1951  $\text{cm}^{-1}$  konnte ein weiteres Maximum bei 1963  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet werden (Abbildung 3-16 B).



**Abbildung 3-17: FTIR-Spektren eines reduzierten HypCD-Komplexes aus *Ralstonia eutropha*.** Beide FTIR-Spektren zeigen die Ligandenausstattung maturaer HypCD-Komplexe, die in Gegenwart aller *hyp* Gene exprimiert wurden (pIB12 in HF962 (HF210  $\Delta P_{acoX}$ )). A) Der HypCD-Komplex wurde in Gegenwart von 0,1 mM DTT gereinigt, was dem Standardprotokoll entspricht. Das Spektrum wurde bei einer Proteinkonzentration von 353  $\mu$ M aufgenommen. B) Der HypCD-Komplex wurde unter reduzierenden Bedingungen, 1 mM DTT im Reinigungspuffer, gereinigt. Gemessen wurde bei einer Proteinkonzentration von 1,31 mM. Spektren werden als zweite Ableitung dargestellt.

Auch der mature *R.e.*HypCD-Komplex zeigte ein vergleichbares Verhalten unter reduzierenden Bedingungen. Während beide Cyanidliganden, sowohl in Gegenwart von 0,1 mM als auch 1 mM DTT, unverändert bei 2099  $\text{cm}^{-1}$  bzw. 2077  $\text{cm}^{-1}$  blieben, traten auch hier im Bereich der CO-Bande neue Maxima auf. Neben dem *Peak* bei 1969  $\text{cm}^{-1}$ , wie er auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen zu finden ist (Abbildung 3-17 A), waren unter reduzierenden Bedingungen auch deutliche Absorptionsmaxima bei 1977  $\text{cm}^{-1}$  und 1959  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen. Darüber hinaus war ein weit weniger ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 1942  $\text{cm}^{-1}$  zu sehen. Dieses war jedoch nur unwesentlich größer als das Signalrauschen des Hintergrunds (Abbildung 3-17 B). In diesem Punkt unterscheiden sich die HypCD-Komplexe der beiden untersuchten Spezies, kommt es in *E. coli* doch lediglich zu einer Aufspaltung in zwei Banden.

### 3.3 Charakterisierung des Vorläufers des Carbonylliganden im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen aus *R. eutropha*

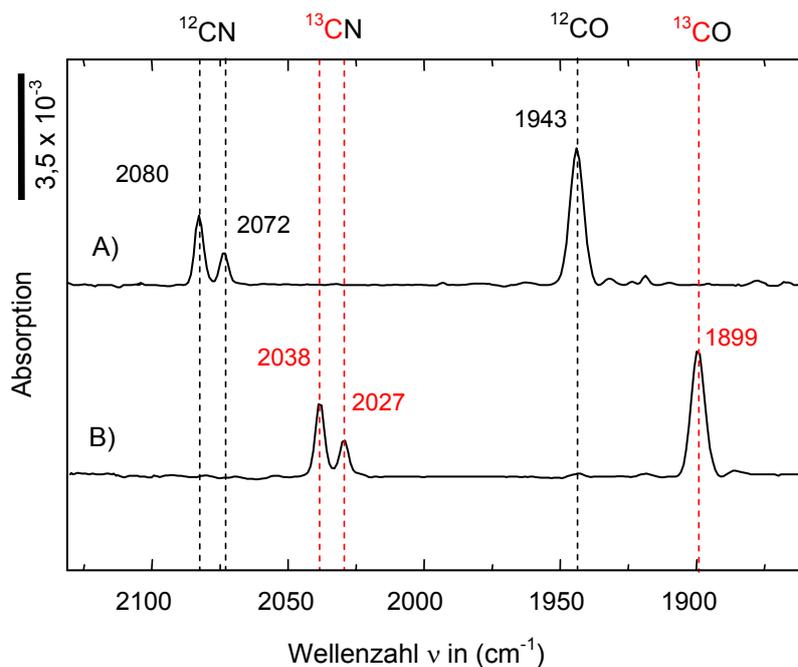
Der beobachtete Einbau von extern zugegebenem, gasförmigem  $^{13}\text{CO}$  als Carbonylligand (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007) lässt die Möglichkeit zu, dass es sich bei dem gesuchten Vorläufer des Carbonylliganden um atmosphärisches Kohlenstoffmonoxid handeln könnte. Diese Möglichkeit sollte im Folgenden eingehend untersucht werden.

### 3.3.1 Der Carbonylligand im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen stammt aus dem Metabolismus

Als erster Schritt bei der Identifikation möglicher Vorstufen des Carbonylliganden muss daher zunächst untersucht werden, ob der Carbonylligand das Produkt des Metabolismus ist oder atmosphärisches CO akkumuliert wird und direkt als Vorstufe des Carbonylliganden fungiert. Dazu sollte untersucht werden wie sich die einzelnen diatomaren Liganden verhalten, wenn die Expressionsstämme auf vollständig mit  $^{13}\text{C}$ -Isotopen markierten Derivaten von Fruktose und Glycerol angezogen wurden. Während der Anzucht zeigte sich das klassische, zweiphasige Wachstum von *Ralstonia eutropha* in FGN-Medium (vergleiche Kapitel 2.2.1). Während in der ersten Phase bevorzugt Fruktose verstoffwechselt wird, wird in der zweiten Phase das verbleibende Glycerol umgesetzt. Die Induktion der Hydrogenaseexpression beginnt dabei erst nach dem Wechsel auf Glycerol als Kohlenstoffquelle (Friedrich, Heine *et al.* 1981; Friedrich 1981; Friedrich 1982).

Als Modellsystem für alle nachfolgenden Markierungsexperimente wurde auf ein etabliertes System zur Expression eines RH-Derivates (pGE567, nachfolgend auch pRH) zurückgegriffen (Buhrke, Lenz *et al.* 2005). Bei dieser RH-Variante wurde die C-terminale Extension, die zur Interaktion mit der zugehörigen Histidin-Protein-Kinase (HoxJ) notwendig ist, durch einen *StrepTagII*<sup>®</sup> ersetzt (RH<sub>StopStrep</sub>). Dieses Derivat zeigt zwar noch immer Hydrogenaseaktivität, ist jedoch nicht mehr in der Lage die Expression der Hydrogenasegene zu steuern (Buhrke, Löscher *et al.* 2005). Exprimiert wurde die RH<sub>StopStrep</sub> in *R. eutropha* HF574 (H16  $\Delta$ hoxBCGH), einem Wildtyp-Derivat bei dem die großen Untereinheiten aller Hydrogenasen, sowie die kleine Untereinheit der RH deletiert wurden (Buhrke, Brecht *et al.* 2002). Der resultierende Expressionsstamm wurde, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, heterotroph in FGN-Medium (Kapitel 2.2.1) angezogen. Nach Zellernte (Kapitel 2.3.1) und Reinigung über Affinitätschromatographie (Kapitel 2.3.3) wurden die isolierten Proteine, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, mittels FTIR-Spektroskopie analysiert.

Abbildung 3-18 A zeigt das typische Spektrum einer unmarkierten, oxidierten RH, wie es zuvor bereits beschrieben wurde (Pierik, Schmelz *et al.* 1998; Bernhard, Buhrke *et al.* 2001). Die beobachteten Absorptionsmaxima korrespondieren mit den Streckschwingungen zweier  $^{12}\text{CN}^-$ -Liganden ( $\nu_{\text{CN}} = 2080/2072$ ) und eines  $^{12}\text{CO}$ -Liganden ( $\nu_{\text{CO}} = 1943$ ). Im Gegensatz dazu zeigte das Spektrum der vollständig markierten RH, dass sämtliche *Peaks* um die charakteristischen 42 - 45 Wellenzahlen verschoben sind. Diese Verschiebung ist das Ergebnis des Einbaus der schwereren  $^{13}\text{C}$ -Isotope in die diatomaren Liganden (Abbildung 3-18 B;  $\nu_{\text{CN}} = 2037/2027$ ,  $\nu_{\text{CO}} = 1899$ ).



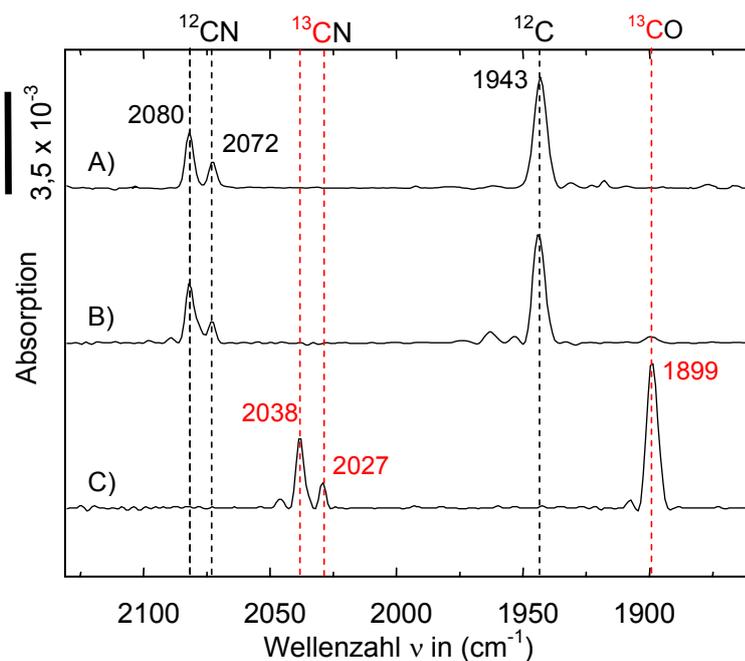
**Abbildung 3-18: FTIR-Spektren der regulatorischen [NiFe]-Hydrogenase (RH) aus heterotrophen Zellen aus uniform  $^{13}\text{C}$ -markierten Medien.** Die Zellen wurden heterotroph, in Minimalmedium mit Fruktose und Glycerol (FGN-Medium) als Energie- und Kohlenstoffquelle, angezogen. A) Zellen gezogen auf unmarkierten Substraten mit  $^{12}\text{C}_6$ -Fruktose und  $^{12}\text{C}_3$ -Glycerol. B) Zellen gezogen auf uniform markierten Substraten mit  $^{13}\text{C}_6$ -Fruktose und  $^{13}\text{C}_3$ -Glycerol. Die gestrichelten Linien markieren die Streckschwingungen der diatomaren Liganden; schwarze Linien zeigen  $^{12}\text{C}$ -Isotope in den diatomaren Liganden an ( $\nu_{\text{CN}} = 2080/2072$  und  $\nu_{\text{CO}} = 1943$ ), rote Linien zeigen  $^{13}\text{C}$ -markierte Liganden ( $\nu_{\text{CN}} = 2038/2027$  und  $\nu_{\text{CO}} = 1899$ ) an.

Neben der zu erwartenden Verschiebung der beiden  $\text{CN}^-$ -Liganden war auch eine quantitative Markierung des Carbonylliganden zu beobachten. Die Markierung des CO-Liganden zeigt, dass dieser durch eine oder mehrere Reaktionen des zellulären Metabolismus bereitgestellt wird und dass atmosphärisches Gas als Substrat in die Biosynthese des CO-Liganden unter diesen Bedingungen keine Rolle spielt.

### 3.3.2 Die Carbonylliganden werden unter heterotrophen Bedingungen exklusiv aus den Kohlenstoffatomen des Glycerols synthetisiert.

Als Weiterentwicklung der vorangegangenen Untersuchungen, welche aufzeigen konnten, dass der Carbonylligand und dessen Vorstufen aus dem Metabolismus des Wirtsorganismus stammen, sollte jetzt überprüft werden, ob sich die Herkunft auf ein bestimmtes Substrat (Fruktose oder Glycerol) eingrenzen lässt. Daher wurden im folgenden experimentellen Setup entweder uniform markierte  $^{13}\text{C}_6$ -Fruktose zusammen mit unmarkiertem Glycerol (Abbildung 3-19 B) oder unmarkierte Fruktose mit uniform markiertem  $^{13}\text{C}_3$ -Glycerol verwendet (Abbildung 3-19 C).

Im Vergleich zu einem Kontrollspektrum einer unmarkierten RH (Abbildung 3-19 A) zeigte das FTIR-Spektrum der RH, welche aus heterotrophen Kulturen mit  $^{13}\text{C}_6$ -Fruktose/ $^{12}\text{C}_3$ -Glycerol gereinigt wurde, keine Veränderung der Absorptionsmaxima der diatomaren Liganden (Abbildung 3-19 B). Eine Verschiebung der diatomaren Liganden war ausschließlich bei Verwendung von  $^{13}\text{C}_3$ -Glycerol zu beobachten (Abbildung 3-19 C).



**Abbildung 3-19: FTIR-Spektren der RH aus heterotroph gewachsenen Zellen, die auf wechselnd uniform markierten Substraten kultiviert wurden.** Die Zellen wurden heterotroph, in Minimalmedium mit Fruktose und Glycerol (FGN-Medium) als Energie- und Kohlenstoffquelle angezogen. A) Zellen gezogen auf unmarkierten Substraten mit  $^{12}\text{C}_6$ -Fruktose und  $^{12}\text{C}_3$ -Glycerol. B) Zellen gezogen auf uniform Isotopen-markierter  $^{13}\text{C}_6$ -Fruktose und unmarkiertem  $^{12}\text{C}_3$ -Glycerol. C) Zellen gezogen auf unmarkierter  $^{12}\text{C}_6$ -Fruktose und uniform Isotopen-markiertem  $^{13}\text{C}_3$ -Glycerol. Die gestrichelten Linien markieren die Maxima der diatomaren Liganden; schwarze Linien zeigen  $^{12}\text{C}$ -Isotope in den diatomaren Liganden an ( $\nu_{\text{CN}} = 2080/2072$  und  $\nu_{\text{CO}} = 1943$ ), rote Linien zeigen  $^{13}\text{C}$ -markierte Liganden ( $\nu_{\text{CN}} = 2038/2027$  und  $\nu_{\text{CO}} = 1899$ ) an.

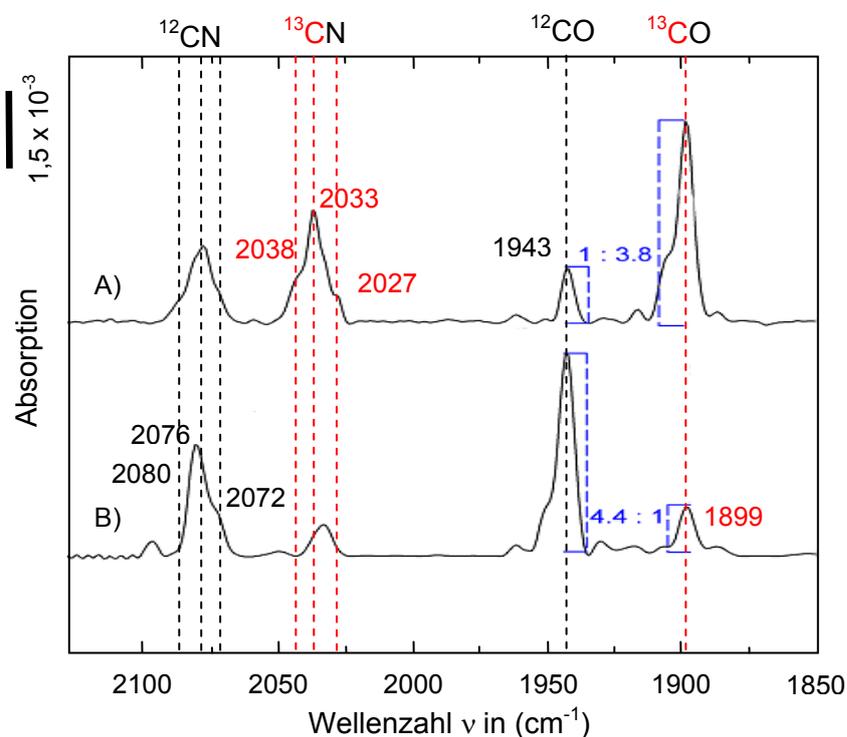
In diesem Spektrum waren sowohl der Carbonylligand als auch die Cyanidliganden verschoben. Die Synthese des Carbonylliganden beginnt folglich erst nach dem Wechsel auf Glycerol als Kohlenstoffquelle, also mit Beginn der Derepression der Hydrogenaseexpression. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Liganden aus Speicherstoffen synthetisiert werden, die während der Fruktosephase gebildet wurden.

Da Glycerol ein Rückgrat aus drei Kohlenstoffatomen besitzt, kann durch differentiell markierte Glycerolderivate festgestellt werden, welche Kohlenstoffatome bei der Biosynthese des Carbonylliganden von Bedeutung sind. Da die beiden terminalen Kohlenstoffatome stereochemisch identisch sind, ist es ausreichend mit zwei unterschiedlichen Derivaten, 1,3- $^{13}\text{C}_2$ -Glycerol und 2- $^{13}\text{C}$ -Glycerol, zu arbeiten. Für den Fall, dass exklusiv nur einer der beiden Arten der Kohlenstoffatome (zentral oder terminal) involviert ist, wäre die Möglichkeit gegeben diesem *Tracer* weiter zum unmittelbaren Vorläufer des CO-Liganden zu folgen.

In der folgenden Serie von Experimenten wurde RH-Protein aus heterotroph kultivierten Zellen gereinigt, die neben unmarkierter Fruktose entweder mit 1,3- $^{13}\text{C}_2$ -Glycerol (Abbildung 3-20 A) oder 2- $^{13}\text{C}$ -Glycerol (Abbildung 3-20 B) angezogen wurden.

Im Bereich der Cyanidliganden waren insgesamt sechs Maxima zu sehen, die aufgrund von Überlappungen der Absorptionsbanden teilweise nur als Schultern sichtbar waren. Die Hauptmaxima lagen dabei etwa mittig zwischen den bekannten Maxima für  $\nu(^{12}\text{CN}^-)$  bei  $2080\text{ cm}^{-1}$  und  $2072\text{ cm}^{-1}$ , bzw. für  $\nu(^{13}\text{CN}^-)$  bei  $2038\text{ cm}^{-1}$  und  $2027\text{ cm}^{-1}$ . Diese entstehen, wenn das katalytische Eisen mit  $^{12/12}\text{CN}^-$  bzw.  $^{13/13}\text{CN}^-$  ligandiert ist. Diese dominierenden Maxima

entstehen dagegen durch die Kopplung der beiden Cyanidliganden, wenn das Eisen im aktiven Zentrum mit  $^{12/13}\text{CN}^-$  besetzt ist.



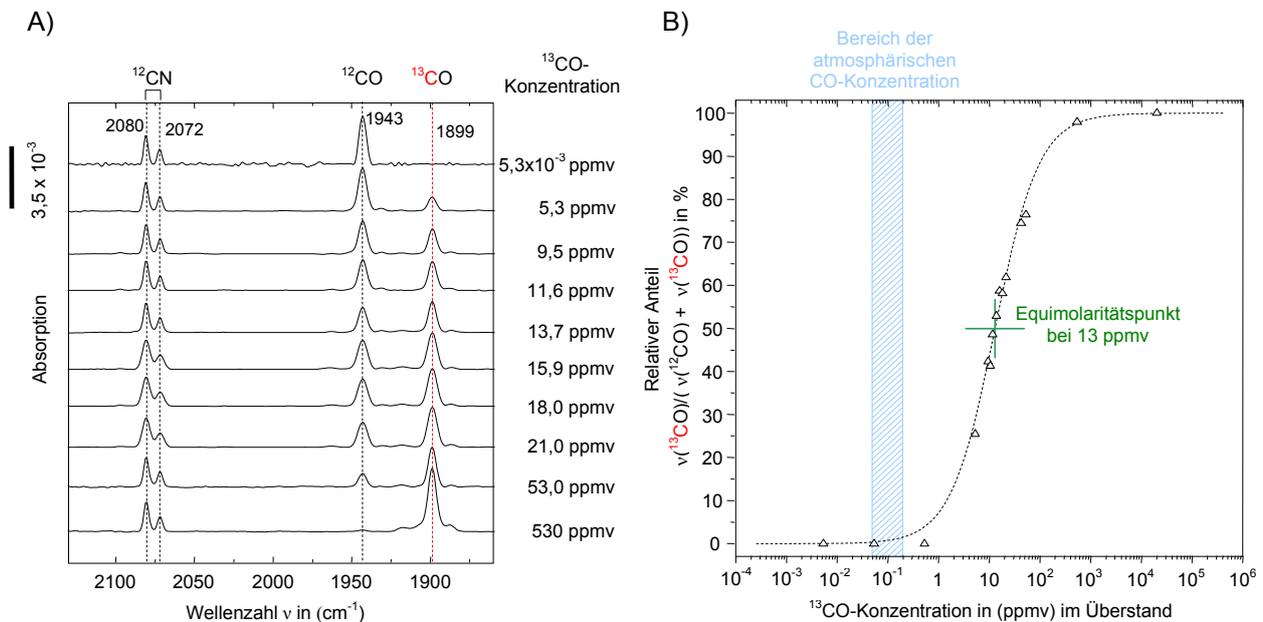
**Abbildung 3-20: FTIR-Spektren der RH aus heterotroph gewachsenen Zellen mit differenziell markiertem Glycerol.** Die Zellen wurden heterotroph, in Minimalmedium mit Fruktose und Glycerol (FGN-Medium) als Energie- und Kohlenstoffquelle, angezogen. A) Zellen gezogen auf  $^{12}\text{C}_6$ -Fruktose und  $1,3\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glycerol. B) Zellen gezogen auf  $^{12}\text{C}_6$ -Fruktose und  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Glycerol. Die gestrichelten Linien stellen die Streckschwingungen der diatomaren Liganden dar; schwarze Linien zeigen  $^{12}\text{C}$ -Isotope in den diatomaren Liganden an ( $\nu_{\text{CN}} = 2080/2076/2072$  und  $\nu_{\text{CO}} = 1943$ ), rote Linien zeigen  $^{13}\text{C}$ -markierte Liganden ( $\nu_{\text{CN}} = 2038/2033/2027$  und  $\nu_{\text{CO}} = 1899$ ) an.

Die FTIR-Spektren zeigten aber auch, dass die Carbonylliganden eine Mischpopulation aus  $^{12}\text{CO}$ - ( $1943\text{ cm}^{-1}$ ) bzw.  $^{13}\text{CO}$ -Liganden ( $1899\text{ cm}^{-1}$ ) sind. Der Mittelwert der Experimente zeigte ein Verhältnis von  $4,1 (\pm 0,3) : 1$  (terminale : zentrale Kohlenstoffatome). Da die terminalen Kohlenstoffatome im Glycerol nur mit einem Verhältnis von  $2 : 1$  überwiegen, werden diese offensichtlich bei der Biosynthese des Carbonylliganden leicht bevorzugt eingebaut. Dieses Ergebnis muss als Indiz dafür gewertet werden, dass mehrere Synthesewege zur Biosynthese des Carbonylliganden beitragen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen allerdings keine Rückschlüsse auf konkrete Produkte des Glycerol-Katabolismus zu, die für weitere SI-Markierungsexperimente herangezogen werden könnten (siehe auch Kapitel 4.3). Einen weiteren Anhaltspunkt zur Evaluierung der metabolischen Vorstufe des CO-Liganden sollte daher deren Quantifizierung liefern.

### 3.3.3 Quantifizierung der biologischen Vorstufe des CO-Liganden unter heterotrophen Bedingungen.

Ogleich die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, dass atmosphärisches CO als Vorstufe des Carbonylliganden im aktiven Zentrum von  $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen ausscheidet, zeigte ein Markierungsexperiment in *R. eutropha* mit  $530\text{ ppmv }^{13}\text{CO}$ , dass der Carbonylligand im FTIR-Spektrum spezifisch und quantitativ als markierter  $^{13}\text{CO}$ -Ligand vorlag (Abbildung

3-21). Diese Beobachtung ist im Ergebnis konsistent mit entsprechenden Untersuchungen in *E. coli*-Wirten (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007). Dass gasförmiges CO aus der Atmosphäre keine Bedeutung für die Synthese hat und dennoch extern appliziertes, gasförmiges CO als Carbonylligand eingebaut werden kann, eröffnet die Möglichkeit, dass intrinsisch produziertes, gasförmiges CO eine direkte Vorstufe des CO-Liganden darstellt.



**Abbildung 3-21:**  $^{13}\text{CO}$ -Titration zur Quantifizierung des intrinsischen Vorläufers des CO-Liganden. A) FTIR-spektroskopische Analyse von  $^{13}\text{CO}$ -markierter RH. Die RH wurde aus heterotrophen Zellen (auf FGN-Medium) gereinigt, die in einer Atmosphäre aus 70 %  $\text{N}_2$  und 30 %  $\text{O}_2$  und in Gegenwart steigender Mengen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenmonoxids angezogen wurden. Alle Spektren wurden auf die Höhe der  $\text{CN}^-$ -Banden normiert. B) Nicht-lineare Regression der Messwerte. Relativer Anteil der Absorption des  $\nu(^{13}\text{CO})$  in Bezug zur Gesamtabsorption der  $\nu(^{12/13}\text{CO})$  ( $y$ ) als Funktion der  $^{13}\text{CO}$ -Konzentration ( $x$ ) im Überstand der Kulturen. Der Äquimolaritätspunkt wurde als  $x_0 = (A_f - A_i)/2$  mittels nicht-linearen Regression über die sigmoide Funktionsgleichung (4) bei 13 ppmv ermittelt. Der schraffierte blaue Bereich gibt die Schwankungsbreite der CO-Konzentration in der Erdatmosphäre an.

Zur Quantifizierung des Metaboliten (bzw. der Metaboliten) sollte in einem kompetitiven CO-Titrationsexperiment, mit ansteigenden Mengen  $^{13}\text{CO}$  im Überstand, der Äquimolaritätspunkt ermittelt werden. Das ist der Punkt bei dem die intrinsisch produzierte Vorstufe des CO-Liganden und das extern zugegebene  $^{13}\text{CO}$  in gleichen Mengen als CO-Liganden im aktiven Zentrum der RH vorliegen. Dieser Äquimolaritätspunkt gibt letztendlich Aufschluss über die Größenordnung der CO-Vorläufer in den Wirtszellen.

Zur Ermittlung des Äquimolaritätspunktes wurde der bereits eingeführte Expressionsstamm (HF574/pRH) in unmarkiertem FGN-Medium und unter einer künstlichen Atmosphäre von 30 %  $\text{O}_2$  und 70 %  $\text{N}_2$  sowie variierenden Mengen  $^{13}\text{CO}$ 's kultiviert. Im Anschluss wurden die Werte der Einzelmessungen, dargestellt als relativer Anteil des  $^{13}\text{CO}$  an der  $^{12/13}\text{CO}$ -

Gesamtpopulation, einer nicht-linearen Regression unterzogen. Dazu wurde folgende sigmoidale Funktion verwendet,

$$(4) \quad y(x) = \frac{A_i - A_f}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^\rho} + A_f,$$

mit  $A_i = 0$  (initialer  $y$ -Wert für  $x = 0$ ),  $A_f = 100$  (finaler  $y$ -Wert für  $\lim_{x \rightarrow \infty} y$ ),  $x_0 = 13,0186$  und  $\rho = 1,0135$ . Dabei entspricht  $x_0 = (A_f - A_i) / 2$  dem Punkt mit gleicher Absorption von  $v(^{12}\text{CO})$  bzw.  $v(^{13}\text{CO})$  und folglich dem Äquimolaritätspunkt. Der Äquimolaritätspunkt lag bei einer CO-Konzentration von 13 ppmv (Abbildung 3-21 B). Damit liegt die Konzentration in etwa beim 130-Fachen der atmosphärischen CO-Konzentration. Diese schwankt global von 50 bis 200 ppbv (Abbildung 3-21 B, blauer Bereich; Conrad 1996).

Nach Ermittlung des CO-Partialdrucks, aus einem Volumenanteil von  $13 \cdot 10^{-4} \%$ , ergibt sich gemäß *Dalton's* Gesetz, mit gegebenem Partialdruck ( $p_{\text{gas}}$ ) aus *Henry's* Gesetz,

$$(5) \quad k_{H,cp} = \frac{c_{aq}}{p_{\text{gas}}},$$

und der stoffspezifischen Henry-Konstante für CO  $k_{H,cp} = 9,5 \cdot 10^{-4} \left[ \frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{atm}} \right]$  bei 298 K, die Konzentration ( $c_{aq}$ ) des in wässriger Lösung gelösten Kohlenstoffmonoxids. Da die *Henry*-Konstante faktisch jedoch keine Konstante ist, sondern eine starke Temperaturabhängigkeit besitzt und das Experiment unter konstant 30 °C (323 K) durchgeführt wurde, muss diese zunächst mittels der *van't Hoff*-Gleichung,

$$(6) \quad kH(T) = kH(T^\ominus) \exp \left[ C \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T^\ominus} \right) \right],$$

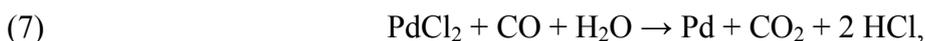
wobei  $T^\ominus$  die Standardtemperatur (298 K),  $T$  die tatsächliche Temperatur während des Versuchs (323 K) und  $C$  eine CO spezifische Stoffkonstante (1300 K) ist, angepasst werden. Demnach ergibt sich bei einem Volumenanteil von 13 ppmv CO am Äquimolaritätspunkt eine Stoffkonzentration von 10,5 nmol/l gelösten Kohlenstoffmonoxids. Daraus folgt, dass die Vorstufen des Carbonylliganden in einer Konzentration im nanomolaren Bereich vorliegen müssen.

### 3.3.4 Entwicklung eines Systems zur spezifischen Eliminierung von gasförmigem Kohlenmonoxid

Auf Grundlage der vorangegangenen Experimente kann mit Sicherheit gesagt werden, dass der Carbonylligand aus dem Wirtsmetabolismus hervorgeht (Kapitel 3.3.1). Die Ergebnisse aus

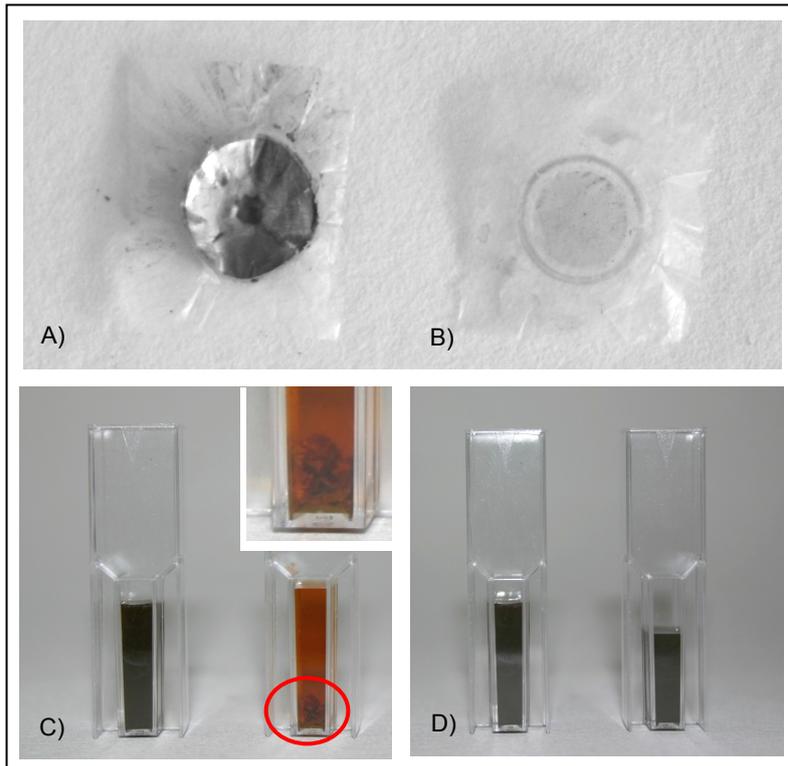
Kapitel 3.3.2 lassen darüber hinaus vermuten, dass es mehrere Synthesewege für den CO-Liganden geben muss. Diese könnten, je nachdem unter welchen Anzuchtbedingungen die Hydrogenasen exprimiert werden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen unterschiedlich großen Beitrag zur Gesamtpopulation beitragen. Die Menge dieser metabolische(n) Vorstufe(n) liegt im niedrigen nanomolaren Bereich. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Carbonylliganden-produzierende(n) Reaktion(en) metabolische Nebenreaktionen sind. Diese dienen womöglich einzig dem Zweck die Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen mit den benötigten CO-Liganden zu versorgen.

Die Markierungsexperimente mit gasförmigem  $^{13}\text{C}$  aus Kapitel 3.3.3 haben gezeigt, dass dieses nicht nur von *Ralstonia eutropha*-Zellen aufgenommen werden kann, sondern auch spezifisch als Surrogat für die endogenen „Carbonylliganden“ Verwendung findet. Somit ist die Möglichkeit gegeben, dass es sich bei dem Vorläufer des Carbonylliganden tatsächlich um freigesetztes CO handelt. Um die Natur des metabolischen Vorläufers zu klären, wurde ein daher ein experimenteller Aufbau entwickelt bei dem spezifisch gasförmiges CO entfernt werden sollte. Da, wie in Kapitel 3.3.3 gezeigt, CO als kleines, nach außen hin ungeladenes Molekül problemlos durch die Zellmembran diffundieren kann, befinden sich – in guter Näherung – Cytoplasma und Medium im Äquilibrium. Nach dem Prinzip der Gaswäsche sollte daher das in Lösung befindliche CO durch den spezifischen *Scavenger*  $\text{PdCl}_2$  zu  $\text{CO}_2$  umgesetzt werden und somit Bedingungen geschaffen werden, in denen die Verfügbarkeit von freiem CO limitiert ist. Dieses System,



dient in der Forensik zum spezifischen, hochempfindlichen Nachweis geringster Mengen Kohlenmonoxids in Lösungen (Reimann und Prokop 1980). Das metallische Palladium scheidet sich an den Wandungen der Kapsel und an der Membran ab (Abbildung 3-22 A).

Da jedoch Vorversuche gezeigt hatten, dass bereits geringste Mengen  $\text{PdCl}_2$  toxisch auf *Ralstonia eutropha* wirken, konnte dieses Agens nicht direkt im Medium gelöst werden. Diese Toxizität beruht jedoch nicht auf einer Veränderung des pH-Wertes durch die Synthese der Salzsäure. Selbst große Mengen an umgesetzten  $\text{PdCl}_2$  konnten den pH-Wert nicht verändern (Daten nicht gezeigt).



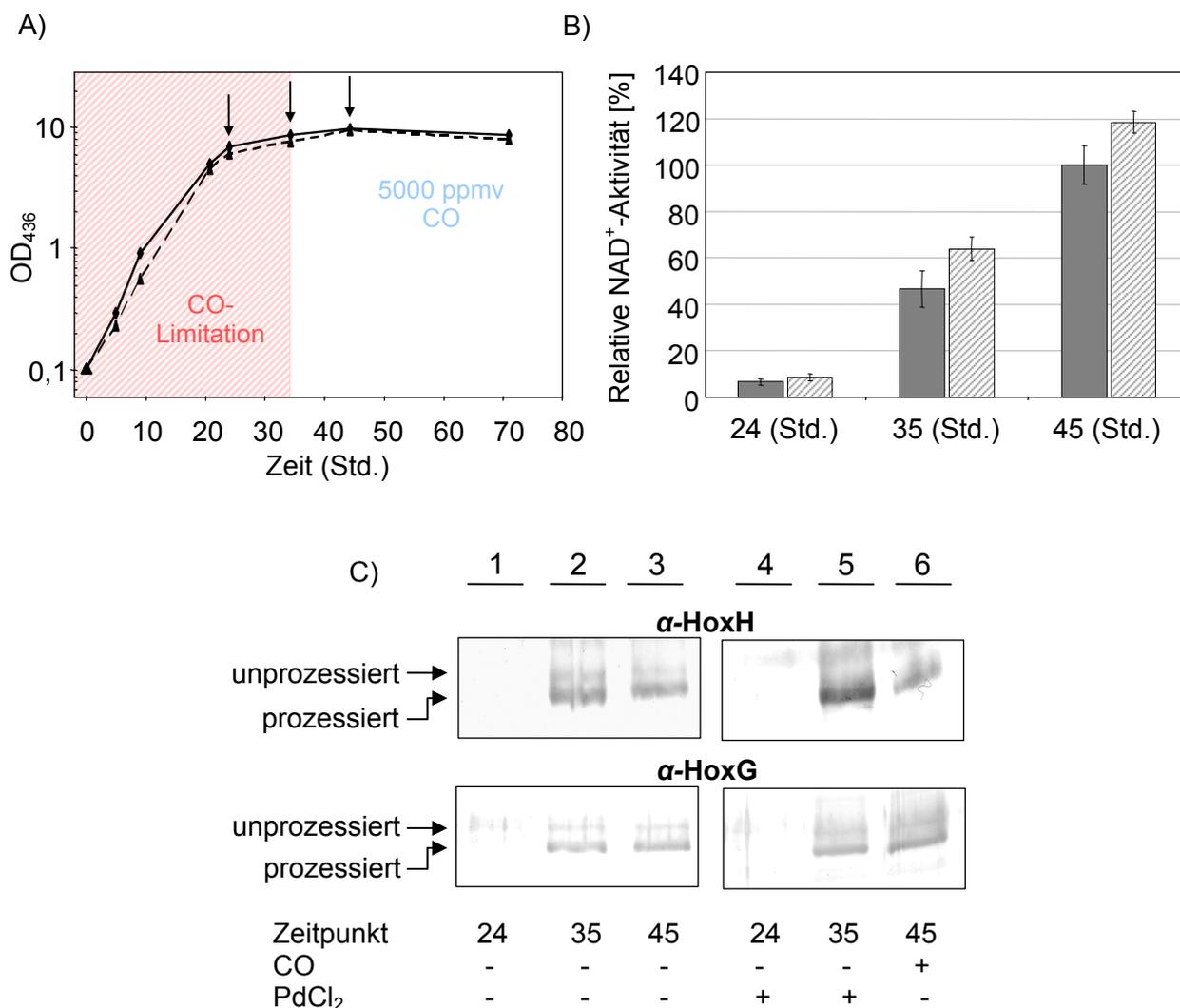
**Abbildung 3-22: Spezifische CO-Gaswäsche mittels Palladium(II)chlorid.** Eine hochkonzentrierte PdCl<sub>2</sub>-Lösung (1 mM PdCl<sub>2</sub> bezogen auf das absolute Kulturvolumen) wurde während der Anzucht in einer Applikationskapsel eingeschlossen und im Kulturmedium versenkt. A) PTFE-Membran nach Anzucht unter lithoautotrophen Bedingungen. Reines metallisches Palladium hat sich an der Membran abgesetzt. B) PTFE-Membran nach Anzucht unter heterotrophen Bedingungen. Metallisches Palladium kann nur in geringsten Spuren nachgewiesen werden. C) PdCl<sub>2</sub> vor (links) und nach (rechts) einem Kultivierungszyklus unter lithoautotrophen Bedingungen. Es ist zu erkennen, dass sich am Boden metallisches Palladium abgesetzt hat (Ausschnitt). D) PdCl<sub>2</sub> vor (links) und nach (rechts) einem Kultivierungszyklus unter heterotrophen Bedingungen. Eine Veränderung der PdCl<sub>2</sub>-Konzentration ist nicht feststellbar.

Aufgrund der Toxizität musste eine Möglichkeit gefunden werden das PdCl<sub>2</sub> räumlich von den lebenden Zellen zu trennen, ohne die Gaswäsche dabei zu beeinträchtigen. Dazu sollte das PdCl<sub>2</sub> in einer Dialysekapsel deponiert werden (siehe Kapitel 3.1), die – mit einer Polytetrafluorethylen-Membran verschlossen – im Medium versenkt werden sollte. Diese Polytetrafluorethylen- (PTFE)- Membran mit einer Dicke von 0,125 µm ist zwar gaspermeabel, Flüssigkeiten und gelöste Substanzen können wegen der stark hydrophoben Eigenschaften des Materials jedoch nicht hindurch diffundieren.

### 3.3.4.1 Effekte der CO-Limitation auf die Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen unter heterotrophen Bedingungen

Zur Durchführung des Experiments wurde *Ralstonia eutropha* H16 heterotroph in FGN-Medium angezogen. Die Schikanekolben mit den Kulturen wurden bei 30 °C und unter einer Atmosphäre mit 85 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> (jeweils in v/v) in Exsikkatoren kultiviert. Zur Einstellung der künstlichen Atmosphäre wurden die Exsikkatoren evakuiert und die Atmosphäre wurde barometrisch eingestellt. Durch die wiederholte Evakuierung kam es bei der einzigen kommerziell erhältlichen Dialysekapsel immer wieder zu Ausblutungen der hochkonzentrierten PdCl<sub>2</sub>-Lösung in das Medium. Als Folge musste eine verbesserte Dialyse- und Applikations-

kapsel entwickelt werden (siehe auch Kapitel 3.1). Diese Kapsel zeigte auch nach vielfacher Verwendung, selbst im Vakuum, noch einhundertprozentige Dichtheit.



**Abbildung 3-23: Effekte der CO-Limitation auf Wachstum und Hydrogenasematuration unter heterotrophen Bedingungen.** A) Wachstum von H16 unter heterotrophen Bedingungen auf Fruktose-Glycerol-Ammonium-(FGN)- Medium mit (durchgezogene Linie) und ohne (gestrichelte Linie) CO-Limitation, gemessen als Absorption bei 436 nm. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Proben entnommen wurden. Die PdCl<sub>2</sub>-Kapseln wurden nach 35 Std. entnommen und 5000 ppmv des Antagonisten CO wurden zugegeben. B) NAD<sup>+</sup>-reduzierende Aktivität der löslichen Hydrogenase in ganzen Zellen. Gemessen wurde bei den in (A) angegebenen Zeitpunkten; jeweils für die Proben (mit CO-Limitation / schraffiert) und die Kontrollgruppe (ohne CO-Limitation / dunkelgrau). Die volle Aktivität (100 %) entspricht dabei  $3,7 \pm 0,4$  U/mg. C) Immunologische Detektion des Maturationsstatus mittels spezifischer Anti-HoxG und Anti-HoxH Antikörpern. Die Proteine wurden mittels eines 12 %-igen (w/v) denaturierenden SDS-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die prämaternen Formen der großen Untereinheit (68,8 kDa bei prä-HoxG und 54,9 kDa bei prä-HoxH) sind dabei geringfügig größer als die maturen Untereinheiten (67,1 kDa bei HoxG und 52,3 kDa bei HoxH).

Im Fortgang des Experiments sollte untersucht werden, ob ein eventueller Effekt der CO-Limitation durch die Zugabe von Kohlenmonoxid komplementiert werden kann. Dazu wurde die PdCl<sub>2</sub>-Kapsel nach einiger Zeit entfernt und 5000 ppmv CO zugegeben.

Das heterotrophe Wachstum von H16 war durch die Zugabe des PdCl<sub>2</sub> nicht beeinflusst (Abbildung 3-23 A). Weder unter CO-Limitation noch nach Zugabe des gasförmigen

Kohlenmonoxids (nach 35 Std.) war eine Abweichung des Wachstumsverhaltens der Probe (gestrichelte Linie) in Bezug zur Kontrolle (durchgezogene Linie) erkennbar. Somit kann überdies die Verlässlichkeit des Applikationssystems belegt werden bzw. mögliche Vergiftungserscheinungen durch austretendes PdCl<sub>2</sub> ausgeschlossen werden.

Als Maß für eine funktionierende Maturation wurde die NAD<sup>+</sup>-reduzierende Aktivität der löslichen Hydrogenase bestimmt. Diese zeigte innerhalb der Fehlergrenzen keine signifikante Abweichung von der Positivkontrolle (Abbildung 3-23 B), wobei die maximale Aktivität (100 %) der Kontrolle nach 45 Stunden bei  $3,7 \pm 0,4$  U/mg lag.

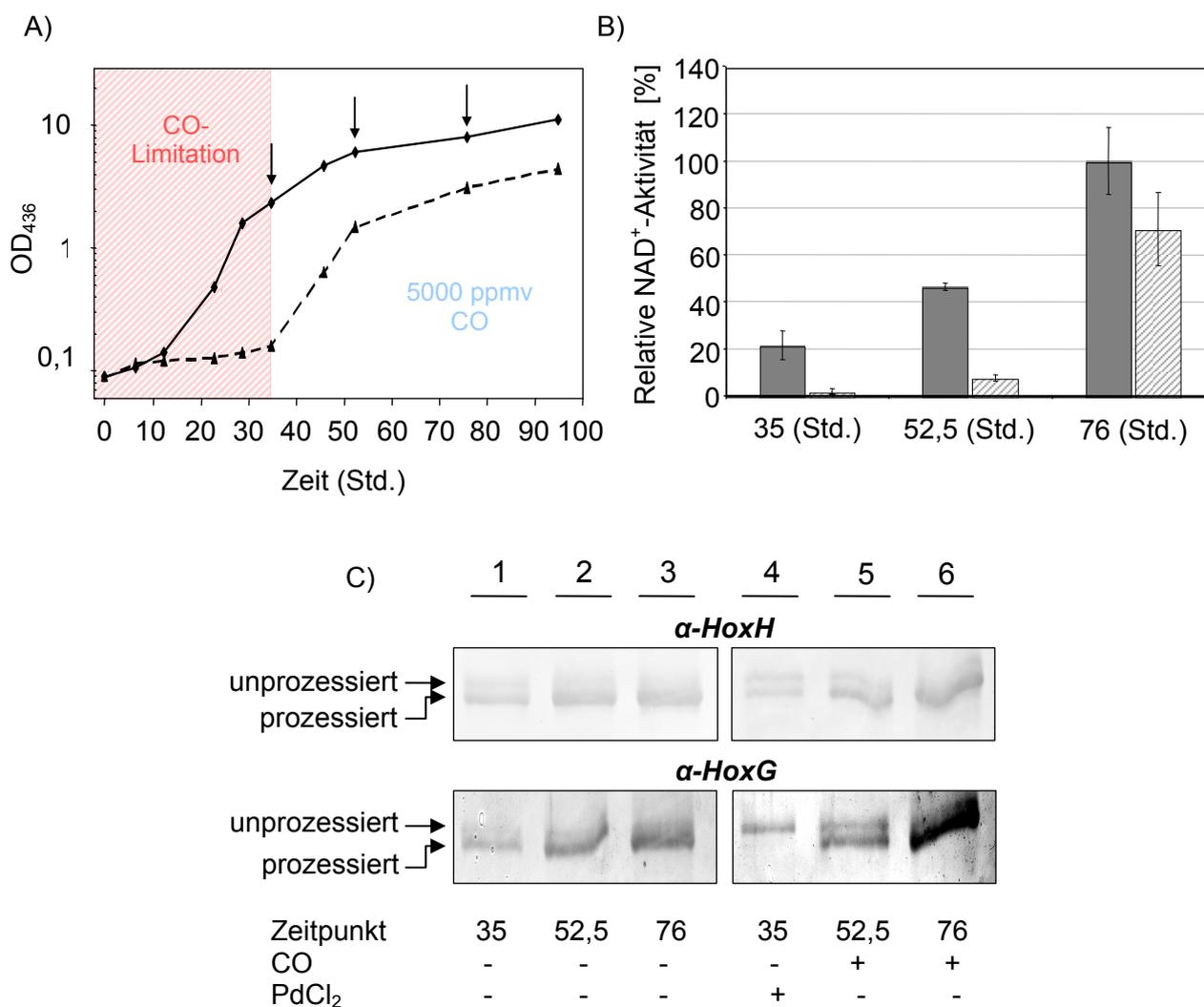
Eine Bestimmung des Maturationsstatus der beiden energiekonservierenden Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* wurde mittels einer immunologischen Analyse durchgeführt. Dem liegt die Beobachtung zugrunde, dass nach erfolgreicher Insertion der prosthetischen Ni(SR)<sub>2</sub>(μ-SR)<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>2</sub>(CO)-Gruppe eine spezifische Endopeptidase aktiv wird, die eine C-terminale Extension der großen Untereinheiten abschneidet. Somit ist eine vollständig mature große Untereinheit geringfügig kleiner als ihr prämaures Pendant (vgl. Kapitel 1.6.6). Nach 24 Stunden Kultivierungsdauer war weder nennenswerte Hydrogenaseaktivität zu messen (Abbildung 3-23 B), noch konnten nennenswerte Mengen der großen Untereinheit beider Hydrogenase detektiert werden (Abbildung 3-23 C; Spalte 1 und 4). Da die Derepression erst etwa nach 24 Stunden beginnt, war diese Beobachtung nicht weiter überraschend. Bei den weiteren Zeitpunkten zeigte sich, dass die großen Untereinheiten vorwiegend in ihrer maturen Form vorlagen. Dies war sowohl unter CO-Limitation (bei 35 Std. / Abbildung 3-23 C; Spalte 2 und 5), als auch nach Zugabe des Antagonisten (bei 45 Std. / Abbildung 3-23 C; Spalte 3 und 6) der Fall.

Anhand dieser Daten war folglich kein Effekt durch die CO-Limitation feststellbar, was zu der Schlussfolgerung führt, dass hier der Vorläufer in einer „gebundenen Form“ vorliegen muss und nicht als freies Gas.

#### **3.3.4.2 Effekte der CO-Limitation auf die Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen unter chemolithoautotrophen Bedingungen**

Um zu untersuchen, ob die Herkunft des Carbonylliganden unter chemolithoautotrophen Bedingungen derjenigen unter heterotrophen Bedingungen gleicht, wurde ein vergleichbares Experiment auch in Minimalmedium (AutN) mit einer künstlichen Atmosphäre von 75 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> (jeweils in v/v) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen bewirkte die CO-Limitation eine deutliche Verzögerung ( $21,9 \pm 1,4$  Std. *Lag-Phase*) im Wachstum (Abbildung 3-24 A).

Der Vergleich der Aktivitäten der löslichen Hydrogenase zeigte, dass sich die Proben, die anfänglich unter CO-Limitation kultiviert wurden, in ihrer Hydrogenaseaktivität dramatisch von der Kontrolle unterschieden. Nach 35 Stunden Wachstum unter CO-limitierenden Bedingungen (Abbildung 3-24 B; 35 Std.) war die NAD<sup>+</sup>-reduzierende Aktivität der löslichen Hydrogenase etwa 20-fach geringer als in denjenigen Zellen, die nicht unter CO-Limitation kultiviert wurden.



**Abbildung 3-24: Effekte der CO-Limitation auf Wachstum und Hydrogenasematuration unter lithoautotrophen Bedingungen.** A) Wachstum von H16 unter lithoautotrophen Bedingungen (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) in Minimal- (AutN)- Medium mit (durchgezogene Linie) und ohne (gestrichelte Linie) CO-Limitation, gemessen als Absorption bei 436 nm. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, an denen Proben entnommen wurden. PdCl<sub>2</sub>-Kapseln wurden nach 35 Std. entnommen und 5000 ppmv des Antagonisten CO wurden zugegeben. B) NAD<sup>+</sup>-reduzierende Aktivität der löslichen Hydrogenase in ganzen Zellen. Gemessen wurde bei den in (A) angegebenen Zeitpunkten; jeweils für die Proben (unter CO-Limitation / schraffiert) und die Kontrolle (ohne CO-Limitation / dunkelgrau). Die volle Aktivität (100 %) entspricht dabei 1,3 ± 0,1 U/mg. C) Immunologische Detektion des Maturationsstatus mittels spezifischer Anti-HoxG und Anti-HoxH Antikörpern. Die Proteine wurden mittels eines 12 %-igen (w/v) denaturierenden SDS-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die prämaternen Formen der großen Untereinheit (68,8 kDa bei prä-HoxG und 54,9 kDa bei prä-HoxH) sind dabei geringfügig größer als die maturated Untereinheiten (67,1 kDa bei HoxG und 52,3 kDa bei HoxH).

Bereits wenige Stunden Inkubation mit gasförmigem Kohlenmonoxid reichten bereits aus, um diesen Unterschied auf etwa das 7-Fache zu senken (Abbildung 3-24 B; 52,5 Std.).

Nach insgesamt 76 Stunden war kein deutlicher Unterschied in der Hydrogenaseaktivität der Proben und der Kontrolle mehr festzustellen (Abbildung 3-24 B; 76 Std.). Die maximale SH-Aktivität der Positivkontrolle nach 76 Stunden lag bei  $1,3 \pm 0,1$  U/mg (100 %). Um die beschriebenen Effekte auf eine Störung der Maturation unter CO-Limitation einzugrenzen, wurde der Maturationsstatus der MBH und der SH wiederum über einen immunologischen Nachweis bestimmt (Abbildung 3-24 C). In den Zellen ohne CO-Limitation lag zu allen drei Zeitpunkten die bei weitem größte Menge der detektierten großen Untereinheiten beider untersuchten Hydrogenasen in ihrer maturen Form vor (Abbildung 3-24 C; Spalte 1 - 3). Unter CO-limitierenden Bedingungen zeigte sich ein anderes Bild. Hier lag die große Untereinheit der SH (HoxH) in nahezu gleichen Mengen in prämaturer und in maturer Form vor (Abbildung 3-24 C; Spalte 4 oben). Noch deutlicher fiel dieser Effekt bei der MBH aus, hier lag die große Untereinheit (HoxG) vollständig in ihrer prämaturen Form vor (Abbildung 3-24 C; Spalte 4 unten). Nach Komplementation mit gasförmigem CO lagen die großen Untereinheiten vorwiegend in ihrer gereiften Form vor (Abbildung 3-24 C; Spalte 5 und 6).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Zugabe von  $\text{PdCl}_2$  einen Effekt auf das Wachstum der H16-Zellen hat (Abbildung 3-24 A). Dieser korreliert eindeutig mit einer verminderten Hydrogenaseaktivität der SH in ganzen Zellen (Abbildung 3-24 B). Durch immunologische Detektion der großen Untereinheiten lassen sich beide Effekte auf eine Störung der Hydrogenasematuration eingrenzen. Da beide untersuchten Hydrogenasen dieselbe Störung zeigten, muss diese Störung der Phase der pleiotropen Reifung zugeordnet werden. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den  $^{13}\text{CO}$ -Markierungsexperimenten, bei denen die Zugabe von gasförmigem CO zu einem spezifischen Einbau als Carbonylliganden geführt hat (siehe Kapitel 3.3.3). Gemeinschaftlich verweisen diese Ergebnisse auf eine Störung der Hydrogenasematuration durch den Entzug von intern produziertem CO als Vorstufe der Carbonylliganden. Dieser Effekt konnte zudem durch die Zugabe von CO komplementiert werden.

Interessanterweise verhalten sich diese Beobachtungen damit gegensätzlich zu den Ergebnissen der analogen Versuchsreihe unter heterotrophen Bedingungen. Dies zeigt, dass unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen unterschiedliche Möglichkeiten zur Synthese des Carbonylliganden existieren. Diese werden von bisher nicht näher bestimmten Genprodukten katalysiert. Im Folgenden wurde daher versucht solche Enzyme zu identifizieren, die konkret an der Synthese des CO-Liganden beteiligt sind.

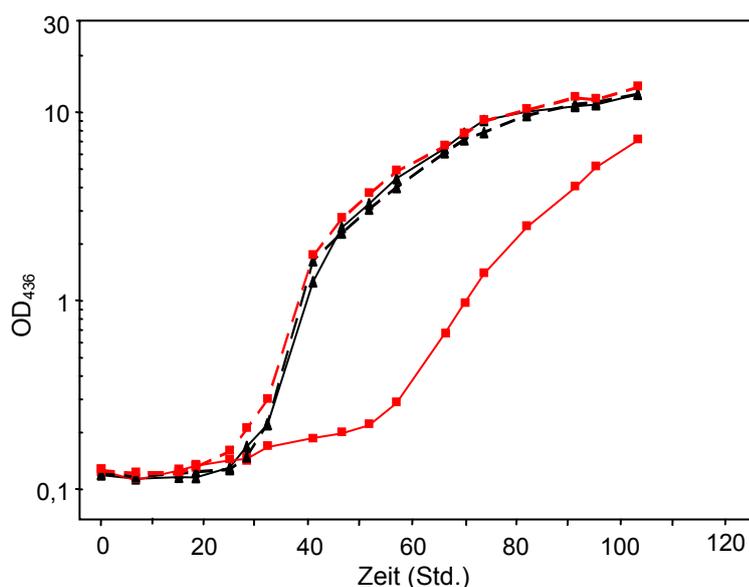
### 3.4 HypX, eine Anpassung der pleiotropen Maturation an ein aerobes Umfeld

Wie eingangs erläutert, ist über die Funktion von HypX nur wenig bekannt (siehe Kapitel 1.6.5). Lange Zeit wurde vermutet, dass HypX in die Synthese zweier zusätzlicher CN<sup>-</sup>-Liganden im aktiven Zentrum der SH involviert ist. Diese Theorie konnte jedoch kürzlich mittels *in situ*-FTIR-Spektroskopie an SH in lebenden Zellen widerlegt werden (Horch, Lauterbach *et al.* 2010). Als Bestandteil des *hyp*-Operons besitzt das Genprodukt von *hypX* demzufolge eine bisher unbekannte Funktion. Diese muss zeitlich vor der proteolytischen Spaltung der prämaternen Untereinheiten der SH und MBH angesiedelt sein. Die wahre Funktion von HypX wurde im Folgenden untersucht.

#### 3.4.1 Komplementation des HypX<sup>-</sup>-Phänotyps durch Applikation geringer Mengen gasförmigen Kohlenmonoxids

Die Experimente mit CO-Limitation zeigten eine deutlich verlängerte Latenzphase und eine verminderte Hydrogenaseaktivität unter lithoautotrophen Bedingungen. Beide Effekte ließen sich auf eine Störung der Maturation eingrenzen (Kapitel 3.3.4.2). Einen vergleichbaren Phänotyp zeigte zuvor bereits die  $\Delta hypX_2$ -Mutante (Buhrke und Friedrich 1998). Daher lag es nahe HypX auf eine mögliche Beteiligung an der Synthese des Carbonylliganden hin zu untersuchen.

Um dieser Theorie nachzugehen, wurden der Wildtyp *R. eutropha* H16 und die  $\Delta hypX_2$ -Mutante HF469 in Minimalmedium (AutN) unter lithoautotrophen Bedingungen mit 15 % O<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 65 % N<sub>2</sub> angezogen.



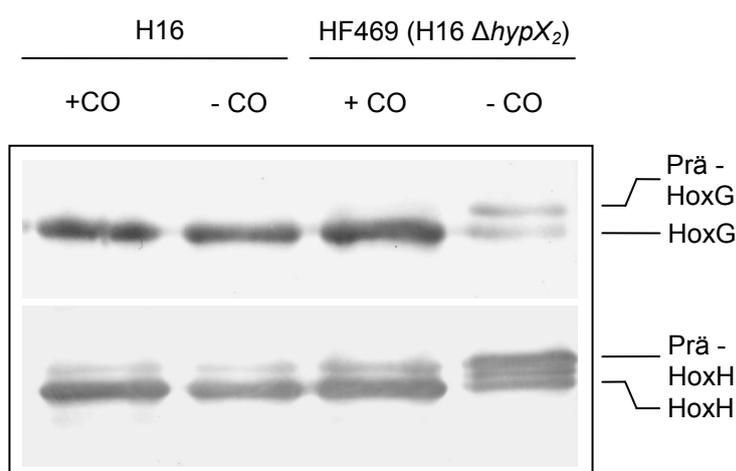
**Abbildung 3-25: Komplementation des lithoautotrophen Wachstums der *hypX*-Mutante durch Zugabe geringer Mengen Kohlenmonoxids.** Die *Ralstonia eutropha*-Stämme H16 (▲) und HF469 (H16  $\Delta hypX_2$  / ■) wurden in Mineralmedium mit CO<sub>2</sub> als einziger Kohlenstoffquelle und H<sub>2</sub> als Energiequelle kultiviert. Dabei wurden beide Stämme als Kontrolle ohne CO (durchgezogene Linien) und mit 5000 ppmv CO (gestrichelte Linien) angezogen.

In der Kontrolle, ohne Zugabe externen Kohlenmonoxids, konnte der bereits beschriebene, verzögerte Eintritt der logarithmischen Wachstumsphase beobachtet werden (Buhrke 2006) / Abbildung 3-25, durchgezogene Linien).

Zur Komplementation dieses HypX<sup>-</sup>-Phänotyps wurden in einem parallelen Experiment zusätzlich 5000 ppmv Kohlenmonoxid zugegeben. Bei Zugabe von CO konnte auch in der  $\Delta hypX_2$ -Mutante ein Wachstum auf Wildtyp-Niveau beobachtet werden (Abbildung 3-25; gestrichelte Linien).

Diese Ergebnisse zeigen somit, dass 5000 ppmv gasförmigen Kohlenstoffmonoxids den Phänotyp der  $\Delta hypX_2$ -Mutante auf physiologischer Ebene vollständig komplementieren können. Da der HypX<sup>-</sup>-Phänotyp auf einer Störung der Maturation beruht (Buhrke und Friedrich 1998), müsste die Zugabe von CO auch hier den beobachteten Arrest der Maturation beheben können. Zu diesem Zweck wurden während des Versuchs Proben entnommen anhand derer der Maturationsstatus der großen Untereinheiten von SH und MBH untersucht werden sollte. Nach 56 Stunden, zum Zeitpunkt der maximalen Lag-Phase, wurden Zellen entnommen und Gesamtzellextrakt hergestellt. Dieser wurde über SDS-PAGE getrennt und mittels spezifischer Antikörperfärbung analysiert.

Dabei konnte im Wildtyp H16 kein Unterschied zwischen der Probe mit CO und der Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 3-26; Spalte 1 und 2). In *R. eutropha* HF469 (H16  $\Delta hypX_2$ ) konnte hingegen eine Akkumulation von prämaturen großen Untereinheiten beobachtet werden (Abbildung 3-26; Spalte 4). Im Gegensatz dazu zeigten die CO-behandelten Zellen, ebenso wie der Wildtyp, ausschließlich gereiftes Protein (Abbildung 3-26; Spalte 3).



**Abbildung 3-26: Applikation von Kohlenstoffmonoxid verhindert die Akkumulation ungereifter großer Untereinheiten.** Immunologische Bestimmung des Maturationsstatus der großen UE der SH und MBH. Autotroph kultivierte Zellen (H16 und HF469[H16  $\Delta hypX_2$ ]) wurden nach 56 Stunden (siehe oben) entnommen und gekocht. Die Gesamtextrakte wurden anschließend über 16%-ige SDS-PAGE getrennt und auf NC-Membran transferiert. Die immunologische Detektion der großen Hydrogenaseuntereinheiten erfolgte mittels  $\alpha$ -HoxH (SH) und  $\alpha$ -HoxG (MBH) AK. So lassen sich gereifte (HoxG 67,1 kDa; HoxH 52,3 kDa), und ungereifte (HoxG 68,8 kDa; HoxH 54,9 kDa) große Untereinheiten unterscheiden.

Da bereits aus vorangegangenen Experimenten bekannt ist, dass gasförmiges CO aus der Umgebung aufgenommen wird und auch als Carbonylligand in das aktive Zentrum von [NiFe]-

Hydrogenasen eingebaut werden kann (Kapitel 3.3.3 / Abbildung 3-21), liegt es nahe, dass HypX eine essentielle Rolle innerhalb der Synthese dieses Liganden spielt. Dies scheint jedoch nicht die einzige metabolische Quelle desselben zu sein, da auch die HypX<sup>-</sup>-Mutante keinen Totalverlust der Hydrogenaseaktivität zeigte.

### 3.4.2 Sequenzvergleich von HypX/HoxX-Homologen

*In silico* Untersuchungen an HypX sollten entscheidende Einblicke in die Funktionsweise des Proteins werfen. Bereits Rey *et al.* konnten mittels Sequenzvergleich homologer HypX/HoxX-Sequenzen aus *Bradyrhizobium japonicum*, *Ralstonia eutropha* sowie *Rhizobium leguminosarum* zwei hoch konservierte Motive identifizieren (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Das erste dieser Motive am N-Terminus von HypX ist homolog zu einer Bindestelle für N<sup>10</sup>-Formyl-Tetrahydrofolat. Die zweite konservierte Domäne liegt in der C-terminalen Hälfte. Dabei handelt es sich um ein Substrat-Binde-Motiv, welches in der Crotonase-Superfamilie durchgängig konserviert ist. Diese beiden hochkonservierten Bereiche werden durch eine Region getrennt, die keinen signifikanten Konservierungsgrad aufweist. Dieser „Linker“ reicht in etwa von AS 269-296 und trennt das HypX-Protein in zwei distinkte Domänen (siehe Abbildung 6-6). Genauere Untersuchungen an den Sequenzen aller bekannten HypX/HoxX-Sequenzen sollten weitergehende Erkenntnisse bezüglich der Signifikanz einzelner Aminosäuren und vor allem im Hinblick auf den zugrunde liegenden Mechanismus liefern.

Insgesamt wurden 18 offene Leseraster aus verschiedenen Spezies, die als *hypX*-Gene bzw. *hoxX*-Gene annotiert wurden, im Sequenzvergleich berücksichtigt (Anhang Abbildung 6-6). Davon wurden zuvor lediglich die drei Isoformen aus *R. eutropha*, *R. leguminosarum* und *B. japonicum* experimentell untersucht. Die übrigen Sequenzen stammen aus Genomprojekten und wurden automatisch bzw. halbautomatisch annotiert.

Eine genauere Inspektion der N-terminalen Domäne zeigte eine Region in der etliche AS durchgehend konserviert sind (Abbildung 3-27). Interessanterweise liegt diese Region nahe des bereits zuvor identifizierten Motivs (Expasy Prosite: PS00373), einer N<sup>10</sup>-Formyl-THF-Bindestelle (Abbildung 3-27 A, Magenta) (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Obgleich dieses Motiv mit keiner der untersuchten Aminosäuresequenzen in allen Positionen übereinstimmte, konnte das fragliche Motiv leicht adaptiert werden (Abbildung 3-27 B; Magenta Buchstaben), ohne dass es dabei zu falsch-positiven Treffern in UniProtKB/SwissProt (Release: 2012-01) kam.



eine deutlich reduzierte Proteinausbeute auf (Buhrke 2006). Dies bestätigte nicht nur die Notwendigkeit beider Aminosäuren für Aktivität und Stabilität von HypX, zudem verweist dieser Befund für die N-terminale HypX-Domäne auf eine Funktion als  $N^{10}$ -Formyl-THF-Hydrolase.

A)

	#						#	A
								E
								N
<i>R.eutropha</i> H16	GIHLHQIEAA	EHRGAESAAD	ASWRNIQAMD	DVALEILAFS	DRMTVSALRG	NAGAGGVFLA	LAADQVWARE	
<i>C.necator</i> CH34	GIHLNIEAA	D-----SAAD	ESWRNINAM	DVARAVIETG	GQLTVAALRG	NAGAGGAFLA	LAADDEVWARE	
<i>R.leguminosarum</i>	GIHLGIEESA	D-----SAAD	ESWRNINAM	ELVREIIVTD	DRLVIAAVLG	NAGAGGVFLS	LAADDEVWMRE	
<i>B.japonicum</i>	GIHLAEIEAA	E-----SAAD	ESWRNINAM	DLARAIETT	DRLVSVIRG	NAGAGGVFLS	LAADDEVWASD	
<i>M.gryphiswaldense</i>	GIHLSTIEAA	L-----SPAD	ESWRNINAM	DLCQAIITCP	SHLTVAALHG	NAGAGGVFMA	LAADMVLARA	
<i>M.magneticum</i>	GIHLCTIESA	A-----SPA	ESWANINAM	DLTREIITCG	SHLTVAAMQG	NAGAGGVFMA	LAADLVAARE	
<i>H.thermophilus</i>	GMNLNTIENA	E-----SPPD	ESWRNINAM	HVCEEILRTE	DKLTVAGMQG	NAGAGGVFLA	LTCDVFVFTRE	
<i>A.aeolicus</i>	GMNLNTIENA	E-----SPAD	ESWRNINAM	DVCEEILKTP	DKLTVAGMQG	NAGAGGVFLA	LTCDLIVFARE	
<i>Hydrogenivirga</i>	GMNLNTIENA	E-----SPPD	ESWRNINAM	DLCEEILRTP	DKLTVAGMQG	NAGAGGVFLA	LTCDLIVFARR	
<i>S.degradans</i>	GIHLNCIEAS	K-----DPAL	ESWLNINAM	DVVKEIIDTP	NQVTVAALRN	NAGAGGAVMA	LACDEVIIRE	
<i>Campylobacterales</i>	GIHLNILEDS	K-----KQGE	DGWSNINAM	DVVKSIIFSD	EIITVSSLHK	NAGAGGVFLA	LACDVFVASE	
<i>Sulfurovum</i> sp.	GIHLNILEDS	R-----KQGE	DGWSNINAM	DLVSSILYAD	EVVTVASFAR	NAGAGGVFMG	LACDVFVAKE	
<i>Nitratiruptor</i> sp.	GIHLTILEDS	K-----KQGE	DGWSNINAM	NLIKTIIFSD	DILTIITAFRA	NAGAGGVFLG	IAGDFVFAKR	
<i>S.avermitilis</i>	GIHLNVIEAA	D-----DPGA	ESWANINAM	DLVEAVLTTT	DRLVSAVAG	NAAAGGVMLA	LAADDEVWCRA	
<i>R.erythropolis</i>	GIHLNVIEAA	S-----DQAG	EAWANIKAIN	EIAKAIIVTCT	EQVVVAFTG	NAGAGGVMLP	LGADVVVARD	
<i>S.nassauensis</i>	GIHLNVIAAA	P-----DPAL	EAWENINAIN	ALCKALVSCT	DKLTIAGFTA	NAGAGGVFMG	LSCDVFVVVD	
<i>P.fluorescens</i>	GVHLNVIQAA	E-----VPGL	EAWANIQAIM	DVCCLELLTAR	-QLVVSGLTG	NAGAGGLMLA	LAADVVLARA	
<i>C.violaceum</i>	GIHLNVIQAA	D-----HPGE	EAWRNIAID	DVCCLEILTAP	-QLTVAGVAG	NAGAGGVMLA	LAADVVALARQ	
	*::*	: :	: *	::*::	: :	: :	::*::	: *

B)

	F							
	A		GD H	H				
	E		AQ F	F				
<i>R.eutropha</i> H16	GVLVNPYK	MGNLYGSEY	TYLLPQRVGA	461	<b>Prositate:</b>	<del>IS</del> XLDG	NAAALxxxxx	LxCDL
<i>C.necator</i> CH34	AAILNPHYK	MGNLYGSEY	TYLLPRRVGM	447	<b>PS00166</b>	IT INA	GGGG	I SQI
<i>R.leguminosarum</i>	GVLNPHYKD	MGNLYGSEY	TYLLPARVGE	430		VA VQK		V THV
<i>B.japonicum</i>	QIILNPHYKD	MGNLYGSEY	TYLLPRRAGA	434		MG MRR		M APM
<i>M.gryphiswaldense</i>	GIILNPHYKG	MGNLYGSEY	TYLLPKRCGA	418		FSN		S G F
<i>M.magneticum</i>	AVVLNPHYKG	MGNLYGSEY	TYLLPRRCGP	425		T		Y
<i>H.thermophilus</i>	GVVLNPHYK	IGNLYGSEF	TYTLPKRVGW	438		A		A
<i>A.aeolicus</i>	GVVLNPHYK	IGNLYGSEF	TYTLPKRVGW	438		H		Q
<i>Hydrogenivirga</i>	GVVLNPHYK	IGNLYGSEF	TYTLPKRVGW	439		B		E
<i>S.degradans</i>	GVVLNPHYK	MG-LYGSEY	TYLMPRLGL	444		L		
<i>Campylobacterales</i>	STVLNPHYKT	LG-LSGSEYH	TYSLPKRVGE	434				
<i>Sulfurovum</i> sp.	RVVFNPHYKT	LG-LSGSEYH	TYTLPGRVGK	432				
<i>Nitratiruptor</i> sp.	GIVLNPHYRT	IG-LSGSEYH	TYTLPRRVGK	443				
<i>S.avermitilis</i>	GAVLNPHYRL	MG-LYGSEY	TYTLPRRVGP	468				
<i>R.erythropolis</i>	GVVLNPHYAT	MG-LFGSELH	TYTLPARVGE	433				
<i>S.nassauensis</i>	GVVLNPHYD	MG-LYGSELH	TYTLPRRVGH	443				
<i>P.fluorescens</i>	DTVYNPHYKS	MG-LYGSEY	TYSLPRAVGQ	449				
<i>C.violaceum</i>	GVVLNPHYQT	MG-LYGSEY	TYTLPRAVGG	449				
	: **:*	: * * **	** :*	*				

**Abbildung 3-28: Sequenzvergleich der C-terminalen Domäne von HypX/HoxX-Homologen aus verschiedenen Spezies (A).** Magenta unterlegte Positionen markieren Aminosäuren, die in Übereinstimmung mit dem PROSITE-Motiv PS00166 stehen. Putativ aktive Aminosäuren, die im Rahmen einer Mutagenesestudie substituiert wurden (Kapitel 3.4.16), sind durch ihre Substituenten oberhalb der Sequenz (blau) gekennzeichnet. Die Rauten markieren AS, die an der Bildung des Oxyanionischen Lochs beteiligt sind (siehe unten). B) Das Motiv (PS00166) ist eine Signatur die EnoylCoA-Hydratasen/Isomerasen (Crotonasen) charakterisiert. Magentafarbene Buchstaben zeigen zusätzliche AS, die nur in HypX-Homologen vorkommen; durchgestrichene Buchstaben zeigen AS die im PS00166-Motiv enthalten sind, aber in keinem HypX/HoxX-Homolog zu finden sind. Vollständige Namen der berücksichtigten Spezies in Abbildung 6-6.

Die C-terminale Domäne von HypX zeigte, ebenso wie die N-terminale Domäne, eine Region in der durchgehend konservierte AS gehäuft auftreten (Abbildung 3-28 A). Diese liegen vor allem in einem Abschnitt in C-terminaler Richtung des bereits identifizierten Motivs (PS00166) (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Diese Signatur (Abbildung 3-28 A; Magenta) ist für

eine Superfamilie von Enzymen mit unterschiedlichsten katalytischen Funktionen, den Crotonasen, charakteristisch.

In sieben der hier untersuchten HypX/HoxX-Isoformen ist dieses Motiv vollständig konserviert. Die übrigen Isoformen ließen sich durch leichte Modifikationen der Sequenz in Übereinstimmung bringen, ohne dass durch einen Abgleich mit UniProtKB/SwissProt (Release: 2012-01) falschpositive Treffer erzielt wurden. Die relative Häufigkeit von durchgehend konservierten Aminosäuren in dieser Region legt eine wichtige Funktion dieses Sequenzabschnittes im Allgemeinen und der konservierten Aminosäuren im Besonderen nahe. Daher sollte die strukturelle Anordnung und Funktion dieser Aminosäuren im Fortgang dieser Studie noch eingehend untersucht werden.

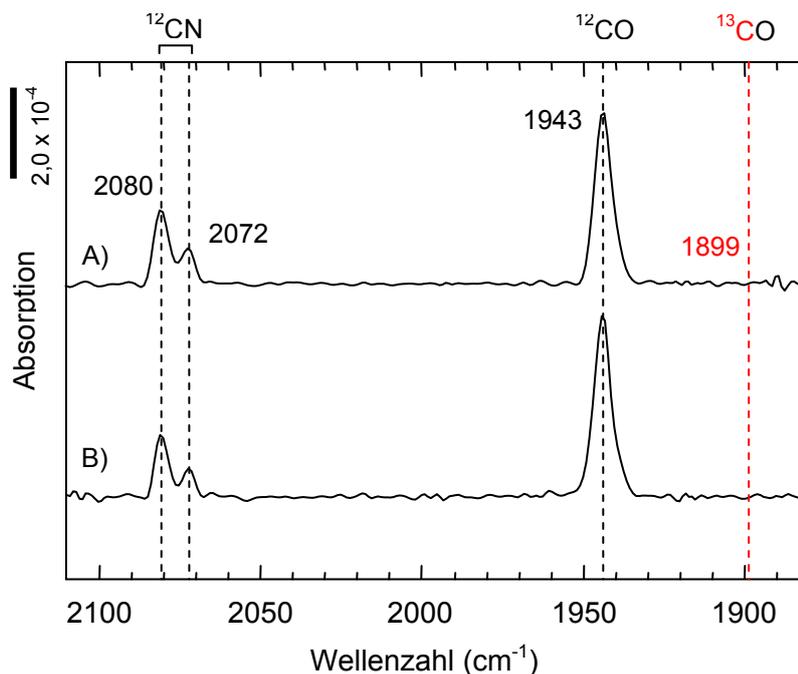
### 3.4.3 Extern appliziertes $^{13}\text{C}$ -Formiat ist kein Substrat in der HypX-abhängigen CO-Synthese

Die putative  $N^{10}$ -Formyl-THF-Bindestelle in HypX (Rey, Fernandez *et al.* 1996) lässt eine Verbindung zum Tetrahydrofolatstoffwechsel vermuten. Tetrahydrofolat ist ein Kofaktor, der innerhalb des Kohlenstoffwechsels eine wichtige Funktion bei der Bereitstellung von  $\text{C}_1$ -Einheiten übernimmt. Solche  $\text{C}_1$ -Einheiten (u. a. Formyl- (CHO)-, Methyl- ( $\text{CH}_3$ )-, Hydroxymethyl- ( $\text{CH}_2\text{OH}$ )-gruppen) sind essentielle Bestandteile in der Biosynthese von Purinen oder Aminosäuren. Die Derivate des Tetrahydrofolatstoffwechsels sind ineinander konvertierbar und stehen in einem enzymatisch kontrollierten Gleichgewicht zueinander (Fuchs 2007). Die Präsenz einer solchen putativen Hydrolase-Domäne eröffnet die Möglichkeit eines experimentellen Nachweises für eine Beteiligung von HypX an der Biosynthese des Carbonylliganden durch die spezifische Markierung des CO-Liganden. Da eine *in vivo*-Markierung mit extern appliziertem, SI-markiertem  $N^{10}$ -Formyl-THF nicht möglich ist, musste eine Alternative gefunden werden, um eine mögliche Markierung des Carbonylliganden *via* HypX zu untersuchen. Daher wurde  $^{13}\text{C}$ -Formiat eingesetzt. Obgleich eine unmittelbare Umsetzung von Formiat - *via* HypX - unwahrscheinlich ist, ist bekannt das Formiat unter ATP-Hydrolyse in Form einer Formylgruppe direkt an Tetrahydrofolat gebunden werden kann und somit indirekt als Substrat verwendet werden kann. Enzyme die diese Reaktion katalysieren sind die Formyltetrahydrofolat-Synthetasen (Fuchs 2007). Bislang jedoch konnte im Genom von *Ralstonia eutropha* H16 kein Gen identifiziert werden, welches ein solches Enzym kodiert. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass ein solches Enzym von einem Leseraster kodiert wird, welches entweder falsch oder derzeit noch nicht annotiert wurde.

Zu diesem Zweck wurde daher  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$  (pRH) unter heterotrophen Bedingungen exprimiert (Kapitel 2.2.4). Da die vollständige Adaption von den reprimierenden Bedingungen

der Vorkultur bis zur Derepression im verwendeten GN-Medium sechs Stunden benötigt (vergleiche Kapitel 3.4.9), wurden 5 mM  $^{13}\text{C}$ -Na-Formiat nach sechs Stunden zugegeben, so sollte verhindert werden, dass das gesamte Formiat verbraucht wäre, bevor die Expression der Hydrogenase beginnt.

Das Expressionsplasmid wurde in den Wildtyp H16 (Abbildung 3-29 A) und in HF469 (H16  $\Delta\text{hypX}_2$ ) (Abbildung 3-29 B) konjugiert. Die Zellen wurden bei einer  $\text{OD}_{436}$  von  $\sim 1,0$  geerntet. Das isolierte Protein wurde anschließend mittels FTIR-Spektroskopie analysiert (siehe Kapitel 2.4.1).



**Abbildung 3-29: Markierung des CO-Liganden der  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$  mit  $^{13}\text{C}$ -Na-Formiat.** FTIR-Spektren von  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$  isoliert aus heterotrophen Zellen, die auf GN-Medium gezogen wurden. Das Expressionsplasmid für  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$  wurde in den Wildtyp H16 (A), sowie in HF469 (H16  $\Delta\text{hypX}_2$ ) (B) konjugiert. Sechs Stunden nach Inokulation wurde das Kulturmedium mit jeweils 5 mM  $^{13}\text{C}$ -Na-Formiat supplementiert.

Die entsprechenden Spektren zeigten weder im  $\text{CN}^-$ -Bereich noch im Bereich der  $\text{CO}$ -Bande eine Veränderung der Ligandenpositionen (Abbildung 3-29). Eine Verstoffwechslung des extern applizierten Formiats bei der Biosynthese des Carbonylliganden kann demnach weder beim  $\text{HypX}^-$ -Stamm noch beim Wildtyp festgestellt werden. Folglich musste eine andere Möglichkeit gefunden werden, eine  $\text{HypX}$ -abhängige Markierung des Carbonylliganden nachzuweisen.

### 3.4.4 Herstellung einer Deletionsmutante im Serin-Hydroxymethyl-Transferase-Gen

Normalerweise wird der THF-Pool wahlweise durch Abspaltung einer Hydroxymethylgruppe von Serin - wobei gleichzeitig Glycin als Nebenprodukt entsteht - oder durch den Abbau von Glycin selbst regeneriert. Die letztgenannte Reaktion wird durch das sogenannte *Glycine-Cleavage-System* katalysiert und stellt die einzige katabole Reaktion von Glycin mit physiologischer Signifikanz dar (Kikuchi, Motokawa *et al.* 2008).

Von den beiden potentiellen Möglichkeiten neue C<sub>1</sub>-Einheiten für den Tetrahydrofolat-Stoffwechsel zu generieren benötigt die Degradation von Glycin zu NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> und THF-gebundenem CH<sub>3</sub> gleich vier Proteine. Alle zusammen bilden das *Glycine-Cleavage-System* (Kikuchi, Motokawa *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu ist für den Serin-Katabolismus lediglich ein einzelnes Gen, *glyA*, erforderlich. Dieses Gen kodiert die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (SHMT). Gleichzeitig ist der Serin-Katabolismus der einzige physiologisch relevante Weg zur Biosynthese von Glycin. Somit ist eine  $\Delta$ *glyA*-Mutante gleichzeitig immer auch auxotroph für Glycin. Die Deletion von *glyA* versetzt uns folglich in die Lage externes, markiertes <sup>13</sup>C-Glycin als Surrogat einzusetzen, ohne dass dieses mit intern produziertem, unmarkiertem Glycin in Konkurrenz steht.

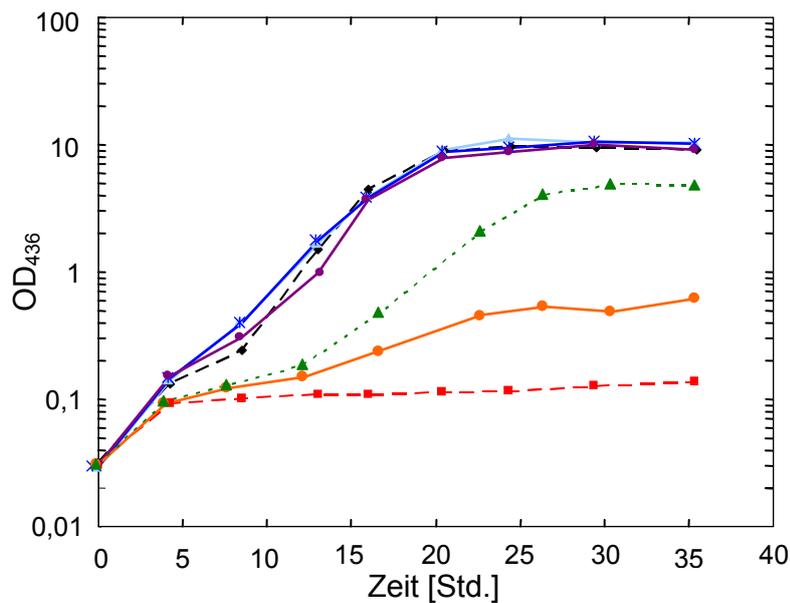
Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid (pCH2771) hergestellt (siehe Kapitel 2.9.2), das eine 384 Bp große *in frame*-Deletion im *glyA*-Gen enthält. Durch doppelt homologe Rekombination wurden die mutierten Allele in verschiedene Stämme eingebracht. So konnten mehrere isogene Stämme erzeugt werden, die eine Glycin-Auxotrophie aufweisen (siehe Tabelle 1).

### 3.4.5 Charakterisierung der Glycin-Bedürftigkeit der SHMT<sup>-</sup>-Mutante

Zunächst sollte der Verlust der Funktionalität der Serin-Hydroxymethyl-Transferase verifiziert und gleichzeitig die minimal notwendige Menge an extern zugegebenem Glycin ermittelt werden, welche noch Wachstum auf Wildtyp-Niveau erlaubt. Zu diesem Zweck wurde ein Versuch durchgeführt bei dem das Wachstum des  $\Delta$ *glyA*-Stammes mit steigenden Mengen Glycin im Vergleich zum Wildtyp-Stamm unter heterotrophen Bedingungen festgehalten wurde. Im Test wurden sechs Glycinkonzentrationen von 0 - 10 mM Glycin getestet.

Dazu wurde *R. eutropha* H16 und HF965 (H16  $\Delta$ *glyA*) in FN-Medium mit 10 mM Glycin als Vorkultur angezogen. Die Hauptkulturen wurden mit 0,02 % der Vorkultur inokuliert. Das Wachstum wurde als Absorption bei 436 nm gemessen.

Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der *R. eutropha*-Mutante in FN-Medium von der externen Zugabe von Glycin abhängig ist (Abbildung 3-30). Ohne die externe Zugabe von Glycin konnte kein Wachstum festgestellt werden. Die anfängliche Zunahme der Zelldichte in der Negativkontrolle bei 4,5 Stunden ist auf den minimalen Eintrag von Glycin aus der Vorkultur zurückzuführen.



**Abbildung 3-30: Charakterisierung der  $\Delta glyA$ -Deletion unter heterotrophen Bedingungen.** Der Wildtyp H16 und HF965 (H16  $\Delta glyA$ ) wurden heterotroph (FN-Medium) mit variierenden Mengen Glycin kultiviert. H16 in FN-Medium ohne Glycin (◆), HF965 (H16  $\Delta glyA$ ) in FN-Medium mit verschiedenen Glycinkonzentrationen; 0 mM (■), 0,1 mM (●), 1 mM (▲), 2 mM (▲), 5 mM (\*), 10 mM (●) Glycin. Das Wachstum wurde als Absorption bei 436 nm gemessen.

Bei Glycinkonzentrationen von 0,1 mM, bzw. 1 mM war ein deutlicher Abfall im Wachstum gegenüber der Wildtyp-Kontrolle zu sehen. Im durchgeführten Experiment über 36 Std. erwiesen sich bereits 2 mM Glycin als ausreichend ein Wachstum auf Wildtyp-Niveau zu ermöglichen. Damit ist gewährleistet, dass eine Mindestkonzentration von 5 mM mehr als ausreichend wäre ein wildtypartiges Wachstum der Mutante zu ermöglichen.

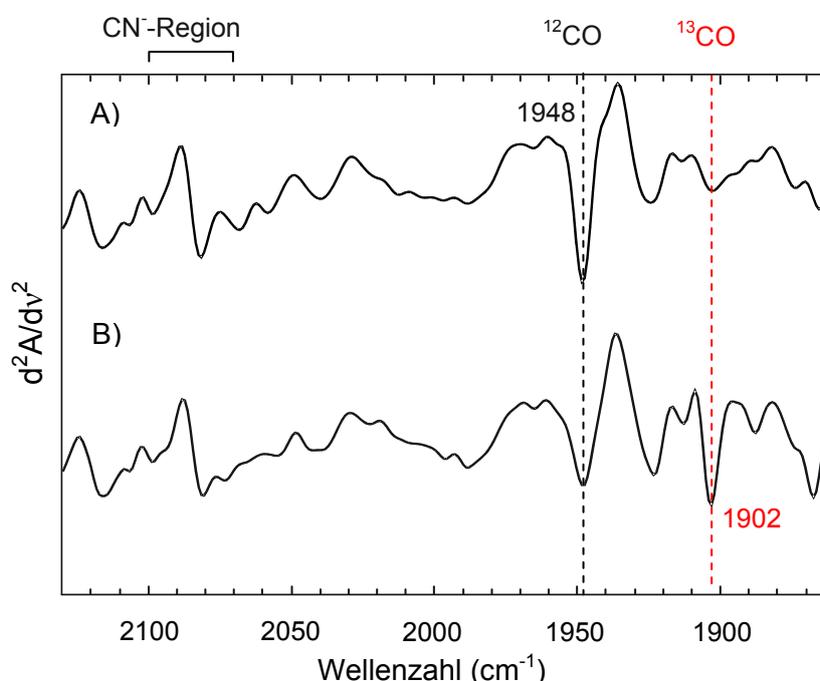
### 3.4.6 *In vivo* Markierung der MBH mit $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter chemolithoautotrophen Bedingungen

Sowohl für die SH als auch für die MBH wurde ein HypX-abhängiger Phänotyp unter lithoautotrophen Bedingungen bereits hinlänglich beschrieben (Buhrke 2006). Daher sollte zunächst die MBH, repräsentativ für die energiekonservierenden Hydrogenasen, unter lithoautotrophen Wachstumsbedingungen auf eine Isotopenmarkierung hin untersucht werden. Dazu wurden durch Transkonjugation (Kapitel 2.10.4 oben) zwei Plasmide in den Megaplasmid-freien *R. eutropha*-Stamm HF966 (HF210  $\Delta glyA$ ) gebracht. Das erste Plasmid (pGE1626) trägt das gesamte MBH-Operon. Das zweite Plasmid (pGE2799) ist eine Derivat von pGE1626 mit einer *hypX<sub>2</sub>*-Deletion im MBH-Operon. Beide Transkonjuganten wurden unter chemolithoautotrophen Bedingungen mit 65 % N<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> sowie 15 % O<sub>2</sub> in der Gasphase angezogen und bei einer OD<sub>436</sub> von 1,0 geerntet (Kapitel 2.2.4). Von diesen Kulturen wurde die Cytoplasmamembran präpariert (Kapitel 2.3.2 oben) und mittels FTIR-Spektroskopie untersucht (siehe Kapitel 2.4.2).

In der  $\Delta hypX_2$ -Mutante (Abbildung 3-31 A) war lediglich ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenzahl von 1948 cm<sup>-1</sup> zu sehen. Dieses Maximum korrespondiert mit den zuvor

beschriebenen Wellenzahlen einer oxidierten MBH mit  $^{12}\text{CO}$ -Ligand (Ludwig 2008). Im Vergleich dazu kam es im „Wildtyp“-Stamm mit *hypX* zu einer Signalaufspaltung. Neben dem Absorptionsmaximum bei  $1948\text{ cm}^{-1}$  war ein weiteres Absorptionsmaximum von vergleichbarer Intensität bei  $1902\text{ cm}^{-1}$  zu sehen (Abbildung 3-31 B).

Durch den teilweisen Einbau des schwereren Kohlenstoffisotopes im markierten Carbonylliganden kommt es zu einer charakteristischen Verschiebung der Streckschwingungen um  $\sim 45$  Wellenzahlen (Nakamoto 2008). Diese Spektren demonstrieren, dass es - ausgehend von uniform markiertem Glycin - unter lithoautotrophen Bedingungen zu einer spezifischen  $^{13}\text{C}$ -Markierung des CO-Liganden im aktiven Zentrum der MBH kommt. Diese Markierung zeigte zudem eine klare Abhängigkeit zu aktivem HypX. Allerdings wies die entsprechende Probe eine nur partielle Markierung des CO-Liganden der MBH auf (Abbildung 3-31 B).



**Abbildung 3-31: Markierung des Carbonylliganden der MBH mittels  $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter lithoautotrophen Bedingungen.** Zweite Ableitung der IR-Spektren von isolierter Cytoplasmamembran. Angezogen wurden die  $\Delta glyA$ -Mutanten in einem  $\text{HypX}^-$  (A) und einem  $\text{HypX}^+$  (B) Hintergrund unter lithoautotrophen Bedingungen. Die Glycin-Auxotrophie wurde mit  $5\text{ mM } ^{13}\text{C}_2$ -Glycin komplementiert.

Im Gegensatz zu FTIR-Spektren isolierter Cytoplasmamembran von Zellen aus der späten stationären Wachstumsphase hoben sich hier keine deutlichen Absorptionsmaxima in der  $\text{CN}^-$ -Bande ab (Ludwig 2008). Da die Zellen bei einer  $\text{OD}_{436}$  von 1,0, also in der frühen logarithmischen Phase, geerntet wurden, ist eine Anreicherung der Cytoplasmamembran mit MBH noch zu gering, um die Absorptionen der  $\text{CN}^-$ -Liganden jenseits des Signal-Rausch-Verhältnisses aufzulösen. Lediglich der deutlich stärkere CO-Peak ließ sich daher abbilden.

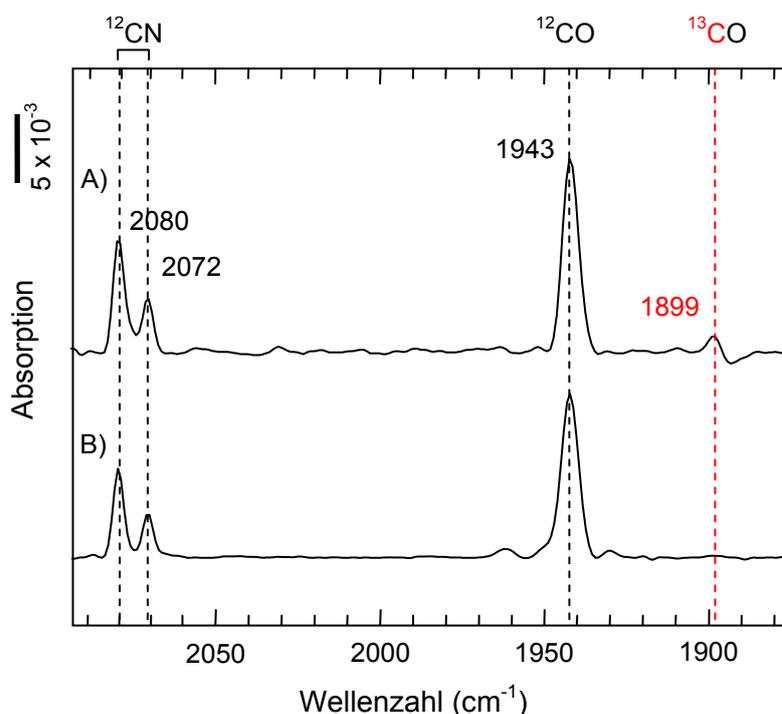
### 3.4.7 *In vivo* Markierung der regulatorischen Hydrogenase mit $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter heterotrophen Standardbedingungen

In vorangegangenen Untersuchungen an HypX aus *Ralstonia eutropha* wurde unter chemolithoautotrophen Bedingungen zwar ein deutlicher physiologischer Phänotyp beschrieben,

jedoch konnte kein solcher Einfluss von HypX auf die Reifung der RH unter heterotrophen Bedingungen mit Fruktose und Glycerol als Energie- und Kohlenstoffquelle beobachtet werden (Buhrke 2006).

Rey *et al.* konnten in *Rhizobium leguminosarum* anhand von Expressionsanalysen nachweisen, dass HypX mit den übrigen *hyp*-Genen koreguliert wird und es sich demzufolge um ein echtes Mitglied des akzessorischen *hyp*-Operons handelt (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Alle bisher untersuchten Genprodukte aus dem *hyp*-Operon sind in die Assemblierung und Inkorporation der katalytisch aktiven Übergangsmetalle und ihrer Liganden involviert. Da der Carbonylligand, wie in Kapitel 3.2 gezeigt, bereits im HypCD-Komplex vorhanden ist, müsste es sich auch bei der HypX-vermittelten CO-Synthese um einen echten pleiotropen Maturations-schritt handeln. Demzufolge scheint es unwahrscheinlich, dass HypX nicht auch an der Reifung der regulatorischen Hydrogenase beteiligt ist.

Um dieser These nachzugehen wurde erneut das in Kapitel 3.3.1 vorgestellte RH-Überexpressionssystem (pRH) verwendet. Als Expressionsstamm der *R. etropha* Stamm HF967 (H16  $\Delta$ *hoxBCGH*  $\Delta$ *glyA*) verwendet, ein Serin-Hydroxymethyl-Transferase- (*glyA*)-defizientes Derivat des bereits etablierten Expressionsstammes HF574 (H16  $\Delta$ *hoxBCGH*). Da dieses Überexpressionssystem - mangels SH und MBH - nur heterotroph wächst, wurden die Kulturen in Minimalmedium mit Fruktose und Glycerol (FGN-Medium) als Energie- und Kohlenstoffquelle angezogen. Jede dieser Kulturen wurde zudem mit 16 mM  $^{13}\text{C}_2$ -Glycin bzw.  $^{12}\text{C}_2$ -Glycin supplementiert.



**Abbildung 3-32: Markierung des Carbonylliganden der RH mit  $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter heterotrophen Standardbedingungen.** FTIR-Spektren gereinigter  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$ . Die Zellen wurden heterotroph in FGN-Medium angezogen und bei einer  $\text{OD}_{436}$  von 6,9 geerntet. Die Zellen wurden mit je 16 mM  $^{13}\text{C}_2$ -Glycin (A) bzw. 16 mM  $^{12}\text{C}_2$ -Glycin (B) supplementiert.

Das Kontrollexperiment (Abbildung 3-32 B) mit unmarkiertem Glycin zeigte zwei Absorptionsmaxima im Bereich der CN<sup>-</sup>-Bande bei 2080 cm<sup>-1</sup> und 2072 cm<sup>-1</sup> und eine starke Absorption im CO-Bereich bei 1943 cm<sup>-1</sup>. Dies entspricht dem Standardspektrum einer unmarkierten, oxidierten RH (Bernhard, Buhrke *et al.* 2001). Im Markierungsexperiment (Abbildung 3-32 A) mit uniform markiertem <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Glycin war zudem ein weiteres Absorptionsmaximum bei 1899 cm<sup>-1</sup> zu erkennen. Mit einem relativen Anteil von weniger als 3 % der Gesamtpopulation beider CO-Spezies deutet dies jedoch nicht auf eine spezifische, HypX-abhängige Markierung des CO-Liganden der RH durch <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Glycin hin. Im Bereich der CN<sup>-</sup>-Bande gab es hingegen keine sichtbaren Veränderungen.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass HypX keinen Einfluss auf die Maturation der RH hat, sondern lediglich die Maturation der energiekonservierenden Hydrogenasen, SH und MBH, beeinflusst. Diese Interpretation wäre konsistent mit früheren Beobachtungen (Buhrke 2006). Auf der andern Seite könnte dieses Ergebnis bedeuten, dass die gewählten heterotrophen Anzuchtbedingungen einen HypX-abhängigen Effekt kaschieren bzw. das HypX nur unter lithoautotrophen Bedingungen seine Funktion entfaltet. Diese Möglichkeiten sollten im Folgenden weiter untersucht werden.

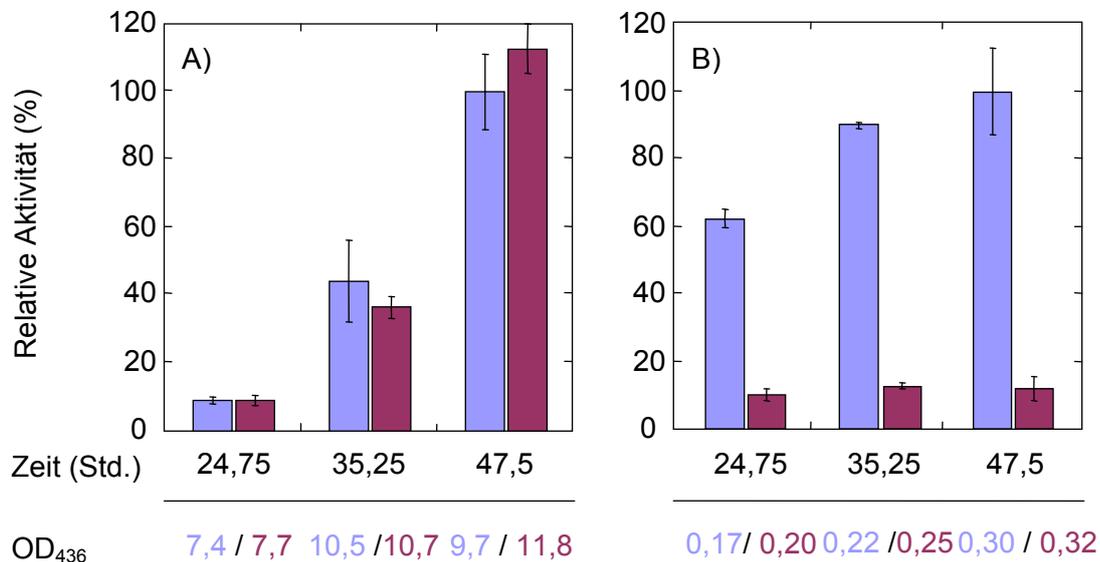
### **3.4.8 Vergleichende Analyse der HypX-Funktion unter verschiedenen heterotrophen Bedingungen**

Da die RH alleine nicht in der Lage ist chemolithoautotrophes Wachstum zu vermitteln, wurden Untersuchungen über den Einfluss von HypX auf Funktionalität der RH bis *dato* ausschließlich unter den oben genannten heterotrophen Bedingungen (FGN-Medium) durchgeführt.

Nachfolgend sollte die These beleuchtet werden, dass eben diese heterotrophen Anzuchtbedingungen bisher zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben. Unter FGN-Bedingungen ist ein zweiphasiges Wachstum zu beobachten. Zunächst wird die Fruktose verstoffwechselt, dabei wird jedoch die Expression von Hydrogenasen reprimiert. Die Derepression beginnt erst mit dem Wechsel auf Glycerol als Kohlenstoffquelle. Zu diesem Zeitpunkt (~24 Std.) hat die Zelldichte im verwendeten Medium üblicherweise einen Wert von OD<sub>436</sub> = ~6,0 erreicht (Friedrich, Heine *et al.* 1981). Bei derart hohen Zelldichten ist die Versorgung der Zellen mit gelöstem Sauerstoff nicht mehr vollständig gewährleistet. Dies könnte der Grund sein, dass die Funktion von HypX entbehrlich wird.

Daher wurde der Einfluss von HypX auf die heterotrophe Hydrogenaseexpression untersucht, indem jeweils der Wildtyp H16 und die  $\Delta hypX_2$ -Mutante HF469 unter FGN- und GN-Bedingungen getestet wurden. Im letztgenannten Medium dient ausschließlich Glycerol als

Energie- und Kohlenstoffquelle. Die Hydrogenaseexpression beginnt hier bereits ~6 Stunden nach Inokulation. Als Maß für den Einfluss von HypX auf die Reifung aller Hydrogenasen wird die Aktivität der SH in ganzen Zellen herangezogen.



**Abbildung 3-33: Einfluss von HypX auf die Reifung von Hydrogenasen unter heterotropen Bedingungen.** Die Stämme H16 (hellblau) und HF469 (violett) wurden unter verschiedenen heterotropen Bedingungen angezogen. Als Maß für die Hydrogenasereifung dient die relative Aktivität der löslichen Hydrogenase in ganzen Zellen. „100 %“ normiert auf volle Aktivität der Kontrolle (H16), diese beträgt im FGN-Medium (A)  $0,77 \pm 0,08$  U/mg und im GN-Medium (B)  $3,51 \pm 0,46$  U/mg.

Während die Hydrogenaseaktivität unter FGN-Bedingungen in Wildtyp und Mutante innerhalb der Fehlergrenze nahezu übereinstimmte (Abbildung 3-33 A), zeigte die Mutante unter GN-Bedingungen eine signifikant reduzierte Hydrogenaseaktivität (Abbildung 3-33 B).

Die „volle“ Aktivität (100 % der Kontrolle) lag im FGN-Medium nach 47,5 Stunden bei  $0,77 \pm 0,08$  U/mg, im GN-Medium lag die „volle“ Aktivität bei  $3,51 \pm 0,46$  U/mg. Dieser Unterschied liegt in erster Linie in der Tatsache begründet, dass die Derepression unter FGN-Bedingungen erst nach ungefähr 24 Stunden einsetzt.

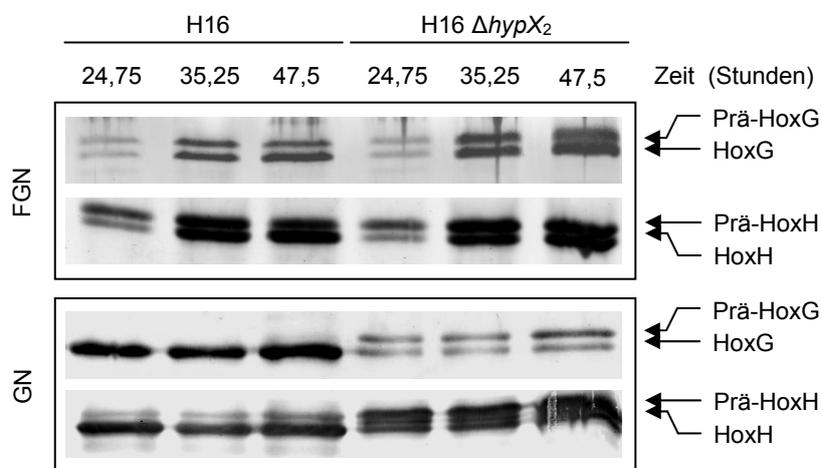
Aus dieser Beobachtung ergibt sich ein eindeutiger Einfluss von HypX auf die Aktivität von Hydrogenasen auch unter heterotropen Bedingungen. Dieser Effekt ist allerdings, wie oben angeführt, nicht unter heterotropen Standardbedingungen (FGN-Medium) zu erkennen. Somit ist gezeigt, dass ein HypX-Effekt nicht exklusiv unter lithoautotropen Bedingungen nachweisbar ist. Dieses war im Hinblick auf die Ergebnisse der CO-Limitation (siehe Kapitel 3.3.4) nicht unbedingt zu erwarten gewesen.

Soweit gilt dies in jedem Fall für die lösliche Hydrogenase. Ein äquivalentes Experiment mit der MBH ist nicht durchführbar. Bei den geringen Zelldichten, zu denen die Proben entnommen werden müssten, müsste ein derart großes Volumen angezogen werden, dass dies mit den

vorhandenen Mitteln nicht zu verwirklichen war. Aufgrund der Tatsache, dass hier die pleiotrope Maturation betroffen ist, darf angenommen werden, dass die Ergebnisse der SH auf die übrigen Hydrogenasen übertragbar sind.

Diese Deduktion konnte über eine immunologische Detektion des Maturationsstatus verifiziert werden. Dadurch sollte zudem untersucht werden, ob die Reduktion der Hydrogenaseaktivität in HF469 – auch unter heterotrophen Bedingungen – tatsächlich auf einem Arrest der Reifung beruht. Dazu wurde Gesamtzellextrakt hergestellt und mittels 12 %-iger SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die großen Untereinheiten HoxG und HoxH immunologisch detektiert, so dass mature und prämaturo Isoformen unterschieden werden können (Abbildung 3-34).

Wie in Abbildung 3-34 (oben) zu erkennen ist, ist unter FGN-Bedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und der  $\Delta hypX_2$ -Mutante erkennbar. In beiden Stämmen nahm die Menge an Hydrogenaseproteinen über die Zeit zu. Während zu Beginn der Derepression bei 24,75 Stunden nur wenig HoxG bzw. HoxH nachweisbar war, stieg die Menge mit zunehmender Kultivierungsdauer an. Dabei liegen mature und prämaturo Formen in etwa gleichen Mengen vor.



**Abbildung 3-34: HypX-Effekt unter heterotrophen Bedingungen.** Immunologische Färbung der großen Untereinheiten der MBH und der SH, mittels spezifischer  $\alpha$ -HoxG und  $\alpha$ -HoxH Antikörper. Die Zellen von H16 (Wildtyp) und HF469 (H16  $\Delta hypX_2$ ) wurden unter verschiedenen heterotrophen Bedingungen (FGN und GN) angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die Zellen wurden gekocht und mittels 12 %-iger SDS-PAGE getrennt.

Anders unter GN-Bedingungen, hier lagen im Wildtyp die großen Untereinheiten nahezu vollständig in gereifter Form vor (Abbildung 3-34; unten). Die Mutante indes zeigte, dass beide großen Untereinheiten etwa zu 50 % in ungereifter Form vorlagen.

Diese Beobachtungen bestätigen, dass HypX auch unter heterotrophen Bedingungen aktiv ist. Ferner geben sie uns auch Aufschluss darüber, dass HypX nur dann essentiell ist, wenn die Hydrogenasen bei niedrigen Zelldichten synthetisiert werden. Darüber hinaus zeigt der obige Western-Blot, dass neben der SH auch die MBH unter heterotrophen Bedingungen betroffen ist.

Da die RH keine proteolytische Spaltung unterläuft, kann ein Effekt auf die regulatorische Hydrogenase nicht über eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden.

### **3.4.9 Der HypX abhängige Einfluss von Serin und Glycin auf die Hydrogenase Aktivität verweisen auf die Beteiligung des C<sub>1</sub>-Metabolismus**

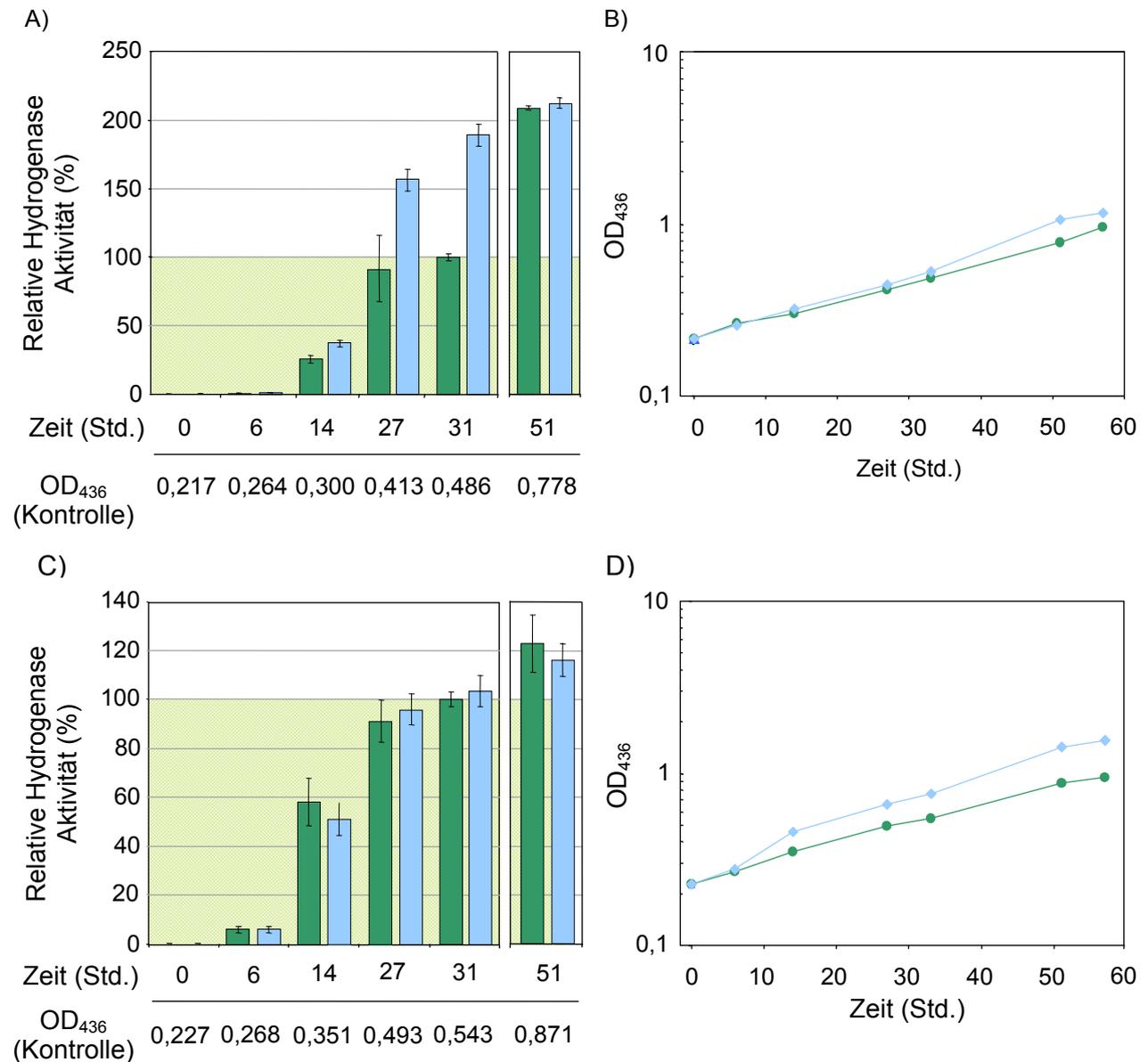
Obgleich das initiale Markierungsexperiment mit der RH unter heterotrophen Bedingungen keine nennenswerte, Glycin-abhängige Markierung des Carbonylliganden aufwies (Kapitel 3.4.7), zeigten die Experimente im vorangegangenen Kapitel, dass unter heterotrophen Bedingungen der HypX-Effekt von der Zusammensetzung des gewählten Mediums abhängig ist. Nur in GN-Medium, wenn Expression und Maturation der Hydrogenasen in Gegenwart hoher Konzentrationen gelösten Sauerstoffs stattfindet, zeigte sich ein deutlicher HypX-Phänotyp (siehe Kapitel 3.4.8).

Auf Basis dieser neuen Erkenntnisse sollte eine mögliche Verbindung zwischen C<sub>1</sub>-Stoffwechsel und HypX experimentell untersucht werden. Dazu wurden *R. eutropha* H16 und HF469 (H16  $\Delta hypX_2$ ) unter heterotrophen Bedingungen in GN-Medium angezogen. Zusätzlich wurden jeweils 5 mM Serin, Glycin und Alanin bei Inokulation zugegeben. Im Falle einer THF-Abhängigkeit würde die Zugabe von Serin und Glycin zu einem Anstieg der Hydrogenaseaktivität führen, da beide Aminosäuren den *Pool* der C<sub>1</sub>-Einheiten auffüllen können. Da HypX, wie durch die Deletion von HypX hinreichend belegt, an einem Flaschenhals der Maturation agiert, sollte sich die Zugabe dieser Aminosäuren positiv auf die Hydrogenaseaktivität auswirken.

Als Maß für eine erfolgreiche Maturation wurde im Folgenden die Aktivität der SH in ganzen Zellen gemessen. Nach Inokulation war in den ersten sechs Stunden keine Aktivität zu ermitteln (Daten nicht gezeigt). Da die Vorkulturen bei 37 °C angezogen wurden und bei dieser Temperatur in *Ralstonia eutropha* die Expression von Hydrogenasen reprimiert ist (Friedrich und Friedrich 1983), beginnt die Expression von Hydrogenasen erst nach Adaption an die veränderten Kulturbedingungen, nach Beginn des Experiments.

Die Messung der SH-Aktivität in H16 zeigte nach Zugabe von Glycin eine Zunahme der Aktivität bezüglich der Kontrolle. Dieser Unterschied erreichte bei 31 Stunden ( $OD_{436} \sim 0,5$ ) sein Maximum. Hier lag die SH-Aktivität bei Zugabe von 5 mM Glycin bei 174 % der Aktivität der Kontrolle. Die volle Aktivität (100 %) der Kontrolle lag dabei bei  $1,69 \pm 0,04$  U/mg. Interessanterweise war der gemessene Unterschied nur bei niedrigen  $OD_{436}$ -Werten von  $\sim 0,5$  (Kontrolle) zu erkennen. Dieser Unterschied hatte sich bei höheren OD-Werten ( $OD_{436} \sim 0,8$ ) bereits vollständig egalisiert (Abbildung 3-35 A). Dieser Befund stützt die These, dass HypX nur

in der Frühphase und bei niedrigen Zelldichten für eine effektive Maturation erforderlich ist (siehe auch Kapitel 3.4.8).



**Abbildung 3-35: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der Zugabe von Glycin.** Aktivität der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 (A) und HF469 (C) unter heterotrophen Bedingungen. Heterotrophes Wachstum von H16 (B) und HF469 (D) in GN-Medium. Die Kontrolle (grün) enthielt keine zusätzlichen Aminosäuren, während der Probe je 5 mM Glycin (hellblau) zugegeben wurde. Die relative Hydrogenaseaktivität wurde auf die maximale Aktivität der Kontrolle bei 31 Stunden normiert, bevor sich die Wirkung von HypX egalisiert hat (51 Std.). Die volle Aktivität (100 %) von H16 (bei 31 Std.) liegt bei  $1,69 \pm 0,04$  U/mg; die volle SH-Aktivität von HF469 (bei 31 Std.) hingegen liegt bei  $0,47 \pm 0,03$ .

Im HypX-defizienten Stamm, HF469, war im Gegensatz dazu keine Zunahme der Aktivität nach Applikation von Glycin zu erkennen. Die Aktivität der Probe stimmte innerhalb der Fehlergrenzen mit der Aktivität der Kontrolle überein (Abbildung 3-35 C), wobei die volle Aktivität (100 %) dieses Stammes erwartungsgemäß niedriger war als beim Wildtyp ( $0,47 \pm 0,03$  U/mg). Dies beweist, dass die Zunahme der Hydrogenaseaktivität nach Zugabe von Glycin

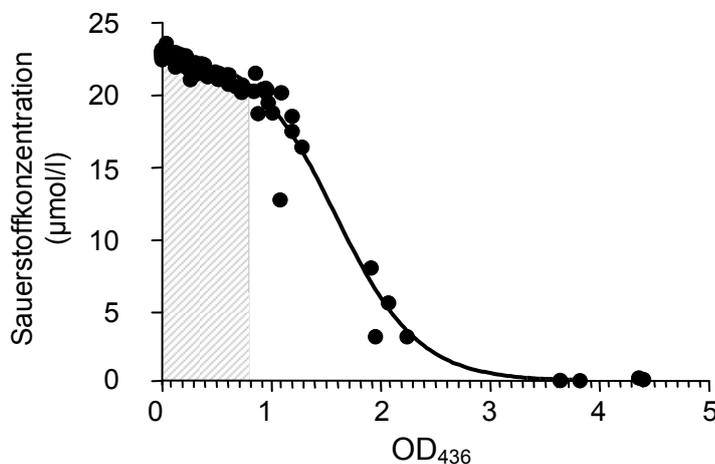
HypX-abhängig ist. Ferner belegt dies die mögliche Verbindung zwischen dem THF-Metabolismus und der HypX-Aktivität.

Ein vergleichbares Bild zeigte sich ebenfalls nach Zugabe von 5 mM Serin, welches im Wildtyp eine alternative Quelle für C<sub>1</sub>-Einheiten darstellt. Im Gegensatz dazu war eine solche HypX-abhängige Zunahme der Hydrogenaseaktivität nach Zugabe von 5 mM Alanin, welches keine Verbindung zum C<sub>1</sub>-Metabolismus besitzt, nicht zu erkennen (siehe Abbildung 6-2 A und C).

Obgleich die Zugabe einiger Säuren des Intermediärstoffwechsels zum Medium, z.B. Succinat, zu einem schnelleren Wachstum von *R. eutropha* führt, ist dies im Allgemeinen bei Aminosäuren nicht der Fall (Friedrich 1981). Damit konsistent war auch die Beobachtung, dass die Zugabe von Glycin zu keiner deutlichen Wachstumssteigerung führte (Abbildung 3-35 B und D).

### 3.4.10 Konzentration des gelösten Sauerstoffs in Korrelation zur Zelldichte

Die Zelldichte *per se* kann jedoch nicht das ausschlaggebende Kriterium für den, bei hohen Zelldichten abnehmenden, HypX-abhängigen Effekt sein. Da *hypX* für die Sauerstofftoleranz der Maturation wichtig ist (Buhrke 2006), liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es die Sauerstoffkonzentration ist, die als entscheidendes Merkmal betrachtet werden muss. Während bei zunehmender Zelldichte der Sauerstoffeintrag durch Diffusion konstant bleibt, nimmt die Konzentration des gelösten Sauerstoffs mit steigender Anzahl der Sauerstoffverzehrer im Medium stetig ab. Da die Sauerstoffaufnahme aber von zahlreichen Parametern abhängt (Art der Bakterien, Kultivierungsbedingungen) und stark variieren kann, sollte als Nächstes direkt der Sauerstoffgehalt im Medium, als universal vergleichbarer Wert, ermittelt werden.



**Abbildung 3-36: Sauerstoffkonzentration im Medium in Abhängigkeit zur Zelldichte.** Die Zelldichte wurde als Absorption bei 436 nm ermittelt. Die Sauerstoffkonzentration wurde unmittelbar im Medium mittels eines nicht-invasiven, optischen Sensors der Firma PreSens ermittelt. Gemessen wurde unter heterotrophen Anzuchtbedingungen (GN); bei 100 upm und einer konstanten Temperatur von 30 °C. Der schraffierte Bereich markiert die Wachstumsphase, in der ein positiver Effekt von HypX auf die Hydrogenaseaktivität deutlich nachweisbar ist. Die Güte der nicht-linearen Regression (siehe Gleichung 9) wurde mit  $R^2 = 0,98$  ermittelt.

Dazu wurde *Ralstonia eutropha* H16 unter heterotrophen Bedingungen (GN-Medium) an Luft, bei konstant 30 °C und 100 upm angezogen. Die verwendeten 500ml-Schikanekolben wurden standardmäßig mit 166 ml Medium befüllt und mit 1 % Vorkultur inokuliert. Die Zelldichte wurde als Absorption bei 436 nm gemessen. Die Sauerstoffkonzentration wurde unmittelbar im Medium mittels eines nicht-invasiven, optischen Sauerstoffsensors gemessen (siehe Kapitel 2.7.1).

Mittels einer sigmoidalen *Dose-Response*-Funktion mit variablen Neigungen,

$$(8) \quad Y = Y_{Bottom} + \frac{(Y_{Top} + Y_{Bottom})}{1 + 10^{(LogY_{Mid} - X) \cdot n_H}},$$

konnte eine nicht-lineare Regression der Daten vorgenommen werden (Abbildung 3-36). Dabei entspricht  $Y_{Top}$  dem Maximalwert der Y-Achse (226,9  $\mu\text{mol/l}$ ) und  $Y_{Bottom}$  dem Minimalwert der Y-Achse (0,0  $\mu\text{mol/l}$ ).  $LogY_{Mid}$  ist der X-Wert, bei dem der Y-Wert dem Mittelwert zwischen Maximal- und Minimalwert entspricht (1,593). Der *Hill*-Koeffizient  $n_H$  steht für die Neigungsrate (-1,198).

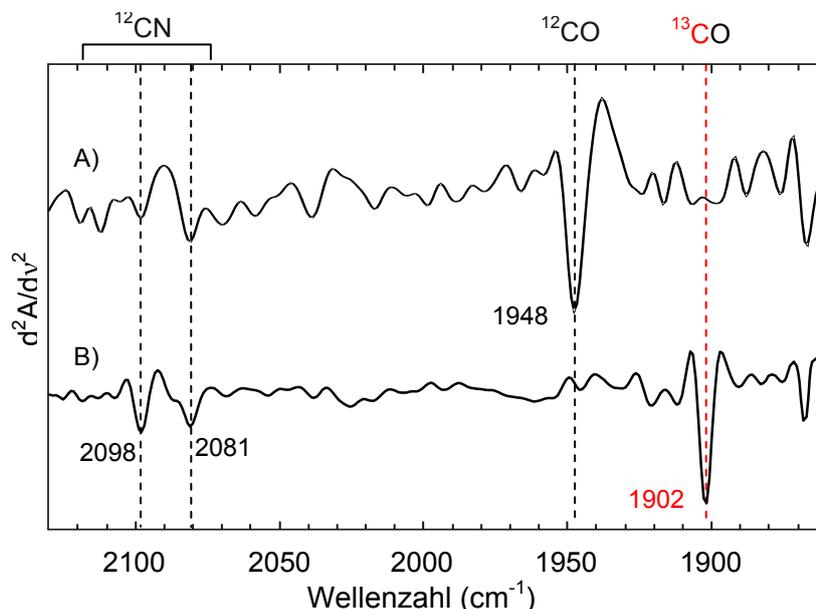
Damit liegt die Sauerstoffkonzentration bei  $OD_{436} = 0,8$  (bei dieser Zelldichte hat sich der Beitrag von HypX zum CO-Gesamtpool bereits egalisiert) bei ca. 206  $\mu\text{mol/l}$ . Das entspricht 92,2 % der Sauerstoffkonzentration vor Inokulation des Mediums.

### 3.4.11 *In vivo* Markierung der MBH mit $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter modifizierten heterotrophen (GN)-Bedingungen

Wie bereits gezeigt, ist HypX in die Maturation, sowohl der MBH als auch der SH, involviert und ist sowohl unter lithoautotrophen (Buhrke 2006) als auch unter heterotrophen Bedingungen aktiv (Kapitel 3.4.8). Die Tatsache, dass sich der HypX<sup>-</sup>-Phänotyp auf physiologischer Ebene durch die Zugabe von CO komplementieren lässt, verweist auf eine Funktion innerhalb der CO-Synthese (Kapitel 3.4.1). Sequenzanalysen lieferten Hinweise auf eine Verbindung zum C<sub>1</sub>-Metabolismus (Kapitel 3.4.2 / Rey, Fernandez *et al.* 1996). Diese konnten durch die HypX-abhängige Aktivitätssteigerung der SH nach Zugabe von Glycin und Serin experimentell erhärtet werden (Kapitel 3.4.9).

Um einen experimentellen Beweis für die Verbindung der HypX-abhängigen CO-Synthese zum THF-Stoffwechsel zu erbringen, sollte daher erneut versucht werden den Carbonylliganden der MBH durch die Zugabe von  $^{13}\text{C}_2$ -Glycin auch unter heterotrophen Bedingungen spezifisch zu markieren. Nachdem die Markierung unter standardisierten, heterotrophen Bedingungen (FGN-Medium), zumindest bei der RH, erfolglos war, wurde daher zunächst die MBH unter den

modifizierten, heterotrophen Wachstumsbedingungen in GN-Medium auf eine Isotopenmarkierung hin untersucht.



**Abbildung 3-37: Markierung des Carbonylliganden der MBH mit  $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter heterotrophen Bedingungen.** Zweite Ableitungen der FTIR-Spektren eines Membranextraktes. Angezogen unter dereprimierenden (GN-) Bedingungen wurden zwei  $\Delta glyA$ -Mutanten ohne HypX (A) und mit HypX (B). Die Glycin-Auxotrophie wurde mit 5 mM  $^{13}\text{C}_2$ -Glycin komplementiert.

Dazu wurden dieselben Stämme wie bei der Markierung unter lithoautotrophen Bedingungen verwendet (siehe Kapitel 3.4.7). Diese wurden in GN-Medium angezogen und bei einer  $\text{OD}_{436}$  von 1,0 geerntet (Kapitel 2.2.4).

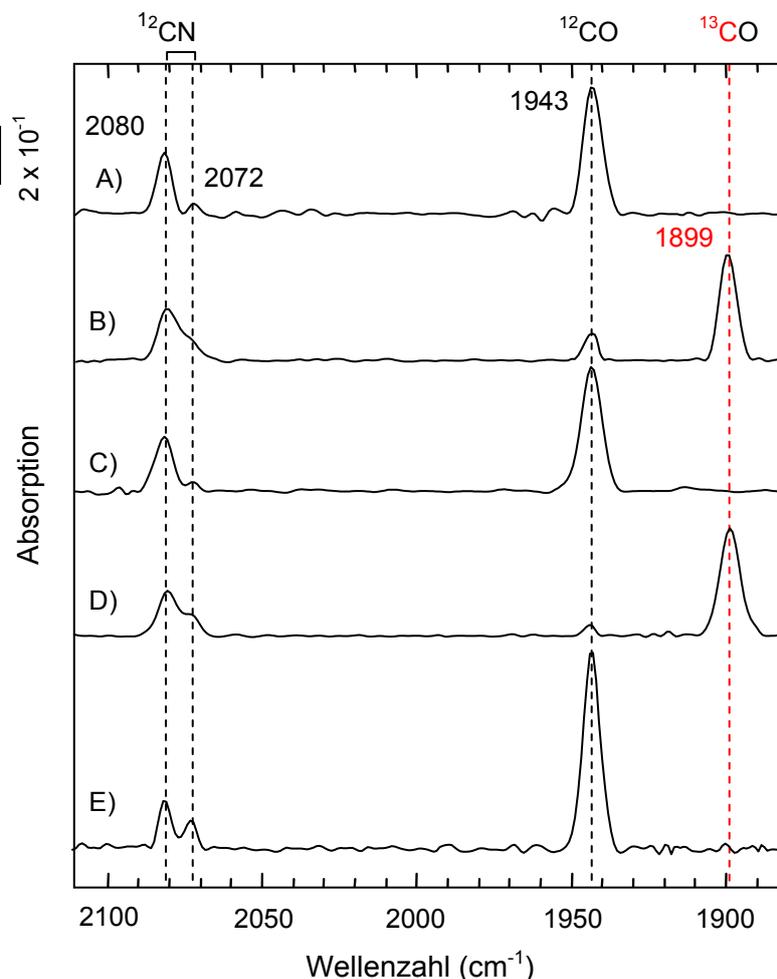
Noch deutlicher als unter lithoautotrophen Bedingungen konnte, in Abhängigkeit von HypX, eine quantitative Markierung des CO-Liganden beobachtet werden (Abbildung 3-37 B). Im  $\text{HypX}^+$ -Stamm lag die Streckschwingung des CO-Liganden vollständig bei  $1902\text{ cm}^{-1}$ , eine Absorption bei  $1948\text{ cm}^{-1}$  war nicht mehr nachweisbar. Die entsprechende Kontrolle mit einem  $\text{HypX}^-$ -Stamm zeigte den Carbonylliganden vollständig unmarkiert bei  $1948\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 3-37 A). Unter diesen Bedingungen konnten bei Proben aus der frühen logarithmischen Phase - bei  $\text{OD}_{436}$  1,0 geerntet (vergleiche Kapitel 2.2.4) - nur schwache Absorptionen im Bereich der Cyanidliganden detektiert werden. Diese zeigten zwei Maxima, bei  $2081\text{ cm}^{-1}$  und  $2098\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 3-37). Somit entsprechen sie exakt den Positionen einer oxidierten, gereinigten MBH (Ludwig 2008).

### 3.4.12 *In vivo* Markierung der RH mit $^{13}\text{C}$ -Glycin-Derivaten unter GN-Bedingungen

Nachdem ein HypX-abhängiger Effekt auf die Reifung der MBH nun auch unter heterotrophen Bedingungen nachgewiesen werden konnte, sollte das Markierungsexperiment für die regulatorische Hydrogenase in GN-Medium wiederholt werden. Als Expressionsstämme wurden zwei Derivate von *Ralstonia eutropha* H16 verwendet. Diesen, HF967 ( $\Delta hoxBCGH \Delta glyA$ ) und HF971 ( $\Delta hoxCGH \Delta glyA \Delta hypX_2$ ), fehlten neben den großen Hydrogenas-

euntereinheiten der MBH und SH auch die Serin-Hydroxymethyl-Transferase (*glyA*). Dem Stamm HF967 ( $\Delta hoxBCGH \Delta glyA$ ) fehlte darüber hinaus auch die kleine Untereinheit der RH, wohingegen HF971 ( $\Delta hoxCGH \Delta glyA \Delta hypX_2$ ) zudem noch eine *in frame*-Deletion in *hypX* ( $\Delta hypX_2$ ) besaß. Desweiteren wurde das bereits in Kapitel 3.4.7 eingeführte Überexpressions-system für  $RH_{StopStrep}$  (pRH) erneut eingesetzt. Die Transkonjuganten wurden unter heterotrophen Bedingungen angezogen und bei einer  $OD_{436}$  von 1,0 geerntet (siehe auch Kapitel 2.2.4).

Nach Zugabe von uniform markiertem  $^{13}C_2$ -Glycin zeigte sich in Abwesenheit von HypX ein FTIR-Spektrum (Abbildung 3-38 A) das dem „Standardspektrum“ einer oxidierten RH entspricht, mit einem einzigen Absorptionsmaximum für den CO-Liganden bei  $1943\text{ cm}^{-1}$ . In Gegenwart von HypX zeigte sich eine nahezu quantitative Markierung des CO-Liganden. Neben einem dominanten Absorptionsmaximum bei  $1899\text{ cm}^{-1}$ , welches den  $^{13}CO$ -Liganden repräsentiert, existiert daneben jedoch auch noch ein kleiner *Peak* ( $\leq 5\%$ ) bei  $1943\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 3-38 B). Dieses Absorptionsmaximum ist auf die Aktivität der alternativen CO-Synthesewege zurückzuführen, die auch in HypX-Mutanten zur Hydrogenasereifung führen (z. B. Abbildung 3-38 A).



**Abbildung 3-38:**  $^{13}C$ -Markierungsexperimente des Carbonylliganden der RH unter heterotrophen (GN-) Bedingungen. FTIR-Spektren von  $RH_{StopStrep}$  isoliert aus  $\Delta glyA$ -Stämmen, die unter heterotrophen, dereprimierenden (GN-) Bedingungen kultiviert wurden. Das Anzuchtmedium wurde mit 5 mM des jeweiligen  $^{13}C$ -Glycin-Derivats supplementiert. A) FTIR-Spektrum der RH aus einem  $\Delta hypX_2$ -Stamm supplementiert mit  $^{13}C_2$ -Glycin. B) FTIR-Spektrum der RH aus einem „Wildtyp“-Stamm mit HypX-Aktivität supplementiert mit  $^{13}C_2$ -Glycin. C) FTIR-Spektrum der RH aus einem  $\Delta hypX_2$ -Stamm mit  $2-^{13}C$ -Glycin. D) FTIR-Spektrum der RH aus einem „Wildtyp“-Stamm mit HypX-Aktivität supplementiert mit  $2-^{13}C$ -Glycin. E) FTIR-Spektrum der RH aus einem Wildtyp-Stamm mit HypX-Aktivität supplementiert mit  $1-^{13}C$ -Glycin. Spektren wurden auf den CN-Bereich normiert.

Sollte diese Markierung tatsächlich exklusiv über den THF-abhängigen C<sub>1</sub>-Stoffwechsel verlaufen, so wäre eine Markierung des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms im verwendeten Glycin bereits hinreichend um eine quantitative Markierung des Carbonylliganden hervorzurufen. Demzufolge sollte eine vergleichbare, quantitative Markierung auch durch differentiell markiertes 2-<sup>13</sup>C-Glycin auftreten. Bei Verwendung von 1-<sup>13</sup>C-Glycin sollte es hingegen nicht zu einer Markierung des Carbonylliganden kommen, da das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe als CO<sub>2</sub> freigesetzt wird. Die entsprechenden FTIR-Spektren (Abbildung 3-38 C - E) zeigten mit 2-<sup>13</sup>C-Glycin ebenfalls eine nahezu quantitative Markierung des CO-Liganden. Wie der Vergleich zwischen den Spektren C) und D) zeigt, ist auch in diesem Fall die Markierung HypX-abhängig. Im Gegensatz dazu zeigte das Markierungsexperiment mit 1-<sup>13</sup>C-Glycin kein Absorptionsmaximum bei 1899 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 3-38 E). Da in dem hier verwendeten Expressionsstamm die endogene Kopie von HypX vorhanden war, ist gezeigt, dass lediglich das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom des Glycins zur HypX-vermittelten Markierung des CO-Liganden beiträgt.

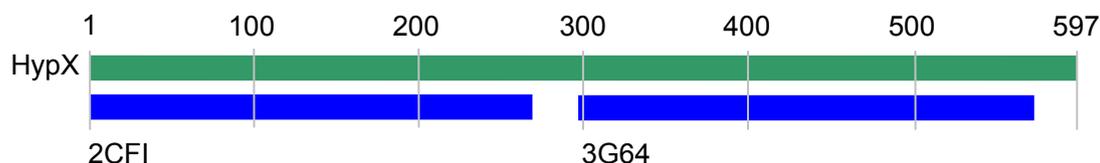
Diese Ergebnisse zeigen, dass mit nur einem einzigen markierten Kohlenstoffatom eine quantitative Markierung des CO-Liganden erreicht werden kann. In keinem Spektrum der RH mit <sup>13</sup>C-Glycin-Derivaten konnte eine Veränderung der Absorptionsmaxima in der CN<sup>-</sup>-Bande beobachtet werden. Es konnten immer zwei Maxima bei 2080 cm<sup>-1</sup> bzw. 2072 cm<sup>-1</sup> beobachtet werden. Das entspricht den Positionen der diatomaren Liganden in einer unmarkierten, oxidierten RH und zeigt das die <sup>13</sup>C-Glycin-vermittelte Markierung CO-spezifisch ist. Auch das <sup>13</sup>C-markierte Kohlenstoffdioxid, welches durch den Katabolismus von <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Glycin freigesetzt wird, führte bei einer Konzentration von 5 mM <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Glycin nicht zu einer Markierung der CN<sup>-</sup>-Liganden.

### 3.4.13 Struktur-Funktionsanalysen an HypX

Für weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Funktion bzw. des enzymatischen Mechanismus von HypX war es unabdingbar sich eingehend der Struktur zu widmen. Da es bis zum heutigen Tag keine Struktur zu HypX gibt, wurde HypX anhand seiner Homologie zu anderen Proteinen strukturell modelliert.

Zunächst wurden für dieses Struktur-Modelling, anhand der Aminosäuresequenz, die sekundären Strukturmerkmale – Helices, Faltblätter, Schleifen und *Random-Coils* – abgeleitet. Basierend auf Anzahl, Art und Reihenfolge dieser Strukturmerkmale lässt sich die Topologie des Proteins abbilden (Abbildung 6-3). Anhand dieser Topologie wurde mit Hilfe von HHsearch, einem Programm zur Erstellung hochqualitativer Homologie-Modelle, die höchste Übereinstimmung zu vorhandenen Strukturen in der RCSB-Proteindatenbank ermittelt (Soding 2005;

Soding, Biegert *et al.* 2005). In einem zweiten Schritt wurde mit SwissModel ein dreidimensionales Strukturmodell erzeugt (Arnold, Bordoli *et al.* 2006; Kiefer, Arnold *et al.* 2009). In der gesamten Datenbank gab es kein Protein, welches über seine gesamte Länge hinweg mit HypX vergleichbar wäre. Daher wurden die C-terminale und die N-terminale Domäne separat modelliert (siehe Abbildung 3-39).



**Abbildung 3-39: Strukturelle Homologien in HypX.** Für beide HypX-Domänen ergab das „Topologie-Mapping“ Übereinstimmungen mit katalytischen Domänen anderer Enzyme. Die N-terminale Domäne zeigt höchste Übereinstimmungen mit der Hydrolase-Domäne der  $N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase aus *Homo sapiens* (2CFI), die C-terminale Domäne hingegen zeigt Übereinstimmungen zur Enoyl-CoA-Hydratase aus *Streptomyces coelicolor* (3G64).

Die N-terminale Region (AS 1-264) zeigte dabei die größte Ähnlichkeit mit der Hydrolase-Domäne einer 10-Formyl-THF-Dehydrogenase (FTHFD) aus *Homo sapiens* (2CFI), wohingegen die C-terminale Hälfte die größte Ähnlichkeit zu einer Enoyl-CoA-Hydratase-Domäne aus *Streptomyces coelicolor* (3G64) besaß. Für einen Abschnitt von 24 Aminosäuren am Ende der HypX-Sequenz konnte keine strukturelle Übereinstimmung mit bekannten Proteinstrukturen gefunden werden. Ebenso konnte für den Abschnitt von AS 269-296 keine Übereinstimmung identifiziert werden. Dieser Abschnitt stimmt mit einer Region in der HypX-Sequenz überein, die unter allen bekannten HypX-Isoformen nur einen geringen Konservierungsgrad zeigt (siehe Abbildung 6-6) und vermutlich einen „Linker“ darstellt. Dieser „Linker“ dient wahrscheinlich dazu die beiden funktionellen Domänen des Proteins so zu koordinieren, dass daraus eine funktionale Einheit entsteht.

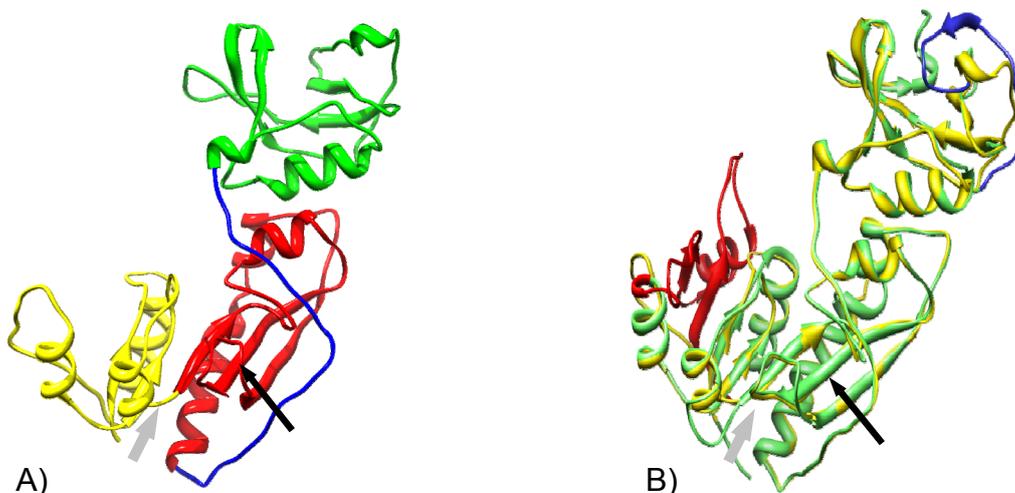
#### 3.4.14 *In silico*-Studie der $N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat-Bindestelle von HypX

Für den N-terminalen Bereich der Aminosäuren 1-264 wurde eine 15 %-ige Sequenzidentität mit der Hydrolase-Domäne der  $N^{10}$ -Formyl-THF-Dehydrogenase aus *Homo sapiens* (2CFI) ermittelt (Kursula, Schuler *et al.* 2006). Interessanterweise verweist dieses „Topologie-Mapping“, genau wie die Sequenzvergleiche von Rey *et al.* (Rey, Fernandez *et al.* 1996), auf eine  $N^{10}$ -Formyl-THF-Hydrolyase-Domäne.

Das entstandene Homologiemodell wurde mittels des *QMEAN4 Score* evaluiert. Der *QMEAN4* bemisst die Zuverlässigkeit des gesamten, generierten Modells. Der *QMEAN4 Score* liegt im Bereich zwischen 0 und 1, wobei höhere Werte ein besseres Modell bedeuten. Der globale *QMEAN4 Score* ist eine Kombination von vier strukturellen Parametern. Die lokale

Geometrie wird durch das Torsionswinkel-Potential von drei aufeinander folgenden Aminosäuren implementiert. Wechselwirkungspotentiale werden verwendet um langreichweitige Wechselwirkungen zu evaluieren. Dabei finden zwei Parameter Eingang in die Bewertung; die C $\beta$ -Interaktion und die *All-Atom*-Interaktion. Ferner wird die Solvatisierung als weiterer Parameter berücksichtigt (Benkert, Tosatto *et al.* 2008). Im konkreten Fall wurde ein *QMEAN4 Score* von 0,43 für das Modell der N-terminalen Domäne von HypX ermittelt.

Durch den strukturellen Sequenzvergleich mit der *N*<sup>10</sup>-Formyl-THF-Dehydrogenase aus *Homo sapiens* (2CFI) konnte eine L-förmige Struktur der N-terminalen *N*<sup>10</sup>-Formyl-Tetrahydrofolat-Hydrolase-Domäne aus HypX erstellt werden (Abbildung 3-40). Diese Struktur zeigte zwei distinkte Subdomänen, eine C-terminale Domäne (grün) und die N-terminale 10-CHO-THF-Bindestelle, die wiederum aus zwei Hälften (rot und gelb) besteht (Abbildung 3-40 A). Beide Domänen sind über einen unstrukturierten Abschnitt (AS 150-183; dunkelblau) miteinander verbunden. Diese Domänenarchitektur ist in vielen *N*<sup>10</sup>-Formyl-THF-hydrolysierenden Enzymen erhalten geblieben (Chumanevich, Krupenko *et al.* 2004; Kursula, Schuler *et al.* 2006; Reuland, Vlasov *et al.* 2006).



**Abbildung 3-40: Struktur der N-terminalen 10-CHO-THF-Domäne aus HypX.** A) Domänenarchitektur der Hydrolase-Domäne. Die N-terminale 10-CHO-THF-Bindestelle (besteht aus zwei Hälften; **Rot** und **Gelb**) reicht von AS 1-150. Diese ist über einen unstrukturierten Abschnitt (AS 151-183; **dunkelblau**) mit der C-terminalen Subdomäne verbunden (**Grün**). B) Überlagerung der Hydrolase-Domäne aus HypX (**Gelb**) und der *N*<sup>10</sup>-Formyl-Hydrolase-Domäne der FTHFD aus *Homo sapiens* (2CFIA; **Hellgrün**). Der graue Pfeil markiert das „Gelenk“ der 10-CHO-THF-Bindestelle; der schwarze Pfeil verweist auf das aktive Zentrum der Hydrolase-Domäne. Diese Abbildungen wurden mit Chimera v1.5.3 (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) erstellt.

Die Überlagerung der Strukturen der *N*<sup>10</sup>-CHO-THF-Bindedomäne aus HypX (gelb) und der *N*<sup>10</sup>-CHO-THF-Bindedomäne der menschlichen FTHFD (grün) (Abbildung 3-40 B) zeigte, dass beide Strukturen weitestgehend übereinstimmen. Lediglich zwei nennenswerte strukturelle Unterschiede ließen sich feststellen. In der N-terminalen Hälfte der THF-Bindedomäne der

menschlichen FTHFD konnten zwei parallele Faltblätter sowie eine antiparallele  $\alpha$ -Helix (rot) identifiziert werden. In der C-terminalen Subdomäne konnte ein modifizierter *Loop* (blau) festgestellt werden. Beide haben keine Entsprechungen in HypX. Eine funktionelle Bedeutung dieser Veränderung ist aufgrund der Entfernung zu den Aminosäuren des aktiven Zentrums (Abbildung 3-40; schwarzer Pfeil) unwahrscheinlich. Vielmehr scheinen diese Veränderungen, insbesondere der N-terminale *Loop* (Abbildung 3-40; roter Abschnitt), durch die Raumforderung der C-terminalen HypX-Domäne bedingt zu sein (siehe unten).

Der graue Pfeil markiert eine Schleife (AS 66-69), die als „Scharnier“ zwischen den beiden Hälften der 10-CHO-THF-Bindestelle dient. In FTHFD aus *Homo sapiens* führen diese beiden Hälften nach Bindung des Substrats eine konformationelle Änderung zueinander aus und schließen das Substrat somit ein. Da sich die Position der katalytisch aktiven Aminosäuren (His74 und Asp109) während dieses Vorgangs nicht ändert, wird angenommen, dass diese Konformationsänderung nicht für die eigentliche Hydrolyse der Formylgruppe notwendig ist (Kursula, Schuler *et al.* 2006).

#### **3.4.15 *In silico*-Studie der putativen Enoyl-CoA-Hydratase-Domäne von HypX**

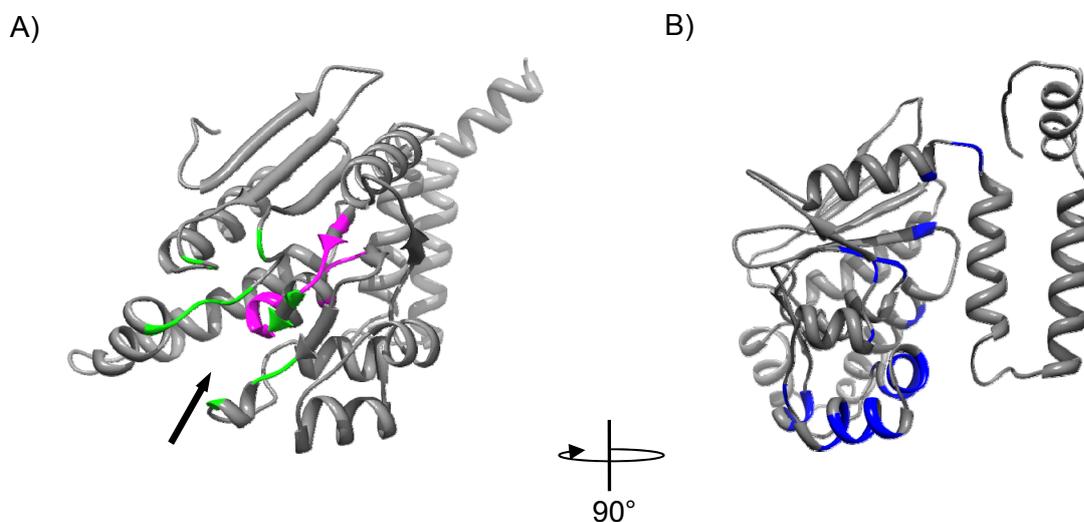
Wie bereits in Kapitel 3.4.2 erwähnt, stellten Rey *et al.* anhand eines Sequenzvergleiches fest, dass die C-terminale Region des HypX-Proteins hohe Ähnlichkeit mit einer Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase-Signatur aufweist (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Diese Signatur (PROSITE: PS00166) charakterisiert die Mitglieder einer Superfamilie von Enzymen - Crotonasen genannt, die eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen katalysieren und dabei diverse Substrate umsetzen können (Hamed, Batchelar *et al.* 2008).

Der Vergleich auf Ebene der sekundären Strukturmerkmale (*Topologie-Mapping*) zeigte jedoch höchste Übereinstimmung mit der potentiellen Enoyl-CoA-Hydratase-Domäne (3G64) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Abbildung 6-4), wobei für den C-terminalen Bereich der Aminosäuren 269-573 eine 22 %-ige Sequenzidentität mit dieser Domäne ermittelt wurde. Diese Enoyl-CoA-Hydratase ist ein Homotrimer und katalysiert die Hydratisierung von Doppelbindungen mittels eines Wassermoleküls (Bahnson, Anderson *et al.* 2002).

Auf Grundlage dieses strukturellen Vergleichs konnte auch für die C-terminale Domäne eine Struktur erstellt werden. Die Struktur erinnert an ein Scheibensegment, wobei am C-Terminus ein Bereich (AS 509-597) mit drei  $\alpha$ -Helices deutlich absteht (Abbildung 3-41 B). Für das Homologiemodell der C-terminalen Domäne von HypX wurde ein *QMEAN4 Score* von 0,5 ermittelt.

Anhand eines Abgleichs mit der CDD-Datenbank (*Conserved Domain Database*) konnten innerhalb der C-terminalen Domäne von HypX drei zusätzliche Signaturen identifiziert werden (Marchler-Bauer, Anderson *et al.* 2009; Marchler-Bauer, Lu *et al.* 2011).

Die erste Signatur charakterisiert das sogenannte *Oxyanionische Loch*. Dieses „Loch“ ist ein Element des katalytischen Mechanismus vieler Crotonase-Enzyme und dient der Stabilisierung eines reaktiven Oxyanionen-Intermediats während der Katalyse. Es wird von nur zwei konservierten Aminosäuren gebildet (Abbildung 6-4; Rautezeichen), die über die positiven Ladungen der Aminogruppen ihres Proteinrückgrates einen stabilisierenden Effekt auf das Zwischenprodukt ausüben (Hamed, Batchelar *et al.* 2008).



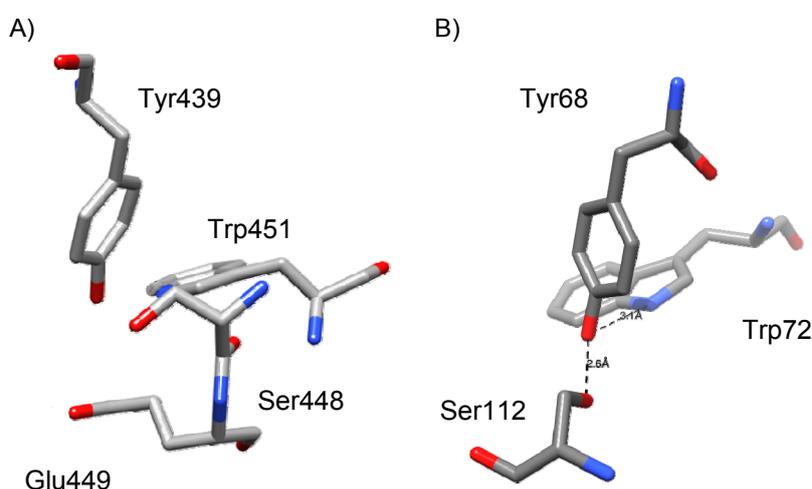
**Abbildung 3-41: Struktur der C-terminalen Hydratase-Domäne aus HypX.** A) In den Bändermodellen der C-terminalen HypX-Domäne (AS 269-573) sind die Aminosäuren, die im Motiv PS00166 (**Magenta**) bzw. in der Hydratase-Substratbindestelle (**Grün**) konserviert sind, farbig hervorgehoben. B) AS die Bestandteil des „Trimerisierungsinterface“ sind, sind **blau** hervorgehoben. Die Tafel B) ist bezüglich der Tafel A) um 90° in der Hochachse gedreht. Der Pfeil verweist auf die potentielle Substratbindestelle / aktive Zentrum. Diese Abbildungen wurden mit Chimera v1.5.3 (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) erstellt.

Das zweite Element ist eine Substratbindestelle, wie sie bei Hydroxycinnamoyl-CoA-Hydratase (2VSS) und 4-Chlorobenzoyl-CoA-Dehalogenasen (1NZY) aus Pseudomonaden vorkommt (Benning, Taylor *et al.* 1996; Bennett, Bertin *et al.* 2008). In HypX ist diese mit 14 von 15 AS konserviert (Abbildung 3-41 A und Abbildung 6-4; Grün). Diese Bindestellen liegen jeweils am Interface zweier Proteinketten dieser homomultimeren Enzyme. Die beiden Aminosäuren, die das *Oxyanionische Loch* bilden, sind auch Bestandteil dieser Signatur (Abbildung 6-4 und Abbildung 3-41 A; Grün). Das PROSITE-Motiv (PS00166), welches zunächst über den Sequenzvergleich identifiziert werden konnte (Abbildung 3-27), zeigte dabei teilweise Überlagerungen mit dieser Signatur (<sub>415</sub>AGG<sub>417</sub>). Abgesehen davon befinden sich die meisten Aminosäuren nicht in unmittelbarer Nähe zum vermeintlichen aktiven Zentrum

(Abbildung 3-41 A; Magenta). Sie bilden also eine nachgeordnete Sphäre, die vermutlich nur mittelbar in die Katalyse involviert ist.

Das dritte neu identifizierte Motiv ist ein Trimerisierungsinterface (Abbildung 3-41 B; Blau). Dieses Motiv kann mit 27 von 28 AS auf die HypX-Sequenz übertragen werden (Abbildung 6-4; blau). Da etliche Hydratasen der Crotonase-Superfamilie Homomultimere sind, dient dieses Motiv im nativen Enzym (z. B. 2VRE) der Ausbildung der Quartärstruktur (Hamed, Batchelar *et al.* 2008). In HypX unterstützt dieses Motiv womöglich die Bildung der Tertiärstruktur. In der Tat sind die konservierten AS des Trimerisierungsinterface vorwiegend an der Seite der Domäne zu finden, die höchstwahrscheinlich in direktem Kontakt mit der N-terminalen Hydrolase-Domäne steht (siehe Diskussion).

Durch diese Studien konnten zwei distinkte Domänen identifiziert werden, die jeweils ein aktives Zentrum aufweisen. Demzufolge ist hier mit zwei völlig unabhängigen katalytischen Reaktionen zu rechnen. Während die Funktion der N-terminalen Domäne die Hydrolyse von  $N^{10}$ -Formyl-THF ist, ist die Funktion der C-terminalen „Crotonase“-Domäne weiterhin schwer fassbar. Anhaltspunkte gab der Vergleich mit einer anderen Klasse von Hydratasen, die sich – ähnlich der bereits erwähnten Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase) – dadurch auszeichnet, dass sie die kovalenten Mehrfachbindungen zwischen zwei Atomen durch Addition von Wasser aufbrechen kann, die sogenannten Nitril-Hydratasen (NHasen). In der Nitril-Hydratase aus *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095 wird die Hydrolyse durch eine Triade von AS (Ser-Tyr-Trp) katalysiert (Mitra und Holz 2007). Abwandlungen dieser katalytischen „Triade“ sind in allen bekannten Nitril-Hydratasen zu finden und erinnern zudem an die katalytischen Triaden aus Nicht-Metallodehydrogenasen (Clark und Ensign 2002; Jones und Thornton 2004). Tatsächlich finden sich in einer Region, welche sich C-terminal der bekannten Crotonase-Signatur befindet, eine Reihe von AS, die in der Klasse der HypX-Proteine durchgehend konserviert sind (Abbildung 3-28).



**Abbildung 3-42: Vergleich der katalytischen „Triade“ der C-terminalen HypX-Domäne mit der katalytischen Triade von Nitril-Hydratasen.** Der direkte Vergleich der C-terminalen HypX-Domäne (A) und der Kristallstruktur einer Nitril-Hydratase (IIRE) aus *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095 (B) zeigt deutliche Übereinstimmung, sowohl in der AS-Komposition als auch den Abständen der AS zueinander. Diese Abbildungen wurden mit Chimera v1.5.3 (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) erstellt.

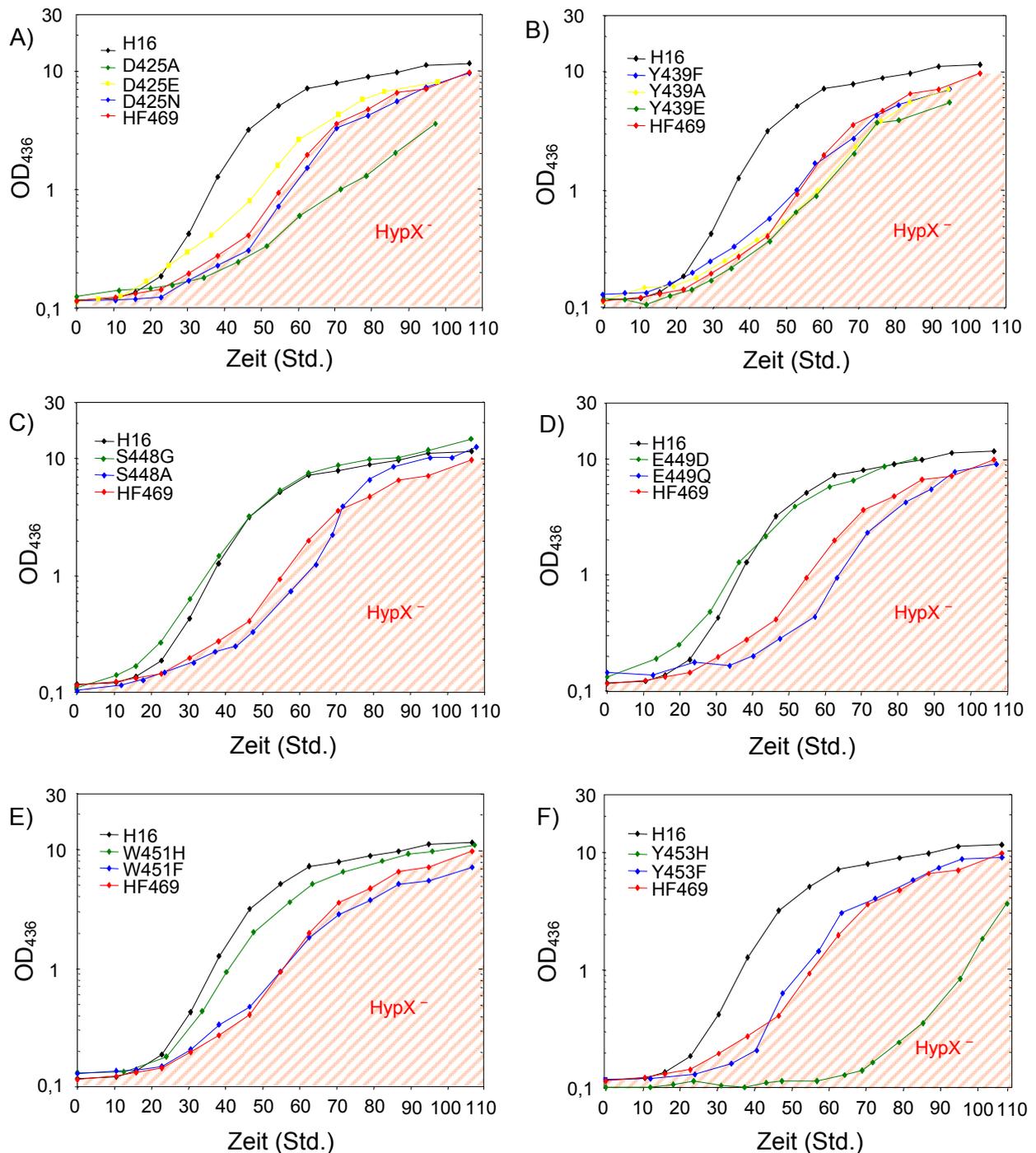
Anhand der Struktur der C-terminalen HypX-Domäne ist zu erkennen, dass drei dieser hochkonservierten AS Tyr439-Ser448-Trp451 räumlich nahezu perfekt mit der katalytischen Triade aus Nitril-Hydratasen übereinstimmen (Abbildung 3-42). Eine zusätzlich dargestellte saure Aminosäure, Glu449, ist in HypX ebenfalls hochkonserviert und findet sich oft als aktives Oxyanion im aktiven Zentrum der Crotonase-Enzyme (Hamed, Batchelar *et al.* 2008).

Damit verdichten sich die Indizien, dass es sich bei der C-terminalen Domäne in HypX womöglich um eine De-/Hydratase handelt. Die Notwendigkeit der identifizierten katalytischen Triade für die Funktionsfähigkeit von HypX sollte im Folgenden experimentell untersucht werden.

#### **3.4.16 Charakterisierung der C-terminalen Domäne von HypX mittels ortsspezifischer Mutagenese**

Um die Natur der C-terminalen Domäne zu determinieren und katalytisch aktive Aminosäuren zu identifizieren, wurden bestimmte Aminosäuren mittels ortsspezifischer Mutagenese ausgetauscht. Sollte die C-terminale Domäne, wie die N-terminale Domäne, auch für die CO-Synthese notwendig sein, so sollte sich die Substitution der aktiven AS auch durch eine Verzögerung des chemolithoautotrophen Wachstums bemerkbar machen. Es wurden 14 Plasmide (siehe Tabelle 2) mit Punktmutationen in einer Region mit überdurchschnittlich vielen Codonen, die für hochkonservierte AS kodieren (siehe Abbildung 3-28; blaue Buchstaben), hergestellt (Kapitel 2.9.3). Diese Region liegt unmittelbar C-terminal der Substratbindestelle. Die mutierten *hypX*-Allele wurden über doppelt homologe Rekombination in das Megaplasmid von *Ralstonia eutropha* H16 eingebracht (Kapitel 2.10.5). Die so entstandenen isogenen Stämme (siehe Tabelle 1) wurden unter lithoautotrophen Bedingungen in Minimalmedium mit 10 % H<sub>2</sub>, 15 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 65 % N<sub>2</sub> (in v/v) in der Gasphase kultiviert. Das Wachstum wurde auf eine HypX-abhängige Wachstumsverzögerung hin untersucht (Abbildung 3-43).

Um die Proteinstabilität der mutagenisierten HypX-Varianten zu überprüfen, wurden parallel die entsprechenden H16-Derivate (siehe Tabelle 1) heterotroph in FGN-Medium angezogen und bei einer OD<sub>436</sub> von  $9,0 \pm 1,0$  geerntet (Kapitel 2.2.6) und anschließend aufgeschlossen (Kapitel 2.3.1). Im Anschluss wurden je 10 µg Protein des löslichen Extrakts über SDS-PAGE aufgetrennt und über eine immunologische Färbung nachgewiesen (Kapitel 2.5 und 2.6). Der AK reagierte dabei mit einer Bande von knapp mehr als 60 kDa. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Größe von HypX (65,7 kDa). Zudem war diese Bande in HF469 (H16  $\Delta hypX_2$ ) nicht nachweisbar (Abbildung 3-44).

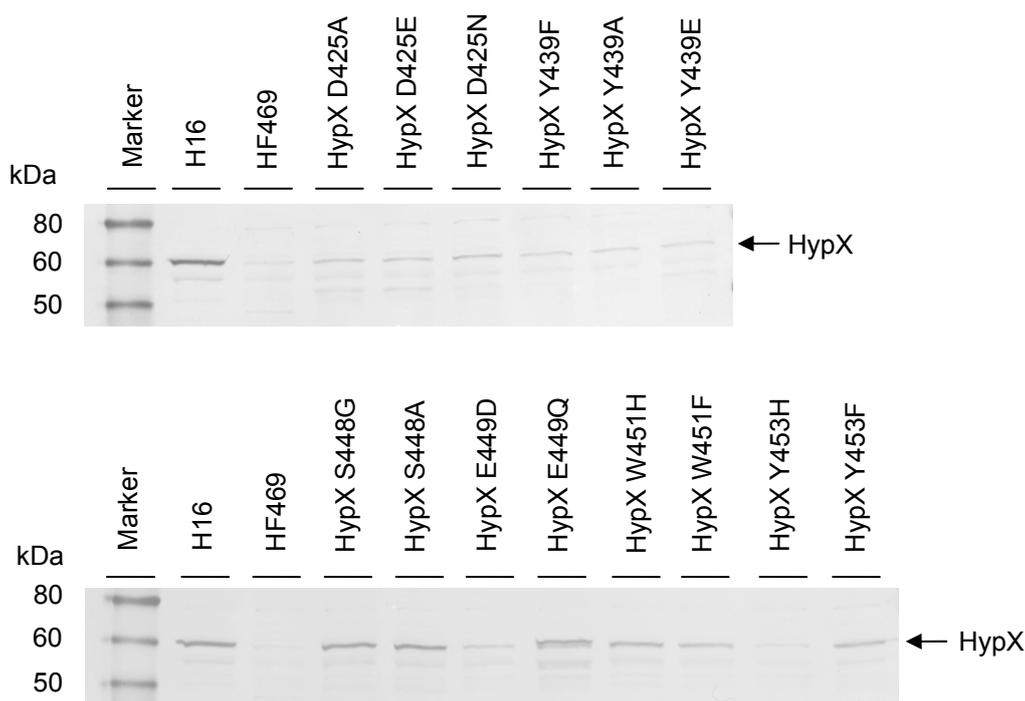


**Abbildung 3-43: Lithoautotrophes Wachstum von Mutanten mit ortsspezifischen Aminosäureaustauschen in der C-terminalen HypX-Domäne.** Das chemolithoautotrophe Wachstum verschiedener *HypX*-Mutanten im Vergleich zu einer Positivkontrolle (H16) und einer Negativkontrolle (HF469). Die Zellen wurden in Minimalmedium (AutN; pH 7,0) mit 10 %  $H_2$ , 15 %  $O_2$ , 10 %  $CO_2$  und 65 %  $N_2$  (in v/v) kultiviert. Das Wachstum wurde als Absorption bei 436 nm gemessen. Es wurden sechs hochkonservierte AS des mutmaßlichen aktiven Zentrums der C-terminalen *HypX*-Domäne substituiert; D425 (A), Y439 (B), S448 (C), E449 (D), W451 (E), Y453 (F).

Die erste untersuchte Aminosäure war D425. Diese AS ist Bestandteil des Enoyl-CoA-Hydratase-Motives (PS00166) und durchweg in allen untersuchten *HypX*-Isoformen konserviert. Da die enzymkatalysierten Reaktionen der Crotonase-Superfamilie, so auch ihre Hydratasen,

zumeist auf *Oxyanionen-Chemie* beruhen, ist eine Beteiligung dieser sauren, hochkonservierten AS wahrscheinlich. Das Aspartat an Position 425 wurde im Rahmen dieser Studie durch das strukturell ähnliche Asparagin, das ebenfalls saure Glutamat sowie Glutamin ersetzt (Abbildung 3-43 A).

Jede dieser Austauschmutanten zeigte den HypX-Phänotyp. In allen drei mutagenisierten HypX-Varianten war das Protein im löslichen Extrakt in verminderter Menge nachweisbar, demzufolge ist D425 für die Stabilität des Proteins wichtig (Abbildung 3-44).



**Abbildung 3-44: Proteininstabilität von HypX Austauschmutanten.** Die verschiedenen HypX-Mutanten wurden heterotroph in FGN-Medium angezogen. Der lösliche Extrakt wurde über 12 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde über einen spezifischen  $\alpha$ -HypX-Antikörper HypX (65,7 kDa) nachgewiesen. Pro Spur wurden 10  $\mu$ g Protein aufgetragen.

Das Codon für Tyrosin 439 wurde gegen Codone für Phenylalanin, Alanin und das saure Glutamat ausgetauscht (Abbildung 3-43 B). Alanin weist weder strukturelle noch funktionale Ähnlichkeiten zu Tyrosin auf, wohingegen Phenylalanin, abgesehen von der endständigen Hydroxygruppe, identisch mit *p*-Hydroxyphenylalanin (Tyrosin) ist. In keiner dieser Austauschmutanten war die entsprechende HypX-Variante funktional. Bei allen drei AS-Substitutionen war HypX in leicht verminderter Menge nachweisbar (Abbildung 3-44).

Die nachfolgend untersuchten Aminosäuren sind alle in einem distinkten Motiv zu finden; G-[N/-]-L-[Y/F/S]-G-S-E-[Y/F/L]-[W/H]-T-Y, welches sich in allen HypX-Isoformen findet und für diese Proteinfamilie charakteristisch ist (vergleiche Kapitel 3.4.2).

Das Serin an Position 448 wurde durch Glycin und Alanin ersetzt. Interessanterweise war nur eine der beiden Austauschmutanten, S448G, noch aktiv (Abbildung 3-43 C). In der Alanin-Mutante hingegen war HypX inaktiv. Beide Proteinvarianten waren stabil (Abbildung 3-44).

Wie bereits erwähnt basieren die katalytischen Mechanismen in Hydratasen der Crotonase-Superfamilie auf *Oxyanionen-Chemie*, die notwendigen Oxyanionen werden durch Deprotonierung der Carboxygruppen saurer Aminosäuren erzeugt (Hamed *et al.* 2008). Daher wurden für das Glutamat 449 ( $pK_s = 3,9$ ) sowohl Glutamin als auch Aspartat ( $pK_s = 4,1$ ) als Surrogate verwendet (Abbildung 3-43 D). Glutamin, dem Glutamat strukturell ähnlich, jedoch ohne dessen zweite Carboxylgruppe und Aspartat, eine weitere saure Aminosäure, sollten belegen, dass diese hochkonservierte Aminosäure durch die Bereitstellung eines Oxyanions an dieser Position Einfluss auf die Funktion von HypX nimmt. Tatsächlich zeigte die E449D-Mutante Wachstum auf dem Niveau von H16, wohingegen E449Q den HypX-Phänotyp zeigte. Interessant war in diesem Vergleich die Untersuchung der Stabilität der mutagenisierten Proteine, da ausgerechnet die E449D-Variante in verminderter Menge vorlag. Im Gegensatz dazu war die E449Q-Variante in unverminderter Menge nachweisbar (Abbildung 3-44).

Bei den W451-Mutanten wurde Tryptophan gegen Histidin bzw. Phenylalanin ausgetauscht (Abbildung 3-43 E). Das Wachstum der Phenylalanin-Austauschmutante zeigte dieselbe Latenzphase wie HF469 (H16  $\Delta hypX_2$ ). Die Histidin-Mutante hingegen zeigte Wachstum auf Wildtyp-Niveau. Beide HypX-Varianten waren stabil (Abbildung 3-44).

Das Tyrosin an Position 453 wurde im Verlauf dieser Mutagenesestudie durch Histidin und Phenylalanin ersetzt (Abbildung 3-43 F). Beide Varianten zeigten einheitlich eine deutliche Wachstumsverzögerung unter lithoautotrophen Bedingungen. Dies unterstreicht die essentielle Bedeutung dieser Aminosäuren. Während sich die Y453F-Mutante jedoch genau wie HF469 (H16  $\Delta hypX_2$ ) verhielt, war die Latenzphase in der Y453H-Mutante deutlich verlängert. Warum die Y453H-Mutante diesen ausgeprägteren physiologischen Effekt zeigte, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. Durch Charakterisierung zweier unabhängiger Klone konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass dieser Phänotyp auf eine unbeabsichtigte, doppelte Mutation zurückzuführen ist. Während HypX Y453F stabil war, war in der Y453H-Mutante nahezu kein HypX mehr nachweisbar (Abbildung 3-44).

**Tabelle 7: Zusammenfassung der HypX<sup>-</sup>-Mutagenese:** Die Wachstumsverzögerung wird gemessen als Zeit von der Inokulation bis zum Erreichen einer OD<sub>436</sub> von 1,0. Die Latenzen sind der Mittelwert aus zwei bzw. drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Mutante	Physiologischer Phänotyp	Latenzphase (Std.) <sup>a</sup>	Proteinstabilität <sup>b</sup>
Wildtyp	HypX <sup>+</sup>	33,8 ± 4,6	+
$\Delta hypX_2$	HypX <sup>-</sup>	72,7 ± 17,9	-
D425A	HypX <sup>-</sup>	70,5 ± 4,9	(+)
D425N	HypX <sup>-</sup>	57,8 ± 0,4	(+)
D425E	HypX <sup>-</sup>	67,3 ± 27,2	(+)
Y439F	HypX <sup>-</sup>	55,0 ± 0,0	(+)
Y439A	HypX <sup>-</sup>	62,0 ± 2,1	(+)
Y439E	HypX <sup>-</sup>	77,0 ± 19,1	(+)
S448A	HypX <sup>-</sup>	62,5 ± 0,7	+
S448G	HypX <sup>+</sup>	32,8 ± 2,5	+
E449Q	HypX <sup>-</sup>	79,5 ± 10,6	+
E449D	HypX <sup>+</sup>	39,3 ± 6,7	(+)
W451H	HypX <sup>+</sup>	46,5 ± 7,8	+
W451F	HypX <sup>-</sup>	56,8 ± 1,8	+
Y453H	HypX <sup>-</sup>	101,8 ± 7,4	-
Y453F	HypX <sup>-</sup>	62,3 ± 1,8	+

<sup>a</sup> Definiert als Zeit bis OD<sub>436</sub>=1,0, <sup>b</sup> Protein auf Wildtyp-Niveau +, leicht verminderte Proteinmenge (+), kein Protein -

Die Ergebnisse der ortsspezifischen Mutagenesestudie sowie der Proteinstabilitätsstudie wurden in Tabelle 7 zusammengefasst.

### 3.4.17 Beide Domänen agieren konzertiert bei der Synthese des Carbonylliganden

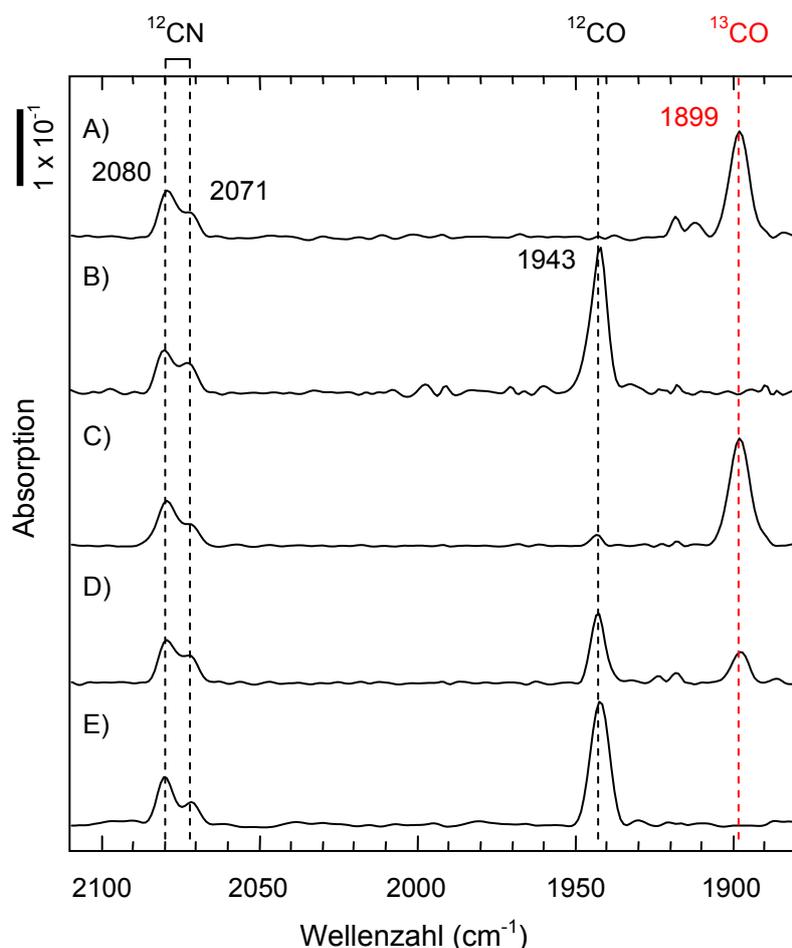
Als Arbeitsmodell wurde postuliert, dass HypX ein Multifunktionsprotein sei und gleichzeitig mehrere Schritte in der Maturation katalysieren könne. Dabei wurde neben der Synthese des CO-Liganden anfänglich auch eine Funktion bei der Synthese zusätzlicher CN-Liganden postuliert (siehe Einleitung). Um zu verifizieren, dass beide Domänen tatsächlich substanzielle Teile derselben enzymatischen Gesamtreaktion sind, nämlich der Biosynthese des Carbonylliganden, wurde daher ein Markierungsexperiment mit Punktmutationen in beiden Domänen (N-terminale Domäne: D109N; C-terminale Domäne: W451F, Y439E) durchgeführt.

Im Gegensatz zur Deletionsmutante, HF469, bei der etwa ein Viertel des gesamten Proteins auf genetischer Ebene entfernt wurde, sollte hier durch Punktmutanten gezielt jede der beiden Domänen ausgeschaltet werden. FTIR-Spektroskopie sollte nachweisen, dass die Funktionalität beider Domänen für eine erfolgreiche Markierung des Carbonylliganden notwendig ist.

Dazu wurden Plasmide hergestellt, die Punktmutationen in den hochkonservierten, katalytisch-aktiven AS beider Domänen von HypX enthielten (siehe Kapitel 3.4.16 und Buhrke

2006). Die mutierten *hypX*-Allele wurden über doppelt homologe Rekombination in das Megaplasmid von *Ralstonia eutropha* eingebracht. So entstand eine Reihe isogener Stämme, welche mittels FTIR-Spektroskopie charakterisiert werden konnten.

Diese Stämme wurden heterotroph in GN-Medium angezogen. Die Zellen wurden anschließend bei einer  $OD_{436}$  von  $\sim 1,0$  geerntet (Kapitel 2.2.4). Alle verwendeten Stämme waren  $\Delta glyA$ -Derivate, die Glycin-Auxotrophie wurde bei allen Kulturen mit 5 mM  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Glycin komplementiert. Aus diesen Zellen wurde, wie in Kapiteln 2.3.1 und 2.4.2 beschrieben,  $RH_{\text{StopStrep}}$  (pRH) gereinigt und mittels FTIR-Spektroskopie analysiert.



**Abbildung 3-45: FTIR-Spektren gereinigter RH aus verschiedenen Hintergründen mit ortsspezifischen Aminosäureaustauschen in beiden HypX-Domänen.** FTIR-Spektren gereinigter RH.  $RH_{\text{StopStrep}}$  wurde heterotroph in GN-Medium mit 5 mM  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Glycin exprimiert und anschließend gereinigt. Dazu wurde das Expressionsplasmid (pRH) in verschiedene Hintergründe transkonjugiert. Zur Untersuchung der N-terminalen Domäne wurde als „Wildtyp“ ein H16-Derivat HF965 (H16  $\Delta glyA$ ) (A) und ein HF485-Derivat HF970 (H16  $\Delta glyA$  HypX D109N) (B) verwendet. Als „Wildtyp“-Hintergrund zur Charakterisierung der C-terminalen Domäne wurde der bereits eingeführte Stamm HF967 (H16  $\Delta hoxBCGH \Delta glyA$ ) (C) verwendet (siehe Kapitel 3.4.7). Zwei Mutanten, die nachweislich einen HypX-Phänotypen aufweisen (Kapitel 3.4.16), HF995 (H16  $\Delta hoxBCGH \Delta glyA$  HypX W451F) (D) und HF990 (H16  $\Delta hoxBCGH \Delta glyA$  HypX Y439E) (E) dienen zur Untersuchung der Hydratase-Domäne. Die Spektren wurden auf die CN-Banden normiert.

Zur Untersuchung der N-terminalen Hydrolase-Domäne wurde ein H16-Derivat mit einer D109N-Punktmutation in HypX (HF485) verwendet, in welches zusätzlich noch eine Deletion in *glyA* eingebracht wurde (Abbildung 3-45 B). Als Kontrolle wurde ein  $\text{HypX}^+$ -Stamm HF965 (H16  $\Delta glyA$ ) als Expressionshintergrund verwendet (Abbildung 3-45 A). Während in der Kontrolle lediglich ein Absorptionsmaximum bei  $1899\text{ cm}^{-1}$  zu sehen war und somit eine quantitative Markierung des CO-Liganden zu erkennen war (Abbildung 3-45 A), war in der Mutante eine Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu einer Wellenzahl von  $1943\text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Eine  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Glycin-abhängige Markierung des CO-Liganden hatte in dieser Mutante

nicht stattgefunden. Folglich ist die Hydrolaseaktivität der N-terminalen HypX-Domäne für die CO-Synthese erforderlich.

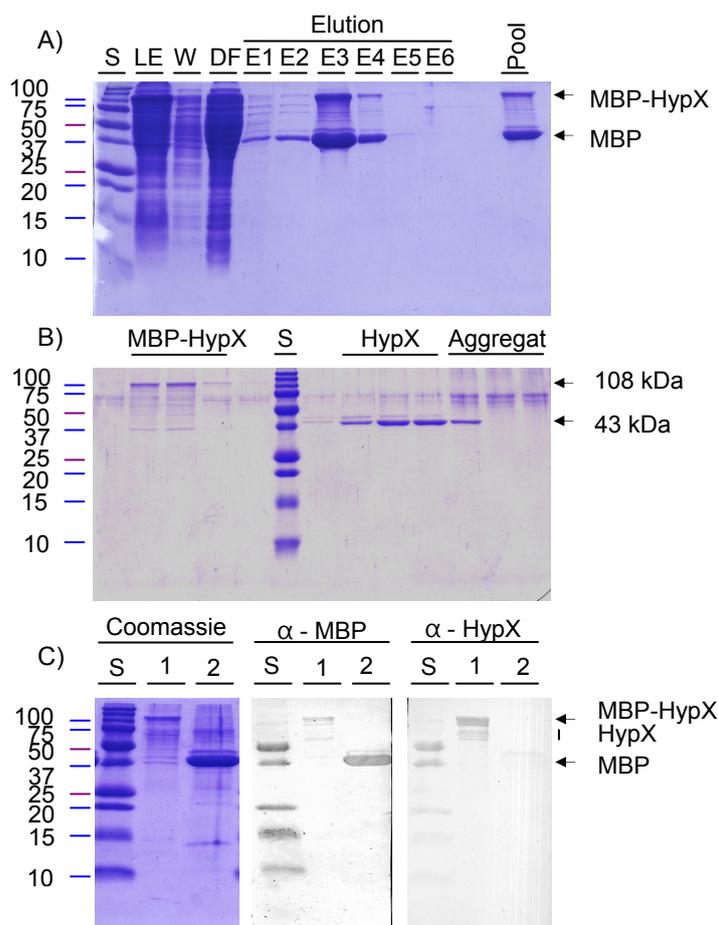
Zur Untersuchung der C-terminalen Domäne wurden zwei hochkonservierte AS, W451 und Y439, ausgetauscht. Parallele Untersuchungen auf physiologischer Ebene zeigten bei beiden verwendeten Mutanten (W451F und Y439E) einen deutlichen HypX-Phänotyp (siehe Kapitel 3.4.16). Obgleich der Reaktionsmechanismus noch unbekannt ist, muss daher angenommen werden muss, dass beide AS für den katalytischen Umsatz essentiell sind. Beide Mutationen wurden in den bewährten Expressionsstamm für Markierungsexperimente HF967 (H16  $\Delta$ *hoxBCGH*  $\Delta$ *glyA*) eingebracht. Als Kontrolle wurde derselbe Expressionsstamm ohne entsprechende Punktmutation in HypX verwendet. Diese Kontrolle zeigte die bereits bekannte quantitative Markierung des Carbonylliganden mit einem einzelnen *Peak* bei 1899  $\text{cm}^{-1}$  (Abbildung 3-45 C). Im Gegensatz dazu zeigten beide Mutanten ein anderes Bild. Bei beiden Spektren lag die Hauptabsorption in der CO-Bande bei 1943  $\text{cm}^{-1}$ . Doch während es bei der Y439E-Mutante nur ein einziges Absorptionsmaximum gab (Abbildung 3-45 E), gab es bei der W451F-Mutante einen zusätzlichen *Peak* bei 1899  $\text{cm}^{-1}$  (Abbildung 3-45 D). Wenngleich dieser zweite *Peak* mit einem relativen Anteil von ca. 30 % einen deutlich geringeren Anteil an der CO-Gesamtpopulation stellte, verweist er dennoch auf eine HypX-Restaktivität. Diese Restaktivität ist dabei jedoch nicht ausreichend, um den HypX-Phänotyp während des lithoautotrophen Wachstums zu komplementieren (siehe dazu Abbildung 3-43 E).

Die vorgenannten Ergebnisse zeigen, dass die Funktionalität sowohl der N-terminalen als auch der C-terminalen Domänen für die HypX-abhängige Biosynthese des Carbonylliganden gewährleistet sein muss. Da die Proteinstabilität nicht bzw. nur geringfügig betroffen ist (siehe 3.4.16), muss für alle drei ausgetauschten AS eine wichtige Funktion bei der Katalyse angenommen werden.

### 3.4.18 HypX enthält einen unerwarteten mononuklearen Kofaktor

Da gereinigtes Protein die Grundlage für alle weitergehenden biochemischen Untersuchungen an HypX ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Versuche unternommen HypX mittels eines vergleichsweise kurzen *Strep*-TagII<sup>®</sup> bzw. über einen Poly-Histidin-Tag zu reinigen. Jedoch schlug die Überexpression bei fast allen konstruierten Überexpressionsplasmiden fehl, obgleich die Richtigkeit der Konstrukte auch hier durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Die beobachteten Schwierigkeiten bei der Überexpression von HypX sind konsistent mit zuvor beschriebenen Problemen der HypX-Expression einer Studie über Hyp-Proteinkomplexe aus *R. eutropha* H16 (Jahns 2005).

Lediglich ein Konstrukt, ein MBP::HypX-Fusionsprotein, erbrachte nennenswerte Ausbeuten an HypX-Protein. Dazu wurde das etwa 42,5 kDa große MBP (engl.: *Maltose Binding Protein / malE*) an den N-Terminus von HypX fusioniert (siehe Kapitel 2.9.4). Dieses Überexpressionsplasmid (pCH631) wurde in *E. coli* JM109 transformiert und die entsprechenden Transformanten in LSLB-Medium kultiviert (siehe Kapitel 2.2.2 und 2.3).



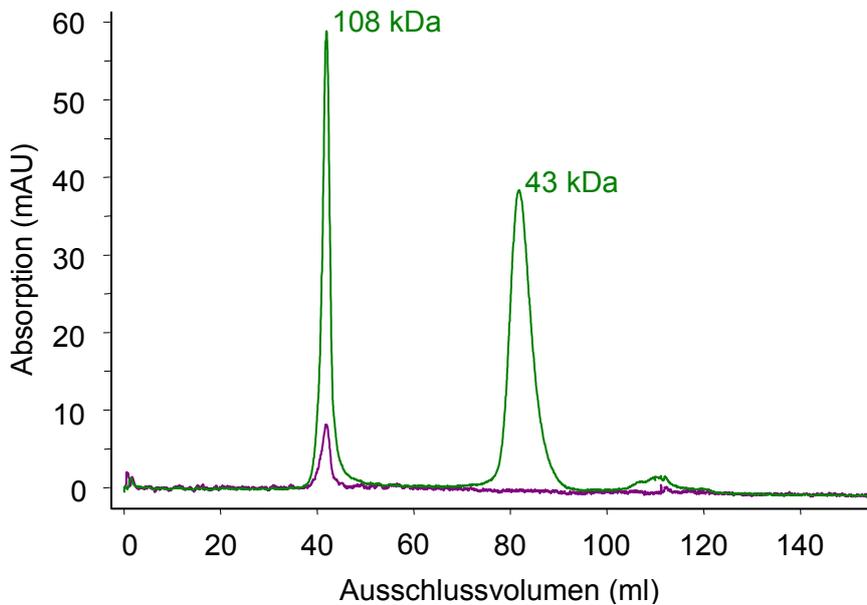
**Abbildung 3-46: Reinigung des MBP::HypX-Fusionsproteins.**

Das MBP::HypX-Fusionsprotein wurde in *E. coli* JM109 exprimiert. Die Zellen wurden mit 0,3-0,5 mM IPTG induziert. Nach Ernte und Aufschluss wurden MBP / MBP::HypX in mehreren Schritten gereinigt. A) Affinitätschromatographie von MBP / MBP::HypX. S, Größenstandard; LE, Löslicher Extrakt; W, Waschfraktion; DF, Durchfluss; E1-E6, Elutionsfraktionen; Pool, vereinigte Elutionsfraktionen. Pro Spur wurden je 1 µl LE, W und DF, sowie je 10 µl E1-E6 aufgetragen. Es wurden zudem 10 µg vereinigt Eluat aufgetragen. B) Eine Größenausschlusschromatographie erfolgte im Anschluss. Von den Elutionsfraktionen (1 ml) wurden je 5 µg Protein aufgetragen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und auf ein Volumen von 500 µl eingengt. C) Das gereinigte und konzentrierte Protein wurde über 12 %-ige SDS-Page und auf NC-Membran übertragen. Die Identität der Proteine wurde mittels α-MBP- und α-HypX-Antikörper untersucht. Pro Spur wurden 10 (1) bzw. 15 (2) µg Protein aufgetragen. S, Größenstandard; 1, MBP::HypX; 2, MBP.

Nach Anzucht (siehe Kapitel 2.3.3) und Ernte wurde das Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über eine Amylosematrix gereinigt. Dabei zeigten sich zwei dominierende Banden im SDS-Gel bei ca. 110 kDa bzw. 43 kDa. Die größere der beiden Banden ist in guter Übereinstimmung mit dem Fusionsprotein (HypX 66 kDa und MBP 42,5 kDa). Die kleinere der Beiden, bei ca. 43 kDa, stimmt mit der Größe des monomeren MBP überein (Abbildung 3-46 A). Der große Anteil an monomeren MBP beruht dabei vermutlich auf einem Abbau des heterolog exprimierten HypX, vor oder während der Reinigung. Interessanterweise war im konzentrierten Eluat eine deutlich grün-bräunliche Färbung zu erkennen.

Im Anschluss wurde das Eluat (MBP und MBP::HypX) mittels Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt (siehe Kapitel 2.3.4, Abbildung 3-46 B und Abbildung 3-47). Das dabei aufgezeichnete UV-Vis-Spektrum bei 280 nm zeigte im Verlauf der Reinigung zwei

Absorptionsmaxima. Das erste Maximum bei 108 kDa repräsentiert das MBP::HypX-Fusionsprotein, wohingegen das zweite Absorptionsmaximum bei 43 kDa nur MBP repräsentiert. Ein parallel aufgenommenes Spektrum bei 415 nm zeigte ein geringes Absorptionsmaximum auf Höhe des Fusionsproteins. Absorption bei dieser Wellenlänge deutet auf ein koordiniertes Metall-Ion als Kofaktor hin.



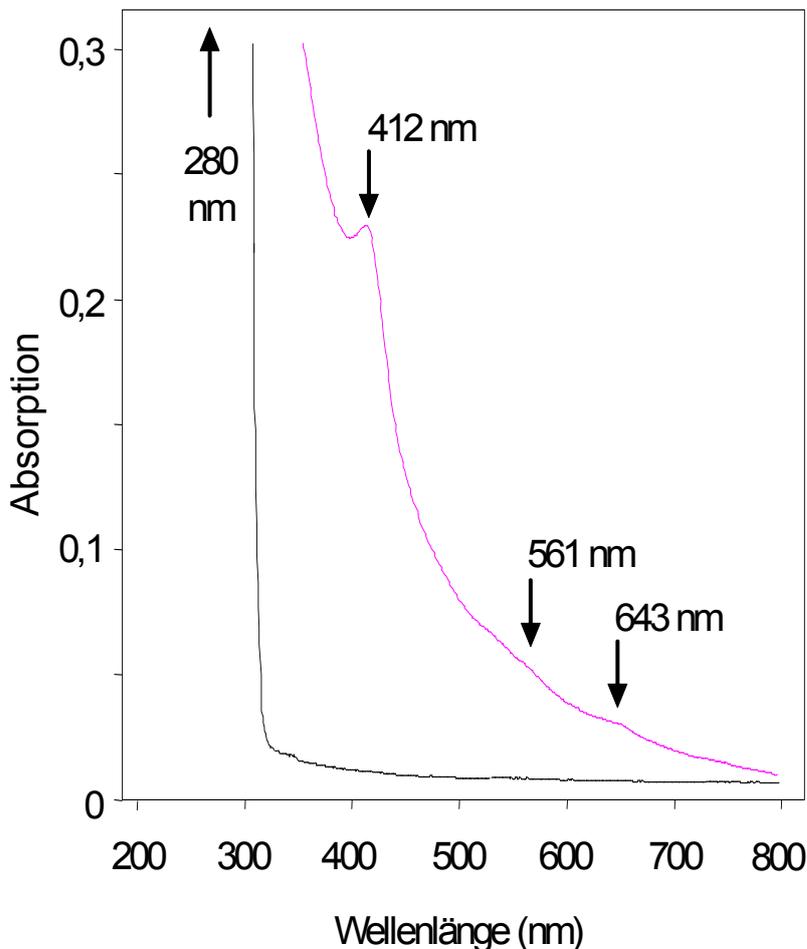
**Abbildung 3-47: Größenausschlusschromatographie von MBP::HypX.** UV-VIS Spektren einer MBP::HypX-Reinigung aufgenommen bei 280 nm (**Grün**) und 415 nm (**Violett**). Im 280-nm-Spektrum sind zwei Absorptionsmaxima, bei 108 kDa (MBP::HypX) und 43 kDa (MBP) zu erkennen. Im 415-nm-Spektrum ist lediglich ein Maximum, deckungsgleich mit dem 108 kDa-Maximum, zu erkennen.

Interessanterweise war auf Höhe des MBP keine Absorption bei 415 nm zu sehen. Daher muss die Koordinierungsstelle des Metall-Ions im HypX-Anteil des Fusionsproteins liegen. Dieser Befund war vollkommen unerwartet, da HypX nie als Metalloprotein in Betracht gezogen wurde.

Die proteinhaltigen Fraktionen der Größenausschlusschromatographie wurden zu zwei *Pools* vereinigt (Abbildung 3-46 B). Anhand immunologischer Detektion konnte die Identität beider Proteinfractionen bestätigt werden (Abbildung 3-46 C). Der Versuch, das Fusionsprotein durch einen *Factor Xa*-Verdau spezifisch zu spalten zeigte keinen Erfolg, vermutlich, da die Schnittstelle für die spezifische Endopeptidase nicht zugänglich ist (Daten nicht gezeigt).

Zur Charakterisierung des Metall-Ions in HypX wurde ein UV-Vis-Spektrum des gereinigten MBP::HypX Fusionsproteins aufgezeichnet. Sowohl beim MBP::HypX, als auch bei der Kontrolle (MBP) war bei 280 nm ein dominantes, proteinspezifisches Absorptionsmaximum - in der Größenordnung von 3,4 AU - zu sehen (nicht gezeigt). Bei einem Scan von MBP::HypX im UV-Vis-Spektrum (200-800 nm) war eine breite Absorption im Bereich von 300-800 nm zu erkennen. Im Bereich dieser Absorption war ein deutliches Absorptionsmaximum bei 412 nm zu sehen. Darüber hinaus waren noch zwei Schultern bei 561 und 643 nm zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigte isoliertes MBP keine Absorption im Bereich von 320-800 nm.

Der Vergleich dieses UV-Vis-Spektrums mit dem Spektrum einer kobalthaltigen Nitril-Hydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 erbrachte weitere Hinweise auf eine Identität als (De-) Hydratase-Domäne (Nagasawa, Takeuchi *et al.* 1991). Diese Nitril-Hydratase besitzt ein deutliches Absorptionsmaximum bei 410 nm sowie ein minimales Absorptionsmaximum bei 561 nm im UV-Vis-Spektrum. Dieses Ergebnis ist als weiteres Indiz auf einen Metall-Kofaktor in HypX zu werten, der gleich bzw. ähnlich der prothetischen Gruppe einer Nitril-Hydratase ist.



**Abbildung 3-48:** MBP::HypX UV-Vis-Spektren. MBP (Schwarz) und MBP::HypX (Violett) in 20mM Tris-HCl Puffer mit 1mM EDTA und 0,2 M NaCl bei pH7,4 @ RT. Als Leerwert wurde der derselbe Puffer verwendet. Die gezeigten Spektren sind Differenzspektren von Probe und Leerwert. Die Konzentration betrug jeweils 1,7mg/ml. Die Spektren wurden bei 12°C aufgenommen.

Nachfolgend wurde daher die Art dieses Metall-Ions bestimmt und der Metallgehalt quantifiziert. Der Metallgehalt wurde durch optische Emissionsspektrometrie (ICP-OES; engl.: *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) ermittelt. Bei der ICP-OES-Messung wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Dabei wurden jeweils mehrere Metall-Ionen parallel gemessen. Aufgrund der Tatsache, dass HypX die katalytische Triade (Jones und Thornton 2004) einer Nitril-Hydratase (Nagasawa, Takeuchi *et al.* 1991) enthält und sowohl eisen- als auch kobalthaltige Nitril-Hydratasen bekannt sind, waren diese beiden Metalle von größtem Interesse. Zudem wurde noch eine quantitative Bestimmung für Zink und Nickel vorgenommen. Es konnte jedoch lediglich Eisen nachgewiesen werden. Pro mol MBP::HypX

konnten 1,26 mol Fe nachgewiesen werden. Zur Kontrolle, im MBP konnten lediglich 0,37 mol Fe pro mol MBP nachgewiesen werden.

**Tabelle 8: Metallbestimmung in HypX mittels ICP-OES.**

Element	Metallgehalt (mol pro mol)	
	MBP	MBP::HypX
Co	< 0,001	< 0,001
Fe	0,37 ± 0,27	1,26 ± 0,48
Zn	< 0,001	< 0,001
Ni	< 0,001	< 0,001

Die Konzentration der Proben lag für HypX::MBP bei 16,1 bzw. 23,3 µM, für MBP lag die Konzentration bei 27,8 bzw. 53 µM.

Obgleich eine unspezifische Bindung des Eisens durch die Zugabe von 1 mM EDTA zum Aufschlusspuffer minimiert werden sollte, weist der Metallgehalt im MBP auf eine solche hin. Daher muss angenommen werden, dass auch das MBP::HypX eine – im Verhältnis – gleiche unspezifische Bindung aufweist. Demnach wären 0,34 mol Fe/Protein auf eine koordinierte Bindung zurückzuführen. Während das MBP im Absorptionsspektrum bei 415 nm keine Absorption aufwies, zeigte das Fusionsprotein eine deutliche Absorption bei dieser Wellenlänge auf, die auf einen Metallkofaktor verweist der im HypX-Teil koordiniert sein muss. Die Metallbestimmung deutete auf Eisen als mononuklearen Kofaktor hin. Dass der Kofaktor nur in substöchiometrischen Mengen zu finden war, ist vermutlich auf die Reinigung in Gegenwart von EDTA im Aufschlusspuffer zurückzuführen.

### 3.5 Eine putative CO-Dehydrogenase aus *Ralstonia eutropha* als alternativer Weg in der Biosynthese des Carbonylliganden

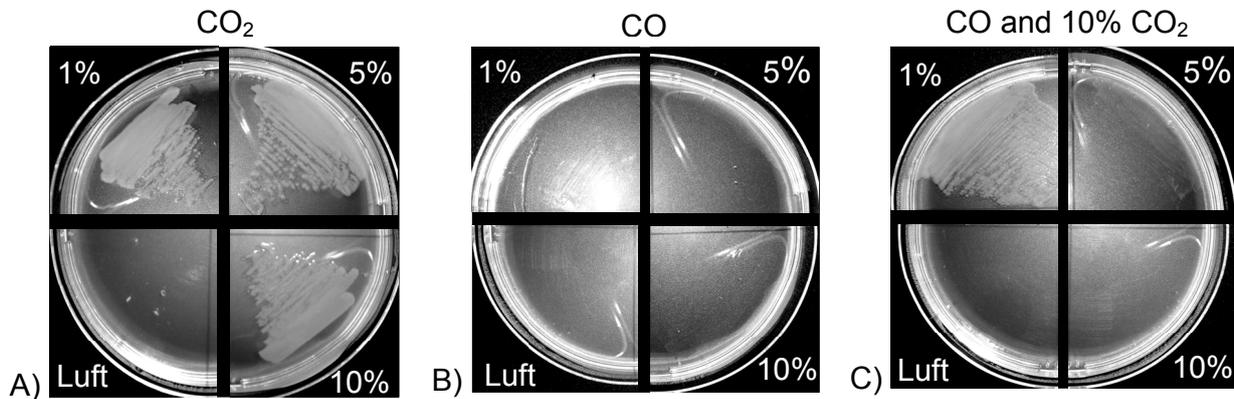
Obgleich HypX als *eine* Quelle des Carbonylliganden identifiziert werden konnte, zeigen Experimente in  $\Delta hypX_2$ -Hintergründen, dass auch hier noch Hydrogenaseaktivität zu finden ist. Da mit HypX auch dem letzten Reifungsprotein für [NiFe]-Hydrogenasen seine Funktion zugeordnet werden konnte, müssen alternative CO-Biosynthesewege außerhalb des Hydrogenaseoperons zu finden sein. Eine häufig diskutierte, potentielle Quelle für den CO-Liganden ist die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CO (siehe Einleitung).

Erstmals durch Roseboom *et al.* vorgeschlagen (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005), konnte für *E. coli* als Wirtsorganismus mittlerweile gezeigt werden, dass gasförmiges CO<sub>2</sub> bzw. Bicarbonat keinerlei Beitrag zur CO-Synthese leisten (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus auch zeigen, dass über die Zugabe von CH<sub>3</sub><sup>13</sup>COOH eine partielle Markierung der CO-Spezies im aktiven Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen aus *A. vinosum* erzielt werden konnte (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005). Insbesondere dieser letzte Befund verweist auf die Möglichkeit, dass CO aus dem Carboxylat des Acetats synthetisiert werden könnte. Eine solche Reaktion könnte durch die reversible Reaktion des CO-Dehydrogenase/AcetylCoA-Synthase-Komplexes (kurz CODH/ACS) katalysiert werden. Dieselben Enzyme (CODH) erlauben auch die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CO, wie sie auch in acetogenen Mikroorganismen zu finden ist (Ferry 1995; Ragsdale 2004). Auch wenn die angeführten Reaktionen typisch für anaerobe Organismen sind, rücken die vorangegangenen Überlegungen die CODHs in den Fokus der Suche nach alternativen, mikroaeroben Synthesewegen der Carbonylliganden.

#### 3.5.1 Keine der putativen CODHs aus *Ralstonia eutropha* ist in der Lage Carboxydotrophie vermitteln

In aeroben, carboxydotrophen Mikroorganismen katalysieren CODHs die Oxidation von Kohlenmonoxid zu CO<sub>2</sub>. Die freigesetzten Elektronen werden dabei auf einen oxidierten Akzeptor übertragen. *In vivo* gehören diese Elektronenakzeptoren zum CO-insensitiven Zweig des Elektronentransportsystems. Beispiele für solche Akzeptoren sind z. B. Ubichinon-10 ( $E_m = 100$  mV), Cytochrom *b*<sub>561</sub> ( $E_m = 40$  mV) oder Cytochrom *b*<sub>563</sub> ( $E_m = -105$  mV) (Kim und Hegeman 1981; Jacobitz und Meyer 1989). Das dabei entstehende CO<sub>2</sub> wird anschließend über den reduktiven Pentosephosphat-Zyklus vom Organismus fixiert (Ferry 1995; Bowien und Kusian 2002).

Um zu untersuchen, ob die potentiellen CODHs aus *Ralstonia eutropha* H16 in der Lage sind Carboxydotrophie zu vermitteln, wurde ein Wachstumstest durchgeführt. Dazu wurde *R. eutropha* H16 unter lithoautotrophen Bedingungen mit mindestens 60 % N<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub> (nur bei Verwendung von CO<sub>2</sub>), 10 % O<sub>2</sub> (jeweils in v/v) sowie variablen Mengen von CO<sub>2</sub> bzw. CO in der Gasphase auf AutN-Platten ausgestrichen und für 72 Stunden bei 30 °C inkubiert.



**Abbildung 3-49: Kohlenmonoxid abhängiges, autotrophes Wachstum von *Ralstonia eutropha* H16.** *Ralstonia eutropha* H16 wurde unter lithoautotrophen Bedingungen auf Platten angezogen, dabei wurde die entsprechende Kohlenstoffquelle in einer Konzentration (v/v) von 1 % (oben links), 5 % (oben rechts), bis 10 % (unten rechts) zugegeben. Als Kohlenstoffquelle wurden dabei variable Mengen Kohlendioxids (A), variable Mengen CO (B) sowie jeweils 10 % Kohlendioxid und variable Mengen Kohlenmonoxids (C) zugegeben. Darüber hinaus wurden 10 % O<sub>2</sub> sowie 10 % H<sub>2</sub> (nur bei Verwendung von CO<sub>2</sub>) zugegeben, der Rest der Gasatmosphäre wurde mit N<sub>2</sub> aufgefüllt. In den unteren linken Quadranten wurde H16 in Luft, ohne H<sub>2</sub>, angezogen. Alle Kulturen wurden für 72 Stunden bei 30 °C angezogen.

In allen Anzuchtbedingungen mit Kohlendioxid als einzige Kohlenstoffquelle konnte ein gleichmäßiges Wachstum festgestellt werden (Abbildung 3-49 A). Im Gegensatz dazu konnte in einem Setup mit 10 % O<sub>2</sub>, bis zu 89 % N<sub>2</sub> und CO-Partialdrücken von 1 – 10 % kein Wachstum festgestellt werden (Abbildung 3-49 B). Um zu untersuchen, ob es bei den verwendeten CO-Partialdrücken womöglich zu einer Kohlenmonoxidvergiftung gekommen ist, wurde H16 mit 10 % CO<sub>2</sub> sowie steigenden Mengen Kohlenmonoxids (1-10 %) unter lithoautotrophen Bedingungen angezogen (Abbildung 3-49 C). Unter diesen Bedingungen konnte bei 1 % CO noch deutliches Wachstum festgestellt werden, bei allen übrigen Konzentrationen konnte kein Wachstum nachgewiesen werden (Abbildung 3-49 C; oben links). Demzufolge sind also CO Konzentrationen von 5 % und mehr toxisch für *Ralstonia eutropha*. An dieser Stelle sei zudem erwähnt, dass die Bakterien die nur mit CO<sub>2</sub> angezogen wurden die typische gelblich-weiße Färbung zeigten. Bakterien die in Gegenwart von 1 % CO angezogen wurden waren blassweiß. Dies verweist auf suboptimale Lebensbedingungen. In einer Negativkontrolle, die an Luft kultiviert wurde, war kein Bakterienwachstum feststellbar (Abbildung 3-49; unten links).

Zusammengenommen kann in *Ralstonia eutropha* daher nicht von Carboxydotrophie gesprochen werden, wie sie durch CODHs in *Hydrogenophaga pseudoflava* und *Oligotropha*

*carboxydovorans* realisiert wird (Dobbek, Gremer *et al.* 1999; Hänzelmann, Dobbek *et al.* 2000). Damit sind diese Ergebnisse konsistent mit älteren Untersuchungsergebnissen von C. G. Friedrich (persönliche Kommunikation B. Friedrich). Die Oxidation von Kohlenmonoxid als Energiequelle scheint somit nicht die physiologische Funktion der zu untersuchenden Enzyme zu sein.

### 3.5.2 Relative Quantifizierung von Cox-Proteinen unter lithoautotrophen Bedingungen und Konstruktion einer CODH-Mutante

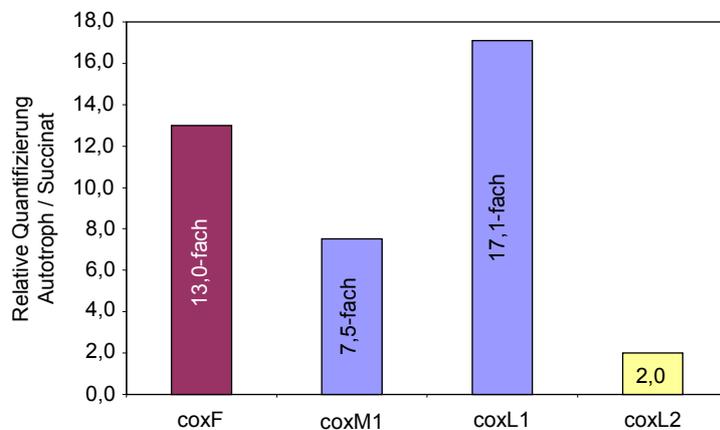
*Ralstonia eutropha* H16 besitzt zahlreiche Gene, welche im Rahmen einer Genomsequenzierung als *cox* (*CO oxidizing*)-Gene identifiziert werden konnten und als solche annotiert wurden (Pohlmann, Fricke *et al.* 2006). Darunter finden sich fünf große Untereinheiten (*coxL1*, 2, 3, 5, 6), eine mittlere Untereinheit (*coxM1*), sechs kleine Untereinheiten (*coxS1-6*) sowie vier Reifungsfaktoren (*coxF*, *coxG1*, *coxE1* und *coxR*), wobei zwei dieser akzessorischen Gene dupliziert vorliegen (*coxG2*, *coxE2*). Über die Funktionen der meisten dieser akzessorischen Gene ist nur sehr wenig bekannt. Jedoch weist CoxR eine Sequenzidentität von 41 % (61 % Sequenzähnlichkeit) zu CoxD aus *Oligotropha carboxydovorans* auf. Dem Reifungsfaktor CoxD wird eine unterstützende Funktion beim Einbau der Schwefel- und Kupfer-Kofaktoren in das Apo-Protein der CODH in *O. carboxydovorans* zugeordnet (Pelzmann, Ferner *et al.* 2009).

Zudem konnten in dieser Studie noch drei weitere mittlere Untereinheiten *coxM3* (H16\_A1702), *coxM4* (H16\_A1724) und *coxM7* (H16\_B0816) identifiziert werden. Beinahe alle Gene sind auf dem ersten Chromosom zu finden. Lediglich *coxL6*, *coxS6*, sowie *coxM7* befinden sich auf Chromosom 2.

Von allen *cox*-Genen wird nur ein einziger Satz Strukturgene zusammen mit einem „vollständigen“ Satz akzessorischer Gene in einem putativen Operon kodiert. Dieses Operon, nachfolgend auch *coxI*-Operon genannt, umfasst die Gene *coxSILIMIREIGIF* (siehe Abbildung 3-51). Zu keinem der Genprodukte lagen entsprechende experimentelle Daten hinsichtlich ihrer genauen Funktion vor.

Zunächst wurde daher untersucht, ob eine funktionale Beziehung zwischen den Genprodukten der *cox*-Gene und den Hydrogenasegenen besteht. Dazu wurde überprüft, inwieweit die Expression der beteiligten Gene korreliert. Hierzu konnte auf die Daten einer Proteomstudie von Kohlmann *et al.* zurückgegriffen werden. In dieser Studie wurde das Proteom von *R. eutropha* im löslichen Komplement von autotroph und heterotroph gewachsenen Zellen mittels quantitativer Proteomanalyse untersucht. Die Proteinidentifizierung und -quantifizierung basierte auf der stabilen Isotopenmarkierung mittels  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -Ammonium zur metabolischen Markierung der jeweiligen Peptide kombiniert mit GeLC-MS/MS (Kohlmann, Pohlmann *et al.*

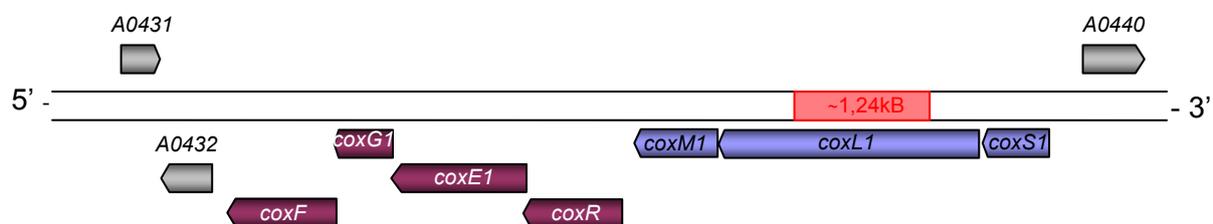
2011). Im Ergebnis wurde dabei eine relative Quantifizierung aller *cox*-Gene unter autotrophen, (Hydrogenase-) dereprimierenden Bedingungen auf  $H_2/CO_2$  in Bezug zu heterotrophen, (Hydrogenase-) reprimierenden Wachstumsbedingungen auf Succinat vorgenommen.



**Abbildung 3-50: Expression von CO-Dehydrogenase assoziierten Genen.** Gezeigt wird die x-fache Überexpression unter autotrophen ( $H_2/CO_2$ ), dereprimierenden Bedingungen gegenüber heterotrophen, reprimierenden Wachstumsbedingungen (Succinat). Der dargestellte Vergleich zeigt die relative Quantifizierung einzelner CODH-assoziierte Proteine, mittels GeLC-MS/MS und dem Einsatz von  $^{14}N/^{15}N$ -markierten Proteinen. Die Signifikanzgrenze liegt bei einer 2-fachen Überexpression.

Es konnte jedoch nicht für alle *cox*-Gene ein Expressionsprofil erstellt werden. Dies kann bedeuten, dass die entsprechenden Gene nicht oder konstitutiv exprimiert werden oder aber nicht detektiert werden können. So werden kleine Proteine mit einer molekularen Masse von weniger als 20 – 30 kDa regelmäßig nicht detektiert. Zum anderen werden Proteine nicht quantifiziert, wenn nur ein Ionenchromatogramm erstellt, nur ein Peptid identifiziert werden konnte, das Signal-Rausch-Verhältnis einen Grenzwert unterschreitet oder die Log2-Ratio inkonsistent ist.

Aus den vorliegenden Daten ging hervor, dass die große und die mittlere Untereinheit des *coxI*-Operons unter autotrophen Bedingungen relativ zu heterotrophen Bedingungen um das 17,1-fache bzw. 7,5-fache überexprimiert werden. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass das akzessorische Protein CoxF unter Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen 13,0-fach überexprimiert vorliegt. Eine zweite große Untereinheit *coxL2* wurde exakt zweifach überexprimiert (Abbildung 3-50). Der Faktor 2,0 stellt bei dieser Methode jedoch die Signifikanzgrenze dar.

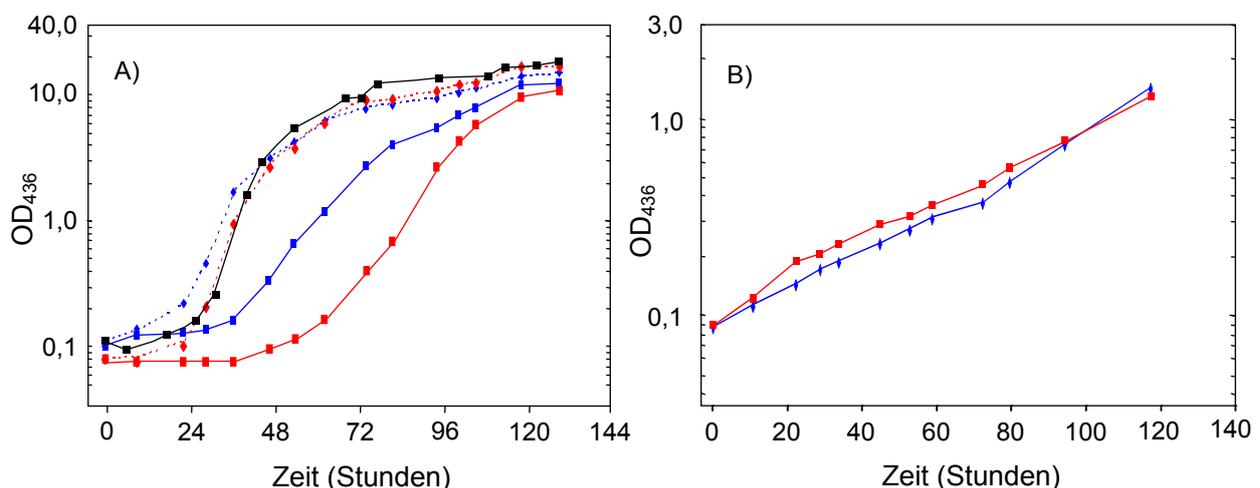


**Abbildung 3-51: Das *coxI*-Operon auf Chromosom 1.** Das *coxI*-Operon ist in 3'-5'-Orientierung auf Chromosom 1 kodiert. Neben den drei Strukturgenen *coxSILIM1* gehören auch vier akzessorische Gene, *coxREIGIF*, zu diesem Operon. Unterhalb der akzessorischen Gene wird ein weiteres Gen in 3'-5'-Richtung kodiert; H16\_A0432. Dieses Gen wurde als Molybdän-Kofaktor-Cytidylyl-Transferase (EC: 2.7.7.76) annotiert und ist vermutlich ebenfalls funktionaler Bestandteil des *coxI*-Operons. Flankiert wird das Operon von zwei Leserastern die in 5'-3' Richtung kodiert sind; H16\_A0431, eine Pterin-4A-Carbinolamine-Dehydratase (EC: 4.2.1.96), und H16\_A0440, einem hypothetischen Protein mit unbekannter Funktion. Die Deletion ist rot hervorgehoben.

Aufgrund seiner augenscheinlich intakten Operonstruktur und seiner deutlichen, relativen Überexpression unter autotrophen Bedingungen ist das *coxI*-Operon der interessanteste Kandidat für die genauere biochemische Charakterisierung hinsichtlich einer Beteiligung der CODHs an der Synthese der Carbonylliganden. Daher wurde, wie in den Kapiteln 2.9.5 beschrieben, ein Suizidplasmid (pIB19) konstruiert und eine etwa 1,24 kB große *in frame*-Deletion in die Strukturgene des *coxI*-Operons eingeführt (siehe Kapitel 2.10.5). Diese Deletion umfasst 52 % der großen Untereinheit von *coxL1*.

### 3.5.3 Einfluss der putativen CO-Dehydrogenase auf das chemolithoautotrophe Wachstum

Zunächst wurde untersucht, inwieweit sich die Deletion im *coxI*-Gencluster von *Ralstonia eutropha* auf das lithoautotrophe Wachstum auswirkt. Dazu wurde die  $\Delta\textit{coxL1}$ -Deletion in ein *Ralstonia eutropha* H16-Derivat eingebracht, in dem bereits die  $\Delta\textit{hypX}_2$  Deletion vorlag (HF469). Dem lag die Überlegung zugrunde, dass HypX zwar an der Synthese eines Teils der Carbonylliganden beteiligt ist (siehe Kapitel 3.4) aber über den prozentualen Anteil der einzelnen Synthesewege nichts bekannt ist. So sollte vermieden werden, dass der von HypX produzierte Anteil der CO-Gesamtpopulation einen etwaigen physiologischen Phänotyp kaschiert. Im Idealfall würde diese Doppelmutante zu einem kompletten Verlust des Hydrogenase-basierten Wachstums führen.



**Abbildung 3-52: Wachstum der CODH-Mutanten.** A) Die *Ralstonia eutropha*-Stämme H16 (■), HF469 (H16  $\Delta\textit{hypX}_2$ ) (■) und HF968 (H16  $\Delta\textit{hypX}_2 \Delta\textit{coxL1}$ ) (■) wurden in Mineralmedium unter autotrophen Bedingungen, mit CO<sub>2</sub> als einziger Kohlenstoffquelle und H<sub>2</sub> als Energiequelle, bei 30 °C kultiviert (durchgezogene Linien). Die beide Stämme, H16  $\Delta\textit{hypX}_2$  (◆) und H16  $\Delta\textit{hypX}_2 \Delta\textit{coxL1}$  (◆), wurden zusätzlich in einem Kontrollversuch mit 5000 ppmv CO in der Gasphase angezogen (gestrichelte Linien). Die Gasphase bestand aus 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> (v/v), Rest N<sub>2</sub>. B) Die *Ralstonia eutropha*-Stämme HF469 (H16  $\Delta\textit{hypX}_2$ ) (◆) und HF968 (H16  $\Delta\textit{hypX}_2 \Delta\textit{coxL1}$ ) (■) wurden in GN-Medium unter heterotrophen, Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen kultiviert. Beide Kulturen wurden bei 30 °C angezogen.

Dazu wurden jeweils H16, HF469 (H16  $\Delta hypX_2$ ) und HF968 (H16  $\Delta hypX_2 \Delta coxLI$ ) in Minimalmedium unter lithoautotrophen Bedingungen mit 5 % O<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 75 % N<sub>2</sub> angezogen (Abbildung 3-52; durchgezogene Linien).

Um den beobachteten Phänotypen auf den Mangel an Carbonylliganden einzugrenzen, wurde ein entsprechendes Kontrollexperiment unter denselben lithoautotrophen Bedingungen mit zusätzlichen 0,5 % (v/v) CO durchgeführt (Abbildung 3-52 A; gestrichelte Linien). Unter Zugabe von 5000 ppmv konnte unter autotrophen Bedingungen mit H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> ein Wachstum auf Niveau des Wildtyps (H16) festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Applikation von gasförmigem CO auch hier zur vollständigen Komplementation des physiologischen Phänotyps führte (vergleiche dazu Kapitel 3.4.1). Ohne die Zugabe externen Kohlenmonoxids kam es auch hier zu einer deutlich vergrößerten Latenzphase, dabei zeigte die CODH-Mutante gegenüber der Kontrolle (HF469) eine um etwa 15 Stunden verlängerte *Lag*-Phase (Abbildung 3-52 A).

Bei einem entsprechenden Versuch unter heterotrophen, Hydrogenase-dereprimierenden (GN-) Bedingungen konnte kein Einfluss der *coxLI*-Deletion auf das Wachstum festgestellt werden (Abbildung 3-52 B). Die Ursache für den zuvor beobachteten autotrophen Wachstumseffekt kann daher nicht auf dem Verlust eines Haushaltsgens zurückzuführen sein, welches auch unter heterotrophen Bedingungen von Nöten wäre.

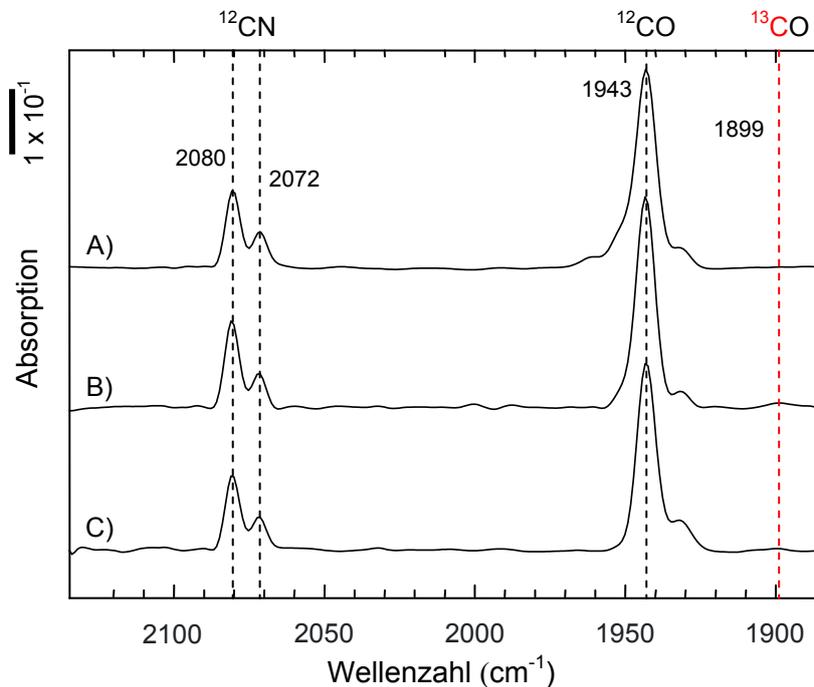
Tatsächlich wäre allein auf Grundlage der Wachstumsverzögerung unter chemolithoautotrophen Bedingungen auch eine unterstützende Funktion im Rahmen der CO<sub>2</sub>-Fixierung durch den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus denkbar. Jedoch ist - insbesondere - die vollständige Komplementation auf physiologischer Ebene durch Gabe von externem CO als starkes Indiz für eine Funktion innerhalb der Synthese des Carbonylliganden zu werten. Im Folgenden wurde daher untersucht inwieweit das verzögerte Wachstum auf die Biosynthese des Carbonylliganden der [NiFe]-Hydrogenasen zurückgeführt werden kann.

### 3.5.4 Acetat als potentielle Vorstufe in der Synthese der Carbonylliganden

Wie eingangs erwähnt, dienen CODHs in acetogenen Anaerobiern der Reduktion von Kohlendioxid zu CO, hier bilden sie als Bestandteil des CODH/ACS-Komplexes das Rückgrat der CO<sub>2</sub>-Fixierung dieser Organismen. Als Ergebnis der konzertierten Aktion - innerhalb dieses CODH/ACS-Komplexes - wird CO<sub>2</sub> in Form von Acetyl-CoA fixiert, welches anschließend der ATP-Synthese bzw. dem Baustoffwechsel dient (Ragsdale 2004; Fuchs 2007).

Obwohl der Wood-Ljungdahl-Weg nur unter anaeroben Bedingungen arbeitet (Fuchs 2007) und *Ralstonia eutropha* augenscheinlich keine ACS-Gene besitzt (Pohlmann, Fricke *et al.* 2006), wurde die reverse Acetyl-CoA-Synthese im Zusammenhang mit der Synthese der

Carbonylliganden diskutiert (Forzi und Sawers 2007). Tatsächlich konnten Roseboom *et al.* eine spezifische, partielle Markierung des CO-Liganden durch  $\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$  in *A. vinosum* feststellen (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005).



**Abbildung 3-53: FTIR-Spektren von  $^{13}\text{C}$ -Acetat markierter RH.** RH<sub>StopStrep</sub> (pRH) wurde in HF574, unter heterotrophen Wachstumsbedingungen (FGN), überexprimiert. Bei einer Zelldichte OD<sub>436</sub> von 6,5, direkt nach Beginn der Hydrogenaseexpression, wurden 5 mM  $^{12}\text{C}$ -Acetat (A);  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Acetat (B); oder  $2\text{-}^{13}\text{C}$ -Acetat (C) zugegeben. Nach 5 Stunden Kultivierungsdauer wurden weitere 2,5 mM Acetat (Endkonzentration) nachgefüttert.

Ausgehend von diesem Befund wurde daher evaluiert, ob auch in *R. eutropha* eine spezifische Markierung des Carbonylliganden durch  $^{13}\text{C}$ -Acetat nachgewiesen werden kann. Dazu wurde RH<sub>StopStrep</sub> unter heterotrophen Bedingungen kultiviert und mit unmarkiertem bzw. differentiell markiertem Acetat, in einer maximalen Endkonzentration von 7,5 mM, supplementiert. Das Acetat wurde in zwei Portionen von jeweils 5,0 mM bzw. 2,5 mM (Endkonzentration) zugegeben. Die erste Portion wurde nach Beginn der Hydrogenaseexpression, bei einer OD<sub>436</sub> = 6,5, appliziert. Die zweite Portion wurde jeweils nach weiteren 5 Stunden Wachstum auf Glycerol zugegeben.

Wie in Abbildung 3-53 zu sehen ist, war weder nach Zugabe von  $\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$  (Abbildung 3-53 B), noch bei  $^{13}\text{CH}_3\text{COOH}$  (Abbildung 3-53 C) eine Markierung des Carbonylliganden festzustellen, obgleich die verwendete Acetat-Konzentration von 7,5 mM deutlich über der von Roseboom *et al.* verwendeten Endkonzentration von 3 mM lag (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005). Dieses Ergebnis steht somit im Gegensatz zu entsprechenden Experimenten in *Allochromatium vinosum* (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005) und verdeutlicht noch einmal sehr anschaulich das es durchaus wirtsspezifische Unterschiede bei der Biosynthese des Carbonylliganden gibt.

### 3.5.5 Kohlenstoffdioxid als Substrat für die Biosynthese des Carbonylliganden in *Ralstonia eutropha*

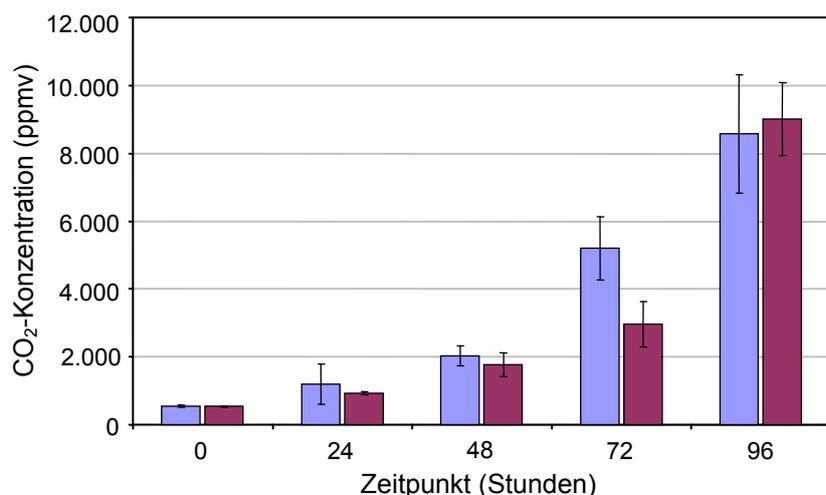
Wie eingangs erwähnt gibt es innerhalb der Klasse der CO-Dehydrogenasen auch Enzyme die eine Reduktion von Kohlenstoffdioxid erlauben. Auch wenn diese Reduktion von Kohlenstoffdioxid nur bei anaeroben CODHs, im Zusammenhang mit Acetyl-CoA-Synthasen (ACS) eine physiologische Rolle spielt, ist eine CODH vermittelte CO-Produktion prinzipiell denkbar. Im Gegensatz dazu katalysieren aerobe, molybdänhaltige CO-Dehydrogenasen für gewöhnlich die Oxidation von Kohlenstoffmonoxid zu Kohlenstoffdioxid (Ferry 1995; Ragsdale 2004).

Obgleich Untersuchungen mit  $^{13}\text{C}$ -Hydrogencarbonat in *E. coli*, auch mit heterolog exprimierter  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$  aus *R. eutropha*, gezeigt haben das weder die endogenen noch die wirtsfremde [NiFe]-Hydrogenase eine Markierung aufwiesen (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007), machen die wirtsspezifischen Unterschiede entsprechende Untersuchungen auch in *R. eutropha* erforderlich.

Um zu klären, ob es sich bei der fraglichen CODH in *Ralstonia eutropha* um eine kanonische CODH handelt, welche die  $\text{CO}_2$ -Fixierung *via* Calvin-Benson-Bassham-Zyklus unterstützt und deshalb einen ausgeprägten Phänotyp unter autotrophen Bedingungen hervorruft (Abbildung 3-52), oder es sich hier tatsächlich um eine bisher nicht untersuchte Variante handelt, die durch die Reduktion von  $\text{CO}_2$  an der Biosynthese von beteiligt ist, wurden Markierungsexperimente mit  $^{13}\text{CO}_2$  durchgeführt.

Da verschiedene Organismen unter heterotrophen Bedingungen zum Teil erhebliche Mengen an Kohlenstoffdioxid freisetzen (Kusian, Sultemeyer *et al.* 2002), wurde zunächst untersucht, ob und in welcher Größenordnung *Ralstonia eutropha* H16 Kohlenstoffdioxid unter heterotrophen Bedingungen produziert. Damit ein Markierungsexperiment mit  $^{13}\text{CO}_2$  erfolgreich sein kann, muss die Menge des extern applizierten  $^{13}\text{CO}_2$  nämlich deutlich über der intrinsisch produzierten Menge liegen. Wobei jedoch hohe  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen - jenseits der 20%-Marke - toxisch für die meisten Mikroorganismen sind (Dixon und Kell 1989).

Zur Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Produktion wurden zwei *Ralstonia eutropha*-Stämme, H16 und HF469 (H16  $\Delta\text{hypX}_2$ ), unter heterotrophen Bedingungen angezogen. Dazu wurden 1100 ml-Serumflaschen mit 200 ml sterilem Medium befüllt und hermetisch verschlossen. Es wurde eine künstliche Gasatmosphäre von 70 %  $\text{N}_2$  und 30 %  $\text{O}_2$  (v/v) eingestellt. Nach Inokulation mit 1 % einer Vorkultur wurden die Kulturen bei 30 °C kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden Gasproben entnommen, welche im Anschluss mittels eines gaschromatographischen Verfahrens (Flammenionisationsdetektor) quantifiziert wurden (siehe Kapitel 2.7.3).

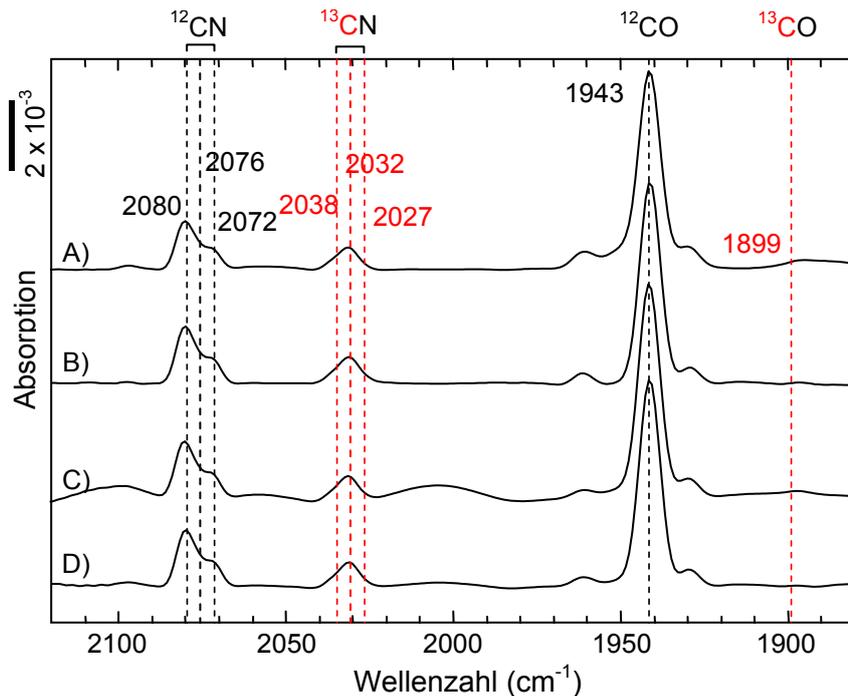


**Abbildung 3-54: CO<sub>2</sub>-Entwicklung von *Ralstonia eutropha* Stämmen unter heterotrophen Bedingungen.** Quantitative gaschromatographische Bestimmung des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks mittels FID. Die *Ralstonia eutropha*-Stämme H16 (Blau) und HF469 (Violett) wurden heterotroph bei 30 °C in 200 ml Medium in 1100 ml-Serumflaschen mit einer künstlichen Atmosphäre von 70 % N<sub>2</sub> und 30 % O<sub>2</sub> angezogen. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Replikaten.

Über einen Zeitraum von 96 Stunden konnte tatsächlich eine Zunahme der CO<sub>2</sub>-Konzentration unter heterotrophen Bedingungen beobachtet werden (Abbildung 3-54). Ausgehend von einer Konzentration von etwa ~0,05 % CO<sub>2</sub> zu Beginn der Messung nahm die CO<sub>2</sub>-Konzentration bezogen auf das Volumen des Überstandes auf  $0,86 \pm 0,17$  % (v/v) bei H16 bzw.  $0,9 \pm 0,11$  % (v/v) bei HF469 zu. Zudem konnte über den Zeitraum der Messung hinweg kein signifikanter Unterschied in der CO<sub>2</sub>-Produktion unter heterotrophen Bedingungen zwischen HF469 und dem Wildtyp H16 festgestellt werden. Für das folgende Markierungsexperiment mussten also CO<sub>2</sub>-Konzentrationen von > 1 % eingesetzt werden, um abzusichern, dass der Anteil an <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> deutlich überwiegt.

Im folgenden Markierungsexperiment wurden daher 10 % <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> in der Gasphase eingesetzt, um eine spezifische Markierung des Carbonylliganden durch eine direkte Reduktion von CO<sub>2</sub> unter heterotrophen Bedingungen nachzuweisen. Dazu wurde das Expressionsplasmid (pRH) in verschiedene Hintergründe konjugiert (siehe unten) und unter heterotrophen, Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen angezogen. Die heterotroph kultivierten Zellen wurden bei einer OD<sub>436</sub> von  $9,0 \pm 1,5$  geerntet und das RH<sub>StopStrep</sub>-Protein wurde für eine FTIR-Analyse isoliert (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.4.2).

Um eine mögliche, CODH-abhängige Markierung des CO-Liganden von anderen Möglichkeiten der CO<sub>2</sub>-Fixierung abzugrenzen, wurde die Expression der RH<sub>StopStrep</sub>-Proteine (pRH) in drei verschiedenen Mutanten HB14 (H16  $\Delta P_{cbbR}$ ), HB1 (H16  $\Delta can$ ) und HB60 (H16  $\Delta caa$ ) untersucht. Als Kontrolle diente zudem der Wildtyp H16.



**Abbildung 3-55:  $^{13}\text{CO}_2$ -abhängige Markierung der diatomaren Liganden der RH.** FTIR-Spektren von  $^{13}\text{CO}_2$  markierter  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$ . Das  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$ -Protein (pRH) wurde aus verschiedenen *Ralstonia eutropha*-Stämmen gereinigt; H16 (A), HB14 (H16  $\Delta P_{cbbR}$ ) (B), HB1 (C) und HB60 (D). Dazu wurden die Zellen heterotroph (FGN), in Gegenwart von 10 %  $^{13}\text{CO}_2$  angezogen. Die Spektren wurden auf die Höhe der  $\nu(^{12}\text{CO})$  Streckschwingung normiert.

Generell kommen für eine  $\text{CO}_2$ -Fixierung neben einer basalen Aktivität des Calvin-Benson-Bassham-Zyklus u. a. auch Carboxylierungsreaktionen in Frage. In HB14 (H16  $\Delta P_{cbbR}$ ) wird etwaige  $\text{CO}_2$ -Fixierung *via* Calvin-Benson-Bassham-Zyklus unterdrückt, indem die Promotorregionen des Regulatorgens *cbbR* deletiert wurde (Kusian und Bowien 1995; Jeffke, Gropp *et al.* 1999).

HB1 und HB60 sind H16-Derivate mit *in frame*-Deletionen in zwei Carboanhydrasegenen (CA), *can* bzw. *caa*. Während Can eine cytoplasmatische  $\beta$ -Carboanhydrase ist, ist Caa eine periplasmatische  $\alpha$ -Carbonhydrase. Carboanhydrasen katalysieren die reversible (De-)Hydratisierung von  $\text{CO}_2$ - $\text{HCO}_3^-$ . Während für HB60, die  $\Delta caa$ -Mutante, kein Phänotyp beobachtet werden konnte, zeigte die  $\Delta can$ -Mutante einen eindeutigen physiologischen Effekt. Interessanterweise führt diese Deletion zu einer erhöhten  $\text{CO}_2$ -Bedürftigkeit, auch unter heterotrophen Bedingungen (Kusian, Sultemeyer *et al.* 2002).

Bei keinem der verwendeten Hintergründe konnte eine Markierung des CO-Liganden nachgewiesen werden. Deutlich war jedoch zu erkennen, dass eine partielle Markierung der  $\text{CN}^-$ -Liganden vorlag (Abbildung 3-55). Die Absorptionsmaxima im Bereich der  $\text{CN}^-$ -Liganden zeigten, dass auch bei 10 %  $^{13}\text{CO}_2$  der bei weitem größte Anteil aller  $\text{CN}^-$ -Liganden unmarkiert ist. Während die beiden Absorptionsmaxima der  $^{12}\text{CN}^-$  noch aufgelöst werden ( $\nu(^{12}\text{CN}) = 2080/2072 \text{ cm}^{-1}$ ), ist in der  $^{13}\text{CN}^-$ -Bande nur eine einzige Absorption deutlich zu erkennen,  $\nu(^{13}\text{CN}) = 2032 \text{ cm}^{-1}$ . Diese Verschiebung des Absorptionsmaximums entsteht durch einen Kopplungseffekt, wenn ein aktives Zentrum mit einer Mischpopulation von  $^{12}\text{CN}^-$ - und  $^{13}\text{CN}^-$ -besetzt wird (vergleiche auch Kapitel 3.3.2). Der korrespondierende Peak im  $^{12}\text{CN}^-$ -Bereich

( $\nu(^{12}\text{CN}) = 2076 \text{ cm}^{-1}$ ) ist aufgrund seiner geringen Intensität nicht mehr aufzulösen. Lediglich die Überschneidung der ansonsten klar voneinander getrennten  $^{12}\text{CN}^-$ -Absorptionsmaxima weist auf diesen *Peak* hin (Abbildung 3-55). Die beiden Maxima eines  $^{13}\text{CN}/^{13}\text{CN}$ -besetzten Zentrums ( $\nu(^{13}\text{CN}) = 2027/2038 \text{ cm}^{-1}$ ) sind nur noch anhand der Basisverbreiterung des Hauptabsorptionsmaximums zu erkennen (Abbildung 3-55). Bei einem nahezu gleichbleibenden, prozentualen Anteil von  $32,32 \pm 0,57 \%$   $^{13}\text{CN}^-$  an der Gesamtpopulation von  $^{12/13}\text{CN}^-$ -Liganden ist jedoch sichergestellt, dass die Menge von externem  $^{13}\text{CO}_2$  ausreichend gewesen wäre, um auch eine deutliche Markierung des CO-Liganden zu gewährleisten.

Eine Biosynthese durch z. B. eine direkte Reduktion von  $\text{CO}_2$  ist somit auch bei *Ralstonia eutropha* auszuschließen.

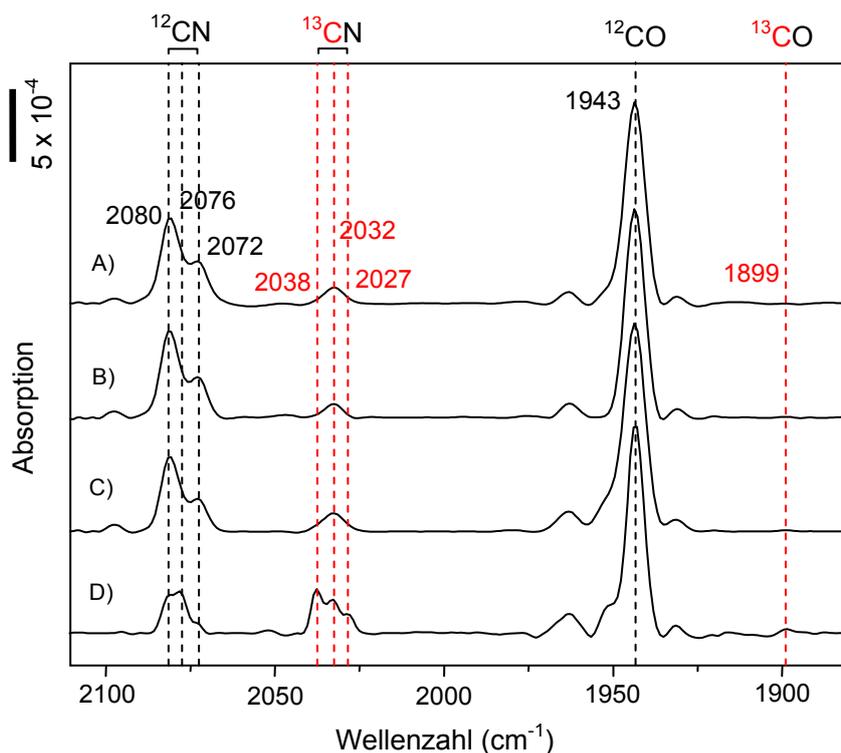
### 3.5.6 Bicarbonat als mögliches Substrat für die Biosynthese des Carbonylliganden in *Ralstonia eutropha*

Untersuchungen an der cytoplasmatischen  $\beta$ -Carboanhydrase Can aus *R. eutropha* weisen auf ein Ungleichgewicht im Äquilibrium zwischen  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  hin. Kusian *et al.* konnten zeigen, dass eine *in frame*-Deletion im *can*-Gen zu einer erhöhten Bedürftigkeit an gasförmigem  $\text{CO}_2$  führte. Unter heterotrophen Bedingungen wird  $\text{CO}_2$  u. a. auch für Carboxylierungsreaktionen,  $\text{HCO}_3^-$  z. B. für die Synthese von Harnstoff oder Arginin verwendet (Fuchs 2007). Dieser Umstand verweist auf die Möglichkeit, dass  $\text{CO}_2$  nicht hinreichend ist, um eine *in vivo*-Markierung des Carbonylliganden zu erzeugen, daher sollte ein vergleichbares Markierungsexperiment auch mit  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  durchgeführt werden.

Zu diesem Zweck wurden dieselben Expressionsstämme wie in Kapitel 3.5.5 verwendet. Sie wurden unter heterotrophen Bedingungen kultiviert. Die heterotroph kultivierten Zellen wurden bei einer  $\text{OD}_{436}$  von  $10,0 \pm 1,0$  geerntet und  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$  wurde für eine FTIR-Analyse isoliert (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.4.2).

Nach Zugabe von 20 mM  $^{13}\text{C}$ -markiertem Hydrogencarbonat konnte in keinem der verwendeten Hintergründe eine Markierung des Carbonylliganden nachgewiesen werden (Abbildung 3-56 A-C). Nach Zugabe von 50 mM  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  war eine sehr geringe Absorption bei  $1899 \text{ cm}^{-1}$  feststellbar (Abbildung 3-56 D). Jedoch kann hier nicht mehr von einer spezifischen Markierung des Carbonylliganden gesprochen werden.

Allerdings ist auch hier, wie schon zuvor beim  $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperiment, eine partielle Markierung der  $\text{CN}^-$ -Liganden zu beobachten, da Bicarbonat bzw.  $\text{CO}_2$  das Substrat der Carbamoylphosphat-Synthetase ist. Während in  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$ , die aus den Stämmen H16 oder HB1 isoliert wurde, durchschnittlich  $11,53 \pm 1,03 \%$  als  $^{13}\text{CN}^-$ -Liganden vorlagen (Abbildung 3-56 A - B), war der Anteil in HB60 mit  $18,82 \pm 0,04 \%$   $^{13}\text{CN}^-$  leicht erhöht (Abbildung 3-56 C).



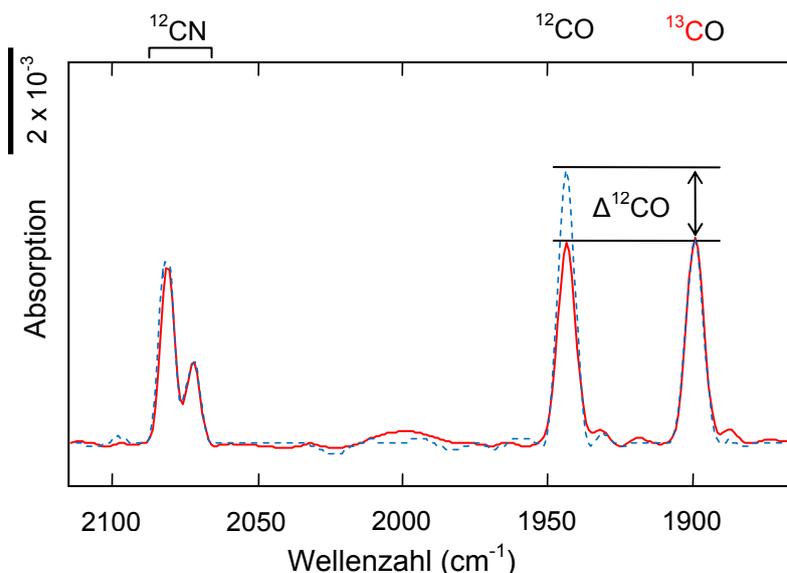
**Abbildung 3-56:**  $^{13}\text{C}$ -Hydrogencarbonat abhängige Markierung der diatomaren Liganden der RH. FTIR-Spektren von  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  markierter  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$ . Das  $\text{RH}_{\text{StopStrep}}$ -Protein wurde in verschiedenen *Ralstonia eutropha*-Stämmen heterotroph (FGN) kultiviert und gereinigt; H16 (A und D), HB1 (B) und HB60 (C). Zur Markierung der diatomaren Liganden wurden 20 mM (A-C) bzw. 50 mM (D)  $^{13}\text{C}$ -markiertes Na-Bicarbonat appliziert. Die Spektren wurden auf die Größe der  $\nu(^{12}\text{CO})$  Streckschwingung normiert.

In einem Folgeexperiment mit 50 mM  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  konnte der Anteil an  $^{13}\text{CN}^-$ -Liganden in H16 noch auf  $52,39 \pm 0,56\%$  gesteigert werden (Abbildung 3-56 D). Hier waren nun, sowohl in der  $^{12}\text{CN}^-$ -Bande ( $\nu(^{12}\text{CN}) = 2080/2076/2072\text{ cm}^{-1}$ ), als auch in der  $^{13}\text{CN}^-$ -Bande ( $\nu(^{13}\text{CN}) = 2027/2032/2038\text{ cm}^{-1}$ ) drei distinkte Maxima aufgelöst.

### 3.5.7 COX1 abhängige Produktion von CO-Liganden

Da für die mutmaßliche „CODH“ kein Substrat bekannt ist, welches als stabiles Isotop für ein *in vivo*-Markierungsexperiment hätte verwendet werden können, wurde ein anderer Weg verfolgt, um die mögliche Beteiligung des *coxLI*-Genprodukts an der CO-Synthese zu untersuchen.

Aufgrund der Erkenntnisse aus der  $^{13}\text{CO}$ -Titrationkurve (siehe Kapitel 3.3.3) war es möglich ein äußerst sensibles System zu etablieren, welches in der Lage ist unmittelbar auch geringe Veränderungen im Gesamtpool der Carbonylliganden zu detektieren, ohne dabei Kenntnis vom jeweiligen Syntheseweg zu haben. So muss auch nicht befürchtet werden, dass das entsprechende Substrat durch andere Stoffwechselreaktionen verbraucht wird, bevor eine Markierung nachweisbar ist. Durch Zugabe gleicher Mengen gasförmigen  $^{13}\text{CO}$ 's, in einer Konzentration nahe dem ermittelten Äquimolaritätspunkt (13 ppmv), wird ein intrinsischer Standard geschaffen, der es ermöglicht zwei Proben direkt miteinander zu vergleichen und mögliche Unterschiede durch gezielte Mutationen zu dokumentieren.



**Abbildung 3-57: FTIR-Spektren der RH aus einer CODH-Mutante.** RH<sub>StopStrep</sub> (pRH) wurde in HF574 (blau gestrichelte Linie) und HF969 (rote Linie) überexprimiert und heterotroph in FGN-Medium kultiviert. Die Kulturen wurden in gasdichten Serumflaschen mit 70 % N<sub>2</sub>, 30 % O<sub>2</sub> und jeweils 12,2 ppmv <sup>13</sup>CO bei 30 °C angezogen. Die basislinienkorrigierten Spektren wurden auf den <sup>13</sup>CO-Peak normiert.

Zu diesem Zweck wurde das Expressionsplasmid pRH in HF574 ( $\Delta$ *hoxBCGH*) und HF969 ( $\Delta$ *hoxBCGH*  $\Delta$ *coxLI*) konjugiert. Anschließend wurden beide Expressionsstämme, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, mit <sup>13</sup>CO angezogen. Anschließend wurde das RH<sub>StopStrep</sub>-Protein gereinigt und über FTIR-Spektroskopie ausgewertet (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.4.2).

Im vorliegenden Fall wurde eine CO-Konzentration von 12,2 ppmv eingesetzt. Diese Konzentration lag genau am Äquimolaritätspunkt der verwendeten Doppelmutante, so dass in der Kontrolle der <sup>12</sup>CO-Anteil leicht über dem intrinsischen Standard lag. Eben dieser Unterschied stellt den Anteil der CO-Gesamtpopulation dar, der durch das Produkt des deletierten Gens (hier *coxLI*) produziert wird.

Wie in Abbildung 3-57 zu erkennen ist, zeigte der „Wildtyp“ bezüglich des Referenzpunktes (<sup>13</sup>CO) gegenüber der CODH<sup>-</sup>Mutante einen um  $26,3 \pm 13,0\%$  (Mittelwert aus drei unabhängigen Replikaten) höheren Anteil an selbst produziertem <sup>12</sup>CO an der Gesamtpopulation von <sup>12/13</sup>CO-Liganden. Daraus folgt, dass sich der Umfang der intrazellulären CO-Produktion durch die *in frame*-Deletion im *coxI*-Operon verringert hat, also die intrinsische <sup>12</sup>CO-Synthese in der CODH<sup>-</sup>Mutante beeinträchtigt ist.

Ogleich das untersuchte Enzym unzweifelhaft an der Biosynthese des Carbonylliganden unter mikro- oder anaeroben Bedingungen beteiligt ist, ist die genaue Natur der katalysierten Reaktion weiter unklar da kein Substrat bekannt ist. Es kann jedoch mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich um eine kanonische CODH handelt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Eine neuartige Dialysekapsel bietet die Möglichkeit zur spezifischen Entfernung unterschiedlicher Gase mittels Gaswäsche

Die hier entwickelte Dialyse- und Applikationskapsel stellt hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und der Reproduzierbarkeit der erlangten Ergebnisse eine signifikante Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik dar. Das Produkt (QuixSep<sup>®</sup>, Membrane Filtration Products Inc., Seguin, USA), welches den Stand der Technik widerspiegelt, zeigte bei mehrfacher Benutzung deutliche Schwächen in Bezug auf die Dichtheit und Zuverlässigkeit. Durch Ausblutungen kam es hier immer wieder zu Vergiftungen der Zellkultur.

Abhilfe schaffte hier die Neuentwicklung einer zuverlässigen Dialysekapsel, die diese Schwäche durch konstruktive Details, wie Dichtring und Schraubverbindung, umgehen konnte. Überdies erreichte sie bei vergleichbarer Dialyseleistung ebenfalls absolute Dichtheit - auch im Vakuum. In Verbindung mit z. B. einer PTFE-Membran, die in wässrigen Medien nur den Durchtritt von Gasen erlaubt, kann diese Dialysekapsel auch als Applikationskapsel eingesetzt werden, die die kontrollierte Abgabe bzw. Aufnahme einer Substanz durch die Dialysemembran erlaubt. Im vorliegenden Fall wurde diese Kapsel zur selektiven Eliminierung von Gasen in einem geschlossenen Kompartiment verwendet werden. So war es möglich eine *in situ*-Gaswäsche zu etablieren. Nur mit Hilfe dieser neu entwickelten Kapsel ist es im Folgenden möglich gewesen einen neuartigen *Assay* zur selektiven *in situ*-Eliminierung von Kohlenmonoxid zu etablieren.

Darüber hinaus ist das hier eingeführte System der *in situ*-Gaswäsche durch die Wahl geeigneter Agenzien beliebig erweiterbar und übertragbar. So lässt sich nicht allein Kohlenmonoxid aus einer Lösung eliminieren. Neben der Verwendung von Palladium(II)chlorid zur spezifischen Oxidation von CO zu CO<sub>2</sub> sind auch weitere Anwendungen auf Grundlage dieses Prinzips vorstellbar. So kann durch die Verwendung von Natriumsulfit mit Hilfe dieser Kapsel spezifisch Sauerstoff gebunden werden, ohne dass es dabei zur Alkalisierung des umgebenden Mediums durch das entstehende Natriumsulfat kommen kann. Ebenso könnten Kohlendioxid und andere saure Gase im Labormaßstab durch den Einsatz von Diethanolamin bzw. Monoethanolamin gebunden werden. Darüber hinaus lässt sich diese Kapsel natürlich auch zu Dialysezwecken einsetzen, so dass sie auch für ein breites biochemisches Anwendungsspektrum - von Fraktionierungen bis zur Konzentration und Reinigung von Proben - verwendbar ist.

## 4.2 Der Zusammenbau der katalytischen $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Gruppe aus [NiFe]-Hydrogenasen findet im HypCD-Komplex statt

Der Sequenzvergleich von insgesamt 448 HypD-Proteinen zeigte, dass in etwa 37 % aller bekannten HypD-Isoformen weniger als vier Cysteine konserviert vorliegen. Diese sind mutmaßlich an der Ausbildung der beiden postulierten Disulfidbrücken beteiligt. Obgleich die Ausbildung dieser Disulfidbrücken bislang nur in Kristallisationsstudien nachgewiesen werden konnte, wurde diesen Disulfidbrücken bzw. den korrespondierenden Thiolgruppen eine essentielle Funktion bei einer postulierten Elektronentransferreaktion zugeordnet (Watanabe, Matsumi *et al.* 2007). Aufgrund dieses Merkmals kann man zwei Typen von HypD-Proteinen unterscheiden, den *DDB*- (*Double Disulfide Bond*) Typ mit beiden Disulfidbrücken (z. B. *Thermococcus kodakarensis* HypD und *Ralstonia eutropha* HypD1) und den *SDB*- (*Single Disulfide Bond*) Typ (*Escherichia coli* HypD und *Ralstonia eutropha* HypD2) mit lediglich der proximalen Disulfidbrücke (SS1). Diese proximale, also der Bindestelle des „katalytischen“ Eisens nächstgelegene, Disulfidbrücke (SS1) ist in allen HypD-Isoformen konserviert. Die Vielzahl der HypD-Proteine die ohne eine zweite Disulfidbrücke auskommen ist derart groß, dass man nicht von einer Ausnahme sprechen kann. Demnach scheint die Präsenz dieser zweiten, distalen Disulfidbrücke (SS2) für die Funktion von HypD entbehrlich zu sein. Bestätigung fand diese Theorie in einer Mutagenesestudie an *R.e.*HypD1, bei den C325S- und C354S-Mutanten von HypD (Diese beiden Aminosäuren bilden in *R.e.*HypD1 die SS2) im Überexpressionssystem dieselbe Aktivität aufwiesen wie das native HypD (Bürstel, Siebert *et al.* 2012). Jeder Austausch eines der anderen konservierten Cysteine führte zu einem dramatischen Verlust der Hydrogenaseaktivität. Dies bestätigte die Ergebnisse einer vergleichbaren Mutagenesestudie aus *E. coli* (Blokesch und Böck 2006). Die natürlich vorkommenden Substitutionen einer Grundgesamtheit von 448 HypD-Isoformen zeigen, dass die beobachteten Aminosäureaustausche nicht willkürlich sind. Für jedes Cystein existiert nur eine geringe Anzahl an Alternativen (Abbildung 3-8). Diese wenigen Alternativen folgen zudem gewissen Regeln (siehe Kapitel 3.2.2), die Indizien dafür liefern, dass diese Substitutionen mehr sind als eine bloße Momentaufnahme einer anhaltenden, zufälligen Evolution von einem zum anderen HypD-Typ. Viel wahrscheinlicher ist es, dass diese Austausche gewissen funktionalen Notwendigkeiten unterliegen.

Die Entfernung vom [4Fe4S]-Cluster zu proximalen Disulfidbrücke liegt in allen untersuchten Spezies bei etwa 8,8 Å (vergleiche Abbildung 3-7) und somit deutlich innerhalb der für den intramolekularen Elektronentransfer beobachteten Distanzen (Page, Moser *et al.* 2003). Diese Beobachtungen stützen das Modell der von Watanabe *et al.* postulierten

Elektronentransferreaktion durch Bildung von Disulfidbrücken (Watanabe, Matsumi *et al.* 2007). Da jedoch die Geschwindigkeit des intramolekularen Elektronentransfers exponential proportional zur überbrückenden Distanz abnimmt (Lippard und Berg 1995), sind zwei Disulfidbrücken womöglich die Voraussetzung für einen hocheffizienten Elektronentransfer. Eine andere mögliche Hypothese zur Existenz einer zweiten Disulfidbrücke ist die Überlegung, dass zwei Disulfidbrücken unmittelbar beide Elektronen bereitstellen könnten, die für die Bindung beider Cyanide benötigt werden. So wäre eine Regeneration der Disulfidbrücken bzw. des [4Fe4S]-Clusters von HypD während des Ligandierungsprozesses überflüssig. Ein solcher Mechanismus wäre unter Bedingungen sinnvoll, in denen die Regeneration der redoxaktiven Elemente in HypD, durch einen Mangel an geeigneten Elektronendonatoren, zum Flaschenhals der gesamten Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen werden würde. Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Ligandierungsprozessen ist jedoch unwahrscheinlich, da auch der Verlust der distalen Disulfidbrücke nicht zu einem Verlust der Hydrogenaseaktivität führt (Bürstel, Siebert *et al.* 2012).

In *Ralstonia eutropha* findet man insofern eine besondere Situation vor, da von jeder HypD-Variante jeweils eine Version vorhanden ist, HypD1 und HypD2. Während das bereits gut charakterisierte HypD1 essentiell für die Reifung der MBH, RH und der SH ist (Dernedde, Eitinger *et al.* 1996), wird HypD2 im Kontext der vierten Hydrogenase kodiert. Vorläufige Untersuchungen der Hydrogenaseaktivität der vierten Hydrogenase in einem  $\Delta hyp1/ \Delta hyp2$ -Hintergrund weisen darauf hin, dass HypD2 essentiell für die Reifung dieser vierten Hydrogenase ist (C. Schäfer, unpublizierte Ergebnisse). Umgekehrt zeigten Untersuchungen von HypD-Mutanten regelmäßig eine geringe Hydrogenaserestaktivität (~ 1 %) (Dernedde, Eitinger *et al.* 1996). Diese ist womöglich das Ergebnis einer partiellen Komplementation durch HypD2.

Von größerem Interesse ist jedoch die Frage nach dem Ort an dem der Carbonylligand an das „katalytische“ Eisen bindet. Neben den großen Untereinheiten der jeweiligen [NiFe]-Hydrogenasen konnte der CO-Ligand bisher nur in HoxV, einem Intermediat der MBH-spezifischen Reifung, nachgewiesen werden (Ludwig, Schubert *et al.* 2009).

Ferner ist bislang noch unklar, ob neben dem CO-Liganden tatsächlich *beide* Cyanidliganden bereits im HypCD-Komplex vorhanden sind. Durch den bisher verwendeten radioaktiven *Assay* konnte lediglich ein qualitativer Nachweis für den Transfer *eines* CN<sup>-</sup> von HypE auf den HypCD-Komplex erbracht werden (Blokesh, Albracht *et al.* 2004).

Durch FTIR-Spektroskopie konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass nicht nur beide Cyanidliganden, sondern auch der Carbonylligand bereits im HypCD-Komplex vorhanden sind. Dieser Befund konnte separat für den HypCD-Komplex aus *Escherichia coli* ( $v(\text{CN})$  2099,

2075  $\text{cm}^{-1}$  und  $\nu(\text{CO})$  1951  $\text{cm}^{-1}$ ) und *Ralstonia eutropha* ( $\nu(\text{CN})$  2099, 2077  $\text{cm}^{-1}$  und  $\nu(\text{CO})$  1969  $\text{cm}^{-1}$ ) bestätigt werden (Abbildung 3-13 und Abbildung 3-14).

Die FTIR-Spektroskopie lieferte zudem den ersten, wenn auch indirekten, Beweis für die Präsenz des „katalytischen“ Eisens. Da die koordinative Bindung der diatomaren Cyanid- bzw. Carbonylliganden an ein Übergangsmetall wie Eisen als Voraussetzung für eine hinreichend hohe Absorption der IR-Strahlung zu sehen ist (Nakamoto 2008).

Basierend auf den Kristallstrukturen von HypC, HypD und HypE aus *Thermococcus kodakarensis* konnte ein Modell der Ligandierung des „katalytischen“ Eisens abgeleitet werden. Gemäß diesem Modell werden die CN<sup>-</sup>-Liganden von HypE über einen nukleophilen Angriff der Liganden auf das Eisen übertragen. Die dafür erforderlichen Elektronen werden durch die Oxidation von freien Thiolen zu Disulfidbrücken bereitgestellt. Das [4Fe4S]-Zentrum in HypD soll dabei eine wichtige Rolle bei der Regeneration dieser Disulfidbrücken besitzen (Dai, Schwendtmayer *et al.* 2000; Watanabe, Matsumi *et al.* 2007). Die hier gezeigten FTIR-Spektren von HypCD-Komplexen substantizieren dieses Modell, da sie den Anfangs- und Endzustand dieses Modells belegen. Ferner legen die genannten Ergebnisse nahe, dass die prosthetische Fe(CN)<sub>2</sub>(CO)-Gruppe als „vormontierte“ Einheit in die großen Untereinheiten transferiert wird. Allerdings ist bisher noch kein schlüssiger Beweis dafür erbracht worden, dass auch das Eisenatom, welches die diatomaren Liganden im HypCD-Komplex trägt, in die großen Untereinheiten der Hydrogenasen transferiert wird und somit zu einem integralen Bestandteil des aktiven Zentrums wird. Für einen Wechsel der diatomaren Liganden wären jedoch - gemäß dem derzeit gültigen Modell - erneut Elektronen erforderlich (Watanabe, Matsumi *et al.* 2007). Da die großen Untereinheiten jedoch weder ein [4Fe4S]-Zentrum, noch bekannte Disulfidbrücken besitzen, die die Elektronen bereitstellen könnten, ist diese Möglichkeit mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Ein direkter Nachweis für einen solchen Transfer könnte *in vitro* mittels eines radioaktiven Eisen-Isotopes erbracht werden.

Interessanterweise zeigten Spektren von HypCD-Komplexen, bei deren Expression HypE nur in substöchiometrischen Mengen vorhanden war, weder CN<sup>-</sup>- noch CO-Liganden. Diese Ergebnisse sind konsistent mit früheren Untersuchungen zum Transfer des Cyanidliganden auf den HypCD-Komplex. Auch bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *side-by-side*-Expression von HypCD und HypE den Ligandentransfer unterstützt, jedoch konnte bisher für HypE nachweislich lediglich eine Funktion bei der Synthese bzw. dem Transfer des Cyanidliganden erbracht werden (Reissmann, Hochleitner *et al.* 2003; Blokesch, Albracht *et al.* 2004; Blokesch, Paschos *et al.* 2004; Watanabe, Matsumi *et al.* 2007). Anhand dieser Daten kann zwar nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass HypE keine Funktion beim Transfer

des CO-Liganden auf das Eisen hat. Viel wahrscheinlicher scheint jedoch die Vermutung, dass es sich dabei um einen indirekten Effekt handelt. Weitergehende Untersuchungen an HypCD-Komplexen aus Stämmen, in denen die Carbamoylphosphat-Synthetase ausgeschaltet wurde, konnten diesen Effekt spezifisch auf die Synthese der Cyanidliganden eingrenzen (Abbildung 3-15). Die Korrelation zwischen der Synthese der CN<sup>-</sup>-Liganden und dem Transfer bzw. der Synthese des Carbonylliganden ist zunächst nicht offensichtlich, ist doch bereits hinlänglich gezeigt worden, dass Carbamoylphosphat keine Vorstufe in der Synthese des Carbonylliganden ist (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005; Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007).

Über die Reihenfolge der Ligandenbindung bei [NiFe]-Hydrogenasen gibt es derzeit noch keine *in vivo*-Untersuchungen. Durch die Synthese organometallischer Modellverbindungen, welche das aktive Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen imitieren sollten (Liaw, Lee *et al.* 2002), konnte ein Modell dieser Abläufe erstellt werden. Solche Modellverbindungen können entsprechende Untersuchungen *in vivo* nicht gänzlich ersetzen, erfahren aber mit den hier vorgestellten Daten Bestätigung. Die oben dargelegten Ergebnisse belegen, dass die Synthese von Carbamoylphosphat und folglich die Bindung der CN<sup>-</sup>-Liganden an das Eisenatom im HypCD-Komplex Voraussetzung ist für die Bindung des Carbonylliganden. Gemäß dem derzeitigen Wissensstand ist das „katalytische“ Eisen vor Bindung der diatomaren Liganden im HypCD-Komplex über zwei Cysteine und zudem womöglich über ein Histidin koordiniert. Diese Situation eines monomeren Eisens wird am besten durch eine (Et<sub>4</sub>N)<sub>2</sub>[Fe(S<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)(CN)<sub>2</sub>(CO)]-Modellverbindung wiedergegeben (Rauchfuss, Contakes *et al.* 2001). Das IR-Spektrum dieser Verbindung zeigte drei distinkte Maxima;  $\nu(\text{CN})$  2080, 2075 cm<sup>-1</sup> und  $\nu(\text{CO})$  1897 cm<sup>-1</sup>. Nach bekunden der Autoren sollte diese Verbindung den Nahbereich der Fe(SR)<sub>2</sub>(CN)<sub>2</sub>(CO)-Einheit aus [NiFe]-Hydrogenasen darstellen. Tatsächlich muss jedoch festgestellt werden, dass diese Modellverbindung in noch viel höherem Maße die Situation eines muren HypCD-Komplexes widerspiegelt. Rauchfuss *et al.* konnten zeigen, dass die große Ligandenfeldstärke der gebundenen Cyanide zu einem *Spin-crossover* am Fe<sup>II</sup> führt, was letztendlich zur Bindung des Carbonylliganden führt (Rauchfuss, Contakes *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass der zugrundeliegende Mechanismus hinter dieser Art der kooperativen Bindung synergetische Effekte sind, die aus den starken  $\sigma$ -Donoreigenschaften der Cyanide resultieren, welche die  $\pi$ -Rückbindung zwischen dem monomeren Fe<sup>II</sup> und dem CO stabilisieren (Moreland und Rauchfuss 2000).

Beim Vergleich beider murer HypCD-Komplexe und dem (Et<sub>4</sub>N)<sub>2</sub>[Fe(S<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)(CN)<sub>2</sub>(CO)] fällt auf, dass die Positionen der Streckschwingungen im FTIR-Spektrum der jeweiligen Cyanidliganden ähnlich ausfallen. Im Vergleich dazu zeigen die Streckschwingungen des

Carbonylliganden eine deutlich größere Streuung. Diese Beobachtung impliziert, dass bereits im HypCD-Komplex die prosthetische  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Gruppe eine Konformation einnimmt, die der in maturen [NiFe]-Hydrogenasen gleicht. Das bedeutet, dass die beiden verbrückenden Cysteine mit den beiden Cyanidliganden eine nahezu planare, äquatoriale Ebene bilden und der Carbonylligand *in trans* zur vermeintlichen „offenen Bindestelle“ lokalisiert ist.

Diese These wird darüber hinaus durch FTIR-Spektren von maturen *E.c.*HypCD-Komplexen gestützt, welche unter reduzierenden Bedingungen gereinigt wurden. In Gegenwart von 1 mM DTT zeigte sich ein Signal-*Splitting* des Carbonylliganden, während die Streckschwingungen der Cyanide ( $\nu(\text{CN})$ ) unverändert bei  $2099\text{ cm}^{-1}$  und  $2075\text{ cm}^{-1}$  blieben. Im Bereich der CO-Bande war nach Reduktion, neben dem bereits bei 0,1 mM DTT beobachteten Maximum bei  $1951\text{ cm}^{-1}$ , ein zweites Maximum bei  $1963\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten (Abbildung 3-16). Bei einem *R.e.*HypCD-Komplex, der unter diesen reduzierenden Bedingungen gereinigt wurde, zeigte sich eine vergleichbare Modifikation. Interessant ist jedoch, dass sich bei *R. eutropha* mindestens zwei zusätzliche Absorptionsmaxima bei  $1977\text{ cm}^{-1}$  und  $1959\text{ cm}^{-1}$  zeigen, deren Intensität zu Lasten des ursprünglichen *Peaks* bei  $1969\text{ cm}^{-1}$  geht (Abbildung 3-17). Diese Modifikation ist auf eine veränderte Elektronendichte am designierten „katalytischen“ Eisen zurückzuführen, die vermutlich durch die Reduktion der Disulfidbrücke bzw. des [4Fe4S]-Clusters verursacht wird. Eine solche spezifische Veränderung des Carbonylliganden wurde bereits in Hydrogenase-Holoenzymen wie der RH beobachtet (Bernhard, Buhrke *et al.* 2001). Dies wird dadurch erklärt, dass der Carbonylligand *in trans*-Position zur offenen Bindestelle am Eisen bindet. Damit reagiert es viel empfindlicher auf Veränderungen der Elektronendichte am Eisen als z. B. die  $\text{CN}^-$ -Liganden, die zudem noch über Wasserstoffbrücken im Proteingerüst fixiert sind (Gordon und Kubas 2010).

Das Verhalten des HypCD-Komplexes unter reduzierenden Bedingungen steht damit jedoch im Gegensatz zu FTIR-Untersuchungen an HoxV. HoxV ist ein MBH-spezifisches Reifungsprotein, welches die  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Einheit vorübergehend aufnimmt bevor diese in die prämaturre große Untereinheit der MBH transferiert wird. Die Inkubation dieses Intermediates mit Dithionit zeigte keinerlei Veränderungen der Wellenzahlen der diatomaren Liganden im FTIR-Spektrum (Ludwig, Schubert *et al.* 2009).

Im Fortgang einer Untersuchung des HypCD-Komplexes könnte untersucht werden welches Merkmal des HypCD-Komplexes die Modifikationen des Carbonylliganden unter reduzierenden Bedingungen bewirkt. Untersuchungen des HypD-Proteins mittels UV-Vis-Spektroskopie zeigten, dass sich der [4Fe4S]-Cluster nur durch die Zugabe exzessiver Mengen Dithionits reduzieren ließ. Ferner ließ sich ein Transfer des  $\text{CN}^-$ -Liganden nur bei einem unter

reduzierenden Bedingungen gereinigten HypCD-Komplex beobachten. Ein einmal vollständig oxidiertes Komplex konnte *in vitro* nicht einmal durch die Zugabe von Dithionit reaktiviert werden (Blokesh, Albracht *et al.* 2004). Es scheint daher fraglich, ob der [4Fe4S]-Cluster die Ursache für die Signalaufspaltung des Carbonylliganden nach Reduktion mit dem vergleichsweise milden Reduktionsmittel DTT ist. Eine zweite mögliche Erklärung für die Signalaufspaltung des Carbonylliganden ist die These, dass die Reduktion der mutmaßlichen Disulfidbrücken eine Veränderung der Elektronendichte am Eisen bewirkt. Zusammen mit dem Befund, dass die C325S- und C354S-Austauschmutanten stabil sind und Hydrogenaseaktivität auf Wildtyp-Niveau zeigen (Bürstel, Siebert *et al.* 2012), liefert diese Überlegung die Basis für eine überprüfbare Theorie. So könnte sich das Verhalten des *R.e.*HypCD-Komplexes in der FTIR-Spektroskopie dahingehend verändern, dass eine Doppelmutante, als Folge des Verlustes einer Disulfidbrücke, nunmehr ein einziges zusätzliches Absorptionsmaximum aufweist (zusätzliche Absorptionsmaxima nach Reduktion bei *E. coli*: 1963  $\text{cm}^{-1}$ ; bei *R. eutropha*: 1977  $\text{cm}^{-1}$  und 1959  $\text{cm}^{-1}$ ).

Im Hinblick auf die Synthese und Funktion von künftigen artifiziellen Katalysatoren scheinen weitere Untersuchungen des HypCD-Komplexes geboten. Insbesondere die Aufklärung der Zwischenschritte zwischen einem unbeladenen HypCD-Komplex und einem vollständig ligandierten  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ist dabei von großem Interesse. Ausgehend von einem gereinigten, unbeladenen Komplex kann über ein *in vitro*-System nachgedacht werden, bei dem die einzelnen Intermediate durch die schrittweise Zugabe von HypE-CN oder Cyanogenbromid (Liaw, Lee *et al.* 2002) und/oder durch Inkubation unter CO-Atmosphäre aufgelöst werden können. Ein solches *in vitro*-System könnte zudem hilfreich bei der Beantwortung der Frage sein wie *in vivo* gewährleistet werden kann, dass die richtige Art und Anzahl von Liganden bindet und ob für den Transfer des Carbonylliganden noch weitere akzessorische Proteine notwendig sind. Darüber hinaus kann sich ein solches System als hilfreich erweisen, um zu klären wie die richtige Konformation mit zwei *cis*-Cyaniden und einem *trans*-CO-Liganden beim Transfer der  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Einheit vom HypCD-Komplex in die prämaturre große Untereinheit aufrechterhalten werden kann.

Der HypCD-Komplex liefert zudem womöglich die Basis für weitergehende Untersuchungen zum Ursprung des Carbonylliganden. So könnte unter Umständen ein induzierbarer Arrest der Reifung auf Ebene des HypCD-Komplexes erzeugt werden. Durch die Zugabe von N-Butylisocyanid oder anderer isosterischer bzw. isoelektrischer Inhibitoren könnte die Bindung der diatomaren Liganden inhibiert werden. Ein solcher inhibitorischer Effekt durch N-Butylisocyanid auf CODHs konnte bereits gezeigt werden (Dobbek, Gremer *et al.* 2002). Infolge dieses Arrests während der logarithmischen Wachstumsphase würde es unter Umständen zu

einer Akkumulation der Vorstufen der jeweiligen diatomaren Liganden kommen. Die Zellextrakte könnten dann in kurzen Intervallen mittels Massenspektrometrie oder Dünnschichtchromatographie untersucht werden.

### **4.3 Die Biosynthese des CO-Liganden in [NiFe]-Hydrogenasen ist die Leistung mehrerer Reaktionen des Wirtsmetabolismus**

Die Herkunft beziehungsweise die Synthese des Carbonylliganden in [NiFe]-Hydrogenasen ist bisher noch völlig ungeklärt. Im Unterschied zu [NiFe]-Hydrogenasen ist die Synthese der diatomaren Liganden in [FeFe]-Hydrogenasen im Wesentlichen bekannt. Der Carbonylligand wird durch das akzessorische Radikal-AdoMet-Enzym HydG als gasförmiges CO freigesetzt. Tyrosin dient als Vorstufe für die Synthese beider Liganden (Driesener, Challand *et al.* 2010; McGlynn, Boyd *et al.* 2010; Shepard, Duffus *et al.* 2010; Mulder, Shepard *et al.* 2011). Desoxyhämoglobin wird hier als sensitiver Reporter für den spektroskopischen Nachweis von CO eingesetzt (Shepard, Duffus *et al.* 2010). Für eine Analogie zur Ligandensynthese in [FeFe]-Hydrogenasen gibt es bei [NiFe]-Hydrogenasen allerdings keine Hinweise. Kein akzessorisches Protein, das mit der Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen in Verbindung gebracht wird, weist die typische Erkennungssequenz CX<sub>3-5</sub>CX<sub>2</sub>C eines Radikal-AdoMet-Enzyms auf (McGlynn, Boyd *et al.* 2010).

Anhand vorangegangener Studien gibt es nur wenige, experimentell belegte Anhaltspunkte zum möglichen Ursprung des Carbonylliganden. Eine der vielversprechendsten Hypothesen beruht auf SI-Markierungsexperimenten mit <sup>13</sup>CO. So konnte in *E. coli* für mehrere, auch heterolog exprimierte, Hydrogenasen eine spezifische quantitative Markierung des Carbonylliganden festgestellt werden (Forzi und Sawers 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007). Dies eröffnet die Option, dass gasförmiges CO – ob durch den Wirtsorganismus freigesetzt oder aus der Umwelt aufgenommen – unmittelbar als Vorstufe des Carbonylliganden dient. Die in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 vorgestellten Ergebnisse belegen, dass der CO-Ligand eindeutig aus dem Wirtsmetabolismus hervorgeht. Hierbei dient exklusiv Glycerol als ultimative Quelle des Carbonylliganden. Da Glycerol, neben Fruktose, eine der beiden basalen Kohlenstoffquellen im Medium ist, ist diese Tatsache insofern bemerkenswert, da die Fruktose-Kohlenstoffatome offensichtlich keinerlei Beitrag zur Biosynthese der Carbonylliganden leisten. An dieser Stelle sei jedoch noch einmal erwähnt, dass die Expression der Hydrogenasegene in *R. eutropha* erst mit der Adaption auf Glycerol als Kohlenstoff- und Energiequelle beginnt (Friedrich 1981). Die Tatsache, dass es bei differentiell markiertem Glycerol immer zu einer Mischpopulation aus markierten und unmarkierten Carbonylliganden kommt, weist auf mehrere unabhängige Synthesewege für diesen Liganden hin. Letztlich scheiden atmosphärische Gase zwar als

Vorstufe der CO-Liganden aus, jedoch bleibt die Möglichkeit das freies CO oder ein anderes Gas aus dem Metabolismus freigesetzt wird, bevor es zur Synthese des Carbonylliganden verwendet wird, unberührt. Diese These wurde durch die Ergebnisse der CO-Limitation unter heterotrophen und lithoautotrophen Bedingungen bestätigt (siehe Kapitel 3.3.4.2). Durch die Zugabe von PdCl<sub>2</sub> konnte hier unter lithoautotrophen Bedingungen eine deutlich größere Latenzphase im Wachstum beobachtet werden. Dieser Phänotyp ging mit einer verminderten Aktivität der löslichen Hydrogenase einher. Gemäß dem Modell, dass die Zugabe des PdCl<sub>2</sub> zur Eliminierung des Kohlenmonoxids im Medium führt, konnten beide Effekte - anhand der Akkumulation der prämaturen großen Untereinheiten der MBH und SH - auf eine Störung der pleiotropen Hydrogenasematuration zurückgeführt werden (Kapitel 3.3.4.2). Diese Störung ließ sich durch die Zugabe von Kohlenmonoxid beheben. Im Gegensatz dazu zeigte der Einsatz von PdCl<sub>2</sub> unter heterotrophen Bedingungen weder eine Wachstumsverzögerung noch einen Effekt auf Hydrogenaseaktivität oder die Maturation (Kapitel 3.3.4.1). Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf das Vorhandensein verschiedener enzymatischer Reaktionen hin, die gemeinschaftlich an der Synthese des Carbonylliganden beteiligt sind.

Ein weiterer Aspekt der Synthese des Carbonylliganden ist die Anpassung der pleiotropen Maturation an hohe Sauerstoffpartialdrücke. Als Anpassung an diese Bedingungen besitzen einige Organismen HypX, ein zusätzliches pleiotropes, akzessorisches Protein, welches CO-Liganden unter hohen Sauerstoffkonzentrationen aus N<sup>10</sup>-Formyl-THF freisetzt. Ein HypX-Phänotyp ist sowohl unter heterotrophen als auch unter lithoautotrophen Bedingungen nachweisbar (Kapitel 3.4.8 und 3.4.9). Dies scheint auf den ersten Blick im Widerspruch mit den Ergebnissen der CO-Limitation aus den Kapiteln 3.3.4.1 und 3.3.4.2 zu stehen. In der Tat zeigen die Ergebnisse dieser Kapitel, dass unter lithoautotrophen Bedingungen Kohlenmonoxid den Hauptanteil der Vorstufe des CO-Liganden bildet, dieser aber unter heterotrophen Bedingungen vorzugsweise aus einer „gebundenen“ Vorstufe synthetisiert wird. Allerdings ist der Effekt von HypX auf eine Wachstumsphase beschränkt, in der die Zahl der Sauerstoffverzehrer (Bakterien) niedrig und die Konzentration des gelösten Sauerstoffs entsprechend hoch ist (Kapitel 3.4.10). Da mit zunehmender Anaerobisierung der Beitrag von HypX zur Synthese der CO-Gesamtpopulation marginalisiert wird (vergleiche Kapitel 3.4.7 und Kapitel 3.4.12) ist dieser Anteil zu Beginn der Derepression im FGN-Medium so gering, dass ein Effekt nicht mehr nachweisbar ist. Auch muss die - durch HypX bereitgestellte - Menge an CO-Liganden vergleichsweise gering auszufallen, da diese bei höheren Zelldichten mittels FTIR-Spektroskopie nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 3-32). Diese basale HypX-Aktivität unter heterotrophen

Bedingungen könnte allerdings der Grund für die Spuren von metallischem Palladium an den PTFE-Membranen aus heterotrophen Anzuchten sein (Abbildung 3-22 B).

Die zur Quantifizierung des zellulären Vorläufers des CO-Liganden eingesetzte  $^{13}\text{C}$ -Titration ergab, dass dieser sich unter heterotrophen Bedingungen im niedrigen nanomolaren Bereich befindet. Dabei reichte ein 130-facher Überschuss<sup>5</sup> an  $^{13}\text{C}$  aus, um eine 50 %-ige Markierung des Carbonylliganden der RH zu erzeugen (Abbildung 3-21). Dies entspricht einer Konzentration von 10,5 nmol/l (Kapitel 3.3.3) und ist damit deutlich geringer als die zelluläre Konzentration der meisten Metabolite, wie sie für das Referenzsystem *E. coli* bestimmt werden konnten (Bennett, Kimball *et al.* 2009). Diese Konzentration muss somit als bisher unbekannt metabolische Nebenreaktion interpretiert werden. Überdies entspricht diese geringe Konzentration dem Hydrogenasegehalt einer Zelle, welcher ebenfalls im nanomolaren Bereich liegt (Forzi, Hellwig *et al.* 2007).

Da sich die pleiotrope Maturation im Wesentlichen bei allen gut untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen zu gleichen scheint<sup>6</sup> und alle bekannten *hyp*-Gene bereits mit einer Funktion besetzt wurden, scheint die Synthese des Carbonylliganden – außer bei hohen  $\text{O}_2$ -Partialdrücken (siehe Kapitel 3.4) – als Leistung des basalen Wirtsmetabolismus bereitgestellt zu werden. Dabei gibt es sowohl wirtsspezifische Unterschiede als auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Anzuchsbedingungen eines Wirtes. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob und wie diese Synthesereaktionen mit der Expression der Hydrogenasen koreguliert werden.

Auch wenn zuvor bereits postuliert wurde, dass es durchaus eine Vielzahl von enzymatischen Reaktionen geben könnte die zur Synthese beitragen, wurde von denselben Autoren postuliert, dass diese vorzugsweise in allen Organismen dieselben sein müssten (Forzi und Sawers 2007). Während sich die erstgenannte These durch diese Studie bestätigt findet, muss das zweite Postulat eindeutig verworfen werden. Zum einen besitzen nur wenige Organismen, die [NiFe]-Hydrogenasen exprimieren auch ein HypX (siehe unten), so dass hier bereits keine Uniformität mehr gegeben ist. Zum anderen konnte durch *in vivo*- $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente mit Acetat, anders als in *Allochromatium vinosum*, keine Markierung eines der diatomaren Liganden erzeugt wird (siehe unten).

---

<sup>5</sup>Bezogen auf die durchschnittliche atmosphärische CO-Konzentration von 0,1 ppmv in der nördlichen Hemisphäre (Conrad, R. (1996). "Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO)." *Microbiol Rev* **60**(4): 609-640.)

<sup>6</sup> Eine prominente Ausnahme stellt hier HypF dar. Während die lange Version vermutlich – wie *E.c.*HypF – Carbamoylphosphat als Substrat akzeptiert. Kann die verkürzte Version, HypF1, dieses nicht verwerten (unveröffentlichte Ergebnisse M. Blokesch). Diese Variante benötigt höchstwahrscheinlich freies Carbamat, welches u.U. direkt synthetisiert oder, ausgehend von Carbamoylphosphat, durch eine ACP dephosphoriliert wird.

#### 4.4 *HypX, eine spezifische Anpassung der Hydrogenasereifung an einen aeroben Lebensstil*

Obleich der negative Effekt einer Deletion von *hypX* auf die Hydrogenaseaktivität bzw. die Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen schon lange bekannt war (Buhrke 2006), war die genaue Funktion von HypX lange Zeit umstritten. Es wurden Funktionen innerhalb der Nickel-Insertion und bei der Synthese zusätzlicher CN<sup>-</sup>-Liganden im aktiven Zentrum der SH postuliert (Rey, Fernandez *et al.* 1996; Bleijlevens, Buhrke *et al.* 2004). Auch nachdem die Existenz der zusätzlichen CN<sup>-</sup>-Liganden in der SH falsifiziert werden konnte (Horch, Lauterbach *et al.* 2010), konnte für *Ralstonia eutropha* keine Beteiligung von HypX an der Insertion des Nickels bestätigt werden. Im Kontext der hier vorgestellten Studie muss der damals in *Rhizobium leguminosarum* beobachtete und bislang noch nicht schlüssig widerlegte Effekt – eine drastisch reduzierte Hydrogenaseaktivität ( $\leq 3,6$  % Restaktivität) bei Zugabe eines Überschusses an Ni<sup>2+</sup>-Ionen, aber nur ein verhältnismäßig geringer Aktivitätsverlust (30-40 % Restaktivität) ohne Zugabe von Ni<sup>2+</sup> – neu bewertet werden (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Da der CO-Ligand bereits Bestandteil einer Fe(CN)<sub>2</sub>(CO)-Einheit im HypCD-Komplex ist (Kapitel 3.2) und diese bereits vor dem Ni<sup>2+</sup>-Ion in die prämaturose große Untereinheit eingebaut wird (Maier und Bock 1996; Chung und Zamble 2011), handelt es sich augenscheinlich um einen nachgeordneten Effekt. Dieser tritt offensichtlich bei *Rhizobium leguminosarum* nur unter Nickel-reichen Bedingungen deutlich zu Tage, da unter Nickel-armen Bedingungen der Nickeleinbau *per se* zum „Flaschenhals“ der Maturation wird und eine verminderte Synthese des Carbonylliganden nicht mehr ins Gewicht fällt. Der Vergleich der Hydrogenaseaktivität des Wildtyps unter beiden Bedingungen bekräftigt dies (+Ni<sup>2+</sup>: 15.200 nmol H<sub>2</sub> · h<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup>; - Ni<sup>2+</sup>: 2100 nmol H<sub>2</sub> · h<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup>) (Rey, Fernandez *et al.* 1996).

Bezüglich einer neuerlichen Revision der Funktion von HypX lieferten chemolithoautotrophe Wachstumsexperimente mit *Ralstonia eutropha* unter CO-Limitation erste Anhaltspunkte (Kapitel 3.3.4.2). Das Wachstum unter diesen Bedingungen zeigte dieselbe vergrößerte Latenzphase wie das chemolithoautotrophe Wachstum einer  $\Delta hypX_2$ -Mutante. Tatsächlich gelang es den physiologischen Phänotyp beim chemolithoautotrophen Wachstum durch die externe Zugabe geringer Mengen gasförmigen Kohlenmonoxids vollständig zu komplementieren (Kapitel 3.4.1). Gleichzeitig konnte der Grund für die Wachstumsverzögerung auf eine - durch CO-Zugabe - reversible Blockade der Hydrogenasematuration eingegrenzt werden. Somit war eine Verbindung zwischen HypX und der CO-Synthese gezeigt.

Weitere Hinweise auf den katalytischen Mechanismus bzw. das Substrat von HypX brachten Untersuchungen an der Sequenz sowie Strukturmodelle von HypX. Bereits im Vorfeld dieser

Studie konnten mittels PROSITE (Sigrist, Cerutti *et al.* 2002) zwei charakteristische Motive identifiziert werden (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Eines dieser beiden Motive befindet sich in der N-terminalen Hälfte und charakterisiert die Substratbindestelle eines  $N^{\prime 0}$ -Formyl-THF-hydrolysierenden Enzyms (PS00373). Das andere Motiv ist die Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase-Signatur (PS00166) der Crotonase-Superfamilie. Die Analyse von 18 HypX/HoxX-Sequenzen zeigte zudem einen Abschnitt (AS 269-296) in der Aminosäuresequenz, der ein nur geringes Maß an Konservierung aufweist (siehe Anhang, Abbildung 6-6) und HypX in zwei distinkte Domänen unterteilt. Diese strukturelle Gliederung wurde auch durch eine Strukturanalyse an HypX gestützt (Abbildung 3-39). Durch den Vergleich der sekundären Strukturmerkmale konnten homologe Domänen in den Kristallstrukturen anderer Enzyme identifiziert werden (Soding 2005; Soding, Biegert *et al.* 2005). Anhand dieser homologen Domänen konnten beide HypX-Domänen modelliert werden (Kapitel 3.4.13). Ohne konkrete Vorgaben gemacht zu haben, lieferte dieses „Topologie-Mapping“ für beide Domänen Treffer, die die Befunde der vorangegangenen Sequenzanalyse bestätigten. So wies die N-terminale Domäne höchste Übereinstimmung mit der  $N^{\prime 0}$ -Formyl-Tetrathydrofolat-Hydrolase Domäne einer FTHFD aus *Homo sapiens* auf (2CFI). Die C-terminale Domäne zeigte hingegen eine hohe strukturelle Übereinstimmung zu einer Enoyl-CoA-Hydratase-Untereinheit aus *Streptomyces coelicolor* A3 (3G64).

Um Rückschlüsse auf die Funktion eines zu untersuchenden Proteins zu erhalten, wird regelmäßig die Aminosäuresequenz herangezogen. Über die Analyse derselben werden homologe Proteine mit bekannter Funktion identifiziert. Jedoch kann allein aufgrund der Sequenz allzu häufig keine Beziehung zu einem bekannten Protein hergestellt werden. In solchen Fällen hat sich die Strukturvorhersage als verlässliches Mittel erwiesen, um weniger eng verwandte Homologe zu identifizieren, da selbst entfernt verwandte Homologe, die nur eine sehr geringe Sequenzidentität zum fraglichen Protein aufweisen, zumeist immer noch eine ähnliche 3D-Struktur aufweisen (Soding, Biegert *et al.* 2005). Selbst in solchen Fällen, bei denen aufgrund ihrer entfernten Verwandtschaft nicht mehr zwingend von einer gemeinsamen Funktion ausgegangen werden kann, konnten noch verifizierte Hypothesen bezüglich des Reaktionsmechanismus, des aktiven Zentrums und seiner Bestandteile aufgestellt werden (Pawlowski, Jaroszewski *et al.* 2000; Todd, Orengo *et al.* 2001).

Bei der Strukturvorhersage wird eine Sequenzidentität von wenigstens 20-25 % vorausgesetzt, ohne dass dadurch die Genauigkeit kompromittiert wird (Soding, Biegert *et al.* 2005). Niedrigere Werte verlangen womöglich zunächst eine manuelle Editierung der Sequenz- bzw. der Alignment-Parameter bevor ein *Template* identifiziert werden kann (Kiefer, Arnold *et al.* 2009).

In solchen Fällen hängt die Aussagekraft der einzelnen Modelle stark von ihrer Qualität ab. Diese wird u. a. durch den sogenannten *QMEAN Score* wiedergegeben (Benkert, Tosatto *et al.* 2008). Rückschlüsse und Hypothesen, die mit Hilfe dieser Homologiemodelle erstellt werden, bedürfen demnach immer auch einer experimentellen Bestätigung oder weiterer Indizien.

Die  $N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat-Bindestelle der N-terminalen Domäne lieferte einen konkreten Anhaltspunkt für weitergehende Untersuchungen. Diese Bindestelle ist in einer Reihe von Enzymen zu finden. Deren Gemeinsamkeit besteht darin, dass alle die Formylgruppe von 10-CHO-THF hydrolysieren. Dabei wird jeweils das Koenzym – die Tetrahydrofolsäure – regeneriert sowie Formylsäure generiert, welche vermutlich am Enzym gebunden bleibt (Guillon, Mechulam *et al.* 1992; Nagy, Marolewski *et al.* 1995; Chumanevich, Krupenko *et al.* 2004; Reuland, Vlasov *et al.* 2006; Krupenko 2009). Wie dieses Zwischenprodukt weiter enzymatisch umgesetzt wird ist dabei abhängig von der jeweiligen Enzymklasse (Fuchs 2007). Die meisten dieser  $N^{10}$ -CHO-THF-hydrolysierenden Enzyme besitzen einen modularen Aufbau. Dieser wird als das Ergebnis einer evolutionären Fusion zweier Proteine mit eng miteinander verbundenen Funktionen angesehen (Reuland, Vlasov *et al.* 2006; Krupenko 2009). HypX, welches einen vergleichbaren modularen Aufbau aufweist, könnte demnach aus einer vergleichbaren Entwicklung hervorgegangen sein.

Experimentelle Daten, welche die Identität der N-terminalen HypX-Domäne als  $N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat-Hydrolase-Domäne bestätigten, lieferte eine Mutagenesestudie an zwei hochkonservierte Aminosäuren. Diese beiden Aminosäuren, His74 und Asp109, sind in allen untersuchten HypX/HoxX-Homologen konserviert. Darüber hinaus sind diese Aminosäuren auch in sämtlichen anderen  $N^{10}$ -CHO-THF-hydrolysierenden Enzymen konserviert, da sie dort das aktive Zentrum der Hydrolase-Domäne bilden. Während die Mutation von His74 zu einer Instabilität der FTHFD aus *Homo sapiens* führte, führte die Mutation von Asp109 zur Inaktivität, nicht aber zur Instabilität (Krupenko und Wagner 1999; Krupenko, Vlasov *et al.* 2001). Diese Beobachtungen wurden anhand einer Mutagenesestudie an *hypX* aus *R. eutropha* bestätigt (Buhrke 2006).

Ausgehend von der These, dass  $N^{10}$ -Formyl-THF als Substrat dient, wurde eine Reihe isogener *Ralstonia eutropha*-Stämme konstruiert. In diesen Stämmen wurde das *glyA*-Gen, welches für eine Serin-Hydroxymethyl-Transferase kodiert, durch eine *in frame*-Deletion entfernt. Diese Stämme sind nicht mehr in der Lage den THF-Pool über den Katabolismus von Serin mit  $C_1$ -Einheiten aufzufüllen. In diesen Stämmen ist die Dekomposition von Glycin die einzige verbleibende Möglichkeit den THF-Pool mit neuen  $C_1$ -Einheiten aufzufüllen (Matthews 1996; Kikuchi, Motokawa *et al.* 2008). Die mit der Deletion von *glyA* einhergehende



Carbonylliganden ausgehend von nur einem einzigen Kohlenstoffatom erzeugt werden. Diese Befunde belegen die These, dass das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom von Glycin - via  $N^{10}$ -Formyl-THF - als direkte Vorstufe für HypX-abhängige CO-Synthese fungiert (siehe Abbildung 4-1).

Insofern sind diese Ergebnisse konsistent mit einer früheren Hypothese bezüglich der Herkunft der Carbonylliganden von [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli* (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Forzi und Sawers 2007). Die Autoren postulierten dort eine Synthese aus  $N^{10}$ -Formyl-THF, genauer Glycin und Serin, als die globale Vorstufe in der CO-Synthese. Im Gegensatz zu dieser Hypothese zeigten Markierungsexperimente mit  $^{13}\text{C}$ -Glycin in einem HypX<sup>-</sup>-Hintergrund jedoch (Abbildung 3-38 A und C) dass nur die HypX-abhängige CO-Synthese in *Ralstonia eutropha* über  $N^{10}$ -Formyl-THF läuft. Demnach ist sie nur in Organismen relevant die ein HypX-Homolog besitzen.

Wenngleich anhand der vorliegenden Ergebnisse noch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann das Glycin nicht unmittelbar als Substrat gebunden wird, macht die Präsenz einer  $N^{10}$ -Formyl-THF-Bindestelle am N-Terminus von HypX diese Möglichkeit äußert unwahrscheinlich. Da es außer dem *Glycine-Cleavage*-System keine anderen, physiologisch relevanten, katabolen Stoffwechselwege für Glycin gibt (Kikuchi, Motokawa *et al.* 2008), kann ausgeschlossen werden, dass die markierten C-Atome der Synthese der Carbonylliganden nicht über andere Stoffwechselwege zugeführt werden.

Im Vorfeld dieser Studie konnte ein HypX-abhängiger Effekt nur unter chemolithoautotrophen Bedingungen und ausschließlich für die beiden energiekonservierenden Hydrogenasen nachgewiesen werden. Daher wurde postuliert, dass die Reifung der RH nicht durch HypX beeinflusst wird (Buhrke 2006). Expressionsanalysen in *Rhizobium leguminosarum* zeigten jedoch, dass HypX mit den übrigen pleiotropen Reifungsproteinen koexprimiert wird (Rey, Fernandez *et al.* 1996). Daher wird HypX, auch in *Ralstonia eutropha*, heute der pleiotropen Maturation zugeordnet (Buhrke und Friedrich 1998). Da der CO-Ligand, wie hier bereits gezeigt werden konnte, schon im HypCD-Komplex vorhanden ist (Kapitel 3.2.6 und 3.2.7), muss durch die Deletion von *hypX* auch die RH betroffen sein. Da die RH alleine allerdings kein chemolithoautotrophes Wachstum erlaubt, konnte ein etwaiger HypX-abhängiger Effekt auf die Reifung der RH nur unter heterotrophen Bedingungen untersucht werden. Initiale Markierungsversuche zeigten bei der RH nur eine minimale Markierung des CO-Liganden (Abbildung 3-32 A), jedoch wurden diese Markierungsexperimente, dem gängigen Standard entsprechend, in FGN-Medium ausgeführt. Da in diesem Medium die Expression der Hydrogenasen erst nach Adaption auf Glycerol als Kohlenstoffquelle beginnt (Friedrich, Heine *et al.* 1981), ist die Zelldichte zu Beginn der Derepression bereits sehr groß ( $\text{OD}_{436} \geq 6,0$ ). Bei

diesen Zelldichten sind bereits keine nennenswerten Mengen an molekularem Sauerstoff mehr im Medium gelöst (Abbildung 3-36). Da der Effekt von HypX unter erhöhten Sauerstoffpartialdrücken am deutlichsten war (Buhrke 2006), konnte aus diesen Umständen gefolgert werden, dass die Wahl der Anzuchtbedingungen (FGN-Medium) nicht geeignet war um einen solchen Effekt auch bei heterotroph exprimierten Hydrogenasen zu beobachten. Durch die Umstellung auf GN-Medium (siehe Tabelle 3) und die Ernte der Kulturen bei geringen Zelldichten ( $OD_{436} \leq 1,0$ ) konnte eine Hydrogenasepopulation gewonnen werden, die ausschließlich in Gegenwart großer Mengen gelösten Sauerstoffs gereift ist (vergleiche Abbildung 3-36). In diesen Populationen wurden regelmäßig ein HypX-abhängiger Effekt auf die Reifung aller drei Hydrogenasen nachgewiesen. Diese Effekte konnten sowohl auf Ebene der Hydrogenaseaktivität (Kapitel 3.4.8), auf Ebene der Maturation (Abbildung 3-34) als auch in der spezifischen CO-Synthese (Kapitel 3.4.11 und 3.4.12) verifiziert werden. Auf Grundlage der Beobachtung, dass die HypX-abhängige CO-Synthese unter aeroben Bedingungen den „Flaschenhals“ der pleiotropen Reifung darstellt, konnte durch die Zugabe verschiedener Aminosäuren, namentlich Glycin und Serin, die  $NAD^+$ -reduzierende Hydrogenaseaktivität ganzer Zellen gesteigert werden (Kapitel 3.4.9). Dieser Versuch verdeutlichte die Dynamik der HypX-abhängigen CO-Synthese in Korrelation zum gelösten Sauerstoff noch deutlicher als die Messung mittels FTIR-Spektroskopie. So wurde auf Ebene der Hydrogenaseaktivität gezeigt, dass bereits ab einer Zelldichte  $OD_{436}$  von  $\geq 0,8$ , bei einer Konzentration  $206 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ , dieser „Flaschenhals“ verschwunden ist.

Da die Synthese des Carbonylliganden unter sauerstoffreichen Bedingungen nur unzureichend gegeben ist, muss HypX als Adaption an diese schwierigen Bedingungen gesehen werden. Die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen sind konsistent mit Beobachtungen an einem *in vitro*-System zur Hydrogenasereifung von [NiFe]-Hydrogenasen aus *E. coli*. Hier wurde berichtet, dass einer der frühen Maturationsschritte sauerstoffsensitiv ist (Soboh, Krüger *et al.* 2010). Auf Grundlage der hier durchgeführten Studie muss angenommen werden, dass es sich bei diesem Schritt um die Synthese des CO-Liganden handelt. Die Wahl von  $N^{10}$ -Formyl-Tetrahydrofolat als Substrat für die Synthese des Carbonylliganden birgt dabei einen entscheidenden Vorteil. Da die Derivate dieses Zweiges des  $C_1$ -Stoffwechsels u. a. für die Synthese von Aminosäuren und Purinen verwendet werden, müssen sie zu jeder Zeit im Metabolismus zur Verfügung stehen (Matthews 1996).

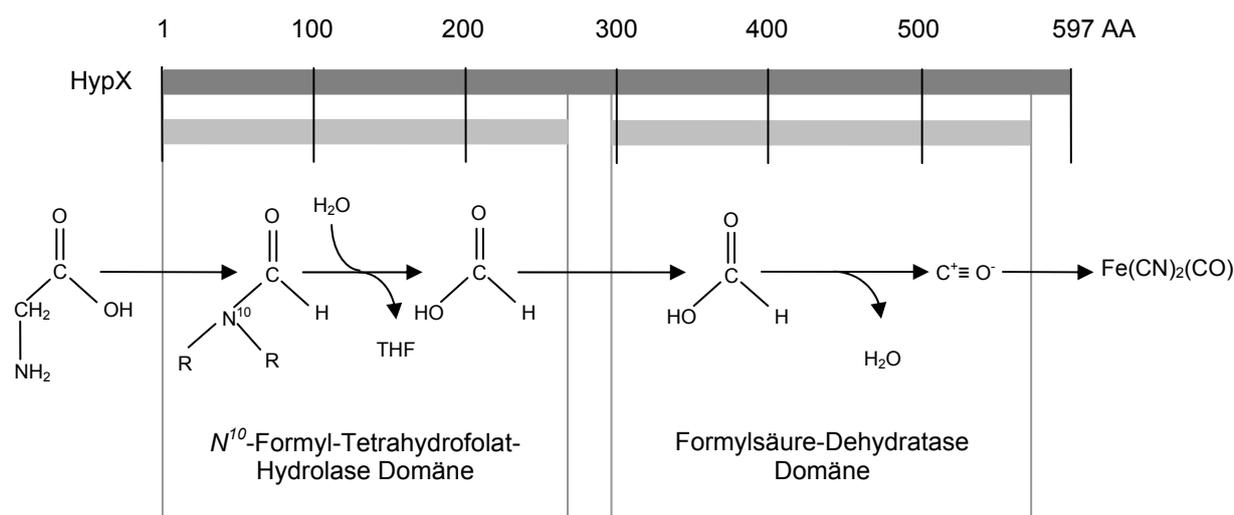
Im Folgenden soll der postulierte katalytische Mechanismus von HypX eingehend beleuchtet werden, der es *Ralstonia eutropha* unter aeroben Bedingungen ermöglicht, den raren und toxischen diatomaren Liganden (CO) aus einem Derivat des  $C_1$ -Metabolismus zu synthetisieren.

Wie in Kapitel 3.4.17 gezeigt wurde, ist für die Gesamtreaktion von HypX, die Synthese des Carbonylliganden, die Aktivität beider Domänen notwendig. Demnach agieren beide Domänen konzertiert in einer Gesamtreaktion (Abbildung 4-2).

Unter Berücksichtigung dieser Gesamtreaktion (siehe Abbildung 4-2) und der Tatsache, dass bei der Hydrolyse der Formylgruppe  $N^{10}$ -CHO-THF (Formiatstufe) Formylsäure als Intermediat entsteht, ist davon auszugehen, dass die Formylsäure unter Abspaltung von Wasser zu CO umgesetzt wird (siehe Gleichung 9).



Da das Kohlenstoffatom der Formylgruppe und des CO's die gleiche Oxidationsstufe (Formiatstufe) besitzen, würde eine Konversion der Formylgruppe über Formiat (Formylsäure) zu CO somit keine Redoxreaktion voraussetzen (Fuchs 2007), sondern lediglich eine simple Dehydratisierung.



**Abbildung 4-2: Postulierte Gesamtreaktion von HypX.** Das extern applizierte <sup>13</sup>C-Glycin versorgt über das *Glycine-Cleavage*-System den THF-abhängigen C<sub>1</sub>-Metabolismus. Seine höchstoxidierte Stufe,  $N^{10}$ -Formyl-THF, dient als Substrat der N-terminalen Hydrolase-Domäne in HypX. Durch Hydrolyse wird der THF-Kofaktor regeneriert und Formylsäure entsteht. Nach dem Transfer in die C-terminale Dehydratase-Domäne wird die Formylsäure zu einer Carbonylgruppe umgesetzt, dabei entsteht H<sub>2</sub>O. Das Produkt ist anschließend im aktiven Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen nachweisbar. R = THF.

Für eine solche Dehydratisierung sprechen mehrere Aspekte. Sowohl die Sequenzanalyse als auch die Strukturanalyse legen nahe, dass es sich bei der C-terminalen HypX-Domäne um eine Hydratase handelt. Mitglieder dieser Klasse von Enzymen (EC 4.2.1; Hydro-Lyasen) sind vorwiegend Dehydratasen, wobei die meisten Hydratasen / Dehydratasen ohnehin vollständig reversibel arbeiten (Bugg 2009). Ausgehend von dem Produkt der  $N^{10}$ -CHO-Hydrolase-Reaktion scheint es eindeutig, dass hier eine Dehydratase-Reaktion vorliegen muss, um CO als direktes

Endprodukt zu erhalten. Es ist allerdings nicht eindeutig geklärt, ob dieses als Carbonylgruppe gebunden bleibt oder als gasförmiges Kohlenmonoxid freigesetzt wird.

Nachdem nachgewiesen werden konnte das beide Domänen konzertiert bei der Synthese des Carbonylliganden agieren (siehe Kapitel 3.4.17), muss es folglich irgendeine Form des Intermediattransfers zwischen beiden Domänen geben. Daher wurde nachfolgend untersucht wie beide Domänen von HypX zueinander orientiert sind.

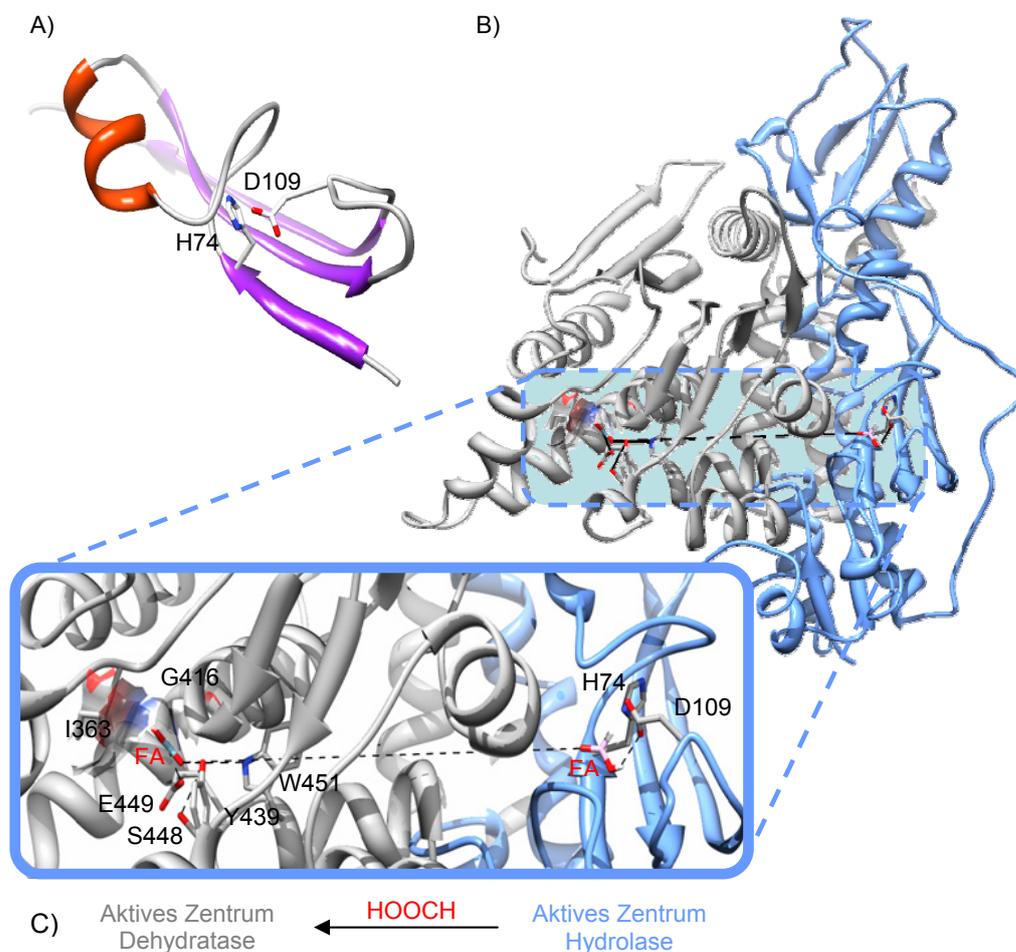
Diese beiden Domänen decken zusammen den bei weitem größten Teil der Aminosäuresequenz ab ( $N^{10}$ -Formyl-Hydrolase-Domäne: AS 1-264; Dehydratase-Domäne: AS 296-573). Ein Bereich von etwa 30 AS (AS 269-296) wird jedoch von keinem der beiden Strukturmodelle abgedeckt. Bei der Modellierung der Gesamtstruktur müssen der C-Terminus der  $N^{10}$ -Formyl-Hydrolase-Domäne und der N-Terminus der Dehydratase-Domäne in plausibler Entfernung zueinander liegen, so dass die entstehende Distanz durch diese etwa 30 AS überbrückt werden kann.

Zur Erstellung einer Gesamtansicht wurden beide HypX-Domänen mittels der Web-basierten Dienste ClusPro 2.0 (Comeau, Gatchell *et al.* 2004) und RosettaDock (Gray, Moughon *et al.* 2003; Wang, Schueler-Furman *et al.* 2005) zueinander ausgerichtet.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Einzeldomänen um Strukturmodelle handelt, ist eine verlässliche Analyse des Holoproteins schwerlich möglich. So kann das Strukturmodell des Holoproteins auch nicht dazu dienen zuverlässig die Distanzen zu ermitteln, die das Intermediat zwischen den beiden Zentren überbrücken müsste (Abbildung 4-3 B). Dennoch scheint klar, dass es einen Transfer der Formylsäure zwischen den aktiven Zentren der beiden Domänen geben muss. Wie ein solcher Transfer der Ameisensäure von der  $N^{10}$ -Formyl-THF-Hydrolase-Domäne in die Dehydratase-Domäne realisiert wird ist derzeit noch unklar. Eine Möglichkeit einen solchen Transfer zu realisieren ist die passive Diffusion durch einen intramolekularen, zumeist stark hydrophoben Tunnel. Diese Art des Intermediattransfers wurde bereits für eine Vielzahl von Multidomänen-Proteinen gezeigt. Dabei werden intramolekulare Distanzen von 25-100 Å überbrückt (Huang, Holden *et al.* 2001; Raushel, Thoden *et al.* 2003). Damit liegt die zu überbrückende Entfernung zwischen beiden aktiven Zentren in HypX in Bereich dessen, was durch passive Diffusion überbrückt werden kann. Obgleich zumindest das aktive Zentrum der Dehydratase-Domäne in einer hydrophoben Kavität mit Kontakt zur Proteinoberfläche liegt, konnte anhand des vorliegenden Strukturmodells kein solcher hydrophober Tunnel identifiziert werden.

Eine andere Möglichkeit legen Beobachtungen an der Kristallstruktur der Hydrolase-Domäne der 10-CHO-THF-Dehydrogenase (FTHFD) aus *Rattus norvegicus* nahe. Hier konnte gezeigt

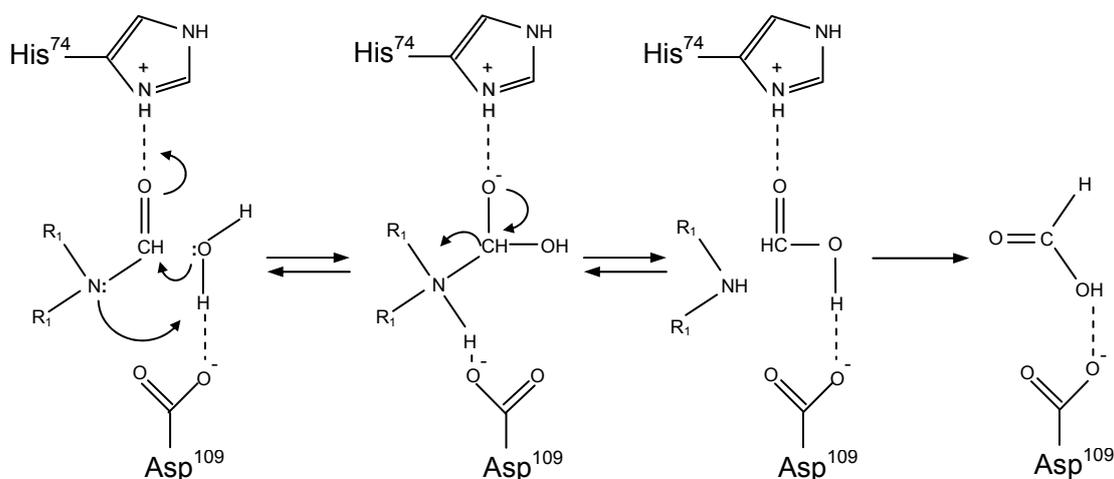
werden, dass eine der katalytischen Aminosäuren der Hydrolase-Domäne (D109) an der Spitze eines flexiblen *Loops* ( $_{105}\text{NGEMDAG}_{111}$ ) sitzt (Abbildung 4-3 A). Die Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die gebildete Formylsäure am Aspartat gebunden bleibt und durch eine konformationelle Veränderung dieses *Loops* in die zweite Domäne transferiert wird (Chumanevich, Krupenko *et al.* 2004). Eine solche Fixierung besitzt zudem einen stabilisierenden Effekt und würde eine unerwünschte Deprotonierung unter den zellulären Bedingungen verhindern (Formylsäure  $\text{pK}_s=3,77$ ). Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass eine konformationelle Änderung eines derart kleinen *Loop* die gesamte Distanz überbrücken kann.



**Abbildung 4-3: Substrattransfer zwischen beiden katalytischen Domänen von HypX.** A) Nach der Hydrolyse der Formylgruppe aus  $N^{10}$ -CHO-THF bleibt die resultierende Formylsäure am Asp109 gebunden. Dieses Aspartat sitzt auf einem flexiblen *Loop*, bestehend aus den Aminosäuren ASN105-GLY111. Der Transfer des Intermediates wird womöglich durch eine konformationelle Änderung dieses flexiblen *Loops* realisiert. B) Visualisierung einer HypX-Gesamtansicht. Diese zeigt die Position der aktiven Zentren beider Domänen zueinander. Die Hydrolase-Domäne ist in Hellblau abgebildet, die Dehydratase-Domäne ist in Hellgrau dargestellt. Die Position der jeweiligen katalytischen AS ist hervorgehoben. C) Detailansicht der beiden aktiven Zentren. Die aktiven AS sind hervorgehoben und gekennzeichnet. Das Oxyanionische Loch ist durch seine AS (Ile363 und Gly416) bzw. deren Oberfläche dargestellt. Das Intermediat Formylsäure (FA) wurde jeweils einmal in beide aktiven Zentren modelliert (Hydrolase-Domäne: rosa; Dehydratase-Domäne: türkis). Diese Abbildung wurde mit Chimera v1.5.3 (Pettersen, Goddard *et al.* 2004) erstellt.

Neuere Untersuchungen an demselben Enzym haben einen Kofaktor, 4'-Phosphopantethein, enthüllt. Dieser ist für die Funktion des Formylsäuretransfers in der FTHFD aus *Rattus norvegicus* erforderlich. Über eine Phosphodiesterbindung ist dieser Kofaktor kovalent an ein Serin in einer intermediären Domäne der FTHFD gebunden. Diese prosthetische Gruppe erlaubt den Transfer des Intermediats in die zweite Domäne. Die Autoren berücksichtigen zudem die Möglichkeit, dass der bereits erwähnte *Loop* dennoch funktionaler Bestandteil des Transfers ist. So wird vorgeschlagen, dass die Formylsäure am Aspartat gebunden bleibt und der *Loop* sich zur Proteinoberfläche öffnet, wo das Intermediat vom 4'-Phosphopantethein übernommen wird und anschließend in die Dehydratase-Domäne transferiert wird (Donato, Krupenko *et al.* 2007). In HypX sind etliche oberflächennahe Serinreste zu finden. Ob eines dieser Serine an der Bindung einer bisher unbekannten prosthetischen Gruppe beteiligt ist, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten kann der Transfer des Intermediates zwischen beiden Domänen derzeit nicht abschließend geklärt werden.

Der Vergleich der N-terminalen Hydrolase-Domäne mit Kristallstrukturen der  $N^{10}$ -Formyl-THF Hydrolase-Domäne aus *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens* erlaubte es den genauen Reaktionsmechanismus zu skizzieren. Dieser Vergleich zeigte, dass nicht nur die Substratbindestelle und essentielle katalytische Aminosäuren (Rey, Fernandez *et al.* 1996), sondern auch die Topologie (Kapitel 3.4.14) der Hydrolase-Domänen verschiedener  $N^{10}$ -Formyl-THF-hydrolysierenden Enzymen konserviert ist. Ferner wurde die Funktionalität dieser Domäne experimentell mittels einer Mutagenesestudie bestätigt (Buhrke 2006). Daher konnte, in Analogie zu diesen Hydrolase-Domänen, der katalytische Mechanismus der N-terminalen HypX-Domäne abgeleitet werden (Abbildung 4-4).



**Abbildung 4-4: Postulierter Mechanismus der N-terminalen Hydrolase-Domäne aus HypX.** Aspartat 109 aktiviert ein Wassermolekül, das nachfolgend die Bindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoffatom der Formylgruppe und dem  $N^{10}$  des THFs hydrolysiert. Histidin 74 unterstützt währenddessen die richtige Orientierung der Carbonylgruppe. Nach der Katalyse verbleibt die Formylsäure (HCOOH) bis zum Transfer am Aspartat 109 gebunden.  $R_1 = \text{THF}$ . Adaptiert aus Krupenko, Vlasov *et al.* (2001) und Chumanevich, Krupenko *et al.* (2004).

In einem ersten Schritt kommt es zur Polarisierung eines katalytisch aktiven Wassermoleküls durch das Asp109. Dazu wird dem Wasser ein Proton entzogen. Dieses übernimmt im weiteren Verlauf die Rolle einer katalytischen Base. Ein solches katalytisches Wassermolekül konnte bereits in den Kristallstrukturen einer GART und einer FMT nachgewiesen werden (Klein, Chen *et al.* 1995; Schmitt, Blanquet *et al.* 1996).

Das Hydroxyl-Ion ist nun fähig einen nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Formylgruppe auszuführen. Dieser Vorgang wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff der Formylgruppe und dem His74 erleichtert, da sie der Carbonyl-Doppelbindung Elektronen entzieht. Dabei entsteht ein Übergangszustand mit einem quartären Amin und einem benachbarten tetraedrischen Kohlenstoff-Zentrum. In einem weiteren Schritt kommt es zu einer Elektronen-Umlagerung und zum Transfer eines Protons vom Wasser zum THF-Kofaktor, welche durch das Asp109 katalysiert werden. Während die entstandene Formylsäure am Asp109 gebunden bleibt, löst sich der regenerierte THF-Kofaktor aus der Substratbindestelle (Krupenko, Vlasov *et al.* 2001; Chumanevich, Krupenko *et al.* 2004).

Nach dem Transfer der Formylsäure in das zweite aktive Zentrum in HypX (siehe oben) kommt es in der C-terminalen Domäne durch die zweite Teilreaktion zur Synthese des Carbonylliganden aus Ameisensäure. Daher soll nachfolgend die C-terminale Domäne hinsichtlich der von ihr katalysierten Reaktion eingehend beleuchtet werden.

Wie in Kapitel 3.4.18 dargelegt wurde, enthält HypX vermutlich einen mononuklearen Fe-Kofaktor. Dieser konnte hier allerdings, vermutlich aufgrund der Reinigungsbedingungen, nur in substöchiometrischen Mengen nachgewiesen werden. Dieser Befund ist konsistent mit der These, dass es sich bei der C-terminalen HypX-Domäne um eine (De-) Hydratase mit enger struktureller Verwandtschaft zu Nitril-Hydratase (NHase) handelt (Miyanaga, Fushinobu *et al.* 2001; Mitra und Holz 2007). Prinzipiell sind zwei Arten von Nitril-Hydratase bekannt, Nicht-Häm Fe-Hydratase und Nicht-Corrin Co-Hydratase. Aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit wird angenommen, dass die Katalyse in beiden Typen identisch verläuft (Yamanaka, Hashimoto *et al.* 2010). Da keine der bekannten  $N^{10}$ -Formyl-Hydrolase einen Metall-Kofaktor besitzt, kann der mononukleare Fe-Kofaktor der C-terminalen Domäne zugeordnet werden. Aufgrund der Metallbestimmung könnte es sich demnach bei der C-terminalen Domäne um eine „Nitril-Hydratase“ (Dehydratase) vom Fe-Typ handeln.

In allen NHase, deren Strukturen publiziert sind, gibt es Reihe von konservierten Aminosäuren (Trp-Tyr-Ser). Diesen wird eine wichtige Funktion innerhalb der Katalyse zugesprochen (Mitra und Holz 2007). Diese sogenannte „katalytische Triade“ erinnert zudem an das aktive Zentrum von Nicht-Metall-Dehydrogenase. So besitzt zum Beispiel die 2-[(R)-2-

Hydroxypropylthio]-ethanosulfonat-Dehydrogenase ein aktives Zentrum bestehend aus Lysin, Tyrosin und Serin (Clark und Ensign 2002; Clark, Boyd *et al.* 2004) . Wie in Kapitel 3.4.15 gezeigt wurde, weist auch die C-terminale HypX-Domäne eine solche katalytische Triade (Trp451-Tyr439-Ser448) auf (Abbildung 4-5 B). In Analogie zu den katalytischen Mechanismen dieser Enzyme sollte auch für die C-terminale HypX-Domäne ein katalytischer Mechanismus postuliert werden. Verschiedene Mutagenesestudien an unterschiedlichen Enzymen mit vergleichbaren aktiven Zentren lieferten identische Ergebnisse wie die hier erlangten Resultate (Tabelle 9), dies belegt die Vergleichbarkeit dieser aktiven Zentren.

Da zu Beginn der durchgeführten Mutagenesestudie noch kein Strukturmodell zur C-terminalen Domäne vorlag, wurde neben den hoch konservierten, potentiell aktiven Aminosäuren (Tyr439-Trp451-Ser448 / Kapitel 3.4.16) auch Asp425 und Tyr453 substituiert. Wie in Abbildung 3-43 und Abbildung 3-44 zu sehen ist, zeigte jeder Austausch an Asp425 einen totalen Aktivitätsverlust bei leicht reduzierter Proteinstabilität. Anhand des Strukturmodells erschließt sich jedoch, dass diese AS sehr weit von dem potentiellen aktiven Zentrum entfernt ist (Abbildung 4-5 A) und folglich höchstwahrscheinlich keine direkte Funktion bei der Katalyse übernehmen kann, sondern womöglich an der Stabilisierung der Tertiärstruktur beteiligt ist.

Ebenso zeigte die Struktur, dass Tyr453 nicht an der Katalyse der C-terminalen Domäne beteiligt sein kann, da seine Seitenkette im vorliegenden Strukturmodell dem aktiven Zentrum abgewandt ist (Abbildung 4-5 A). Die Mutagenesestudie zeigte auch hier einen Verlust der HypX-Aktivität, wobei es nur in der Y453H-Mutante zu einer damit einhergehenden Instabilität des Proteins kam. Interessanterweise zeigte eben diese Mutante, gegenüber der Negativkontrolle (HF469) eine deutlich vergrößerte Latenzphase im lithoautotrophen Wachstum (Abbildung 3-43). Dies lässt sich nicht durch einen einfachen Funktionsverlust von HypX erklären. Es scheint daher wahrscheinlich, dass hier ein polarer Effekt auf die Transkription des stromabwärts liegenden *hoxA* vorliegt. Die Funktion des konstitutiven Promotors wird folglich durch das verwendete Phenylalanin-Codon (TTT) nicht betroffen, wohingegen das verwendete Histidin-Codon (CAT) sich negativ auf die Funktion des *hoxA*-Promotors auswirkt (natives Tyrosin-Codon: TAT). Ein solcher Phänotyp wurde bereits für die  $\Delta hypX_1$ -Mutante beschrieben (Lenz, Schwartz *et al.* 1994; Buhrke und Friedrich 1998; Schwartz, Buhrke *et al.* 1999).

Der Austausch von Tyr439 gegen Phenylalanin, Glutamat oder Alanin zeigte jeweils den Verlust der HypX-Aktivität (Abbildung 3-43 und Abbildung 3-44). Die Hydroxygruppe des Tyrosins hat offensichtlich für den Mechanismus von Nitril-Hydratasen eine zentrale Bedeutung. Mit einem  $pK_s$ -Wert von  $pK_{Ph-OH}=10,07$  liegt die Hydroxygruppe im Tyrosin unter

physiologischen Bedingungen normalerweise protoniert vor. Bei Studien an der 2-[(R)-2-Hydroxypropyl-thio]ethansulfonat-Dehydrogenase aus *Xanthobacter* Py2, welche eine Lys-Tyr-Ser-Triade besitzt, konnte jedoch gezeigt werden, dass das Tyrosin bei physiologischen pH-Werten (pH = 7,5) deprotoniert vorliegt (Clark und Ensign 2002; Clark, Boyd *et al.* 2004). Die Deprotonierung kann durch angrenzende Ladungen einer benachbarten AS positiv beeinflusst werden. Im konkreten Fall wird angenommen, dass Serin als Base fungiert und die Deprotonierung des Tyrosins begünstigt (Mitra und Holz 2007). In Analogie zur Situation in NHasen muss angenommen werden, dass in HypX die Deprotonierung durch das Ser448 begünstigt wird. Die Substitution von Tyr439 mit einem Glutamat war der Versuch das entstehende Oxyanion funktionell durch eine saure Aminosäure zu imitieren. Der  $pK_s$ -Wert für die Carboxygruppe des Glutamats liegt mit  $pK_{s, \gamma\text{-COOH}} = 4,32$  deutlich unterhalb des physiologischen pH-Wertes. Dennoch konnte das Oxyanion des Glutamats den Verlust des Tyrosins nicht komplementieren. Die vorliegenden Ergebnisse verweisen auf die zentrale Rolle dieses Tyrosins für die Funktionalität von HypX. Die Tatsache, dass Phenylalanin nicht in der Lage war, die Funktionalität aufrechtzuerhalten, obwohl es - abgesehen von der endständigen Hydroxygruppe - strukturell quasi identisch ist, unterstreicht die Schlüsselrolle dieser Seitengruppe.

Die Austausch von Ser448 gegen Glycin und Alanin führten beide nicht zu einer Instabilität des Proteins. Die Funktion von HypX blieb jedoch nur bei der S448G-Substitution erhalten. Folglich ist die Methylgruppe des Alanins nicht geeignet, eine Deprotonierung von Tyr439 zu unterstützen. Glycin indes unterstützt augenscheinlich eine solche Deprotonierung bzw. gibt durch den Wegfall einer Seitenkette an Position 448 den Weg für eine der benachbarten AS frei die Funktion des Serins zu komplementieren.

Eine Aminosäure, die nicht zur katalytischen Triade gehört, E449, wurde gegen Glutamin und Aspartat ausgetauscht. Jedoch war nur Aspartat ( $pK_{s, \beta\text{-COOH}} = 3,90$ ) in der Lage die Funktion des Glutamats zu komplementieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Oxyanion an dieser Position eine essentielle Funktion erfüllt. Obgleich ein Glutamat an dieser Position in allen HypX-Homologen konserviert ist, findet sich keine entsprechende Aminosäure in den Nitril-Hydratasen. Diese AS ist jedoch regelmäßig in den aktiven Zentren von Crotonase-Enzymen zu finden, wo sie oft eine wichtige Funktion bei der Katalyse übernimmt (Hamed, Batchelar *et al.* 2008). Diese Beobachtung unterstreicht einen potentiellen Hybridcharakter der C-terminalen Dehydratase-Domäne von HypX. Der vordergründige Widerspruch zwischen Funktion und Stabilität der E449D-Mutante (siehe Kapitel 3.4.16) kann nur damit erklärt werden, dass diese Substitution sich zwar auf die Proteininstabilität auswirkt, aber nicht auf dessen Aktivität. Die

Aktivität des verbleibenden Proteins muss demnach hinreichend sein, um den HypX<sup>-</sup>-Phänotyp auf physiologischer Ebene zu verdecken.

Die dritte Aminosäure der katalytischen Triade, Trp451, wurde gegen Phenylalanin bzw. Histidin ausgetauscht. Die Tatsache, dass die HypX-Aktivität durch ein Histidin an derselben Stelle nicht betroffen ist, bestätigt die Annahme, dass der Imidazol-Ring aus Histidin dieselbe Funktion erfüllen kann wie das Indol-Ringsystem aus Tryptophan. Indol und Imidazol besitzen beide heterozyklische Ringsysteme, die jeweils ein protoniertes Stickstoffatom beinhalten. Im Zusammenhang mit der Aufklärung des Mechanismus von NHasen konnten Mitra *et al.* zeigen, dass dieses Stickstoffatom an der Aktivierung des benachbarten Tyrosins beteiligt ist (Mitra und Holz 2007).

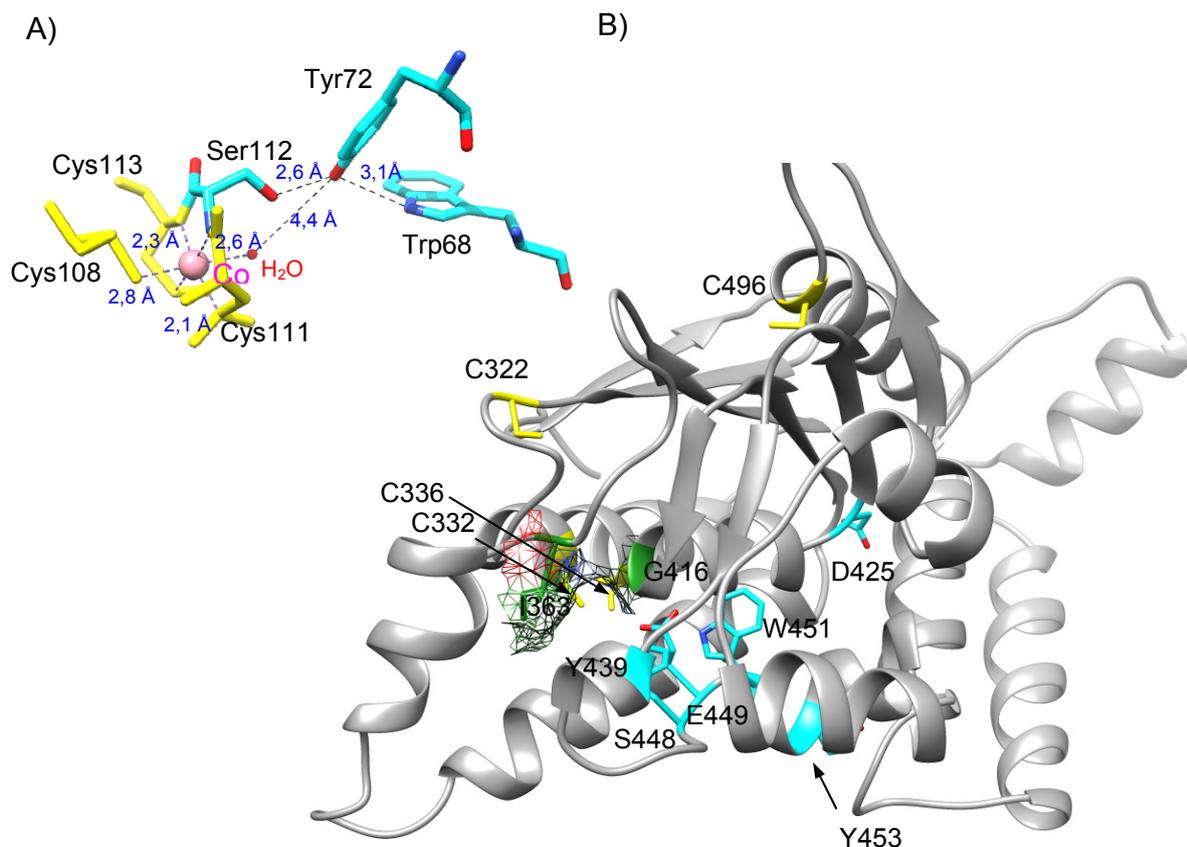
**Tabelle 9: Vergleich verschiedener Mutagenesestudien.** Vergleich verschiedener Mutagenesestudien an den aktiven Zentren von HypX, NHasen und einer strukturell verwandten Dehydrogenase.

Enzym	Aminosäure-Substitution <sup>c</sup>	Aktivität <sup>b</sup>	Referenz
HypX aus <i>Ralstonia eutropha</i>	D425A	-	Diese Studie
	D425N	-	
	D425E	-	
	Y439F	-	
	Y439A	-	
	Y439E <sup>a</sup>	-	
	S448A	-	
	S448G	+	
	E449Q	-	
	E449D	+	
	W451H	+	
	W451F <sup>a</sup>	- (~44 %)	
	Y453H	-	
Y453F	-		
Co-NHase aus <i>Pseudonocardia thermophila</i> JCM 3095	Y68F	- (0,6 %)	(Miyanaga, Fushinobu <i>et al.</i> 2004)
2-[(R)-2-Hydroxypropylthio]ethansulfonat-Dehydrogenase aus <i>Xanthobacter</i> Py2	Y155F	-	(Clark und Ensign 2002)
	Y155E	-	
	S142A	- (0,8 %)	
	S142C	-	
	K159A	-	
Fe-NHase aus <i>Rhodococcus erythropolis</i> N771	S113A	+ (40 %)	(Yamanaka, Hashimoto <i>et al.</i> 2010)
	Y72F	-	

<sup>a</sup> Es liegen spektroskopische Daten vor. W451F zeigt Restaktivität, jedoch auch den physiologischen HypX<sup>-</sup>-Phänotyp; <sup>b</sup> Aktivität in *R. eutropha* bedeutet, dass kein HypX<sup>-</sup>-Phänotyp auf physiologischer Ebene (Wachstum) nachweisbar ist. Restaktivität in Klammern; <sup>c</sup> Funktionell vergleichbare AS wurden farblich kodiert.

Daraus kann abgeleitet werden, dass das entsprechende Imidazol in Histidin dieselbe Funktion erfüllt. Zusätzlich wird diese These durch die Beobachtung gestützt, dass in 27,7 % aller untersuchten HypX-Proteine an dieser Position ein Histidin zu finden ist. Ein rein aus Kohlenstoffatomen bestehendes Ringsystem, wie in Phenylalanin, ist jedoch nicht ausreichend.

Alle untersuchten NHasen besitzen einen mononuklearen, sechsfach ligandierten Metallkofaktor, namentlich Fe oder Co. Dieser wird durch drei Cystein-Schwefelatome, zwei Amid-Stickstoffatome benachbarter Proteine und ein molekulares Wasser ligandiert (Abbildung 4-5 A).

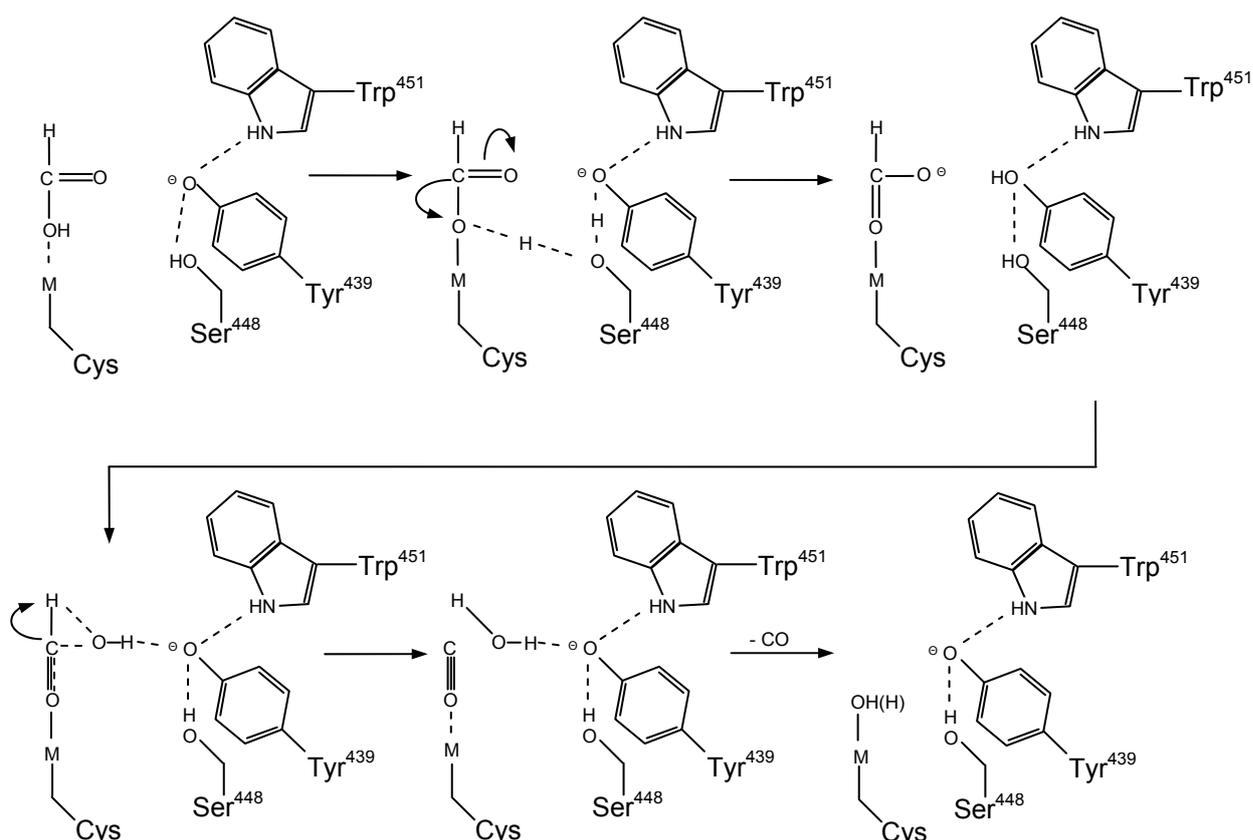


**Abbildung 4-5: Das aktive Zentrum der C-terminalen Domäne aus HypX.** A) Katalytisch aktive Aminosäuren der Nitril-Hydratase aus *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095 (1IRE). Co, Kobalt B) Strukturmodell der C-terminalen Domäne von HypX. Wichtige Aminosäuren sind farblich hervorgehoben; Oxyanionisches Loch (grün), potentiell aktive AS (cyan), Cysteine (gelb). Die Gitternetzstruktur symbolisiert das Oxyanionische Loch.

Die beteiligten Cysteine liegen alle in einem universalen Motiv (CXYCSCX) (Mitra und Holz 2007). Ein solches Motiv ist in HypX nicht zu finden. Die C-terminale Domäne besitzt vier Cysteine (Abbildung 4-5 B), von denen eines weit ab des aktiven Zentrums liegt (C496). Lediglich zwei der drei verbleibenden Cysteine (C332 und C336) liegen in einer rationalen Entfernung zu den Aminosäureresten des aktiven Zentrums. Das Vierte (C322) liegt in dem hier gezeigten Strukturmodell in einem unstrukturierten Abschnitt nahe den beiden anderen Cysteinen. Es ist daher vorstellbar, dass auch dieses Cystein in der nativen Struktur in die

Koordinierung des Kofaktors involviert ist. Das prognostizierte *Oxyanionische Loch* (Ile363 und Gly416), welches zur Stabilisierung eines Oxyanionen-Übergangszustandes während der Katalyse dient (Hamed, Batchelar *et al.* 2008), wurde durch das Gitternetz veranschaulicht. Dieses stellt den Anteil der Proteinoberfläche dar, der im vorliegenden Modell durch Ile363 und Gly416 gebildet wird. Überdies zeigt die dargestellte Abbildung die Aminosäuren, die potentiell an der Katalyse beteiligt sind bzw. mittels ortsspezifischer Mutagenese experimentell untersucht wurden (cyan).

In Analogie zum Reaktionsmechanismus von Nitril-Hydrataseen kann ein katalytischer Mechanismus postuliert werden (Abbildung 4-6). In diesem Modell wird ein ligandierendes Wassermolekül durch die direkte Bindung des Substrats, Formylsäure, vom Metall-Ion verdrängt. Durch dessen Lewis-Acidität wird die Bindung der Hydroxygruppe der Formylsäure geschwächt, so dass durch einen nukleophilen Angriff des deprotonierten Serin-Sauerstoffs ein Proton entzogen werden kann.



**Abbildung 4-6: Postulierter Mechanismus der C-terminalen Dehydratase-Domäne.** Detaillierte Beschreibung siehe Text. Modifiziert nach Mitra und Holz (2007) und Yamanaka, Hashimoto *et al.* (2010).

Durch Umlagerung der Elektronen kommt es im Folgenden zur Ausbildung eines Oxyanions. Dieser reaktive Übergangszustand wird womöglich über das *Oxyanionische Loch* stabilisiert, welches augenscheinlich keine Entsprechung in NHasen besitzt. Durch den Entzug

des Protons der Formylsäure liegt das - zu Beginn deprotonierte - Tyrosin wieder protoniert vor. Dabei spielt, wie der Glutamat- bzw. Phenylalanin-Austausch zeigen konnte, die Hydroxygruppe des Tyrosins eine wichtige Rolle als essentielle Säure und kann nicht durch die Substitution einer anderen ionisierbaren Seitenkette ersetzt werden. Das Proton greift in einem zweiten Protonenübergang zunächst über eine Wasserstoffbrücke den Sauerstoff des Oxyanions an. Dabei bildet sich vorübergehend ein Hydroxyl-Ion, welches der verbleibenden Formylgruppe über einen nukleophilen Angriff ein weiteres Proton entzieht. Das entstandene Wasser verbleibt in der hydrophoben Umgebung des aktiven Zentrums zunächst am Tyrosin gebunden, bis die Abgangsgruppe (CO) das aktive Zentrum verlässt. Im Anschluss wird das Metall-Ion erneut durch das Wassermolekül ligandiert. Im Detail gibt es unterschiedliche postulierte Funktionen für die einzelnen Aminosäuren, z. B. wird für das Serin manchmal eine sehr viel indirektere Funktion beim „*Fine-Tuning*“ der Elektronenkonfiguration des Metall-Ions antizipiert (Yamanaka, Hashimoto *et al.* 2010). So wird erklärt, warum entsprechende rekombinante Enzyme noch Restaktivität aufweisen (siehe Tabelle 9). Die Funktion einer weiteren durchgehend konservierten Aminosäure (E449) bleibt indes unklar. Die Substitution mit Glutamin und Aspartat zeigte, dass eine saure AS hier die Funktion von Glutamat komplementieren kann. Saure Aminosäuren sind Bestandteil einer Vielzahl von Enzymen aus der Familie der Crotonasen, u. a. auch von (De-)Hydratase (Agnihotri und Liu 2003; Koski, Haapalainen *et al.* 2004; Hamed, Batchelar *et al.* 2008). Es scheint daher nicht ausgeschlossen, dass HypX einen Hybridmechanismus ausgebildet hat, der Charakteristika beider Enzymklassen in sich vereint.

Formal stellt der hier vorgestellte Prozess eine Dehydratisierung dar und damit die reverse Reaktion der von NHasen normalerweise katalysierten Reaktion. Eine solche Dehydratisierung von Formylsäure und die damit einhergehende Produktion von CO ist bisher noch in keinem Enzym beobachtet worden, obgleich bereits CO-Produktion auch bei NHasen beobachtet werden konnte. Durch die Verwendung eines artifiziellen Substratanalogs, *tert*-Butylisonitril, kommt es zu einer Isonitril-Hydrolyse, bei der auch CO als Abgangsgruppe freigesetzt wird. Diese Reaktion setzt allerdings die direkte Bindung des Isonitril-Kohlenstoffatoms voraus und somit scheidet eine analoge Reaktion im vorliegenden Fall aus (Hashimoto, Suzuki *et al.* 2008).

Obgleich die enzymkatalysierte Dehydratisierung von HCOOH ein *Novum* ist, ist diese Art der Dekomposition von Ameisensäure zu CO und H<sub>2</sub>O bereits lange bekannt und gut untersucht. Die Umformung von Ameisensäure zu CO und Wasser wird in der Regel säurekatalysiert (Yang, Ger *et al.* 2008) oder findet unter hyperthermalen Bedingungen (>300 °C) statt (Akiya und Savage 1998).

Prinzipiell gibt es HCOOH in zwei Konformeren, *cis*-Formylsäure und *trans*-Formylsäure (Abbildung 4-7). Mit einer *cis-trans*-Isomerisierungsenergie von 7,5 kcal/mol und einer *trans-cis*-Isomerisierungsenergie von 11,5 kcal/mol ist *trans*-Formylsäure (in Abwesenheit von Wasser) deutlich stabiler. Daher liegt Formylsäure bevorzugt als *trans*-Formylsäure vor. In dieser Konformation ist die Dehydratisierung (effektive Aktivierungsenergie 66,81 kcal/mol) gegenüber der Decarboxylierung (effektive Aktivierungsenergie 67,78 kcal/mol) energetisch bevorzugt. Beide Arten der Dekomposition laufen generell in Abwesenheit, aber auch in Gegenwart von Wasser ab (Akiya und Savage 1998).

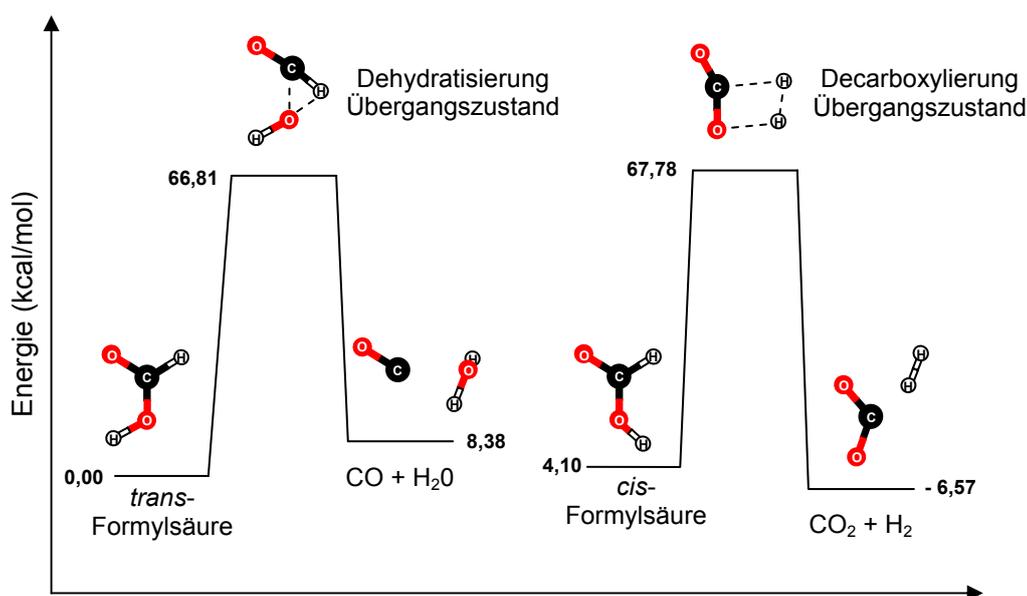


Abbildung 4-7: Energiediagramm für die hyperthermale Dekomposition und Isomerisierung von Formylsäure (HCOOH) in Abwesenheit von Wasser. Adaptiert aus Akiya und Savage (1998).

Da die Kavität in der das zweite aktive Zentrum liegt stark hydrophob ist, wurde hier davon ausgegangen, dass die Dekomposition in Abwesenheit eines aktivierenden Wassers verläuft. Da Formylsäure unter physiologischen Bedingungen deprotoniert, müsste in einer konzertierten, enzymkatalysierten Dekomposition nicht nur die *trans*-Konformation stabilisiert werden, es müsste ferner eine Deprotonierung verhindert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die *in vivo* <sup>13</sup>C-Markierung des CO-Liganden mittels <sup>13</sup>C-Na-Formiat nicht erfolgreich war (Abbildung 3-29), weil CHNaO<sub>2</sub> in wässriger Lösung zumeist in seiner anionisierten Form vorliegt. Bei der Hydrolyse der Formylgruppe von 10-CHO-THF entsteht jedoch Ameisensäure, welche wiederum als Substrat für die in der C-terminale Domäne katalysierte Reaktion dient. In der Literatur wurde beschrieben das HCOOH auch während Transfers von der N-terminalen in die C-terminale Domäne gebunden bleibt (Chumanevich, Krupenko *et al.* 2004; Donato, Krupenko *et al.* 2007), was vermutlich – auch in HypX – zu einer Stabilisierung dieses Intermediates unter physiologischen Bedingungen führt. Die Verwendung von <sup>13</sup>C-markierter

Formylsäure ist daher auch nicht zielführend, da Formylsäure, mit einem  $pK_s = 3,77$ , unter physiologischen pH-Werten ebenfalls hauptsächlich deprotoniert vorliegen würde. Womöglich ist das zweite aktive Zentrum im Holoenzym auch überhaupt nicht direkt für „externe“ Formylsäure bzw. deren anionische Form zugänglich. Anhand dieses Experiments kann eine Verwendung von Formiat nicht belegt werden, allerdings kann sie auch nicht schlüssig widerlegt werden. Ferner ist Formiat eine sehr gute Kohlenstoff- und Energiequelle (Friedrich 1981), daher kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass das applizierte Formiat durch andere Stoffwechselprozesse verbraucht wurde, bevor es in signifikanten Mengen zur HypX-abhängigen CO-Synthese verwendet werden konnte.

Diese „Instabilität“ von Formylsäure unter physiologischen Bedingungen, aber auch von  $N^{10}$ -Formyl-THF, stellt ein großes Hindernis für eine eingehende *in vitro* Charakterisierung von HypX dar. Daher muss über stabile Substratanaloga nachgedacht werden. Während Ameisensäure nicht ohne Weiteres zu ersetzen ist, hat sich anstelle von  $N^{10}$ -Formyl-THF bereits  $N^{10}$ -Formyl-5,8-Dideazofolat bewährt (Krupenko, Wagner *et al.* 1995). Zur initialen biochemischen Charakterisierung der N-terminalen Domäne könnte die Formylsäureproduktion und die Freisetzung von THF mittels spektroskopischer *Assays* untersucht werden (Nagy, Marolewski *et al.* 1995). Die Produktion von gasförmigem CO könnte entsprechend der Methode von Shepard *et al.* charakterisiert werden (Shepard, Duffus *et al.* 2010).

Für eine weitergehende Charakterisierung von HypX ist es unverzichtbar aktives Protein für eine biochemische Charakterisierung zu gewinnen. Bisher gestaltete sich die Überexpression von HypX allerdings als schwierig (vergleiche Kapitel 3.4.18). Vergleichbare Probleme wurden schon bei der Überexpression anderer  $N^{10}$ -Formyl-THF-abhängiger Enzyme, wie zum Beispiel der FTHFD, berichtet. Hier führte die Induktion der Proteinsynthese zur Apoptose der jeweiligen Zelllinien, da die Expression der FTHFD in schnell proliferierenden Zellen zu einem einseitigen Verbrauch von C<sub>1</sub>-Gruppen im Tetrahydrofolat-Stoffwechsel durch die FTHFD führte (Oleinik und Krupenko 2003). Es ist daher naheliegend, dass auch die Überexpression von HypX einen solchen Effekt auf die *Ralstonia eutropha*-Wirtsstämme hat. Einzig die ektopische Überexpression in *E. coli* als MBP::HypX-Fusionsprotein führte zu einer nennenswerten Proteinausbeute. Aufgrund zuvor gemachter Beobachtungen bei der ektopischen Expression der FTHFD in *E. coli* liegt jedoch die Vermutung nahe, dass das Protein nicht aktiv ist (Donato, Krupenko *et al.* 2007). Es wurde berichtet, dass bei der Expression in *E. coli* eine essentielle posttranslationale Modifikation ausbleibt. So zeigte die ektopische Expression von FTHFD aus *Rattus norvegicus* in *E. coli* eine reiche Proteinausbeute, jedoch konnte das gewonnene Protein die Gesamtreaktion nicht mehr katalysieren. Ursächlich für diesen Aktivitätsverlust war die

Tatsache, dass der bakterielle Wirt nicht in der Lage war die essentielle, prosthetische Gruppe 4'-Phosphopantethein zu synthetisieren bzw. kovalent mit dem Enzym zu verbinden (Donato, Krupenko *et al.* 2007). Sollte auch HypX auf eine solche prosthetische Gruppe angewiesen sein, muss auch in diesem Fall *in vitro* erst eine Rekonstitution mit CoA erfolgen (Donato, Krupenko *et al.* 2007). Wie bereits angesprochen ist es ferner denkbar, dass es durch die Fusion mit dem 42,5 kDa großen MBP zu einer sterischen Behinderung kommen könnte, welche die konformationelle Änderung nach Bindung des Substrats verhindert (Kursula, Schuler *et al.* 2006).

Eine erprobte, weiterführende Herangehensweise wäre daher die separate Expression und Charakterisierung beider Domänen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Expression der Dehydratase-Domäne. Zu zeigen, dass es sich hier um eine reversible enzymatische Funktion handelt, die auch mit Kohlenmonoxid als Substrat funktioniert, würde die Möglichkeit für biotechnologische Anwendungen mit enormem Potential eröffnen (siehe unten).

Ferner konnte durch BLAST-Analyse eine Reihe weiterer Enzyme nachgewiesen werden, die der HypX-Familie zuzuordnen sind (siehe Abbildung 6-5). HypX/HoxX-Homologe sind interessanterweise auch in einigen, wenigen Eukaryoten zu finden (*Trichoplax adhaerens*, *Melampsora larici-populina*, *Puccinia graminis*, *Physcomitrella patens*, *Branchiostoma floridae*, *Hydra magnipapillata*). Daraus ergibt sich die Frage, ob HypX/HoxX-Homologe nicht womöglich eine sehr viel weitreichendere Bedeutung besitzen als „bloße“ CO-produzierende, akzessorische Enzyme der Hydrogenasereifung. Obgleich die Genomdaten vieler dieser Organismen noch nicht vollständig sind, konnten bisher bei keinem dieser Eukaryoten, aber auch bei etlichen der untersuchten Prokaryoten keine weiteren Hydrogenase-assoziierten Gene festgestellt werden (Abbildung 6-5). Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass Prokaryoten, Pilze und Pflanzen keine FTHFD besitzen (Krupenko 2009), aber auch in *Trichoplax adhaerens*, *Branchiostoma floridae* oder *Hydra magnipapillata* konnten bisher keine FTHFD-Gene verifiziert werden. Die Funktion der FTHFD besteht in Tieren darin, die vollständig oxidierten C<sub>1</sub>-Einheiten von N<sup>10</sup>-Formyl-THF unter Freisetzung von CO<sub>2</sub> zu „entsorgen“, um den THF-Kofaktor zu regenerieren und somit den THF-*Pool* zu regulieren (Krupenko 2009). Womöglich übernehmen diese HypX-Homologe eine vergleichbare Funktion in Organismen, die keine derart ausgeprägte Sensitivität gegenüber CO zeigen, wie dies die „höheren“ Tiere tun. Demnach können HypX-Proteine womöglich als evolutionäre Vorläufer der FTHFDs angesehen werden.

#### **4.5 Eine vermeintliche CODH ist als Teil des Wirtsmetabolismus an der Synthese des Carbonylliganden beteiligt.**

Nachdem nun auch die Funktion von HypX geklärt war, war klar, dass die Synthese des Carbonylliganden großteils eine Leistung von Genprodukten ist, die außerhalb der Hydrogenaseoperone kodiert werden. Lediglich die spezifische Anpassung der CO-Ligandensynthese an den aeroben Lebensstil eines Knallgasbakteriums, wie *Ralstonia eutropha*, ist durch *hypX* im Hydrogenaseoperon kodiert.

Ogleich die Ergebnisse der CO-Limitation nahe legen, dass gasförmiges CO nicht die einzige Vorstufe bei der Synthese des Carbonylliganden ist (Kapitel 3.3.4), besitzt Kohlenstoffmonoxid in jedem Fall eine wichtige Rolle bei dessen Biosynthese. Im Zusammenhang mit der Synthese der Carbonylliganden wird als eine weitere Kohlenmonoxid freisetzende, enzymkatalysierte Reaktion zuweilen die Häm-Degradation genannt (Forzi und Sawers 2007). Ein entsprechendes Gen das für eine Hämoxxygenase kodiert konnte im Genom von *Ralstonia eutropha* H16 allerdings nicht identifiziert werden (Pohlmann, Fricke *et al.* 2006). Da die Freisetzung von CO durch den Abbau von Hämoglobin aerobe Bedingungen voraussetzt (Tenhunen, Marver *et al.* 1969), steht diese Möglichkeit nur Organismen offen, die, anders als z. B. *E. coli*, Hydrogenasen unter aeroben Bedingungen exprimieren.

Eine weitere Möglichkeit CO zu produzieren, ist die direkte Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CO (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005). Enzyme, die eine solche Reduktion vermitteln könnten, sind CO-Dehydrogenasen (CODH). CO-Dehydrogenasen bilden eine strukturell und funktionell vielfältige Gruppe von Enzymen. Man unterscheidet zwei grundlegende Klassen von CO-Dehydrogenasen; [Ni-Fe-S]-CODHs und [Mo-Fe-Flavin]-CODHs. Die erstgenannte Klasse von CODHs sind Bestandteil des CODH/ACS-Komplexes. Dieser dient der Fixierung von Kohlendioxid in Form von Acetyl-CoA unter anaeroben Bedingungen. Diese Klasse von CODHs ist ausschließlich in anaeroben Mikroorganismen zu finden (Ferry 1995; Ragsdale 2004).

Im Gegensatz dazu findet man [Mo-Fe-Flavin]-CODHs lediglich in Aerobiern. Es sind mindestens acht Gattungen bekannt, in denen diese CO-Dehydrogenasen identifiziert wurden (Ferry 1995). Aerobe CO-Dehydrogenasen gehören genau wie Xanthin Dehydrogenasen, 4-Hydroxybenzoyl-CoA Reduktasen und Chinolin 2-Oxidoreduktasen zur Familie der Molybdän-Hydroxylasen (Schubel, Kraut *et al.* 1995). Diese Enzyme sind zumeist Hexamere (LMS)<sub>2</sub> und bestehen aus dem Dimer eines Heterotrimers. Das Heterotrimer besteht aus einer großen (L), einer mittleren (M) und einer kleinen (S) Untereinheit. Die große Untereinheit enthält dabei das katalytische Molybdän bzw. den Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid-Kofaktor (MCD), die

mittlere Untereinheit ist ein Flavoprotein und die kleine Untereinheit enthält zwei [2Fe2S]-Zentren. Einen vergleichbaren Aufbau der vermeintlichen CODHs legen auch die annotierten Gene aus *Ralstonia eutropha* nahe.

Als alternative CO-Quelle unter den mikroaeroben Bedingungen einer *Ralstonia eutropha*-Kultur mit hoher Zelldichte wäre so ein Prozess durchaus vorstellbar, jedoch gehören alle bisher identifizierten CODHs aus *Ralstonia eutropha* augenscheinlich zum aeroben Molybdän-abhängigen Typ. Die kanonischen CODHs des aeroben Mo-haltigen Typs katalysieren gewöhnlich die Oxidation von Kohlenmonoxid zu CO<sub>2</sub>,



und decken somit den Energiebedarf des Wirtes. Das erzeugte Kohlendioxid wird zudem über den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus fixiert und dient dem Baustoffwechsel (Ferry 1995; Ragsdale 2004). Autotrophe Wachstumsexperimente (Kapitel 3.5.1) zeigen jedoch, dass keine der vermeintlichen CODHs aus *R. eutropha* Wachstum auf Kohlenmonoxid als Energie- und/oder Kohlenstoffquelle vermitteln kann und es sich somit bei der vermeintlichen CODH nicht um kanonische CODHs des aeroben Molybdän-Typs handeln kann. Allerdings konnte aufgrund dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, dass in *Ralstonia eutropha* eine CODH-Variante vorliegt, die in der Lage ist CO<sub>2</sub> zu reduzieren.

Eine mögliche direkte Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CO wurde durch *in vivo*-Markierungsexperimente mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> bzw. H<sup>13</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> untersucht (Kapitel 3.5.5 - 3.5.6). Es konnte gezeigt werden, dass unter heterotrophen Bedingungen erhebliche Mengen CO<sub>2</sub> freigesetzt werden (Kapitel 3.5.5). Im gezeigten Experiment stieg die Konzentration auf einen Volumenanteil von knapp 1 % CO<sub>2</sub>, was deutlich über der atmosphärischen Konzentration von etwa 390 ppmv liegt (Keeling, Piper *et al.* 2005). Mit einem Anteil von 10 % <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> konnte unter heterotrophen Bedingungen bei *Ralstonia eutropha* neben einer partiellen Markierung der Cyanidliganden jedoch keine Markierung des CO-Liganden festgestellt werden (Kapitel 3.5.5). Auch die Verwendung von Bicarbonat zeigte ein vergleichbares Ergebnis (Kapitel 3.5.6). Somit kann eine direkte Reduktion von CO<sub>2</sub> ausgeschlossen werden. Diesbezüglich sind die hier vorgestellten Ergebnisse konsistent mit früheren Untersuchungen, die *E. coli* als Wirt verwendeten (Forzi, Hellwig *et al.* 2007; Lenz, Zebger *et al.* 2007). Jüngste Untersuchungen an der Reifung von [Fe]-Hydrogenasen aus *Methanobrevibacter smithii* und *Methanothermobacter marburgensis* zeigten, dass die CO-Liganden dieser Hydrogenasen aus CO<sub>2</sub> stammen, was an sich nicht außergewöhnlich ist, da hier CO<sub>2</sub> als basale Kohlenstoffquelle diente. Jedoch wird darüber hinaus postuliert, dass auch hier höchstwahrscheinlich gasförmiges CO als unmittelbarer

Vorläufer der Biosynthese der Carbonylliganden dient. Eine direkte CO<sub>2</sub>-Reduktion wurde jedoch auch hier ausgeschlossen, da das Genom keine Nickel-abhängige CODH kodiert (Schick, Xie *et al.* 2012).

Vielversprechender erschienen in diesem Zusammenhang Untersuchungen an *Allochromatium vinosum*. Ob CODH-vermittelt oder nicht, konnte hier durch Zugabe von 3 mM CH<sub>3</sub><sup>13</sup>COOH zum Medium eine spezifische, 20 %-ige <sup>13</sup>C-Markierung des Carbonylliganden erzielt werden (Roseboom, Blokesch *et al.* 2005). Obgleich ein reprimierender Effekt auf die Hydrogenaseexpression in *Ralstonia eutropha* durch die Zugabe von Acetat nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann (Friedrich 1981), zeigte ein vergleichbares *in vivo*-Markierungsexperiment in *Ralstonia eutropha* keine Markierung eines diatomaren Liganden (Kapitel 3.5.4).

Interessanterweise zeigte eine Proteomstudie von Kohlmann *et al.* einen signifikanten Anstieg der Produktion einiger CODH-Untereinheiten sowie eines akzessorischen Genes unter chemolithoautotrophen Bedingungen (H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>) relativ zu organoheterotrophen Bedingungen (Succinat) (Kohlmann, Pohlmann *et al.* 2011). Anhand dieser Proteomdaten wurde daher in dieser Arbeit eine der vermeintlichen CODHs für eine eingehende Untersuchung ausgewählt und auf ihre Beteiligung an der Synthese des Carbonylliganden hin untersucht (Kapitel 3.5.2).

Auf Grundlage des in Kapitel 3.3.3 ermittelten Äquimolaritätspunktes konnte eine Methode zur Untersuchung entsprechender Deletionsmutanten etabliert werden. Diese Methode ermöglicht es jedes in Frage kommende Gen auszuschalten und die entsprechenden Genprodukte, mittels FTIR-Spektroskopie, auf eine etwaige Beteiligung an der Synthese des Carbonylliganden hin zu untersuchen. Dazu wird der <sup>13</sup>CO-Peak nahe dem Äquimolaritätspunkt als Referenzpunkt verwendet. So kann die Menge des intrinsisch produzierten <sup>12</sup>CO von Wildtyp und Mutante verglichen werden (Kapitel 3.5.7). Ein besonderer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit auch kleinste Veränderungen im CO-Pool zu detektieren, auch wenn diese sich nicht auf physiologischer Ebene bemerkbar machen. Eine etwaige Veränderung im CO-Konsum würde sich dabei nicht manifestieren, da dieser in gleichem Maße <sup>12</sup>CO und <sup>13</sup>CO betreffen würde (einen hypothetischen Isotopeneffekt ausgenommen).

Obgleich so eine Beteiligung der vermeintlichen CODH an der Synthese des CO-Liganden gezeigt werden konnte, scheidet eine Funktion als kanonische CODH aufgrund der Wachstums- und SI-Markierungsexperimente aus. Vielmehr scheint es sich hier um ein verwandtes Enzym aus der Familie der molybdänhaltigen (Mo-)Hydroxylasen zu handeln, zu denen auch die aeroben CODHs gehören (Dobbek, Gremer *et al.* 1999). Andere Enzyme dieser Familie katalysieren die oxidative Hydroxylierung unterschiedlichster Substrate wie verschiedene

Aldehyde oder heterozyklische Aromate (Hille 1996; Dobbek, Gremer *et al.* 1999). Um die Natur des Substrats zu beleuchten, wurde ein Vergleich zwischen den Proteinsequenzen der großen Untereinheiten verschiedener Mo-Hydroxylasen und CoxL1 vorgenommen (Abbildung 4-8).

	Aktives Zentrum	Motiv I	Motiv II
	##	##	# # #
Re CoxL1	371 D <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> A <sup>#</sup> G <sup>#</sup> R 378	256 GGGFG 260	508 H <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> H <sup>#</sup> E <sup>#</sup> T <sup>#</sup> T 515
Hp CutL	381 V <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> R <sup>#</sup> C <sup>#</sup> S <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R 388	265 GGGFG 269	522 Q <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> H <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> T <sup>#</sup> T 529
Pt CutA	378 V <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> R <sup>#</sup> C <sup>#</sup> S <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R 385	262 GGGFG 264	519 Q <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> H <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> T <sup>#</sup> T 526
Oc CoxL	384 V <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> R <sup>#</sup> C <sup>#</sup> S <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R 391	268 GGGFG 272	528 Q <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> H <sup>#</sup> E <sup>#</sup> T <sup>#</sup> T 535
Pp QorL	369 -A <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 374	252 GGGFG 256	506 S <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> H <sup>#</sup> E <sup>#</sup> T <sup>#</sup> T 513
An NdhC	370 -A <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 375	254 GGGFG 258	505 Q <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> H <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> T <sup>#</sup> T 512
Ta HcrA	356 -A <sup>#</sup> M <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> H <sup>#</sup> C <sup>#</sup> - 361	242 GGGFG 246	481 I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> N <sup>#</sup> T <sup>#</sup> M 488
Rp HbaC	356 -A <sup>#</sup> M <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> H <sup>#</sup> C <sup>#</sup> - 361	242 GGGFG 246	480 I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> S <sup>#</sup> T <sup>#</sup> V 487
Dg MOP	531 -A <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 536	418 G <sup>#</sup> G <sup>#</sup> T <sup>#</sup> F <sup>#</sup> G 422	653 H <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> A <sup>#</sup> D <sup>#</sup> I <sup>#</sup> G 660
Dd MOD	533 -A <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 538	420 G <sup>#</sup> G <sup>#</sup> T <sup>#</sup> F <sup>#</sup> G 426	655 H <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> A <sup>#</sup> D <sup>#</sup> A <sup>#</sup> G 662
Dp XDH	923 -A <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> F <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 928	808 GGGFG 812	1051 I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> L <sup>#</sup> N <sup>#</sup> T <sup>#</sup> K 1058
Bt XDH	909 -A <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> F <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 914	794 GGGFG 798	1037 M <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> L <sup>#</sup> H <sup>#</sup> T <sup>#</sup> K 1044
En HXA	941 -A <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> F <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 946	826 GGGFG 830	1069 M <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> L <sup>#</sup> H <sup>#</sup> T <sup>#</sup> K 1076
Rc XdhB	340 -A <sup>#</sup> F <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> F <sup>#</sup> G <sup>#</sup> - 345	225 GGGFG 229	488 M <sup>#</sup> G <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> G <sup>#</sup> L <sup>#</sup> H <sup>#</sup> A <sup>#</sup> K 495
Konsensus	.AhRu.h.	GGuFG	.GQG.ph.

	Motiv III	Motiv IV	Motiv V
	# ##	# # ## #	# ##
Re CoxL1	547 T <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> S <sup>#</sup> L 553	668 F <sup>#</sup> G <sup>#</sup> N <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> M <sup>#</sup> I <sup>#</sup> V <sup>#</sup> E <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 680	742 V <sup>#</sup> K <sup>#</sup> G <sup>#</sup> C <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 747
Hp CutL	561 T <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> S <sup>#</sup> T 567	680 C <sup>#</sup> P <sup>#</sup> T <sup>#</sup> R <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> M <sup>#</sup> I <sup>#</sup> E <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 692	752 A <sup>#</sup> K <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> A <sup>#</sup> E 757
Pt CutA	558 T <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> S <sup>#</sup> T 564	677 C <sup>#</sup> P <sup>#</sup> T <sup>#</sup> R <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> M <sup>#</sup> I <sup>#</sup> E <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 689	749 A <sup>#</sup> K <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> A <sup>#</sup> E 754
Oc CoxL	567 T <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> S <sup>#</sup> T 573	686 C <sup>#</sup> P <sup>#</sup> T <sup>#</sup> R <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> M <sup>#</sup> I <sup>#</sup> E <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 698	758 A <sup>#</sup> K <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> A <sup>#</sup> E 763
Pp QorL	544 A <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> A 550	666 C <sup>#</sup> G <sup>#</sup> T <sup>#</sup> M <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> M <sup>#</sup> I <sup>#</sup> V <sup>#</sup> E <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 678	738 I <sup>#</sup> K <sup>#</sup> G <sup>#</sup> M <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 743
An NdhC	544 T <sup>#</sup> I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> A <sup>#</sup> A 550	666 C <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> T <sup>#</sup> I <sup>#</sup> V <sup>#</sup> E <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 678	738 V <sup>#</sup> K <sup>#</sup> G <sup>#</sup> M <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 743
Ta HcrA	520 S <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> S <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> V <sup>#</sup> T 526	650 V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> K <sup>#</sup> A <sup>#</sup> L <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> L <sup>#</sup> A <sup>#</sup> V <sup>#</sup> E <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 662	721 A <sup>#</sup> K <sup>#</sup> E <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> E 726
Rp HbaC	519 A <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> S <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> I <sup>#</sup> T 525	648 C <sup>#</sup> G <sup>#</sup> R <sup>#</sup> A <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> L <sup>#</sup> A <sup>#</sup> V <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 660	721 D <sup>#</sup> K <sup>#</sup> E <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> E 726
Dg MOP	695 S <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> 701	795 L <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> L <sup>#</sup> C <sup>#</sup> N <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> L <sup>#</sup> A <sup>#</sup> T <sup>#</sup> D <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 807	864 A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 869
Dd MOD	697 A <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> S <sup>#</sup> S <sup>#</sup> Q <sup>#</sup> 703	795 I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> K <sup>#</sup> I <sup>#</sup> C <sup>#</sup> N <sup>#</sup> K <sup>#</sup> L <sup>#</sup> V <sup>#</sup> V <sup>#</sup> D <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 807	864 A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 869
Dp XDH	1089 T <sup>#</sup> A <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S 1095	1196 I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> S <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> A <sup>#</sup> I <sup>#</sup> D <sup>#</sup> I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 1208	1269 S <sup>#</sup> K <sup>#</sup> A <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 1274
Bt XDH	1076 T <sup>#</sup> A <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> V <sup>#</sup> S <sup>#</sup> T 1082	1181 V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> S <sup>#</sup> S <sup>#</sup> L <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> A <sup>#</sup> I <sup>#</sup> D <sup>#</sup> I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 1193	1255 S <sup>#</sup> K <sup>#</sup> A <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 1260
En HXA	1108 T <sup>#</sup> A <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S 1114	1213 V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> R <sup>#</sup> T <sup>#</sup> I <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> S <sup>#</sup> I <sup>#</sup> D <sup>#</sup> Y <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 1225	1290 S <sup>#</sup> R <sup>#</sup> G <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 1295
Rc XdhB	527 T <sup>#</sup> A <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> S <sup>#</sup> G <sup>#</sup> A 533	651 A <sup>#</sup> G <sup>#</sup> A <sup>#</sup> S <sup>#</sup> L <sup>#</sup> N <sup>#</sup> P <sup>#</sup> A <sup>#</sup> L <sup>#</sup> D <sup>#</sup> I <sup>#</sup> G <sup>#</sup> 663	725 S <sup>#</sup> K <sup>#</sup> A <sup>#</sup> V <sup>#</sup> G <sup>#</sup> E 730
Konsensus	shtS...	hs..hN..h..GQ	.p.atE

**Abbildung 4-8: Sequenzvergleich der Molybdän-Kofaktor koordinierenden Motiven von Vertretern der Molybdän-Hydroxylasen.** Durchgehend konservierte Aminosäuren (zu 100 % konserviert) sind grün unterlegt, hochkonservierte Aminosäuren mit einem Konservierungsgrad  $\geq 75$  % sind gelb unterlegt. Die Konsensussequenz zeigt neben den durchweg konservierten Aminosäuren (großgeschrieben) auch Positionen an denen AS mit bestimmten Eigenschaften konserviert sind (kleine Buchstaben; s, klein; h, hydrophob; t, winzig; a, aliphatisch; p, polar; u, winzig und hydrophob). Rauten oberhalb der Sequenzen markieren AS, die an der Koordination des MoCo beteiligt sind. Re CoxL1, Molybdän-Hydroxylase aus *Ralstonia eutropha* (A/N: YP\_724956); Hp CutL, CODH aus *Hydrogenophaga pseudoflavus* (AAD00363); Pt CutA, CODH aus *Pseudomonas thermocarboxydovorans* (CAA54902); Oc CoxL, CODH aus *Oligotropha carboxydovorans* (CAA57829); Pp QorL, Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* (CAA66830); An NdhC, Nikotin-Dehydrogenase aus *Arthrobacter nicotinovorans* (CAA53088); Ta HcrA, 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* (CAA05038); Rp HbaC, 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase aus *Rhodospseudomonas palustris* (AAB42208); Dg MOP, Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* (CAA54439); Dd MOD, Aldehyd-Oxidoreduktase from *Desulfovibrio desulfuricans* (CAB64929); Dp XDH, Xanthin-Dehydrogenase aus *Drosophila pseudoobscura* (AAA29022); Bt XDH, Xanthin-Dehydrogenase aus *Bos taurus* (CAA58497); En Hxa, Xanthin-Dehydrogenase aus *Emericella nidulans* (CAA58034); Rc XdhB, Xanthin-Dehydrogenase aus *Rhodobacter capsulatus* (CAA04470); Sequenzvergleich modifiziert nach (Hänzelmann, Dobbek *et al.* 2000).

Dieser Vergleich zeigt zwar hohen Grad an Homologie in allen Kofaktor-bindenden Motiven, jedoch zeigen sich auch distinkte Unterschiede im sogenannten *Active Site Loop*.

Dieser *Loop* wird als das aktive Zentrum der Mo-Hydroxylasen angesehen und seine Aminosäuresequenz ist für die Spezifität der Substratbindung essentiell (Hänzelmann, Dobbek *et al.* 2000). Im Falle der kanonischen CODHs ist z. B. ein konserviertes Cystein an der Koordinierung eines essentiellen  $\text{Cu}^+$ -Ions beteiligt (Dobbek, Gremer *et al.* 2002). Im *Active Site Loop* von CoxL1 fehlt ein entsprechendes Cystein. Das aktive Zentrum aus CoxL1 zeigt größte Ähnlichkeit zum *Active Site Loop* einer Chinolin-2-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas putida* (Hänzelmann, Dobbek *et al.* 2000).

Tatsächlich sind auch andere Enzyme aus der Klasse der Oxidoreduktasen bekannt, die gasförmiges CO freisetzen (E.C.: 1.13.11.24, 1.13.11.47 oder 1.13.11.48), diese sogenannten Dioxygenasen katalysieren die oxidative Ringspaltung unterschiedlicher Substrate bei gleichzeitiger Freisetzung von Kohlenstoffmonoxid.

Da der *Active Site Loop* von CoxL1 keinem der untersuchten Enzyme gleicht, ist eine Prognose des potentiellen Substrats schwierig. Hierfür kommen eine Vielzahl von Aldehyden und Aromaten in Frage (Hille 1996). Unter Berücksichtigung des Endproduktes, CO, erscheint Formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) als ein mögliches Substrat. Die Dekomposition von Formaldehyd zu CO durch Photolyse ist ein bekannter Prozess (Calvert, Kerr *et al.* 1972). Dabei wird  $\text{CH}_2\text{O}$  durch Licht angeregt und zerfällt in zwei unterschiedlichen Reaktionen (11) bzw. (12),



oder



Das in Reaktion (11) entstandene Formyl-Radikal reagiert anschließend in Gegenwart von Sauerstoff weiter zu einem Hydroperoxyl-Radikal und Kohlenmonoxid,



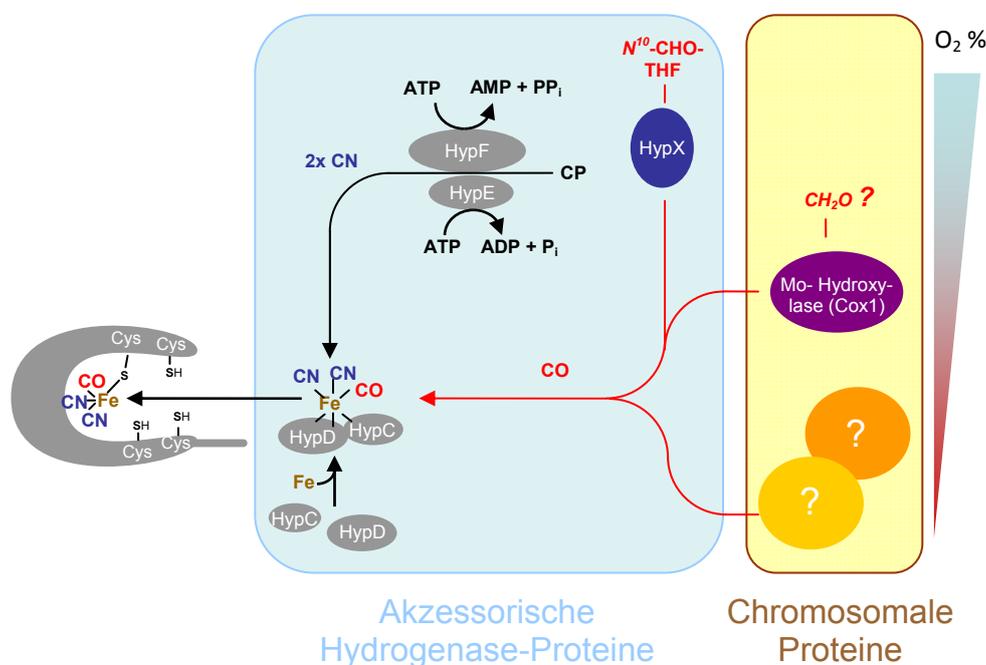
Eine entsprechende enzymkatalysierte Reaktion (analog zu Gleichung 12) wäre im Rahmen der Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen durchaus denkbar. Ein entsprechendes *in vivo*-Experiment mit  $^{13}\text{C}$ -Formaldehyd würde an dieser Stelle Klarheit schaffen.

## 4.6 Fazit und Perspektiven

In dieser Studie konnten hinsichtlich der pleiotropen Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen wesentliche Fortschritte erzielt werden (siehe Abbildung 4-9). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass *beide* Cyanidliganden und auch der Carbonylligand bereits im HypCD-Komplex

vorhanden sind. Dieser Befund konnte unabhängig für *E. coli* und *R. eutropha* bestätigt werden. Es konnte überdies gezeigt werden, dass die Ligandierung des katalytischen Eisens mit den CN-Liganden die Voraussetzung für die Ligandierung mit CO ist und das zumindest HypE in stöchiometrischen Mengen mit HypC und HypD vorliegen muss.

Ferner konnte in dieser Studie unzweifelhaft gezeigt werden, dass die Synthese des Carbonylliganden eine Leistung des Wirtsmetabolismus ist und eine gemeinschaftliche Leistung mehrerer Synthesewege sein muss. Dabei gibt es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Anzuchtbedingungen. Ferner sind auch Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen feststellbar. Die Quantifizierung erbrachte eine Konzentration der intrinsischen Vorstufen im niedrigen, nanomolaren Bereich. Damit scheint es wahrscheinlich, dass es sich um eine nicht näher bestimmte Nebenreaktion des Metabolismus handeln muss.



**Abbildung 4-9: Erweitertes Schema der pleiotropen Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha*.** Der HypCD-Komplex enthält neben zwei CN-Liganden auch den Carbonylliganden. Die  $\text{Fe}(\text{CN})_2(\text{CO})$ -Einheit wird im Anschluss an die Assemblierung als Ganzes in die große Untereinheit transferiert. Die Synthese des Carbonylliganden erfolgt über ein Netzwerk von verschiedenen, zumeist unbekannt, enzymatischen Reaktionen. Diese stellen unter unterschiedlichen Bedingungen einen variierenden Anteil am CO-Gesamtpool. Unter aeroben Bedingungen leistet HypX einen entscheidenden Beitrag. Ausgehend von  $N^{10}$ -CHO-THF wird der CO-Ligand unter aeroben Bedingungen in einer zweistufigen Synthese produziert. Weitere Reaktionen zeigen mit zunehmender Anaerobisierung einen steigenden Anteil an der CO-Synthese. Eine weitere CO-Quelle ist eine vermeintliche CODH (CoxMSL1), die höchstwahrscheinlich den Mo-Hydroxylasen zuzuordnen ist. Ein Substrat ist derzeit noch unbekannt.

Als erstes konkretes Enzym konnte HypX als CO-Produzent identifiziert werden. Als Anpassung an extrem sauerstoffreiche Bedingungen setzt dieses akzessorische Enzym  $N^{10}$ -Formyl-THF in einer beispiellosen, zweistufigen Reaktion zum Carbonylliganden um. HypX ist damit auch eine Erklärung für die hohe Sauerstofftoleranz der [NiFe]-Hydrogenasen in *Ralstonia*

*eutropha*, die parallel zu den Resistenzmechanismen der einzelnen Hydrogenasen auch für die pleiotrope Reifung aller drei Hydrogenasen gegeben sein muss.

Darüber hinaus konnte ein weiteres Enzym als potentielle CO-Quelle identifiziert werden. Da für diese vermeintliche CODH (vielmehr ein Enzym aus der Familie der Mo-Hydroxylasen) bisher kein Substrat bekannt ist, kann die Natur der katalysierten Reaktion nicht näher benannt werden. Lediglich ein Beitrag zur Gesamtsyntheseleistung des Carbonylliganden ist aufgrund eines neuartigen *Assays* nachweisbar.

Hinsichtlich weiterführender Studien, basierend auf den hier vorgestellten Ergebnissen, zeigen sich zwei deutliche Schwerpunkte.

Der erste Schwerpunkt ist eine weitergehende Untersuchung des HypCD-Komplexes. Aufbauend auf der bestehenden Methodik sollte versucht werden für *R. eutropha* eine *in vitro*-Reifung aufzubauen, die es ermöglicht die einzelnen Zwischenschritte des Ligandierungsprozesses aufzulösen. Zudem könnte, wie bereits erwähnt, versucht werden durch eine konditionale Arretierung der Reifung Intermediate der Reifung zu akkumulieren.

Von größerem Interesse wäre allerdings eine eingehendere Untersuchung von HypX. HypX ist ein bisher völlig unbekanntes, neues Enzym des THF-abhängigen C<sub>1</sub>-Stoffwechsels, von dem man annahm bereits alle beteiligten Enzyme zu kennen. Vor allem die Überexpression und Reinigung von HypX als Ganzes oder in einzelnen Domänen muss das vordringliche Ziel kommender Arbeiten sein. Die biochemische Charakterisierung, insbesondere der C-terminalen Dehydratase-Domäne, ist dabei von außerordentlichem Interesse. Eine etwaige Umkehrbarkeit der vorgeschlagenen Formylsäure-Dehydratisierung besäße enormes wissenschaftliches, vor allem aber biotechnologisches bzw. wirtschaftliches Potential. Durch die Hydratisierung von Kohlenmonoxid zu Formylsäure wäre eine Möglichkeit gefunden Energie sicher, effizient und in hoher Dichte (1,8 kWh/l) zu speichern (persönliche Kommunikation Prof. M. Beller). Durch den Einsatz einer DFAFC (engl.: *Direct Formic Acid Fuel Cell*) (Uhm, Lee *et al.* 2009; Erickson, Mitrovski *et al.* 2011) oder die Dehydrierung zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> (Boddien, Loges *et al.* 2008; Loges, Boddien *et al.* 2008) könnte diese Energie nutzbar gemacht werden. Je nach Herkunft des verwendeten Kohlenmonoxids wäre ein solches Verfahren zudem klimaneutral, da nur soviel CO<sub>2</sub> freigesetzt würde wie zuvor CO bei der Synthese von Formiat gebunden worden wäre. Ausreichend große Mengen an Kohlenmonoxid könnten unter anderem durch Untertagevergasung von Kohle (Schulz 1999), bei der Erdgasreformierung (Synthesegas) oder durch die Reduktion von CO<sub>2</sub> in einem Sonnenofen mit keramischen Kobaltferrit als Katalysator (energy.sandia.gov) gewonnen werden.

Untersuchungen an HypX wären zudem auch aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Nitril-Hydratasen interessant. Nitril-Hydratasen werden bereits heute großmaßstäblich eingesetzt, um verschiedene Feinchemikalien in Bioreaktoren zu produzieren und anschließend zu reinigen. So werden verschiedene Nitrile in ihre korrespondierenden, höherwertigen Amide umgewandelt. Unter anderem werden Acrylamide (>30.000 t/Jahr), Nicotinamide (>3.500 t/Jahr) und 5-Cyano-Valeramide in großen Mengen auf diesem Weg hergestellt (Mitra und Holz 2007). Zur Erweiterung dieses Spektrums werden große Anstrengungen unternommen diese Enzyme für weitere Substrate zugänglich zu machen (Prasad und Bhalla 2010). Eine ausführliche Charakterisierung des aktiven Zentrums der C-terminalen HypX-Domäne könnte sich auch als hilfreich für das Verständnis der Substratbindung in diesen NHasen erweisen.



## 5 Referenzen

- Agar, J. N., C. Krebs, *et al.* (2000). "IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU." Biochemistry **39**(27): 7856-7862.
- Agnihotri, G. and H. W. Liu (2003). "Enoyl-CoA hydratase. reaction, mechanism, and inhibition." Bioorg Med Chem **11**(1): 9-20.
- Akhmanova, A., F. Voncken, *et al.* (1998). "A hydrogenosome with a genome." Nature **396**(6711): 527-528.
- Akiya, N. and P. E. Savage (1998). "Role of Water in Formic Acid Decomposition." American Institute of Chemical Engineers Journal **44**(2): 405-415.
- Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.
- Arnold, K., L. Bordoli, *et al.* (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." Bioinformatics **22**(2): 195-201.
- Atanassova, A. and D. B. Zamble (2005). "Escherichia coli HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel." J Bacteriol **187**(14): 4689-4697.
- Atkins, P., T. Overton, *et al.*, Eds. (2009). Inorganic Chemistry. Oxford, Oxford University Press.
- Atta, M. and J. Meyer (2000). "Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*." Biochim Biophys Acta **1476**(2): 368-371.
- Bahnon, B. J., V. E. Anderson, *et al.* (2002). "Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion." Biochemistry **41**(8): 2621-2629.
- Benkert, P., S. C. Tosatto, *et al.* (2008). "QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment." Proteins **71**(1): 261-277.
- Bennett, B. D., E. H. Kimball, *et al.* (2009). "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*." Nat Chem Biol **5**(8): 593-599.
- Bennett, J. P., L. Bertin, *et al.* (2008). "A ternary complex of hydroxycinnamoyl-CoA hydratase-lyase (HCHL) with acetyl-CoA and vanillin gives insights into substrate specificity and mechanism." Biochem J **414**(2): 281-289.
- Benning, M. M., K. L. Taylor, *et al.* (1996). "Structure of 4-chlorobenzoyl coenzyme A dehalogenase determined to 1.8 Å resolution: an enzyme catalyst generated via adaptive mutation." Biochemistry **35**(25): 8103-8109.
- Bernhard, M., T. Buhrke, *et al.* (2001). "The H<sub>2</sub> sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and its interaction with a histidine protein kinase." J Biol Chem **276**(19): 15592-15597.
- Bernhard, M., B. Friedrich, *et al.* (2000). "*Ralstonia eutropha* TF93 is blocked in tat-mediated protein export." J Bacteriol **182**(3): 581-588.
- Bernhard, M., E. Schwartz, *et al.* (1996). "The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling." J Bacteriol **178**(15): 4522-4529.

- Bertani, G. (2004). "Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems." J Bacteriol **186**(3): 595-600.
- Bleijlevens, B., T. Buhrke, *et al.* (2004). "The auxiliary protein HypX provides oxygen tolerance to the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by way of a cyanide ligand to nickel." J Biol Chem **279**(45): 46686-46691.
- Blokesch, M. (2004). [NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*: Funktionen der am Metalleinbau beteiligten Proteine. Institut für Genetik und Mikrobiologie. München, Ludwig-Maximilian Universität. **PhD**: 160.
- Blokesch, M., S. P. Albracht, *et al.* (2004). "The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases." J Mol Biol **344**(1): 155-167.
- Blokesch, M. and A. Böck (2002). "Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle." J Mol Biol **324**(2): 287-296.
- Blokesch, M. and A. Böck (2006). "Properties of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypD." FEBS Lett **580**(17): 4065-4068.
- Blokesch, M., A. Paschos, *et al.* (2004). "Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE." Eur J Biochem **271**(16): 3428-3436.
- Blokesch, M., M. Rohmoser, *et al.* (2004). "HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation." J Bacteriol **186**(9): 2603-2611.
- Böck, A., P. W. King, *et al.* (2006). "Maturation of hydrogenases." Adv Microb Physiol **51**: 1-71.
- Boddien, A., B. Loges, *et al.* (2008). "Hydrogen Generation at Ambient Conditions: Application in Fuel Cells." ChemSusChem **1**(8-9): 751-758.
- Borejdo, J. and C. Flynn (1984). "Electrophoresis in the presence of Coomassie brilliant blue R-250 stains polyacrylamide gels during protein fractionation." Anal Biochem **140**(1): 84-86.
- Bowien, B. and B. Kusian (2002). "Genetics and control of CO<sub>2</sub> assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*." Arch Microbiol **178**(2): 85-93.
- Bürstel, I. (2006). Analyse des Promotors von GIGANTEA, einem Blühinduktionsgen aus *Arabidopsis thaliana*, durch phylogenetisch-vergleichende Sequenzanalyse und "chemische Genetik". Entwicklungsbiologie der Pflanzen. Köln, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung. **Diplomarbeit**: 148.
- Bürstel, I., E. Siebert, *et al.* (2012). "A universal scaffold for synthesis of the Fe(CN)<sub>2</sub>(CO) moiety of [NiFe]-hydrogenase." Journal of Biological Chemistry.
- Bugg, T. (2009). Enzymatic Addition/Elimination Reactions. Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Publishing Ltd.: 193-209.
- Buhrke, T. (2006). Der H<sub>2</sub>-Sensor von *Ralstonia eutropha*: Struktur-Funktions-Beziehungen einer neuartigen [NiFe]-Hydrogenase. Microbiology. Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin. **Ph.D.**: 184.
- Buhrke, T., M. Brecht, *et al.* (2002). "The H<sub>2</sub> sensor of *Ralstonia eutropha*: biochemical and spectroscopic analysis of mutant proteins modified at a conserved glutamine residue close to the [NiFe] active site." J Biol Inorg Chem **7**(7-8): 897-908.

- Buhrke, T. and B. Friedrich (1998). "hoxX (hypX) is a functional member of the *Alcaligenes eutrophus* hyp gene cluster." Arch Microbiol **170**(6): 460-463.
- Buhrke, T., O. Lenz, *et al.* (2005). "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**(25): 23791-23796.
- Buhrke, T., O. Lenz, *et al.* (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**(6): 1677-1689.
- Buhrke, T., S. Löscher, *et al.* (2005). "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**(20): 19488-19495.
- Burgdorf, T., O. Lenz, *et al.* (2005). "[NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation." J Mol Microbiol Biotechnol **10**(2-4): 181-196.
- Burgdorf, T., E. van der Linden, *et al.* (2005). "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**(9): 3122-3132.
- Calderazzo, F., G. Fachinetti, *et al.* (1974). "Carbonyl complexes of bis(cyclopentadienyl)vanadium(II) and bis(cyclopentadienyl)vanadium(III). Bis(cyclopentadienyl)iodovanadium(III) a model compound for the quantitative assessment of the reversible carbon monoxide coordinative addition." Journal of the American Chemical Society **96**(11): 3695-3696.
- Calvert, J. G., J. A. Kerr, *et al.* (1972). "Photolysis of formaldehyde as a hydrogen atom source in the lower atmosphere." Science **175**(4023): 751-752.
- Cammack R., Ed. (2001). Hydrogen as a fuel: learning from nature. London, U.K., Taylor and Francis.
- Casadaban, M. J. (1976). "Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu." J Mol Biol **104**(3): 541-555.
- Chen, W. P. and T. T. Kuo (1993). "A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA." Nucleic Acids Res **21**(9): 2260.
- Chenna, R., H. Sugawara, *et al.* (2003). "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs." Nucleic Acids Res **31**(13): 3497-3500.
- Chumanovich, A. A., S. A. Krupenko, *et al.* (2004). "The crystal structure of the hydrolase domain of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase: mechanism of hydrolysis and its interplay with the dehydrogenase domain." J Biol Chem **279**(14): 14355-14364.
- Chung, K. C. and D. B. Zamble (2011). "The *Escherichia coli* metal-binding chaperone SlyD interacts with the large subunit of [NiFe]-hydrogenase 3." FEBS Lett **585**(2): 291-294.
- Clark, D. D., J. M. Boyd, *et al.* (2004). "The stereoselectivity and catalytic properties of *Xanthobacter autotrophicus* 2-[(R)-2-Hydroxypropylthio]ethanesulfonate dehydrogenase are controlled by interactions between C-terminal arginine residues and the sulfonate of coenzyme M." Biochemistry **43**(21): 6763-6771.
- Clark, D. D. and S. A. Ensign (2002). "Characterization of the 2-[(R)-2-hydroxypropylthio]ethanesulfonate dehydrogenase from *Xanthobacter* strain Py2: product inhibition, pH dependence of kinetic parameters, site-directed mutagenesis, rapid equilibrium inhibition, and chemical modification." Biochemistry **41**(8): 2727-2740.

- Comeau, S. R., D. W. Gatchell, *et al.* (2004). "ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes." Bioinformatics **20**(1): 45-50.
- Conrad, R. (1996). "Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H<sub>2</sub>, CO, CH<sub>4</sub>, OCS, N<sub>2</sub>O, and NO)." Microbiol Rev **60**(4): 609-640.
- Constant, P., S. P. Chowdhury, *et al.* (2011). "Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H<sub>2</sub>-oxidizing bacteria." Appl Environ Microbiol **77**(17): 6027-6035.
- Constant, P., S. P. Chowdhury, *et al.* (2010). "Streptomyces contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase." Environ Microbiol **12**(3): 821-829.
- Crabtree, R. H. (2009). The organometallic chemistry of the transition metals. Hoboken, NJ, Wiley.
- Dai, S., C. Schwendtmayer, *et al.* (2000). "Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster." Science **287**(5453): 655-658.
- Dernedde, J., M. Eitinger, *et al.* (1993). "Analysis of a pleiotropic gene region involved in formation of catalytically active hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16." Arch Microbiol **159**(6): 545-553.
- Dernedde, J., T. Eitinger, *et al.* (1996). "hyp gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system." Eur J Biochem **235**(1-2): 351-358.
- Dixon, N. M. and D. B. Kell (1989). "The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of micro-organisms." J Appl Bacteriol **67**(2): 109-136.
- Dobbek, H., L. Gremer, *et al.* (2002). "Catalysis at a dinuclear [CuSMo(=O)OH] cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15971-15976.
- Dobbek, H., L. Gremer, *et al.* (1999). "Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selenylcysteine." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8884-8889.
- Donato, H., N. I. Krupenko, *et al.* (2007). "10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase requires a 4'-phosphopantetheine prosthetic group for catalysis." J Biol Chem **282**(47): 34159-34166.
- Driesener, R. C., M. R. Challand, *et al.* (2010). "[FeFe]-hydrogenase cyanide ligands derived from S-adenosylmethionine-dependent cleavage of tyrosine." Angew Chem Int Ed Engl **49**(9): 1687-1690.
- Eberz, G. and B. Friedrich (1991). "Three trans-acting regulatory functions control hydrogenase synthesis in *Alcaligenes eutrophus*." J Bacteriol **173**(6): 1845-1854.
- Erickson, E. M., S. M. Mitrovski, *et al.* (2011). "Optimization of a permeation-based microfluidic direct formic acid fuel cell (DFAFC)." Electrophoresis **32**(8): 947-956.
- Ferry, J. G. (1995). "CO dehydrogenase." Annu Rev Microbiol **49**: 305-333.
- Fontecilla-Camps, J. C., P. Amara, *et al.* (2009). "Structure-function relationships of anaerobic gas-processing metalloenzymes." Nature **460**(7257): 814-822.

- Fontecilla-Camps, J. C., M. Frey, *et al.* (1997). "Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action?" Biochimie **79**(11): 661-666.
- Fontecilla-Camps, J. C., A. Volbeda, *et al.* (2007). "Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases." Chem Rev **107**(10): 4273-4303.
- Forzi, L., P. Hellwig, *et al.* (2007). "The CO and CN(-) ligands to the active site Fe in [NiFe]-hydrogenase of *Escherichia coli* have different metabolic origins." FEBS Lett **581**(17): 3317-3321.
- Forzi, L. and R. G. Sawers (2007). "Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*." Biometals **20**(3-4): 565-578.
- Friedrich, B., E. Heine, *et al.* (1981). "Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*." J Bacteriol **145**(3): 1144-1149.
- Friedrich, B., C. Hogrefe, *et al.* (1981). "Naturally occurring genetic transfer of hydrogen-oxidizing ability between strains of *Alcaligenes eutrophus*." J Bacteriol **147**(1): 198-205.
- Friedrich, B. and E. Schwartz (1993). "Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs." Annu Rev Microbiol **47**: 351-383.
- Friedrich, C. G. (1982). "Depression of hydrogenase during limitation of electron donors and derepression of ribulosebiphosphate carboxylase during carbon limitation of *Alcaligenes eutrophus*." J Bacteriol **149**(1): 203-210.
- Friedrich, C. G. and B. Friedrich (1983). "Regulation of hydrogenase formation is temperature sensitive and plasmid coded in *Alcaligenes eutrophus*." J Bacteriol **153**(1): 176-181.
- Friedrich, C. G., Friedrich B., Bowien B. (1981). "Formation of Enzymes of Autotrophic Metabolism During Heterotrophic Growth of *Alcaligenes eutrophus*." J. Gen. Microbiol. **122**: 69-78.
- Friedrich, C. G., K. Schneider, *et al.* (1982). "Nickel in the catalytically active hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*." J Bacteriol **152**(1): 42-48.
- Fritsch, J., O. Lenz, *et al.* (2011). "The maturation factors HoxR and HoxT contribute to oxygen tolerance of membrane-bound [NiFe] hydrogenase in *Ralstonia eutropha* H16." J Bacteriol **193**(10): 2487-2497.
- Fritsch, J., P. Scheerer, *et al.* (2011). "The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre." Nature **479**(7372): 249-252.
- Fuchs, G., Ed. (2007). Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Garcin, E., X. Vernede, *et al.* (1999). "The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center." Structure **7**(5): 557-566.
- Gay, P., D. Le Coq, *et al.* (1985). "Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria." J Bacteriol **164**(2): 918-921.
- Gordon, J. C. and G. J. Kubas (2010). "Perspectives on How Nature Employs the Principles of Organometallic Chemistry in Dihydrogen Activation in Hydrogenases†." Organometallics **29**(21): 4682-4701.
- Goris, T., A. F. Wait, *et al.* (2011). "A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase." Nat Chem Biol **7**(5): 310-318.
- Gray, J. J., S. Moughon, *et al.* (2003). "Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations." J Mol Biol **331**(1): 281-299.

- Greco, C., G. Zampella, *et al.* (2006). "Insights into the Mechanism of Electrocatalytic Hydrogen Evolution Mediated by Fe<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>)(CO)<sub>6</sub>: The Simplest Functional Model of the Fe-Hydrogenase Active Site." Inorganic Chemistry **46**(1): 108-116.
- 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**(5): 675-679.
- Grove, W. R. (1839). "XXIV. On voltaic series and the combination of gases by platinum." Philosophical Magazine Series 3 **14**(86): 127-130.
- Guillon, J. M., Y. Mechulam, *et al.* (1992). "Disruption of the gene for Met-tRNA(fMet) formyltransferase severely impairs growth of Escherichia coli." J Bacteriol **174**(13): 4294-4301.
- Hamed, R. B., E. T. Batchelar, *et al.* (2008). "Mechanisms and structures of crotonase superfamily enzymes--how nature controls enolate and oxyanion reactivity." Cell Mol Life Sci **65**(16): 2507-2527.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Hänzelmann, P., H. Dobbek, *et al.* (2000). "The effect of intracellular molybdenum in Hydrogenophaga pseudoflava on the crystallographic structure of the seleno-molybdo-iron-sulfur flavoenzyme carbon monoxide dehydrogenase." J Mol Biol **301**(5): 1221-1235.
- Hashimoto, K., H. Suzuki, *et al.* (2008). "Catalytic mechanism of nitrile hydratase proposed by time-resolved X-ray crystallography using a novel substrate, tert-butylisonitrile." J Biol Chem **283**(52): 36617-36623.
- Häussinger, P., R. Lohmüller, *et al.* (2000). Hydrogen, 1. Properties and Occurrence. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Higuchi, Y., H. Ogata, *et al.* (1999). "Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H<sub>2</sub>, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution." Structure **7**(5): 549-556.
- Hille, R. (1996). "The Mononuclear Molybdenum Enzymes." Chem Rev **96**(7): 2757-2816.
- Horch, M., L. Lauterbach, *et al.* (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**(43): 8026-8029.
- Hottenrott, S., T. Schumann, *et al.* (1997). "The Escherichia coli SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase." J Biol Chem **272**(25): 15697-15701.
- Huang, X., H. M. Holden, *et al.* (2001). "Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions." Annu Rev Biochem **70**: 149-180.
- Hube, M., M. Blokesch, *et al.* (2002). "Network of hydrogenase maturation in Escherichia coli: role of accessory proteins HypA and HybF." J Bacteriol **184**(14): 3879-3885.
- Huson, D. H., D. C. Richter, *et al.* (2007). "Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees." BMC Bioinformatics **8**: 460.
- Jacobi, A., R. Rossmann, *et al.* (1992). "The hyp operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in Escherichia coli." Arch Microbiol **158**(6): 444-451.

- Jacobitz, S. and O. Meyer (1989). "Removal of CO dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydovorans* cytoplasmic membranes, rebinding of CO dehydrogenase to depleted membranes, and restoration of respiratory activities." J Bacteriol **171**(11): 6294-6299.
- Jacobsen, H., H. Klenow, *et al.* (1974). "The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis." Eur J Biochem **45**(2): 623-627.
- Jahns, A. (2005). Charakterisierung von Hyp-Proteinkomplexen, die an der Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* H16 beteiligt sind. Mikrobiologie. Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin. **Diplom Biologe**: 71.
- Jeffke, T., N. H. Gropp, *et al.* (1999). "Mutational analysis of the *cbb* operon (CO<sub>2</sub> assimilation) promoter of *Ralstonia eutropha*." J Bacteriol **181**(14): 4374-4380.
- Jones, A. K., O. Lenz, *et al.* (2004). "NiFe hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*." Biochemistry **43**(42): 13467-13477.
- Jones, S. and J. M. Thornton (2004). "Searching for functional sites in protein structures." Curr Opin Chem Biol **8**(1): 3-7.
- Kaluarachchi, H., K. C. Chan Chung, *et al.* (2010). "Microbial nickel proteins." Nat Prod Rep **27**(5): 681-694.
- Kaluarachchi, H., J. W. Zhang, *et al.* (2011). "Escherichia coli SlyD, More Than a Ni(II) Reservoir." Biochemistry.
- Kaluarachchi, H., J. W. Zhang, *et al.* (2011). "Escherichia coli SlyD, more than a Ni(II) reservoir." Biochemistry **50**(50): 10761-10763.
- Keeling, C. D., S. C. Piper, *et al.*, Eds. (2005). Atmospheric CO<sub>2</sub> and <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> exchange with the terrestrial biosphere and oceans from 1978 to 2000: observations and carbon cycle implications. A History of Atmospheric CO<sub>2</sub> and its effects on Plants, Animals, and Ecosystems. New York, Springer Verlag.
- Kiefer, F., K. Arnold, *et al.* (2009). "The SWISS-MODEL Repository and associated resources." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D387-392.
- Kikuchi, G., Y. Motokawa, *et al.* (2008). "Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **84**(7): 246-263.
- Kim, Y. M. and G. D. Hegeman (1981). "Electron transport system of an aerobic carbon monoxide-oxidizing bacterium." J Bacteriol **148**(3): 991-994.
- Kleihues, L., O. Lenz, *et al.* (2000). "The H<sub>2</sub> sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases." J Bacteriol **182**(10): 2716-2724.
- Klein, C., P. Chen, *et al.* (1995). "Towards structure-based drug design: crystal structure of a multisubstrate adduct complex of glycinamide ribonucleotide transformylase at 1.96 Å resolution." J Mol Biol **249**(1): 153-175.
- Kohlmann, Y., A. Pohlmann, *et al.* (2011). "Analyses of soluble and membrane proteomes of *Ralstonia eutropha* H16 reveal major changes in the protein complement in adaptation to lithoautotrophy." J Proteome Res **10**(6): 2767-2776.
- Kortlüke, C. and B. Friedrich (1992). "Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16." J Bacteriol **174**(19): 6290-6293.
- Kortlüke, C., K. Horstmann, *et al.* (1992). "A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16." J Bacteriol **174**(19): 6277-6289.

- Koski, M. K., A. M. Haapalainen, *et al.* (2004). "A two-domain structure of one subunit explains unique features of eukaryotic hydratase 2." J Biol Chem **279**(23): 24666-24672.
- Kozakov, D., R. Brenke, *et al.* (2006). "PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials." Proteins **65**(2): 392-406.
- Kozakov, D., K. H. Clodfelter, *et al.* (2005). "Optimal clustering for detecting near-native conformations in protein docking." Biophys J **89**(2): 867-875.
- Krupenko, S. A. (2009). "FDH: an aldehyde dehydrogenase fusion enzyme in folate metabolism." Chem Biol Interact **178**(1-3): 84-93.
- Krupenko, S. A., A. P. Vlasov, *et al.* (2001). "On the role of conserved histidine 106 in 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase catalysis: connection between hydrolase and dehydrogenase mechanisms." J Biol Chem **276**(26): 24030-24037.
- Krupenko, S. A. and C. Wagner (1999). "Aspartate 142 is involved in both hydrolase and dehydrogenase catalytic centers of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase." J Biol Chem **274**(50): 35777-35784.
- Krupenko, S. A., C. Wagner, *et al.* (1995). "Recombinant 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase catalyses both dehydrogenase and hydrolase reactions utilizing the synthetic substrate 10-formyl-5,8-dideazafofolate." Biochem J **306** ( Pt 3): 651-655.
- Kubas, G. J. (2001). "Metal–dihydrogen and  $\sigma$ -bond coordination: the consummate extension of the Dewar–Chatt–Duncanson model for metal–olefin  $\pi$  bonding " J. Organomet. Chem. **635**(1-2): 37-68.
- Kubas, G. J. (2007). "Fundamentals of H<sub>2</sub> Binding and Reactivity on Transition Metals Underlying Hydrogenase Function and H<sub>2</sub> Production and Storage." Chemical Reviews **107**(10): 4152-4205.
- Kubas, G. J., R. R. Ryan, *et al.* (1984). "Characterization of the first examples of isolable molecular hydrogen complexes, M(CO)<sub>3</sub>(PR<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>) (M = molybdenum or tungsten; R = Cy or isopropyl). Evidence for a side-on bonded dihydrogen ligand." Journal of the American Chemical Society **106**(2): 451-452.
- Kursula, P., H. Schuler, *et al.* (2006). "Structures of the hydrolase domain of human 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase and its complex with a substrate analogue." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **62**(Pt 11): 1294-1299.
- Kusian, B. and B. Bowien (1995). "Operator binding of the CbbR protein, which activates the duplicate cbb CO<sub>2</sub> assimilation operons of *Alcaligenes eutrophus*." J Bacteriol **177**(22): 6568-6574.
- Kusian, B., D. Sultemeyer, *et al.* (2002). "Carbonic anhydrase is essential for growth of *Ralstonia eutropha* at ambient CO<sub>2</sub> concentrations." J Bacteriol **184**(18): 5018-5026.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, *et al.* (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- Leach, M. R., S. Sandal, *et al.* (2005). "Metal binding activity of the *Escherichia coli* hydrogenase maturation factor HypB." Biochemistry **44**(36): 12229-12238.
- Leach, M. R., J. W. Zhang, *et al.* (2007). "The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD." J Biol Chem **282**(22): 16177-16186.

- Lenz, O., M. Bernhard, *et al.* (2002). "The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*." J Mol Microbiol Biotechnol **4**(3): 255-262.
- Lenz, O. and B. Friedrich (1998). "A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12474-12479.
- Lenz, O., A. Gleiche, *et al.* (2005). "Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase." J Bacteriol **187**(18): 6590-6595.
- Lenz, O., M. Ludwig, *et al.* (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**(6): 1107-1119.
- Lenz, O., E. Schwartz, *et al.* (1994). "The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation." J Bacteriol **176**(14): 4385-4393.
- Lenz, O., A. Strack, *et al.* (1997). "A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species." J Bacteriol **179**(5): 1655-1663.
- Lenz, O., I. Zebger, *et al.* (2007). "Carbamoylphosphate serves as the source of CN(-), but not of the intrinsic CO in the active site of the regulatory [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*." FEBS Lett **581**(17): 3322-3326.
- Liaw, W. F., J. H. Lee, *et al.* (2002). "Six-coordinate and five-coordinate Fe(II)(CN)<sub>2</sub>(CO)(x) thiolate complexes (x = 1, 2): synthetic advances for iron sites of [NiFe] hydrogenases." J Am Chem Soc **124**(8): 1680-1688.
- Lill, R. (2009). "Function and biogenesis of iron-sulphur proteins." Nature **460**(7257): 831-838.
- Lippard, S. J. and J. M. Berg (1995). Bioanorganische Chemie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Livingstone, C. D. and G. J. Barton (1993). "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation." Comput Appl Biosci **9**(6): 745-756.
- Loges, B., A. Boddien, *et al.* (2008). "Kontrollierte Wasserstoffherzeugung aus Ameisensäure-Amin-Addukten bei Raumtemperatur und direkte Nutzung in H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Brennstoffzellen." Angewandte Chemie **120**(21): 4026-4029.
- 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. Mikrobiologie. Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin. **Dr. rer. nat.:** 179.
- Ludwig, M., T. Schubert, *et al.* (2009). "Concerted action of two novel auxiliary proteins in assembly of the active site in a membrane-bound [NiFe] hydrogenase." J Biol Chem **284**(4): 2159-2168.
- Ludwig, M., R. Schulz-Friedrich, *et al.* (2006). "Occurrence of hydrogenases in cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria: implications for the phylogenetic origin of cyanobacterial and algal hydrogenases." J Mol Evol **63**(6): 758-768.
- Lutz, S., A. Jacobi, *et al.* (1991). "Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **5**(1): 123-135.
- Magalon, A., M. Blokesch, *et al.* (2001). "Fidelity of metal insertion into hydrogenases." FEBS Lett **499**(1-2): 73-76.

- Magalon, A. and A. Bock (2000). "Analysis of the HypC-hycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the Escherichia coli hydrogenase 3." J Biol Chem **275**(28): 21114-21120.
- Magalon, A. and A. Bock (2000). "Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from Escherichia coli taking place after nickel incorporation." FEBS Lett **473**(2): 254-258.
- Maier, T. and A. Bock (1996). "Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form." Biochemistry **35**(31): 10089-10093.
- Maier, T., A. Jacobi, *et al.* (1993). "The product of the hypB gene, which is required for nickel incorporation into hydrogenases, is a novel guanine nucleotide-binding protein." J Bacteriol **175**(3): 630-635.
- Maier, T., F. Lottspeich, *et al.* (1995). "GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of Escherichia coli." Eur J Biochem **230**(1): 133-138.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, *et al.* (2009). "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D205-210.
- Marchler-Bauer, A., S. Lu, *et al.* (2011). "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D225-229.
- Maróti, G., G. Rákhely, *et al.* (2010). "Specificity and selectivity of HypC chaperonins and endopeptidases in the molecular assembly machinery of [NiFe] hydrogenases of Thiocapsa roseopersicina." International Journal of Hydrogen Energy **35**(8): 3358-3370.
- Matthews, R. G., Ed. (1996). One-carbon metabolism. Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology Washington, DC, ASM Press.
- McGlynn, S. E., E. S. Boyd, *et al.* (2010). "Identification and characterization of a novel member of the radical AdoMet enzyme superfamily and implications for the biosynthesis of the Hmd hydrogenase active site cofactor." J Bacteriol **192**(2): 595-598.
- Mehta, N., S. Benoit, *et al.* (2003). "Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient Helicobacter pylori colonization." Microb Pathog **35**(5): 229-234.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.
- Mitra, S. and R. C. Holz (2007). "Unraveling the catalytic mechanism of nitrile hydratases." J Biol Chem **282**(10): 7397-7404.
- Miyanaga, A., S. Fushinobu, *et al.* (2004). "Mutational and structural analysis of cobalt-containing nitrile hydratase on substrate and metal binding." Eur J Biochem **271**(2): 429-438.
- Miyanaga, A., S. Fushinobu, *et al.* (2001). "Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase." Biochem Biophys Res Commun **288**(5): 1169-1174.
- Montet, Y., P. Amara, *et al.* (1997). "Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics." Nat Struct Biol **4**(7): 523-526.
- Moreland, A. C. and T. B. Rauchfuss (2000). "Binding of pi-acceptor ligands to (triamine)iron(II) complexes." Inorg Chem **39**(14): 3029-3036.
- Mulder, D. W., E. M. Shepard, *et al.* (2011). "Insights into [FeFe]-Hydrogenase Structure, Mechanism, and Maturation." Structure **19**(8): 1038-1052.

- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Nagasawa, T., K. Takeuchi, *et al.* (1991). "Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1." Eur J Biochem **196**(3): 581-589.
- Nagy, P. L., A. Marolewski, *et al.* (1995). "Formyltetrahydrofolate hydrolase, a regulatory enzyme that functions to balance pools of tetrahydrofolate and one-carbon tetrahydrofolate adducts in *Escherichia coli*." J Bacteriol **177**(5): 1292-1298.
- Nakamoto, K. (2008). Applications in Organometallic Chemistry. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, John Wiley & Sons, Inc.: 275-331.
- Niu, S., L. M. Thomson, *et al.* (1999). "Theoretical Characterization of the Reaction Intermediates in a Model of the Nickel-Iron Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*." Journal of the American Chemical Society **121**(16): 4000-4007.
- Ogata, H., S. Hirota, *et al.* (2005). "Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state." Structure **13**(11): 1635-1642.
- Ogata, H., P. Kellers, *et al.* (2010). "The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Allochromatium vinosum*: characterization of the oxidized enzyme (Ni-A state)." J Mol Biol **402**(2): 428-444.
- Ogata, H., W. Lubitz, *et al.* (2009). "[NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism." Dalton Trans(37): 7577-7587.
- Oleinik, N. V. and S. A. Krupenko (2003). "Ectopic expression of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase in A549 cells induces G1 cell cycle arrest and apoptosis." Mol Cancer Res **1**(8): 577-588.
- Olson, J. W. and R. J. Maier (2000). "Dual roles of *Bradyrhizobium japonicum* nickel protein in nickel storage and GTP-dependent Ni mobilization." J Bacteriol **182**(6): 1702-1705.
- Page, C. C., C. C. Moser, *et al.* (2003). "Mechanism for electron transfer within and between proteins." Curr Opin Chem Biol **7**(5): 551-556.
- Papadopoulos, J. S. and R. Agarwala (2007). "COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences." Bioinformatics **23**(9): 1073-1079.
- Paschos, A., A. Bauer, *et al.* (2002). "HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation." J Biol Chem **277**(51): 49945-49951.
- Paschos, A., R. S. Glass, *et al.* (2001). "Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases." FEBS Lett **488**(1-2): 9-12.
- Pawlowski, K., L. Jaroszewski, *et al.* (2000). "Sensitive sequence comparison as protein function predictor." Pac Symp Biocomput: 42-53.
- Pelzmann, A., M. Ferner, *et al.* (2009). "The CoxD protein of *Oligotropha carboxidovorans* is a predicted AAA+ ATPase chaperone involved in the biogenesis of the CO dehydrogenase [CuSMoO<sub>2</sub>] cluster." J Biol Chem **284**(14): 9578-9586.
- Petkun, S., R. Shi, *et al.* (2011). "Structure of Hydrogenase Maturation Protein HypF with Reaction Intermediates Shows Two Active Sites." Structure **19**(12): 1773-1783.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, *et al.* (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.

- Pierik, A. J., W. Roseboom, *et al.* (1999). "Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)<sub>2</sub>CO, Biology's way to activate H<sub>2</sub>." *J Biol Chem* **274**(6): 3331-3337.
- Pierik, A. J., M. Schmelz, *et al.* (1998). "Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*." *FEBS Lett* **438**(3): 231-235.
- Pilak, O., B. Mamat, *et al.* (2006). "The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase." *J Mol Biol* **358**(3): 798-809.
- Pinske, C., S. Kruger, *et al.* (2011). "Efficient electron transfer from hydrogen to benzyl viologen by the [NiFe]-hydrogenases of *Escherichia coli* is dependent on the coexpression of the iron-sulfur cluster-containing small subunit." *Arch Microbiol* **193**(12): 893-903.
- Pohlmann, A., W. F. Fricke, *et al.* (2006). "Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16." *Nat Biotechnol* **24**(10): 1257-1262.
- Prasad, S. and T. C. Bhalla (2010). "Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry." *Biotechnol Adv* **28**(6): 725-741.
- Py, B. and F. Barras (2010). "Building Fe-S proteins: bacterial strategies." *Nat Rev Micro* **8**(6): 436-446.
- Radius, U., F. M. Bickelhaupt, *et al.* (1998). "Is CO a Special Ligand in Organometallic Chemistry? Theoretical Investigation of AB, Fe(CO)<sub>4</sub>AB, and Fe(AB)<sub>5</sub> (AB = N<sub>2</sub>, CO, BF, SiO)." *Inorganic Chemistry* **37**(5): 1080-1090.
- Ragsdale, S. W. (2004). "Life with carbon monoxide." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**(3): 165-195.
- Rangarajan, E. S., A. Asinas, *et al.* (2008). "Structure of [NiFe] hydrogenase maturation protein HypE from *Escherichia coli* and its interaction with HypF." *J Bacteriol* **190**(4): 1447-1458.
- Rauchfuss, T. B., S. M. Contakes, *et al.* (2001). "The influence of cyanide on the carbonylation of iron(II): synthesis of Fe-Sr-Cn-Co centers related to the hydrogenase active sites." *J Am Chem Soc* **123**(28): 6933-6934.
- Raushel, F. M., J. B. Thoden, *et al.* (2003). "Enzymes with molecular tunnels." *Acc Chem Res* **36**(7): 539-548.
- Reimann, W. and O. Prokop, Eds. (1980). *Gerichtsmedizin. Vademecum*. Berlin, VEB Verlag Volk und Gesundheit.
- Reissmann, S., E. Hochleitner, *et al.* (2003). "Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands." *Science* **299**(5609): 1067-1070.
- Reuland, S. N., A. P. Vlasov, *et al.* (2006). "Modular organization of FDH: Exploring the basis of hydrolase catalysis." *Protein Sci* **15**(5): 1076-1084.
- Rey, L., D. Fernandez, *et al.* (1996). "The hydrogenase gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains an additional gene (*hypX*), which encodes a protein with sequence similarity to the N10-formyltetrahydrofolate-dependent enzyme family and is required for nickel-dependent hydrogenase processing and activity." *Mol Gen Genet* **252**(3): 237-248.
- Rina, M., C. Pozidis, *et al.* (2000). "Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5. Properties and psychrophilic adaptations." *Eur J Biochem* **267**(4): 1230-1238.

- Rodrigue, A., A. Chanal, *et al.* (1999). "Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway." J Biol Chem **274**(19): 13223-13228.
- Rosano, C., S. Zuccotti, *et al.* (2002). "Crystal structure and anion binding in the prokaryotic hydrogenase maturation factor HypF acylphosphatase-like domain." J Mol Biol **321**(5): 785-796.
- Roseboom, W., M. Blokesch, *et al.* (2005). "The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different." FEBS Lett **579**(2): 469-472.
- Rousset, M., Y. Montet, *et al.* (1998). "[3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11625-11630.
- Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.
- Sargent, F. (2007). "The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 835-847.
- Sawers, G. (1994). "The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*." Antonie Van Leeuwenhoek **66**(1-3): 57-88.
- Sawers, R. G. (2005). "Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*." Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 42-46.
- Schick, M., X. Xie, *et al.* (2012). "Biosynthesis of the iron-guanylylpyridinol cofactor of [Fe]-hydrogenase in methanogenic archaea as elucidated by stable-isotope labeling." J Am Chem Soc **134**(6): 3271-3280.
- Schink, B. and H. G. Schlegel (1979). "The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties." Biochim Biophys Acta **567**(2): 315-324.
- Schlegel, H. G., H. Kaltwasser, *et al.* (1961). "[A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies]." Arch Mikrobiol **38**: 209-222.
- Schmidt, T. G., J. Koepke, *et al.* (1996). "Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin." J Mol Biol **255**(5): 753-766.
- Schmitt, E., S. Blanquet, *et al.* (1996). "Structure of crystalline *Escherichia coli* methionyl-tRNA(f)Met formyltransferase: comparison with glycylamide ribonucleotide formyltransferase." EMBO J **15**(17): 4749-4758.
- Schneider, K. and H. G. Schlegel (1976). "Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16." Biochim Biophys Acta **452**(1): 66-80.
- Schönbein, C. F. (1839). "Beobachtungen über die elektrische Polarisation fester und flüssiger Leiter." Annalen der Physik **122**(1): 109-127.
- Schubel, U., M. Kraut, *et al.* (1995). "Molecular characterization of the gene cluster *coxMSL* encoding the molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*." J Bacteriol **177**(8): 2197-2203.
- Schubert, T., O. Lenz, *et al.* (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**(2): 453-467.

- Schulz, H. (1999). "Short history and present trends of Fischer–Tropsch synthesis." Applied Catalysis A: General **186**(1–2): 3-12.
- Schwartz, E., T. Buhrke, *et al.* (1999). "Positive transcriptional feedback controls hydrogenase expression in *Alcaligenes eutrophus* H16." J Bacteriol **181**(18): 5684-5692.
- Schwartz, E., A. Henne, *et al.* (2003). "Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H(2)-based lithoautotrophy and anaerobiosis." J Mol Biol **332**(2): 369-383.
- Schwarze, A., M. J. Kopczak, *et al.* (2010). "Requirements for construction of a functional hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase." Appl Environ Microbiol **76**(8): 2641-2651.
- Schwenk, E. (1998). Sternstunden der frühen Chemie von Johann Rudolph Glauber bis Justus von Liebig. München, Beck.
- Shepard, E. M., E. S. Boyd, *et al.* (2011). "Biosynthesis of complex iron-sulfur enzymes." Curr Opin Chem Biol **15**(2): 319-327.
- Shepard, E. M., B. R. Duffus, *et al.* (2010). "[FeFe]-hydrogenase maturation: HydG-catalyzed synthesis of carbon monoxide." J Am Chem Soc **132**(27): 9247-9249.
- Shepard, E. M., S. E. McGlynn, *et al.* (2010). "Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10448-10453.
- Shima, S., O. Pilak, *et al.* (2008). "The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site." Science **321**(5888): 572-575.
- Shomura, Y., H. Komori, *et al.* (2007). "Crystal structures of hydrogenase maturation protein HypE in the Apo and ATP-bound forms." J Mol Biol **372**(4): 1045-1054.
- Shomura, Y., K. S. Yoon, *et al.* (2011). "Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase." Nature **479**(7372): 253-256.
- Siegbahn, P. E., J. W. Tye, *et al.* (2007). "Computational studies of [NiFe] and [FeFe] hydrogenases." Chem Rev **107**(10): 4414-4435.
- Sigrist, C. J., L. Cerutti, *et al.* (2010). "PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D161-166.
- Sigrist, C. J., L. Cerutti, *et al.* (2002). "PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors." Brief Bioinform **3**(3): 265-274.
- Simon, R., U. Priefer, *et al.* (1983). "A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria." Nat Biotech **1**(9): 784-791.
- Sleep, N. H., A. Meibom, *et al.* (2004). "H<sub>2</sub>-rich fluids from serpentinization: geochemical and biotic implications." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 12818-12823.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, *et al.* (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Soboh, B., S. Krüger, *et al.* (2010). "Development of a cell-free system reveals an oxygen-labile step in the maturation of [NiFe]-hydrogenase 2 of *Escherichia coli*." FEBS Lett **584**(18): 4109-4114.

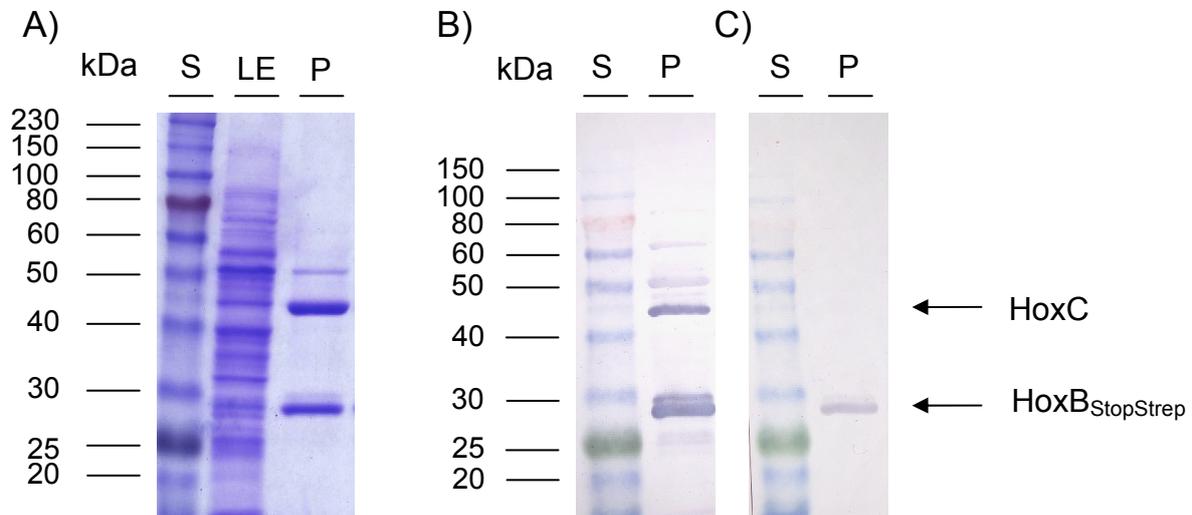
- Soboh, B., D. Linder, *et al.* (2004). "A multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase and an NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*." Microbiology **150**(Pt 7): 2451-2463.
- Soding, J. (2005). "Protein homology detection by HMM-HMM comparison." Bioinformatics **21**(7): 951-960.
- Soding, J., A. Biegert, *et al.* (2005). "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W244-248.
- Srivastava, S., M. Urban, *et al.* (1982). "Mutagenesis of *Alcaligenes eutrophus* by insertion of the drug-resistance transposon Tn5." Arch Microbiol **131**(3): 203-207.
- Stephenson, M. and L. H. Stickland (1931). "Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme." Biochem J **25**(1): 205-214.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- Tabor, S. and C. C. Richardson (1985). "A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(4): 1074-1078.
- Tamagnini, P., E. Leitao, *et al.* (2007). "Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications." FEMS Microbiol Rev **31**(6): 692-720.
- Tenhunen, R., H. S. Marver, *et al.* (1969). "Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme." J Biol Chem **244**(23): 6388-6394.
- Thauer, R. K. (1998). "Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture." Microbiology **144** ( Pt 9): 2377-2406.
- Thauer, R. K., A. R. Klein, *et al.* (1996). "Reactions with Molecular Hydrogen in Microorganisms: Evidence for a Purely Organic Hydrogenation Catalyst." Chem Rev **96**(7): 3031-3042.
- Thiemermann, S., J. Dervede, *et al.* (1996). "Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* requires the *hoxW* gene product." J Bacteriol **178**(8): 2368-2374.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, *et al.* (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): 4673-4680.
- Tian, F., O. B. Toon, *et al.* (2005). "A hydrogen-rich early Earth atmosphere." Science **308**(5724): 1014-1017.
- Todd, A. E., C. A. Orengo, *et al.* (2001). "Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective." J Mol Biol **307**(4): 1113-1143.
- Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Uhm, S., H. J. Lee, *et al.* (2009). "Understanding underlying processes in formic acid fuel cells." Phys Chem Chem Phys **11**(41): 9326-9336.
- Valente, F. M., A. S. Oliveira, *et al.* (2005). "Hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase." J Biol Inorg Chem **10**(6): 667-682.

- Van der Linden, E., T. Burgdorf, *et al.* (2004). "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**(5): 616-626.
- Van Soom, C., C. Verreth, *et al.* (1993). "Identification of a potential transcriptional regulator of hydrogenase activity in free-living *Bradyrhizobium japonicum* strains." Mol Gen Genet **239**(1-2): 235-240.
- Vignais, P. M. and B. Billoud (2007). "Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview." Chem Rev **107**(10): 4206-4272.
- Vignais, P. M., B. Billoud, *et al.* (2001). "Classification and phylogeny of hydrogenases." FEMS Microbiol Rev **25**(4): 455-501.
- Vincent, K. A., J. A. Cracknell, *et al.* (2005). "Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(47): 16951-16954.
- Vincent, K. A., A. Parkin, *et al.* (2007). "Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases." Chem Rev **107**(10): 4366-4413.
- Vincent, K. A., A. Parkin, *et al.* (2005). "Electrochemical definitions of O<sub>2</sub> sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases." J Am Chem Soc **127**(51): 18179-18189.
- Vogt, S., E. J. Lyon, *et al.* (2008). "The exchange activities of [Fe] hydrogenase (iron-sulfur-cluster-free hydrogenase) from methanogenic archaea in comparison with the exchange activities of [FeFe] and [NiFe] hydrogenases." J Biol Inorg Chem **13**(1): 97-106.
- Volbeda, A., M. H. Charon, *et al.* (1995). "Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*." Nature **373**(6515): 580-587.
- Volbeda, A. and J. C. Fontecilla-Camps (2003). "The active site and catalytic mechanism of NiFe hydrogenases." Dalton Transactions(21): 4030-4038.
- Volbeda, A., E. Garcin, *et al.* (1996). "Structure of [NiFe] Hydrogenases Active Site: Evidence for Biologically Uncommon Fe Ligands." J Am Chem Soc **118**(51): 12989-12996.
- Volbeda, A., L. Martin, *et al.* (2005). "Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases." J Biol Inorg Chem **10**(3): 239-249.
- Voncken, F. G., B. Boxma, *et al.* (2002). "A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. L2." Gene **284**(1-2): 103-112.
- Voss, S. and A. Skerra (1997). "Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification." Protein Eng **10**(8): 975-982.
- Wang, C., O. Schueler-Furman, *et al.* (2005). "Improved side-chain modeling for protein-protein docking." Protein Sci **14**(5): 1328-1339.
- Watanabe, S., T. Arai, *et al.* (2009). "Crystal structure of HypA, a nickel-binding metallochaperone for [NiFe] hydrogenase maturation." J Mol Biol **394**(3): 448-459.
- Watanabe, S., R. Matsumi, *et al.* (2007). "Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: insights into cyanation reaction by thiol redox signaling." Mol Cell **27**(1): 29-40.
- Waugh, R. and D. H. Boxer (1986). "Pleiotropic hydrogenase mutants of *Escherichia coli* K12: growth in the presence of nickel can restore hydrogenase activity." Biochimie **68**(1): 157-166.

- Wilde, E. (1962). "Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*." Archives of Microbiology **43**(2): 109-137.
- Wilson, C. M. (1983). "Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures." Methods Enzymol **91**: 236-247.
- Witholt, B., M. Boekhout, *et al.* (1976). "An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*." Anal Biochem **74**(1): 160-170.
- Wolf, I., T. Buhrke, *et al.* (1998). "Duplication of hyp genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16." Arch Microbiol **170**(6): 451-459.
- Wong, K. L. T. and H. H. Brintzinger (1975). "Reactivity patterns of chromocene, molybdenocene, and tungstenocene reaction systems. I. Carbonyl complex formation as a probe of coordinative unsaturation." Journal of the American Chemical Society **97**(18): 5143-5146.
- Wu, L. F. and M. A. Mandrand (1993). "Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny." FEMS Microbiol Rev **10**(3-4): 243-269.
- Yamanaka, Y., K. Hashimoto, *et al.* (2010). "Kinetic and structural studies on roles of the serine ligand and a strictly conserved tyrosine residue in nitrile hydratase." J Biol Inorg Chem **15**(5): 655-665.
- Yang, C. C., J. Ger, *et al.* (2008). "Formic acid: a rare but deadly source of carbon monoxide poisoning." Clin Toxicol (Phila) **46**(4): 287-289.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, *et al.* (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-119.
- Zhang, J. W., G. Butland, *et al.* (2005). "A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway." J Biol Chem **280**(6): 4360-4366.
- Zheng, L., R. H. White, *et al.* (1994). "Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product." Biochemistry **33**(15): 4714-4720.
- Zirngibl, C., W. Van Dongen, *et al.* (1992). "H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea." Eur J Biochem **208**(2): 511-520.

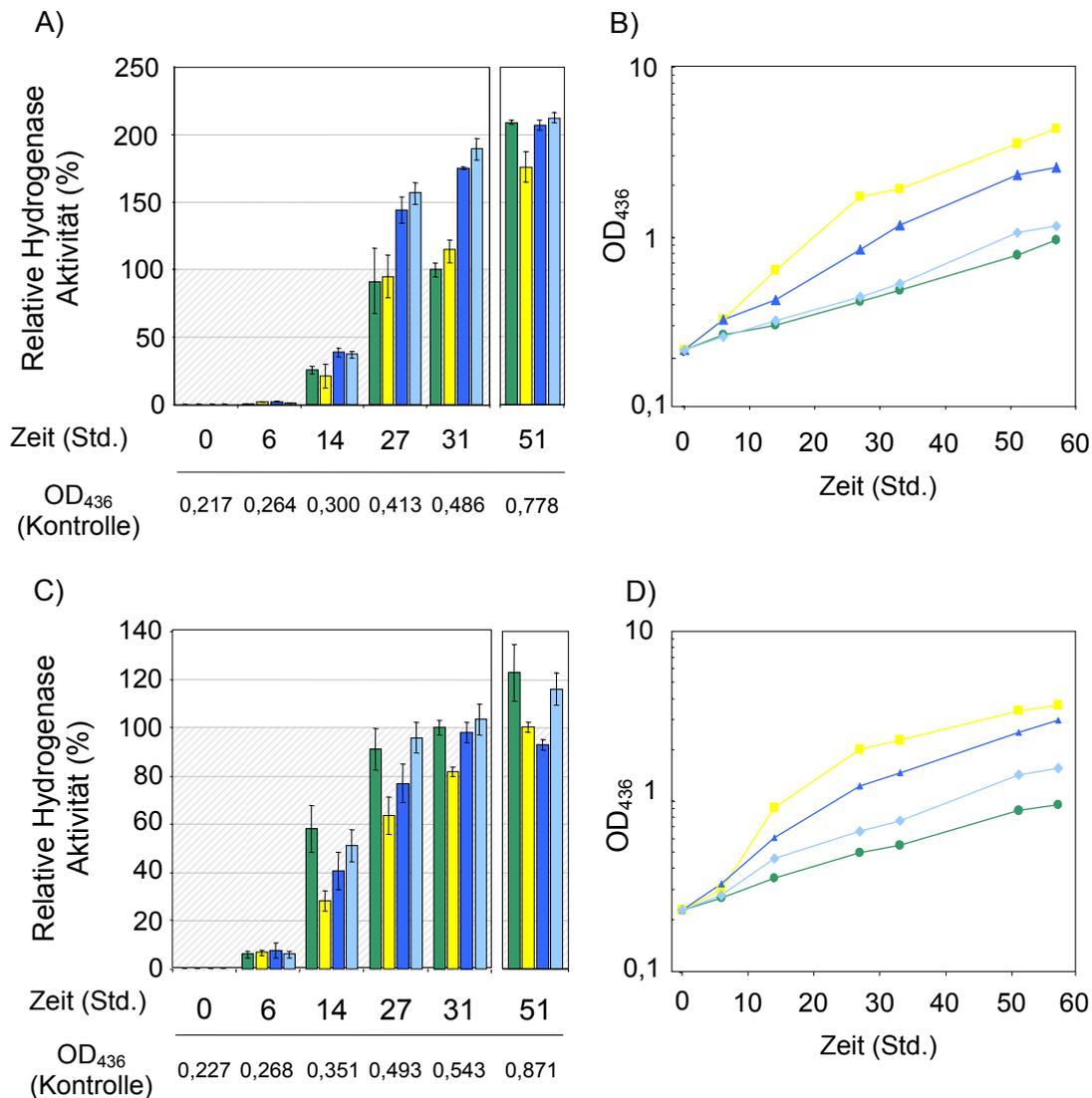
## 6 Anhang

### 6.1 Typische Reinigung der $RH_{\text{StopStrep}}$



**Abbildung 6-1: Eine typische Reinigung der  $RH_{\text{StopStrep}}$ .** Nach Aufschluss von 3-5 g Zellen wurde der Zellextrakt, wie in Kapitel 2.3.3, beschrieben über *Strep-Tactin Spin Columns*<sup>®</sup> gereinigt. A) Die gepoolten Elutionsfraktionen und der Lösliche Extrakt wurden durch eine denaturierende 12 %-ige SDS-PAGE getrennt und anschließend über eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Es wurden jeweils 5  $\mu\text{g}$  der gepoolten Elutionsfraktionen bzw. 1  $\mu\text{l}$  löslicher Extrakt aufgetragen. B-C) Je 5  $\mu\text{g}$  des vereinigten Eluates wurden über 12 %-ige SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurden die große Untereinheit (HoxC) und die „getagte“ kleine Untereinheit ( $HoxB_{\text{StopStrep}}$ ) der RH durch eine Antikörperfärbung mit  $\alpha$ -RH Antikörper (B) bzw.  $\alpha$ -Strep Antikörper (C) verifiziert. S, Proteinstandard; LE, Löslicher Extrakt; P, vereinigte Elutionsfraktionen.

## 6.2 Einfluss verschiedener Aminosäuren auf die HypX-abhängige Hydrogenasematuration



**Abbildung 6-2: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von Zugabe von verschiedenen Aminosäuren.** Aktivität der NAD<sup>+</sup>-reduzierenden Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 (A) und HF469 (C) unter heterotrophen Bedingungen. Heterotrophes Wachstum von H16 (B) und HF469 (D) in GN-Medium. Es wurde je 5 mM Alanin (gelb), Serin (dunkelblau) und Glycin (hellblau) zugegeben. Die Kontrollgruppe (grün) enthielt keine zusätzlichen Aminosäuren. Die relative Hydrogenaseaktivität wurde auf die maximale Aktivität der Kontrolle bei 31 Stunden normiert, bevor sich die Wirkung von HypX egalisiert hat (51 Std.). Die volle Aktivität (100 %) von H16 (bei 31 Std.) liegt bei  $1,69 \pm 0,04$  U/mg; die volle SH-Aktivität von HF469 (bei 31 Std.) hingegen liegt bei  $0,47 \pm 0,03$ .

### 6.3 Strukturelles „Alignment“ der N-terminalen Domäne aus HypX

HypX	1	MRILL	LTHSFNSLTQ	RLFVELRQRG	HLVSVEFDIA	-----	-----
2CFIA	1	fqs--mkiav	igqs--lfgq	evychlrkeg	hevvgvftvp	dkdggkadplg	leaekdgvpv
HypX		sssss s	hhh	hhhhhhh	sss		
2CFIA		sssss ss	hhhh	hhhhhhh	sssssss	hhh	hhhhh ss
HypX	36	-----	--DSVTEEAV	ALFAPDLVIA	PFLKRAIPER	IWSRL--VCL	VVHPG-IVGD
2CFIA	54	fkysrwrakg	galpdvvaky	qalgaelnvl	pfcsqfipme	iisaprghsi	iyhpsllprh
HypX			hhhh hh	ssss	hh hhh	ss sssss	
2CFIA		sss	hhhhh hh	ssss	hh hhh	sss sssss	
HypX	81	RGPSALDWAI	VRDERSWGVT	VLQANGEMDA	GPVWASATFP	MRAARKSSLY	RNEV-TVAAV
2CFIA	114	rgasainwtl	ihgdckggfs	ifwaddgldt	gdlllqkece	vlpddtvstl	ynrflfpegi
HypX		hhhhh h	sssss ssss	sssssssss s	hhhh hh	hhh	
2CFIA		hhhhh h	sssss ssss	sssssssss s	hhhh hh	hhhhh	
HypX	140	QAVLEALAAF	EAGWRSANDA	QSGPGTWNPA	MRQAERGIDW	ARESTAAVLA	KLHAADSFPG
2CFIA	184	kgmvqavrli	aegkaprlpq	peegatyegi	qkktakinw	dq-paeaihn	wirgndkvpg
HypX		hhhhhhhhh hh		hh	hhhhh hhh		
2CFIA		hhhhhhhhh hh		hh	hhhhh hhh		
HypX	200	VPDALFGQPC	RLFDAHAATP	QTVA-----	RAPRGQPGDI	VARREHAVLR	LTVDAGVWIG
2CFIA	234	awteaceqkl	tffnstlnts	glvpegdalp	ipgahrpgvv	t--kagllif	gnddkmllvk
HypX		sssss sss ssssss		hh	ss s	sssss s	sssss
2CFIA		sssss sss ssssss		sss	sss s	sssss s	sssss
HypX	254	HAKLAVRDEW	E-----				
2CFIA	291	niqledgkmi	lasnffk				
HypX		ssss sss s					
2CFIA		ssss sss ss					

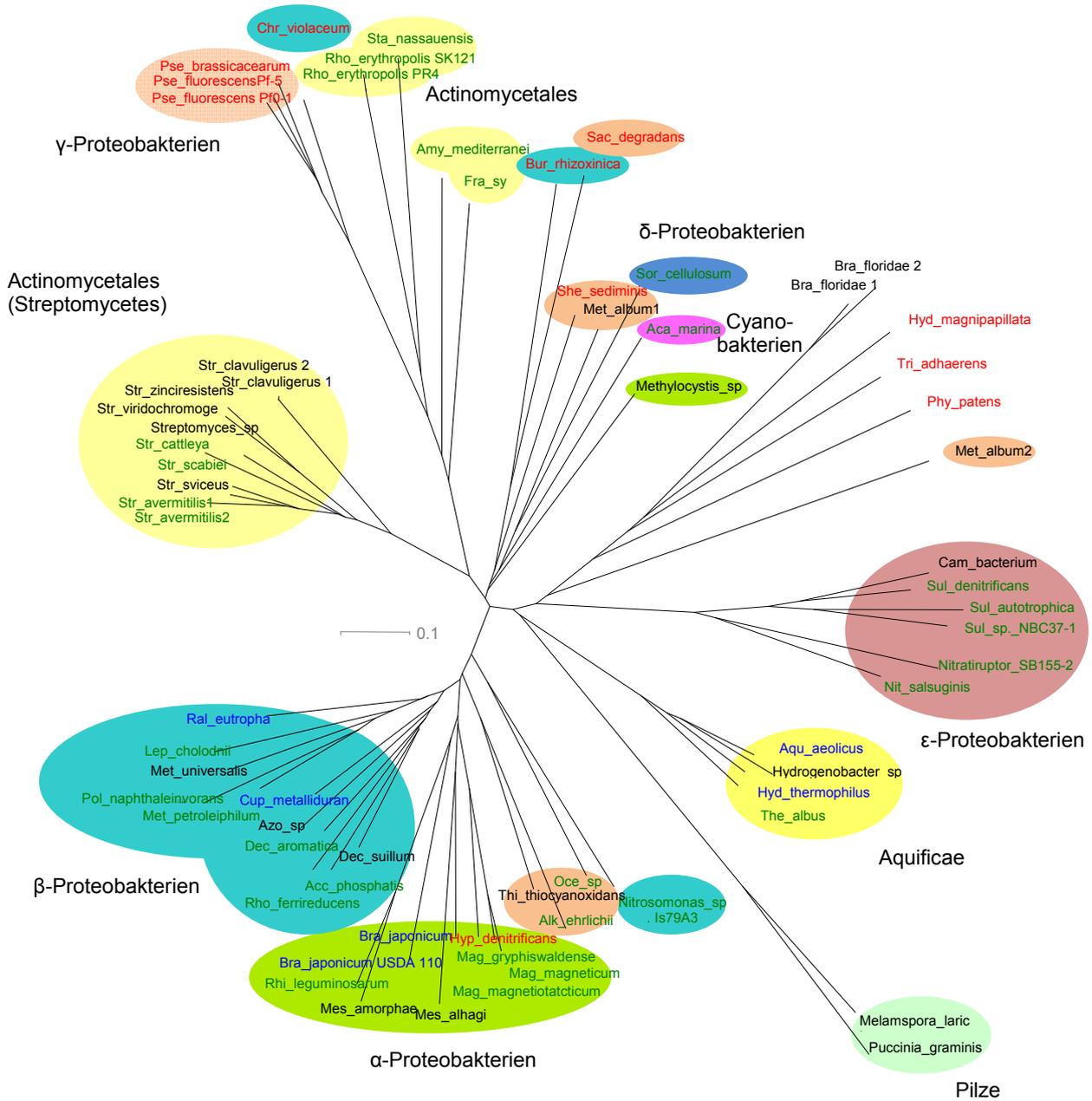
**Abbildung 6-3: Strukturelles „Alignment“ der N-terminalen Domäne aus HypX.** Aminosäuren die an der Ausbildung eines sekundären Strukturmerkmals beteiligt sind, sind mit einem „h“ bei einer Helix oder einem „s“ für eine Faltblattstruktur gekennzeichnet. Rote Lettern kennzeichnen die katalytisch aktiven Aminosäuren. Die blauen Lettern der HypX-Sequenz entsprechen dem unstrukturierten Abschnitt zwischen AS 151-183 (Abbildung 3-40 A; blauer Abschnitt). Die rot bzw. blau unterlegten Abschnitte der Referenzsequenz entsprechen den Abweichungen zwischen beiden Strukturen (Abbildung 3-40 B; blaue und rote Abschnitte).

## 6.4 Strukturelles „Alignment“ der C-terminalen Domäne aus HypX

HypX	296		DAGEWSEFR	YWEDDSGAGL	VGYLAFDCY-	-NGMSTAQC	QRLCAALRY-				
3G64A	2	xspftgsaa-	-ptpewrhlr	veit----dg	vatvtlarpd	klnaltfeay	adlrddlael				
HypX				s ssssss sss	ssssss		hhh hhhhhhhh				
3G64A				s ssss	ssssss		hhh hhhhhhhh				
								#			
HypX	343	ARGRQTRVLV	LLGGE	FFSN	GIH	HQIEAA	EHRGAESAAD	ASWRNIQAMD	DVA	EILAFS	
3G64A	55	srrravralv	lagegrgfc	ggdvdeiiga	tlxdt---a	rlldfnrxtg	qvvravre-c				
HypX			sss ss	ss s	hhhhhhh h		hhhhhhhhh	hhhhhhh			
3G64A		hhh	sss ss	ss s	hhhhhhh h	h	h	hhhhhhhhh	hhhhhhh		
										#	
HypX	402	DRMTVSALRG	NAGAG	GVFLA	LAADQV	WARE	GVLVN	PHYKN	MCNLYGSEYW	TYLLP	RVGA
3G64A	112	pfpviaalhg	vaagagavla	laadfrvadp	strfalftr	vglsggdxga	ayllprvvgl				
HypX			sssss s	ssshhhhhh	hh	sssss	sss	hh		h	hhhhh h
3G64A			sssss s	ssshhhhhh	hh	sssss	sss	hh		h	hhhhh h
											©
HypX	462	QRASDLMDGR	L	PMSVRAIE	I	GLID	ASLDG	DARSCLAEIG	RRAVALARA	P	DYAAHIDNKR
3G64A	171	ghatrllxl	g	dtvrapeaer	igliselte-	-egradeaar	tlarrladgp	alahaqtkal			
HypX		hhhhhhhhh		hhhhh h	sss		hhhhh	hhhhh		hhhhhhhhh	
3G64A		hhhhhhhhh		ssshhhh h	sss		hhhhh	hhhhh		hhhhhhhhh	
HypX	522	RKRAADEAAK	PLAQYREEEL	VHMRNFYGF	DPSYHVARYH	FVYKLP	PHAHT	PR			
3G64A	231	ltaeld---x	plaaavelda	stqallxtge	--dyaefhaa	ftekprpkwq	gr-				
HypX		hhhhh		hhhhhhhhh	hhhhh		hhhhhhhhh	hhh			
3G64A		hhh		hhhhhhhhh	hhhhh		hhhhhhhhh	hhh			

**Abbildung 6-4: Strukturelles „Alignment“ der C-terminalen Domäne aus HypX.** Aminosäuren die an der Ausbildung eines sekundären Strukturmerkmals beteiligt sind, sind mit einem „h“ bei einer Helix oder einem „s“ für eine Faltblattstruktur gekennzeichnet. Die AS, die zur Substratbindestelle gehören, sind grün unterlegt. Die AS des Trimerisierungsinterface sind blau unterlegt. Eine AS (Met442), ist dabei Bestandteil beider Signaturen, diese AS ist gelb hervorgehoben. Die Rauten (#) oberhalb der Sequenz von HypX markieren die AS, die an Bildung des *Oxyanionischen Lochs* beteiligt sind. Das ©-Symbol markiert hochkonservierte AS, welche putative aktive AS sind.

## 6.5 Phylogenetische Verteilung von HypX-Homologen



**Abbildung 6-5: Phylogenetische Verteilung von HypX/HoxX-Homologen.** „Knallgasbakterien“ sind blau dargestellt (soweit bekannt). Spezies die mit Grün hervorgehoben wurden besitzen auch andere hydrogenase-assoziierte Gene. Organismen die in Rot dargestellt wurden besitzen keine Hydrogenasen (sofern bekannt). Für die in schwarz geschriebenen Organismen liegt kein vollständiges Genom vor. Die farbigen Sphären indizieren den entsprechenden Stamm, Klasse, bzw. Ordnung. Der Grenzwert für eine Berücksichtigung beim Sequenzvergleich wurde auf einen *E-Value* von  $2 \cdot e^{-88}$  festgesetzt. Folgende Organismen mit HypX/HoxX-Homologen wurden beim zugrundeliegenden Multi-Sequenzvergleich berücksichtigt: *Acaryochloris marina* MBIC11017, YP\_001520946.1; *Accumulibacter phosphatis* clade IIA str. UW-1, YP\_003166011.1; *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1, YP\_742845.1; *Amycolatopsis mediterranei* U32, YP\_003766118.1; *Aquifex aeolicus* VF5, NP\_213788.1; *Azoarcus* sp. KH32C, BAL26072.1; *Bradyrhizobium japonicum*, CAA78990.1; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 BAC52191, *Branchiostoma floridae*, XP\_002592743.1; *Burkholderia rhizoxinica* HKI 454, YP\_004022592.1; *Campylobacteriales bacterium* GD 1, ZP\_05072344.1; *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, NP\_903812.1; *Cupriavidus metallidurans* CH34, YP\_583693.1; *Dechloromonas aromatica* RCB, YP\_287160.1; *Dechlorosoma suillum* PS, EGW59710.1; *Frankia symbiont*, YP\_004583817.1; *Hydra magnipapillata*, XP\_002169603.1; *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-1, ZP\_02178182.1; *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, YP\_003433460.1; *Hyphomicrobium denitrificans* INES1, EHB75344.1; *Leptothrix cholodnii* SP-6, YP\_001791480.1; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, CAM75713.1; *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, YP\_420998.1; *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1, ZP\_00055441.1; NP\_773566.1; *Melampsora larici-populina* 98AG31, EGG05706.1; *Mesorhizobium alhagi* CCNWJ12-2, EHK54675.1; *Mesorhizobium amorphae* CCNWGS0123, ZP\_09092245.1; *Methylibium petroleiphilum* PM1, YP\_001021998.1; *Methylocystis* sp. ATCC 49242, ZP\_08070739.1; *Methylomicrobium album* BG8 (1), ZP\_08483504.1; *Methylomicrobium album* BG8 (2), ZP\_08483816.1; *Methyloversatilis universalis* FAM5, ZP\_08506124.1; *Nitratifactor salsuginis* DSM 16511; YP\_004167111.1; *Nitratiruptor* sp. SB155-2, YP\_001356445.1; *Nitrosomonas* sp. Is79A3, YP\_004696319.1; *Oceanospirillum* sp. MED92, ZP\_01166042.1; *Physcomitrella patens* subsp. *patens*, XP\_001780677.1; *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, YP\_982187.1; *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421, YP\_004353165.1; *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, YP\_260772.1; *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, YP\_348856.1; *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* CRL 75-36-700-3, XP\_003336072.1; *Ralstonia eutropha* H16, NP\_942660.1; *Rhizobium leguminosarum*, CAA85446.1; *Rhodococcus erythropolis* PR4, YP\_002766527.1; *Rhodococcus erythropolis* SK121, ZP\_04387290.1; *Rhodoferax ferrireducens* T118, YP\_525330.1; *Saccharophagus degradans* 2-40, YP\_526001.1; *Shewanella sediminis* HAW-EB3, YP\_001475080.1; *Sorangium cellulosum* 'So ce 56', YP\_001617020.1; *Stackebrandtia nassauensis* DSM 44728, YP\_003513239.1; *Streptomyces avermitilis* MA-4680, BAC75076.2; *Streptomyces avermitilis* MA-4680, NP\_828541.1; *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, YP\_004919797.1; *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (1), ZP\_08219443.1; *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (2), ZP\_06775022.1; *Streptomyces scabiei* 87.22, YP\_003494152.1; *Streptomyces* sp. Mg1, ZP\_05001454.1; *Streptomyces svicensis* ATCC 29083, ZP\_06915368.1; *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736, ZP\_07301684.1; *Streptomyces zinciresistens* K42, ZP\_08806232.1; *Sulfurimonas autotrophica* DSM 16294, YP\_003892361.1; *Sulfurimonas denitrificans* DSM 1251, YP\_393937.1; *Sulfurovum* sp. NBC37-1, YP\_001358952.1; *Thermocrinis albus* DSM 14484, YP\_003473804.1; *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh 4, ZP\_08930120.1; *Trichoplax adhaerens*, XP\_002112030.1. Die Aminosäuresequenzen stammen aus der NCBI-Proteindatenbank. Der zugrundeliegende Multi-Sequenzvergleich sowie die phylogenetische Analyse wurden mit COBALT @ NCBI durchgeführt. Die AS-basierten phylogenetischen Abstände wurden gemäß Grishin berechnet (Grishin 1995) der phylogenetische Stammbaum wurde mit Hilfe von DENDROSCOPE erstellt (Huson, Richter *et al.* 2007). Der Maßstabsbalken stellt die evolutionäre Distanz in 0,1 Substitutionen pro Position, berechnet anhand der Anzahl und Wahrscheinlichkeit von Aminosäuresubstitutionen an der jeweiligen Stelle, dar.





	N	F	A	SQ	H	H						
	A	A	E	GD	F	F						
	E	©	©	©	©	©						
R. eutropha H16	#	G I H L H Q I E A A	E H R G A E S A A D	A S W R N I Q A M D	D V A L E I L A F S	D R M T V S A L R G	N A G A G V F L A	J A A Q V M W A R E	G V L V N P H Y K N	M G N L Y G S E Y W	T Y L L P Q R V G A	461
C. metallidurans CH34		G I H L N L I E A A	D - - - - S A A D	E S W R N I N A I D	D V A R A V I E T G	G O L T V A A L F G	N A G A G A F L A	J A A E V M W A R E	A A I L N P H Y K N	M G N L Y G S E Y W	T Y L L P R R V G M	447
R. leguminosarum bv. viciae UPM791		G I H L G I E S A	D - - - - S A A D	E S W R N I N A M N	E L V R I I A I T D	D R I V F A A L I G	N A G A G V F L S	J A A E V M W R E	G V I L N P H Y K D	M G N L Y G S E Y W	T Y L L P A R V G E	430
B. japonicum USDA 110		G I H L A E I E A	D - - - - S A A D	E S W R N I N A I D	D L A R A I I E T T	D R I V V S I R I G	N A G A G V F L S	J A A E V M W A S D	Q I I L N P H Y K D	M G N L Y G S E Y W	T Y L L P R R A G A	434
M. gryphiswaldense MSR-1		G I H L S T I E A A	L - - - - S P A D	E S W R N I N A M N	D L C A Q I A I T C P	S H L T V A A L H G	N A G A G V F M A	J A A M V L A S R	G I I L N P H Y K G	M G N L Y G S E Y W	T Y L L P K R C G A	418
M. magneticum AMB-1		G I H L C T I E S A	A - - - - S P A E	E S W A N I N A M N	D L T R E I I T C G	S H L T V A A M O G	N A G A G V F M A	J A A J I V A A R E	A V V L N P H Y K G	M G N L Y G S E Y W	T Y L L P R R C G P	425
H. thermophilus TK-6		G M N L T N T I E N A	E - - - - S P P D	E S W R N I N A M D	H V C E E I L R T E	D K L T V A G M O G	N A G A G V F L A	I T C F V F T R E	G V V L N P H Y K N	I G N L Y G S E F W	T Y T L P K R V G M	438
A. aeolicus VF5		G M N L T N T I E N A	E - - - - S P P D	E S W R N I N A I D	D C E E I L R T P	D K L T V A G M O G	N A G A G V F L A	I T C J L I F E A R	G V V L N P H Y K N	I G N L Y G S E F W	T Y T L P K R V G M	438
Hydrogenivirga sp. 128-5-R1-1		G M N L T N T I E N A	E - - - - S P P D	E S W R N I N A M D	D C E E I L R T P	D K L T V A G M O G	N A G A G V F L A	I T C J L I F E A R	G V V L N P H Y K N	I G N L Y G S E F W	T Y T L P K R V G M	439
S. degradans 2-40		G I H L N C I E A S	K - - - - D P A L	E S W L N I N A I D	D V K B E I I D T P	N Q V T V A A L F N	N A G A G A Y M A	J A C E V I R E	G V V L N P H Y K N	M G - L Y G S E Y W	T Y L M P R R L G L	444
Campylobacteriales bact. GD-1		G I H L N I L E D S	K - - - - K Q G E	D G W S N I N A M N	D V V K S I I F S D	E I I T V S S L H K	N A G A G V F L A	J A C J V V A S E	S T V I N P H Y K T	I G - L S G S E Y H	T Y S L P K R V G E	434
Sulfurovum sp. NBC37-1		G I H L N I L E D S	R - - - - K Q G E	D G W A N I N A M N	D L V S S I L Y A D	E V M T V A S F A R	N A G A G V F M G	J A C J V V V A K E	R V F N P H Y K T	I G - L S G S E Y H	T Y T L P G R V G K	432
Nitratiruptor sp. SB155-2		G I H L T I L E D S	K - - - - K Q G E	D G W S N I N A M N	N L I K I L F S D	D I L L T A F A	N A G A G V F L G	J A G E V F A K R	G I V L N P H Y R T	I G - L S G S E Y H	T Y T L P R R V G K	443
S. avermitilis MA-4680		G I H L N V I E A A	D - - - - D P G A	E S W A N I N A I D	D L V E A V L T T T	D R I V V S A V A G	N A A A G V M L A	J A A E V M W C R A	G A V L N P H Y R L	M G - L Y G S E Y W	T Y T L P P A R V G E	468
R. erythropolis PR4		G I H L N V I E A A	S - - - - D Q A G	E W A N I K A I N	E I A K A I V T C T	E Q V V A A F T G	N A G A G V M L P	J A C A V V V A R D	G V V L N P H Y A T	M G - L F G S E L H	T Y T L P A R V G E	433
S. nassauensis DSM 44728		G I H L N V I A A A	P - - - - D P A L	E A W E N I N A I N	A L C K A L V S C T	D K L T J A G F A	N A G A G V M F G	I S J V V V V R D	G V V L N P Y D -	M G - L Y G S E L H	T Y T L P R R V G H	443
P. fluorescens Pf-5		G V H L N V I Q A A	E - - - - V P G L	E A W A N I Q A I D	D V C L E L L T A R	- Q I V V S G L I T G	N A G A G L M L A	J A A J V V L A R A	D T V Y N P H Y K S	M G - L Y G S E Y W	T Y S L P R A V G Q	449
C. violaceum ATCC 12472		G I H L N V I Q A A	D - - - - H P G E	E A W R N I Q A I D	D V C L E I L T A P	- Q I L T V A G V A G	N A G A G V M L A	J A A J V A L A R Q	G V V I N P H Y Q T	M G - L Y G S E Y W	T Y T L P R A V G Q	449
		*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*
		*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*
R. eutropha H16		Q R A S D L M D G R	L P M S V R R A I E	I G L I D A S L D G	D A R S C L A E I G	R R A V A L A R A P	D Y A A H I D N K R	R K R A A D E A A K	P L A Q Y R E E E L	V H M H R N F Y G F	D P S Y H V A R Y H	561
C. metallidurans CH34		A R A R A I M Q N R	L P I G A A E A A R	E G V W D A C L S G	D V A A F T V Q V V	A R A B A L A A A V	D L A Q R L E B K R	A R R V R D E A V K	P L A A Y R D E E L	E H M R R N F Y G F	D P S Y H V A R Y H	547
R. leguminosarum bv. viciae UPM791		D R A R R V M Q A R	L P M G I D E A L E	F G L A T R R L P G	N I D A A B Q V L H	R A V A E L A A A P	E L A G R I A A A Q	A R R G R D E A E K	P L A A Y R E E E L	R M R R N F Y G F	D P S Y H V A R Y N	530
B. japonicum USDA 110		A N A T R I T Q C R	L P M G V A E A R R	L A I V D R V L S G	- E A L A D A S I V	Q S G A M A S D A	G F A A R L A A K Q	Q R R A A D E A E K	P L Q S Y R D E E L	R R M K L N F Y G F	D P S Y H V A R Y N	533
M. gryphiswaldense MSR-1		Q K A E Q V V Q A R	L P M G T A Q A I D	L G L I D G F P G	T P Q E F F R A Q V M	A Q A E N L A A A I	D L D A K L A A K R	L V R M D E A E A K	P L A A Y R A E E L	E R M K L N F Y G F	D P S Y H V A R W N	518
M. magneticum AMB-1		D K A R Q V V E A R	L P M G T A E A E R	L G L I D C R F G R	D V P E F R R I V E	E M A E A L T T D P	A L D E R L A A K R	L S R A A D E A A K	P L E Q Y P A E E L	E H M K L N F Y G F	D P S Y H V A R Y N	525
H. thermophilus TK-6		E K G R E I M E N R	M P T S S L K A Y Q	I G L I D G V F G K	T P E E F R D K L R	R W L V D F L N S L	G Y E E F I K R K R	E E R R K D E L E K	P L S A Y R E E E L	E R M K L N F Y G F	D T S Y H I A R Y Y	538
A. aeolicus VF5		E K G E V M E N R	M P I S S K K A F E	I G L I D G V F G K	T P K E F R Q R L K	E R I K N F I N S K	D F Y E F I E K A K	K B T S G E W L E	E I Q K C R E H E L	E K M K L N F Y G F	D T S Y H I A R Y Y	538
Hydrogenivirga sp. 128-5-R1-1		E R G R E V M E R R	M P I S S E A K R	I G L I E G V F G R	T P S E F R R E L K	R R V E E F V R S R	D F W K F I E K R K	R E R T S P E W L E	L I E R C K E E L	E H M K L N F Y G F	D T S Y H I A R Y Y	539
S. degradans 2-40		A L T S R I V E K C	Q P M L A H E A M D	V G F A D V M F E E	D W Q S E H V Q L M	N Y C H Q L P S R L	D L T E F F L R Y K A	Q Q R A S D E Q E K	P L E Q Y R R E E L	I E M K E I F D D P	D A F Y H Q A R R E	544
Campylobacteriales bact. GD-1		E K A N E L L E K C	L P I S A N K A K D	I K W I D E V F A K	-- E N Y F D D L R	K F A A S L L E N E	D S Y D D F I Y E K	Q D Y L E D N K E Y	- I N K C K E Q E L	K V M H P E F W D E	A S E F H A L R H E	531
Sulfurovum sp. NBC37-1		A M A E K L L D E C	L P Y S A Q R A E E	L G M L D K V F A H	-- E N Y Y E E L Y	T F A L S C Y D --	-- D D F L M G K	Q E Y L E A N R E R	- I E A L K E K E L	A V M H P E F W D E	E S P F H L L R R E	524
Nitratiruptor sp. SB155-2		E T A Q K L L D E A	L P L N A Q E A K S	I G L I D E V F K -	--- D F Q E V E	S Y A I Q L A Q D E	E R Y F Y K L L D Q K	R D R L E Q D E E Y	- I Q E C V E N E L	E K M Y Q F W D P	K S D E H K I R H N	537
S. avermitilis MA-4680		A A A E R L M E R A	L P Y S A A S A R R	T G L V D R V M E C	G P Q E F A A E V G	R L A A R L A A L P	G T A S R I T A K R	R E L D R Q S V I	P P A A F R E Q E L	A R M R T F L D P	D A P Y H A L R R A	568
R. erythropolis PR4		E Q A R S L L A E C	S A I G I R R A L D	I G L V D A I G P R	R P D L F E A W L H	E V A T D L L E G D	R M E S M L E R K R	L R L E - - - - R D	P V E P E E R E L	E E M K I D M F G D	R N G F A E K R R N	529
S. nassauensis DSM 44728		A T A A R L L T E K	L P V D A T A A A A	I G L A D A V G P R	E P E S F A S W L T	G M A O S Y A D H	W M G O A L D A K L	K V L S G - - - - T H	P P A Y Y E A A E L	S E M A K D F F D D	R S G F A A A R S G	540
P. fluorescens Pf-5		A M A K Q L T E A C	L P I S A L Q A L Q	M G M V Q E I G P R	C P D E F G L W I L	Q R A N G V L N D P	R Y Q H L R Q R K L	D A D P - - - - - Q	L I Q H C R N A E L	E E M H M D M V Q N	R K G F A E K C S N	544
C. violaceum ATCC 12472		E M A A R I C G C G	L P I G A R Q A W R	L G M V Q D I G P R	D P D A F G S W I L L	S T A A A A E R - T	W P E H A R - R K Q	E L D L - - - - - Q	R L Q Q C R R A E L	D E M R E D M L E N	R R Q F A E R C R N	542
		*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*
		*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*** :	*

<i>R. eutropha</i> H16	FVYKLPHAHT	PRHLA---MH	RGGLPAAQE	LQALAGKRS-	597
<i>C. metallidurans</i> CH34	FVRRTPHSWT	PRHLA---AH	RDIDWGTG-R	LKAVKP---	579
<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i> UPM791	FIRKTPKSRT	PLTLA---IH	RATGDEADRG	RTMR---	561
<i>B. japonicum</i> USDA 110	FIHKVPKSRT	PLTIAGHRIR	RAPGRPVGMA	VSS-----	566
<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1	FIRRVPKSRT	PLYLA---RH	ROK-----	-----	538
<i>M. magneticum</i> AMB-1	FIHKVKKSR	FLYLA---VH	RSKINNIR--	-----	550
<i>H. thermophilus</i> TK-6	FVRRILPFR	PPYLA---IH	RRLGFSS---	-----	562
<i>A. aeolicus</i> VF5	FVRRKPHFR	PPYLA---IH	RRLKFSL---	-----	562
<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	FVHRVPHFR	PPYLA---IH	RRLGFTQP--	-----	564
<i>S. degradans</i> 2-40	FVFKIKPVKE	VTAEA---QS	QMVG-----	-----	565
<i>Campylobacteriales</i> <i>bact.</i> GD-1	FVYKVCPIKT	PERLR-----	--DA-----	-----	548
<i>Sulfurovum</i> sp. NBC37-1	FVYKLCPROT	PQRLKR---G	RKDA-----	-----	545
<i>Nitratiruptor</i> sp. SB155-2	FVYKICPTKT	PLRIAK---H	RRKNA-----	-----	559
<i>S. avermitilis</i> MA-4680	FVRKERPRRT	PPHLSPAAVA	PSGQIPSEAH	VTGTAPHGVS	PRPDGWYEEES
<i>R. erythropolis</i> PR4	FVLKL-----	-----	-----	-----	534
<i>S. nassauensis</i> DSM 44728	FVHKMAPAET	PPRLARHRWN	FANG-----	-----	564
<i>P. fluorescens</i> Pf-5	FVYKRTCCCT	PERLIEA-WA	KPQDIALYV-	-----	572
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	FVLRPACGT	PDRLVAG-WA	RADG-----	-----	565
	*: ;				

**Abbildung 6-6: Sequenzvergleich von HypX/HoxX-Sequenzen.** Die, das „Oxyanionische Loch“ bildenden, AS Leucin und Glycin sind mit # gekennzeichnet. Potentiell katalytisch aktive AS sind mit einem © oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Blaue Buchstaben oberhalb der Sequenz markieren Position und Art der AS, die alternativ durch gerichtete Mutagenese in die HypX-Sequenz eingefügt wurden, um die Relevanz der jeweils konservierten AS für Struktur und Funktion zu untersuchen. Farbige unterlegte Buchstaben zeigen die AS an den Positionen, welche bereits im ursprünglichen 10-Formyl-Bindestellen-Motiv bzw. dem Crotonase-Motiv zu finden sind. Folgende Spezies bzw. ihre HypX-Isoformen wurden bei dem vorliegenden Sequenzvergleich berücksichtigt: *Aquifex aeolicus* VF5, NP\_213788.1; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, BAC52191.1; *Campylobacteriales bacterium* GD 1, ZP\_05072344.1; *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, NP\_903812.1; *Cupriavidus metallidurans* CH34, YP\_583693.1; *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-1, ZP\_02178182.1; *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, YP\_003433460.1; *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, CAM75713.1; *Magnetospirillum magneticum* AMB-1, YP\_420998.1; *Nitratiruptor* sp. SB155-2, YP\_001356445.1; *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, YP\_260772.1; *Ralstonia eutropha* H16, NP\_942660.1; *Rhizobium leguminosarum*, CAA85446.1; *Rhodococcus erythropolis* PR4, YP\_002766527.1; *Saccharophagus degradans* 2-40, YP\_526001.1; *Stackebrandtia nassauensis* DSM 44728, YP\_003513239.1; *Streptomyces avermitilis* MA-4680, NP\_828541.1; *Sulfurovum* sp. NBC37-1, YP\_001358952.1.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Das aktive Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen.....	4
Abbildung 1-2: H <sub>2</sub> -Koordination und Stabilisierung in einem H <sub>2</sub> -Modellkomplex.....	6
Abbildung 1-3: Die Effekte von starken und schwachen Liganden auf die Elektronenverteilung in d <sup>6</sup> -Komplexen.....	8
Abbildung 1-4: Postulierter katalytischer Zyklus in [NiFe]-Hydrogenasen.....	9
Abbildung 1-5: Die drei [NiFe]-Hydrogenasen aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	11
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung des MBH- und SH-Operons.....	12
Abbildung 1-7: Die pleiotrope Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen.....	14
Abbildung 1-8: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Ligandierung des „katalytischen“ Eisens im HypCD-Komplex.....	16
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des heterotrophen Wachstums von <i>Ralstonia eutropha</i> in verschiedenen Medien in Korrelation zur Hydrogenaseexpression.....	28
Abbildung 3-1: Technische Zeichnungen der neu entwickelten Dialyse- und Applikationskapsel.....	51
Abbildung 3-2: Anwendung der Dialysekapseln.....	52
Abbildung 3-3: Dialysekurven im Vergleich.....	54
Abbildung 3-4: Dichtheitsprüfung der Kapseln.....	55
Abbildung 3-5: HypD Sequenzvergleich.....	57
Abbildung 3-6: Strukturmodelle verschiedener HypD-Isoformen aus verschiedenen Spezies.....	58
Abbildung 3-7: Die beiden funktionalen Varianten von HypD aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	59
Abbildung 3-8: Statistische Analyse von HypD.....	60
Abbildung 3-9: Hochkonservierte, strukturelle Merkmale von HypD.....	62
Abbildung 3-10: Überexpressionsplasmide zur Expression und Reinigung verschiedener HypCD-Komplexe aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	63
Abbildung 3-11: Anreicherung des reifen HypCD-Komplexes.....	66
Abbildung 3-12: Immunologischer Nachweis von HypC und HypD.....	67
Abbildung 3-13: FTIR-Spektren des HypCD-Komplexes aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	68
Abbildung 3-14: FTIR-Spektren des HypCD-Komplexes aus <i>Escherichia coli</i> .....	69
Abbildung 3-15: FTIR-Spektren des HypCD-Komplexes aus <i>E. coli</i> -Mutanten.....	70
Abbildung 3-16: FTIR-Spektren eines reduzierten HypCD-Komplexes aus <i>E. coli</i> .....	72
Abbildung 3-17: FTIR-Spektren eines reduzierten HypCD-Komplexes aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	73
Abbildung 3-18: FTIR-Spektren der regulatorischen [NiFe]-Hydrogenase (RH) aus heterotrophen Zellen aus uniform <sup>13</sup> C-markierten Medien.....	75
Abbildung 3-19: FTIR-Spektren der RH aus heterotroph gewachsenen Zellen, die auf wechselnd uniform markierten Substraten kultiviert wurden.....	76
Abbildung 3-20: FTIR-Spektren der RH aus heterotroph gewachsenen Zellen mit differentiell markiertem Glycerol.....	77
Abbildung 3-21: <sup>13</sup> CO-Titration zur Quantifizierung des intrinsischen Vorläufers des CO-Liganden.....	78
Abbildung 3-22: Spezifische CO-Gaswäsche mittels Palladium(II) chlorid.....	81
Abbildung 3-23: Effekte der CO-Limitation auf Wachstum und Hydrogenasematuration unter heterotrophen Bedingungen.....	82
Abbildung 3-24: Effekte der CO-Limitation auf Wachstum und Hydrogenasematuration unter lithoautotrophen Bedingungen.....	84
Abbildung 3-25: Komplementation des lithoautotrophen Wachstums der <i>hypX</i> -Mutante durch Zugabe geringer Mengen Kohlenmonoxids.....	86
Abbildung 3-26: Applikation von Kohlenstoffmonoxid verhindert die Akkumulation ungereifter großer Untereinheiten.....	87
Abbildung 3-27: Sequenzvergleich der N-terminalen Domäne von HypX/HoxX-Homologen aus verschiedenen Spezies.....	89
Abbildung 3-28: Sequenzvergleich der C-terminalen Domäne von HypX/HoxX-Homologen aus verschiedenen Spezies.....	90
Abbildung 3-29: Markierung des CO-Liganden der RH <sub>StopStrep</sub> mit <sup>13</sup> C-Na-Formiat.....	92
Abbildung 3-30: Charakterisierung der <i>AglyA</i> -Deletion unter heterotrophen Bedingungen.....	94

Abbildung 3-31: Markierung des Carbonylliganden der MBH mittels $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter lithoautotrophen Bedingungen .....	95
Abbildung 3-32: Markierung des Carbonylliganden der RH mit $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter heterotrophen Standardbedingungen.....	96
Abbildung 3-33: Einfluss von HypX auf die Reifung von Hydrogenasen unter heterotrophen Bedingungen.....	98
Abbildung 3-34: HypX-Effekt unter heterotrophen Bedingungen.....	99
Abbildung 3-35: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der Zugabe von Glycin.....	101
Abbildung 3-36: Sauerstoffkonzentration im Medium in Abhängigkeit zur Zelldichte .....	102
Abbildung 3-37: Markierung des Carbonylliganden der MBH mit $^{13}\text{C}_2$ -Glycin unter heterotrophen Bedingungen.....	104
Abbildung 3-38: $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente des Carbonylliganden der RH unter heterotrophen (GN-) Bedingungen.....	105
Abbildung 3-39: Strukturelle Homologien in HypX. Für beide HypX-Domänen ergab ein „Topologie-Mapping“ Übereinstimmungen mit katalytischen Domänen anderer Enzyme .....	107
Abbildung 3-40: Struktur der N-terminalen 10-CHO-THF-Domäne aus HypX.....	108
Abbildung 3-41: Struktur der C-terminalen Hydratase-Domäne aus HypX.....	110
Abbildung 3-42: Vergleich der katalytischen „Triade“ der C-terminalen HypX-Domäne mit der katalytischen Triade von Nitril-Hydratasen.....	111
Abbildung 3-43: Lithoautotrophes Wachstum von Mutanten mit ortsspezifischen Aminosäureaustauschen in der C-terminalen HypX-Domäne.....	113
Abbildung 3-44: Proteinestabilität von HypX Austauschmutanten .....	114
Abbildung 3-45: FTIR-Spektren gereinigter RH aus verschiedenen Hintergründen mit ortsspezifischen Aminosäureaustauschen in beiden HypX-Domänen.....	117
Abbildung 3-46: Reinigung des MBP::HypX Fusionsprotein .....	119
Abbildung 3-47: Größenausschlusschromatographie von MBP::HypX .....	120
Abbildung 3-48: MBP::HypX UV-Vis-Spektren.....	121
Abbildung 3-49: Kohlenmonoxid abhängiges, autotrophes Wachstum von <i>Ralstonia eutropha</i> H16.....	124
Abbildung 3-50: Expression von CO-Dehydrogenase assoziierten Genen .....	126
Abbildung 3-51: Das <i>coxI</i> -Operon auf Chromosom 1.....	126
Abbildung 3-52: Wachstum der CODH <sup>-</sup> -Mutanten .....	127
Abbildung 3-53: FTIR-Spektren von $^{13}\text{C}$ -Acetat markierter RH.....	129
Abbildung 3-54: CO <sub>2</sub> -Entwicklung von <i>Ralstonia eutropha</i> Stämmen unter heterotrophen Bedingungen. Quantitative gaschromatographische Bestimmung des CO <sub>2</sub> -Partialdrucks mittels FID .....	131
Abbildung 3-55: $^{13}\text{CO}_2$ -abhängige Markierung der diatomaren Liganden der RH.....	132
Abbildung 3-56: $^{13}\text{C}$ -Hydrogencarbonat abhängige Markierung der diatomaren Liganden der RH.....	134
Abbildung 4-1: Schema der HypX-abhängigen Synthese des Carbonylliganden in [NiFe]-Hydrogenasen aus <i>R. eutropha</i> .....	149
Abbildung 4-2: Postulierte Gesamtreaktion von HypX .....	152
Abbildung 4-3: Substrattransfer zwischen beiden katalytischen Domänen von HypX.....	154
Abbildung 4-4: Postulierter Mechanismus der N-terminalen Hydrolase-Domäne aus HypX .....	155
Abbildung 4-5: Das aktive Zentrum der C-terminalen Domäne aus HypX .....	160
Abbildung 4-6: Postulierter Mechanismus der C-terminalen Dehydratase-Domäne .....	161
Abbildung 4-7: Energiediagramm für die hyperthermale Dekomposition und Isomerisierung von Formylsäure (HCOOH) in Abwesenheit von Wasser.....	163
Abbildung 4-8: Sequenzvergleich der Molybdän-Kofaktor koordinierenden Motiven von Vertretern der Molybdän-Hydroxylasen.....	169
Abbildung 4-9: Erweitertes Schema der pleiotropen Maturation von [NiFe]-Hydrogenasen aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	171
Abbildung 6-1: Eine typische Reinigung der RH <sub>StopStrep</sub> .....	XVIII
Abbildung 6-2: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von Zugabe von verschiedenen Aminosäuren.....	XIX
Abbildung 6-3: Strukturelles „Alignment“ der N-terminalen Domäne aus HypX.....	XX
Abbildung 6-4: Strukturelles „Alignment“ der C-terminalen Domäne aus HypX.....	XXI
Abbildung 6-5: Phylogenetische Verteilung von HypX/HoxX-Homologen.....	XXIII
Abbildung 6-6: Sequenzvergleich von HypX/HoxX-Sequenzen.....	XXVII

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme .....	24
Tabelle 2: Verwendete Plasmide .....	25
Tabelle 3: Verwendete Nährmedien .....	27
Tabelle 4: Verwendete Primer .....	43
Tabelle 5: Suizidplasmide und Primer-Paarungen für die AS-Austauschmutanten in HypX.....	45
Tabelle 6: Komplementationstest der <i>R.e.HypCD</i> -Überexpressionsplasmide.....	64
Tabelle 7: Zusammenfassung der HypX <sup>-</sup> -Mutagenese .....	116
Tabelle 8: Metallbestimmung in HypX mittels ICP-OES.....	122
Tabelle 9: Vergleich verschiedener Mutagenesestudien.....	159