

**Biochemische und strukturelle Untersuchungen der
Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen CODH-II und CODH-V aus
*Carboxydotherrnus hydrogenoformans***

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

Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Jochen Martin Fesseler

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

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter: 1. Prof. Dr. Holger Dobbek
2. PD Dr. Athina Zouni
3. Prof. Dr. Silke Leimkühler

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2015

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek in der Arbeitsgruppe Strukturbiologie / Biochemie von März 2011 bis März 2015 an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation wurde an folgenden Publikationen mitgewirkt:

J.-H. Jeoung, S. Goetzl, S. E. Hennig, J. Fessler, C. Wörmann, J. Dendra, H. Dobbek, The Extended Reductive Acetyl-CoA Pathway: ATPases in Metal Cluster Maturation and Reductive Activation. *Biol. Chem.* **395**, 545-58 (2014).

J.-H. Jeoung, J. Fessler, S. Goetzl, H. Dobbek, Carbon Monoxide. Toxic gas and fuel for anaerobes and aerobes: carbon monoxide dehydrogenases. *Met. Ions Life Sci.* **14**, 37-69 (2014).

M. Bommer, C. Kunze, J. Fessler, T. Schubert, G. Diekert, H. Dobbek, Structural basis for organohalide respiration. *Science* **346**, 455-458 (2014).

J. Fessler, J.-H. Jeoung, H. Dobbek, How the [NiFe₄S₄] cluster of CO dehydrogenase activates CO₂ and NCO⁻. *Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.*

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 GLOBALER KOHLENSTOFFKREISLAUF (CO/CO ₂)	5
1.2. CHEMIE DES CO UND DES CO ₂	7
1.2.1 CHEMIE DES KOHLENMONOXIDS	7
1.2.2 CHEMIE DES KOHLENDIOXIDS	9
1.3. KOHLENMONOXID-DEHYDROGENASEN (AEROBE UND ANAEROBE CODHS)	12
1.3.1 CU,MO-ENTHALTENDE CODHS	12
1.3.2 NI,FE-ENTHALTENDE CODHS	14
ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	27
2 MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 CHEMIKALIEN	28
2.2 ANOXISCHE ARBEITEN	28
2.3 BAKTERIENSTÄMME UND ANTIBIOTIKA	28
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	29
2.4.1 KLONIEREN VON <i>COOS-II_{CH}</i>	29
2.4.2 KLONIEREN VON <i>COOS-V_{CH}</i>	29
2.4.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	30
2.4.4 TRANSFORMATION	31
2.5 HETEROLOGE GENEXPRESSION	31
2.5.1 EXPRESSION VON <i>COOS-II_{CH}</i>	32
2.5.2 EXPRESSION VON <i>COOS-V_{CH}</i>	32
2.6 PROTEINREINIGUNG	33
2.6.1 REINIGUNG VON <i>CODH-II_{CH}</i>	33
2.6.2 REINIGUNG VON <i>CODH-V_{CH}</i>	34
2.7 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE	35
2.8 MESSUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT	35
2.8.1 CO-OXIDATIONSASSAY	35
2.8.2 CO ₂ -REDUKTIONSSASSAY	35
2.8.3 NH ₂ OH-REDUKTIONSSASSAY	36
2.9 RÖNTGENKRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN	37
2.9.1 KRISTALLISATION VON <i>CODH-II_{CH}</i> UND <i>CODH-V_{CH}</i>	37

2.9.2 MANIPULATION VON KRISTALLEN	38
2.9.3 DATENSAMMLUNG	39
2.9.4 STRUKTURBESTIMMUNG	40
2.9.5 STRUKTURVERFEINERUNG UND EVALUATION	40
2.10. VERSCHIEDENE METHODEN	41
2.10.1 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	41
2.10.2 DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	42
2.10.3 BESTIMMUNG DES OLIGOMEREN ZUSTANDS VON CODH-V _{CH}	42
2.10.4 COLORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES NICHT-HÄM-EISENS (Fe ²⁺)	43
2.10.5 ERMITTLUNG DER TEMPERATURSTABILITÄT VON CODH-V _{CH}	43
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
3.1 CO-DEHYDROGENASE II (CODH-II _{CH})	44
3.1.1 HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG	44
3.1.2 KATALYTISCHE AKTIVITÄT DER CODH-II _{CH}	45
3.1.3 KRISTALLISATION UND RÖNTGENDIFFRAKTION	45
3.1.4 STRUKTUREN DREIER ZUSTÄNDE BEI ATOMARER AUFLÖSUNG	46
3.1.5 STRUKTUR DES CYANID-INHIBIERTEN ZUSTANDS IN VERZERRT QUADRATISCH-PLANARER GEOMETRIE	57
3.1.6 VISUALISIERUNG DER SUBSTRATKANÄLE MITTELS XENON-DERIVATISIERUNG	61
3.2 CO-DEHYDROGENASE V (CODH-V _{CH})	65
3.2.1 HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG	67
3.2.2 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE UND QUANTIFIZIERUNG DES FE-GEHALTS	68
3.2.3 OLIGOMERER ZUSTAND DER CODH-V _{CH}	70
3.2.4 KRISTALLISATION	71
3.2.5 GESAMTSTRUKTUR DER CODH-V _{CH}	72
3.2.6 STRUKTUR DER CODH-V _{CH} IM REDUZIERTEN ZUSTAND	78
3.2.7 ERMITTLUNG VON SUBSTRATKANÄLEN DURCH XENON-DERIVATISIERUNG	85
3.2.8 ENZYMATISCHE AKTIVITÄT DER CODH-V _{CH}	88
4. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	92
4.1 CO-DEHYDROGENASE II (CODH-II _{CH})	92
4.2 CO-DEHYDROGENASE V (CODH-V _{CH})	95
5. AUSBLICK	96
6. LITERATUR	98
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110

8. ANHANG **112**

9. DANKSAGUNG **125**

10. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG **127**

Zusammenfassung

Eine Vielzahl strikt anaerober Organismen verwendet den reduktiven Acetyl-CoA-Weg zum autotrophen Wachstum mit Kohlenmonoxid als einziger Kohlenstoffquelle. Die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) ist das Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges und katalysiert die Oxidation von CO mit Raten von bis zu $31,000 \text{ s}^{-1}$ und die Reduktion von CO_2 mit bis zu 12 s^{-1} an einem $[\text{Ni}_4\text{Fe}_4\text{S-OH}_x]$ -Cluster (C-Cluster). Das Genom des thermophilen und hydrogenogenen Bakteriums *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* enthält insgesamt fünf Gene, die für CODHs kodieren. Anhand der Genumgebung wurden dabei unterschiedliche Rollen für die einzelnen CODHs vorgeschlagen. Für ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse in der Katalyse, wurden CODH-II_{Ch} und -V_{Ch} heterolog in *Escherichia coli* produziert und biochemisch und strukturell charakterisiert.

Für CODH-II_{Ch} wurden in der vorliegenden Arbeit die Strukturen von drei Schlüsselzuständen des katalytischen Zyklus mit atomarer Auflösung ($d_{\text{min}} < 1.1 \text{ \AA}$) bestimmt. Dadurch konnten Details, wie Bindungslängen und -winkel, mit bisher unerreichter Präzision (Standardabweichung unter 0.05 \AA) ermittelt werden. Der CO_2 -gebundene Zustand zeigte aufgrund der verbesserten Auflösung einen deutlich verringerten O-C-O-Bindungswinkel von 117° , welcher auf eine stärkere Aktivierung des Substrats schließen lässt. Die Analyse der Ligandspezifischen Bindungslängen und -winkel sowie deren Vergleich mit CO_2 und Formiat, legen eine Beschreibung als Carboxylat nahe. Somit findet im $-600 \text{ mV} + \text{CO}_2$ -Zustand eine Zweielektronen-reduktive Aktivierung statt. Die beobachtete Ni-C-Bindungslänge von 1.81 \AA gehört zu den kürzesten bekannten Bindungen dieses Typs und weist auf starke π -Rückbindungseffekte hin. In einer ähnlichen Konformation bindet der redoxspezifische Inhibitor Cyanat (NCO^-). Aufgrund der Bindungsgeometrie und Interaktionen mit der Proteinmatrix, erscheint eine reduktive Aktivierung mit Übertragung von zwei Elektronen auf Cyanat als wahrscheinlich. Somit handelt es sich um eine Mechanismus-abhängige Inhibition, die zu einem gebundenen Formamid führt. Zusätzlich konnte die Struktur des -320 mV -Zustands, welcher der kompetente Zustand für die CO-Oxidation ist, mit einer Auflösung von 1.05 \AA bestimmt werden. Die dabei beobachtete Bindungslänge von 2.2 \AA zwischen Fe2 und dem OH_x -Liganden, weist auf einen Wasserliganden hin.

Durch eine alternative Kristallbehandlung wurde ferner eine Cyanid-inhibierte Struktur gelöst, in der CN^- erstmalig in einer verzerrt quadratisch-planaren Geometrie an Ni bindet und ein Modell für den Übergangszustand der CO-Oxidation darstellt.

Die hydrophoben Gaskanäle, die für den Austausch von CO und CO₂ verantwortlich sind, konnten durch Xenon-Derivatisierung identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bisher uncharakterisierte CODH-V_{Ch} heterolog hergestellt, gereinigt und strukturell untersucht. Die Gesamtstruktur dieses Proteins ist sehr eng mit der von CODH-II_{Ch} verwandt und weist eine nahezu identische Faltung auf. Es zeigten sich jedoch deutliche Abweichungen in der Cluster-Zusammensetzung. So enthält CODH-V_{Ch} im *as-isolated* Zustand ein [4Fe3S2O]-Cluster (Hybrid-Cluster) anstelle eines C-Clusters. Nach Reduktion mit Dithionit verliert dieses seine Oxo-Liganden und wird, unter signifikanter struktureller Umlagerung, in ein [4Fe3S]-Cluster überführt. Zusätzlich besitzt CODH-V_{Ch} an der Dimerisierungsfläche (D-Cluster) anstelle eines [4Fe4S]- ein [2Fe2S]-Cluster. CODH-V_{Ch} verfügt über Hydroxylamin-Reduktionsaktivität mit einem k_{cat} -Wert von 0.13 s^{-1} und einem K_{M} -Wert von 7.6 mM, zeigt jedoch keine CO-Oxidations- oder CO₂-Reduktions-Aktivität. Damit ähnelt CODH-V_{Ch} in seinen katalytischen Fähigkeiten und seinem zentralen Metall-Cluster, den verwandten Hybrid-Cluster-Proteinen (HCP).

Summary

A variety of strict anaerobic organisms employ the reductive acetyl-CoA path for autotrophic growth, using carbon monoxide as sole carbon source. Carbon monoxide dehydrogenase (CODH) is the key enzyme of the path and catalyzes CO oxidation with rates of $31,000\text{ s}^{-1}$ and CO₂ reduction with rates of 12 s^{-1} at a [Ni₄Fe₄S-OH_x] cluster (cluster C). The genome of the thermophilic and hydrogenogenic bacterium *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* contains five copies of genes coding for the catalytic subunit of a CODH. According to the gene environment, different physiological roles for the individual CODHs were proposed. To compare their respective structure and catalytic function, CODH-II_{Ch} and -V_{Ch} were heterologously produced in *Escherichia coli* and biochemically and structurally investigated.

Three key states of the catalytic cycle of CODH-II_{Ch} were solved at true-atomic resolution ($d_{\text{min}} < 1.1\text{ \AA}$). Detailed information on bond lengths and angles were gained with unprecedented precision (standard deviations below 0.05 \AA). The CO₂ bound state revealed a significantly decreased bent angle of 117° , supporting a stronger degree of activation as previously proposed. The observed Ni-C bond length of 1.81 \AA is one of the shortest values known, indicating substantial π -backbonding. The redox specific inhibitor cyanate (NCO⁻) binds in a similar conformation. Comparable geometries of CO₂ and NCO⁻ as for formate and formamide respectively, suggest a two-electron reductive activation and a mechanism-dependent type of inhibition for NCO⁻. Additionally, the structure of the -320 mV state was determined at a resolution of 1.05 \AA . The observed Fe2-OH_x bond length favors interpretation as a water molecule.

Additionally, a novel cyanide inhibited state was discovered, showing CN⁻ bound in a distorted square-planar geometry to the Ni atom of cluster C. With presence of the neighbouring OH_x ligand at Fe2, this state represents a direct analogue to the proposed transition state of CO oxidation.

Xenon-derivatization was employed to visualize the hydrophobic substrate channels in CODH-II_{Ch} and compared to bifunctional systems.

CODH-V_{Ch} was heterologously produced, purified and characterized by x-ray crystallography. The overall structure revealed a close relationship to CODH-II_{Ch}, showing an almost identical fold. However, a significant difference in cluster composition was observed. Instead of cluster C, a [4Fe3S2O] cluster (hybrid cluster) was found in the *as-isolated* state. After reduction with dithionite, the cluster is transformed to a [4Fe3S] cluster upon loss of its oxo-ligands. Additionally, a [2Fe2S] cluster was found at the dimer interface instead of a [4Fe4S] cluster (cluster D).

SUMMARY

CODH- V_{Ch} exhibits hydroxyl amine reductase activity with a k_{cat} of 0.13 s^{-1} and a K_M of 7.6 mM and agrees well with the major activity of hybrid cluster proteins (HCPs). However, despite the annotation as CODH, no CO oxidation or CO_2 reduction activity has been encountered.

1 Einleitung

1.1 Globaler Kohlenstoffkreislauf (CO/CO₂)

Die Mehrheit unserer heutigen globalen Umwelt- und Energieprobleme, lassen sich auf Kohlendioxid und den Kohlenstoffkreislauf zurückführen: Sowohl die biologische Fixierung von CO₂ zu organischen Kohlenstoffverbindungen, als auch die Verbrennung von Kohle zu CO₂ sind von größter globaler Bedeutung [1]. CO₂ ist der Ausgangsstoff aller fossilen Brennstoffe, die über die letzten 4 Milliarden Jahre hinweg in Form organischen Kohlenstoffs in der Erdkruste gelagert wurden. Da Kohle, Erdgas und Erdöl die Basis des modernen Lebensstils darstellen und als Brennstoff, Energiequelle und Ausgangsmaterial für organische Chemikalien dienen, führt deren Verknappung zu großen ökonomischen und politischen Auswirkungen [2]. Jährlich gelangen 36 Gigatonnen (Gt) an CO₂ (Wert 2013, [3]) und 1.2 Gt an CO [4, 5] durch Verbrennung von fossilen Brennstoffen in die Atmosphäre.

Die natürliche Kohlenstofffixierung durch Photosynthese führt zu einer Assimilation von über 200 Gt pro Jahr und stellt damit den wichtigsten aller Kohlenstofffixationswege dar [6]. Aufgrund zusätzlicher Netto-Flüsse von CO₂ in die Atmosphäre aus Atmung oder geologischen Prozessen, nimmt die atmosphärische Konzentration dennoch um ca. 3 Gt pro Jahr zu [3] und zieht negative Folgen für das globale Klima nach sich [1].

Im Gegensatz zur Photosynthese, die molekularen Sauerstoff benötigt, kann Kohlenstoff auch in Abwesenheit von Sauerstoff gebunden werden. Der zentrale Stoffwechselweg zur Fixierung von Kohlendioxid unter anaeroben Bedingungen ist der reduktive Acetyl-CoA-Weg [7-9]. Dieser besteht aus zwei Zweigen, dem Methyl- und Carbonyl-Zweig und ist in Abbildung 1 dargestellt. Im Folat-abhängigen Methyl-Zweig wird dabei zunächst ein Molekül CO₂ zu Formiat reduziert, welches unter Verbrauch eines ATP-Moleküls an Tetrahydrofolat gebunden wird. Das so entstandene N¹⁰-Formyl-Tetrahydrofolat wird dehydratisiert und nachfolgend schrittweise zu N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat reduziert [8]. Insgesamt werden im Methyl-Zweig sechs Elektronen und ein ATP-Molekül verbraucht, um CO₂ zu einer Methyl-Gruppe umzusetzen.

N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat bindet darauffolgend an eine N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat:Corrinoid-Eisenschwefelprotein Methyltransferase (MeTr), welche die Methylgruppe an das Corrinoid-Eisenschwefelprotein (*corrinoid iron-sulfur protein*’, CoFeSP) weitergibt. Auf diese Weise werden Methyl- und Carbonyl-Zweig des reduktiven Actetyl-CoA-Wegs verbunden (Abb. 1).

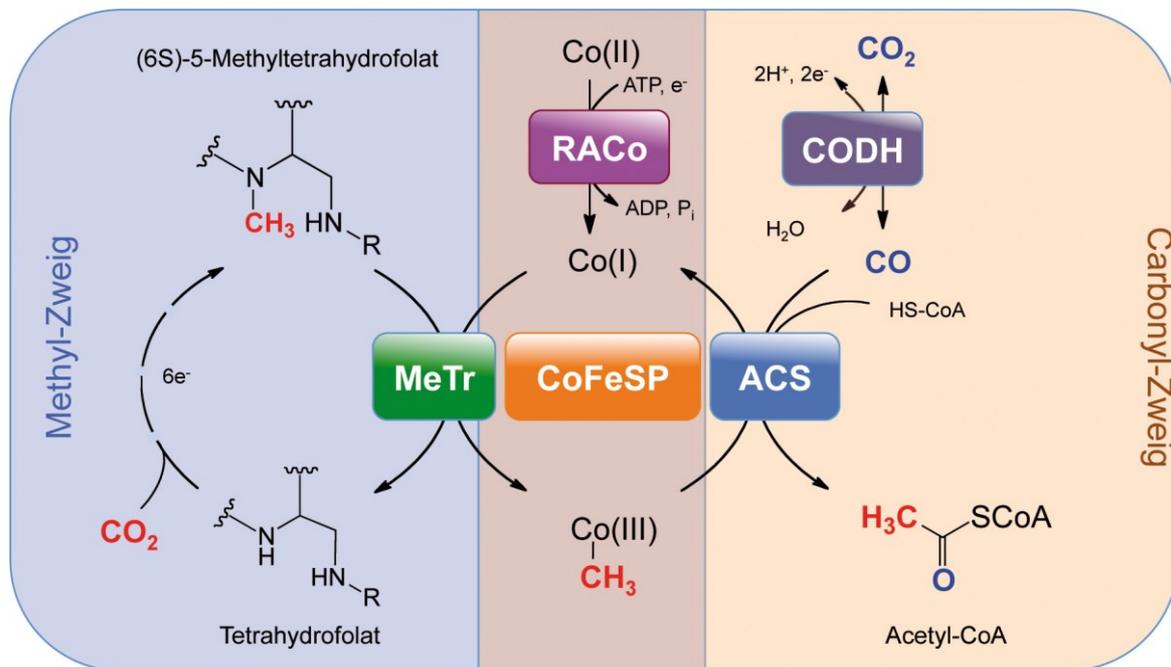


Abbildung 1: Schritte des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs. Schematische Darstellung mit den beteiligten Enzymen. MeTr: N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat:Corrinoid-Eisenschwefelprotein Methyltransferase, CoFeSP: Corrinoid-Eisenschwefelprotein, RACo: reduktiver Aktivator von CoFeSP, ACS: Acetyl-CoA-Synthase, CODH: Kohlenmonoxid-Dehydrogenase. Verändert nach Referenz: [10].

Im Carbonyl-Zweig reduziert die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase-Komponente (CODH) von CODH/ACS das Substrat CO₂ zu CO und transferiert dieses durch ein internes Tunnelsystem zum aktiven Zentrum der Acetyl-CoA-Synthase (ACS) [11]. Dort wird CO mit Coenzym A (CoASH) und einer Methylgruppe, die von CoFeSP bereitgestellt wird, zu Acetyl-CoA kondensiert. Dabei folgt die Gesamtreaktion der Gleichung:



Acetyl-CoA ist ein zentraler Metabolit der mikrobiellen Biosynthese und kann weiter zu Acetat (durch Acetogene) umgesetzt oder als Energiequelle (durch acetoklastische Methanogene) verwendet werden [10].

Neben dem Calvin-Zyklus und dem Acetyl-CoA-Weg sind vier weitere Kreisläufe für die autotrophe CO₂-Fixierung verantwortlich: Reduktiver Citratzyklus, 3-Hydroxypropionat-Bizyklus, Hydroxypropionat-Hydroxybutyrat-Zyklus und Dicarboxylat-Hydroxybutyrat-Zyklus [12]. Diese besitzen jedoch einen deutlich geringeren Anteil an der globalen Kohlenstoff-Assimilation [9].

1.2. Chemie des CO und des CO₂

1.2.1 Chemie des Kohlenmonoxids

Kohlenmonoxid ist ein farb- und geruchloses, giftiges Gas, das bei der unvollständigen Verbrennung kohlenstoffhaltiger Stoffe entsteht [13].

Das Molekül mit einer Gesamtzahl von 10 Elektronen zeigt aufgrund des ausgleichenden Charakters von Elektronegativität und Formalladung nur ein schwaches Dipolmoment, das am Kohlenstoffatom lokalisiert ist [14].

Kohlenmonoxid zeichnet sich durch einen partiellen Dreifachbindungscharakter aus (C-O-Bindungslänge: 1.128 Å) [15] und bildet bevorzugt stabile Komplexe mit Übergangsmetallen (Metallo-carbonyle). Als höchstes besetztes Molekülorbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) enthält Kohlenmonoxid ein bindendes σ -Orbital, das mit einer Reihe von d-, s- und p-Orbitalen eines Metalls eine σ -Bindung ausbilden kann. Da das tiefste unbesetzte Molekülorbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) im CO ein antibindendes π -Orbital ist, kann dieses durch Überlappung mit gefüllten d-Orbitalen eines Metalls eine π -Bindung ausbilden [13, 16]. Dieser Effekt, der als π -Rückbindung bezeichnet wird, führt zu einer Schwächung der C-O-Bindung und einer Stärkung der M-C-Bindung, weshalb oftmals sehr kurze Metall-Kohlenstoff-Bindungen ($r_{M-C} < 1.8 \text{ \AA}$) beobachtet werden [17]. Abbildung 2 zeigt schematisch die relevanten Molekülorbitale und die Bildung von Metallo-carbonylen.

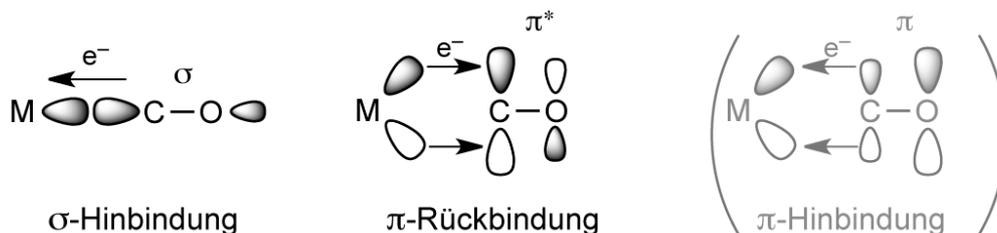


Abbildung 2: Bildung von Metallo-carbonylen. Reproduziert nach Referenz: [16].

Die starke Metall-Carbonyl-Bindung ist der Grund für die Toxizität von CO. So werden Metalloproteine, die niedrigvalente Metalle wie Nickel oder Eisen enthalten, durch CO inhibiert und können ihre physiologische Funktion nicht weiter ausüben. Bei der Bindung von Kohlenmonoxid an Metallzentren, werden typischerweise acht unterschiedliche Koordinationsarten beobachtet. Diese sind in Abbildung 3 aufgeführt.

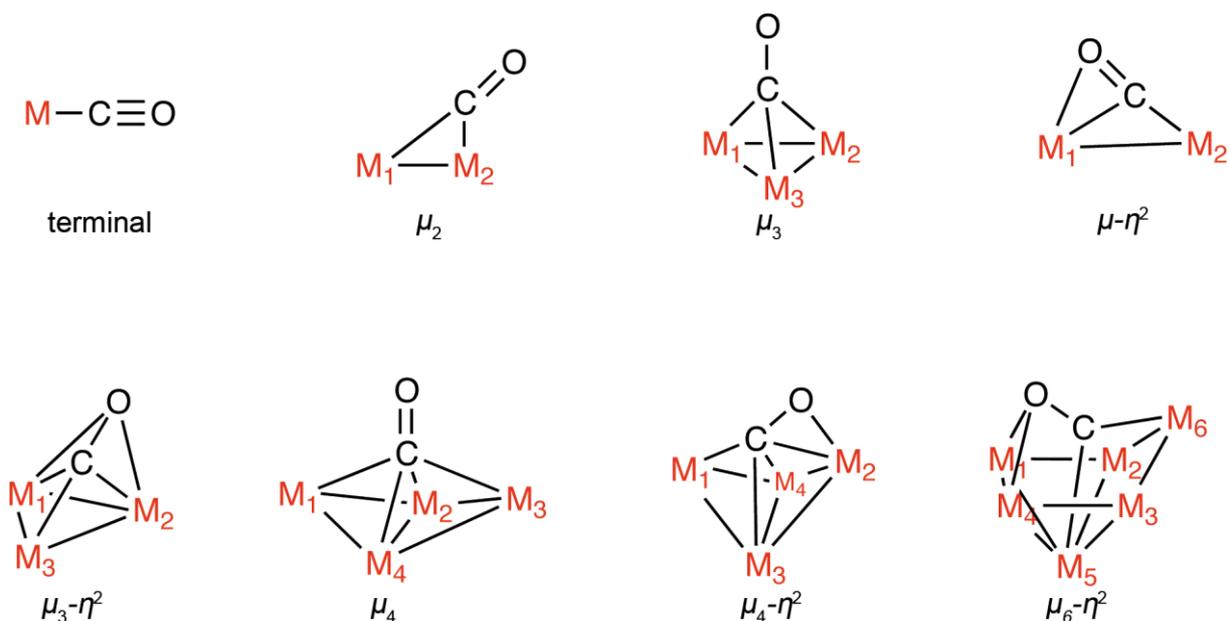


Abbildung 3: Koordinationschemie des Kohlenmonoxids an Übergangmetallzentren. Die dargestellten Bindungen zwischen CO und Metall sind koordinativ und nicht mit kovalenten Bindungen gleichzusetzen. Reproduziert nach Referenz: [17].

Dabei wird am häufigsten die terminale Koordination beobachtet, jedoch treten auch verbrückende Koordinationen zwischen zwei (μ_2) und drei (μ_3) Metallzentren häufiger auf [17]. Je nach Koordinationstyp und Metall variieren M-C- und C-O-Bindungslängen.

Kohlenmonoxid spielt als Ausgangsstoff eine wichtige Rolle bei der industriellen Herstellung von molekularem Wasserstoff durch die reversible und exotherme Wasser-Gas-Shift-Reaktion (WGSR, Gl. 2) [18-21].



Das verwendete Kohlenmonoxid wird zuvor aus Kohlevergasung oder Dampfreformierung gewonnen und der entstandene Wasserstoff im Anschluss häufig für die Ammoniak-Synthese mittels Haber-Bosch-Verfahren genutzt. Abbildung 4 zeigt das Reaktionsschema der Wasser-Gas-Shift-Reaktion am Beispiel eines Eisencarbonyl-Katalysators.

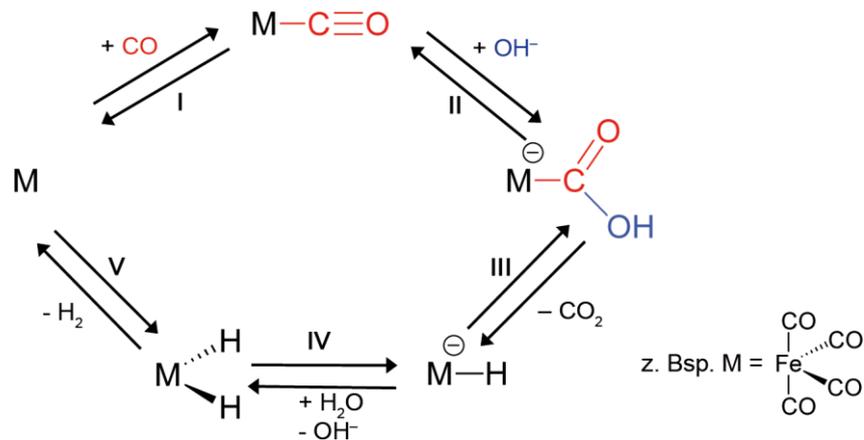


Abbildung 4: Reaktionsschema der Wasser-Gas-Shift-Reaktion (WGSR). Zunächst bindet CO terminal an die offene Koordinationsstelle des Metallkatalysators (I). Ein nukleophiler Angriff durch eine Hydroxylgruppe führt zum Metallcarboxylat als Zwischenprodukt, wobei dieses eine negative Ladung trägt (II). Die Abspaltung von CO_2 resultiert im Metall-Hydrid (III), welches im weiteren Reaktionsverlauf durch ein Wassermolekül protoniert wird (IV). Unter Eliminierung von H_2 wird der Ausgangszustand des Katalysators wiederhergestellt (V). Verändert nach Referenz: [22].

Die Reaktionsbedingungen bei diesem Verfahren sind harsch und benötigen neben hohen Temperaturen (200-250 °C für Niedrigtemperatur-Shift-Reaktoren, 310-350 °C für Hochtemperatur-Shift-Reaktoren) und Drücken (1-83 atm), auch die Verwendung von Katalysatoren [18]. Aufgrund des hohen Energieaufwands wird diese Reaktion im Zuge steigender Strompreise zunehmend unwirtschaftlich, obwohl der globale H_2 -Verbrauch steigt.

1.2.2 Chemie des Kohlendioxids

CO_2 ist ein lineares Molekül mit einer Bindungslänge von 1.163 Å [13] und kommt in der Natur frei und in gebundenem Zustand vor. In freiem Zustand ist es Bestandteil der Atmosphäre (0.03 Vol.-%), des Meerwassers (ca. 0.0005 Vol.-%) und vieler Mineralquellen. In gebundenem Zustand tritt es vor allem als MgCO_3 und CaCO_3 auf [13]. Trotz fehlendem Dipolmoment führt der Elektronegativitätsunterschied von Sauerstoff und Kohlenstoff zu polaren Bindungen, die am besten durch die elektronische Struktur $\text{O}^{-\delta}-\text{C}^{+2\delta}-\text{O}^{-\delta}$ repräsentiert werden [23].

Das Kohlenstoffatom verhält sich als Elektrophil (Lewis-Säure), wohingegen die Sauerstoffatome schwach nukleophil (Lewis-Base) sind. Aufgrund dieser Zweigestaltigkeit benötigt CO_2 häufig bifunktionelle Katalyse für seine Aktivierung und Umsetzung [21, 23, 24].

Kohlendioxid ist die höchst-oxidierte (Oxidationszahl +IV) aller Kohlenstoffverbindungen und auch die stabilste Kohlenoxidverbindung.

Die Reduktion des CO₂ erfordert eine starke Reduktionskraft und ist thermodynamisch und kinetisch gehemmt, wie sich an folgenden Reaktionsgleichungen für verschiedene Ein- und Mehrelektronen-Reduktionen ablesen lässt [23, 25, 26]:



Dabei zeigt sich, dass die Einelektronen-Reduktion zum Radikalanion CO₂^{•-} (siehe Gl. 3) sehr niedrige Potentiale benötigt, die vor allem zur Überführung des linearen CO₂ in das gewinkelte CO₂^{•-} aufgewendet werden müssen. Dieser hohe Energieaufwand begründet auch, warum die elektrokatalytische Reduktion von CO₂ in heterogenen Systemen nur schwer nutzbar ist [23]. Mehrelektronen-Reduktionen liegen dagegen in einem deutlich einfacher zu erreichenden Potentialbereich und führen zur Bildung von CO, Formiat, Formaldehyd, Methanol und Methan (siehe Gl. 4-8). Da alle genannten Reaktionen Protonen benötigen, ist der Umsatz bei niedrigen pH-Werten begünstigt [27].

Der entscheidende Schritt der Reaktion ist jedoch die initiale Aktivierung des CO₂. Bindet CO₂ durch sein Kohlenstoffatom an ein drittes Atom (Nukleophil), wird die lineare Geometrie zugunsten einer gewinkelten Geometrie aufgelöst. Die Aktivierung führt zumeist zu einer Verringerung der C-O-Bindungsordnung [23], wobei die negative Partialladung an einem Sauerstoffatom durch Bindung an ein Elektrophil ausgeglichen werden kann (Abb. 5).

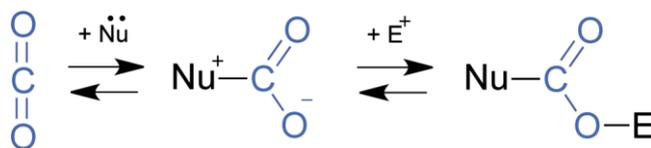


Abbildung 5: Aktivierung des CO₂ durch bifunktionelle Katalyse.

Angeregtes CO₂, das Radikalanion CO₂^{•-} oder das CO₂-Addukt an einer elektronenreichen Spezies (z.B. Nu-CO₂), besitzen eine gewinkelten Konformation mit einem O-C-O-Winkel von nahezu 133° [21]. Dieser Wert minimiert die intramolekulare elektronische Abstoßung

und die Molekülenergie [28]. Eine Vielzahl von Berechnungen und Röntgenstrukturanalysen zur Koordinationschemie des CO₂ an Übergangsmetallzentren wurden veröffentlicht und diskutiert [21, 29, 30]. Dabei sind die wichtigsten unterschiedlichen Bindungsarten in Abbildung 6 aufgeführt.

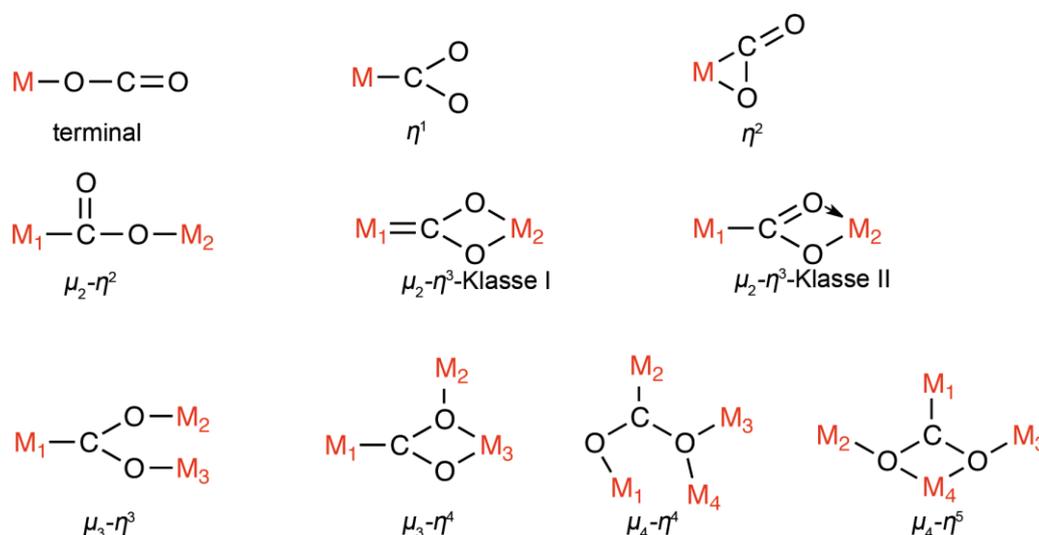


Abbildung 6: Koordinationschemie des Kohlendioxids an Übergangsmetallzentren. Reproduziert nach Referenz: [29].

Die einfachste Koordinationsart mit einer M-C-Bindung ist der η^1 -Typ. Dies führt zu einer Aktivierung des Kohlendioxids und manifestiert sich in der Bildung einer gewinkelten Geometrie. Oftmals wurde für einkernige Metall-CO₂-Komplexe zusätzlich eine *side-on*-Koordinationsart durch ein Sauerstoffatom beobachtet, was als η^2 -Koordinationsart bezeichnet wird. Für bimetallische Komplexe stellt der μ_2 - η^2 -Koordinationsstyp die einfachste Form dar, wobei der Kohlenstoff an ein Metallatom und der Sauerstoff an ein zweites Metallatom bindet. Diese Koordinationsart wurde für viele unterschiedliche Verbindungen beobachtet. Die verbrückten Zentren unterscheiden sich, je nachdem ob sie unabhängig, durch weitere funktionelle Gruppen verknüpft oder Bestandteil einer polymeren Struktur sind [29]. Im Anhang (Tab. A1 und Abb. A1) sind unterschiedliche Metallcarboxylat-Komplexe mit ihrer Zusammensetzung und spezifischen Bindungslängen und -winkeln vorgestellt. Dabei finden sich in allen aufgeführten Koordinationsarten, jeweils eine kurze und eine lange C-O-Bindung [29]. Die beobachteten O-C-O-Bindungswinkel zeigen, je nach Zusammensetzung und Aufbau des Komplexes, Werte zwischen 101° (Ru/Ru) [31] und 124° (Co/Co) [32].

Es gibt zusätzlich noch eine weitere Koordinationsform für die Verknüpfung zweier Metallzentren. Bei dieser μ_2 - η^3 -Klasse koordiniert der zweite Sauerstoff des CO₂ ebenfalls das zweite Metallzentrum. Je nach Länge der O-M₂-Bindung und deren Ordnung, werden die

Klassen I und II unterschieden. Die beobachteten O-C-O-Bindungswinkel sind in Verbindungen der Klasse I deutlich geringer als in Klasse II. Insgesamt zeigt sich, dass in allen Koordinationstypen der CO₂-Metallkomplexe die Bindungsordnung von μ_1 zu $\mu_4-\eta^5$ verringert und die C-O-Bindungslänge vergrößert wird [29]. Obwohl dies *per se* einer Aktivierung des CO₂-Moleküls entspricht, kann aufgrund der hohen Bindungsenergie mit den Metallzentren ein „toter“ Komplex resultieren, der keine katalytische Aktivität aufweist [24].

1.3. Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen (aerobe und anaerobe CODHs)

Kohlenmonoxid entsteht durch unvollständige Oxidation von Kohlenstoffverbindungen. Dabei wird ein Großteil durch natürliche Prozesse, wie Kohlenwasserstoffverbrennung, atmosphärische Methanoxidation, vulkanische Aktivität oder photochemischen Abbau von organischen Verbindungen in Wasser, Boden und Meeressedimenten, freigesetzt [4, 5]. Auch Mikroorganismen setzen Kohlenmonoxid zu einem messbaren Teil in die Atmosphäre frei [8]. Aufgrund der negativen Eigenschaften des CO in Bezug auf das globale Klima und seiner Toxizität, sind mikrobiologische Prozesse zur Fixierung von CO aus der Atmosphäre von großer Bedeutung. So werden jährlich 10^8 Tonnen CO aus den unteren Schichten der Atmosphäre durch bakterielle Oxidation entfernt [33]. Eine Vielzahl von Mikroorganismen vermag es, CO als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzbar zu machen. Für diese Aufgabe werden Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen (CODH, *carbon monoxide dehydrogenase*, EC 1.2.99.2, CO:Akzeptor-Oxidoreduktase) als Schlüsselenzyme verwendet, welche die reversible Oxidation von CO in Analogie zur WGS-Reaktion katalysieren.

Dabei wurden bisher zwei Klassen beschrieben, die sich in Aufbau, Cofaktorzusammensetzung und Sauerstoffempfindlichkeit unterscheiden. Diese sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.3.1 Cu,Mo-enthaltende CODHs

Cu,Mo-CODHs sind heterotrimere Enzyme und treten in mehreren aerob-lebenden Organismen, wie z.B. *Oligotropha carboxidivorans*, auf [34, 35]. Im Organismus spielt dieses Enzym die Schlüsselrolle bei der Energiekonservierung, wenn *O. carboxidivorans* mit CO als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wächst [36] und katalysiert die CO-Oxidation mit einem k_{cat} von 93.2 s^{-1} und K_M für CO von $10.7 \text{ }\mu\text{M}$ [37]. Kristallstrukturen des voll-aktiven Enzyms (23 U/mg) bei atomarer Auflösung zeigten ein aktives Zentrum, welches aus einem

zweikernigen Cu,Mo-Zentrum besteht [38]. Abbildung 7 zeigt Struktur, Cofaktorzusammensetzung und Mechanismus der Cu,Mo-CODH_{Oc} [10].

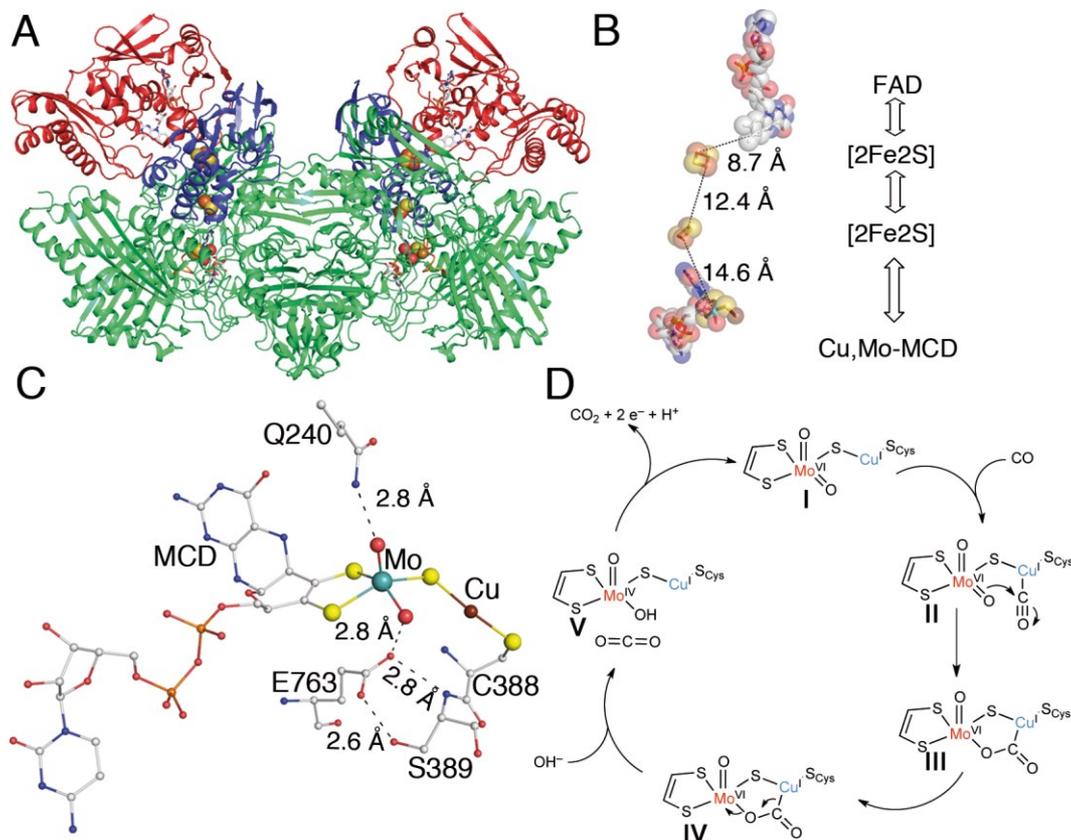


Abbildung 7: Struktur und Mechanismus der Cu,Mo-CODH_{Oc}. A) Gesamtstruktur der Cu,Mo-CODH_{Oc} im Bändermodell. Die L-Einheiten sind in grün, M-Untereinheiten in rot und S-Untereinheiten in blau dargestellt (PDB-ID: 1N61) [38]. B) Cofaktorzusammensetzung und -abstände innerhalb eines LMS-Monomers. C) Zusammensetzung des [CuSMo(=O)O]-Clusters im aktiven Zentrum. Die Darstellung im Kugelstabmodell erfolgte zusammen mit wichtigen Aminosäureresten der näheren Koordinationsumgebung. D) Mechanismus der CO-Oxidation. Im oxidierten Zustand (I) bindet CO an das Cu(I)-Ion (II). Durch nukleophilen Angriff des äquatorialen Oxo-Liganden bildet sich ein Mo(VI)-O-C(=O)-Cu(I)-metallazyklisches Zwischenprodukt (III). Nach Umlagerung (IV) und unter Bindung einer Hydroxylgruppe wird CO₂ freigesetzt (V). Das Mo(IV)-Cu(I)-Zentrum wird durch sequentielle Abgabe von zwei Elektronen und einem Proton in den Ausgangszustand (I) zurückversetzt. Verändert nach Referenzen: [10, 39].

Das Mo-Ion trägt einen axialen Oxo- (Mo=O) und einen horizontalen Hydroxo-Liganden (Mo-OH) und ist durch eine Endithiolat-Funktion an den Pyranring des Molybdopterin gebunden. Zusätzlich verbrückt ein μ -Sulfido-Ligand das Mo-Zentrum mit einem Cu-Ion. Die Katalyse wird dabei vom [CuSMo(=O)O]-Cluster ausgeführt, wobei das Mo-Atom im Laufe des Reaktionszyklus Oxidationsstufen zwischen +VI und +IV durchläuft.

1.3.2 Ni,Fe-enthaltende CODHs

Vorkommen und Funktion

Nickel,Eisen-CO-Dehydrogenasen (Ni,Fe-CODHs) kommen in einer Vielzahl von anaerob lebenden Bakterien und Archaeen vor und sind an unterschiedlichen Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung beteiligt [40, 41]. Diese Enzyme enthalten mindestens fünf sauerstoffempfindliche FeS-Cluster (D, B, C), wobei B- und D-Cluster eine Elektronentransferkette zum katalytisch aktiven C-Cluster bilden.

Es existieren insgesamt vier unterschiedliche Klassen von CODHs. Enzyme der Klassen I und II sind ACS/CODH-Komplexe (bifunktionelle CODHs), welche in obligat autotrophen Methanogenen die Synthese von Acetyl-CoA aus CO₂ und H₂ katalysieren (Klasse I) bzw. an der acetoklastischen Methanogenese (Klasse II) mitwirken. Diese bestehen aus fünf verschiedenen Untereinheiten (α , β , γ , δ und ϵ), wobei die α -Einheit die eigentliche CODH-Einheit ist und fünf verschiedene Metallcluster (B, C, D, F und E) enthält.

Klasse III Enzyme werden in Homoacetogenen gefunden und enthalten zwei autonome Proteine, ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer (ACS/CODH) und ein γ,δ -Dimer (CoFeSP). Dabei sind die α -, β -, γ -, und δ -Untereinheiten der Klasse III homolog zu den β -, α -, γ - und δ -Untereinheiten der Klassen I/II. Die ϵ -Einheit der Klassen I/II besitzt hingegen keine Entsprechung in den anderen Beiden. Die Klassen I, II und III haben gemeinsam, dass sie sowohl die CO/CO₂-Konversion, als auch die Synthese und den Abbau von Acetyl-CoA katalysieren [40].

Enzyme der Klasse IV sind monofunktionelle α_2 -Homodimere und entsprechen den α -Untereinheiten der Klasse I/II und der β -Untereinheit der Klasse III. CODHs der Klasse IV wurden zuerst aus *Rhodospirillum rubrum* [42] und *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* [43] isoliert und charakterisiert.

Struktur und Aufbau

Bisher wurden die Kristallstrukturen von Ni,Fe-CODHs von vier unterschiedlichen Organismen gelöst, wobei drei aus Bakterien (*C. hydrogenoformans*, *R. rubrum*, *Moorella thermoacetica*) [44-47] und eine aus Archaeen (*Methanosarcina barkeri*) [48] stammten. Im Jahre 2001 konnten die Kristallstrukturen zweier Enzyme der Klasse IV berichtet werden, wobei diese aus *C. hydrogenoformans* (CODH-II_{Ch}) [44] und *R. rubrum* (CODH_{Rr}) [45] isoliert wurden. Schließlich wurde die erste Struktur einer bifunktionellen CODH im Jahre 2002 gelöst [46]. Die Strukturen der charakterisierten mono- und bifunktionellen Ni,Fe-CODHs aus *C. hydrogenoformans* und *M. thermoacetica* sind in Abbildung 8 dargestellt.

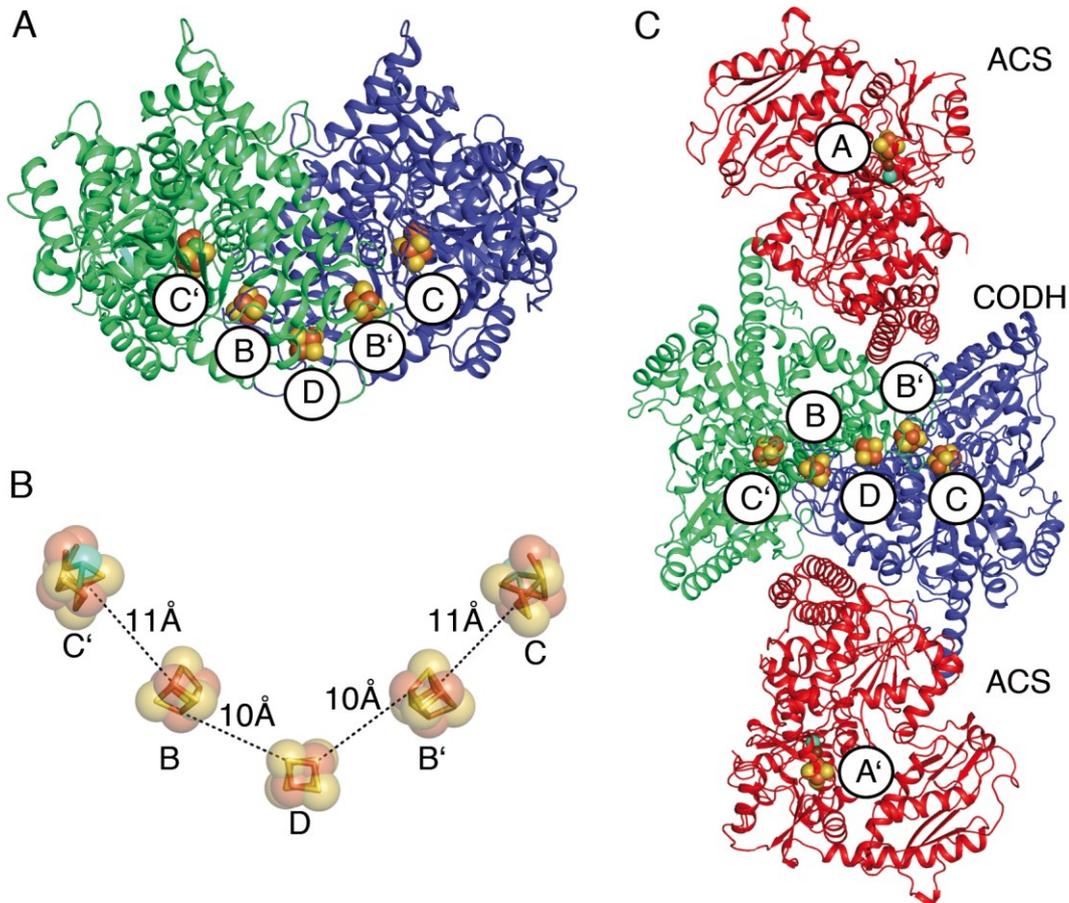


Abbildung 8: Gesamtstruktur von CODH-II_{Ch} und CODH/ACS_{Mt}. A) Bändermodell der homodimeren CODH-II_{Ch} (PDB-ID: 1SU8) [49]. Die beiden Monomere sind grün bzw. blau gefärbt und die Metallcluster sind als Sphären dargestellt. B) Räumliche Anordnung der Metallcluster in CODH-II_{Ch} mit den kürzesten Abständen redoxaktiver Bestandteile. C) Bändermodell von CODH/ACS_{Mt} (PDB-ID: 1MJG) [46]. Die CODH-Untereinheiten sind grün bzw. blau und die ACS-Untereinheiten rot dargestellt. Fe-Atome sind orange, S- gelb, Ni- cyan und Cu- als dunkelrote Sphären gezeigt. Cluster von unterschiedlichen Ketten sind mit ' gekennzeichnet.

Mono- und bifunktionelle CODHs zeigen eine pilzartige Architektur, wobei die beiden monomeren Untereinheiten durch ein kubanes [4Fe4S]-Cluster (D-Cluster) kovalent verbunden sind (Abb. 8A). Im weiteren Verlauf soll der Aufbau anhand der enthaltenen Metallcluster näher beleuchtet werden. Dazu werden die Aminosäuren entsprechend der Nummerierung in CODH-II_{Ch} vorgestellt.

In direkter Nähe zur Proteinoberfläche befindet sich das D-Cluster. Zwei Cys-Reste (Cys39 und Cys47) eines Monomers koordinieren hierbei die beiden verbrückenden Fe-Atome der [2Fe2S]-Clusteruntereinheit. In 10 Å Entfernung befindet sich das B-Cluster (bzw. B'-Cluster). Dieses [4Fe4S]-Cluster wird von vier Cystein-Resten koordiniert (Cys48, Cys51, Cys56 und Cys70). Durch Dimerisierung werden in monofunktionellen CODHs jeweils die B- und C-Cluster der verschiedenen Monomere nebeneinander angeordnet. Cluster C ist ein

[Ni₄Fe₄S]-Cluster und befindet sich in 11 Å Entfernung des B'-Clusters. Dieses wird durch Koordination von fünf Cystein-Resten (Cys295, Cys333, Cys446, Cys476 und Cys526) und einem Histidin-Rest (His251) mit der Proteinmatrix verbunden.

Durch die räumliche Anordnung von drei [4Fe₄S]- und zwei [Ni₄Fe₄S]-Clustern, kann eine Elektronentransferkette C'-B-D bzw. C-B'-D vorgeschlagen werden (Abb. 8B). Dabei liegen die Abstände im Bereich typischer biologischer Elektronentransferreaktionen [50, 51]. Auf diese Weise besteht eine „Stromleitung“ zwischen katalytischem Zentrum und Solvens, wo Elektronen durch Ferredoxine oder andere Elektronentransferpartner zur Verfügung gestellt oder abtransportiert werden können.

Neben den erwähnten Strukturen der monofunktionellen CODHs, wurden auch Strukturen des Klasse III Komplexes (ACS/CODH) aus *M. thermoacetica* gelöst [46, 47]. Dabei ist die Struktur mit ACS in der geöffneten Konformation in Abbildung 8C dargestellt. ACS besteht aus einer N-terminalen, einer mittleren und einer C-terminalen Domäne, die durch flexible *linker*-Regionen verbunden sind [46, 47, 52]. Die N-terminale Domäne besitzt eine Rossmannfaltung und interagiert mit der Dimerisierungsregion der CODH-Komponente. Die C-terminale Domäne trägt das katalytisch aktive A-Cluster. Dabei handelt es sich um ein Ni₃Ni-[4Fe₄S]-Cluster, welches die finale Kondensation von CO mit einer Methylgruppe und CoA zum Acetyl-CoA katalysiert. Lange Zeit war die Metallzusammensetzung des A-Clusters unklar. So wurden neben dem stabilen distalen Ni_d, sowohl Cu [46] als auch Zn [47] gefunden. Aufgrund von Aktivitätskorrelationen mit dem Ni-Gehalt und der ebenfalls für ACS aus *C. hydrogenoformans* bestätigten Ni₃Ni-Komposition (mit einem labilen Ni_p) [52], ist diese Form als aktiv und katalytisch kompetent akzeptiert. Der Mechanismus wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (siehe [53-56]). Ein hydrophober Gas-Tunnel mit einer Länge von 70 Å wurde durch Xenon-Derivatisierung identifiziert und zeigte, wie der interne Transfer des CO vom C- zum A-Cluster verläuft [57].

Im Jahr 2008 konnte schließlich die Kristallstruktur der α₂ε₂-CODH-Untereinheit einer Klasse I Acetyl-CoA-Synthase/Decarboxylase (CODH/ACDS) aus *M. barkeri* gelöst werden [48]. Die CODH-Komponente zeigt dabei eine deutliche Übereinstimmung mit den bereits bekannten Komponenten aus nicht-Methanogenen. Zwei zusätzliche [4Fe₄S]-Cluster konnten identifiziert werden, die in Elektronentransferdistanz zum B/B'-Cluster liegen. Im Weiteren soll nun das katalytisch aktive C-Cluster in seiner Struktur und seinen elektronischen Zuständen näher beleuchtet werden.

Elektronische Zustände und Struktur des C-Clusters

Bevor die Struktur der CODH und damit des C-Clusters aufgeklärt wurde, konnten Untersuchungen mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) wichtige Einsichten in die elektronischen Zustände des C-Clusters liefern. Dabei wurden vier unterschiedliche Redoxzustände des C-Clusters (C_{ox} , C_{red1} , C_{red2} und C_{int}) gefunden [40]. Diese Zustände sind mit den individuellen Mittelpunktpotentialen und ihren spezifischen Inhibitoren in Abbildung 9 aufgeführt.

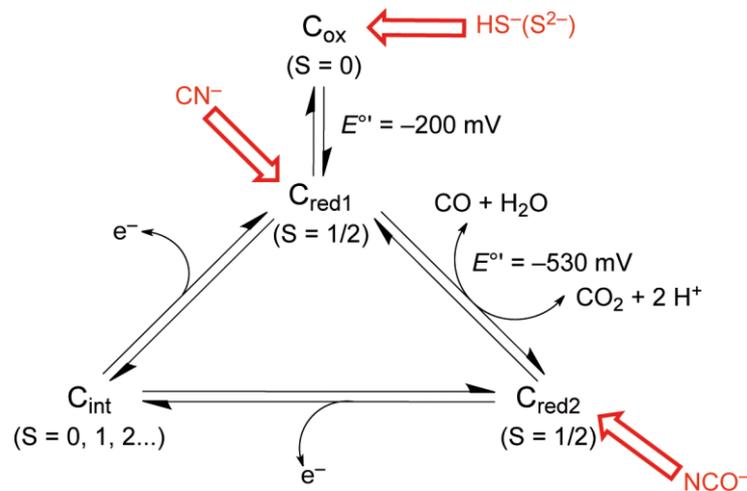


Abbildung 9: Redoxzustände des C-Clusters. Elektronische Zustände sind zusammen mit ihren Spinzuständen, Mittelpunktpotentialen und ihren spezifischen Inhibitoren dargestellt. Verändert nach: [58].

Der ESR-stille, katalytisch inaktive C_{ox} -Zustand wird bei Redoxpotentialen unterhalb von -200 mV durch Einelektronen-Reduktion in den ESR-aktiven C_{red1} -Zustand überführt [40, 59]. Dabei konnte eine paramagnetische Spezies ($S = 1/2$) mit fast identischem ESR-Signal für $CODH_{Mt}$ ($g_{av} = 1.82$), $CODH_{Rr}$ ($g_{av} = 1.87$) und $CODH-I_{Ch}$ ($g_{av} = 1.87$) beobachtet werden [60-64]. C_{red1} ist der katalytisch kompetente Zustand für die CO-Oxidation und wird nach Reaktion in den Zweielektronen-reduzierten C_{red2} -Zustand überführt. Das Mittelpunktpotential des C_{red2} -Zustands von $E^\circ = -530 \text{ mV}$ [60, 61], stimmt dabei gut mit dem Wert für das CO_2/CO -Redoxpaar ($E^\circ = -558 \text{ mV}$) überein [65]. Der C_{red2} -Zustand zeigt im Gegensatz zu C_{red1} geringfügige Verschiebungen im paramagnetischen Resonanzspektrum zu $g_{av} = 1.86$ (mit $g_1 = 1.97$, $g_2 = 1.87$ und $g_3 = 1.75$) [60, 63]. Der genaue Verbleib der beiden Elektronen ist jedoch weiterhin unklar. So wurden unterschiedliche Modelle vorgeschlagen, bei denen Ni^0 , ein Ni^{2+} -Hydrid oder eine dative Metall-Metall-Bindung zwischen Ni und Fe involviert sind [40, 66, 67].

Die reduktive Halbreaktion des Reaktionszyklus wird von der oxidativen Halbreaktion gefolgt. In dieser wird zunächst ein Elektron zum B-Cluster transferiert, wobei sich ein transienter Zwischenzustand C_{int} ausbildet, der keine paramagnetische Signatur besitzt.

Mithilfe der Elektronentransferkette wird schließlich ein weiteres Elektron vom C-Cluster freigesetzt, welches diesen in den CO-reaktiven C_{red1} -Zustand zurückversetzt [68].

Elektrokatalytische Untersuchungen mittels Protein-Film-Elektrochemie konnten kürzlich zeigen, dass Inhibitoren der CODH spezifisch an definierte Redoxzustände binden [64]. So inhibiert S^{2-} (bzw. HS^-) spezifisch den C_{ox} -Zustand und ist wahrscheinlich der Grund für die Beobachtung eines μ_2 -Sulfido-verbrückten Zustands, welcher in der ersten Kristallstruktur von CODH-II_{Ch} gefunden wurde [44].

Ferner wurde gezeigt, dass Cyanid (CN^-) spezifisch den C_{red1} -Zustand inhibiert und durch tiefere Potentiale unterhalb des $C_{\text{red1}}/C_{\text{red2}}$ -Übergangs wieder freigesetzt wird [64]. Cyanid ist bekannt als langsam-bindender Inhibitor der CO-Oxidation [69] und verschiebt das C_{red1} -Spektrum nach Bindung auf charakteristische Weise mit resultierenden g -Werten von 1.87, 1.78 und 1.55 [70].

Cyanat (NCO^-), welches isoelektronisch zu CO_2 und N_3^- ist, adressiert spezifisch den C_{red2} -Zustand und inhibiert dadurch die CO_2 -Reduktion [64]. Die NCO^- -Bindung an das C-Cluster ist ähnlich langsam wie die Bindung von Cyanid und führt zu einer Verstärkung des C_{red2} -Spektrums, wobei dieses keine nennenswerten Veränderungen zeigt [64].

Die Struktur des aktiven C-Clusters konnte von der Kristallstruktur von CODH-II_{Ch} bei einem Potential von -320 mV abgeleitet werden [71]. Dazu wurden CODH-Kristalle mit 5 mM Dithiothreitol inkubiert und die Struktur anschließend bestimmt. Bei dem gewählten Potential wurde ein Zustand analog zum C_{red1} -Zustand erwartet. Das C-Cluster ist ein $[Ni_4Fe_4S-OH_x]$ -Cluster, in dem das Ni-Ion eine Eckposition der kubantyp-Unterstruktur besetzt. Ein Fe^{2+} -Atom ist durch einen anorganischen Schwefel-Liganden als Exo-Ligand mit dieser Unterstruktur verknüpft und wird seinerseits von einem Cystein- und einem Histidin-Liganden koordiniert [44, 45, 49, 71]. Das Fe(II)-Ion konnte bereits spektroskopisch erfasst werden und wird auch als *Ferrous-Component II* (FCII) bezeichnet. Im Jahr 2007 konnten entscheidende Einblicke in den Reaktionsmechanismus der CODH-II_{Ch} gewonnen werden, als die Kristallstruktur in unterschiedlichen Redoxzuständen und Gegenwart von CO_2 bestimmt wurde [71]. Diese Strukturen sind in Abbildung 10 aufgeführt.

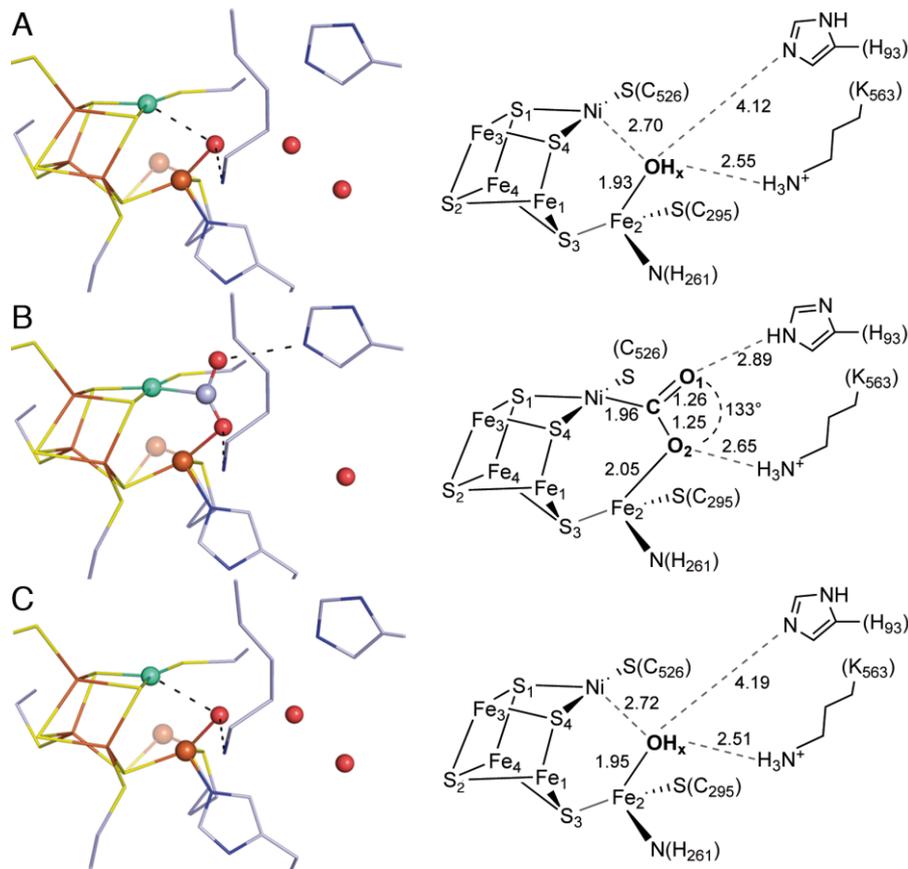


Abbildung 10: Strukturen des C-Clusters in unterschiedlichen Redoxzuständen. Dargestellt ist das C-Cluster im -600 mV- (A), -600 mV + CO_2 - (B) und -320 mV-Zustand (C). Neben dem Kugelstabmodell ist eine schematische Darstellung mit interatomaren Distanzen (in Å) aufgeführt. Die C-Atome sind graublau, S-Atome gelb, Fe-Atome orange, Ni-Atome cyan, O-Atome rot und N-Atome blau dargestellt. Dabei ist die gering besetzte alternative Konformation von Fe2 (Fe2B) transparent gezeigt. Die Auflösung der verwendeten Strukturen war 1.40 Å (A, PDB-ID: 3B51), 1.50 Å (B, PDB-ID: 3B52) und 1.48 Å (C, PDB-ID: 3B53) [71].

Zur Erzeugung des -600 mV-Zustands (äquivalent zum $\text{C}_{\text{red}2}$) wurden Kristalle mit dem starken Reduktionsmittel Ti^{3+} -Citrat behandelt (Abb. 10A) [71]. Dabei wurde ein $[\text{Ni}_4\text{Fe}_4\text{S-OH}_x]$ -Cluster vorgefunden, wobei Fe2 einen Wasser oder- Hydroxyl-Liganden (OH_x) trägt, der sich in 2.7 Å Abstand vom Ni-Atom befindet. Fe2 besitzt neben einer Hauptkonformation (Fe2A) auch eine gering besetzte Alternativkonformation (Fe2B), wobei das Besetzungszahlverhältnis in den beobachteten Zuständen typischerweise bei 60 zu 40 % (A/B) liegt. Durch „soaking“ der reduzierten Kristalle mit NaHCO_3 -Lösung im Beisein von Ti^{3+} -Citrat (Umsatzbedingung), wurde der -600 mV + CO_2 -Zustand hergestellt. Dabei wurde ein $[\text{Ni}_4\text{Fe}_4\text{S-CO}_2]$ -Cluster (Abb. 10B) identifiziert, wobei CO_2 als verbrückender Ligand vom μ_2 - η^2 -Typ zwischen Ni und Fe2 auftritt. Das gebundene CO_2 wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu His93 und Lys563 stabilisiert und zeigt eine gewinkelte Struktur mit einem $\text{O}_1\text{-C-O}_2$ -Winkel von 133° . Zusätzlich wurden intramolekulare

Bindungslängen von 1.26 (r_{C-O1}) und 1.25 Å (r_{C-O2}) für die Verfeinerung beibehalten. Die Bindung des CO₂ an das C-Cluster wird durch Bindungslängen von 1.96 Å für die Ni-C-Bindung und 2.05 Å für die Fe2-O2-Bindung charakterisiert.

Nach Behandlung der Kristalle mit dem Reduktionsmittel Dithiothreitol wurde der –320 mV-Zustand hergestellt und die Struktur bestimmt. Hierbei zeigte sich analog zum –600 mV-Zustand ein Wasser- oder Hydroxyligand (OH_x) am Fe2, der sich in 2.7 Å Entfernung zum Ni-Ion befindet (Abb. 10C).

Reaktionsmechanismus der CO-Oxidation

Ni₂Fe-CODHs sind hocheffiziente CO_x-Transformatoren. CODH-II_{Ch} katalysiert die reversible CO-Oxidation mit einem k_{cat} -Wert von 31,000 s⁻¹ (bei 80 °C) und einem K_M -Wert für CO von 18 μM [43]. Die Spezifitätskonstante für die CO-Oxidation liegt dabei nahe an der Diffusionsgrenze ($k_{cat}/K_M = 1.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). In Abbildung 11 ist der Reaktionsmechanismus auf Basis der Kristallstrukturen von CODH-II_{Ch} (Abb. 10, [71]) und Einsichten aus spektroskopischen Untersuchungen dargestellt [60-63].

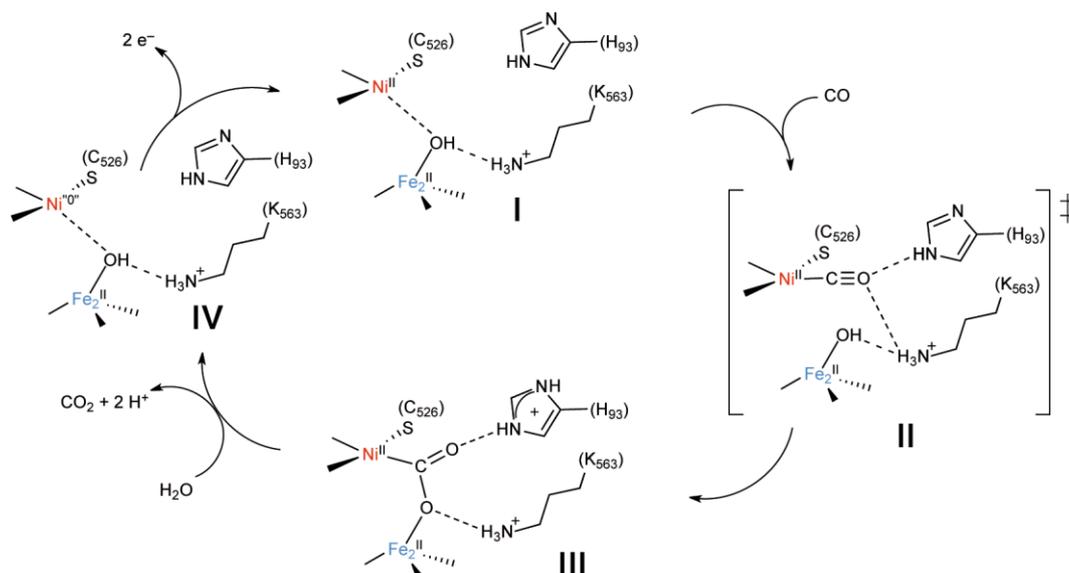


Abbildung 11: Mechanismus der CO-Oxidation für CODH-II_{Ch}. I) Im C_{red1}-Zustand befindet sich ein Hydroxyligand am Fe2 und wird durch ionische Wechselwirkungen mit Lys563 aktiviert. CO erreicht das C-Cluster durch einen hydrophoben Kanal, der über dem Ni-Atom endet. II) CO bindet an das Ni-Atom in einer quadratisch-planaren Geometrie und wird durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zu His93 und Lys563 stabilisiert. Im Übergangszustand befindet sich die Hydroxylgruppe in Angriffs-Distanz und greift nukleophil am Kohlenstoffatom des CO an. III) Das Oxidationsprodukt CO₂ ist als verbrückender Ligand am C-Cluster gebunden. IV) Bindung eines Wassermoleküls verdrängt das Produkt CO₂ zusammen mit zwei Protonen aus dem aktiven Zentrum und führt zum Zweielektronen-reduzierten C_{red2}-Zustand. Die sequentielle Freisetzung zweier Elektronen führt über C_{int} zu C_{red1} zurück.

Im katalytisch kompetenten C_{red1} -Zustand enthält das C-Cluster einen Hydroxyliganden am Fe^{2+} -Ion (**I**). In diesem Zustand erreicht das Substrat CO das C-Cluster über einen hydrophoben Gaskanal. Es bindet entweder zunächst an die apikale Bindungsstelle des Ni-Ions und lagert sich zur äquatorialen Position um oder bindet direkt in die äquatoriale Bindestelle. Wasserstoffbrückenbindungen mit His93 und Lys563 stabilisieren die äquatoriale Position und erhöhen die Polarisierung des CO. Dies führt schließlich zum nukleophilen Angriff des Hydroxyliganden (**II**). Das resultierende Carboxylat befindet sich als verbrückender Ligand zwischen Ni und Fe2 und wird durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Lys563 und Wasserstoffbrückenbindungen mit His93 stabilisiert (**III**). Die anschließende Bindung eines Wassermoleküls führt zur Freisetzung des CO_2 und zweier Protonen. Das C-Cluster befindet sich im C_{red2} -Zustand, wobei die genaue Lokalisation der zwei Elektronen unbekannt ist (**IV**). Schließlich erfolgt die sequentielle Freisetzung der beiden Elektronen über das B-Cluster und führt zum C_{red1} -Zustand zurück.

Strukturen von inhibierten Zuständen und Reaktionsprodukten am C-Cluster

Zahlreiche Strukturen von inhibierten Formen von Ni,Fe-CODHs konnten gelöst werden und erlauben Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus und die Reaktivität des C-Clusters [44, 72, 73]. Zusätzlich konnte die Struktur des Reaktionsprodukts der n-Butylisocyanid-Oxidation am C-Cluster aufgeklärt und eine neue Form der Ni-C-Bindung beschrieben werden [74]. In Abbildung 12 sind die einzelnen Strukturen dargestellt und werden im Weiteren näher diskutiert.

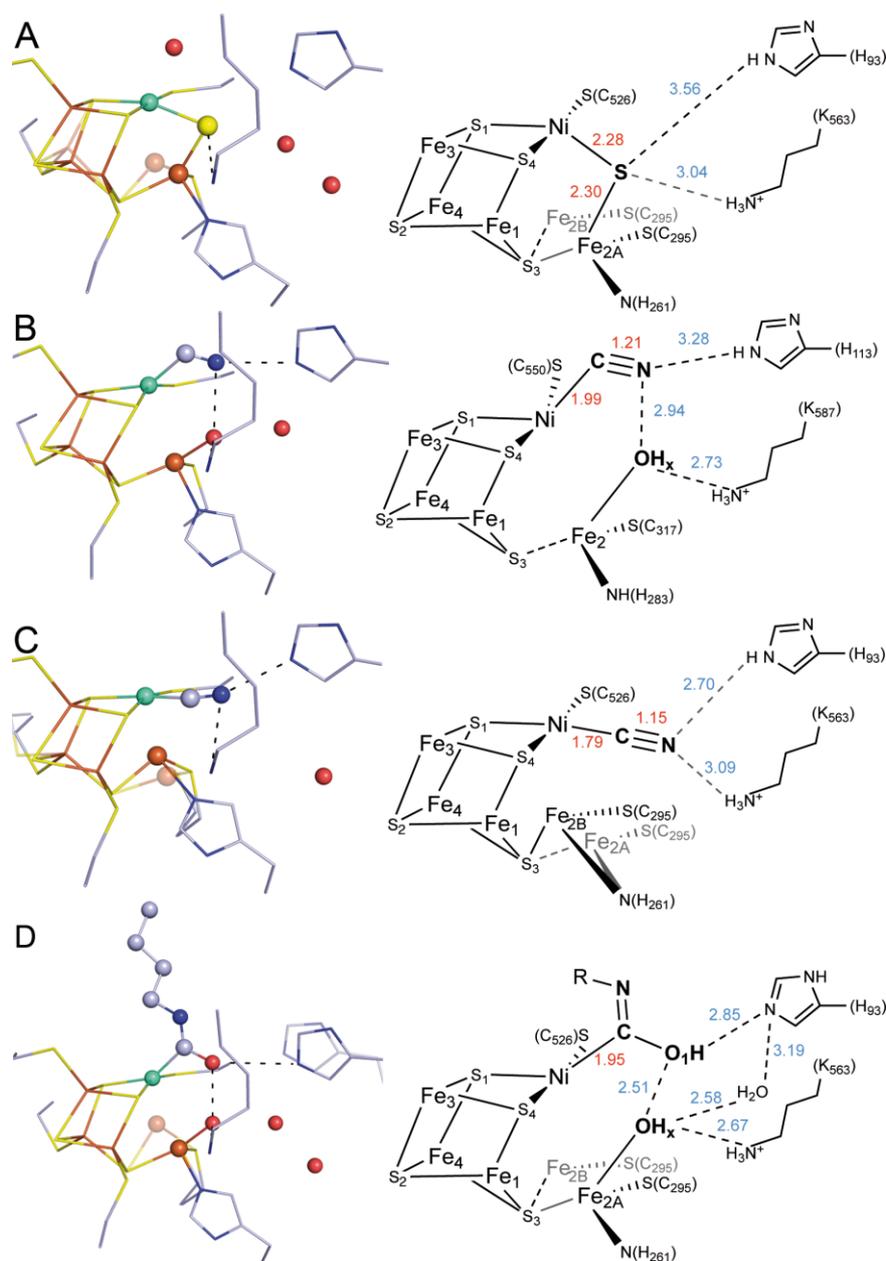


Abbildung 12: Strukturen des C-Clusters mit unterschiedlichen Inhibitoren und Reaktionsprodukten.

Gezeigt sind Kugelstabmodelle der einzelnen Strukturen (links) und Strukturformeln mit relevanten Bindungslängen (rechts, in Å). A) Sulfid-gebundene Struktur (PDB-ID: 1SUF) [44, 49]. B) Gewinkelte Konformation des Cyanid-inhibierten C-Clusters von ACS/CODH_{Mt} (PDB-ID: 3I04) [73]. C) Lineare Konformation des Cyanid-inhibierten C-Clusters der CODH-II_{Ch} (PDB-ID: 3I39) [72]. D) Komplex von CODH-II_{Ch} mit n-Butylisocyanat (PDB-ID: 2ZYV) [74]. Die Färbung der einzelnen Atome erfolgte elementspezifisch.

Bereits die erste publizierte Struktur von CODH-II_{Ch} [44] beherbergte mit einem μ -Sulfid einen unerwarteten Liganden am C-Cluster (Abb. 12A). Dieser bindet mit Abständen von 2.28 und 2.30 Å als verbrückender Ligand zwischen Ni und Fe2 und führt zu einem [Ni4Fe5S]-Cluster. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Sulfid ein Inhibitor der CO-Oxidation ist [59] und spezifisch an den C_{ox}-Zustand bindet [64].

Cyanid (CN^-) ist isoelektronisch zu CO, inhibiert die CO-Oxidation und bindet spezifisch an das C-Cluster im C_{redI} -Zustand unter Ausbildung eines charakteristischen ESR-Signals [40, 64, 75]. CN^- wirkt als reversibler, langsam-bindender Inhibitor mit einer Bindungskonstante von $21.7 \mu\text{M}$ für CODH-II $_{Ch}$ [69, 76], wobei die Inkubation mit CO und/oder starken Reduktionsmitteln (Ti^{3+} -Citrat) zu einer vollständigen Reaktivierung führt [76]. Röntgenkristallographische Studien konnten zwei unterschiedliche Bindungsarten für den Cyanid-inhibierten Zustand identifizieren: In CODH/ACS $_{Mt}$ bindet das CN^- -Ion an die offene apikale Bindungsstelle des Ni in einer nicht-linearen Konformation (Abb. 12B) [73], wohingegen in CODH-II $_{Ch}$ eine lineare Bindung des Cyanids, unter Ausbildung einer quadratisch-planaren Geometrie am Ni-Atom, gefunden wurde (Abb. 12C) [72]. Die beiden Konformationen der Cyanid-Bindung stehen im Einklang mit kinetischen Untersuchungen unter *steady-state*-Bedingungen [69]. Dadurch konnte folgendes Modell vorgeschlagen werden: CN^- bildet zunächst einen schnellen, reversiblen Komplex mit dem Ni-Atom des C-Clusters. Durch langsame Umlagerungen resultiert ein finaler Zustand mit fest-gebundenem Cyanid [72, 77].

Schließlich führt die Oxidation von n-Butylisocyanid (nBIC) am C-Cluster der CODH-II $_{Ch}$ zum produktgebundenen Komplex, in dem n-Butylisocyanat in einer tetraedrischen Geometrie gefunden wurde (Abb. 12, D). Diese Beobachtung steht im Einklang zu den Strukturen der ACS/CODH $_{Mt}$ mit CN^- und der CODH-Komponente des ACDS-Systems aus *M. barkeri* mit CO, in denen ebenfalls eine tetraedrische Geometrie der Ni-C-Bindung identifiziert wurde [48, 73].

Zelluläre Funktionen der CODHs in *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*

C. hydrogenoformans ist ein thermophiles, hydrogenogenes Bakterium, gehört zum Phylum *Firmicutes* (niedere GC Gram-positive) und wurde zuerst aus einer heißen Quelle auf Kunaschir (Kurilen-Archipel, Russland) isoliert [78]. Das Bakterium nutzt die Oxidation von CO als Energiequelle, wobei Wasser als Elektronenakzeptor verwendet wird. Auf diese Weise entstehen als Produkte CO_2 und H_2 . Die Wichtigkeit der CODHs für den Organismus zeigt sich in *C. hydrogenoformans* durch die Existenz von mindestens fünf Genen, die für die katalytische Untereinheit (*cooS*) einer CODH kodieren [79]. Dabei sind diese über das Genom verstreut und unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Sequenz. Aufgrund der vorhergesagten Funktionen benachbarter Gene, können Rückschlüsse auf die zellulären Funktionen der einzelnen CODHs gezogen werden. In Abbildung 13 befindet sich eine

schematische Übersicht der Genomlokalisierung der einzelnen *cooS*-Gen-Cluster in *C. hydrogenoformans*.

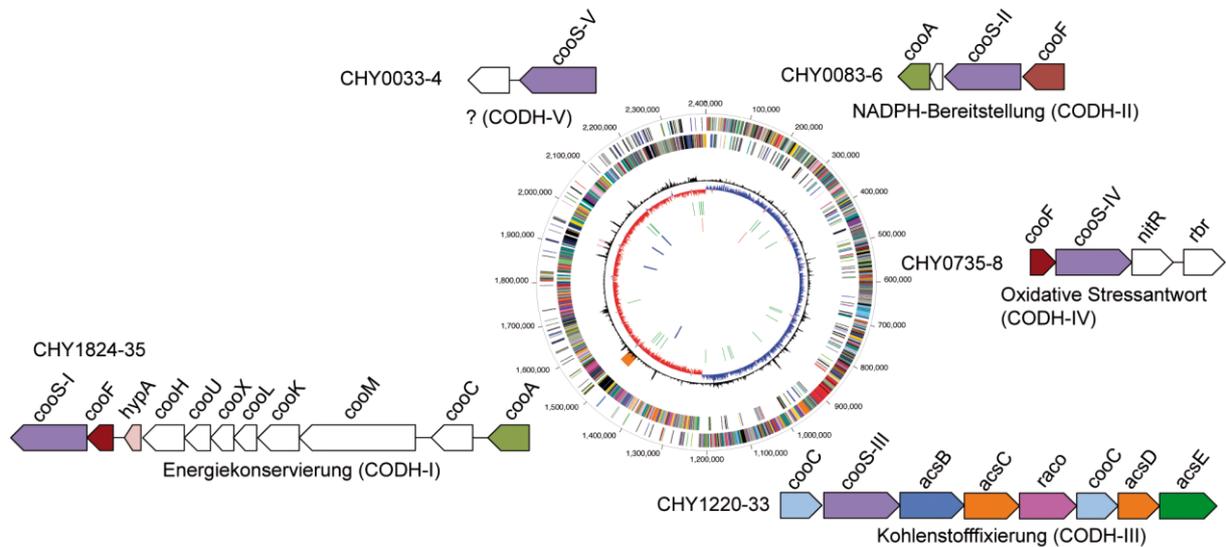


Abbildung 13: Lokalisation der fünf verschiedenen CODH-codierenden Gene in *C. hydrogenoformans*. Dargestellt sind die Gencluster der einzelnen *cooS*-Gene, die für die CODH-Homologe I-V kodieren. Mögliche zelluläre Funktionen sind für vier CODHs (CODH-I bis -IV) annotiert. Verändert nach Referenz: [79].

Das *cooS*-I-Gen befindet sich direkt unterhalb eines Hydrogenase-Genclusters (*cooM_{KLXUH}*) und der codierenden Sequenz für ein Elektronentransferprotein (*cooF*). Es konnte gezeigt werden, dass die Bestandteile des gesamten Genclusters (CHY1824-35) einen membran-gebundenen Komplex bilden, der *in vitro* CO und H₂O zu CO₂ und H₂ umsetzt [43, 80]. Ein homologer CODH/Hydrogenase-Komplex ist in *R. rubrum* für die CO-getriebene Protonen-Respiration verantwortlich, wobei die Energiekonservierung durch Ausbildung eines Protonengradienten entlang der Zellmembran stattfindet [81].

Das *cooS*-II-Gen, welches für die strukturell charakterisierte CODH-II_{Ch} kodiert, wurde ursprünglich zusammen mit dem assoziierten *cooF*-Gen kloniert [82] und das funktionelle Homodimer wurde gereinigt [43]. Es konnte gezeigt werden, dass CODH-II_{Ch} membran-assoziiert ist und im Zusammenspiel mit unbekanntem cytosolischen Partnerenzymen zur NADPH-Bereitstellung beiträgt [43]. Im Jahr 2001 wurde die Struktur der CODH-II_{Ch} gelöst [44] und im Weiteren als Modellsystem für strukturelle Untersuchungen verwendet [71, 72, 74].

Das Gen *cooS*-III kodiert für die CO₂/CO-konvertierende Untereinheit einer bifunktionellen CODH, die als stabiler Komplex mit ACS (*acsB*) auftritt und den finalen Schritt des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs katalysiert. Die einzelnen Gene im Cluster kodieren für ATP-abhängige Maturasen (*cooC*), die beiden Untereinheiten des Corrinoid-FeS-Proteins

(*acsC/acsD*) [83], einen reduktiven Aktivator von CoFeSP (*raco*) [84, 85] und eine Methyltransferase (*acsE*) [86]. Somit kann vermutet werden, dass CODH-III_{Ch} unmittelbar an der Kohlenstofffixierung beteiligt ist. Das *cooS*-III-Gen enthält eine intrinsische Rasterschubmutation, die zum Abbruch des Genprodukts nach nur 158 Aminosäuren führen würde (CODHs bestehen typischerweise aus mehr als 600 Aminosäureresten) [79]. So könnte diese Mutation eine Reaktion des Laborstamms auf die geänderten Wachstumsbedingungen sein, in denen permanent hohe Konzentrationen an CO als Kohlenstoffquelle im Kulturmedium enthalten waren. Für den Organismus ist die Verwendung einer CODH-III nicht nötig, weil das vorliegende CO direkt durch eine monomere Acetyl-CoA-Synthase umgesetzt werden kann [79].

Das Gencluster, in dem sich das *cooS*-IV Gen befindet, enthält neben einem *cooF*-Gen (Ferrodoxin) auch Gene, die für ein Rubrerythrin (*rbr*) und eine FAD-enhaltende Oxidoreduktase (*nitr*) kodieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass Rubrerythrin Peroxidase- und NitR NADPH-Oxidase-Aktivität besitzt [87]. Da anaerobe Organismen ein alternatives System zum Schutz vor oxidativem Stress verwenden, könnte CODH-IV_{Ch} zur Bereitstellung der benötigten Elektronen aus der CO-Oxidation beitragen [79].

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Genclustern, konnte für *cooS*-V kein Hinweis auf die zelluläre Rolle des Genprodukts erschlossen werden. Lediglich zwei Gene befinden sich in derselben Leserichtung in unmittelbarer Nähe unterhalb des *cooS*-V-Gens. Dabei kodiert ein Gen für einen mechanosensitiven Ionenkanal (*mscS*) und das andere für ein GTP-abhängiges Nukleinsäurebindeprotein (*ychF*).

In unterschiedlichen phylogenetischen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass sich das *cooS*-V-Gen in einer divergierten Außengruppe befindet und sich in andere Kläden, wie die *cooS*-Gene I bis IV, einordnet [79, 88]. Für eine Auswahl an CODHs wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Dieser ist in Abbildung 14 aufgeführt.

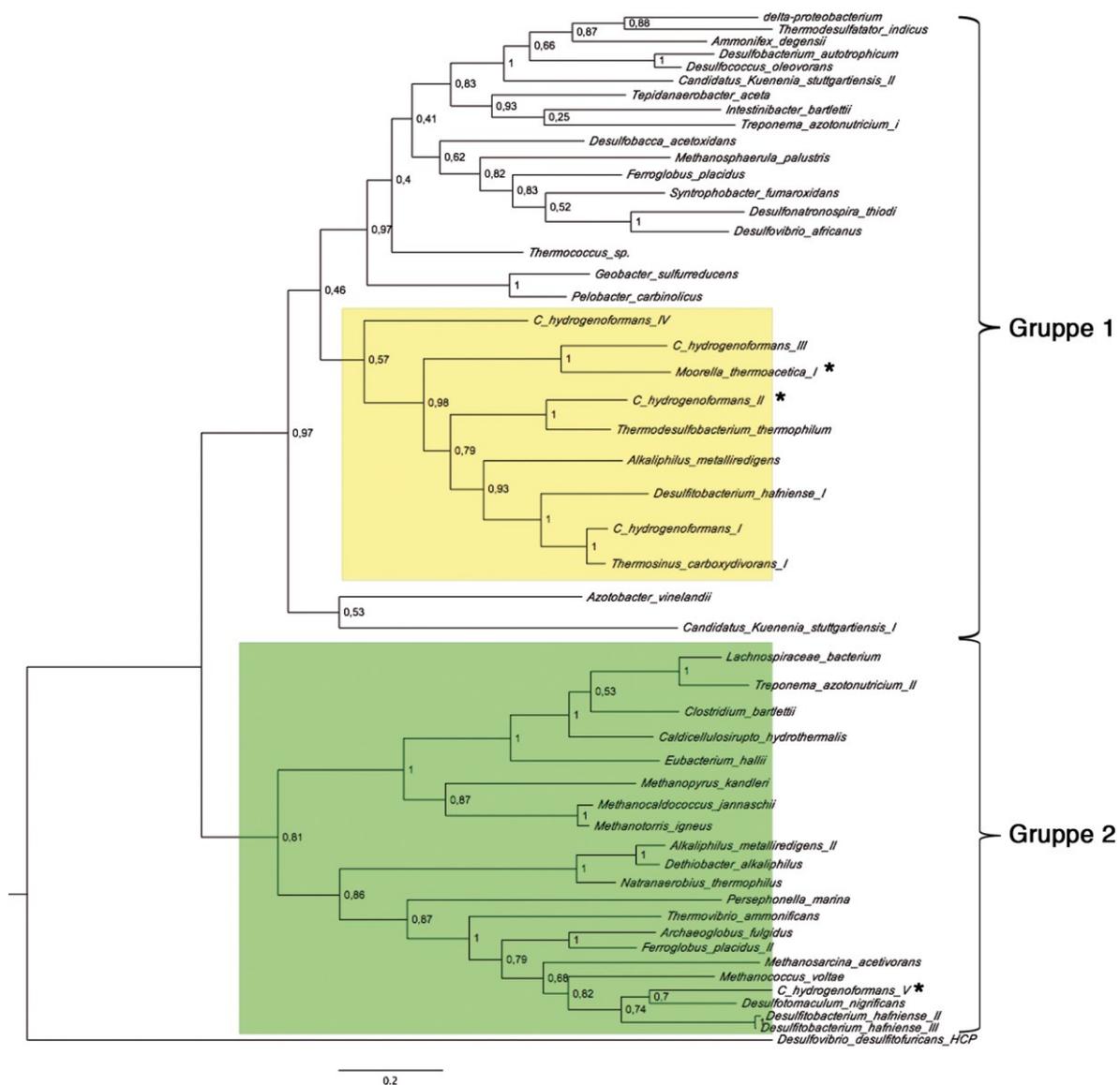


Abbildung 14: Phylogenetischer Baum für CO-Dehydrogenasen. Die Sequenz von CODH-II_{Ch} wurde als Suchsequenz verwendet und ein phylogenetischer Baum für die verwandten CODHs (51 Sequenzen) erstellt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Gruppen identifiziert. Gruppe 1: „wahre CODHs“, Gruppe 2: CODHs vom CODH-V_{Ch}-Typ. Als Außengruppe wurde die Sequenz des Hybrid-Cluster-Proteins aus *Desulfovibrio desulfuricans* verwendet. CODH-II_{Ch} und -V_{Ch} sowie die bifunktionelle CODH_{Mt}-Komponente sind mit * gekennzeichnet. Der phylogenetische Baum wurde mit MEGA6 [89] unter Verwendung der maximalen Wahrscheinlichkeitsmethode erstellt, durch die *Bootstrap*-Methode (100 Zyklen) überprüft und mit FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) grafisch dargestellt.

Die untersuchten CODHs ordnen sich im phylogenetischen Baum in zwei Gruppen ein. Dabei enthält Gruppe 1 eine Vielzahl von Sequenzen, worunter sich die charakterisierte Enzyme aus *M. thermoacetica* und *C. hydrogenoformans* (CODHs I bis IV) befinden („wahre CODHs“, gelb unterlegt). In Gruppe 2 ordnen sich ausschließlich uncharakterisierte CODHs ein, worunter sich auch CODH-V_{Ch} befindet (grün unterlegt).

Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Verständnis der katalytischen Vorgänge bei der Oxidation von CO bzw. der Reduktion von CO₂ in CODHs durch strukturelle Untersuchungen verbessert werden. Da die Struktur des $-600 \text{ mV} + \text{CO}_2$ -Zustands unter Umsatzbedingungen erzielt wurde, stellt sich die Frage, ob es sich um den C_{red2}-CO₂-Komplex handelt oder die Elektronen bereits vom reduzierten C-Cluster auf das Substrat geflossen sind (C_{red1}-CO₂²⁻). Diese Information kann durch Verfeinerung hochaufgelöster Strukturen nahe der 1 Å-Grenze gewonnen werden, wobei die Modelle ohne strukturelle Begrenzungen (*restraints*) verfeinert werden. Die resultierenden Bindungslängen und -winkel weisen dabei direkt auf den Grad der Aktivierung und die chemische Natur des Liganden hin. Mit Methoden aus der Analyse von Kleinmolekülstrukturen können die Standardabweichungen der resultierenden geometrischen Parameter ermittelt werden. Somit kann eine umfassende strukturelle Beschreibung erfolgen. Zusätzlich soll die Struktur des Cyanat-inhibierten Zustands der CODH-II_{Ch} gelöst werden und die strukturellen Grundlagen dieser Inhibition aufgeklärt werden. Vergleiche mit dem isoelektronischen Substrat CO₂ sollen Rückschlüsse auf die katalytischen Strategien bei der Aktivierung von kleinen Molekülen zulassen.

Die Untersuchung Cyanid-inhibierter Zustände zeigte bisher zwei verschiedene Geometrien für CODH-II_{Ch} und ACS/CODH_{Mt}. Da Cyanid ein langsam-bindender Inhibitor ist, wurde ein sequentielles Modell mit einer schnellen reversiblen Bindung und einer nachfolgenden strukturellen Umlagerung vorgeschlagen. Die Cyanid-gebundene Struktur der CODH-II_{Ch} entspricht dabei wahrscheinlich dem finalen inhibierten Zustand. Deshalb soll versucht werden, einen alternativen Cyanid-gebundenen Zustand im Kristall herzustellen und diesen strukturell zu charakterisieren.

Da der effektive Substrattransport zum bzw. der Produkttransport vom C-Cluster eine entscheidende Rolle für die hohen Umsatzraten spielt, sollen die Gaskanäle in CODH-II_{Ch} durch Xenon-Derivatisierung untersucht werden. So sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Kanalstruktur zwischen CODHs der Klassen III und IV näher beleuchtet werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein verlässliches Expressionssystem für das *cooS-V*-Gen etabliert und das Genprodukt im weiteren Verlauf biochemisch, spektroskopisch und strukturell charakterisiert werden. Dadurch sollen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen CODH-V_{Ch} und den bekannten CODHs identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und besaßen mindestens analytischen Reinheitsgrad. N₂ (99.99 %), N₂/H₂ (95/5 %) und CO (99.99 %) wurden von *Air Liquide* (Berlin) erhalten. Deionisiertes Wasser wurde aus einer Reinstwasseranlage (Merck Millipore, Darmstadt) entnommen. DNA-Amplifizierungen wurden mit Phusion-DNA-Polymerase von *New England Biolabs* (Frankfurt/Main) durchgeführt. Restriktionsenzyme, DNase-freies Wasser, T4-DNA-Ligase sowie Kits zur Plasmid-Isolierung, Reinigung von PCR-Produkten und Extraktion von Plasmid-DNA aus Agarose-Gelen, wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Alle verwendeten Chromatographie-Materialien stammten von *GE Healthcare* (München).

2.2 Anoxische Arbeiten

Proteinreinigungen, biochemische Charakterisierungen und Kristallisationsexperimente wurden in anoxischen Handschuhkästen (*model B, COY Laboratory*, Michigan, USA) unter einer Atmosphäre von 95 % N₂ und 5 % H₂ durchgeführt. Puffer und Lösungen wurden in Glasflaschen, die mit Butylgummisepten und Schraubverschluss geschlossen wurden, durch mehrere Zyklen (mindestens 4 Zyklen) von Evakuierung und Begasung mit N₂ an einer Vakuum-Gas-Anlage anoxisch gemacht.

2.3 Bakterienstämme und Antibiotika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Klonierungen *Escherichia coli* DH5 α -Zellen mit dem Genotyp F⁻ ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *phoA supE44* λ ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1* verwendet. Zur Genexpression fanden *E. coli* Rosetta(DE3)-Zellen mit dem Genotyp F⁻ *ompT hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pRARE6 (Cam^R) und *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Genotyp F⁻ *ompT gal dcm hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) Verwendung. *E. coli* Rosetta(DE3)-Zellen wurden zusätzlich mit dem pRKISC-Plasmid [90] transformiert, welches die Gene für prokaryotische FeS-Cluster-Biosynthese enthält. Alle verwendeten *E. coli*-Zellen lassen sich auf kommerziell erhältliche Zellen zurückführen, die von Novagen (EMD Merck, Darmstadt) erhalten wurden.

Für diese Arbeit wurden folgende Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen verwendet:

- Carbenicillin (Cb), 50 µg/ml
- Chloramphenicol (Cam), 50 µg/ml
- Kanamycin (Km), 50 µg/ml
- Tetrazyklin (Tet), 100 µg/ml

2.4 Molekularbiologische Arbeiten

2.4.1 Klonieren von *cooS-II_{Ch}*

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde das *cooS-II_{Ch}*-Gen durch Dr. Jae-Hun Jeoung (Humboldt-Universität zu Berlin) aus *C. hydrogenoformans* [79] in einen pET28a-Vektor (Novagen) kloniert [71]. Das erhaltene pPKS2-Plasmid wurde im Verlauf dieser Arbeit zur IPTG-induzierten Expression des *cooS-II_{Ch}*-Gens mit N-terminalem Hexahistidin-Affinitäts-tag (His-tag) verwendet.

2.4.2 Klonieren von *cooS-V_{Ch}*

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde das *cooS-V_{Ch}*-Gen durch Dr. Jae-Hun Jeoung aus *C. hydrogenoformans* [79] in einen pET28a-Vektor kloniert (pPKS5). Da CODH-V_{Ch} nach Genexpression und Lyse der Zellen ausschließlich im unlöslichen Proteinanteil aufgefunden wurde (Dr. Jae-Hun Jeoung, persönliche Mitteilung), wurde eine andere Strategie verfolgt und das Gen in einen pASK-IBA17 *plus*-Vektor (IBA, Göttingen) kloniert. In diesem Plasmid kann das Gen mit einem N-terminalen *Strep*-Tactin[®]-Affinitäts-tag (*Strep-tag II*[®]) exprimiert werden, wobei der *Strep-tag* mittels TEV-Protease (*tobacco etch virus*) sequenzspezifisch abgespalten werden kann. Dazu wurde das Gen aus pPKS5 mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) amplifiziert. Die verwendeten Primer-Sequenzen und das PCR-Protokoll (Tab. 1) sind im Folgenden dargestellt:

Vorwärtsprimer *cooS-V_{Ch}*:

5'-GGA GAT GGT CTC GGC GCC GCT ACA AAA ACG TCC ATT CA-3'

Rückwärtsprimer *cooS-V_{Ch}*:

5'-GGA GAT GGT CTC GTA TCA TTA AAT ACC CAG TTT GGC GC-3'

markiert: *BsaI*-Erkennungssequenz

Tabelle 1: PCR-Protokoll zur DNA-Amplifikation für *cooS-V_{Ch}*

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
Initiale Denaturierung	98	30	
Denaturierung	55	15	
Anlagerung	72	30	25 Zyklen
Elongation	72	240	
Finale Elongation	72	600	

Amplifikationsprodukt (*cooS-V_{Ch}*) und Vektor (pASK-IBA17 *plus*) wurden mit dem Restriktionsenzym *BsaI* geschnitten. Dieses führt nach der Erkennungssequenz 5'-GGTCT(N)₁ bzw. 3'-CCAGAG(N)₅ eine Restriktionsstelle ein. Bei entsprechendem *Primerdesign* können so zwei unterschiedliche „klebrige Enden“ mit nur einem Restriktionsenzym erstellt werden. Der gesamte Restriktionsansatz wurde auf ein präparatives Agarose-Gel (1 %) aufgetragen und für 1 h bei 90 V aufgetrennt. Einzelne Banden mit einer Größe von 1.9 kb für *cooS-V_{Ch}* und 3.3 kb für pASK-IBA17 *plus* wurden erhalten, mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und durch ein Gelextraktionskit (Fermentas) isoliert. Die Ligation wurde mit einer T7-Ligase (*New England Biolabs*), unter Verwendung entsprechender Puffer für eine Zeit von 2 h bei Raumtemperatur, angesetzt und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Rekombinante Plasmide wurden mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) extrahiert und die Identität des Gens durch Kontrollverdau und Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) bestätigt (pPK-*strep*-S5).

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Verwendete Puffer:

TAE-Puffer (50x): 242 g Tris, 57 ml Essigsäure (100 %), 100 ml 0.5 M EDTA, ad 1000 ml H₂O

Ladepuffer (6x): 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden 1 %-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Diese wurden mit 50-fach TAE-Puffer und Agarose (Roth) hergestellt und zur Anfärbung der DNA mit GelRed (Biotium) versetzt. DNA-Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen an Ladepuffer kombiniert, gut durchmischt und nebst DNA-Marker (*Gene Ruler*, 1kb DNA *ladder*, Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 90 V für ca. 60 min angelegt.

2.4.4 Transformation

Verwendete Medien:

SOC-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g NaCl, 0.186 g/l KCl, 2.5 g/l $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$, 3.6 g/l Glucose
Luria-Bertani(LB)-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agar:	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin

Chemisch-kompetente *E. coli* Zellen wurden nach Sambrook und Russell [91] hergestellt und für die Transformation verwendet. Dazu wurden 2 μl des rekombinanten Plasmids zu 200 μl der kompetenten Zellen gegeben und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 42 s bei 42 °C durchgeführt und der Ansatz umgehend auf Eis transferiert. Nach 10 min Inkubation wurden die Zellen mit 800 μl SOC- bzw. LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Bakterien-suspension bei 8,000 g für 1 min zentrifugiert, das Zellpellet in einem Volumen von 100 μl resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.5 Heterologe Genexpression

Verwendete Medien und Lösungen:

LB-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 1x KPi-Puffer
TB-Medium:	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 10 ml/l Glycerin, 1x KPi-Puffer
Modifiziertes TB-Medium:	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 10 ml/l Glycerin, 1x KPi-Puffer
KPi-Puffer (10x):	122 g/l K_2HPO_4 , 23 g/l KH_2PO_4
Additive:	0.1 M FeSO_4 -Lösung 0.1 M Na_2S -Lösung 0.1 M NiCl_2 -Lösung

Zur heterologen Genexpression wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli* Expressionsstämme transformiert. Vorkulturen wurden entweder durch Transfer einer Einzelkolonie des ausplattierten Transformationsansatzes oder 20 μl der jeweiligen Glycerol-aufbewahrungslösung in LB- oder TB-Medium angeimpft und über Nacht im Schüttel-inkubator bei 37 °C inkubiert.

2.5.1 Expression von *cooS-II_{Ch}*

Das rekombinante Plasmid pPKS2 wurde zunächst in *E. coli* Rosetta(DE3)-Zellen, welche bereits das pRKISC-Plasmid enthielten, transformiert und eine Vorkultur in mTB-Medium bei 37 °C über Nacht angesetzt. Die Hauptkultur wurde in 800 ml mTB-Medium durch 8 ml Vorkultur angeimpft und zusätzlich mit 0.02 mM NiCl₂, 0.1 mM FeSO₄, 0.1 mM Na₂S und 2 mM L-Cystein kombiniert. Die Kultivierung wurde in 1 l Glasfermentern mit integrierter Begasungseinheit (Ochs Glasgeräte) durchgeführt. Bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 wurde bei 30 °C unter Begasung mit Luft inkubiert. Die Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und das Kulturmedium wurde mit Additivlösungen zu Endkonzentrationen von 0.5 mM NiCl₂, 0.5 mM FeSO₄, 0.5 mM Na₂S und 50 mM KNO₃ supplementiert. Zusätzlich wurde die Begasung auf Stickstoff umgestellt, um *E. coli* ein Wachstum unter anaeroben Bedingungen zu erlauben. Die Zellen wurden 20 h nach Induktion der Genexpression durch Zentrifugation bei 10,700 g pelletiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.5.2 Expression von *cooS-V_{Ch}*

Das rekombinante Plasmid pPK-*strep*-SV wurde in chemisch-kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert und eine Vorkultur in TB-Medium bei 37 °C über Nacht im Schüttelinkubator gelagert. Die Hauptkultivierung wurde in 5 l TB-Medium durchgeführt, welches zusätzlich mit 1 % (w/v) Glucose, 0.2 mM FeSO₄ und 0.2 mM Na₂S versetzt wurde. Durch entsprechende Verdünnung aus der Vorkultur, wurde eine Inokulationszellichte von 0.05 OD₆₀₀ hergestellt. Die Kultivierung wurde bei 37 °C unter Rühren und Zugang von Luft bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 durchgeführt. Daraufhin wurden die Kultivierungsflaschen mit gasdichten Butylgummi-Septen verschlossen und die Genexpression nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.8 durch Zugabe von 0.2 mg/l Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Die Genexpression erfolgte für 16 h bei 30 °C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10,700 g und 8 °C für 20 min pelletiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.6 Proteinreinigung

2.6.1 Reinigung von CODH-II_{Ch}

Verwendete Puffer:

Lysis-Puffer (Puffer L)	50 mM Tris (8.0), 20 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Saccharose, 2 mM Natrium-Dithionit (DT)
Wasch-Puffer (Puffer W)	50 mM Tris (8.0), 20 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT, 1 mM DT
Elutionspuffer (Puffer E)	50 mM Tris (8.0), 20 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Lagerungspuffer (Puffer S)	20 mM Tris (8.0), 2 mM DTT, 2 mM DT

CODH-II_{Ch} wurde durch immobilisierte Nickel-Affinitätschromatographie mittels N-terminalem His-tag gereinigt. Dazu wurden ca. 8 g Zellen in 50 ml Lysis-Puffer resuspendiert, welcher zusätzlich mit einer Spatelspitze Lysozym (Roth) und DNaseI (AppliChem) versetzt wurde. Nachdem die Suspension für 20 min gerührt wurde, folgte die langsame Zugabe von 10 % (w/v) Deoxycholat (Roth) bis eine finale Konzentration von 0.9 % erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen durch 15-minütige Ultraschallbehandlung mit einem Bandelin Sonopuls (Mikrospitze, 50 % *duty cycle*, 50 % *power*) aufgeschlossen und für weitere 20 min unter Rühren inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation bei 95,800 g für 60 min bei 12 °C abgetrennt.

Eine 3 ml Ni-Sepharose(SHP)-Säule wurde mit 10 Säulenvolumina Puffer L äquilibriert und der klare Zentrifugationsüberstand durch eine Peristaltikpumpe mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde mit 30 ml Puffer W gewaschen und die dunkelbraune CODH-II_{Ch}-Lösung in 6 ml Puffer E eluiert. Imidazol wurde durch Pufferaustausch gegen Puffer S auf einer PD-10 Entsalzungssäule entfernt. Das gereinigte Protein wurde mit Vivaspin 500 Konzentratoren (Molekulargewichtsgrenze: 30 kDa, Sartorius) zu einer Konzentration von > 20 mg/ml angereichert, in Glasvials aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.6.2 Reinigung von CODH- V_{Ch}

Verwendete Puffer:

Lysis-Puffer (Puffer L)	50 mM Tris (8.0), 300 mM NaCl, Spatelspitze Avidin (IBA)
Wasch-Puffer (Puffer W)	50 mM Tris (8.0), 300 mM NaCl
Elutionspuffer (Puffer E)	50 mM Tris (8.0), 300 mM NaCl, 2.5 mM Desthiobiotin
Lagerungspuffer (Puffer S)	20 mM Tris (8.0)

CODH- V_{Ch} wurde mittels N-terminalem Strep-*tag* durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden ca. 10 bis 15 g Zellen in 50 ml Puffer L resuspendiert und für 30 min gerührt. Danach erfolgte die Zugabe von pulverförmigem *N*-Octyl- β -D-Maltosid (AppliChem oder Glycon, Luckenwalde) bis eine Endkonzentration von 0.5 % (w/v) erreicht wurde. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung analog zu CODH-II $_{Ch}$. Zelltrümmer und unlösliche Zellbestandteile wurden mittels Ultrazentrifugation bei 95,800 g für 60 min und 12 °C abgetrennt. Der klare Überstand wurde auf eine StrepTactin-SuperFlow-Säule (Säulenvolumen: 10 ml) überführt, die zuvor mit Puffer W äquilibriert wurde. Nach Beendigung des Ladevorgangs wurde mit Puffer W (10 Säulenvolumina) gewaschen und anschließend mit 2 Säulenvolumina Puffer E mit geringer Flussrate eluiert. Rotbraun-gefärbte Fraktionen wurden vereinigt, mittels Zentrifugalkonzentratoren auf ein Volumen von 2 ml eingengt (MilliPore Amicon-Ultra15, 50 kDa Molekulargewichtsgrenze) und das zur Elution verwendete Desthiobiotin durch eine PD-10 Entsalzungssäule gegen Puffer S abgetrennt. Gereinigte CODH- V_{Ch} mit N-terminalem Strep-*tag* (CODH- V_{Ch}^{VL} ; Volllänge) wurde auf eine Konzentration von >20 mg/ml eingengt, in Glasvials aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Zur Abspaltung des Affinitäts-*tags* wurde TEV-Protease mit N-terminalem Strep-*tag* (bereitgestellt durch Dr. Martin Bommer) im molaren Verhältnis von 1:100 zur gereinigten CODH- V_{Ch} gegeben, auf ein Volumen von 15 ml mit Puffer W verdünnt und im Beisein von 5 mM β -Mercaptoethanol (Merck) über Nacht bei 25 °C inkubiert. Ungeschnittenes Protein und TEV-Protease wurden durch Transfer auf die StrepTactin-SuperFlow-Säule abgeschieden. *Tag*-befreite CODH- V_{Ch} (im weiteren Verlauf als CODH- V_{Ch}^X bezeichnet) befand sich im Durchfluss und wurde gesammelt, konzentriert, in Glasvials aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

2.7 UV/Vis-Spektroskopie

Absorptionsspektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV/Vis) wurden an einem Dioden-Array-Spektrophotometer (Agilent Modell 8453) unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Dabei fanden Quarzküvetten (Hellma GmbH & Co) mit einer Schichtdicke von 1 cm Verwendung.

2.8 Messung der enzymatischen Aktivität

2.8.1 CO-Oxidationsassay

Die CO-Oxidationsaktivität wurde mit Hilfe der CO-abhängigen Reduktion von oxidiertem Methylviologen (MV^{ox}) spektralphotometrisch bestimmt (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Der Reaktionsansatz (50 mM HEPES-Puffer (pH 8.0), 20 mM MV^{ox} , 5 mM DTT) wurde durch Begasen mit N_2 zunächst anoxisch gemacht und im Anschluss mit CO gesättigt. Ein Volumen von 1 ml des Reaktionsansatzes wurde in eine verschließbare Quarzküvette (1 cm Pfadlänge, Hellma GmbH & Co) mit Butylgummi- oder Silikonseptum überführt, die zuvor mit CO-Gas gespült wurde. Zur Aktivitätsbestimmung wurden zunächst konzentrierte CODH-Proben mit Verdünnungspuffer (50 mM HEPES (pH 8.0), 4 mM DTT und 2 mM DT) ca. 10,000-fach verdünnt. Um die Reaktion zu starten, wurde verdünnte CODH-Lösung mit einer gasdichten Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) in die Küvette mit der Assay-Lösung transferiert. Die Reaktion wurde spektralphotometrisch an einem UV/Vis-Diodenarray-Spektrophotometer (Agilent Modell 8453) bei 25 °C verfolgt. Die Berechnung der Aktivität erfolgte anhand des bekannten Extinktionskoeffizienten von reduziertem Methylviologen bei 578 nm ($\epsilon_{578} = 9.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Eine Aktivitätseinheit wurde definiert als 1 $\mu\text{mol CO-Verbrauch pro Minute}$ (1 U = 1 $\mu\text{mol/min}$).

2.8.2 CO₂-Reduktionsassay

Die CO₂-Reduktionsaktivität wurde spektralphotometrisch durch Bildung von Carboxyhämoglobin bestimmt, wobei die Experimente in einem anoxischen Handschuhkasten durchgeführt wurden. Dabei wurden geringe Veränderungen zum beschriebenen Assay nach Ensign [92] vorgenommen. Die Aktivitätsbestimmungen wurden in 2 ml Quarzküvetten mit Schraubkappe durchgeführt, die durch ein Butylgummi- oder Silikonseptum verschlossen wurden. Die gewählten Reaktionsbedingungen wurden so gewählt, dass sie dem $-600 \text{ mV} + \text{CO}_2$ -Zustand aus dem *soaking*-Experiment für Proteinkristalle entsprachen (siehe

Material & Methoden, 2.9.2). Ein Volumen von 2 ml Assaylösung, bestehend aus 50 mM Tris (pH 8.0), 0.2 mg/ml Hämoglobin (Sigma-Aldrich), 5 mM Ti^{3+} -Citrat und 50 mM NaHCO_3 (als CO_2 -Quelle), wurde in die Küvetten überführt. Die Bildung eines Gasraums zwischen Lösung und Deckel wurde strikt vermieden. Die Lösung wurde zunächst für 2 min bei 25 °C inkubiert, wobei keine spektralen Änderungen detektiert werden konnten. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von CODH gestartet und die Entstehung von CO durch Bildung des Carboxyhämoglobin-Signals bei 419 nm verfolgt. Eine Standard-Kurve wurde durch Titration von CO-gesättigter Lösung erstellt, wobei die Absorption im Bereich zwischen 400 und 460 nm aufgenommen wurde [93]. Die Gleichung wurde bestimmt zu: $[\text{CO}](\mu\text{mol}) = (\Delta A_{419} - 0.019) / 0.0367$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.9996$. Die Konzentration gesättigter CO-Lösung in Wasser bei 25 °C von 1.04 mM wurde aus der Literatur entnommen [92]. Eine Aktivitätseinheit wurde definiert als 1 μmol CO-Produktion pro Minute (1 U = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$).

2.8.3 NH_2OH -Reduktionsassay

Die Hydroxylamin-Reduktionsaktivität wurde durch Verbrauch von reduziertem MV (MV^{red}) im anoxischen Handschuhkasten spektralphotometrisch erfasst, wie zuvor von Wolfe *et al.* beschrieben [94]. Dazu wurde in 2 ml Quarzküvetten mit Schraubkappe zunächst Messpuffer (100 mM HEPES (8.0), 100 mM NaCl) vorgelegt, im Probenhalter bei 40 °C für 2 min inkubiert und ein Basisspektrum als Nullabgleich aufgenommen. MV^{ox} wurde zugegeben um eine Konzentration von 10 mM zu erhalten und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde MV^{ox} mit DT-Lösung reduziert, bis eine Absorption von 1.2 bei 578 nm erzielt wurde (A_{578}). Es erfolgte die Zugabe eines definierten Volumens an NH_2OH -Stammlösung, um die gewünschte Substratkonzentration einzustellen. Nach Inkubation für eine weitere Minute, in der sich das Spektrum nicht geändert hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von CODH- V_{Ch} gestartet. Die Reaktion wurde für 300 s spektralphotometrisch verfolgt und die Anfangsgeschwindigkeit für unterschiedliche Hydroxylamin-Konzentrationen erfasst. Nach Berechnung der spezifischen Aktivität (in U/mg), wurden die K_M - und A_{sp}^{max} -Werte für die NH_2OH -Reduktaseaktivität der CODH- V_{Ch} ermittelt. Dazu wurde eine nicht-lineare Regression auf Basis der Michaelis-Menten-Gleichung an die experimentellen Daten angepasst (Gl. 11).

$$A_{sp}^{\text{obs}} = \frac{A_{sp}^{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gl.11})$$

Dabei entspricht [S] der Substratkonzentration, A_{sp}^{obs} der beobachteten spezifischen Aktivität (in U/mg), A_{sp}^{max} der maximalen beobachtbaren spezifischen Aktivität bei unendlich hoher Substratkonzentration und K_M der Michaelis-Konstante.

2.9 Röntgenkristallographische Methoden

Kristallisation von CODH-II_{Ch} und CODH-V_{Ch} erfolgte mit dem Dampfdiffusionsverfahren unter anoxischen Bedingungen (siehe 2.2, Anoxische Arbeiten). Die anfängliche Suche nach Kristallisationsbedingungen wurde mit der *sitting-drop*-Methode unter Verwendung von 96-well MRC-Platten (Greiner BioOne) durchgeführt. Als Reservoirbedingungen wurden unterschiedliche, kommerziell-verfügbare Kristallisationsscreeninglösungen verwendet. Geeignete Kristallisationsbedingungen wurden mittels *hanging-drop*-Verfahren [95] durch mischen identischer Volumina an Protein- und Reservoirlösung und Äquilibration gegen Reservoirlösung reproduziert bzw. verfeinert. Die Reservoirzusammensetzung wurde im Hinblick auf Präzipitanzkonzentration, Salzkonzentration, pH-Wert und Tropfengröße systematisch variiert und die resultierenden Kristalle einer Röntgenstreuanalyse unterzogen.

2.9.1 Kristallisation von CODH-II_{Ch} und CODH-V_{Ch}

Für CODH-II_{Ch} wurden geeignete Kristallisationsbedingungen bereits durch Dr. Jae-Hun Jeoung ermittelt [71, 93]. Da im Verlauf dieser Arbeit eine Verbesserung der Auflösung erzielt werden sollte, wurde zunächst eine Vergrößerung der Kristalle unter Beibehaltung von möglichst uniformem Aussehen verfolgt. Kristalle wurden durch Mischen von Proteinlösung (12 mg/ml) mit 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 0.05-0.2 M Ammoniumsulfat, 2 mM DT und 10-12 % PEG3350 innerhalb von 1-2 Wochen mittels *streak-seeding* erzielt und wuchsen innerhalb von 4 Wochen zu ihrer finalen Größe.

Für CODH-V_{Ch} war zu Beginn keine Kristallisationsbedingung bekannt. Deshalb wurden Kristallisationsscreenings mit einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml durchgeführt. Bereits nach 24 h konnten Kristalle in mehreren Bedingungen gefunden werden. Einzelne, rotbraungefärbte Kristalle von CODH-V_{Ch}^{VL} wurden in den Bedingungen B4 und B8 des Peg/Ion Screens (*Hampton Research*, USA) sowie für CODH-V_{Ch}^X in Bedingungen G2 und G3 des PACT *premier* Screens (*Molecular Dimensions*, UK) identifiziert. Die Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Kristallisationsbedingungen von CODH- V_{Ch} .

Screeninglösung	Bedingung	Zusammensetzung	Proteinvariante
Peg/Ion (Hampton Research)	B4	0.2 M $MgNO_3 \cdot 6H_2O$ 20 % PEG3350	CODH- V_{Ch}^{VL}
	B8	0.2 M MgFormiat $2H_2O$ 20 % PEG3350	
PACT (Molecular Dimensions)	G2	0.1 M Bis-Tris-Propan (7.5) 0.2 M NaBr 20 % PEG3350	CODH- V_{Ch}^X
	G3	0.1 M Bis-Tris-Propan (7.5) 0.2 M NaI 20 % PEG3350	

2.9.2 Manipulation von Kristallen

Ausgangslösungen von DT und DTT wurden mit einer Konzentration von 1 M frisch in Wasser hergestellt. Eine 83 mM Ti^{3+} -Citrat-Lösung wurde, wie in der Literatur beschrieben [96], hergestellt: 100 μ l $Ti^{3+}Cl_3$ (30 % in 10 % HCl, Sigma) wurde mit 480 μ l einer 0.5 M Na_2 -Citrat-Lösung versetzt und mit 620 μ l Tris (8.0) gepuffert. Die verwendeten Puffer sind für die einzelnen Bedingungen in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Pufferlösungen zur Einstellung von Redoxzuständen in Kristallen.

Name	Zustand	Zusammensetzung
A	-600 mV	50 mM Tris (8.0), 25 % PEG3350, 5 mM Ti^{3+} -Citrat
A-1	-600 mV + CO_2	50 mM Tris (8.0), 25 % PEG3350, 5 mM Ti^{3+} -Citrat, 45 mM $NaHCO_3$
A-2	-600 mV + NCO^-	50 mM Tris (8.0), 25 % PEG3350, 5 mM Ti^{3+} -Citrat, 45 mM KNCO
B	-320 mV + MV^{ox}	50 mM Tris (8.0), 25 % PEG3350, 7 mM DTT, 0.5 mM MV^{ox}
C	-320 mV	50 mM Tris (8.0), 25 % PEG3350, 7 mM DTT
C-1	-320 mV + CN^-	50 mM Tris (8.0), 25 % PEG3350, 7 mM DTT, ca. 14 mM KCN

Zur Herstellung der einzelnen Redoxzustände von CODH-II $_{Ch}$ wurde folgendes Vorgehen angewendet. Zunächst wurden die Kristalle auf ein Redoxpotential von -600 mV eingestellt, um die Zustände in allen aktiven Zentren der Kristalle zu synchronisieren. Dazu wurden die Kristalle in Puffer A transferiert und nach ausführlichem Waschen für 3 h inkubiert. Für Strukturanalysen von Kristallen im -600 mV-Zustand wurden diese entweder direkt (-600 mV) oder nach weiterer Inkubation für 30 min in Puffer A-1 (-600 mV + CO_2) bzw. Puffer A-2 (-600 mV + NCO^-) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Erstellung von

Zuständen bei -320 mV wurden einzelne Kristalle aus Puffer A in Tropfen mit Puffer B überführt und sorgfältig gewaschen. Diese Prozedur wurde mindestens fünfmal in Tropfen mit frischem Puffer B durchgeführt. Erst nachdem keine weitere Blaufärbung des Puffers um die Kristalle detektiert wurde (stammt von reduziertem Methylviologen), konnte der -320 mV-Zustand durch Inkubation der Kristalle für 1 h in Puffer C hergestellt werden. Für Strukturanalysen des -320 mV-Zustands, wurden Kristalle direkt nach Inkubation in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der alternative CN^- -gebundene Zustand wurde wie folgt hergestellt: Zunächst wurden Kristalle im -320 mV-Zustand erstellt. Um die Kristalle nicht einem zu großen Konzentrationsgefälle an CN^- auszusetzen, wurde KCN schrittweise zugefügt. So wurden jeweils Volumina von ca. $1 \mu\text{l}$ einer 70 mM KCN-Stammlösung mit Hilfe eines Nylonloops in den Tropfen eingebracht und die Lösung langsam durchmischt. Nach insgesamt fünf Transferschritten an KCN-Stammlösung wurden die Kristalle für 20 min inkubiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einem Gesamtvolumen von $25 \mu\text{l}$ entspricht dies einer finalen Cyanid-Konzentration von ca. 14 mM.

Zur Herstellung des reduzierten Zustands von CODH- V_{Ch} wurden Kristalle in Reservoirlösung transferiert, welche neben 20% (v/v) Glycerin zusätzlich 5 mM Dithionit enthielt. Nach vollständiger Entfärbung der Kristalle wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Xenon-Derivatisierungen von CODH- II_{Ch} - und $-V_{Ch}$ -Kristallen, wurden mit Hilfe einer Edelgas-Kammer (*Hampton Research*, USA) und Xenon-Gas (99.99% , Linde) durchgeführt. Dazu wurden die Kristalle für $5-7$ min bei 27 bar inkubiert und nach langsamer Reduktion des Drucks sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, wurden alle Puffer vor dem Einfrieren der Kristalle mit 15% (v/v) 2,3-Butandiol (CODH- II_{Ch}) bzw. 20% (v/v) Glycerin (CODH- V_{Ch}) versetzt.

2.9.3 Datensammlung

Röntgendiffraktionsexperimente wurden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung an den *beamlines* BL14.1 und 14.2 des Elektronenspeicherrings BESSY-II (HZB, Berlin) durchgeführt [97], die vom *Joint-Berlin-MX-Laboratory* betrieben werden. Die Kristalle wurden während der Messungen in einem Stickstoffstrom bei 100 K temperiert. Standarddatensätze wurden bei einer Wellenlänge von 0.91841 \AA aufgenommen, wohingegen für Elementbestimmungen das anomale Signal auf der Hochenergieseite der spezifischen Röntgenabsorptionskante genutzt wurde. So erfolgten Messungen zur Identifikation von Eisen

nahe am Absorptionsmaximum der Fe-K-Kante bei 1.74 Å und für Xenon nahe an der L-I-Kante bei 1.7 bzw. 1.9 Å (Xe-L₁-Kante: 2.27 Å). Zur initialen Indizierung und Ermittlung der optimalen Messstrategie wurde iMosflm [98] verwendet. Diffraktionsdaten wurden mit dem XDS-Paket [99] bzw. XDSAPP [100] indiziert, integriert, skaliert und zusammengefügt.

2.9.4 Strukturbestimmung

Die Struktur von CODH-II_{Ch} wurde durch Patterson-Suchmethoden mit Phaser [101] bzw. durch *rigid-body-refinement* mit REFMAC5 [102] gelöst. Dabei diente die bereits bekannte Struktur von CODH-II_{Ch} im –320 mV-Zustand (PDB-ID: 3B53) als homologes Suchmodell, wobei alle Heteroatome aus dem Modell entfernt wurden. Um initiale Phasen für die bisher unbekannte Struktur von CODH-V_{Ch} zu erhalten, wurde die Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell mittels AutoMR in PHENIX [103] angewendet. Dabei wurde ein Suchmodell genutzt, welches auf Basis der Struktur von CODH-II_{Ch} im –320 mV-Zustand unter Berücksichtigung eines Sequenzalignments (Sequenzidentität: 31.5 %) mit dem Programm *Sculptor* [104] erstellt wurde. Mehrere Zyklen automatischen Modellbaus und Verfeinerung wurden mit *AutoBuild* [105] durchgeführt.

2.9.5 Strukturverfeinerung und Evaluation

Allgemein

Abwechselnde Zyklen von Modellbau und Strukturverfeinerung wurden mit COOT [106] und REFMAC5 [102] bzw. phenix.refine [103] durchgeführt. Schwache *restraints* für die geometrischen Parameter (Bindungslängen und -winkel) wurden mit REFMAC5 erstellt und für die Strukturverfeinerung des C-Clusters in CODH-II_{Ch} bzw. des Hybrid-Clusters in CODH-V_{Ch} verwendet. Für CODH-II_{Ch} wurden zunächst Positionsparameter, Temperaturfaktoren und individuelle Besetzungsgrade des C-Clusters verfeinert. Im Anschluss wurden anisotrope B-Faktoren, alternative Seitenkettenkonformationen und die beiden Konformationen für Fe₂ modelliert und in die Strukturverfeinerung miteinbezogen.

Für CODH-V_{Ch} wurde analog vorgegangen, wobei aufgrund der geringeren Auflösung nur die Metallatome des Hybrid-Clusters mit anisotropen B-Faktoren verfeinert werden konnten. Alle Strukturabbildungen wurden mit PyMOL [107] erstellt.

Verfeinerung von atomar-aufgelösten Strukturen der CODH-II_{Ch} mit SHELXL

Mehrere Verfeinerungszyklen wurden mit SHELXL-2014 [108] durchgeführt, bis R_{cryst} und R_{free} konvergierten. Dazu wurden *conjugate-gradient least squares* Methoden gegen F^2 verwendet, wobei 5 % der Daten zur Validierung des R_{free} -Faktors für die Verfeinerung entzogen wurden. Es wurden für die Metall-Cluster (D, B und C) und für die gebundenen Liganden, keine *restraints* verwendet. Wasserstoffatome wurden als *riding hydrogens* im finalen Verfeinerungszyklus eingeführt und alle nicht-Wasserstoffatome mit anisotropen B-Faktoren verfeinert. Abschließend wurde ein Verfeinerungszyklus unter Inversion der gesamten *least-squares*-Korrelations-Matrix (*full matrix inversion*) gegen die Gesamtheit aller Daten durchgeführt, wodurch Standardabweichungen für Bindungslängen und -winkel ermittelt wurden. Dabei wurden alle anisotropen B-Faktoren fixiert und alle *restraints* entfernt.

Evaluation

Die Berechnung von Kanälen in den Strukturen erfolgte mit MOLE 2.0 [109] und HOLLOW [110]. Die Bestimmung von Molekülebenen in den Kristallstrukturen erfolgte mit der Methode nach Blow [111] und in Zusammenarbeit mit Dr. Tobias Werther (HU Berlin). Die Ebenendarstellung wurde mit dem *planewizard plug-in* für PyMOL [107] erstellt. Für CODH-V_{Ch} wurden Strukturvergleiche mit Hilfe des DALI-Servers [112] durchgeführt.

2.10. Verschiedene Methoden

2.10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford [113] bestimmt. Dazu wurde zunächst eine Eichgerade mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Aufgrund der Eigenabsorption von FeS-Clustern im UV-Bereich ist die Konzentrationsbestimmung unter Verwendung von theoretischen Extinktionskoeffizienten nicht erstrebenswert.

2.10.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel:	12 bzw. 15 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37.5:1, Roth) 375 mM Tris (pH 8.8) 0.1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0.08 % (v/v) <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED) 0.05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Sammelgel:	6 % Acrylamid 125 mM Tris (pH 6.8) 0.1 % (w/v) SDS 0.08 % TEMED
Färbelösung:	0.025 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure
Probenpuffer (4x):	200 mM Tris (pH 6.5), 8 % (w/v) SDS, 0.4 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin, 400 mM Dithiothreitol (DTT)
Laufpuffer (10x):	1.92 M Glycin, 248 mM Tris (pH 6.5), 1 % (w/v) SDS

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli [114] durchgeführt. Dabei wurde als Molekulargewichtsstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) mit β -Galaktosidase (116.0 kDa), BSA (66.2 kDa), Ovalbumin (45.0 kDa), Laktat-Dehydrogenase (35.0 kDa), REase Bso98I (25.0 kDa), β -Laktoglobulin (18.4 kDa) und Lysozym (14.4 kDa) verwendet. Proteinproben wurden mit einem entsprechenden Volumen an Probenpuffer versehen und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde zunächst für 20 min bei 80 V und schließlich für 100 min bei 160 V durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Färbelösung angefärbt und die Gele mit Entfärbelösung entfärbt.

2.10.3 Bestimmung des oligomeren Zustands von CODH- V_{Ch}

Die Bestimmung des oligomeren Zustands von CODH- V_{Ch} erfolgte durch analytische Gelfiltration. Diese wurde unter anoxischen Bedingungen auf einer HiLoad 16/600 Superdex 200 *prep-grade* Gelfiltrationssäule durchgeführt. Die Chromatographie erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit einem Laufpuffer bestehend aus 50 mM Tris (pH 8.0) und 100 mM NaCl, wobei CODH- V_{Ch} mit einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Volumen von 20 μ l aufgetragen wurde. Die Ermittlung des resultierenden Molekulargewichts erfolgte durch Vergleich mit dem Retentionsvolumen von Proben bekannten Molekulargewichts.

2 mg/ml Laktat-Dehydrogenase (250 kDa), 1 mg/ml Conalbumin (75 kDa), 1 mg/ml Ovalbumin (43 kDa), 1 mg/ml Rnase A (13.7 kDa) und 1 mg/ml Aprotinin (6.5 kDa) wurden auf der Gelfiltrationssäule aufgetragen und unter isokratischen Bedingungen eluiert. Eine Standardkurve wurde erstellt, indem das Elutionsvolumen gegen das logarithmierte Molekulargewicht aufgetragen wurde (Abb. A8, Anhang).

2.10.4 Colorimetrische Bestimmung des nicht-Häm-Eisens (Fe^{2+})

Die Bestimmung des nicht-Häm-Eisens in CODH- V_{Ch} erfolgte durch Bildung eines gefärbten Komplexes mit dem spezifischen Chelator Feren-S [115]. Dazu wurden 100 μl der zu untersuchenden Proteinlösung mit 100 μl 1 %-iger (v/v) HCl gemischt und für 10 min bei 90 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden schrittweise 500 μl 7.5 %-ige (w/v) Ammoniumacetat-Lösung, 100 μl 4 %-ige (w/v) Ascorbin-Lösung, 100 μl 2.5 %-ige SDS-Lösung und 100 μl einer 1.5 %-igen (w/v) Feren-Lösung zugegeben. Es erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12,400 g und 8 °C. Im Anschluss wurde die Absorption des Überstands bei 593 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Der Eisengehalt wurde anhand einer Eichgerade bestimmt, die mit Proben bekannter Eisenkonzentration (0-20 μM) erstellt wurde (Abb. A9, Anhang).

2.10.5 Ermittlung der Temperaturstabilität von CODH- V_{Ch}

Die thermische Stabilität von CODH- V_{Ch} erfolgte durch Messung des UV/Vis-Spektrums in Abhängigkeit der Temperatur. Dazu wurde eine 10 μM Proteinlösung in Messpuffer (100 mM HEPES (8.0), 100 mM NaCl) vorgelegt und die Absorption bei 280 nm bei steigender Temperatur zwischen 20 und 80 °C aufgenommen. Die Temperatur wurde in Schritten von 2 °C sequentiell erhöht und das Spektrum nach 2 min Inkubation aufgenommen. Die Messungen erfolgten an einem UV/Vis-Diodenarray-Spektralphotometer mit Peltier-Element (Agilent Modell 8453). Die ermittelte Stabilitätskurve ist im Anhang (Abb. A10) dargestellt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 CO-Dehydrogenase II (CODH-II_{Ch})

3.1.1 Heterologe Expression und Reinigung

CODH-II_{Ch} wurde durch heterologe Expression des *cooS*-II-Gens in *E. coli* Rosetta(DE3) hergestellt. Bereits 3 h nach Induktion der Genexpression durch IPTG-Zugabe, zeigte sich eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa auf dem SDS-PAGE-Gel (MW_{erw}: 68 kDa). Nach der Fermentation wurden Bakterienpellets mit einem Nasszellgewicht von ca. 2 g pro 1 Kulturmedium geerntet. Um die Synthese des kompletten und aktiven C-Clusters zu gewährleisten, wurde die Genexpression unter anoxischen Bedingungen durch Begasung mit N₂ durchgeführt. Da *E. coli* fakultativ anaerob ist, wird der Metabolismus unter den gewählten anoxischen Bedingungen auf anaerobes Wachstum umgeschaltet. Dies resultiert in geringeren Zelldichten und somit vermindertem Nasszellgewicht pro 1 Kulturmedium im Vergleich zu aerober Fermentation. Die Reinigung der CODH-II_{Ch} erfolgte durch Ni-Affinitätschromatographie mit angeschlossenem Pufferaustausch und führte zum Produkt mit mehr als 95 % Reinheit. Durchschnittlich wurden 2.3 mg CODH-II_{Ch} (aktives Enzym) pro g Nasszellgewicht isoliert. Abbildung 15 zeigt die heterologe Herstellung und Reinigung von CODH-II_{Ch}.

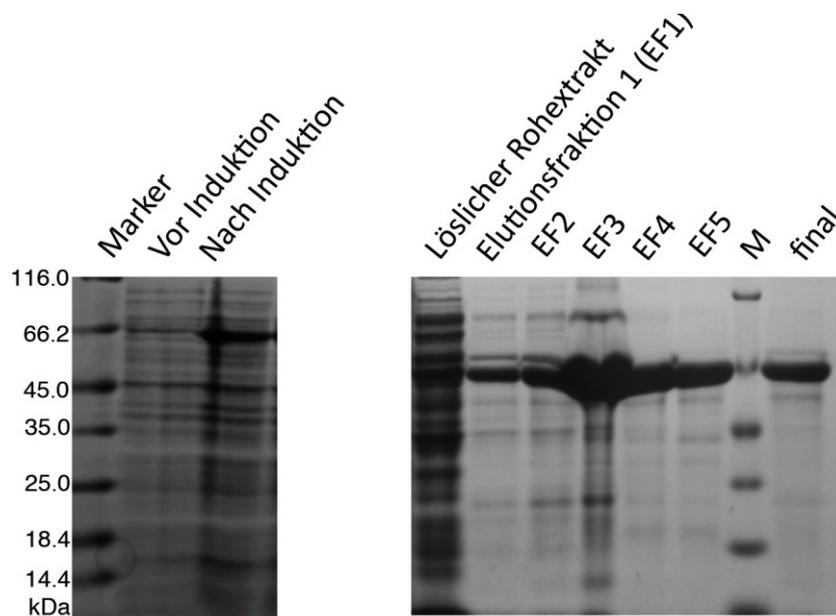


Abbildung 15: Heterologe Herstellung und Reinigung von CODH-II_{Ch}. Dargestellt sind 15 %-ige SDS-PAGE-Gele. Links: Fortschritt der heterologen Herstellung vor und nach Induktion (+ 3 h). Rechts: Fortschritt der Proteinreinigung durch Ni-Affinitätschromatographie. Nach Laden des Rohextrakts auf eine Ni-SHP-Säule wurde mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert und in kleinen Fraktionen aufgesammelt. Diese wurden im Anschluss vereinigt (final).

3.1.2 Katalytische Aktivität der CODH-II_{Ch}

Die katalytische Aktivität der gereinigten CODH-II_{Ch} wurde standardmäßig erfasst und katalogisiert. Nur Enzymchargen mit ausreichender spezifischer Aktivität ($A_{sp} \geq 6000$ U/mg, bei 80 °C) können aufgrund des Besetzungsgrads des C-Clusters für kristallographische Studien verwendet werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzymchargen besaßen eine spezifische Aktivität der CO-Oxidation von 872 U/mg bei 25 °C und 8200 U/mg bei 80 °C. Die spezifische Aktivität der CO₂-Reduktion wurde ebenfalls untersucht und zeigte einen Wert von 0.9 U/mg bei 25 °C, was einer CO₂-Reduktionsrate von 1.1 s^{-1} entspricht. Dies korreliert gut mit vorher erfassten Aktivitätswerten von CODH-II_{Ch} [58, 93].

3.1.3 Kristallisation und Röntgendiffraktion

CODH-II_{Ch} wurde mit Hilfe des Dampfdiffusionsverfahrens unter anoxischen Bedingungen bei 18 °C kristallisiert. Hierfür wurden gleiche Volumina von CODH-II_{Ch}-Lösung mit Reservoirlösung in einem Gesamtvolumen von 4-12 μl angesetzt. Da die Kristallisation bei geringer Präzipitanzkonzentration durchgeführt wurde, war die Nukleation zunächst gehemmt und wurde durch *streak-seeding* herbeigeführt. Kristalle erschienen im Laufe von 1-2 Wochen und vollendeten ihr Wachstum nach weiteren 1-2 Wochen. Daraufhin wurden einzelne Kristalle isoliert und die gewünschten Zustände (wie unter Kapitel 2.9.2 beschrieben) hergestellt. Abbildung 16 zeigt beispielhaft Kristalle mit einer Größe von ca. 0.5 x 0.5 x 0.8 mm ($V = 0.2 \text{ mm}^3$), die im Verlauf dieser Arbeit für Röntgendiffraktionsexperimente verwendet wurden, zusammen mit dem resultierenden Diffraktionsbild.

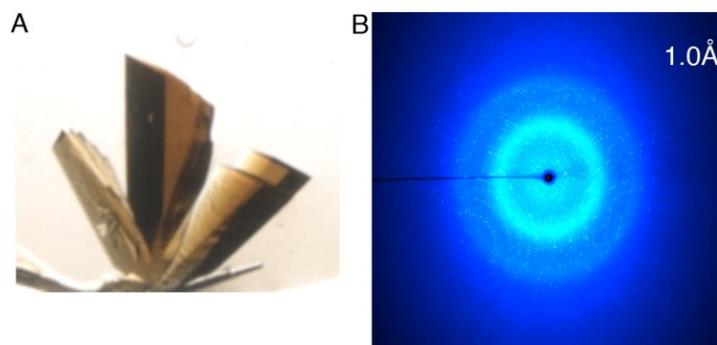


Abb. 16: Kristalle von CODH-II_{Ch} und typisches Röntgendiffraktionsmuster. Der mittlere Kristall (A) wurde zur Erstellung des $-600 \text{ mV} + \text{CO}_2$ -Zustands verwendet und erzielte das in B dargestellte Röntgendiffraktionsbild am Synchrotron. Die maximale Auflösung der beobachteten Reflexe lag bei 1.0 \AA .

Die resultierenden Beugungsbilder zeigten eine maximale Auflösung von 1.0 Å, wodurch erstmals Einblicke in die Struktur definierter Redoxzustände der CODH-II_{Ch} bei atomarer Auflösung gewonnen werden konnten.

3.1.4 Strukturen dreier Zustände bei atomarer Auflösung

Allgemeines

Um Einblicke in die Geometrie und chemische Natur unterschiedlicher Zustände von CODH-II_{Ch} zu erhalten, wurden Datensätze mit atomarer Auflösung ($d_{\min} < 1.1$ Å) aufgenommen. Dabei konnten maximale Auflösungen von 1.03 Å (–600 mV + CO₂), 1.09 Å (–600 mV + NCO[–]) und 1.05 Å (–320 mV) erzielt werden (siehe Anhang, Tabelle A2).

Im Gegensatz zu den zuvor charakterisierten Strukturen des –600 mV + CO₂- und –320 mV-Zustands [58], konnte die Auflösung um 0.47 bzw. 0.45 Å verbessert werden. Zunächst wurde phasiert und das Modell ohne Cluster verfeinert. Im Anschluss wurde das C-Cluster positioniert (Ni₄Fe₄S) und weitere Verfeinerungen erfolgten ohne Liganden am Cluster. Aufgrund der resultierenden positiven Differenzdichte in der $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte wurden dreiatomige Liganden für die –600 mV-Zustände und ein einatomiger Ligand für den –320 mV-Zustand vorgefunden. Diese wurden im Anschluss als CO₂, NCO[–] bzw. Wasser (OH_x) modelliert. Die *omit*-Karten sind im Anhang in Abbildung A2 dargestellt.

Im –600 mV + CO₂-Zustand zeigte sich ein verbrückender CO₂-Ligand, welcher an Ni und Fe2A bindet und im wesentlichen die Geometrie der Struktur mit geringer Auflösung widerspiegelt [71].

Der –600 mV + NCO[–]-Zustand zeigte, analog zum CO₂-gebundenen Zustand, eine verbrückende Geometrie des NCO[–]-Liganden am C-Cluster mit Bindungen zu Ni und Fe2A. Da Cyanat in zwei unterschiedlichen Orientierungen binden kann, nämlich mit verbrückendem N- oder O-Atom, wurden beide Möglichkeiten modelliert. Die resultierenden Differenzdichten konnten dabei keine Information über die Korrektheit der jeweiligen Orientierung liefern. Somit wurde eine Analyse verbundener B-Faktoren durchgeführt. Aufgrund eines deutlich geringeren durchschnittlichen Gesamt-B-Faktors und dessen Standardabweichung von 7.7 ± 0.4 Å² wurde die Konformation mit Ni-C(N)-O-Fe2A bevorzugt, im Gegensatz zur Ni-C(O)-N-Fe2A-Konformation mit einem Wert von 8.0 ± 1.4 Å². Dieses Erkenntnis wird durch die Betrachtung der chemischen Umgebung und der beobachteten Bindungslängen bestätigt.

Der –320 mV-Zustand zeigte einen einatomigen Liganden am Fe2A, welcher wie zuvor beschrieben [58], als Wasser modelliert wurde.

Die Strukturverfeinerungen führten mit den *maximum-likelihood*-basierten Verfeinerungsprogrammen REFMAC5 [102] und phenix.refine [103] bereits zu Modellen mit R-Faktoren ($R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$) von 11.2 / 13.6 % (−600 mV + CO₂), 12.5 / 14.0 % (−600 mV + NCO[−]) und 11.1 / 13.2 % (−320 mV). Im Anschluss erfolgte die Verfeinerung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit dem Programm SHELXL-2014 [108]. Dieses Programm besitzt seine Stärken vor allem in der Verfeinerung von hochaufgelösten Strukturen ($d_{\text{min}} < 2.0 \text{ \AA}$) und Strukturen mit anomalen Streuatomen. Es wird deshalb hauptsächlich für die Strukturanalyse von kleinen Molekülen (organische und anorganische Verbindungen) verwendet.

Die resultierenden Modelle und finalen $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarten nach der Strukturverfeinerung sind in Abbildung 17 dargestellt und sollen im Weiteren näher beleuchtet werden.

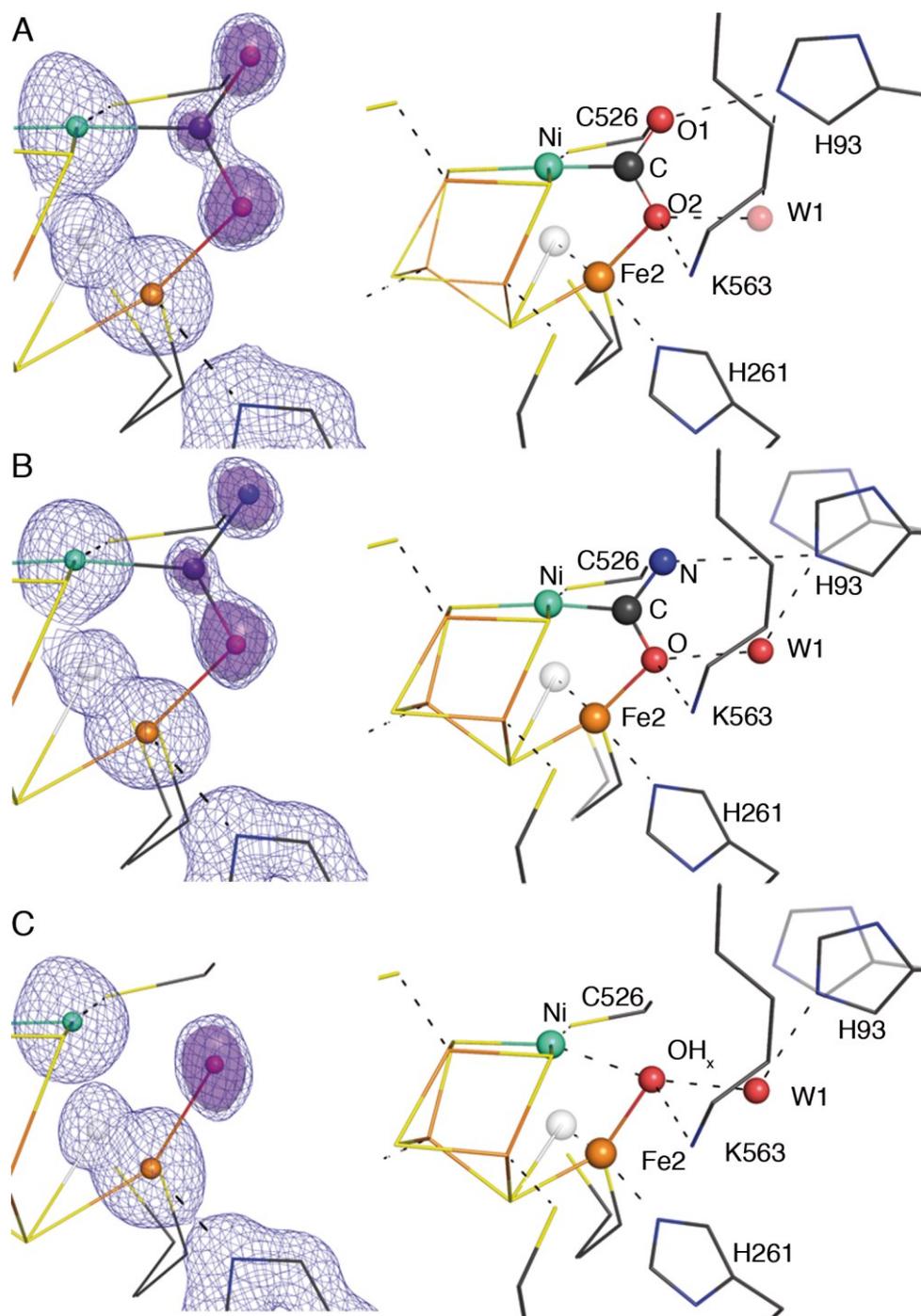


Abbildung 17: Kristallstruktur der CODH-II_{Ch} bei atomarer Auflösung in unterschiedlichen Zuständen. Gezeigt sind die Strukturen nach Verfeinerung für den $-600\text{ mV} + \text{CO}_2^-$ (A), $-600\text{ mV} + \text{NCO}^-$ (B) und den -320 mV -Zustand (C). Im linken Bild ist die Struktur zusammen mit der finalen $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte bei einem Konturlevel von 1.75σ (blau) und 2.5σ (lila, transparente Oberfläche) dargestellt. Im rechten Bild ist die nähere Koordinationsumgebung des C-Clusters dargestellt. Die einzelnen Atome wurden als Kugelstabmodell dargestellt und elementspezifisch gefärbt. Die alternative Konformation des His93 und des Fe2 sind transparent gezeigt.

Im CO_2 -gebundenen Zustand zeigte sich eine uniform verteilte Elektronendichte über das CO_2 -Molekül hinweg. Dabei lassen sich die einzelnen Positionen der Atome anhand des

gewählten Konturlevels mit hoher Ortssicherheit bestimmen. Das Ni-Atom zeigt eine deutliche Anisotropie der Elektronendichte, welche sich in geringerem Maße im CO₂ widerspiegelt. CO₂ und das Ni-Atom besitzen beide einen Besetzungsgrad von 57 % und zeigen somit eine vollständige Akkumulation dieses Zustands. In der zweiten Koordinationssphäre existieren Wasserstoffbrückenbindungen des CO₂ zu His93 (r: 2.72 Å) und Lys563 (r: 2.70 Å). His93 zeigt nur eine einzelne Konformation der Seitenkette, welche den Imidazolring in Richtung des Ni-Atoms positioniert. In unmittelbarer Nähe des O₂-Atoms befindet sich ein Wassermolekül W1 (r: 2.65 Å), dessen Besetzungsgrad 30 % beträgt. Demnach findet sich W1 nur in Fraktionen des Kristalls, die kein intaktes C-Cluster und keinen CO₂-Liganden tragen.

In der NCO⁻-gebundenen Struktur zeigte sich bei dem gewählten Konturlevel eine Elektronendichteverbindung für die O-C-Bindung, jedoch nicht für die C-N-Bindung. Analog zur CO₂-gebundenen Struktur, wurde eine gewinkelte Geometrie für das NCO⁻-Molekül vorgefunden. In der sekundären Koordinationssphäre existiert weiterhin eine Interaktion mit der Seitenkette von Lys563. Dabei wurde ein NCO⁻⋯Nζ-Lys563-Abstand von 2.65 Å beobachtet. Nach Bindung des Cyanats werden zwei Konformationen von His93 realisiert: Eine Hauptkonformation mit einem Besetzungsgrad von 65 % und einer Nebenkonformation von 35 %. Die Hauptkonformation zeigt einen Abstand von 3.62 Å für die OCN⁻⋯Nε-His93 Interaktion, wohingegen die Nebenkonformation vergleichbar zum CO₂-gebundenen Zustand ist (OCN⁻⋯Nε-His93: 2.64 Å). Beide Konformationen unterscheiden sich in der Nε-Position um 1.34 Å. Im Gegensatz zur CO₂-gebundenen Struktur besitzt das Wassermolekül W1 einen Besetzungsgrad von 70 %, welcher mit der Gesamtbesetzung des NCO⁻ korreliert (57 %).

Der -320 mV-Zustand zeigt ein [Ni₄Fe₄S-OH_x]-Cluster im aktiven Zentrum. Die Elektronendichte der Cluster-gebundenen OH_x-Gruppe besitzt eine leicht ellipsoide Form und kann durch ein einzelnes Atom erklärt werden. Die OH_x-Gruppe befindet sich am Fe2A-Atom und interagiert mit der Proteinmatrix mit einem O⁻⋯Nζ-Lys563-Abstand von 2.67 Å. W1 befindet sich in Wasserstoffbrückendistanz (2.71 Å) und ist zu 71 % besetzt. Wie in der NCO⁻-gebundenen Struktur konnten zwei Konformationen für His93 identifiziert werden, die jedoch äquivalent besetzt sind (proximale Konf.: 48 %, distale Konf.: 52 %).

Analyse der Bindungslängen und -winkel

Um Informationen über Geometrie und chemische Natur der Liganden zu erhalten, wurde nach konvergierender Strukturverfeinerung die Inversion der gesamten Normalmatrix in SHELXL-2014 [108] durchgeführt. Auf diese Weise können Bindungslängen und -winkel mit ihren individuellen Standardabweichungen ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind für die atomar-aufgelösten Strukturen in Abbildung 18 aufgeführt.

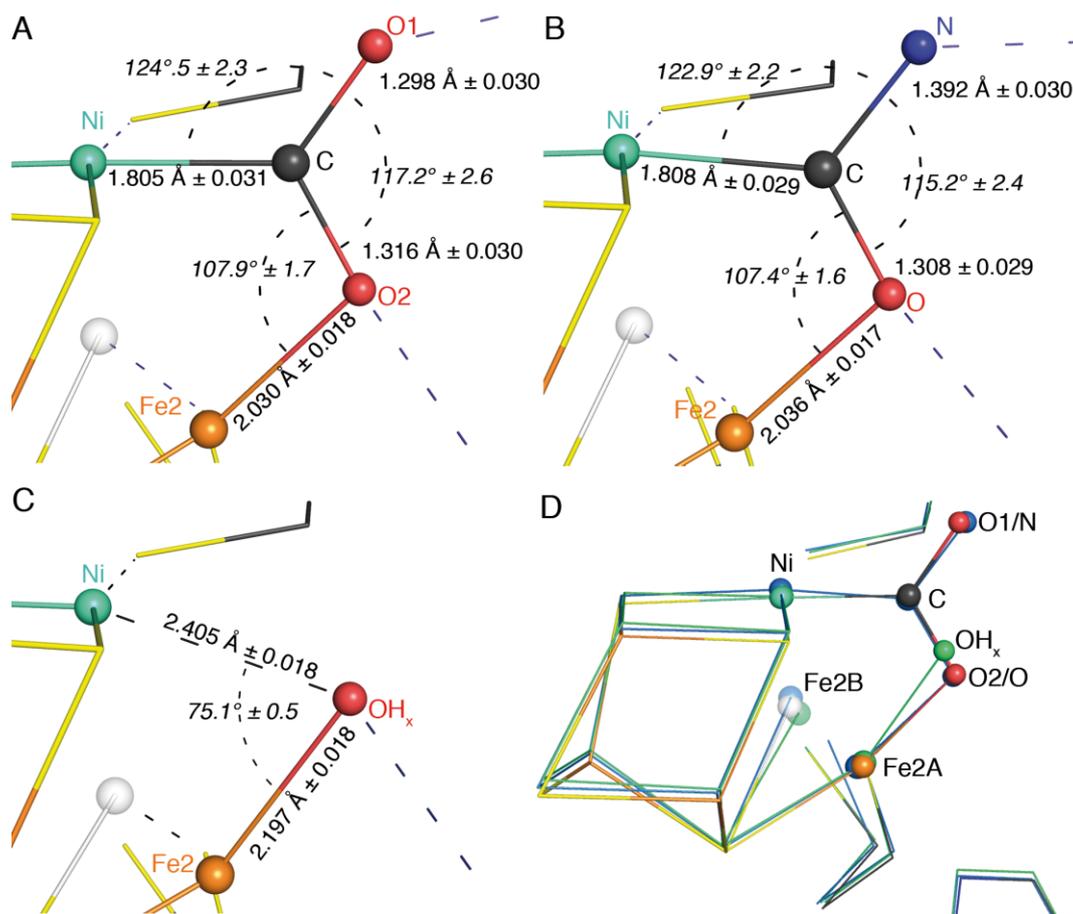


Abbildung 18: Bindungslängen und -winkel sowie deren Standardabweichungen für Cluster C und seine Liganden. Die durch Inversion der Normal-Matrix berechneten Bindungslängen und Standardabweichungen für den CO_2 -gebundenen (A), NCO^- -gebundenen (B) und OH_x -gebundenen Zustand (C). Die Farbgebung in A-C erfolgte elementspezifisch. D) Überlagerung der Strukturen aus A-C. Die Färbung entspricht den jeweiligen Zuständen mit $-600\text{mV} + \text{CO}_2$ (siehe A), $-600\text{ mV} + \text{NCO}^-$ (blau) und -320 mV (grün).

Im CO_2 -gebundenen Zustand (Abb. 18A), wird die CO_2 -Bindung ans Cluster durch Bindungslängen von 1.81 \AA für die Ni-C- und 2.03 \AA für Fe2A-O2-Bindung charakterisiert. Die C-O1- und C-O2-Bindungen von 1.30 und 1.32 \AA sind dabei ähnlich lang, wobei die Standardabweichungen in der Größenordnung von unter 0.05 \AA liegen. CO_2 zeigt eine fast perfekte sp^2 -Hybridisierung mit Bindungswinkeln von 124.5° , 118.3° und 117.2° für $\angle\text{Ni-C-}$

O1, $\angle\text{Ni-C-O2}$ und $\angle\text{O1-C-O2}$, mit Standardabweichungen von ca. 2° . Die Ni-C-O-Winkel sind unterschiedlich groß, wobei der Ni-C-O1-Winkel den Ni-C-O2-Winkel um mehr als 9° (bzw. 5σ) übersteigt.

Im NCO^- -gebundenen Zustand (Abb. 18B) sind die Bindungslängen für Ni-C und Fe2A-O mit Werten von 1.81 und 2.04 Å vergleichbar zum CO_2 -gebundenen Zustand. Die Ligand-internen Bindungslängen für C-N und C-O weichen mit Werten von 1.39 und 1.31 Å deutlich voneinander ab. Auch NCO^- besitzt eine nahezu ideale sp^2 -Hybridisierung mit Winkeln von 122.9° , 121.9° und 115.2° , für $\angle\text{Ni-C-N}$, $\angle\text{Ni-C-O}$ und $\angle\text{N-C-O}$. Die Standardabweichungen für Bindungslängen und -winkel sind in einer ähnlichen Größenordnung, wie in der CO_2 -gebundenen Struktur.

Im OH_x -gebundenen Zustand (Abb. 18C) existieren Bindungslängen von 2.2 Å für Fe2-O und von 2.4 Å für Ni-O. Dies spricht für eine leicht verbrückende Interaktion zwischen Ni und OH_x , wobei die koordinative Bindung weiterhin zwischen OH_x und Fe2 verortet ist. Dabei wird ein Ni-O-Fe2-Winkel von 75° beobachtet. Die Gesamtkoordination des Ni ist T-förmig und wird durch die Winkel von 90° ($\angle\text{S}\gamma(\text{Cys526})\text{-Ni-S1}$), 104° ($\angle\text{S1-Ni-S4}$) und 165° ($\angle\text{S}\gamma(\text{Cys526})\text{-Ni-S4}$) belegt.

Die Überlagerung der atomar-aufgelösten Strukturen (Abb. 18D) verdeutlicht die große Übereinstimmung zwischen den CO_2 - und NCO^- -gebundenen Zuständen. Im CO_2 -gebundenen Zustand weichen die Positionen von C- und O-Atomen um 0.10, 0.14 (O1/N) und 0.13 Å (O2/O) vom NCO^- -gebundenen Zustand ab. Die Position der OH_x -Gruppe im -320 mV-Zustand unterscheidet sich deutlich von den beiden anderen Zuständen und zeigt Abweichungen von 0.38 Å im Vergleich zu O2 (CO_2) und 0.45 Å zu O (NCO^-). Es zeigt sich außerdem eine deutlich längere Fe2A-O-Bindung von 2.2 Å im -320 mV-Zustand.

Trotz der deutlichen Unterschiede hinsichtlich des Redoxzustands oder der gebundenen Liganden, weichen die einzelnen Clusterinternen Bindungslängen und -winkel nur gering voneinander ab. Alle relevanten Werte sind dabei im Anhang in Tabelle A6 hinterlegt.

Ebenenabweichungsanalyse

Das Ni-Atom des C-Clusters ist Zentrum von zwei Ebenen: Einer horizontalen S4-Ni-S1-Ebene und einer horizontal verlaufenden Ebene, die im CO₂- und NCO⁻-gebundenen Zustand durch Ni-C-O1 bzw. Ni-C-N definiert wird. Da CO₂ und NCO⁻ im freien Zustand aus drei linear-verbundenen Atomen bestehen, soll im Folgenden der Einfluss der Aktivierung durch Koordination an das C-Cluster untersucht werden. Abbildung 19 zeigt eine Ebenenabweichungsanalyse für CO₂ (A) und NCO⁻ (B).

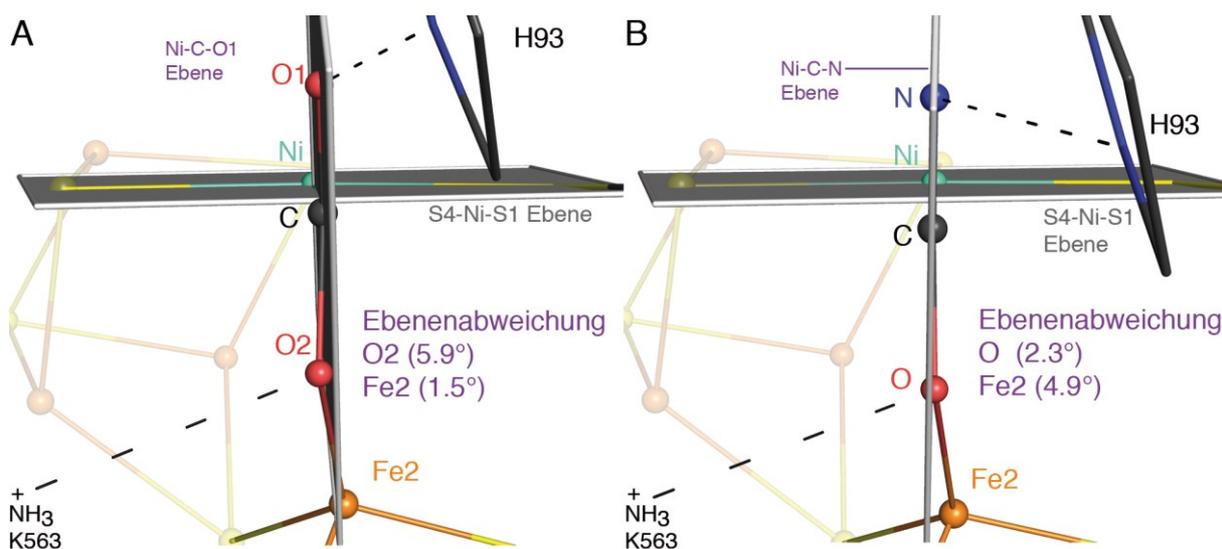


Abbildung 19: Ebenenabweichungsanalyse der CO₂- und NCO⁻-gebundenen Zustände. A) Ebenen im CO₂-gebundenen Zustand. B) Ebenen im NCO⁻-gebundenen Zustand. Die S4-Ni-S1-Ebene und die Ni-C-O1- bzw. Ni-C-N-Ebenen sind zusammen mit den einzelnen Atomen im Kugelstabmodell dargestellt.

In der CO₂-gebundenen Struktur zeigt sich eine deutliche Abweichung des O2 aus der vertikalen Ebene. Dabei beträgt die resultierende Distanz von der Ni-C-O1-Ebene 0.12 Å und eine Winkelabweichung von 5.9° für O2 in Richtung der Aminofunktion von Lys563. Dies führt zu einem Verlust der Planarität des CO₂-Moleküls. Die Abweichung des O2-Atoms von der Ebene ist im Vergleich zur beobachteten Standardabweichung deutlich ($\sigma_{\text{C-O2}} = \pm 0.03 \text{ \AA}$, $\sigma_{\text{C-O2-Fe2}} = \pm 1.7^\circ$).

Zum Vergleich wurde die entsprechende Analyse mit der NCO⁻-gebundenen Struktur durchgeführt. Hier zeigt der Ligand eine planare Struktur und alle Atome befinden sich, im Gegensatz zur CO₂-gebundenen Struktur, innerhalb der Ni-C-N-Ebene. Geringe Abweichungen des O-Atoms mit einer Distanz von 0.04 Å und einer Winkelabweichung von 2.3° liegen im Bereich der beobachteten Standardabweichungen ($\sigma_{\text{C-O}} = \pm 0.03 \text{ \AA}$, $\sigma_{\text{C-O-Fe2}} = \pm 1.6^\circ$) und sind somit nicht signifikant. Die starke Abweichung des Fe2 von der Ebene liegt in einer leicht geänderten Positionierung des Ni-Atoms begründet. Aufgrund dessen bilden

die berechneten Ni-C-O1- und Ni-C-O2-Ebenen einen Winkel von 1.8° (siehe Anhang Abb. A6).

Der Vergleich der beiden Strukturen zeigte zwar eine signifikante *out-of-plane*-Verzerrung für CO₂, eine Interpretation dieses Effekts als Teil der katalytischen Strategie erscheint jedoch aufgrund der geringen Abweichung als unwahrscheinlich.

Chemische Interpretation der hochaufgelösten Strukturen

Anhand der gefundenen Bindungslängen, -winkel und Planaritätsanalysen konnten hilfreiche Einblicke in die chemische Natur der untersuchten Zustände gewonnen werden. Die vorgefundene CO₂-gebundene Struktur zeigt ein aktiviertes CO₂-Molekül mit einem Bindungswinkel von 117° , welcher sehr nahe am Idealwinkel für sp²-hybridisierte Kohlenstoffatome liegt ($\sim 120^\circ$). Im Gegensatz zur Struktur mit einer Auflösung von 1.5 Å ($\angle\text{O-C-O} = 133^\circ$, $r_{\text{Ni-C}} = 1.96 \text{ \AA}$) [71], zeigten sich deutliche Abweichungen im Bindungswinkel um 16° und einer Verringerung der Ni-C-Distanz um 0.16 Å (siehe Anhang Abb. A3). Der vorgefundene Bindungswinkel (117°) in der hochaufgelösten Struktur stimmt mit einer Vielzahl von $\mu_2\text{-}\eta^2$ -Komplexen von CO₂ mit homogener und heterogener Metallzusammensetzung überein. Eine Auswahl ist im Anhang in Tabelle A1 und Abbildung A1 aufgeführt [31, 32, 116-122]. Beispielsweise konnten ähnliche Winkel für η^1 -koordinierte mononukleare Ni-Komplexe (119.6°) [122] oder $\mu_2\text{-}\eta^2$ -koordinierte bimetallische Komplexe mit Re,Re- (119.0°) [117] oder Re,Sn-Zentren (117.0°) [118] beobachtet werden. Der in CODH-II_{Ch} gefundene O-C-O-Bindungswinkel von 117° stimmt außerdem gut mit dem von freier Ameisensäure (H₂COOH, 123°) überein [123].

In Komplexen des $\mu_2\text{-}\eta^2$ -Typs zeigt CO₂ typischerweise eine kurze, freie Bindung und eine längere, verbrückende Bindung zum zweiten Metall [29]. Dieser Effekt ist für das C-Cluster gebundene CO₂ deutlich schwächer ausgeprägt. Im Gegensatz zu freiem CO₂ ($r_{\text{C-O}}$: 1.16 Å) [13] und Ameisensäure ($r_{\text{C-O}}$: 1.23 bzw. 1.26 Å) [123] sind die C-O-Bindungen deutlich verlängert und äquivalent in ihrer Länge. Die Abweichungen zu den Literaturwerten von Modellverbindungen können durch stabilisierende Interaktionen mit der Proteinmatrix (His93 und Lys563) und dem C-Cluster erklärt werden. So unterscheidet sich die chemische Umgebung in einem aktiven Zentrum hinsichtlich der Ladung, Dielektrizitätskonstante und H-Brücken-Wechselwirkungen deutlich von der Umgebung in Kristallstrukturen kleiner Moleküle.

Die Ni-C-Bindung von 1.81 Å gehört zu den kürzesten beobachteten Bindungen dieses Typs

und spricht für starke π -Rückbindungseffekte, die durch die besondere Zusammensetzung des elektronenreichen C-Clusters begünstigt werden.

Aufgrund der Vergleiche mit den Bindungslängen und -winkeln, entspricht der vorgefundene Zustand einem Metall-Carboxylat und stellt ein Schlüsselintermediat der CO_2 -Reduktion dar, welches im katalytischen Zyklus direkt von einer C-O-Bindungsspaltung gefolgt wird. Anhand der beobachteten Fe²-O₂-Bindung, der Präsenz eines nukleophilen OH_x-Liganden am Fe² im C_{red1}-Zustand (CO-Oxidation) und der benötigten bifunktionellen Katalyse bei der CO_2 -Reduktion ist die Ansicht etabliert, dass es sich bei der C-O₂-Bindung um die zu spaltende, labile Bindung handelt. Zusätzlich bestärken die deutliche Abweichung aus der Ni-C-O-Ebene, die direkte Nähe eines Proton-Donors (H₃N⁺-Lys563) und der Zugang zu einem konservierten Wasserkanal diese Betrachtungsweise.

Es stellt sich weiterhin die Frage, warum unter den gewählten Umsatzbedingungen (Reduktionsäquivalente und Substrat vorhanden) ein Carboxylat-gebundener Zustand in der Struktur beobachtet wird. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bindung, Aktivierung und Reduktion des CO_2 schnell verläuft und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt somit die Protonierung und nachfolgende C-O-Bindungsspaltung ist. Unter den gewählten Bedingungen (pH 8.0) könnte die ausreichende Bereitstellung von Protonen *in crystallo* vermindert sein und der beobachtete Carboxylat-gebundene Zustand akkumulieren.

Im NCO⁻-gebundenen C-Cluster zeigt sich eine Aktivierung des linearen Cyanats, welches erstmalig in einer μ_2 - η^2 -Geometrie vorgefunden wurde. In anorganischen Kristallstrukturen koordiniert der Ambidentatligand NCO⁻ entweder in einer N-gebundenen linearen oder einer O-gebundenen, gewinkelten Konformation [124-127]. Verbrückende Koordinationen wurden hingegen nur selten beobachtet und beinhalten ausschließlich lineare Geometrien des Cyanats [128, 129]. Im Komplex mit humaner Carboanhydrase-II, der einzigen weiteren makromolekularen Struktur mit Cyanat, bindet dieses in einer N-gebundenen Geometrie an das Zn²⁺-Ion, wobei ein Zn-N-C-Winkel von 135° beobachtet wurde [130]. Dabei bleibt das Cyanat jedoch linear mit einem N-C-O-Winkel von 180°.

Im Gegensatz dazu, zeigt die NCO⁻-gebundene Struktur am C-Cluster eine signifikante Aktivierung, welche sich durch einen N-C-O-Winkel von 115° manifestiert. Die beiden enthaltenen C-O- und C-N-Bindungen unterscheiden sich in ihrer Länge deutlich und liegen im Bereich von C-O-Doppel- und C-N-Einfachbindungen [13]. Untersuchungen mittels Photoelektronen-Spektroskopie zeigten für das freie und lineare Cyanat eine C-N-Bindungslänge von 1.18 Å und eine C-O-Bindungslänge von 1.26 Å [131]. Die vorgefundene C-N-Bindungslänge (1.39 Å) weicht deutlich von diesen Werten ab, befindet sich jedoch nahe

des Wertes für freies Formamid ($r_{\text{C-N}} = 1.30 \text{ \AA}$) [132]. Außerdem beträgt die C-O-Bindungslänge 1.31 \AA und liegt in einer ähnlichen Größenordnung, wie die Literaturwerte für Cyanat (1.26 \AA) und Formamid (1.25 \AA). Dabei weicht der Bindungswinkel für Formamid ($\angle\text{N-C-O} = 121.5^\circ$) [132] nur gering vom beobachteten Wert (115.2°) ab. Die vergrößerte Entfernung der Imidazolfunktion des His93 vom Ligand lässt sich durch Reduktion des Cyanats zum Formamid und der resultierenden Wasserstoffatome am Stickstoff des Formamids erklären. Die Proton-Proton-Abstoßung zwischen N-H und dem protonierten H-N ϵ -His93 führt dabei zu einer Verschiebung der His-Seitenkette. Der in der proximalen His93B-Konformation vorgefundene Abstand erhöht sich von 2.7 auf 3.6 \AA , was die Koexistenz von Formamid und His-Seitenkette erlaubt.

Die beobachteten Bindungslängen und -winkel sowie die Interaktionen mit der Proteinmatrix, lassen auf eine Zweielektronen-reduktive Aktivierung des Cyanats schließen. Dies resultiert in einem gebundenen Formamid am C-Cluster im $-600 \text{ mV} + \text{NCO}^-$ -Zustand. Es handelt sich somit um eine Mechanismus-abhängige Inhibition, die auch als Suizid-Inhibition bezeichnet wird. Formamid ist thermodynamisch stabilisiert und besitzt eine hohe Aktivierungsbarriere von $73\text{-}78 \text{ kcal/mol}$ hinsichtlich der Spaltung in Cyanid und Wasser [133], weshalb unter den gewählten Bedingungen kein Umsatz beobachtet wurde.

Die Analyse des -320 mV -Zustandes führte zu einer verbesserten Beschreibung des Liganden am Fe2. Dabei ist die Fe-OH $_x$ -Bindung im Vergleich zur Struktur mit mittlerer Auflösung [71] um 0.3 \AA verlängert. Die resultierende Fe2-O-Bindung von 2.20 \AA stimmt dabei gut mit dem Wert für Fe(H $_2$ O) $_6^{2+}$ -Komplexe ($r_{\text{Fe-O}} = 2.085 \text{ \AA}$ [134] bzw. 2.13 \AA [135], Werte für Kristallstrukturen) überein. In der Literatur werden hingegen kürzere Bindungslängen für Fe $^{2+}$ -OH-Bindungen zwischen 1.83 und 2.05 \AA gefunden [136-138]. Aufgrund dieser Vergleiche handelt es sich beim Liganden des Fe2-Atoms wahrscheinlich um Wasser. Diese Vermutung könnte in Zukunft durch eine detaillierte Berechnung auf QM/MM-Ebene weiter untersucht werden.

Die Ni-O-Interaktion ist mit 2.41 \AA ist deutlich länger als typische Ni-OH $_2$ Bindungen (2.08 \AA) [134]. Zusammen mit der Abweichung des Wassermoleküls aus der Ebene spricht dies weiterhin für eine T-förmige Koordination am Ni, wie sie häufig in *low-spin* d 8 -Systemen wie Ni $^{2+}$ beobachtet wird [13, 139].

Abschließend sollen die Ergebnisse aus den Strukturanalysen bei atomarer Auflösung in Form von Strukturformeln zusammengefasst werden. Dies ist in Abbildung 20 dargestellt.

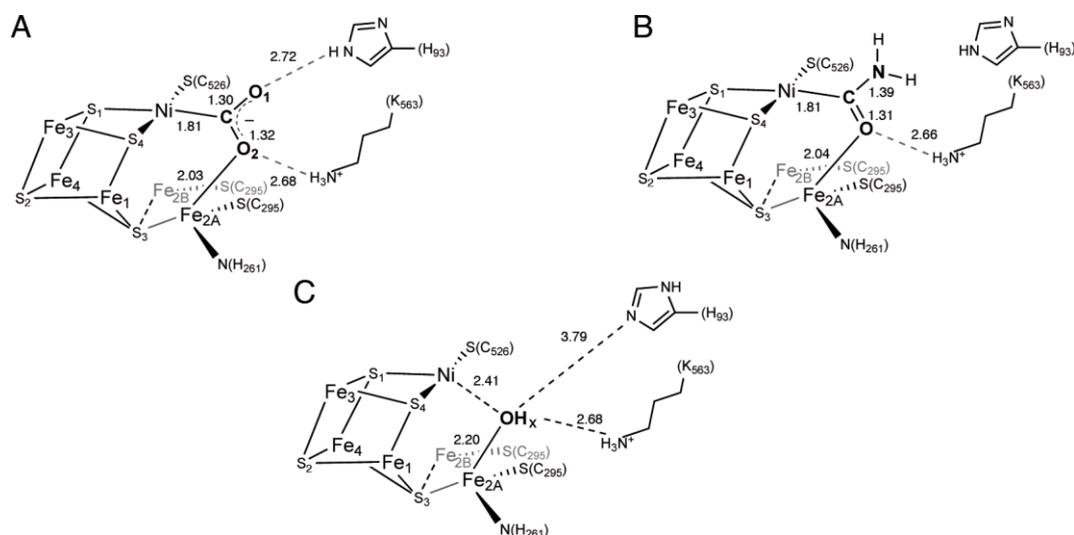


Abbildung 20: Strukturformeln der atomar-aufgelösten Zustände. Dargestellt sind chemische Interpretationen der Zustände $-600\text{ mV} + \text{CO}_2$ (A), $-600\text{ mV} + \text{NCO}^-$ (B) und -320 mV (C) sowie wichtige intramolekulare Bindungslängen und Koordinationsabstände (in Å).

Mit Hilfe der hochaufgelösten Kristallstrukturen von CODH-II_{Ch} konnten neue Einblicke in die atomare Zusammensetzung von Schlüsselzuständen des Reaktionszyklus gewonnen werden. Die detaillierte geometrische Beschreibung mit Bindungslängen und -winkeln, inklusive individueller Standardabweichungen, bildet die Grundlage für zukünftige computergestützte Modellierungen und Berechnungen. Auf diese Weise sollen neue Einblicke in die energetischen Unterschiede der einzelnen Zustände gewonnen und die Abfolge von Reaktionspfaden ermittelt werden.

Die Struktur des $-600\text{ mV} + \text{CO}_2$ -Zustands offenbarte ein gebundenes Carboxylat-Molekül am C-Cluster, dessen negative Ladung delokalisiert ist und identisch lange C-O-Bindungen beherbergt, obwohl eine geschwächte Fe2A-O-Bindung erwartet wurde.

Die Struktur des $-600\text{ mV} + \text{NCO}^-$ -Zustands erlaubte die molekularen Ursachen der Inhibition aufzuklären und Unterschiede und Gemeinsamkeiten bei der Reaktivität von CO_2 und NCO^- zu ermitteln. Somit konnte gezeigt werden, dass das C-Cluster ein idealer Katalysator ist und nicht nur CO_2 , sondern auch NCO^- zu aktivieren vermag. Außerdem konnte indirekt gezeigt werden, dass das C-Cluster im -600 mV tatsächlich dem C_{red2}-Zustand entspricht, da Cyanat selektiv an diesen Zustand bindet.

Die Struktur des -320 mV -Zustands erlaubte eine detaillierte Beschreibung des Liganden und erlaubte die Identifikation eines Wassermoleküls als Ligand am Fe2A ($\text{OH}_x = \text{H}_2\text{O}$).

3.1.5 Struktur des Cyanid-inhibierten Zustands in verzerrt quadratisch-planarer Geometrie

Die Struktur des Cyanid-inhibierten Zustands von CODH-II_{Ch} [72] konnte zeigen, dass CN⁻ in die quadratisch-planare Koordinationsstelle des Ni bindet. In diesem Zustand können CN⁻ und OH_x-Gruppe aufgrund sterischer Abstoßungen nicht koexistieren. Ferner wurde beobachtet, dass die beiden Konformationen des Fe2 ihre relativen Verhältnisse invertieren und Fe2B mit einem Besetzungsgrad von 70 % dominiert. Deshalb wurde angenommen, dass das physiologische Substrat CO in einer verzerrt quadratisch-planaren Konformation bindet, in der auch die OH_x-Gruppe des Fe2 in nukleophiler Angriffsdistanz koexistieren kann.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein alternativer CN⁻-gebundener Zustand hergestellt, in dem die CN⁻-Konzentration im *soaking*-Puffer (-320 mV) schrittweise bis zu einer Endkonzentration von ca. 14 mM erhöht wurde. Nach der Datensammlung (d_{\min} : 1.35 Å, Datenstatistiken im Anhang Tab. A3) und der Strukturaufklärung, wurde im Modell zunächst das C-Cluster ohne Liganden platziert und verfeinert. Dabei verblieb ein positives Signal in der F_o-F_c -Elektronendichtekarte zwischen dem Ni des C-Clusters und dem Ne-Atom von His93. In die resultierende elliptische Elektronendichte konnte aufgrund der passenden Größe, Bindungslänge und Umgebung ein Cyanid-Ion modelliert werden. Abbildung 21 zeigt die verfeinerte Struktur zusammen mit der finalen $2F_o-F_c$ - und der *omit*- F_o-F_c -Elektronendichtekarte.

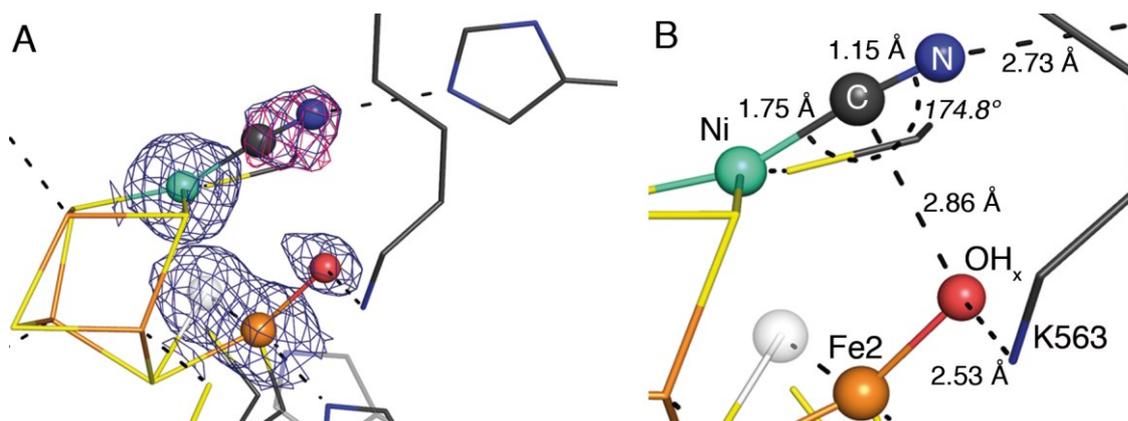


Abbildung 21: Struktur des Cyanid-gebundenen Zustands in verzerrt quadratisch-planarer Koordinationsgeometrie. A) Finales Modell des $-320\text{ mV} + \text{CN}^-$ -Zustands mit $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte (blau, 1.0σ) und der *omit*- F_o-F_c -Elektronendichtekarte (pink, 6σ). B) Relevante Bindungslängen und -winkel in der Struktur. Die Atome im Kugelstabmodell wurden elementspezifisch gefärbt. Dabei ist die gering-besetzte Position des Fe2 transparent dargestellt.

Cyanid bindet in dieser Struktur als terminaler, linearer Ligand in einer verzerrt quadratisch-planaren Geometrie mit einem Ni-C-N-Winkel von 175° an das Ni-Atom. Die C-N-Bindungslänge von 1.15 \AA sowie die Ni-C-Bindungslänge von 1.75 \AA , sind in guter Übereinstimmung mit den Werten der unverzerrten, quadratisch-planar-gebundenen Struktur (vgl. $r_{\text{Ni-C}}$: 1.79 und $r_{\text{C-N}}$: 1.15 \AA) [72]. Dabei wird die Bindung des Cyanids durch Wasserstoffbrücken mit His93 stabilisiert ($r_{\text{N-N}_6}$: 2.73 \AA) und der Ligand befindet sich in kurzer Distanz zur OH_x -Gruppe des Fe2 ($r_{\text{C-O}}$: 2.86 \AA). Die Besetzungsverhältnisse der beiden Konformationen von Fe2 sind in dieser Struktur vergleichbar und wurden als 60:40 % (A/B) verfeinert. Dies entspricht auch den Besetzungsgradverhältnissen, die für den -320 mV -Zustand gefunden wurden [71] und weicht vom Verhältnis in der Cyanid-inhibierten Struktur (10:70 % für Fe2A und Fe2B) [72] deutlich ab. Die Fe2A-gebundene OH_x -Funktion ist vergleichbar zum -320 mV -Zustand (Kapitel 3.1.4) in einer Entfernung von 2.53 \AA zur Aminogruppe von Lys563 positioniert.

Die hier vorgestellte Cyanid-gebundene Struktur unterscheidet sich deutlich von der nBIC-gebundenen Struktur mit tetraedrischer Geometrie [74], in welcher die Position des C-Atoms in Richtung der apikalen Bindungsstelle um 0.62 \AA abweicht. Neben der CN^- -inhibierten Struktur von CODH-II_{Ch} [72] ist auch eine inhibierte Struktur der CODH/ACS_{Mt} bekannt [73]. Dabei wurde eine gewinkelte Konformation des Cyanids mit einem unerwarteten Ni-C-N-Winkel von ca. 114° beobachtet (Durchschnittswert von 4 Molekülen in der ASU). In Abbildung 22 ist eine Überlagerung der CN^- -gebundenen Zustände am C-Cluster dargestellt.

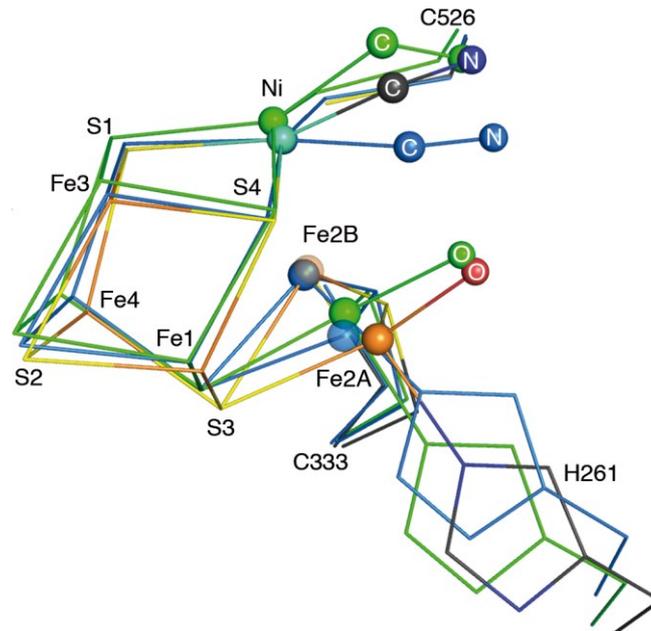


Abbildung 22: Überlagerung unterschiedlicher CN^- -gebundener Strukturen. Dargestellt sind Cyanid-gebundene Strukturen von CODH_{Mt} (d_{\min} : 2.15 Å, grün, PDB-ID: 3I04) [73] und CODH-II_{Ch} in quadratisch-planarer (d_{\min} : 1.36 Å, marineblau, PDB-ID: 3I39) [72] bzw. verzerrt quadratisch-planarer Koordinationsgeometrie (d_{\min} : 1.35 Å). Die schwach-besetzte Konformation des Fe2 wurde halbtransparent dargestellt. Zur Klarheit wurden koordinierende Reste des C-Clusters nicht gezeigt und die Nummerierung entspricht CODH-II_{Ch} .

Dabei zeigt sich zunächst eine deutliche Abweichung der Bindungsgeometrie der Cyanide, wobei die linearen Konformationen aus CODH-II_{Ch} (diese Arbeit und [72]) im Einklang mit der Komplexchemie des Cyanids sind. Die Autoren der Struktur der Cyanid-inhibierten CODH/ACS_{Mt} erklärten die Abweichung von einer linearen Konformation durch sterische Abstoßung des Cyanid-N-Atoms mit der Seitenkette eines benachbarten Isoleucin-Rests. Aufgrund der relativ geringen Auflösung (d_{\min} : 2.2 Å) und der damit einhergehenden geringen Qualität der Elektronendichtekarten ist es jedoch problematisch, diesen Daten zuviel Gewicht beizumessen. In der hier vorgestellten verzerrt quadratisch-planaren Geometrie befindet sich das Cyanid-Molekül entlang einer virtuellen Trajektorie oberhalb des quadratisch-planaren Cyanids. Dabei wurden C-C- und N-N-Abstände von 0.84 und 1.11 Å vorgefunden, wobei die C-Atome der beiden Cyanid-Konformationen mit dem Ni-Atom des C-Clusters einen Winkel von 27.5° einschließen. Cyanid ist bekannt als langsam bindender Inhibitor der CO-Oxidation [65, 69, 76, 140]. Der Grund dafür könnte entweder in einer *per se* langsamen reversiblen Bindung an das C-Cluster liegen oder aber in einer schnellen reversiblen Bindung, welche von einer langsamen strukturellen Umlagerung gefolgt wird und schließlich zu einer festen Bindung des Inhibitors führt [72, 141]. So handelt es sich bei der beobachteten verzerrt quadratisch-planaren Struktur, um einen Zwischenzustand auf dem

Weg zur vollständig inhibierten Form mit quadratisch-planarer Bindungsgeometrie. Dies ist schematisch in Abbildung 23 dargestellt.

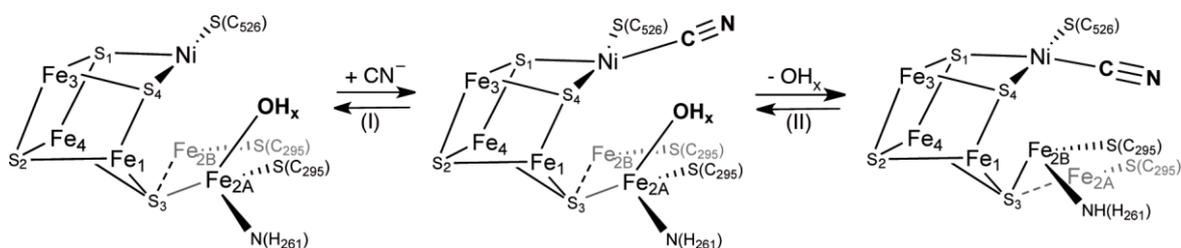


Abbildung 23: Mechanismus der Cyanidinhibition. Im -320 mV-Zustand bindet CN^- zunächst in einer verzerrt quadratisch-planaren Konformation (I). Diese wird gefolgt von einer strukturellen Umlagerung in deren Zuge die OH_x -Gruppe am Fe2A eliminiert wird (II). Dabei führt die Bindung des CN^- in quadratisch-planarer Geometrie zu einer Besetzungsumkehr am Fe2, wo schließlich Konformation B überwiegt. Verändert nach Referenz: [72].

In der Literatur wurde kontrovers diskutiert, ob es sich beim finalen $[\text{Ni}_4\text{Fe}_4\text{S}_4\text{-CN}]$ -Cluster um einen reversiblen oder irreversiblen, inhibierten Zustand handelt. Obwohl die Cyanidinhibierte Form von CODH-II_{Ch} in Lösung durch Inkubation mit dem Substrat CO oder dem starken Reduktionsmittel Ti^{3+} -Citrat reaktiviert werden kann, ist bislang keine Korrelation des inhibierten Zustands in Lösung mit den kristallographisch erfassten Zuständen möglich. So kann weiterhin keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Schritt (II) aus Abb. 23 reversibel oder irreversibel ist und zu einer vollständig inhibierten, katalytisch „toten“ CODH führt.

Cyanid, welches isoelektronisch und isostrukturell zum Substrat CO ist, bindet in der beschriebenen verzerrt quadratisch-planaren Geometrie (Abb. 21), wie für den Übergangszustand der CO-Oxidation erwartet wird (siehe Abb. 11, Einleitung). CO könnte so zunächst in die offene apikale Bindungsstelle des Ni-Atoms binden und nach erfolgter Umlagerung in der gefundenen Geometrie aufgrund der unterstützenden Interaktionen mit His93 arretieren. Da sich die OH-Gruppe in unmittelbarer Distanz (*near-attack distance*) von 2.7 \AA befindet, würde der nukleophile Angriff nach Deprotonierung direkt zur Carboxylat-gebundenen Struktur führen.

Somit konnten anhand der neuen CN^- -gebundenen Struktur, wertvolle Einsichten in den Mechanismus der CN^- -Inhibition sowie in den erwarteten CO-gebundenen Übergangszustand gewonnen werden.

3.1.6 Visualisierung der Substratkanäle mittels Xenon-Derivatisierung

Ein entscheidender Faktor für die Katalyse mit hohen Umsatzraten ist die schnelle und direkte Bereitstellung aller Substrate und gerichteter Abtransport der Produkte. CODHs sind für diese Bedürfnisse optimal ausgestattet und sind im Stande Protonen, Elektronen und Wasser in einer hocheffizienten Weise zum und vom C-Cluster zu transportieren. In diese logistische Aufgabe sind eine Elektronentransferkette (B- und D-Cluster), eine Histidin-Kaskade (His96-His99-His101) und konservierte Wasserkanäle involviert [26, 40, 93]. Der Schlüssel für eine schnelle und effiziente Katalyse ist jedoch der Substrat- und Produkttransfer für CO und CO₂. Dazu wurde bereits in der ersten veröffentlichten Struktur der CODH-II_{Ch}, die im Jahre 2001 gelöst wurde, ein hydrophober Substratkanal vorgeschlagen, welcher die Proteinoberfläche mit dem C-Cluster verbindet [44]. Xenon-Derivatisierungsexperimente an CODH/ACS_{Mt} erlaubten die Identifizierung eines 138 Å langen Gaskanals, welcher die beiden A-Cluster und die C-Cluster miteinander verbindet und so den intramolekularen CO-Transport bewerkstelligen kann [57]. So wurde eindrucksvoll gezeigt, wie die Architektur der Gaskanäle einen Rahmen für den Produkttransfer erlaubt. Trotzdem konnten damit nur bedingt Rückschlüsse auf die Kanalarchitektur in monofunktionellen CODHs gezogen werden.

CODH-II_{Ch} gehört zur Klasse der monofunktionellen CODHs und ist physiologisch für die Generierung von Elektronen (Reduktionsäquivalenten) aus der CO-Oxidation verantwortlich [79], wohingegen die CODH-Untereinheit von CODH/ACS_{Mt} als bifunktionelles Enzym *in vivo* wohl ausschließlich die CO₂-Reduktion katalysiert.

Um Einblicke in die Kanalarchitektur monofunktionaler CODHs zu erhalten, wurde die Struktur der Xenon-derivatisierten CODH-II_{Ch} gelöst. Dazu wurden Kristalle bei einem Druck von 27 bar unter Xenon-Atmosphäre inkubiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und ein Datensatz bei 1.7 Å Wellenlänge aufgenommen (Anhang Tab. A3). Nachdem die Daten phasiert wurden, konnten die Xe-Atome anhand der berechneten anomalen Differenz-Fourier-Karte in der Struktur identifiziert werden. Abbildung 24 zeigt die Position der einzelnen Xe-Atome im funktionellen Dimer.

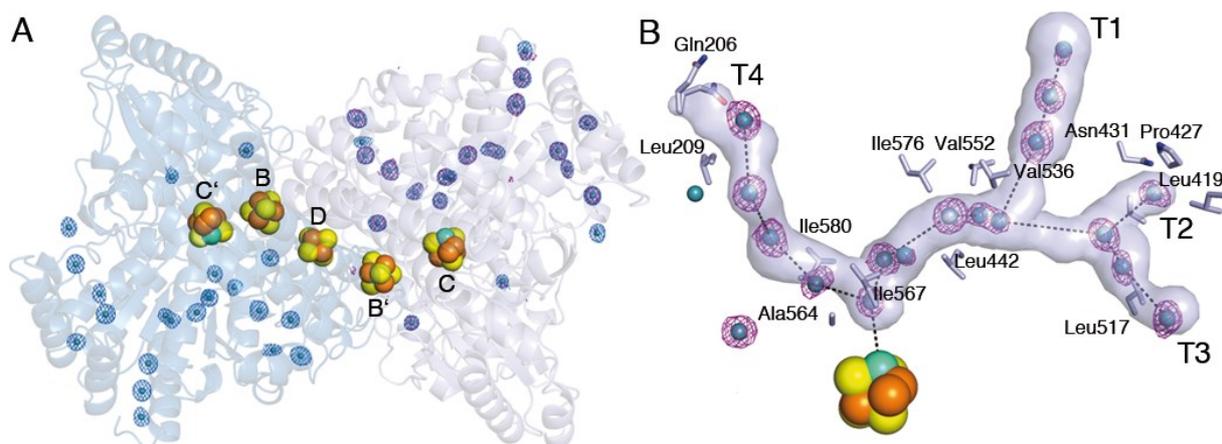


Abbildung 24: Xenon-Derivatisierung von CODH-II_{Ch}. A) Gesamtstruktur des CODH-Dimers in Bänderdarstellung mit den identifizierten Xe-Atomen (grüne Sphären) und Metallclustern (elementfarbene Sphären). Die berechnete anomale Differenz-Fourier-Karte für Xe (der Datensatz wurde bei einer Wellenlänge von 1.7 Å aufgenommen) ist bei einem Konturlevel von 3.0 σ (pink) und die finale $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte bei einem Konturlevel von 1.0 σ (blau) dargestellt. B) Gaskanäle zum C-Cluster wurden mit Hilfe von MOLE 2.0 [109] berechnet. Zusätzlich wurden hydrophobe Reste in unmittelbarer Nähe des Kanals identifiziert und im Stabmodell dargestellt. Insgesamt vier Tunneleingänge (T1-T4) verbinden die Proteinoberfläche mit den Tunneln zum C-Cluster.

Es wurden insgesamt 19 Xe-Atome pro Monomer identifiziert, wobei 17 Atome direkt in den Kanälen zwischen C-Cluster und der Proteinoberfläche aufgefunden wurden. Dabei zeigten die Xe-Atome sehr deutliche Signale in der $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte und in der anomalen Differenz-Fourier-Karte. Die identifizierten Kanäle besitzen eine verzweigte Y-Form, wobei eine Kanalhälfte in Richtung der Dimerisierungsfläche zeigt und eine stärker verzweigte Hälfte in Richtung der Außenfläche weist. Die beiden Hälften vereinigen sich am Ile567 direkt oberhalb des C-Clusters. Es existieren insgesamt vier Tunneleingänge, welche die Oberfläche und das C-Cluster verbinden. Die Tunnel T1-T3 treffen sich 12 Å vor dem C-Cluster an einem gemeinsamen Verzweigungspunkt, wobei die Gesamtdistanzen zwischen Cluster und Oberfläche bei 29 Å (T1, T2) bzw. 32 Å (T3) liegen. Im Gegensatz dazu beträgt die Distanz des Eingangs T4 zum C-Cluster lediglich 20 Å.

Im Zentrum dieser Untersuchung stand der Vergleich der Xenon-derivatisierten Strukturen der monofunktionellen CODH-II_{Ch} und dem bifunktionellen CODH/ACS_{Mt}-Komplex. So wurden zunächst die Positionen der einzelnen Xe-Atome verglichen und Kanäle zum und vom C-Cluster berechnet. In Abbildung 25 ist dies dargestellt.

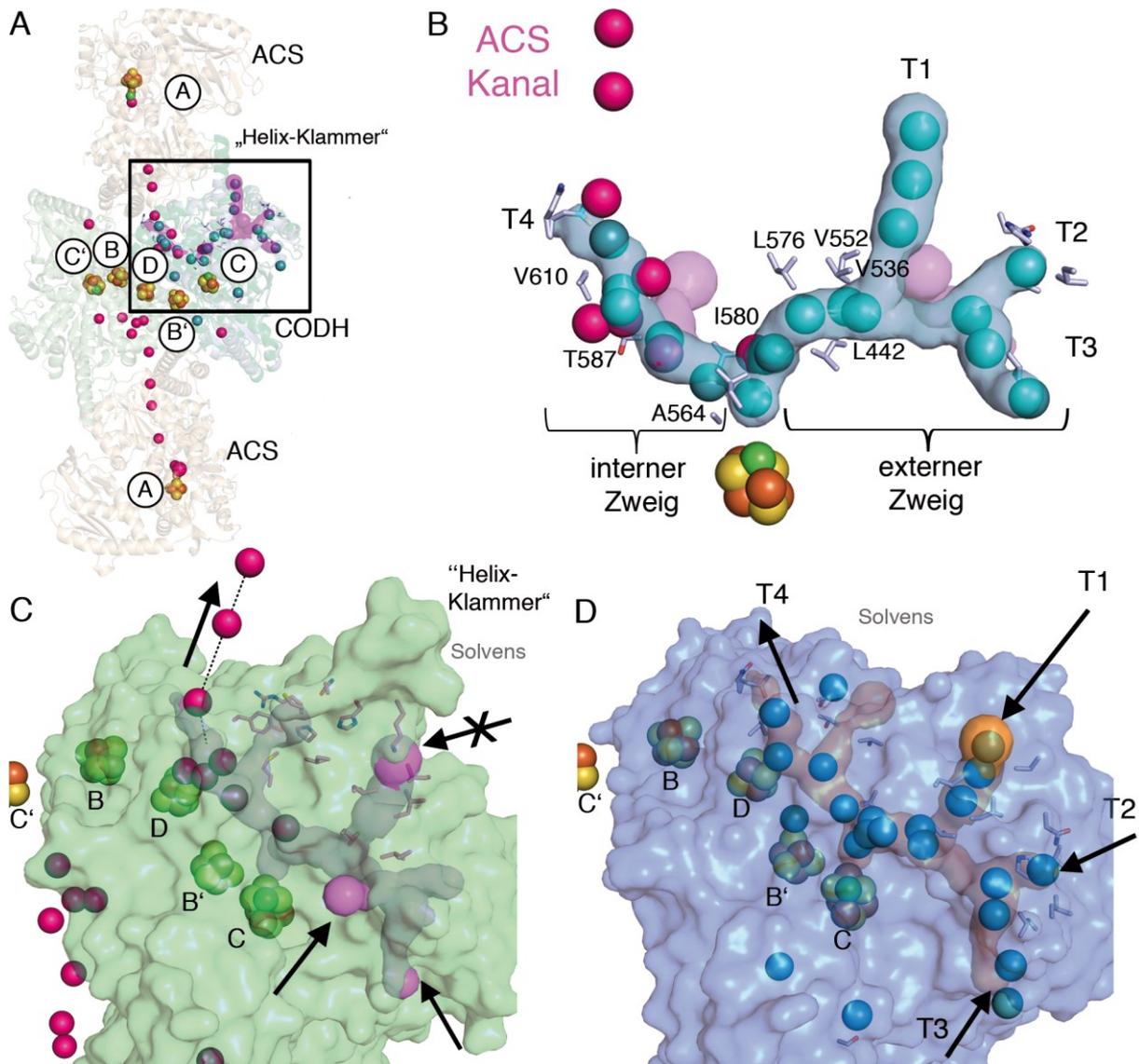


Abbildung 25: Vergleiche der Xe-derivatisierten Strukturen von bifunktionellen und monofunktionellen CODHs. A) Überlagerung von CODH/ACS_{Mt} (PDB-ID: 2Z8Y) [57] und CODH-II_{Ch} nach Xenon-Derivatisierung. Dabei sind ACS_{Mt}- (beige), CODH_{Mt}- (grün) und CODH-II_{Ch} (blau) in Bänderdarstellung gezeigt. B) Vergleich der Kanalstruktur oberhalb des C-Clusters für CODH_{Mt} (pinker Kanal, Xe als pinke Sphären) und CODH-II_{Ch} (grüner Kanal und grüne Xe-Atome). Dabei sind relevante hydrophobe Reste im Kanal und das C-Cluster aus CODH-II_{Ch} dargestellt. C) Oberflächendarstellung der Kanäle von CODH_{Mt}. Der potentielle Tunneleingang T1 (vgl. CODH-II_{Ch}) ist durch eine C-terminale Helix verschlossen. An der Position von T4 aus CODH-II_{Ch} beginnt der interne Tunnel, welcher das C-Cluster mit dem A-Cluster der ACS-Einheit verbindet. D) Oberflächendarstellung von CODH-II_{Ch} mit den Eingängen zum Tunnelsystem. Die berechneten Kanäle wurden orange und die Xe-Atome als blaue Sphären dargestellt. Die Gaskanäle am C-Cluster wurden mit MOLE 2.0 [109] berechnet und die Eingänge zu den Tunneln sind mit Pfeilen in den Abbildungen C und D gekennzeichnet.

In der Struktur des CODH/ACS_{Mt}-Komplexes befinden sich zehn Xe-Atome pro α/β -Dimer, neun davon in dem Verbindungskanal zwischen A- und C-Cluster (Abb. 25A und B, interner Zweig). Im Gegensatz zur Struktur der CODH-II_{Ch} konnten in der bifunktionellen CODH_{Mt}

keine Xe-Atome im externen Zweig identifiziert werden. Mit Hilfe des Programms MOLE 2.0 [109] wurden die Gaskanäle für CODH/ACS_{Mt} und CODH-II_{Ch} berechnet und visualisiert. CODH/ACS_{Mt} besitzt einen ähnlichen zweigeteilten Gaskanal oberhalb des C-Cluster, der sich mit dem von CODH-II_{Ch} überlagert. Dieser unterscheidet sich jedoch deutlich in seinen Ausprägungen.

Der Tunneleingang T1, welcher für die monofunktionelle CODH-II_{Ch} identifiziert wurde, ist in seiner Grundstruktur vorhanden, wird in CODH/ACS_{Mt} jedoch von einem Lysin-Rest (Lys660) und drei Leucin-Resten (Leu457, Leu656 und Leu567) abgeschlossen (siehe Anhang Abb. A7). Die genannten Reste sind Bestandteil einer C-terminalen Helix, die als eine Art Klammer zur Komplexbildung in der bifunktionellen CODH_{Mt} mit der ACS-Untereinheit beiträgt („Helix-Klammer“).

Die Abwesenheit des Tunneleingangs T1 in der bifunktionellen CODH könnte der Vermeidung von Diffusion freien Kohlenmonoxids in das Cytosol dienen. Bifunktionelle CODHs finden sich in einer Vielzahl von Organismen, die keine monofunktionellen CODHs besitzen und durch steigende intrazelluläre CO-Konzentrationen gefährdet sind. Entsprechende Experimente an CODH/ACS_{Mt} konnten zeigen, dass während der Acetyl-CoA-Synthese kaum Diffusion von CO ins Medium stattfindet [142]. Für CODH/ACS_{Mt} sind im externen Zweig nur zwei Kanaleingänge zu identifizieren, wobei einer mit T3 aus CODH-II_{Ch} übereinstimmt. Zusätzlich wurde bereits argumentiert, dass mehrere aromatische Reste oberhalb des C-Clusters den externen Zweig in CODH/ACS_{Mt} abschließen [57] und das Substrat CO₂ durch dynamisch geformte Gaskanäle zum C-Cluster gelangt [143].

Die physiologische Funktion von CODH-II_{Ch} liegt wahrscheinlich in der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten aus der CO-Oxidation. Dazu ist es nötig, das entstandene CO₂ sehr schnell aus dem aktiven Zentrum zu entfernen. Es kann angenommen werden, dass Substrateingang und Produktausgang für eine optimale Katalyse räumlich getrennt sein sollten. Der zweigliedrige Aufbau des Gaskanals von CODH-II_{Ch} legt nahe, dass der externe Zweig der CODH-II_{Ch} mit den Tunneleingängen T1-T3 hauptsächlich für den Transfer ausreichender Mengen Substrat zur Verfügung steht und das Produkt schließlich durch den internen Zweig und Tunneleingang T4 ins Medium abgegeben wird. Auf diese Weise würde Substrat- und Produkttransport räumlich entkoppelt und die Grundlage für eine Reaktionsgeschwindigkeit nahe der Diffusionsgrenze geschaffen.

3.2 CO-Dehydrogenase V (CODH- V_{Ch})

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, zusätzlich zu den Studien an CODH-II $_{Ch}$, auch eine umfassende Untersuchung der bislang uncharakterisierten CODH- V_{Ch} erfolgen. Im Gegensatz zu den anderen vier *cooS*-Genen, ist das *cooS-V*-Gen nicht in ein Gencluster eingebunden. So konnte keine Information über dessen physiologische Funktion abgeleitet werden. Trotz ihrer globalen Übereinstimmung zeigten sich für Sequenzalignments der CODH-Aminosäuresequenzen aus *C. hydrogenoformans* signifikante Abweichungen für CODH- V_{Ch} (Abb. 26).

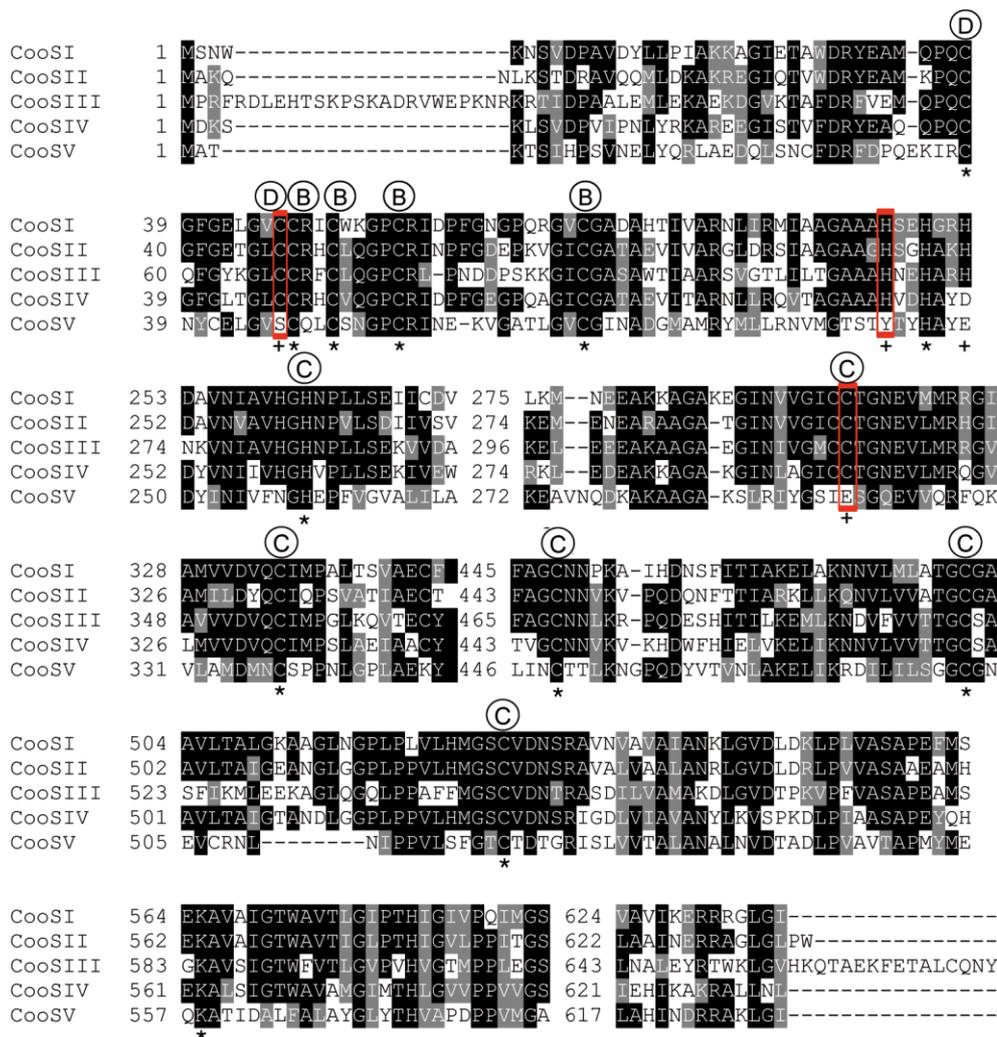


Abbildung 26: Sequenzalignment der CODH-I bis -V aus *C. hydrogenoformans*. Reste sind anhand ihres Konservierungsgrades schattiert. Koordinierende Reste der einzelnen Cluster sind aufgrund der bekannten Struktur von CODH-II durch Symbole für D-Cluster (D), B-Cluster (B) und C-Cluster (C) gekennzeichnet. Die roten Rahmen weisen auf Abweichungen für wichtige Reste der Cluster-Koordination und Katalyse hin. Konservierte Reste wichtiger Funktion mit globaler Übereinstimmung wurden mit * und relevante Reste mit nur beschränkter Übereinstimmung mit + gekennzeichnet. Die Sequenz von CODH-III, die aufgrund einer intrinsischen Rasterschubmutation verkürzt wäre, wurde durch Sequenzalignments mit CODH-II $_{Ch}$ und der bifunktionellen CODH $_{Mt}$ rekonstruiert.

Das Sequenzalignment konnte zeigen, dass deutliche Abweichungen für koordinierende und umgebende Reste des C-Clusters in CODH- V_{Ch} auftreten. So findet sich anstelle des Cys295, welches in CODH-II $_{Ch}$ für die Koordination des Fe2 verantwortlich ist, in CODH- V_{Ch} ein Glutamat-Rest (Glu295) und anstelle von His93, welches ein wichtiger H-Brückenbildner im aktiven Zentrum ist, befindet sich in der Sequenz von CODH- V_{Ch} ein Tyrosin-Rest (Tyr91). Ferner existieren geringe Abweichungen in den koordinierenden Resten für das D-Cluster. Anstelle des koordinierenden Cys47 tritt in CODH- V_{Ch} ein Serin-Rest (Ser46) und ein zusätzliches Cystein wird in der CODH- V_{Ch} -Sequenz an Position 41 (Cys41) gefunden.

Bereits zuvor konnte in einer phylogenetischen Analyse von Matson *et al.* [88] gezeigt werden, dass CODH- V_{Ch} sich deutlich von den anderen CODHs aus *C. hydrogenoformans* abhebt (vgl. Abb. 14). So ordnen sich CODHs-I bis IV in eine große Klade (Klade B) ein, in der sich auch die charakterisierten CODHs aus *R. rubrum* und *M. thermoacetica* befinden. CODH- V_{Ch} wird zusammen mit den *cooS*-Genprodukten aus Clostridien und Methanogenen in Klade C eingeordnet. Im Gegensatz zu den CODHs aus Kladen A und B, sind die *cooS*-Gene aus Klade C nicht direkt in die Acetogenese involviert. Dabei wurden drei unterschiedliche Argumente vorgebracht:

- 1.) Bakterien, die nur eine assoziierte CODH aus Klade C enthalten, sind nicht im Stande CO₂-reduzierende Acetogenese durchzuführen [144].
- 2.) *cooS*-Sequenzen aus Klade C setzen sich sehr stark von denen aus Kladen A und B ab, was ein Ergebnis von starkem Selektionsdruck hinsichtlich einer alternativen Funktion sein könnte.
- 3.) Keines der identifizierten *cooS*-Gene aus Klade C befindet sich in der Nähe eines Gens, das eine Rolle im Acetyl-CoA-Weg spielt [88].

Aufgrund der augenscheinlichen Abweichungen in der Proteinsequenz vom Konsensus soll für CODH- V_{Ch} eine vertiefte Untersuchung erfolgen.

3.2.1 Heterologe Expression und Reinigung

Zunächst wurde ein heterologes Expressionssystem für CODH- V_{Ch} etabliert. Dazu wurde das *cooS-V*-Gen in einen pASK-IBA17 *plus* Vektor kloniert, um das Genprodukt mit einem N-terminalen Strep-tag in *E. coli* BL21(DE3) zu synthetisieren. Die Genexpression wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin induziert und führte nach 12 h zu einer Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 64 kDa (erwartet 68 kDa) auf dem SDS-PAGE-Gel. Nach der Fermentation wurden Bakterienpellets mit einem Nasszellgewicht von ca. 2.4 g pro l Kulturmedium geerntet. Die Reinigung von CODH- V_{Ch} führte zum Produkt mit mehr als 95 % Reinheit, wobei durchschnittlich 1-2 mg CODH- V_{Ch} pro g Nasszellgewicht isoliert werden konnte. Abbildung 27 zeigt die heterologe Proteinherstellung und den Reinigungsfortschritt mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie.

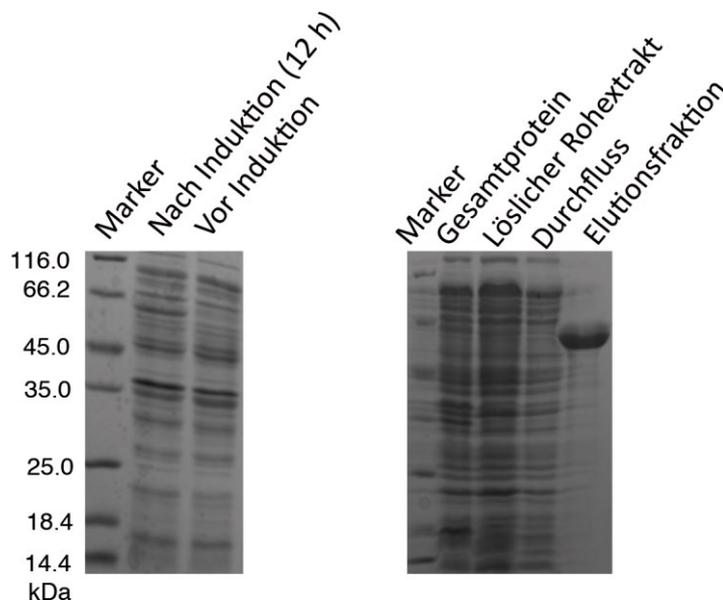


Abbildung 27: Heterologe Herstellung und Reinigung von CODH- V_{Ch} . Dargestellt sind 15 %-ige SDS-PAGE-Gele. Links: Fortschritt der heterologen Herstellung nach und vor Induktion (+ 12 h). Rechts: Fortschritt der Proteinreinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie. Nach Laden des Rohextrakts auf eine StrepTactin-Säule wurde mit Elutionspuffer (250 mM Desthiobiotin) eluiert und in kleinen Fraktionen aufgesammelt. Diese wurden im Anschluss vereinigt und nach Pufferaustausch konzentriert.

Für einen Teil der Proteinchargen erfolgte im Anschluss an die Reinigung die Abspaltung des N-terminalen Strep-tags mittels TEV-Protease. So konnte tag-freies Protein vorwiegend zur Kristallisation eingesetzt werden.

Das isolierte Protein zeichnete sich durch eine rotbräunliche Färbung aus, welche nach Behandlung mit dem Reduktionsmittel Dithionit nahezu vollständig verblasste. Im Folgenden

sollen die spektralen Eigenschaften von CODH- V_{Ch} durch UV/Vis-Spektroskopie näher beleuchtet werden.

3.2.2 UV/Vis-Spektroskopie und Quantifizierung des Fe-Gehalts

Aufgrund der starken Färbung im *as-isolated* Zustand und der hohen Sequenzübereinstimmung mit CODH-II $_{Ch}$ wurde für CODH- V_{Ch} eine ähnliche Cofaktorzusammensetzung mit mehreren FeS-Clustern angenommen. Um die spektralen Eigenschaften zu ergründen, wurden UV/Vis-Spektren des isolierten Enzyms aufgenommen und das Verhalten einzelner spektraler Bestandteile durch Titration mit dem starken Reduktionsmittel Dithionit ($E^{\circ'} = -660$ mV) [145] untersucht. Dies ist in Abbildung 28 dargestellt.

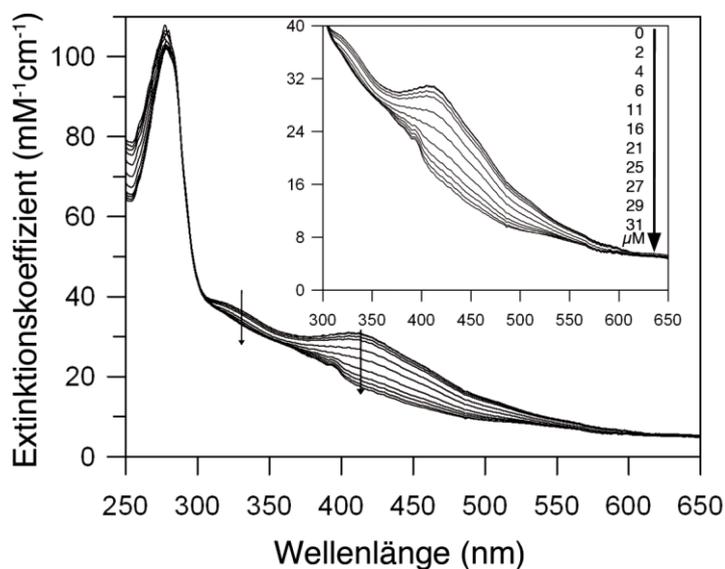


Abbildung 28: UV/Vis-Spektren der isolierten und reduzierten CODH- V_{Ch} . 20 μ M CODH- V_{Ch} wurden in Messpuffer (50 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl) vorgelegt und mit Dithionit-Lösung (Stammkonzentration von 1 mM) titriert. Das eingefügte Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des spektralen Bereichs zwischen 300 und 650 nm. Die dargestellten Spektren wurden bei variierender DT-Konzentration von 0 bis 31 μ M aufgenommen und auf ein identisches Volumen normiert.

Das Spektrum der isolierten CODH- V_{Ch} zeigt neben dem Proteinsignal bei 280 nm auch prominente Signale bei 310 und 419 nm. Dabei zeichnen sich die einzelnen Maxima durch Extinktionskoeffizienten von 101.0 (ϵ_{280}), 39.2 (ϵ_{310}) und 30.1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ϵ_{419}) aus. Die sequentielle Zugabe von Dithionit bewirkte ein Ausbleichen der Signale bei 310 und 419 nm, wobei speziell das Signal bei 419 nm stark auf die Zugabe reagierte. Die

Extinktionskoeffizienten der reduzierten Spezies betragen für die prominenten Signale 105.2 (ϵ_{280}), 38.8 (ϵ_{310}) und 16.5 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ϵ_{419}).

Die beobachteten Extinktionsdifferenzen zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand waren -4.2 ($\Delta\epsilon_{280}$), 0.4 ($\Delta\epsilon_{310}$) und 13.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon_{419}$). Mit Hilfe eines angenommenen Extinktionskoeffizienten von 4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ϵ_{419}) pro Fe konnte eine Zahl von 7.5 Fe-Atomen pro Monomer berechnet werden, was einer Anzahl an 1.9 [4FeXS]-Clustern entspricht. In Tabelle 4 sind die einzelnen Extinktionsfaktoren und -verhältnisse für CODH- I_{Ch} , - II_{Ch} und - V_{Ch} aufgeführt.

Tabelle 4: Extinktionskoeffizienten für CODH- V_{Ch} im Vergleich zu CODH- I_{Ch} und - II_{Ch} . Die Werte für CODH- I_{Ch} und - II_{Ch} wurden aus der Literatur [43] entnommen und auf das Monomer umgerechnet. ND: Nicht determiniert.

	CODH- I_{Ch}	CODH- II_{Ch}	CODH- V_{Ch}
ϵ_{280} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	96.0 (ox) / 86.0 (red)	100.2 (ox) / 101.9 (red)	101.0 (ox) / 105.2 (red)
ϵ_{310} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	ND	ND	39.2 (ox) / 38.8 (red)
ϵ_{419} ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	37.0 (ox) / 17.5 (red)	41.9 (ox) / 21.4 (red)	30.1 (ox) / 16.5 (red)
$\epsilon_{280}/\epsilon_{310}$	ND	ND	2.6 (ox) / 2.7 (red)
$\epsilon_{280}/\epsilon_{419}$	2.6 (ox) / 4.9 (red)	2.4 (ox) / 4.8 (red)	3.4 (ox) / 6.4 (red)
ber. Anzahl an [4FeXS]- Clustern pro Monomer	2.3	2.6	1.9

Der Vergleich mit den beiden anderen charakterisierten CODHs aus *C. hydrogeniformans* zeigte ähnliche Werte für den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm, welche speziell zwischen CODH- II_{Ch} und - V_{Ch} gut übereinstimmen. Der Peak um 419 nm ist charakteristisch für [4Fe4S]-Cluster und besitzt Extinktionskoeffizienten um 16 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, wobei in der 420 nm-Region typischerweise eine Verringerung der Absorption um 50 % beobachtet wird [146]. Es zeigt sich, dass der Extinktionskoeffizient bei 419 nm für CODH- V_{Ch} im Vergleich zu CODH- I_{Ch} und - II_{Ch} deutlich geringer ist, was für eine verringerte Anzahl an enthaltenden Fe-Atomen und somit an FeS-Clustern spricht. Zur Bestätigung des spektralphotometrisch ermittelten Fe-Gehalts, wurde eine colorimetrische Bestimmung mit Hilfe des spezifischen Eisenchelators Feren-S durchgeführt [115]. Der Fe-Feren-Komplex zeichnet sich durch eine grünliche Färbung aus und besitzt sein Absorptionsmaximum bei 593 nm. Um eine Eichgerade zu erhalten, wurden zunächst Messungen an Proben mit bekannter Fe-Konzentration durchgeführt (Anhang Abb. A9). Der Verlauf der Messungen war in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 20 μM linear und lieferte eine Eichgerade mit der Gleichung $A_{593} = 0.032[\text{Fe}^{2+}] + 0.032$. Durch die Bestimmung der Absorptionswerte an drei

unabhängigen Proben von CODH- V_{Ch} (Konzentration: 0.05, 0.1 und 2 mg/ml), konnte der Fe-Gehalt zu 7.6 (\pm 0.6) Fe-Atomen pro Monomer bestimmt werden. Dieser Wert korreliert sehr gut mit den spektralphotometrisch ermittelten Werten von 7.5 Fe-Atomen bzw. 1.9 [4FeXS]-Clustern pro Monomer. Somit konnte der Fe-Gehalt anhand zweier unabhängiger Methoden experimentell bestimmt werden.

3.2.3 Oligomerer Zustand der CODH- V_{Ch}

Um Informationen über den oligomeren Zustand von CODH- V_{Ch} zu erhalten, wurden analytische Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Zunächst wurde eine Eichgerade für Proteine bekannten Molekulargewichts aufgestellt (Anhang Abb. A8). Dabei konnte die Geradengleichung zu $\log MW = 7.917 - 0.0385 \cdot V_e$ bestimmt werden. CODH- V_{Ch} eluiert als einzelner scharfer Peak bei einem Elutionsvolumen von 73.9 ml. Der Gelfiltrationslauf für CODH- V_{Ch} ist in Abbildung 29 dargestellt.

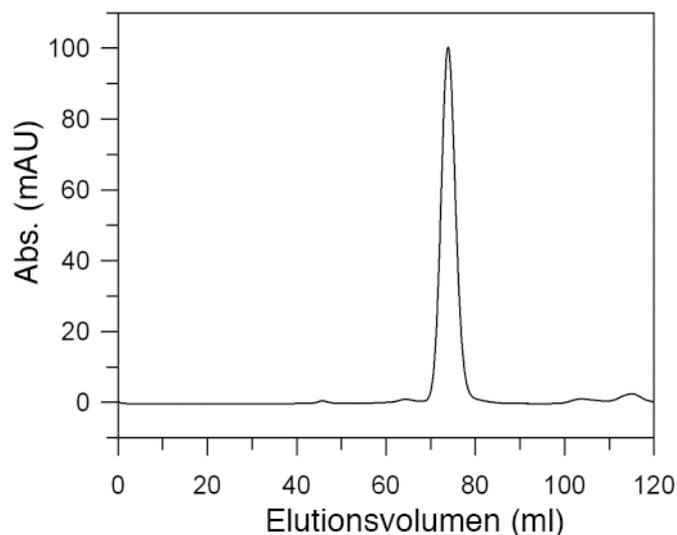


Abbildung 29: Molekulargewichtsbestimmung von CODH- V_{Ch} mittels Größenausschlusschromatographie. Die Gelfiltration wurde mit 20 μ g CODH- V_{Ch} in Gelfiltrations-Puffer (50 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl) auf einer S200 *prep-grade*-Säule durchgeführt. Das Elutionsvolumen des Peaks war 73.9 ml (V_e). Die dargestellten Absorptionswerte wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

Neben dem einzelnen Maximum wurden keine weiteren oligomeren Zustände identifiziert. Somit konnte ein Molekulargewicht von 117.8 kDa berechnet werden. Dieser Wert weicht vom erwarteten Molekulargewicht des Dimers um ca. 13 % ($MW_{erw} = 136.4$ kDa) ab. Grund hierfür könnte die Form des Dimers sein. So gelten die verwendeten Proportionalitätsannahmen lediglich für globuläre Proteine und können zu signifikanten Abweichungen für andere Formen führen. Auch können unspezifische Interaktionen zwischen Säulenmaterial

und Protein eine Retention bewirken, was in einem geringeren beobachteten Molekulargewicht resultieren würde.

3.2.4 Kristallisation

Um die Struktur von CODH- V_{Ch} bestimmen zu können, wurden zunächst geeignete Kristallisationsbedingungen gesucht. Dabei wurde mittels kommerzieller Test-Lösungen gearbeitet, die auf einer 96-well-Mikrotiterplatte im *sitting-drop*-Verfahren angesetzt wurden [95]. Mit der ersten erfolgreichen Reinigung von CODH- V_{Ch} wurden PEG/Ion- (*Hampton Research*) und PACT-premier-Screens (*Molecular Dimensions*) durchgeführt. Dabei wurden Kristalle unterschiedlicher Größe und Form bereits nach 24 h aufgefunden. In Abbildung 30 sind exemplarisch Kristalle aus zwei verschiedenen Bedingungen dargestellt.

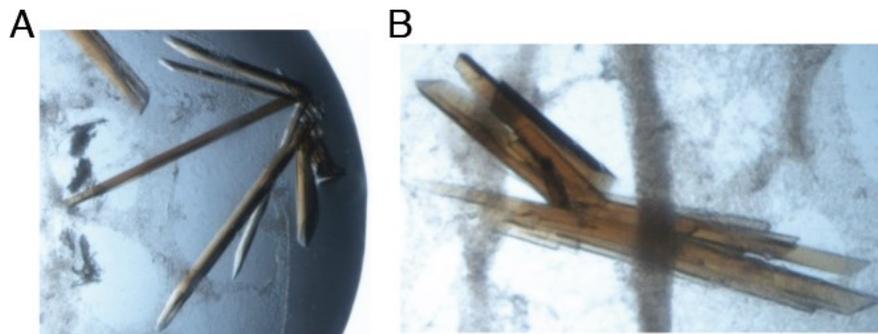


Abbildung 30: Kristalle von CODH- V_{Ch} . Die dargestellten Kristalle erschienen im Peg/Ion-Screen (*Hampton Research*) nach 24 h Inkubation. A) Bedingung B4: 0.2 M $MgNO_3$ -Hexahydrat, 20 % PEG3350. B) Bedingung B8: MgFormiat-Dihydrat, 20 % PEG3350. Die Kristalle wurden durch Mischung äquivalenter Volumina von 15 mg/ml Protein mit Reservoirlösung mit der Dampfdiffusionsmethode erzeugt.

Die dargestellten Kristalle sind dreidimensionale Nadeln, welche sich durch Verwachsungen an der Basis auszeichnen. Die Tropfen sind von einer Haut aus präzipitiertem Protein bzw. einer PEG-Haut überzogen, welche vor der Isolierung der Kristalle zunächst entfernt werden musste. Aufgrund vorhandener Hohlräume an den Enden sind die Kristalle deutlich fragiler als die von CODH-II $_{Ch}$ und erfordern eine umsichtige Behandlung.

Die ersten Diffraktionstests mit Röntgenstrahlung blieben aufgrund unsauberer Reflexe hinter den Erwartungen zurück, weshalb im Folgenden Protein mit abgespaltenem Strep-tag (CODH- V_{Ch}^X) zur Kristallisation verwendet wurde. Die erzielten Kristalle mit ähnlicher Morphologie zeigten häufig verbesserte Diffraktionsbilder und wurden standardmäßig für Röntgenstreuexperimente gezüchtet.

3.2.5 Gesamtstruktur der CODH- V_{Ch}

Zunächst wurde ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.5 Å des *as-isolated* Zustands bei einer Röntgenwellenlänge von 0.91841 Å aufgenommen (Anhang Tab. A4). Dabei wurde die Raumgruppe $P2_1$ mit den Zelllängen von 68, 228.9 und 82.3 Å (a, b, c) und den Winkeln $\alpha = \gamma = 90^\circ$ und $\beta = 99.67^\circ$ gefunden. Die Struktur von CODH- V_{Ch} wurde durch Patterson-Suchmethoden mit CODH- II_{Ch} als Suchmodell (Sequenzhomologie: 31.5 %) gelöst und das initiale Modell durch automatisiertes und manuelles Modellbauen kontinuierlich verbessert. CODH- V_{Ch} zeigt zwei Dimere (4 Monomere) in der asymmetrischen Einheit, welche sich in einem Abstand von 22 Å (kürzeste Distanz der D-Cluster) befinden. Die Faltung entspricht dabei in großen Teilen denen von CODH- II_{Ch} . Abbildung 31 zeigt die Gesamtstruktur von CODH- V_{Ch} .

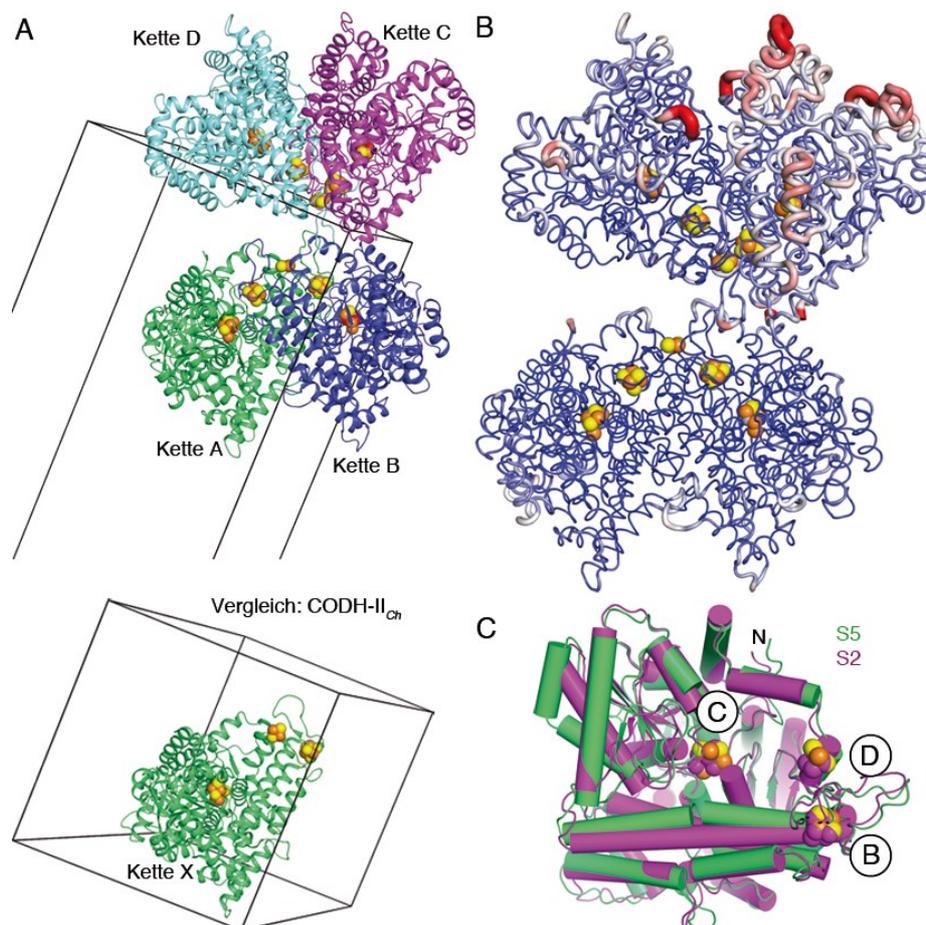


Abbildung 31: Gesamtstruktur von CODH- V_{Ch} . A) Zusammensetzung der Einheitszelle in CODH- V_{Ch} (oben) und CODH- II_{Ch} (unten, PDB-ID: 3B53) [58]. B) B-Faktor-Darstellung für CODH- V_{Ch} . Der Kettendurchmesser korreliert dabei mit steigendem B-Faktor, wobei auch die Färbung von blau nach rot in den Grenzen von 10 bis 50 Å² den B-Faktor abbildet. C) Überlagerung zwischen den Monomeren von CODH- V_{Ch} (grün) und - II_{Ch} (violett, PDB-ID: 3B53) in Bänderdarstellung. Dabei sind die Helices als Zylinder dargestellt. Die Atome der einzelnen Metallcluster sind als Sphären mit elementspezifischer Farbe gezeigt.

Die beiden Dimere der CODH- V_{Ch} sind mit der D-Cluster-Seite aneinander angeordnet, wobei diese über eine Schraubenachse um 64° zueinander verdreht sind. Die beobachtete Einheitszelle ist mit einem Volumen von $1,304,032 \text{ \AA}^3$ um den Faktor 2 größer als die von CODH-II $_{Ch}$ und weist für die vier Monomere einen Matthews-Koeffizienten von 2.4 und einen Solvensgehalt von 49 % auf. Bei der Analyse der B-Faktoren, die ein Maß für die thermische Mobilität und Flexibilität der einzelnen Atome sind, zeigten sich deutlich höhere Werte für die Ketten C und D. Speziell Kette C zeigt Regionen, die sich durch B-Faktoren um 50 \AA^2 auszeichnen. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in der Kristallpackung zu finden, wo diese Region nur geringe Interaktionen mit der benachbarten asymmetrischen Einheit besitzt.

Die größten strukturellen Übereinstimmungen bestehen mit CODH-II $_{Ch}$ (PDB-ID: 3B51, DALI *Z-score*: 51.1 %), CODH/ACS $_{Mt}$ (PDB-ID: 1OAO, DALI *Z-score*: 49.3 %), Hybrid-Cluster-Protein aus *Desulfovibrio desulfuricans* (PDB-ID: 1GN9, DALI *Z-score*: 28.2 %), Hybrid-Cluster-Protein aus *Desulfovibrio vulgaris* (PDB-ID: 1OA1, DALI *Z-score*: 24.1 %), CODH-Untereinheit der Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase aus *M. barkeri* (PDB-ID: 3CF4, DALI *Z-score*: 23.5 %) und monomerer ACS $_{Ch}$ (PDB-ID: 1RU3, DALI *Z-score*: 17.2 %).

Obwohl der strukturelle Aufbau der Monomere gut mit dem von CODH-II $_{Ch}$ übereinstimmt, gab es dennoch drastische Unterschiede in der Zusammensetzung der Metall-Cluster. Abbildung 32 zeigt die Struktur der CODH- V_{Ch} im *as-isolated* Zustand mit speziellem Augenmerk auf die Cluster-Zusammensetzung.

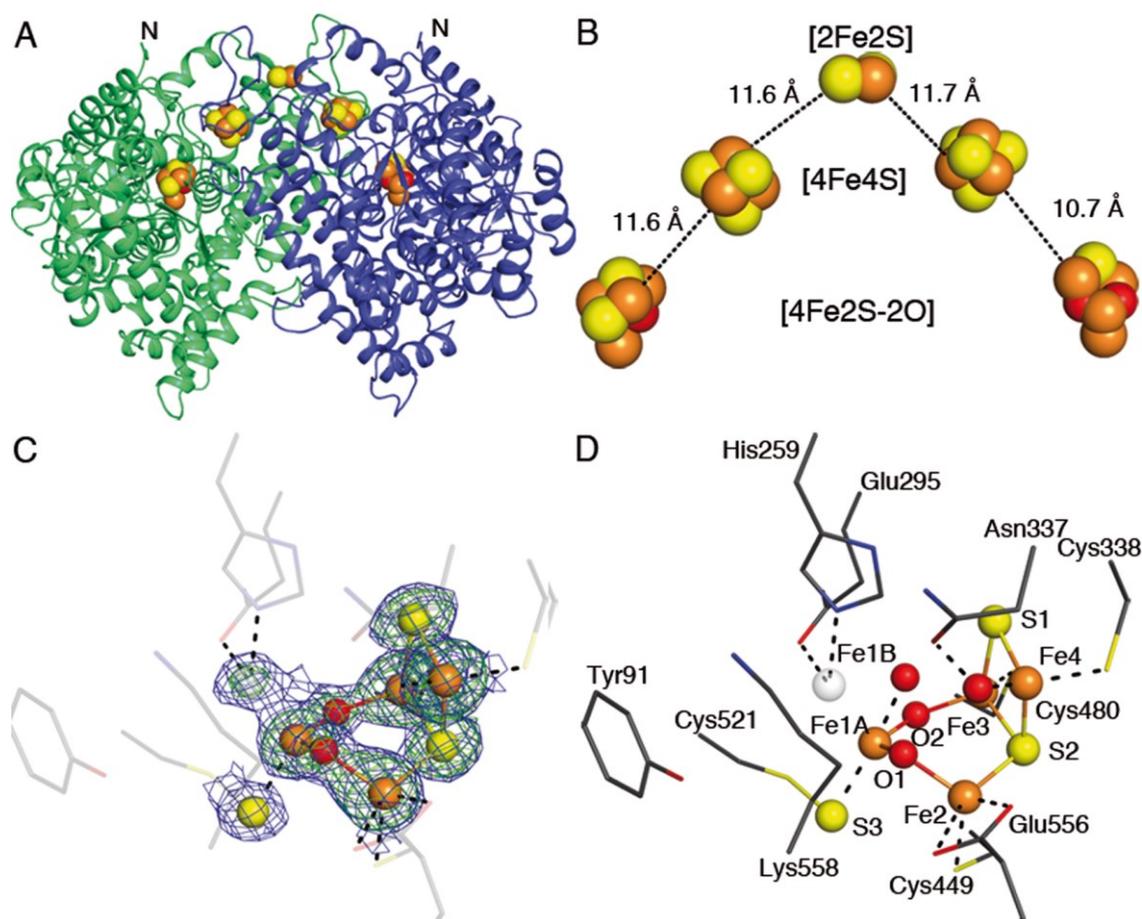


Abbildung 32: Struktur von CODH- V_{Ch} im *as-isolated* Zustand. A) Bänderdarstellung des Dimers. Die Ketten A und B sind in grün und blau, die Metall-Cluster als Sphären dargestellt. B) Vermutliche Elektronentransferkette der CODH- V_{Ch} . Abstände der nächstliegenden Fe-Atome sind für die Cluster D, B und C* aufgeführt. C) *Omit- F_o - F_c* -Elektronendichtekarte (grün) des Hybrid-Clusters (C*-Cluster) aus Kette D konturiert bei 6.0σ zusammen mit der finalen verfeinerten $2F_o$ - F_c -Karte bei 1.0σ (blau) und dem finalen Modell des $[4Fe_2S_2O]$ -Clusters (C*). D) Übersichtsdarstellung des C*-Cluster mit relevanten koordinierenden und umgebenden Proteinresten als Kugelstabmodell.

CODH- V_{Ch} besitzt als D-Cluster ein $[2Fe_2S]$ -Cluster, welches die beiden Monomere zum Dimer verknüpft. Dabei wird jeweils ein Fe-Atom durch die Thiolatfunktion von Cys38 und Cys41 koordiniert.

Anstelle des katalytisch aktiven $[Ni_4Fe_4S]$ -Clusters (C-Cluster) wurde in CODH- V_{Ch} ein $[4Fe_2S_2O]$ -Cluster identifiziert. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes Hybrid-Cluster, welches der zentrale Bestandteil von Hybrid-Cluster-Proteinen (HCP) ist [148]. Grundmotiv des C*-Clusters ist eine $[3Fe_2S]$ -Substruktur, welche durch zwei μ_2 -Oxo-Sauerstoffatome mit einem weiteren Fe-Atom (Fe1) verbrückt ist. Dabei wird dieses Fe1 in zwei Konformationen (A und B) aufgefunden, wobei die A-Konformation mit 40 % überwiegt (Kette B). Fe1A wird zusätzlich von einer Cys-Persulfid-Funktion (Cys521) mit der Proteinmatrix verbunden. Es wurden zwei Wasser-Reste am Cluster gefunden, welche die offenen Koordinationsstellen

von Fe1A (W1) und Fe4 (W2) besetzen und diese koordinativ absättigen, was in einer verzerrt-tetraedrischen Geometrie resultiert. Die B-Konformation von Fe1 ist zu 23 % besetzt und weist eine Koordination durch einen einzähnigen Carboxylat-Ligand (Glu295) und einen N ϵ -Imidazol-Ligand (His259) auf. Fe2 wird neben einem Cys-Thiolat (Cys449) von einem zweizähnigen Carboxylat-Liganden (Glu556) koordiniert. Die einzelnen Cluster-Atome sind zusammen mit den jeweiligen Besetzungsgraden, B-Faktoren und Bindungseigenschaften in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Besetzungsgrade und B-Faktoren des Hybrid-Clusters von CODH- V_{Ch} im *as-isolated* Zustand und relevante Bindungslängen und -winkel. Die Werte sind exemplarisch für das Cluster in Kette B gezeigt.

	Besetzungs- grad (%)	B-Faktor (\AA^2)		Bindungs- länge (\AA)		Winkel ($^\circ$)
Fe1A/B	40 / 23	12.3 / 15.8	Fe1A-O1	1.76	Fe1A-O1-Fe2	122.7
Fe2	62	21.5	Fe1A-O2	1.63	O1-Fe2-S2	102.9
Fe3	62	11.4	Fe2-O1	1.87	Fe1A-O2-Fe3	130.7
Fe4	62	13.2	Fe3-O2	1.99	O2-Fe3-S2	106.8
S1	62	12.9	Fe2-S2	2.30	S1-Fe3-S2	103.2
S2	62	11.4	Fe3-S2	2.25	S1-Fe4-S2	105.6
O1	62	24.4	Fe3-S1	2.26	Fe2-S2-Fe4	97.2
O2	62	10.6	Fe4-S1	2.22	Fe3-S1-Fe4	74.7
C521-S δ	60	18.4	Fe4-S2	2.22	Fe3-S2-Fe4	75.0
W1	60	21.4	Fe1A-W1	2.03		
W2	60	19.0	Fe4-W2	2.03		
			Fe1A-S δ -C521	2.33		

Dabei besitzt das Cluster insgesamt einen Besetzungsgrad von 62 %, wobei sich die einzelnen Besetzungsgrade von Fe1A/B ebenfalls zu diesem Wert aufaddieren. Vom durchschnittlichen B-Faktor des Clusters von 15.2 \AA^2 weichen Fe2 (21.5 \AA^2) und O1 (24.4 \AA^2) signifikant ab, was für eine hohe thermische Mobilität bzw. Unordnung dieser Atome spricht. Die Bindungslängen der FeS-Untereinheit des Clusters liegen mit Werten zwischen 2.2 und 2.3 \AA im Bereich von biologischen Fe-S-Bindungen [149]. Die gefundenen Fe-O-Bindungen mit Längen zwischen 1.8 \AA (Fe1A-O1) und 2.0 \AA (Fe3-O2), stimmen gut mit den Referenzwerten zwischen 1.7 und 2.1 \AA für einfachverbrückte μ -Oxo-Dieisen-Komplexe überein [147]. Lediglich die Bindung zwischen Fe1A und O2 erscheint mit einer Länge von 1.6 \AA als kurz.

In unmittelbarer Nähe zum C*-Cluster befinden sich Tyr91, Lys558 und Asn337. Diese Reste haben als Entsprechungen in CODH-II_{Ch} His93, Lys553 und Gln332, wobei His93 und Lys563 bekanntermaßen eine wichtige Rolle in der Katalyse ausüben (siehe Abb. 11).

HCPs gehören, wie Ni,Fe-CODHs, zur Prisman-Proteinfamilie und wurden erstmals im Jahre 1989 beschrieben [150]. Anhand des Metallgehalts und eines charakteristischen ESR-Spektrums wurde ein [6Fe6S]-Cluster („Prisman“) als Cofaktor vorgeschlagen [150]. Nach eingehenden Studien, inklusive Mössbauer-Spektroskopie [151] und der Bestimmung der Kristallstruktur [152], konnte der Aufbau des „Prisman“-Proteins aus *D. vulgaris* geklärt werden. Dieses beinhaltet, neben einem kubanen [4Fe4S]-Cluster, ein bis dahin unbekanntes Hybrid-Cluster mit vier Fe-Atomen, zwei μ_2 -Oxo- und zwei μ_2 -Sulfido-Brücken [152]. Dabei führte die Kopplung zwischen den beiden Clustern, welche sich in einem Abstand von 12 Å befanden, zum charakteristischen, prismanartigen ESR-Spektrum. Das Hybrid-Cluster kann in vier Redoxzuständen mit einer Gesamtladung von +6 (vollständig oxidiert) bis +3 (vollständig reduziert) vorliegen. Der Potentialbereich von nur 0.5 V zwischen den vollständig oxidierten und reduzierten Zuständen, ist dabei einzigartig für biologische Metallzentren [153, 154].

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche kristallographische Untersuchungen an verschiedenen HCPs und in unterschiedlichen Redoxzuständen durchgeführt. Dabei wurde entdeckt, dass sich die Struktur des Hybrid-Clusters beim Übergang vom oxidierten (oder *as-isolated*) zum reduzierten Zustand drastisch ändert [155]. Nach aktuellem Stand setzt sich das Hybrid-Cluster im *as-isolated* Zustand aus einem [4Fe2S3O]- und im reduzierten Zustand aus einem [4Fe3S]-Cluster zusammen [148, 155, 156]. In Abbildung 33 sind die Strukturen des Hybrid-Clusters im *as-isolated* und reduzierten Zustand für HCP aus *D. vulgaris* dargestellt.

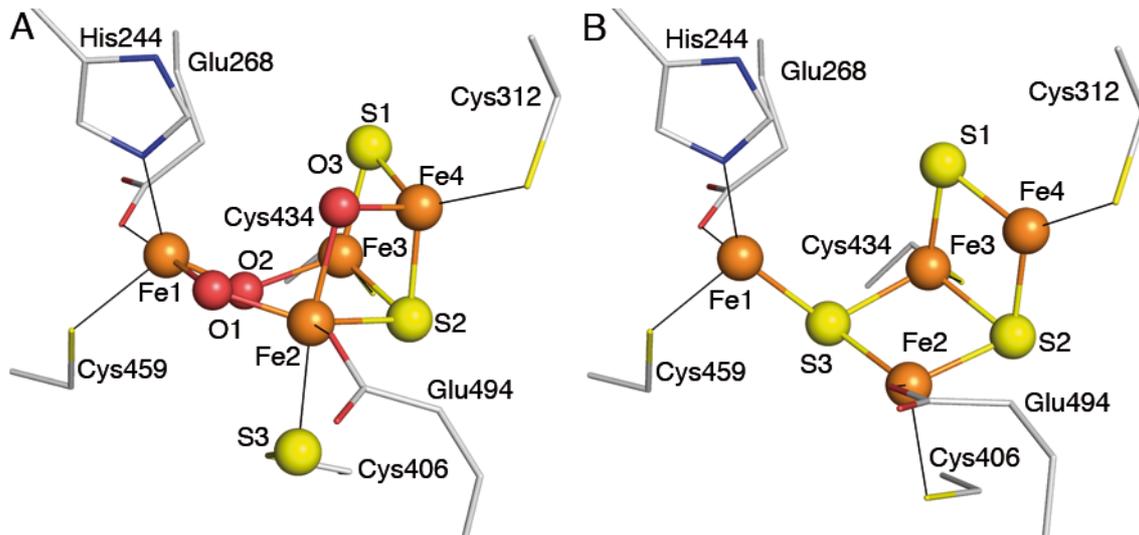


Abbildung 33: Strukturen von *as-isolated* und reduziertem Hybrid-Cluster-Protein aus *D. vulgaris*. A) Struktur des Hybrid-Clusters im *as-isolated* Zustand (PDB-ID: 1W9M) [156]. B) Struktur des reduzierten Hybrid-Clusters (PDB-ID: 10A1) [155]. Die Darstellung erfolgte im Kugelstabmodell mit elementspezifischer Färbung der einzelnen Atome. Der Wasserligand von Fe1 im reduzierten Cluster (B) wurde aus Gründen der Übersicht ausgelassen.

Das Hybrid-Cluster im *as-isolated* Zustand ähnelt in seiner Form einem aufgeklappten Würfel, bei dem eine Ecke (Fe1) herausgeklappt wurde. So entstehen insgesamt drei Flächen, wobei zwei von diesen Flächen Fe-Oxo-Brücken mit Bindungslängen von 1.9 bis 2.1 Å enthalten. Ein Fe-Atom des oxidierten Clusters (Fe2) wird durch einen Persulfid-Liganden von Cys406 koordiniert.

Im Zuge der Reduktion verliert das [4Fe2S3O]-Cluster die drei Oxo-Liganden und lagert sich zu einem [4Fe3S]-Cluster um. Dabei stammt ein Sulfido-Ligand des Clusters im reduzierten Zustand von der Persulfid-Funktion des Cys406. Dieses Cluster besitzt nur noch zwei nahezu orthogonale [2Fe2S]-Flächen (Winkel von 114° bzw. 111.9° für S3-Fe3-S1 und Fe2-S2-Fe4), wobei sich das Cluster im Gegensatz zum *as-isolated* Zustand um ca. 28° öffnet (vgl. Fe2-S2-Fe4 von 83.8°). Im Anhang ist in Tabelle A7 eine Übersicht der relevanten geometrischen Parameter für das Hybrid-Cluster von HCP_{Dv} aufgeführt.

Die Funktion von HCPs ist immer noch Gegenstand von Diskussionen, wobei zahlreiche Untersuchungen für eine Rolle in der Neutralisierung von reaktiven Stickstoff- oder Sauerstoff-Spezies sprechen [94, 157-160].

3.2.6 Struktur der CODH- V_{Ch} im reduzierten Zustand

Da für die bekannten Hybrid-Cluster signifikante Umstrukturierungen durch Reduktion beobachtet werden konnten [155, 156], wurde die Struktur des DT-reduzierten Zustands von CODH- V_{Ch} bestimmt. Dazu wurden Kristalle in DT-haltiger Cryo-Lösung inkubiert, nach vollständiger Entfärbung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen. Zusätzlich zur Datensammlung bei 0.91841 Å wurde auch ein Datensatz an der Röntgenabsorptionskante von Fe (K-Kante, $\lambda = 1.74$ Å) aufgenommen, um die Fe-Positionen definieren zu können. Die Struktur des reduzierten Hybrid-Clusters ist in Abbildung 34 dargestellt.

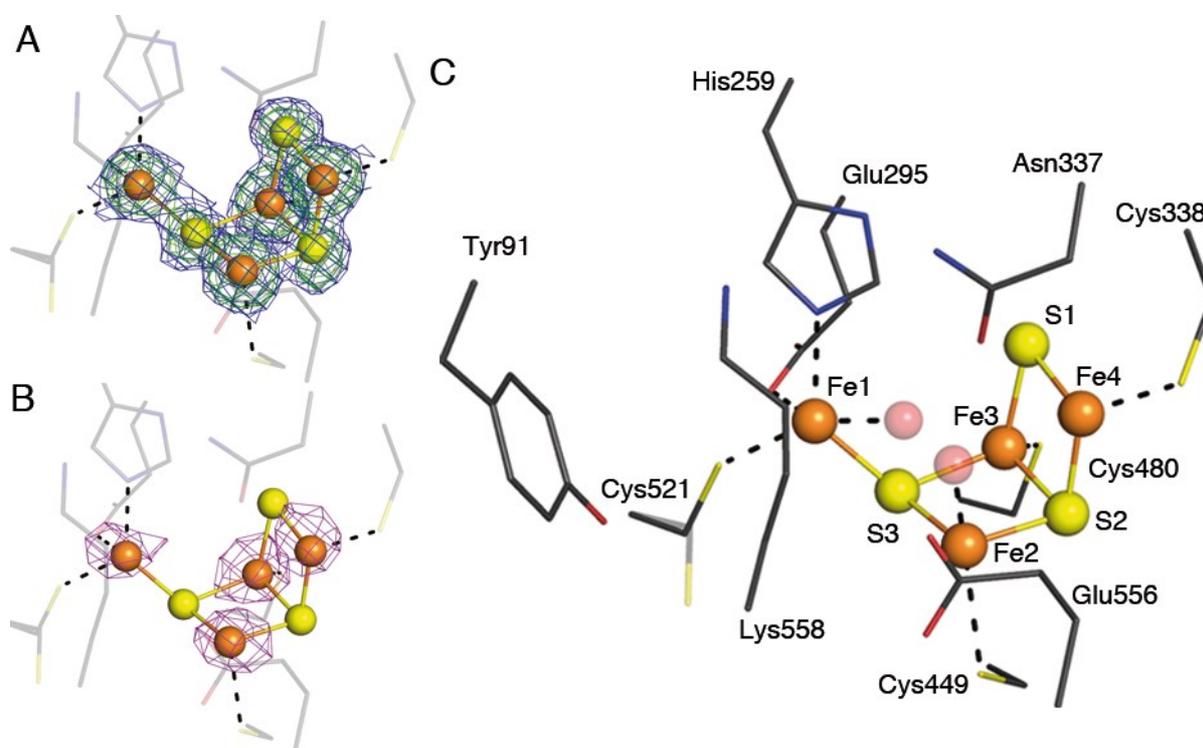


Abb. 34: Struktur des reduzierten Hybrid-Clusters (C*-Cluster) aus CODH- V_{Ch} . A) $Omit-F_o-F_c$ - (Konturlevel: 6.0σ , grün) und finale verfeinerte $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte (Konturlevel: 1.0σ , blau) zusammen mit dem Modell. B) Anomale Differenz-Fourier-Karte für Fe. Der Datensatz wurde bei einer Wellenlänge von 1.74 Å aufgenommen und zeigt die Fourier-Karte bei einem Konturlevel von 6.0σ in magenta. C) Kugelstabmodell des reduzierten Hybrid-Clusters, zusammen mit den relevanten Resten der näheren Koordinationsumgebung.

In der DT-reduzierten Struktur von CODH- V_{Ch} wurden keine signifikanten strukturellen Abweichungen des Peptid-Rückgrats beobachtet und die Gesamtstruktur entspricht dem *as-isolated* Zustand. Im reduzierten Hybrid-Cluster zeigt sich jedoch eine drastische redox-induzierte Umlagerung und führt zu einem [4Fe3S]-Cluster. Dabei rückt das zuvor als

Persulfid an Cys521 gebundene S3-Atom in das Cluster und bildet zusammen mit Fe2 eine zur [2Fe2S]-Substruktur orthogonal gelegene Fläche aus. Cys521 zeigt hierbei in einem Teil der aktiven Zentren der asymmetrischen Einheit zwei Konformationen, wobei die Hauptkonformation (Besetzungsgrad 77 %) als Ligand von Fe1 auftritt, wohingegen die Sekundärkonformation (Besetzungsgrad 23 %, Werte für Kette A) keine nennenswerten Interaktionen ausübt. S3 bindet als μ_3 -Sulfido-Rest Fe1 in das Cluster ein. Dabei wird nur eine einzige Konformation von Fe1 vorgefunden, welches durch Glu295, His259 und Cys521 mit der Proteinmatrix verbunden wird. Tabelle 6 zeigt Besetzungsgrade, B-Faktoren und relevante Bindungslängen und -winkel des reduzierten Hybrid-Cluster von CODH- V_{Ch} .

Tabelle 6: Besetzungsgrade und B-Faktoren des Hybrid-Clusters von CODH- V_{Ch} im reduzierten Zustand und relevante Bindungslängen und -winkel. Hierbei wurden die Werte des Hybrid-Clusters aus Kette A verwendet.

	Besetzungs- grad (%)	B-Faktor (\AA^2)		Bindungslänge (\AA)		Winkel ($^\circ$)
Fe1	57	16.0	Fe1-S3	2.21	Fe1-S3-Fe2	121.3
Fe2	57	12.5	Fe2-S3	2.31	S3-Fe2-S2	99.7
Fe3	57	8.4	Fe3-S3	2.35	Fe1-S3-Fe3	119.0
Fe4	57	12.3	Fe2-S2	2.21	S3-Fe3-S2	98.5
S1	57	9.9	Fe3-S2	2.21	S3-Fe3-S1	116.5
S2	57	10.3	Fe3-S1	2.22	S1-Fe3-S2	103.3
S3	57	11.9	Fe4-S1	2.19	S1-Fe4-S2	107.8
W1	30	3.5	Fe4-S2	2.11	Fe2-S2-Fe4	104.2
W2	30	14.4	Fe1-W1	1.87	Fe3-S1-Fe4	73.4
			Fe2-W2	1.92	Fe3-S2-Fe4	75.2

Im Vergleich zum *as-isolated* Zustand zeigt sich für das Hybrid-Cluster in CODH- V_{Ch} ein ähnlicher Besetzungsgrad von 57 %. Dabei sind die B-Faktoren der Cluster-Atome deutlich geringer (Durchschnitt: 11.6 \AA^2), was sich bereits in einer besser definierten Elektronendichtekarte manifestierte (siehe Abb. 34A). Die Bindungslängen und -winkel sind vergleichbar mit typischen Werten von biologischen FeS-Clustern (vgl. Anhang Tab. A6 und [149]). In idealen [4Fe4S]-Clustern vom Kubantyp, liegen die beobachteten Fe-S-Fe-Winkel im Bereich von 105° und S-Fe-S-Winkel um 73° [149]. Einige Winkel im reduzierten Hybrid-Cluster weichen davon deutlich ab. Fe1, welches sich als eine Art Exo-Ligand an einem [3Fe3S]-Clusters befindet, beschreibt einen Winkel von 121° bzw. 119° (für Fe1-S3-Fe2 bzw. Fe1-S3-Fe3) mit der planaren „Bodenebene“ des Clusters. Die Winkel, welche die Beziehung

der beiden Seitenflächen der $[3\text{Fe3S}]$ -Clustereinheit beinhalten, zeigen Werte von 117° (S3-Fe3-S1) und 104° und weichen stark von den S-Fe-S-Winkeln kubaner FeS-Cluster ab. Dagegen stimmen sie sehr gut mit den Winkeln aus dem reduzierten Hybrid-Cluster aus HCP_{Dv} überein (Anhang Tab. A7). Um die Strukturen des Hybrid-Clusters aus CODH-V_{Ch} im *as-isolated* und reduzierten Zustand vergleichen zu können, wurden beide in Abbildung 35 gegenübergestellt.

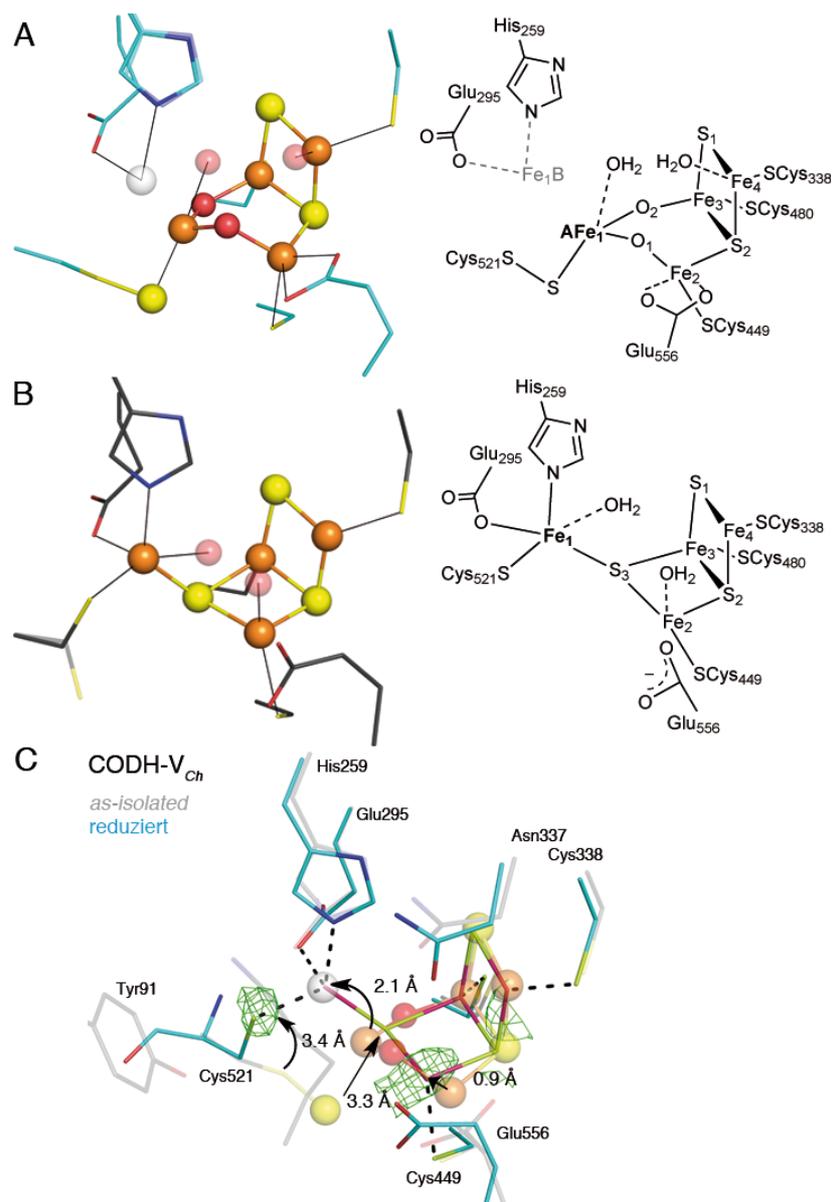


Abbildung 35: Struktureller Vergleich zwischen *as-isolated* und reduziertem Hybrid-Cluster in CODH-V_{Ch} . Dargestellt sind Kugelstabmodelle (links) und Strukturformeln (rechts) des *as-isolated* (A) und reduzierten Zustands (B). Abbildung C zeigt eine Überlagerung von *as-isolated* (Kohlenstoffatome in hellblau) und reduziertem Zustand (schwarze Kohlenstoffatome, Kugelstabmodell, halbtransparent) zusammen mit der finalen F_σ - F_c -Elektronendichtekarte des *as-isolated*-Zustands bei einem Konturlevel von 3.5σ (grün). Die Pfeile zeigen die Trajektorien einzelner Atome beim Übergang vom *as-isolated* zum reduzierten Zustand.

Neben den bereits beschriebenen Eigenschaften der jeweiligen Zustände, zeigt sich im Zuge der Reduktion eine strukturelle „Öffnung“ des Clusters. Zusätzlich gehen clusterinterne Atome (Oxo-Atome O1 und O2) und externe Liganden (Wassermoleküle W1 und W2) verloren. Die Umlagerungen, die in Abbildung 35C mit Pfeilen dargestellt wurden, sind drastisch. So ändert das zuvor als Persulfid-Atom gebundene S3 seine Position um 3.3 Å, wobei Fe1 um 2.1 Å versetzt wird. Dabei nimmt Fe1 exakt die Position ein, in welcher sich die Sekundärposition des Fe1 (Fe1B) im *as-isolated* Zustand befindet. Die Seitenkette von Cys521 zeigt eine redox-abhängige Umlagerung, wobei sich die Position der S γ -Funktion um 3.4 Å ändert. Die Überlagerung der reduzierten Struktur mit der finalen F_o-F_c -Elektronendichtekarte des *as-isolated* Zustands eröffnete einen weiteren Aspekt. An der Stelle, an der sich im reduzierten Zustand das S γ -Atom (Cys521) und das Fe2-Atom des Hybrid-Clusters befindet, existieren zwei unmodellerte, schwache Signale in der Differenzelektronendichte. Die Elektronendichte kommt durch die Summe aller Atome im Kristall an einer bestimmten Position zustande. Somit existiert im Kristall eine kleine Fraktion an aktiven Zentren, in denen sich an besagter Stelle ein Atom befindet. Durch die Übereinstimmung in der Position mit dem S γ -Atom des Cysteins 521 und dem Fe2-Atom des reduzierten Zustands, der gefundenen Besetzungsgrade und B-Faktoren, kann auf eine Mischung zweier Zustände in der *as-isolated* Struktur von CODH- V_{Ch} geschlossen werden. So befinden sich in dieser, neben der vorherrschenden oxidierten Struktur, auch Anteile der reduzierten Struktur, welche für die Sekundärposition des Fe1 (Fe1B) sowie hoher B-Faktoren für Fe2 und weiterer Atome verantwortlich ist. Grund für eine solche Mischung von Zuständen, könnte entweder in der Proteinisolierung oder der Messung begründet sein.

Da CODH- V_{Ch} im reduzierenden Cytosol von *E. coli* rekombinant synthetisiert wurde und die Reinigung unter einer anoxischen Atmosphäre stattfand, könnte die isolierte CODH- V_{Ch} Mikroheterogenitäten aus *apo*-, oxidiertem und reduziertem Protein beinhalten. Um dies zu Umgehen, könnte die Probe im Zuge der Reinigung oder vor dem schockgefrieren der Kristalle, mit Hilfe eines artifiziellen Elektronenakzeptors (z.B. Thionin oder Hexacyanoferrat), oxidiert werden.

Der zweite Grund könnte in der Datensammlung begründet sein. So konnte bereits für zahlreiche redoxaktive Proteine gezeigt werden, dass im Zuge der Exposition mit hochenergetischer Synchrotronstrahlung Photoreduktion eintritt [161]. Dadurch würde die Reduktion eines geringen Teils der Hybrid-Cluster im Kristall eintreten (ca. 37 %, berechnet Anhand des Besetzungsgrads von Fe1B). Dies könnte durch Messung der Kristalle an einer Strahlungsquelle mit deutlich geringerem Photonenflux, wie sie beispielsweise in

kommerziellen Röntgendiffraktionssystemen mit rotierender Anode verbaut sind, umgangen werden.

Vergleich des Hybrid-Clusters mit anderen biologischen Metallclustern

Um die Gemeinsamkeiten der Cluster des aktiven Zentrums und deren Umgebung für CODH- V_{Ch} und - II_{Ch} näher zu erläutern, ist in Abbildung 36 eine Überlagerung zusammen mit den koordinierenden Resten dargestellt.

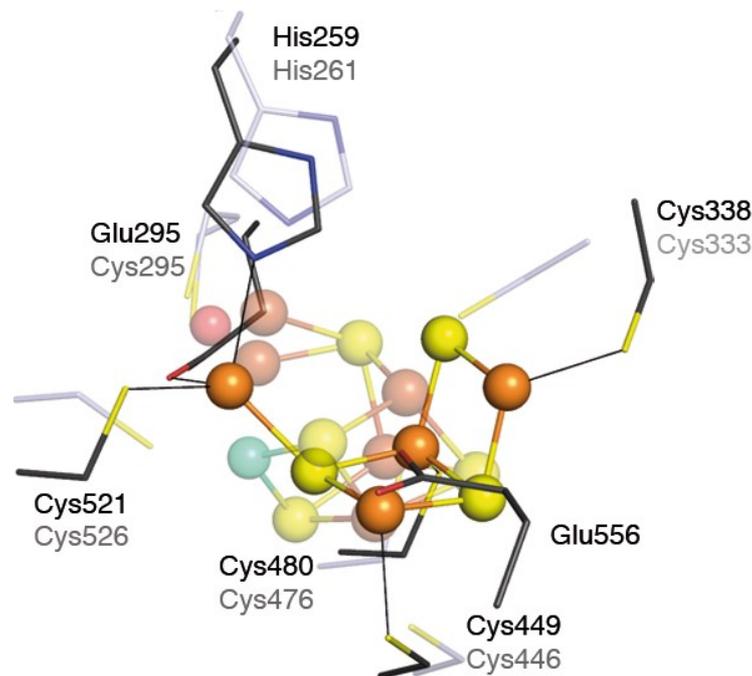


Abbildung 36: Überlagerung des reduzierten Hybrid-Clusters aus CODH- V_{Ch}^{red} mit dem C-Cluster aus CODH- II_{Ch} (-600 mV-Zustand, PDB-ID: 3B53) [71]. In der Kugelstabdarstellung sind die Atome elementspezifisch gefärbt (C-Atome für CODH- V_{Ch} in schwarz, für CODH- II_{Ch} in graublau), wobei die Atome des C-Clusters halbtransparent gezeigt sind.

Die Überlagerung von reduziertem Hybrid-Cluster und C-Cluster zeigt sehr deutlich die Unterschiede. So befinden sich zwar die coplanaren Ebenen des Hybrid-Clusters ([3Fe3S]-Untereinheit) in ähnlicher Anordnung, weichen jedoch in Position und Verbindungswinkel deutlich voneinander ab. Das C-Cluster ist von einer kubischen Form, wohingegen das Hybrid-Cluster der Form eines halbierten Würfels entspricht. Die Verknüpfung zum Exo-Fe-Atom verläuft dabei in beiden Clustern aus einer unterschiedlichen Ebene. Der Vergleich der koordinierenden Reste zeigt für einen Teil konservierter Aminosäuren ähnliche Positionen (Cys449/Cys446, Cys480/476 und His259/261), jedoch auch deutliche Abweichungen (Cys521/Cys526 und Cys338/Cys333). Die beiden Glu-Liganden Glu556 und Glu295 (ersetzt Cys295) besitzen einen großen Einfluss auf die unterschiedliche Clusterausprägung.

Aufgrund der verschiedenen koordinierenden Reste und deren Anordnung zeigt sich, dass in CODH- V_{Ch} die Assemblierung eines C-Clusters aus räumlichen Gründen nicht ohne weiteres möglich wäre. Dadurch lässt sich indirekt ausschließen, dass es sich beim beobachteten Hybrid-Cluster um ein Artefakt der heterologen Herstellung handelt.

Die beobachteten redox-induzierten Clusterumformungen wurden neben HCPs auch im proximalen Cluster sauerstofftoleranter Hydrogenasen beobachtet [162, 163]. In Abbildung 37 ist eine Übersicht verzerrter FeS-Cluster dargestellt, die eine redox-induzierte Umformung eingehen.

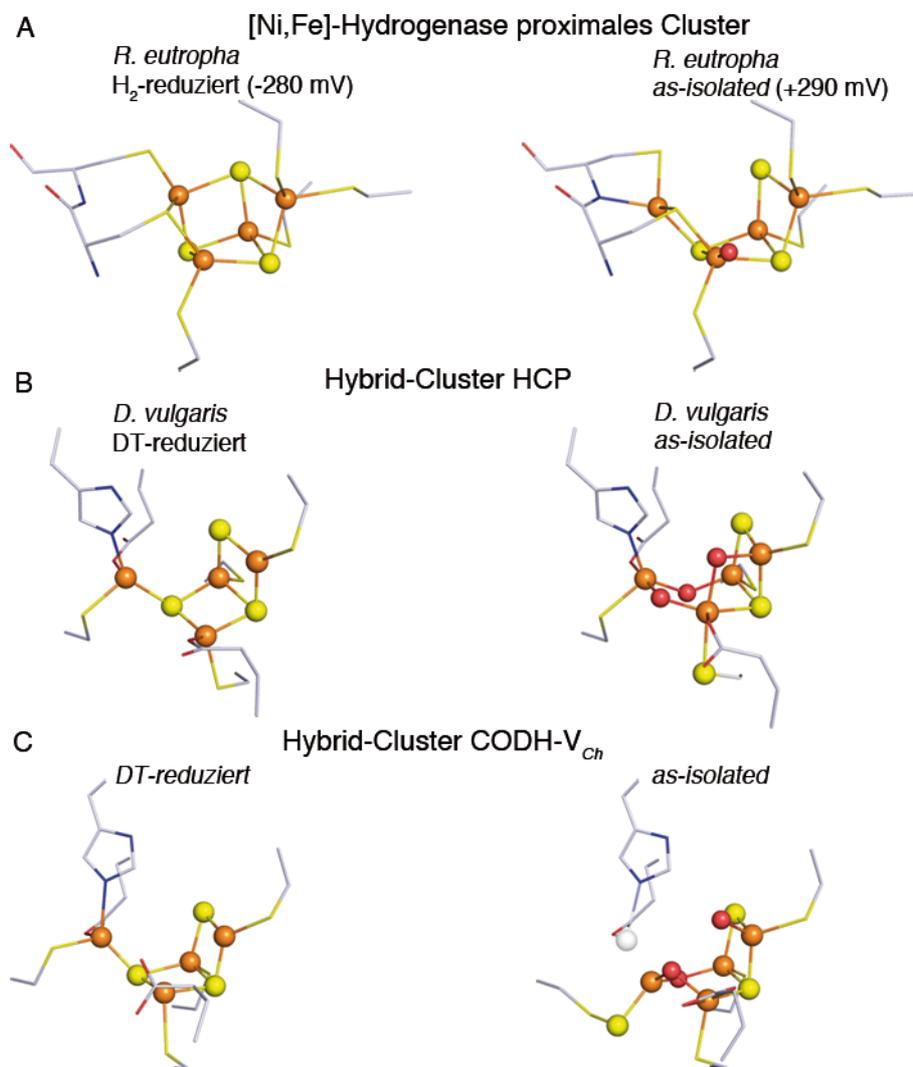


Abbildung 37: Vergleich von verzerrten FeS-Clustern mit redoxinduzierter Umlagerung. A) Proximales Cluster der [Ni,Fe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* im reduzierten (PDB-ID: 3RGW) [162] und *as-isolated* Zustand (PDB-ID: 4IUB) [163]. B) Hybrid-Cluster aus HCP $_{Dv}$ im DT-reduzierten (PDB-ID: 10A1) [155] und *as-isolated* Zustand (PDB-ID: 1W9M) [156]. C) Hybrid-Cluster der CODH- V_{Ch} im DT-reduzierten und *as-isolated* Zustand. Die Cluster sind mit ihren koordinierenden Resten im Kugelstabmodell dargestellt. Dabei sind die einzelnen Atome elementspezifisch gefärbt.

Das proximale Cluster der sauerstofftoleranten Ni,Fe-Hydrogenase aus *R. eutropha* zeigt eine strukturelle Verwandtschaft zum Hybrid-Cluster im reduzierten Zustand. Im H₂-reduzierten Zustand beinhaltet das proximale Cluster eine kubanartige [4Fe3S]-Grundstruktur und wird von sechs Cys-Resten koordiniert. Im superoxidierten Zustand ($-2 e^-$) erfolgt eine Konformationsänderung, in der sich ein Fe-Atom um 1.36 Å aus der Cluster-Struktur entfernt und einen Ligandenwechsel durchführt. Dabei verliert es einen μ -Sulfidoliganden, welcher im Anschluss durch einen deprotonierten Amidoliganden des Proteinrückgrats ersetzt wird. Das proximale Cluster im *as-isolated* Zustand ähnelt in seiner Struktur dem reduzierten Hybrid-Cluster. Diese unterscheiden sich jedoch in den koordinierenden Resten. So enthält das proximale Cluster weiterhin einen verbrückenden Cystein-Liganden zwischen zwei Fe-Atomen und die gesamten Fe-Atome sind koordinativ abgesättigt. Auf diese Art und Weise ist es im Stande, zwei Redox-Übergänge in einem engen Potentialbereich von lediglich 200 mV zu bewerkstelligen. So kann das proximale Cluster das aktive Zentrum mit dem H-Cluster, durch Zweielektronen-Reduktion vor oxidativem Schaden durch O₂ schützen [164].

Die Hybrid-Cluster aus HCP_{Dv} [155, 156] und CODH-V_{Ch} ähneln sich zwar in der Grundstruktur ihrer reduzierten und *as-isolated* Zustände, weisen aber auch Unterschiede auf. Die reduzierten Zustände sind strukturell sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich in der Koordination des Fe₂. Dieses wird in HCP_{Dv} [155] von einem einzähnigen Carboxylat-Liganden koordiniert, wohingegen der Glu-Rest in CODH-V_{Ch} eine abgewinkelte Konformation einnimmt und keine Koordination realisiert wird.

Im *as-isolated* Zustand offenbaren sich deutlichere Unterschiede. Zwar besitzen beide Hybrid-Cluster einen Persulfid-Liganden, dieser koordiniert im HCP_{Dv} das Fe₂, in CODH-V_{Ch} jedoch Fe₁. Fe₁ ändert bei Reduktion in CODH-V_{Ch} seine Position um 2.1 Å und entfernt sich aus der zweiten Cluster-Ebene, wohingegen das Fe₁ in HCP_{Dv} seine Position beibehält. In HCP_{Dv} besitzt Fe₂ einen verbrückenden Oxo-Liganden zu Fe₄ und wird von einem einzähnigen Carboxylatliganden koordiniert. Dagegen besitzt das Fe₂ in CODH-V_{Ch} keinen Oxo-Liganden, wird aber von einem Glu-Rest als zweizähnigem Liganden gebunden. Der Redoxübergang führt im HCP_{Dv} zu einer Positionsänderung des Fe₂ um 1.8 Å. Zusätzlich ändert sich die Position des Persulfid-Liganden in beiden Hybrid-Clustern drastisch. In CODH-V_{Ch} verschiebt sich die S₃-Position um 3.3 Å, im HCP_{Dv} sogar um 3.7 Å.

Der proximale Cluster aus *R. eutropha* und die Hybrid-Cluster aus HCP_{Dv} und CODH-V_{Ch} ähneln sich in ihrer Grundarchitektur und in ihrer redoxinduzierten Konformationsänderung. Sie unterscheiden sich jedoch anhand ihrer Koordination und der Anzahl an realisierten

Redoxzuständen. Zusätzlich dient das proximale Cluster vornehmlich dem Elektronentransfer [164], wohingegen das Hybrid-Cluster eine katalytische Aktivität besitzt [94, 155, 159].

3.2.7 Ermittlung von Substratkanälen durch Xenon-Derivatisierung

Um Informationen über die Lage und Beschaffenheit von potentiellen Substratkanälen zu erhalten, wurde eine Xe-Derivatisierung für CODH- V_{Ch} (analog zu CODH- II_{Ch}) durchgeführt. Nachdem die Kristalle in einer Xe-Atmosphäre bei Überdruck inkubiert und nachfolgend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, erfolgte die Messung eines Datensatzes bei einer Wellenlänge von 1.9 Å. In Abbildung 38 ist die Struktur der Xe-derivatisierten CODH- V_{Ch} aufgeführt.

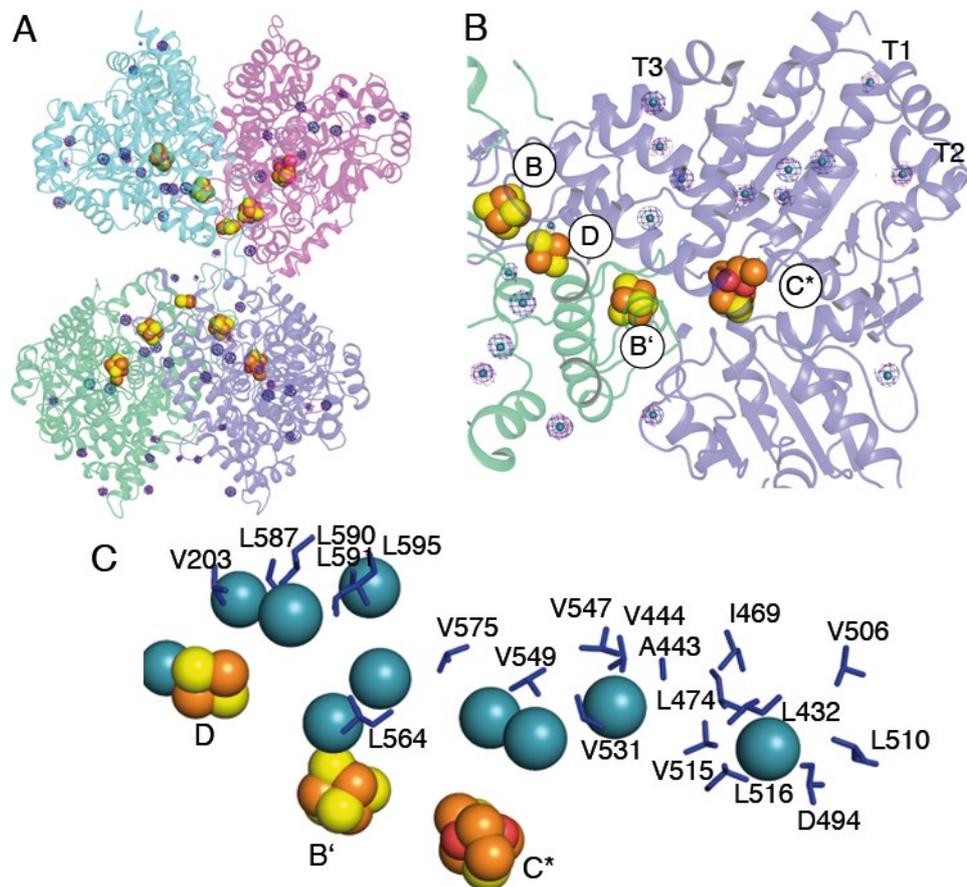


Abbildung 38: Xe-Derivatisierung von CODH- V_{Ch} . A) Gesamtansicht der asymmetrischen Einheit in Bänderdarstellung (Kette A: Grün, B: Lila, C: Cyan, D: Magenta). Die Metallcluster (Fe-Atome orange, S-Atome gelb) sind als Sphären dargestellt. Die Xe-Atome sind als blau-grüne Sphären zusammen mit der anomalen Differenz-Fourier-Karte für Xe (Wellenlänge: 1.9 Å) bei einem Konturlevel von 3σ gezeigt. B) Vergrößerte Ansicht von Kette B mit den beobachteten Tunneleingängen T1-T3. C) Hydrophobe Reste im Kanal zwischen Hybrid-Cluster und Oberfläche.

Insgesamt konnten in der asymmetrischen Einheit 63 Xe-Atome identifiziert werden, wobei sich 39 innerhalb der Kanäle zum Hybrid-Cluster befanden. Die übrigen Xe-Atome befinden sich an der Oberfläche des Proteins, wobei diese teils identische Positionen wie Br^- -Atome in den bekannten Strukturen (*as-isolated* und reduziert) einnehmen. Da Brom bei der gewählten Wellenlänge einen geringen anomalen Streukoeffizienten besitzt, kann aufgrund des starken Signals in der Differenz-Fourier-Karte von einem quantitativen Austausch durch Xe-Atome ausgegangen werden (siehe Anhang Abb. A11). Die Zahl der gefundenen Xe-Atome von 16 pro Monomer, korreliert sehr gut mit dem Wert der Xe-derivatisierten Struktur von CODH-II_{Ch} (19 Xe pro Monomer). Die identifizierte Kanalstruktur verbindet das Hybrid-Cluster mit der Oberfläche und besitzt je nach Eingang eine Länge von 32 (T1), 29 (T2) und 36 Å (T3). Diese Werte und die Positionen der Tunneleingänge sind vergleichbar mit T1, T2 und T4 aus CODH-II_{Ch}. Die Reste, welche die Kanalstruktur ausprägen und sich in Interaktionsdistanz mit den Xe-Atomen befinden, sind vollständig hydrophober Natur, wobei Leucin- und Valin-Reste überwiegen.

Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Substratkanäle in CODH-V_{Ch} mit denen in HCP_{Dv} zu vergleichen, wurden beide in Abbildung 39 überlagert.

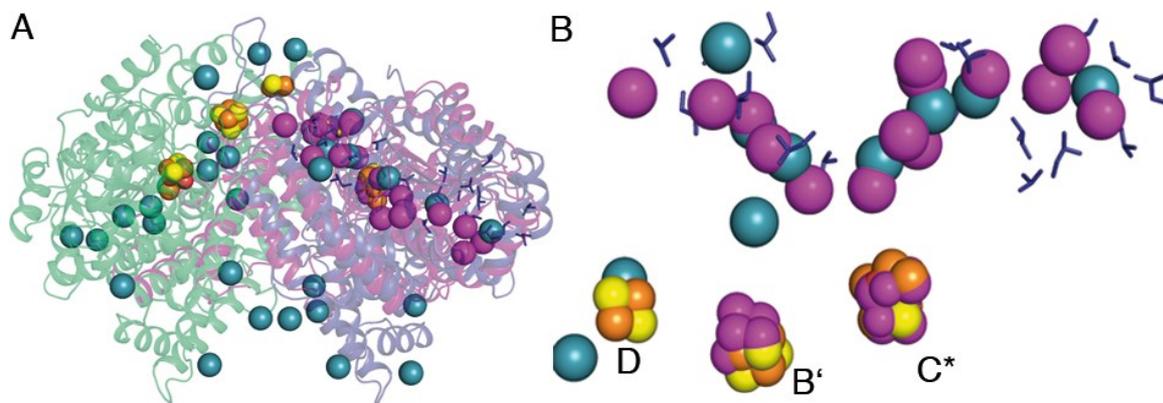


Abbildung 39: Strukturelle Überlagerung zwischen CODH-V_{Ch} und HCP_{Dv}. A) Bänderdarstellung mit dem Dimer von CODH-V_{Ch} (Kette A in grün, Kette B in lila) und dem HCP-Monomer (violett, PDB-ID: 1E9V). Die Xe-Atome sind als blaugrüne (CODH-V_{Ch}) und violette (HCP) Sphären dargestellt. B) Überlagerung der Xe- und Clusteratome im Kanal oberhalb des Hybrid-Clusters. Die Farbgebung aus A wurde beibehalten und zusätzlich wurden die hydrophoben Reste im Kanal von CODH-V_{Ch} als Stäbe dargestellt.

Es zeigt sich, dass die Lage der Kanäle und der Cluster B' und C* mit den Gegenstücken aus HCP_{Dv} gut übereinstimmt. In der Xe-derivatisierten Struktur des HCP befinden sich 14 Xe-Atome im Kanal, wobei die Lage der Tunneleingänge denen in CODH-V_{Ch} und -II_{Ch} entspricht. Dies legt nahe, dass auch HCPs aufgrund ihrer katalytischen Aktivität geeignete Wege für Substrat- und Produkttransfer zum Hybrid-Cluster benötigen. Durch den Vergleich

der Xe-derivatisierten Strukturen von CODH-II_{Ch}, ACS/CODH_{Mt} [57], HCP_{Dv} (PDB-ID: 1E9V) und -V_{Ch} konnte gezeigt werden, wie durch ein gemeinsames Faltungsmuster die Architektur für eine Kanalstruktur definiert wird. Das vorhandene Grundmotiv kann durch spezifische Austausche in der Aminosäuresequenz weiter ausgebaut oder vermindert werden. Um den Einfluss der strukturellen Umlagerung des Hybrid-Clusters in CODH-V_{Ch} sowie seiner koordinierenden Reste auf den potentiellen Substratzugang zum aktiven Zentrum zu untersuchen, wurde die Kanalstruktur für den oxidierten und reduzierten Zustand berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 40 aufgeführt.

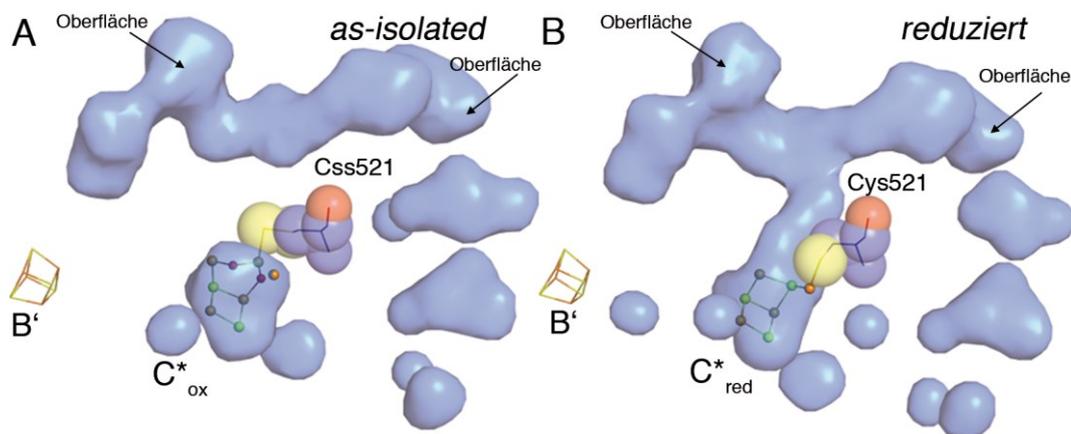


Abbildung 40: Kanäle zum Hybrid-Cluster von CODH-V_{Ch} im oxidierten und reduzierten Zustand. Kanäle in der Umgebung des Hybrid-Clusters (C*) im *as-isolated* (A) und reduzierten Zustand (B). Die Kanäle sind als transparente Oberflächen (blau) und die Cluster-Atome als Kugelstabmodell dargestellt. Die koordinierenden Reste Cys521 (Cys mit Persulfid-Funktion) bzw. Cys521 sind als Stabmodell zusammen mit dem van-der-Waals-Radius als transparente Sphären dargestellt. Die Ermittlung der Kanäle erfolgte an Modellen ohne Hybrid-Cluster mit dem Programm HOLLOW [110] unter Verwendung identischer Parameter für *as-isolated* und reduzierten Zustand in der Umgebung des S γ -Atoms von Cys521.

Im *as-isolated* Zustand befindet sich oberhalb des Hybrid-Clusters ein länglicher Kanal, welcher zwei Übergänge zur Proteinoberfläche und damit zum Solvens besitzt. Die Lage des Kanals entspricht dem in CODH-II_{Ch}, welcher durch Xe-Derivatisierung als Zugangspunkt für hydrophobe Substrate identifiziert wurde. Die Seitenkette von Cys521, die im *as-isolated* Zustand eine Persulfid-Funktion besitzt (Css521), befindet sich direkt unterhalb des Übergangs zum Hybrid-Cluster und unterbricht die Verbindung des aktiven Zentrums zum Substrattunnel. Im Gegensatz dazu ist die Cys-Seitenkette in der reduzierten Funktion um ca. 180° „geflippt“ und bildet eine Bindung zum Fe1 aus. Dadurch besteht eine Verbindung der clusterumgebenden Höhle zum Substratkanal und damit zum Solvens. Auf diese Weise wirkt Cys521 als eine Art redoxabhängiger Pförtner, der den Zugang von Substrat zum aktiven Zentrum verhindert (oxidiertes Zustand) oder ermöglicht (reduzierter Zustand). Diese

Beobachtung legt eine reduzierende Aktivität des Enzyms nahe. Dies würde für eine Rolle im Abbau oxidierender Verbindungen sprechen, da der Substratzugang nur erfolgen kann, wenn genügend Elektronen für die Reduktion und damit Neutralisation potentieller Oxidantien vorhanden sind.

3.2.8 Enzymatische Aktivität der CODH- V_{Ch}

Hybrid-Cluster-Proteine sind in der Lage, die Reduktion von Hydroxylamin zu Ammoniak und Wasser nach folgender Gleichung zu katalysieren:



Diese Aktivität wurde bereits in drei unterschiedlichen HCP-Klassen gefunden und quantifiziert [94, 155, 157, 165]. Daneben wurde auch in der monofunktionellen CODH aus *R. rubrum* Hydroxylamin-Reduktaseaktivität nachgewiesen, die durch Mutation an einem koordinierenden Rest des C-Clusters (H295V) sogar noch deutlich gesteigert wurde [166]. Um Informationen über die Reaktivität des Hybrid-Clusters in CODH- V_{Ch} zu erhalten, wurde die Hydroxylamin-Reduktaseaktivität im Rahmen dieser Arbeit bestimmt. Dazu wurde die Reoxidation des Redoxfarbstoffs Methylviologen (MV, $E^{\circ\prime} = -446 \text{ mV}$) [167] bei 578 nm beobachtet und die spezifische Aktivität ($A_{\text{sp}}^{\text{obs}}$) für unterschiedliche Hydroxylamin-Konzentrationen untersucht. Da diese Art der Aktivitätsbestimmung sehr sensitiv auf Spuren von Sauerstoff reagiert, wurden die Experimente erst nach mehrfacher Durchspülung des anoxischen Handschuhkastens mit Stickstoff und Formiergas durchgeführt, wobei permanent Kontrollexperimente zur Stabilität des reduzierten Farbstoffs erfolgten.

Im Anschluss an die Bestimmung der Hydroxylamin-Reduktaseaktivität, wurden die Daten mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung analysiert und die Parameter $A_{\text{sp}}^{\text{max}}$ und K_M für die Reaktion bestimmt. Abbildung 41 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.

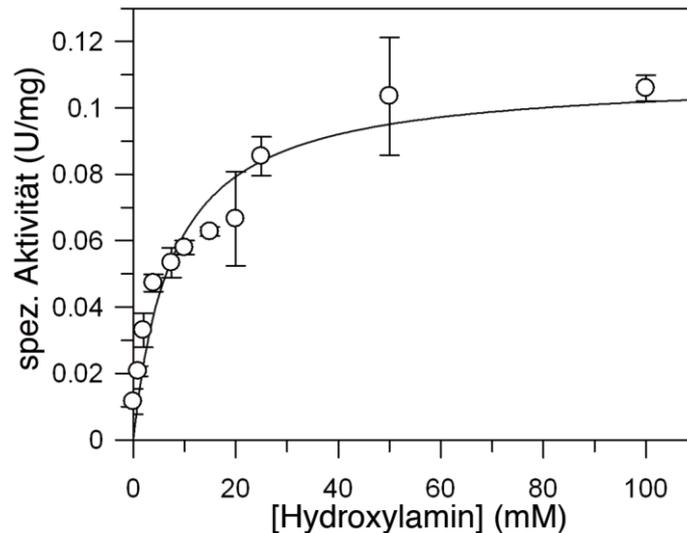


Abbildung 41: Bestimmung der Hydroxylamin-Reduktaseaktivität von CODH- V_{Ct} . Die spezifische Aktivität für unterschiedliche NH_2OH -Konzentrationen wurde indirekt durch Oxidation von Methylviologen spektralphotometrisch verfolgt. Der Assay wurde mit einer Enzymkonzentration von $1 \mu\text{M}$ in 50 mM Tris (8.0), 100 mM NaCl bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Daten wurden einer nicht-linearen Regression mit der Michaelis-Menten-Gleichung unterzogen und Werte für K_M von $7.6 \pm 2.0 \text{ mM}$ und $A_{\text{sp}}^{\text{max}}$ von $0.11 \pm 0.01 \text{ U/mg}$ ermittelt. Die Regressionskurve ist neben den Messwerten im Diagramm dargestellt.

Eine nicht-lineare Regression der Daten mit der Michaelis-Menten-Gleichung lieferte einen K_M -Wert von 7.6 mM und einen $A_{\text{sp}}^{\text{max}}$ -Wert von 0.11 U/mg , wobei letzterer einer Umsatzrate von 0.13 s^{-1} (k_{cat}) entspricht. Die Lage der einzelnen Messpunkte gibt dabei eine hyperbole Funktion wider. Dabei weichen die beobachteten spezifischen Aktivitätswerte oberhalb einer Hydroxylaminkonzentration von 20 mM signifikant vom Verlauf ab. Trotz mehrfacher Durchführung des Experiments und dreifacher Bestimmung der Werte, waren diese konstant erhöht.

Die Berechnung der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M zu $0.02 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ zeigte, dass die Reaktion sehr weit von der Diffusions-Grenze von 10^8 bis $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ entfernt ist. Ein Vergleich der kinetischen Parameter für die Hydroxylamin-Reduktaseaktivität unterschiedlicher HCPs ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Vergleich der kinetischen Parameter für die Hydroxylamin-Reduktaseaktivität für HCPs, CODH aus *R. rubrum* und CODH- V_{Ch} . ^a Gemessen bei 80 °C, ^b Gemessen bei 40 °C. Die Messtemperatur für die anderen Werte wurde nicht berichtet. wt: Wildtyp.

Protein (Klasse)	Organismus	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)	Referenz
HCP (Klasse I)	<i>D. vulgaris</i>	3.1	NR	NR	[155]
HCP (Klasse II)	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	1.9	1.0	1.9×10^3	[157]
HCP (Klasse II)	<i>E. coli</i>	396	2.5	1.6×10^3	[94]
HCP (Klasse III)	<i>P. furiosus</i>	3.8 ^a	0.4 ^a	9.5×10^3	[165]
CODH wt (Ni)	<i>R. rubrum</i>	7.9	17.4	0.45×10^3	[166]
CODH H265V (-Ni)	<i>R. rubrum</i>	27.4	17.4	1.57×10^3	[166]
CODH- V_{Ch}	<i>C. hydrogenoformans</i>	0.13 ^b	7.6 ^b	0.02×10^3	diese Arbeit

Die katalytische Effizienz der CODH- V_{Ch} fällt im Vergleich zu den anderen aufgeführten Enzymen deutlich geringer aus. Zwar liegt der K_M -Wert mit 7.6 mM in einer ähnlichen Größenordnung, wie für die HCPs der Klassen I und II, jedoch ist die Umsatzrate k_{cat} um mehr als eine Größenordnung verringert. Selbst wildtypische CODH aus *R. rubrum*, die ein intaktes C-Cluster enthält, besitzt eine 60-fach höhere Hydroxylamin-Reduktaseaktivität als die Hybrid-Cluster-enthaltende CODH- V_{Ch} [166]. Es existieren jedoch auch signifikante Unterschiede in den Umsatzraten der einzelnen HCPs. HCP aus *E. coli* besitzt eine mehr als 100-fach erhöhte Umsatzrate, im Vergleich zu den anderen verwandten Enzymen aus *D. vulgaris*, *R. capsulatus* und *P. furiosus*. Innerhalb der aufgeführten Enzyme, besitzt HCP aus *P. furiosus* die höchste Affinität. Auch zeichnet sich dieses Enzym durch eine sehr starke Temperaturabhängigkeit aus und erreicht sein Temperaturoptimum bei über 70 °C [165].

Alle vorgestellten Enzyme haben gemeinsam, dass sie die Hydroxylamin-Reduktion mit einem K_M -Wert im millimolaren Bereich katalysieren. Da zelluläre Konzentrationen von NH_2OH deutlich geringer sind, handelt es sich bei der gefundenen Aktivität wahrscheinlich nicht um die physiologische Funktion [165].

Für CODH- V_{Ch} wurde eine systematische Suche nach weiteren katalytischen Aktivitäten durchgeführt. Da die Substrattunnel nur einen geringen Durchmesser besitzen und auch das aktive Zentrum nur geringen Raum bietet, wurden hauptsächlich Substrat-Kandidaten mit geringem Molekulargewicht untersucht. So konnten unterschiedliche Reaktionen für die

potentiellen Substrate CO, CO₂, Cyanid, Methan, Methanol, Formaldehyd, Formiat, Acetat, Pyruvat, Nitrit, Nitrat, N₂O, NO, Sulfit, Sulfat, Sulfid, H₂ und H₂O₂ getestet werden. Dazu wurden Redoxindikatoren mit unterschiedlichen Potentialbereichen (Methylviologen, Benzylviologen, Methylenblau) als Sonde in *steady-state*-Assays bzw. das charakteristische FeS-Cluster-Signal in *single-turnover*-Assays mittels UV/Vis-Spektroskopie verwendet. CODH-V_{Ch} zeigte im Gegensatz zu allen anderen untersuchten CODHs aus *C. hydrogenoformans* weder CO-Oxidations- noch CO₂-Reduktionsaktivität [43, 168].

Trotz intensiver Suche nach weiteren Reaktivitäten, konnte lediglich die Reduktion von NO und H₂O₂ nachgewiesen werden. Da NO auch unspezifisch durch das Überpotential des DT reduziert werden kann, wurde ein GC-MS-basierter Nachweis (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) des potentiellen Produkts N₂O unter Verwendung von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel durchgeführt [169, 170]. Obwohl N₂O qualitativ nachgewiesen werden konnte, wurde keine Konzentrationsabhängigkeit des Umsatzes gefunden.

HCPs besitzen auch die Fähigkeit H₂O₂ zu reduzieren. Deshalb wurde die Peroxidase-Aktivität von CODH-V_{Ch} analog zu Almeida *et al.* [159], untersucht. Entgegen der Beschreibung konnte sehr wohl eine Reduktion des H₂O₂ ohne Enzym beobachtet werden, weshalb der Assay nur eine geringe Aussagekraft besitzt. Qualitativ lässt sich das reduzierte Spektrum von CODH-V_{Ch} durch Zugabe von H₂O₂ in das oxidierte Spektrum überführen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Reaktion.

Neben den potentiellen Einzelsubstrat Redoxreaktionen ($S + n_1e^- + n_2H^+ \Leftrightarrow P + n_3H_2O$, wobei S für Substrat und P für Produkt steht), wurden auch unterschiedliche Kombinationen von Substraten getestet. Dabei ist es jedoch nicht immer möglich, einen Assay mit hoher Spezifität und Sensitivität zu entwickeln.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten und dem gemeinsamen evolutionären Ursprung, erscheint eine Rolle von CODH-V_{Ch} im Kohlenstoff-Metabolismus weiterhin als möglich. Weitere Untersuchungen mit einer Ausdehnung der potentiellen Substrate und Reaktionen sollen in Zukunft folgen.

4. Zusammenfassende Diskussion

4.1 CO-Dehydrogenase II (CODH-II_{Ch})

Anhand der Ergebnisse konnten eingehende Informationen über die katalytische Funktion des C-Clusters in CODH-II_{Ch} gewonnen werden. Mit Hilfe der einzelnen Strukturen wurden inhibierte und katalytische Zustände beschrieben und eröffneten zuvor unbekannte Details über deren Geometrie. Auf Basis der vorgestellten und bereits bekannten Strukturen (Kapitel 3.1.4 bis 3.1.6, [44, 71, 72]) und spektroskopischer Untersuchungen [60, 61, 63, 64], lässt sich abschließend ein erweiterter katalytischer Zyklus formulieren (Abb. 42).

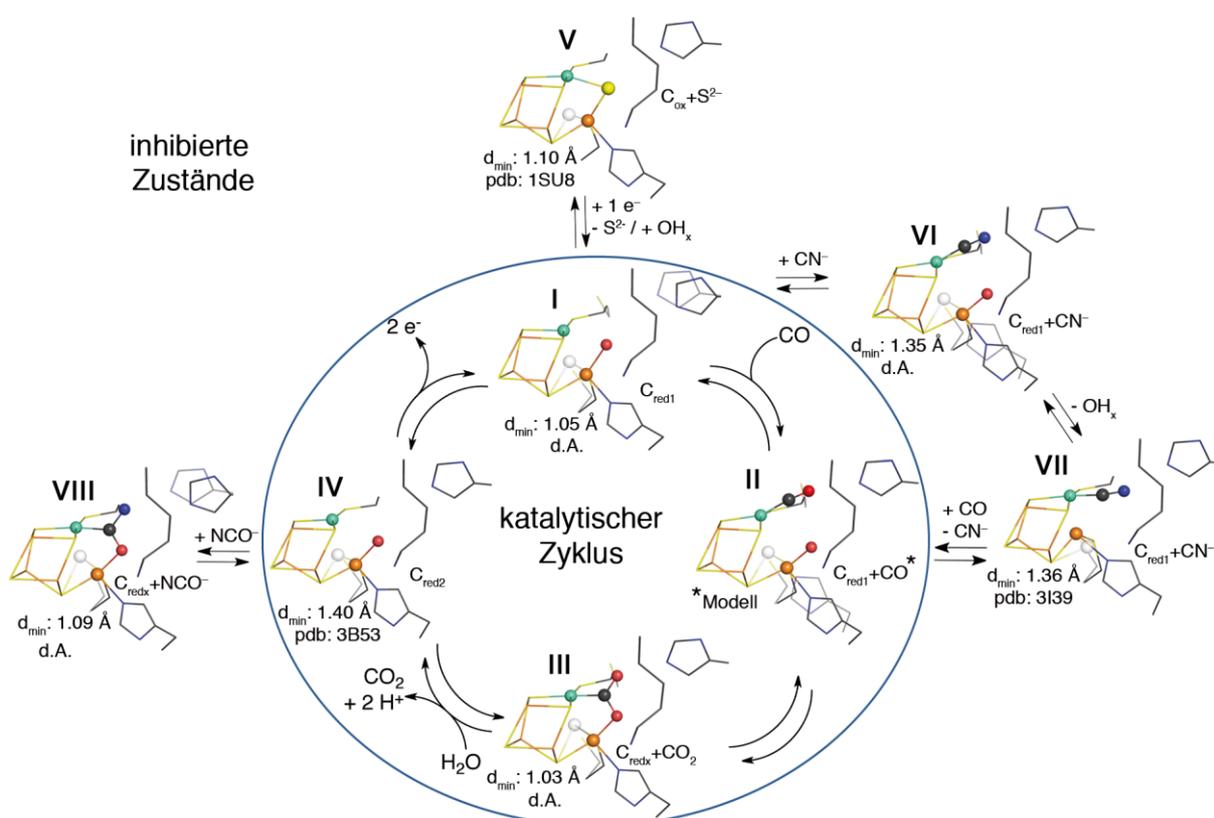


Abbildung 42: Erweiterter katalytischer Zyklus der CODH-II_{Ch}. Dargestellt sind die Strukturen von Schlüsselzuständen der CO-Oxidation und von inhibierten Zuständen. I) C_{red1}: Struktur des -320 mV-Zustands (Kapitel 3.1.4). II) C_{red1}+CO: Modell des Übergangszustands der CO-Oxidation basierend auf der verzerrt quadratisch-planaren Cyanid-gebundenen Struktur im -320 mV + CN⁻-Zustand (3.1.4). III) C_{redx}+CO₂: Struktur des -600 mV + CO₂-Zustands (3.1.5). IV) C_{red2}: Struktur des -600 mV-Zustands [71]. V) C_{ox}+S²⁻: Inaktiver oxidierter Zustand mit verbrückendem μ -Sulfido-Ligand zwischen Ni und Fe2 [44, 49]. VI) C_{red1}+CN⁻(1): Struktur des -320 mV + CN⁻-Zustands (1) mit verz. quadr.-planarer Koordinationsgeometrie (3.1.5). VII) C_{red1}+CN⁻(2): Struktur des -320 mV + CN⁻-Zustands (2) mit quadr.-planarer Koordination [72]. VIII) C_{redx}+NCO⁻: Struktur des -600 mV + NCO⁻-Zustands (3.1.4). Kugelstabmodelle des C-Clusters sind zusammen mit dem erwarteten elektronischen Zustand und der Auflösung der zugrundeliegenden Struktur aufgeführt. Die einzelnen Atome wurden elementspezifisch eingefärbt. d.A.: diese Arbeit.

Katalytischer Zyklus

I) C_{red1} : Kompetenter Zustand für die CO-Oxidation. Dieser Zustand wurde bei einem Potential von -320 mV erzeugt und beinhaltet ein $[\text{Ni}_4\text{Fe}_4\text{S-OH}_x]$ -Cluster. Dabei handelt es sich beim gebundenen OH_x -Liganden aufgrund der gefundenen Bindungslängen und -winkel um Wasser (H_2O).

II) $C_{\text{red1}}+\text{CO}$: Der Übergangszustand der CO-Oxidation wurde als Modell auf Basis der CN^- -gebundenen Struktur (-320 mV + CN^- , Kapitel 3.1.5) vorgeschlagen. In diesem Zustand koexistieren CO-Ligand am Ni und OH_x -Ligand am Fe2. Die Bindung des CO könnte zu einer Deprotonierung des im -320 mV-Zustand gebundenen Wasserliganden führen und nachfolgend einen nukleophilen Angriff am Kohlenstoffatom erlauben.

III) $C_{\text{redx}}+\text{CO}_2$: Der CO_2 -gebundene Zustand auf Basis der -600 mV + CO_2 -Struktur (3.1.4), zeigt den Status nach Angriff der Hydroxylgruppe am CO-Molekül. Dabei handelt es sich um ein $[\text{Ni}_4\text{Fe}_4\text{S-CO}_2]$ -Cluster und entspricht entweder $C_{\text{red1}}:\text{CO}_2^{2-}$ oder $C_{\text{red2}}:\text{CO}_2$. Aufgrund des strukturellen Vergleichs mit Formiat und der deutlich abweichenden Bindungslängen im Gegensatz zu CO_2 erscheint es plausibel, dass die Elektronen im beobachteten Zustand (3.1.4) bereits auf das Substrat geflossen sind und es sich somit um $C_{\text{red1}}:\text{CO}_2^{2-}$ handelt.

IV) C_{red2} : Der 2-e^- -reduzierte Zustand wurde bei einem Potential von -600 mV hergestellt und zeigt ein $[\text{Ni}_4\text{Fe}_4\text{S-OH}_x]$ -Cluster [71]. Dabei sind die beiden Elektronen entweder über das C-Cluster delokalisiert, als Hydrid an Ni gebunden [66] oder existieren als dative Ni,Fe-Metall-Metall-Bindung [67]. Nach sequentiellm Transfer der beiden Elektronen wird der C_{red1} -Zustand (I) wiederhergestellt.

Inhibierte Zustände

V) $C_{\text{ox}}+\text{S}^{2-}$: Inaktiver oxidiertes Zustand mit verbrückendem μ_2 -Sulfido-Ligand zwischen Ni und Fe2 [44, 49]. Bei Potentialen oberhalb von -50 mV entsteht der katalytisch inaktive C_{ox} -Zustand, der durch 1-e^- -Reduktion wieder in den C_{red1} -Zustand zurückgeführt werden kann [64]. Im Beisein von Hydrosulfid oder Sulfid (HS^- , S^{2-}) entsteht der $C_{\text{ox}}+\text{S}^{2-}$ -Zustand. Dieser kann nur bei Potentialen unterhalb von -250 mV in den C_{red1} -Zustand zurückgeführt werden [64].

VI) $C_{red1}+CN^-(1)$: Cyanid-gebundener Zustand mit CN^- in verzerrt quadratisch-planarer Koordination und Koexistenz des OH_x -Liganden am Fe2 (Kapitel 3.1.5). Dabei entsteht dieser Zustand durch schnelle Bindung des CN^- an das C-Cluster im C_{red1} -Zustand (I).

VII) $C_{red1}+CN^-(2)$: Cyanid-gebundener Zustand mit quadratisch-planarer Koordination [72]. Im Zuge einer strukturellen Umlagerung ausgehend von VI, besetzt das CN^- -Ion die äquatoriale Koordinationsstelle des Ni, wobei die OH_x -Gruppe aus dem Cluster eliminiert wird. Das C-Cluster im Cyanid-inhibierten Zustand kann durch Inkubation mit CO bzw. Reaktion mit starkem Reduktionsmittel ($E^\circ \leq -600$ mV) reaktiviert werden [64, 76].

VIII) $C_{redx}+NCO^-$: Der Cyanat-inhibierte Zustand des C-Clusters wurde auf Basis der -600 mV + NCO^- -Struktur erstellt (Kapitel 3.1.4). NCO^- bindet spezifisch an den C_{red2} -Zustand und führt zu einer verbrückten Geometrie analog zum CO_2 -gebundenen Zustand (III). Dabei handelt es sich entweder um $C_{red2}:NCO^-$ oder $C_{red1}:H_2NCO$. Der beobachtete Bindungswinkel von unter 120° sowie die Realisierung einer distalen Konformation des His93 sprechen für einen Zustand, in dem bereits zwei Elektronen auf NCO^- übertragen wurden ($C_{red1}:H_2NCO$).

Zusammenfassend konnten durch diese Arbeit strukturelle Einsichten in alle bisher bekannten Zustände der $CODH-II_{Ch}$ gewonnen werden. Das C-Cluster zeichnet sich in allen untersuchten Zuständen, mit und ohne Liganden, durch eine hohe strukturelle Plastizität aus. So zeigen Überlagerungen der einzelnen Zustände kaum Abweichungen in der Position der Cluster-Atome und deren Bindungslängen und -winkeln. Es wurde bereits durch Jeoung & Dobbek [71] vorgeschlagen, dass die hohen Umsatzgeschwindigkeiten von $31,000$ s^{-1} auch in der geringen Reorganisationsenergie gründen, die beim Übergang verschiedener Zustände nötig wird. Die strukturellen Untersuchungen machen deutlich, dass eine Analyse von individuellen Beiträgen zur Katalyse selbst bei atomarer Auflösung nicht einfach zu leisten ist. Um ein umfangreiches Bild über die katalytische Funktion zu erhalten, bedarf es einer Vereinigung von strukturellen Informationen, quantenchemischen Berechnungen, spektroskopischen und kinetischen Untersuchungen. Nur so kann die Frage beantwortet werden, warum das C-Cluster ein solch effizienter Katalysator für CO_x -Transformationen ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnten synthetische Katalysatoren auf Basis des C-Clusters entwickelt werden und in Zukunft eine großtechnische Umsetzung von Kohlenoxiden ermöglichen.

4.2 CO-Dehydrogenase V (CODH- V_{Ch})

Die hier vorgestellten Untersuchungen zur CODH- V_{Ch} zeigten erstmalig ein Protein, das in Grundfaltung und oligomerem Zustand einer Ni,Fe-CODH entspricht, jedoch ein Hybrid-Cluster anstelle des C-Clusters enthält (siehe 3.2). Die biochemische und strukturelle Charakterisierung dieses Proteins der CODH-Untergruppe 2 (Abb. 14), offenbarte zahlreiche Gemeinsamkeiten zwischen CODHs und Hybrid-Cluster-Proteinen, wobei beide zur übergeordneten Prisman-Familie gehören (PF03063).

CODH- V_{Ch} existiert in Lösung als Homodimer und enthält fünf Metallcluster (Kapitel 3.2.1-3.2.3). Röntgenstrukturanalysen konnten zeigen, dass dabei pro Dimer ein [2Fe2S]-Cluster, zwei [4Fe4S]-Cluster und zwei Hybrid-Cluster enthalten sind (Kapitel 3.2.5-3.2.6). Letztere bestehen im *as-isolated* Zustand aus einem [4Fe3S2O]-Cluster (3.2.5) und werden durch Reduktion mit Dithionit in ein [4Fe3S]-Cluster überführt (3.2.6). Damit entspricht das Hybrid-Cluster in seiner redoxabhängigen Dynamik dem aus *D. vulgaris* [155, 156] und ähnelt dem proximalen Cluster aus O_2 -toleranten Ni,Fe-Hydrogenasen [163]. Die Kanalstruktur wurde durch Xe-Derivatisierung aufgeklärt und offenbarte ein für CODHs konserviertes Tunnelsystem (vgl. CODH-II $_{Ch}$, Kapitel 3.2.7).

Es konnte gezeigt werden, dass CODH- V_{Ch} die Reduktion von Hydroxylamin mit einer Umsatzrate k_{cat} von 0.13 s^{-1} und einem K_M -Wert von 7.6 mM katalysiert (Kapitel 3.2.8). Ein Umsatz von CO oder CO_2 konnte jedoch nicht beobachtet werden.

CODH- V_{Ch} ist ein verbindendes Glied zwischen HCPs und CODHs. Dabei stellt sich die Frage, ob das Hybrid-Cluster in CODH- V_{Ch} durch Mutation eines C-Cluster-enthaltenden Enzyms entstand oder das C-Cluster aus einem Hybrid-Cluster-enthaltenden Vorgänger resultierte. So könnte CODH- V_{Ch} in seiner Faltung und Cofaktorzusammensetzung einem Vorgängerprotein entsprechen, aus welchem sich durch Mutation koordinierender Reste CODHs mit einem [Ni4Fe4S]-Cluster und HCPs durch Verlust einer Domäne zu Hybrid-Cluster-Proteinen entwickelten.

Da Proteine der Prismanfamilie aus evolutionärer Sicht eine sehr alte Proteinfamilie darstellen, könnten zukünftige Ergebnisse interessante Einsichten in die Entwicklung eines frühzeitlichen Kohlenstoffmetabolismus liefern.

5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten signifikant zum Verständnis von Struktur, Mechanismus und Aufbau von Ni,Fe-Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen beitragen und bilden eine vielversprechende Grundlage für weiterführende Experimente.

CODH-II_{Ch} wurde in drei unterschiedlichen Zuständen auf atomarer Ebene charakterisiert und eröffnete Einblicke in die chemische Natur der Liganden. Wichtige Detailinformationen über den Protonierungszustand der einzelnen Spezies würden weiter zum Verständnis der Katalyse und Inhibition beitragen. Die verwendeten Proteinkristalle könnten in ihrer Größe weiter optimiert ($> 1 \text{ nm}^3$) und einer Neutronenbeugungsanalyse unterzogen werden. Dazu wäre auch ein Transfer bzw. Wachstum der Kristalle in D₂O nötig, da der Streuquerschnitt von Deuterium (2.05 b) deutlich kleiner als der von Wasserstoff (80.27 b, 1 b = 100 fm²) ist und so das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert würde [171]. Zusätzlich könnten Berechnungen auf DFT- und QM/MM-Ebene wichtige Informationen über die Energie der Zustände bzw. Aussagen über weiterlaufende Reaktionstrajektorien im katalytischen Zyklus liefern.

Ferner würde die Bestimmung der spektroskopischen Eigenschaften des C-Clusters in den untersuchten Zuständen weitere Einblicke in die Reaktivität des Clusters liefern. Bisher wurden Rückschlüsse auf den spektroskopischen Zustand des C-Clusters (C_{red1}, C_{red2}) nur aufgrund des gewählten Redoxpotentials (-320 mV, -600 mV) gezogen. So könnte die Messung von ESR-Spektren von Kristallen nach Behandlung in den entsprechenden *soaking*-Lösungen erstmals eine Korrelation zwischen Kristallstruktur und spektroskopischen Zuständen liefern. Speziell der -600 mV + CO₂-Zustand wäre ein interessantes Ziel für solche Untersuchungen. Neben der vorgefundenen Geometrie könnte direkt gezeigt werden, ob die Elektronen im beobachteten Zustand bereits vom C-Cluster auf CO₂ geflossen sind oder noch immer am C-Cluster lokalisiert sind.

Da aufgrund der hohen Auflösung auch Zustände mit geringem Besetzungsgrad aufgelöst werden können, könnten strukturelle Untersuchungen mit CO-freisetzenden „caged-compounds“ endlich Informationen über die Bindungsgeometrie des CO liefern und weitere Erkenntnisse über den katalytischen Mechanismus der CO-Oxidation ermöglichen.

Auch eine Identifizierung des CO-gebundenen Zustands, ausgehend vom -600 mV + CO₂-Zustand, erscheint möglich. Mit Hilfe eines pH-Sprungs des umgebenden Mediums (bislang pH 8.0) hin zu geringeren pH-Werten könnte der C-O-Bindungsbruch im gebundenen Carboxylat induziert werden und zum CO-gebundenen Zustand am Ni-Atom führen.

Aufgrund verlangsamer Diffusion im Kristall besteht die Chance, diesen Zustand durch schnelles schockgefrieren der Kristalle „einzufangen“.

Ferner könnte das verbrückende [4Fe4S]-Cluster (D-Cluster) in CODH-II_{Ch} durch Mutagenese in ein [2Fe2S]-Cluster umgeformt werden und im Anschluss der Einfluss der veränderten Elektronentransferkette auf die Aktivität untersucht werden.

Die Struktur der CODH-V_{Ch} eröffnete ein unerwartetes Hybrid-Cluster im aktiven Zentrum. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit könnte durch ortsgerichtete Mutagenese versucht werden, ein C-Cluster in CODH-V_{Ch} aufzubauen.

Zusätzlich sollten weitere Untersuchungen zu etwaigen katalytischen Eigenschaften des Enzyms unternommen werden, da die gefundene Hydroxylamin-Reduktaseaktivität aufgrund der beobachteten Parameter physiologisch irrelevant erscheint. Hierbei könnten elektrochemische Messungen mit immobilisiertem Protein eine vielversprechende Alternative darstellen. Auf diese Weise könnten auch Redoxreaktionen ohne merkliche spektrale Änderung, allein auf Basis des Flusses von Elektronen vom Enzym zum Substrat (oder zurück), beobachtet werden.

6. Literatur

- [1] Geider, R.J., *et al.*, Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global Change Biology* **7**(8), 849-882 (2001).
- [2] Yergin, D., *The Quest: Energy, Security and the Remaking of the Modern World*. Penguin Press (2011).
- [3] IPCC, 2013: Summary for Policymakers. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, ed. Stocker, T.F. *et al.*, Cambridge University Press (2013).
- [4] Khalil, M.A.K. und R.A. Rasmussen, The Global Cycle of Carbon-Monoxide - Trends and Mass Balance. *Chemosphere* **20**(1-2), 227-242 (1990).
- [5] Khalil, M.A.K., J.P. Pinto, und M.J. Shearer, Atmospheric carbon monoxide. *Chemosphere: Global Change Sci.* **1**, xi-xiii (1999).
- [6] Hall, D.O. und K. Rao, *Photosynthesis* (6. Aufl.), Cambridge University Press (1999).
- [7] Oelgeschlager, E. und M. Rother, Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea. *Arch. Microbiol.* **190**(3), 257-269 (2008).
- [8] Ragsdale, S.W. und E. Pierce, Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**(12), 1873-98 (2008).
- [9] Fuchs, G., Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life? *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 631-658 (2011).
- [10] Jeoung, J.H., *et al.*, Carbon monoxide. Toxic gas and fuel for anaerobes and aerobes: carbon monoxide dehydrogenases. *Met. Ions Life Sci.* **14**, 37-69 (2014).
- [11] Kumar, M., *et al.*, Kinetic Evidence That Carbon-Monoxide Dehydrogenase Catalyzes the Oxidation of Carbon-Monoxide and the Synthesis of Acetyl-CoA at Separate Metal Centers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**(24), 11646-11647 (1993).
- [12] Berg, I.A., *et al.*, Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(6), 447-460 (2010).
- [13] Hollemann, A.F., E. Wiberg und N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie* (102. Aufl.), Walter de Gruyter (2007).
- [14] Scuseria, G.E., *et al.*, The Dipole-Moment of Carbon-Monoxide. *J. Chem. Phys.* **94**(10), 6660-6663 (1991).
- [15] Gilliam, O.R., C.M. Johnson, und W. Gordy, Microwave Spectroscopy in the Region from 2 to 3 Millimeters. *Phys. Rev.* **78**(2), 140-144 (1950).
- [16] Janiak, C.M., H.J. Meyer, D. Gudat, und R. Alsfasser, *Riedel Moderne Anorganische Chemie*, De Gruyter (2012).

- [17] Dyson, P.J. und J.S. McIndoe, *Transition Metal Carbonyl Cluster Chemistry*, CRC Press (2000).
- [18] Newsome, D.S., The Water-Gas Shift Reaction. *Catal. Rev.: Sci. Eng.* **21**(2), 275-318 (1980).
- [19] Ford, P.C. und A. Rokicki, Nucleophilic Activation of Carbon-Monoxide - Applications to Homogeneous Catalysis by Metal-Carbonyls of the Water Gas Shift and Related Reactions. *Adv. Organomet. Chem.* **28**, 139-217 (1988).
- [20] Burch, R., Gold catalysts for pure hydrogen production in the water-gas shift reaction: activity, structure and reaction mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**(47), 5483-5500 (2006).
- [21] Aresta, M. und A. Dibenedetto, Utilisation of CO₂ as a chemical feedstock: opportunities and challenges. *Dalton Trans.* (28), 2975-2992 (2007).
- [22] Rozanska, X. und R. Vuilleumier, Mechanisms of the water-gas-shift reaction by iron pentacarbonyl in the gas phase. *Inorg. Chem.* **47**(19), 8635-8640 (2008).
- [23] Appel, A.M., *et al.*, Frontiers, Opportunities, and Challenges in Biochemical and Chemical Catalysis of CO₂ Fixation. *Chem. Rev.* **113**(8), 6621-6658 (2013).
- [24] Aresta, M., Carbon Dioxide Reduction and Uses as Chemical Feedstock. *Activation of Small Molecules*, ed. W.B. Tolman, Wiley-VCH (2006).
- [25] Benson, E.E., *et al.*, Electrocatalytic and homogeneous approaches to conversion of CO₂ to liquid fuels. *Chem. Soc. Rev.* **38**(1), 89-99 (2009).
- [26] Can, M., F.A. Armstrong, und S.W. Ragsdale, Structure, Function, and Mechanism of the Nickel Metalloenzymes, CO Dehydrogenase, and Acetyl-CoA Synthase. *Chem. Rev.* **114**(8), 4149-4174 (2014).
- [27] Rosen, B.A., *et al.*, Ionic Liquid-Mediated Selective Conversion of CO₂ to CO at Low Overpotentials. *Science* **334**(6056), 643-644 (2011).
- [28] Rabalais, J.W., *et al.*, Electronic Spectroscopy of Isoelectronic Molecules. 2. Linear Triatomic Groupings Containing 16 Valence Electrons. *Chem. Rev.* **71**(1), 73-108 (1971).
- [29] Gibson, D.H., The organometallic chemistry of carbon dioxide. *Chem. Rev.* **96**(6), 2063-2095 (1996).
- [30] Gibson, D.H., Carbon dioxide coordination chemistry: metal complexes and surface-bound species. What relationships? *Coord. Chem. Rev.* **185-6**, 335-355 (1999).
- [31] Field, J. S., R. J. Haines, J. Sundermeyer, und S.F. Woollam, Ready Deprotonation of the Protic Solvent Species [Ru₂(CO)₅(R'OH{μ-(RO)₂PN(Et)P(OR)₂}₂)]²⁺ (R = Me or Prⁱ; R' = H, Me, Et, *etc.*) and the Formation of [Ru₂{μ-OC(O)}(CO)₄{μ-(RO)₂PN(Et)-P(OR)₂}₂] containing Carbon Dioxide in a Bridging Co-ordination Mode. *J. Chem. Soc. Chem. Commun. Trans.* **14**, 985-988 (1990).

- [32] Szalda, D.J., *et al.*, Properties and Reactivity of Metallocarboxylates - Crystal and Molecular-Structure of the $-\text{CO}_2^{2-}$ -Bridged "Polymer" $\{[\text{Co}^{\text{III}}(\text{en})_2(\text{CO}_2)]-(\text{ClO}_4)\text{H}_2\text{O}\}_n$. *Inorg. Chem.* **31**(22), 4712-4714 (1992).
- [33] Bartholomew, G.W. und M. Alexander, Microbial-Metabolism of Carbon-Monoxide in Culture and in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**(5), 932-937 (1979).
- [34] Schübel, U., *et al.*, Molecular Characterization of the Gene-Cluster *coxMSL* Encoding the Molybdenum-Containing Carbon-Monoxide Dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Bacteriol.* **177**(8), 2197-2203 (1995).
- [35] Hille, R., The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**(7), 2757-2816 (1996).
- [36] Meyer, O., *et al.*, The role of Se, Mo and Fe in the structure and function of carbon monoxide dehydrogenase. *Biol. Chem.* **381**(9-10), 865-876 (2000).
- [37] Zhang, B., C.F. Hemann, und R. Hille, Kinetic and Spectroscopic Studies of the Molybdenum-Copper CO Dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Biol. Chem.* **285**(17), 12571-12578 (2010).
- [38] Dobbek, H., *et al.*, Catalysis at a dinuclear $[\text{CuSMo}(=\text{O})\text{OH}]$ cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(25), 15971-15976 (2002).
- [39] Stein, B.W. und M.L. Kirk, Orbital contributions to CO oxidation in Mo-Cu carbon monoxide dehydrogenase. *Chem. Comm.* **50**(9), 1104-1106 (2014).
- [40] Lindahl, P.A., The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? *Biochemistry* **41**(7), 2097-105 (2002).
- [41] Ragsdale, S.W., Life with carbon monoxide. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**(3), 165-195 (2004).
- [42] Bonam, D. und P.W. Ludden, Purification and characterization of carbon monoxide dehydrogenase, a nickel, zinc, iron-sulfur protein, from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **262**(7), 2980-7 (1987).
- [43] Svetlitchnyi, V., *et al.*, Two membrane-associated NiFeS-carbon monoxide dehydrogenases from the anaerobic carbon-monoxide-utilizing eubacterium *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *J. Bacteriol.* **183**(17), 5134-5144 (2001).
- [44] Dobbek, H., *et al.*, Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a $[\text{Ni-4Fe-5S}]$ cluster. *Science* **293**(5533), 1281-5 (2001).
- [45] Drennan, C.L., *et al.*, Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(21), 11973-8 (2001).
- [46] Doukov, T.I., *et al.*, A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science* **298**(5593), 567-572 (2002).

- [47] Darnault, C., *et al.*, Ni-Zn-[Fe₄-S₄] and Ni-Ni-[Fe₄-S₄] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* **10**(4), 271-279 (2003).
- [48] Gong, W., *et al.*, Structure of the $\alpha_2\epsilon_2$ Ni-dependent CO dehydrogenase component of the *Methanosarcina barkeri* acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(28), 9558-63 (2008).
- [49] Dobbek, H., *et al.*, Carbon monoxide induced decomposition of the active site [Ni-4Fe-5S] cluster of CO dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**(17), 5382-5387 (2004).
- [50] Page, C.C., *et al.*, Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**(6757), 47-52 (1999).
- [51] Gray, H.B. und J.R. Winkler, Long-range electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(10), 3534-9 (2005).
- [52] Svetlitchnyi, V., *et al.*, A functional Ni-Ni-[4Fe-4S] cluster in the monomeric acetyl-CoA synthase from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(2), 446-451 (2004).
- [53] Amara, P., *et al.*, A quantum chemical study of the reaction mechanism of acetyl-coenzyme A synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(8), 2776-84 (2005).
- [54] Bender, G., *et al.*, Infrared and EPR Spectroscopic Characterization of a Ni(I) Species Formed by Photolysis of a Catalytically Competent Ni(I)-CO Intermediate in the Acetyl-CoA Synthase Reaction. *Biochemistry* **49**(35), 7516-7523 (2010).
- [55] Chmielowska, A., P. Lodowski, und M. Jaworska, Redox Potentials and Protonation of the A-Cluster from Acetyl-CoA Synthase. A Density Functional Theory Study. *J. Phys. Chem. A* **117**(47), 12484-12496 (2013).
- [56] Gencic, S., *et al.*, Different Modes of Carbon Monoxide Binding to Acetyl-CoA Synthase and the Role of a Conserved Phenylalanine in the Coordination Environment of Nickel. *Biochemistry* **52**(10), 1705-1716 (2013).
- [57] Doukov, T.I., *et al.*, Xenon in and at the end of the tunnel of bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Biochemistry* **47**(11), 3474-3483 (2008).
- [58] Jeoung, J.-H. und H. Dobbek, Ni, Fe-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenases, *Handbook of Metalloproteins*, ed. A. Messerschmidt. John Wiley & Sons (2007).
- [59] Feng, J. und P.A. Lindahl, Carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*: effect of redox potential on catalysis. *Biochemistry* **43**(6), 1552-9 (2004).
- [60] Lindahl, P.A., E. Münck, und S.W. Ragsdale, CO Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* - Epr and Electrochemical Studies in CO₂ and Argon Atmospheres. *J. Biol. Chem.* **265**(7), 3873-3879 (1990).
- [61] Lindahl, P.A., S.W. Ragsdale, und E. Münck, Mössbauer Study of CO Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Biol. Chem.* **265**(7), 3880-3888 (1990).

- [62] Hu, Z.G., *et al.*, Nature of the C-cluster in Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* **118**(4), 830-845 (1996).
- [63] Spangler, N.J., *et al.*, Spectroelectrochemical characterization of the metal centers in carbon monoxide dehydrogenase (CODH) and nickel-deficient CODH from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **271**(14), 7973-7977 (1996).
- [64] Wang, V.C., *et al.*, A unified electrocatalytic description of the action of inhibitors of nickel carbon monoxide dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **135**(6), 2198-206 (2013).
- [65] Grahame, D.A. und E. DeMoll, Substrate and Accessory Protein-Requirements and Thermodynamics of Acetyl-CoA Synthesis and Cleavage in *Methanosarcina barkeri*. *Biochemistry* **34**(14), 4617-4624 (1995).
- [66] Amara, P., *et al.*, Carbon monoxide dehydrogenase reaction mechanism: a likely case of abnormal CO₂ insertion to a Ni-H(-) bond. *Inorg. Chem.* **50**(5), 1868-78 (2011).
- [67] Lindahl, P.A., Metal-metal bonds in biology. *J. Inorg. Biochem.* **106**(1), 172-8 (2012).
- [68] Fraser, D.M. und P.A. Lindahl, Stoichiometric CO reductive titrations of acetyl-CoA synthase (Carbon monoxide dehydrogenase) from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* **38**(48), 15697-705 (1999).
- [69] Ensign, S.A., M.R. Hyman, und P.W. Ludden, Nickel-Specific, Slow-Binding Inhibition of Carbon-Monoxide Dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by Cyanide. *Biochemistry* **28**(12), 4973-4979 (1989).
- [70] Anderson, M.E., *et al.*, Identification of a Cyanide Binding-Site in CO Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* Using Epr and Endor Spectroscopies. *J. Am. Chem. Soc.* **115**(25), 12204-12205 (1993).
- [71] Jeoung, J.H. und H. Dobbek, Carbon dioxide activation at the Ni,Fe-cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase. *Science* **318**(5855), 1461-4 (2007).
- [72] Jeoung, J.H. und H. Dobbek, Structural basis of cyanide inhibition of Ni, Fe-containing carbon monoxide dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(29), 9922-3 (2009).
- [73] Kung, Y., *et al.*, Crystallographic snapshots of cyanide- and water-bound C-clusters from bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Biochemistry* **48**(31), 7432-40 (2009).
- [74] Jeoung, J.H. und H. Dobbek, n-Butyl isocyanide oxidation at the [NiFe₄S₄OH_(x)] cluster of CO dehydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **17**(2), 167-73 (2012).
- [75] Diekert, G.B. und R.K. Thauer, Carbon-Monoxide Oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* **136**(2), 597-606 (1978).
- [76] Ha, S.W., *et al.*, Interaction of potassium cyanide with the [Ni-4Fe-5S] active site cluster of CO dehydrogenase from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *J. Biol. Chem.* **282**(14), 10639-10646 (2007).

- [77] Seravalli, J. und S.W. Ragsdale, C-13 NMR characterization of an exchange reaction between CO and CO₂ catalyzed by carbon monoxide dehydrogenase. *Biochemistry* **47**(26), 6770-6781 (2008).
- [78] Svetlichny, V.A., *et al.*, *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing Thermophilic Anaerobic Bacterium from Hydrothermal Environments of Kunashir Island. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**(3), 254-260 (1991).
- [79] Wu, M., *et al.*, Life in hot carbon monoxide: The complete genome sequence of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* Z-2901. *PLoS Genet.* **1**(5), 563-574 (2005).
- [80] Soboh, B., D. Linder, und R. Hedderich, Purification and catalytic properties of a CO-oxidizing : H₂-evolving enzyme complex from *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *Eur. J. Biochem.* **269**(22), 5712-5721 (2002).
- [81] Fox, J.D., *et al.*, Characterization of the region encoding the CO-induced hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **178**(21), 6200-6208 (1996).
- [82] Gonzalez, J.M. und F.T. Robb, Genetic analysis of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* carbon monoxide dehydrogenase genes *cooF* and *cooS*. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**(2), 243-247 (2000).
- [83] Svetlitchnaia, T., *et al.*, Structural insights into methyltransfer reactions of a corrinoid iron-sulfur protein involved in acetyl-CoA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**(39), 14331-14336 (2006).
- [84] Hennig, S.E., *et al.*, Redox-dependent complex formation by an ATP-dependent activator of the corrinoid/iron-sulfur protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**(14), 5235-5240 (2012).
- [85] Hennig, S.E., *et al.*, ATP-induced electron transfer by redox-selective partner recognition. *Nat. Commun.* **5** (2014).
- [86] Goetzl, S., *et al.*, Structural Basis for Electron and Methyl-Group Transfer in a Methyltransferase System Operating in the Reductive Acetyl-CoA Pathway. *J. Mol. Biol.* **411**(1), 96-109 (2011).
- [87] Fessler, J., Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Rubrerythrins und seiner putativen FAD-haltigen Reduktase aus *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*, Masterarbeit, Universität Bayreuth (2011).
- [88] Matson, E.G., K.G. Gora, und J.R. Leadbetter, Anaerobic Carbon Monoxide Dehydrogenase Diversity in the Homoacetogenic Hindgut Microbial Communities of Lower Termites and the Wood Roach. *PLoS One* **6**(4) (2011).
- [89] Tamura, K., *et al.*, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**(12), 2725-2729 (2013).
- [90] Nakamura, M., K. Saeki, und Y. Takahashi, Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster. *J. Biochem.* **126**(1), 10-18 (1999).

- [91] Sambrook, J.R. und D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- [92] Ensign, S.A., Reactivity of Carbon-Monoxide Dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* with Carbon Dioxide, Carbonyl Sulfide, and Carbon Disulfide. *Biochemistry* **34**(16), 5372-5381 (1995).
- [93] Jeoung, J.-H., Anaerobic Carbon Monoxide Dehydrogenase: Mechanism of CO-Oxidation at the [NiFe₄S₄OH_x] Cluster and Nickel-Processing by its ATPase CooC, Dissertation, Universität Bayreuth (2008).
- [94] Wolfe, M.T., *et al.*, Hydroxylamine reductase activity of the hybrid cluster protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**(21), 5898-5902 (2002).
- [95] McPherson, A., Introduction to protein crystallization. *Methods* **34**(3), 254-265 (2004).
- [96] Seefeldt, L.C. und S.A. Ensign, A Continuous, Spectrophotometric Activity Assay for Nitrogenase Using the Reductant Titanium(III) Citrate. *Anal. Biochem.* **221**(2), 379-386 (1994).
- [97] Mueller, U., *et al.*, Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J. Synchrotron Rad.* **19**, 442-449 (2012).
- [98] Leslie, A.G.W. und H.R. Powell, Processing diffraction data with MOSFLM. *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography* **245**, 41-51 (2007).
- [99] Kabsch, W., Xds. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132 (2010).
- [100] Krug, M., *et al.*, XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 568-572 (2012).
- [101] McCoy, A.J., *et al.*, Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**(Pt 4), 658-674 (2007).
- [102] Murshudov, G.N., *et al.*, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **67**(Pt 4), 355-67 (2011).
- [103] Adams, P.D., *et al.*, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**(Pt 2), 213-21 (2010).
- [104] Bunkoczi, G. und R.J. Read, Improvement of molecular-replacement models with Sculptor. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **67**, 303-312 (2011).
- [105] Terwilliger, T.C., *et al.*, Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **64**, Emsley61-69 (2008).
- [106] Emsley, P. und K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**(Pt 12, 1), 2126-32 (2004).
- [107] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.3, Schrödinger, LLC.

- [108] Gruene, T., *et al.*, Refinement of macromolecular structures against neutron data with SHELXL2013. *J. Appl. Crystallogr.* **47**(Pt 1), 462-466 (2014).
- [109] Sehnal, D., *et al.*, MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels. *J. Cheminform.* **5** (2013).
- [110] Ho, B.K. und F. Gruswitz, HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures. *BMC Struct. Biol.* **8**, 49 (2008).
- [111] Blow, D.M., To Fit a Plane to a Set of Points by Least Squares. *Acta Crystallogr.* **13**(2), 168-168 (1960).
- [112] Holm, L. und P. Rosenstrom, Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **38**, W545-W549 (2010).
- [113] Bradford, M.M., Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2), 248-254 (1976).
- [114] Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **227**(5259), 680-685 (1970).
- [115] Fish, W.W., Rapid Colorimetric Micromethod for the Quantitation of Complexed Iron in Biological Samples. *Methods Enzymol.* **158**, 357-364 (1988).
- [116] Audett, J.D., *et al.*, Substrate Organo-Metallic Chemistry of Osmium Tetraoxide - Formation of a Novel Type of Carbon-Dioxide Coordination. *J. Am. Chem. Soc.* **104**(25), 7352-7353 (1982).
- [117] Yang, Y.L., *et al.*, Homonuclear Dirhenium Complex Bridged by CO₂ - Molecular-Structure of a Rhenium Dimer Bridged by CO₂ and a Rhenium Chloride Complex. *J. Organomet. Chem.* **467**(2), C6-C8 (1994).
- [118] Gibson, D.H., *et al.*, Characterization and Thermolysis Reactions of CO₂-Bridged Iron-Tin and Rhenium-Tin Complexes - Structure-Reactivity Correlations. *Organometallics* **14**(3), 1242-1255 (1995)
- [119] Hanna, T.A., A.M. Baranger, und R.G. Bergman, Reaction of Carbon-Dioxide and Heterocumulenes with an Unsymmetrical Metal-Metal Bond - Direct Addition of Carbon-Dioxide across a Zirconium-Iridium Bond and Stoichiometric Reduction of Carbon-Dioxide to Formate. *J. Am. Chem. Soc.* **117**(45), 11363-11364 (1995).
- [120] Gibson, D.H., *et al.*, Synthesis, characterization, and reactions of ruthenium phenanthroline complexes bearing C-1 ligands: Formyl, metallocarboxylate, and CO₂-bridged complexes. *Organometallics* **17**(23), 5178-5183 (1998).
- [121] Campora, J., *et al.*, CO insertion reactions into the M-OH bonds of monomeric nickel and palladium hydroxides. Reversible decarbonylation of a hydroxycarbonyl palladium complex. *Organometallics* **23**(8), 1652-1655 (2004).
- [122] Yoo, C., J. Kim, und Y. Lee, Synthesis and Reactivity of Nickel(II) Hydroxycarbonyl Species, NiCOOH- κ C. *Organometallics* **32**(23), 7195-7203 (2013).

- [123] Holtzberg, F., B. Post, und I. Fankuchen, The Crystal Structure of Formic Acid. *Acta Crystallograph.* **6**(2), 127-130 (1953).
- [124] Wriedt, M., I. Jess, und C. Nather, Poly[bis(cyanato- κN)bis(μ -pyrazine- $\kappa^2 N:N'$) cobalt(II)]. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **65**, M431-U791 (2009).
- [125] Zhang, D.P., Monoclinic form of (cyanato- κN){2,2'-[ethane-1,2-diylbis (nitrilomethylidyne)]diphenolato- $\kappa^4 O,N,N',O'$ }manganese(III). *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **66**, M1656-U1539 (2010).
- [126] Ben Moussa, I., *et al.*, Substitutional disorder in bis[(cyanato- κO)/hydroxido-(0.5/0.5)](5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato- $\kappa^4 N$)tin(IV). *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **67**, M903-U808 (2011).
- [127] Caballero, A.B., *et al.*, Bis(cyanato- κN)bis-(5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pyrimidine- κN)zinc. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **67**(Pt 3), m345 (2011).
- [128] Duggan, D.M. und D.N. Hendrick, Di- μ -cyanato-Bis(2,2',2''-Triamino-triethylamine)dinickel(II) Tetraphenylborate. *Inorg. Chem.* **13**(9), 2056-2062 (1974).
- [129] Mahendrasinh, Z., *et al.*, Cyanato bridged binuclear nickel(II) and copper(II) complexes with pyridylpyrazole ligand: Synthesis, structure and magnetic properties. *Inorg. Chim. Acta* **375**(1), 333-337 (2011).
- [130] West, D., *et al.*, Human carbonic anhydrase II-cyanate inhibitor complex: putting the debate to rest. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **70**, 1324-1327 (2014).
- [131] Bradforth, S.E., *et al.*, Photoelectron-Spectroscopy of CN^- , NCO^- , and NCS^- . *J. Chem. Phys.* **98**(2), 800-810 (1993).
- [132] Ladell, J. und B. Post, The Crystal Structure of Formamide. *Acta Crystallogr.* **7**(8-9), 559-564 (1954).
- [133] Nguyen, V.S., *et al.*, Theoretical Study of Formamide Decomposition Pathways. *J. Phys. Chem. A* **115**(5), 841-851 (2011).
- [134] Haynes, W.M., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 91st Edition., CRC Press (2010).
- [135] Sham, T.K., J.B. Hastings, und M.L. Perlman, Structure and Dynamic Behavior of Transition-Metal Ions in Aqueous-Solution - an EXAFS Study of Electron-Exchange Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **102**(18), 5904-5906 (1980).
- [136] Benisvy, L., *et al.*, Monomeric iron(II) hydroxo and iron(III) dihydroxo complexes stabilized by intermolecular hydrogen bonding. *Inorg. Chem.* **45**(6), 2403-2405 (2006).
- [137] Hikichi, S., *et al.*, Synthesis and characterization of the benzoylformato ferrous complexes with the hindered tris(pyrazolyl)borate ligand as a structural model for mononuclear non-heme iron enzymes. *Inorg. Chem.* **36**(20), 4539-4547 (1997).

- [138] MacBeth, C.E., *et al.*, Hydrogen-bonding cavities about metal ions: Synthesis, structure, and physical properties for a series of monomeric M-OH complexes derived from water. *Inorg. Chem.* **40**(18), 4733-4741 (2001).
- [139] Horn, B., *et al.*, Three-Coordinate Nickel(II) and Nickel(I) Thiolate Complexes Based on the beta-Diketiminato Ligand System. *Inorg. Chem.* **53**(13), 6867-6874 (2014).
- [140] DeRose, V.J., *et al.*, A multinuclear ENDOR study of the C-cluster in CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: Evidence for H_xO and histidine coordination to the [Fe₄S₄] center. *J. Am. Chem. Soc.* **120**(34), 8767-8776 (1998).
- [141] Szedlacsek, S.E. und R.G. Duggleby, Kinetics of Slow and Tight-Binding Inhibitors. *Enzyme Kinetics and Mechanism, Pt D* **249**, 144-180 (1995).
- [142] Seravalli, J. und S.W. Ragsdale, Channeling of carbon monoxide during anaerobic carbon dioxide fixation. *Biochemistry* **39**(6), 1274-1277 (2000).
- [143] Wang, P.H., *et al.*, Uncovering a dynamically formed substrate access tunnel in carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **135**(25), 9493-502 (2013).
- [144] Drake, H.L., A.S. Gossner, und S.L. Daniel, Old acetogens, new light. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**, 100-128 (2008).
- [145] Mayhew, S.G., Redox Potential of Dithionite and SO₂⁻ from Equilibrium Reactions with Flavodoxins, Methyl Viologen and Hydrogen Plus Hydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **85**(2), 535-547 (1978).
- [146] Sweeney, W.V. und J.C. Rabinowitz, Proteins Containing 4Fe-4S Clusters - an Overview. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 139-161 (1980).
- [147] Kurtz, D.M., Oxo-Bridged and Hydroxo-Bridged Diiron Complexes - a Chemical Perspective on a Biological Unit. *Chem. Rev.* **90**(4), 585-606 (1990).
- [148] Macedo, S., *et al.*, Hybrid cluster proteins (HCPs) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 and *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): X-ray structures at 1.25 Ångstrom resolution using synchrotron radiation. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**(4-5), 514-525 (2002).
- [149] Fukuyama, K., *et al.*, Atomic resolution structures of oxidized [4Fe-4S] ferredoxin from *Bacillus thermoproteolyticus* in two crystal forms: Systematic distortion of [4Fe-4S] cluster in the protein. *J. Mol. Biol.* **315**(5), 1155-1166 (2002).
- [150] Hagen, W.R., A.J. Pierik, und C. Veeger, Novel Electron-Paramagnetic Resonance Signals from an Fe/S Protein Containing 6 Iron Atoms. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I* **85**, 4083-4090 (1989).
- [151] Kröckel, M., *et al.*, The prismane protein resolved - Mössbauer investigation of a 4Fe cluster with an unusual mixture of bridging ligands and metal coordinations. *Eur. J. Biochem.* **251**(1-2), 454-461 (1998).

- [152] Arendsen, A.F., *et al.*, The "prismane" protein resolved: X-ray structure at 1.7 Ångstrom and multiple spectroscopy of two novel 4Fe clusters. *J. Biol. Inorg. Chem.* **3**(1), 81-95 (1998).
- [153] Pierik, A.J., *et al.*, Multifrequency Epr and High-Resolution Mossbauer-Spectroscopy of a Putative [6Fe-6S] Prismane-Cluster-Containing Protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) - Characterization of a Supercluster and Superspin Model Protein. *Eur. J. Biochem.* **206**(3), 705-719 (1992).
- [154] Tavares, P., *et al.*, Spectroscopic characterization of a novel tetranuclear Fe cluster in an iron-sulfur protein isolated from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biochemistry* **37**(9), 2830-2842 (1998).
- [155] Aragao, D., *et al.*, Reduced hybrid cluster proteins (HCP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 and *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): X-ray structures at high resolution using synchrotron radiation. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**(5), 540-548 (2003).
- [156] Aragao, D., *et al.*, Structural and functional relationships in the hybrid cluster protein family: structure of the anaerobically purified hybrid cluster protein from *Desulfovibrio vulgaris* at 1.35 Ångstrom resolution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **64**, 665-674 (2008).
- [157] Cabello, P., *et al.*, Hydroxylamine assimilation by *Rhodobacter capsulatus* E1F1 - Requirement of the *hcp* gene (hybrid cluster protein) located in the nitrate assimilation *nas* gene region for hydroxylamine reduction. *J. Biol. Chem.* **279**(44), 45485-45494 (2004).
- [158] Filenko, N.A., D.F. Browning, and J.A. Cole, Transcriptional regulation (prismane) protein of a hybrid cluster. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 195-197 (2005).
- [159] Almeida, C.C., *et al.*, The role of the hybrid cluster protein in oxidative stress defense. *J. Biol. Chem.* **281**(43), 32445-32450 (2006).
- [160] Filenko, N., *et al.*, The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *J. Bacteriol.* **189**(12), 4410-4417 (2007).
- [161] Ravelli, R.B.G. and S.M. McSweeney, The 'fingerprint' that X-rays can leave on structures. *Structure* **8**(3), 315-328 (2000).
- [162] Fritsch, J., *et al.*, The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature* **479**(7372), 249-U134 (2011).
- [163] Frielingsdorf, S., *et al.*, Reversible [4Fe-3S] cluster morphing in an O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* **10**(5), 378-U92 (2014).
- [164] Goris, T., *et al.*, A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* **7**(9), 648-648 (2011).
- [165] Overeijnder, M.L., W.R. Hagen, and P.L. Hagedoorn, A thermostable hybrid cluster protein from *Pyrococcus furiosus*: effects of the loss of a three helix bundle subdomain. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**(5), 703-710 (2009).

-
- [166] Heo, J., *et al.*, Converting the NiFeS carbon monoxide dehydrogenase to a hydrogenase and a hydroxylamine reductase. *J. Bacteriol.* **184**(21), 5894-5897 (2002).
- [167] Michaelis, L. und E.S. Hill, The viologen indicators. *J. Gen. Physiol.* **16**(6), 859-873 (1933).
- [168] Götzl, S., Funktionelle Charakterisierung von Ni,Fe-haltigen Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen und ihren assoziierten Ferredoxinen, Diplomarbeit, Universität Bayreuth (2007).
- [169] Zumft, W.G. und K. Frunzke, Discrimination of Ascorbate-Dependent Non-Enzymatic and Enzymatic, Membrane-Bound Reduction of Nitric-Oxide in Denitrifying *Pseudomonas perfectomarinus*. *Biochim. Biophys. Acta* **681**(3), 459-468 (1982).
- [170] Giuffre, A., *et al.*, The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: Evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(26), 14718-14723 (1999).
- [171] Blum, M.M., *et al.*, X-ray structure of perdeuterated diisopropyl fluorophosphatase (DFPase): perdeuteration of proteins for neutron diffraction. *Acta Crystallograph., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 379-385 (2010).
- [172] Aresta, M., *et al.*, New Nickel-Carbon Dioxide Complex - Synthesis, Properties, and Crystallographic Characterization of (Carbon Dioxide)-Bis(Tricyclohexylphosphine) Nickel. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (15), 636-637 (1975).
- [173] Dohring, A., *et al.*, The Ni(0)-CO₂ System - Structure and Reactions of [Ni(PCy₃)₂(η²-CO₂)]. *Z. Naturforsch.,B: Chem. Sci.* **40**(4), 484-488 (1985).
- [174] Lunin, V.Y., P.V. Afonine, und A.G. Urzhumtsev, Likelihood-based refinement. I. Irremovable model errors. *Acta Crystallograph., Sect. A: Found. Crystallograph.* **58**, 270-282 (2002).

7. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ACS	Acetyl-CoA-Synthase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASU	Asymmetrische Einheit (<i>asymmetric unit</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. hydrogenoformans / Ch</i>	<i>Carboxydotherrnus hydrogenoformans</i>
Cam	Chloramphenicol
Cb	Carbenicillin
CCP4	Collaborative Computational Project 4
CoA	Coenzym A
CODH	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
Css	S-Mercapto-Cystein
Da	Dalton
DT	Natriumdithionit
DTT	Dithiothreitol
<i>D. vulgaris / Dv</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD	Flavinadenindinukleotid
Gl.	Gleichung
HCP	Hybrid-Cluster-Protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
MCD	Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid
<i>M. thermoacetica</i>	<i>Moorella thermoacetica</i>
mTB Medium	Modifiziertes <i>terrific-broth</i> Medium
MV	Methylviologen
MW	Molekulargewicht

n-BIC	n-Butylisocyanid
NADH(P)	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) (reduziert)
OH _x	Wasser oder Hydroxylgruppe
OD	optische Dichte
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein-Datenbank
PDB-ID	Protein-Datenbank-Identifikationsnummer
PEG	Polyethylenglycol
red	reduziert
r.m.s.	<i>root mean square</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
S2	CODH-II _{Ch}
S5	CODH-V _{Ch}
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHP	<i>Sepharose High Performance</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific-broth</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
Tricin	<i>N</i> -(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV/Vis	Ultravioletter und sichtbarer Bereich
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WGS(R)	Wasser-Gas-Shift(-Reaktion)

8. Anhang

Tabelle A1: Bindungsarten und -eigenschaften von Metallcarboxylat-Komplexen. ^{a)} Die verbrückende Bindung ist unterstrichen dargestellt.

Bindungsmodus	Metall Summenformel der Verbindung	M-C Distanz (Å)	C-O Distanz (Å) ^{a)}	O-C-O angle (°)	M-O	Ref.
η^1	Ni (PNP)NiCOOH- κ C	1.866(2) Ni-C	1.269(3) 1.313(3)	119.6(2)	-	[122]
η^2	Ni [Ni(CO ₂ (PCy ₃) ₂),0.75(C ₇ H ₈)	1.84 Ni-C	1.17 <u>1.22</u>	133	1.99	[172]
	Ni [Ni(CO ₂ (PCy ₃) ₂)	1.857(4) Ni-C	1.210(4) <u>1.257(5)</u>	136.2	1.967(3)	[173]
$\mu^2-\eta^2$	Ir/Os [(PPh ₃),(<i>t</i> -BuNC)(4- <i>t</i> -Bupy)Ir(μ -O)(μ -C[OMe]O)Os(O) ₂ (4- <i>t</i> -Bupy) ₂] ²⁺	1.869(14) Ir-C	1.418(16) <u>1.338(16)</u>	101.7(10)	2.029(7) Os-O	[116]
	Ru/Ru [Ru ₂ { μ -OC(O)}(CO) ₄ { μ -(RO) ₂ PN(Et)P(OR) ₂ }] ₂	2.04(2) Ru-C	1.13(2) <u>1.25(2)</u>	101(2) [°]	2.23(1) Ru-O	[31]
	Ir/Zr Cp ₂ Zr(μ -N'Bu)(CO ₂)IrCp*	2.098(10) Ir-C	1.229(12) <u>1.306(12)</u>	122.1(9)	2.123(6) Zr-O	[119]
	Co/Co {[Co ^{III} (en) ₂ (CO ₂)]-(ClO ₄)H ₂ O} _n	1.924(20) Co-C	1.214(19) <u>1.285(18)</u>	124(2)	2.164(11) Co-O	[32]
	Re/Re (CO) ₃ L ₂ Re(μ , η^1 , η^1 -CO ₂)Re(CO) ₄ L L= NH ₂ CH(CH ₃) ₂	2.184(9) Re-C	1.24(1) <u>1.30(1)</u>	119.0(8)	2.117(6)	[117]
	Re/Sn Cp*Re(CO)(NO)(CO ₂)SnMe ₃	2.103(5) Re-C	1.237(6) <u>1.311(6)</u>	117.0(5)	2.054(4) Sn-O	[118]
	Pd/Pd [Pd(PCP)] ₂ (μ -CO ₂ - κ^2 C,O)	2.110(6) Pd-C	1.210(7) <u>1.277(6)</u>	122.9(4)	2.112(4)	[121]
	Ru/Ru <i>cis,cis</i> - (CH ₃ CN)(CO)(tpy)Ru(CO ₂)Ru(tpy)- (CO) ₂ ²⁺ 2PF ₆ ⁻	2.059(4) Ru-C	1.232(4) <u>1.297(5)</u>	121.3(4)	2.058(3)	[120]
	Ni/Ni {(PNP)Ni} ₂ - μ -CO ₂ - κ^2 C,O	1.888(2) Ni-C	<u>1.296(3)</u> 1.240(3)	123.7(2)	1.897(2) Ni-O	[122]

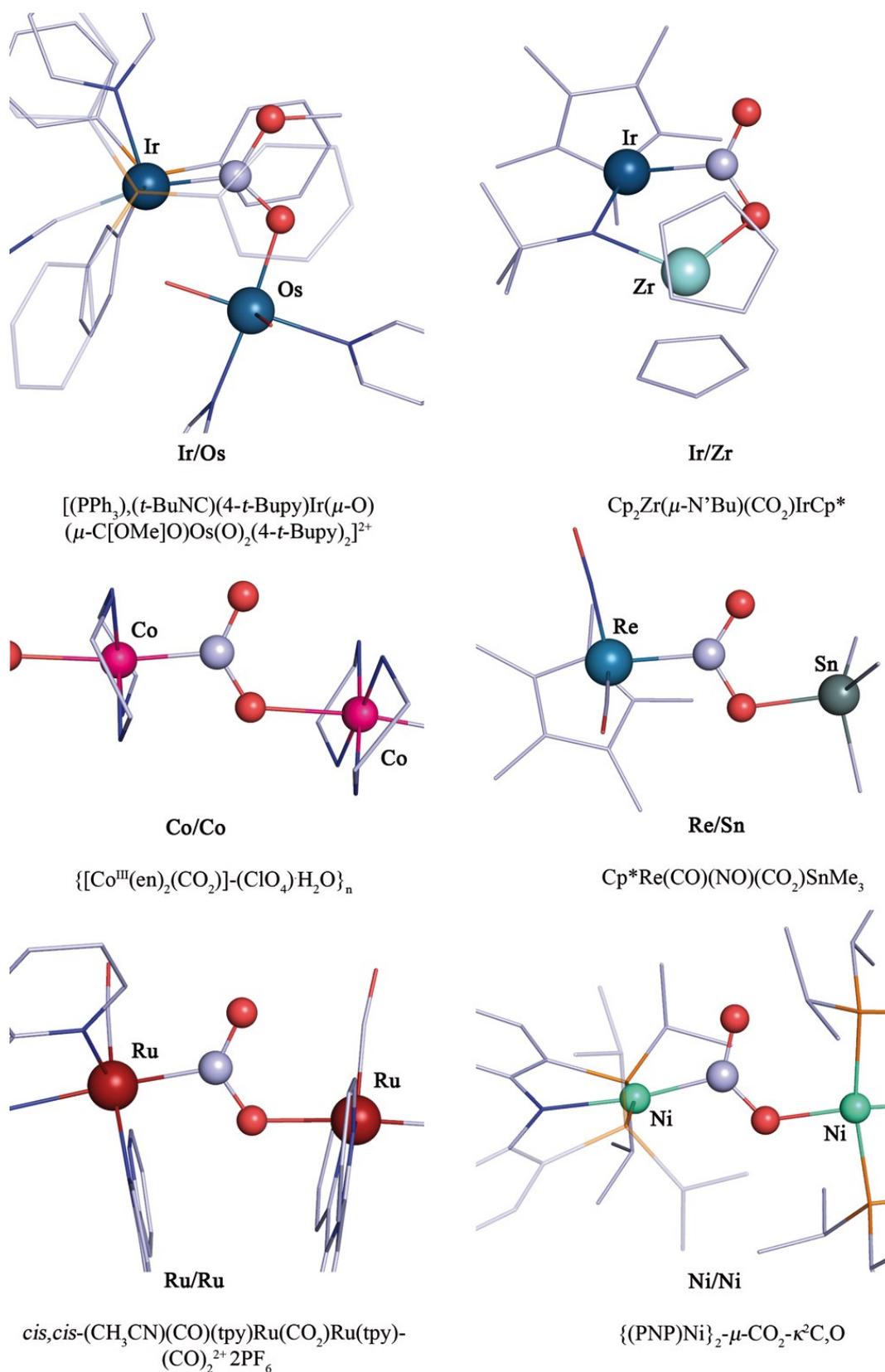


Abbildung A1: Strukturen verschiedener Metall-Carboxylat-Komplexe des $\mu_2\text{-}\eta^2$ -Koordinationstyps. Kugelstabmodelle einiger in Tab. A1 aufgeführter Verbindungen. Die elementspezifische Farbgebung zeigt Sauerstoff in rot, Kohlenstoff in graublau, Stickstoff in blau und Phosphor in orange. Metallatome sind in weiteren Farben dargestellt. Die zugrundeliegenden Strukturen wurden dem *Cambridge Crystallographic Data Centre* entnommen.

Tabelle A2: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch}.

	- 600 mV + CO ₂	-600 mV + NCO ⁻	- 320 mV
Datensammlung			
Röntgenquelle	Beamline 14.2, BESSY	Beamline 14.2, BESSY	Beamline 14.1, BESSY
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841	0.91841
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten	112.51 Å, 74.88 Å, 71.08 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 111.26^\circ$	112.19 Å, 75.01 Å, 71.15 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 111.22^\circ$	112.51 Å, 74.88 Å, 71.08 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 111.26^\circ$
Reflexe Gesamt / Einzigartig	949,538 / 264,706	823,731 / 223,489	795,720 / 249,305
R _s (%) ^a	5.3 (67.1)	5.9 (67.7)	5.1 (52.7)
Auflösung (Å)	40.77 - 1.03 (1.06 - 1.03)	40.80 - 1.09 (1.13 - 1.09)	40.68 - 1.05 (1.09 - 1.05)
Vollständigkeit (%)	97.9 (88.8)	98.0 (94.6)	97.69 (83.81)
(I)/(σ I)	12.39 (1.71)	12.82 (1.7)	10.44 (1.30)
Strukturverfeinerung			
Auflösungsbereich (Å)	40.77 - 1.03	33.16 - 1.09	40.68 - 1.049
Reflexe (Arbeits- / Testset)	902,074 / 47,464	212,314 / 11,175	236,839 / 12,466
R _{cryst} ($F_o < 4\sigma F_o, F_o$) (%) ^b	9.92 / 15.27	9.78 / 13.63	0.1068 / 0.1318
R _{free} ($F_o < 4\sigma F_o, F_o$) (%) ^b	12.43 / 17.74	12.60 / 16.48	0.1357 / 0.1601
Proteinmoleküle in der ASU	1	1	1
Zahl der Atome			
Protein	4755	4785	4989
Heterogen	25	25	30
Wasser	869	758	761
Clashscore	4.76	2.57	5.57
B-Faktoren (Å ²)			
Durchschnitt / Protein / Wasser / C-Cluster	18.0 / 14.5 / 37.2 / 8.3	16.5 / 13.9 / 33.8 / 7.9	17.50 / 15.00 / 34.10 /
Ramachandran-Statistiken (%)			
Bevorzugt / erlaubt / nicht erlaubt	96.0 / 3.85 / 0.15	96.0 / 3.85 / 0.15	96 / 3.71 / 0.29
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie			
Bindungen (Å)	0.051	0.019	0.174
Winkel (°)	3.69	2.78	2.94

Für die Verfeinerungsstatistiken wurden Friedel-Paare gemischt. Die Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

a) $R_s = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$, wobei i der Anzahl unabhängiger Beobachtungen für den Reflex h entspricht.

b) Der freie R-Faktor (R_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

Tabelle A3: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch}.

	-320 mV + CN ⁻	S2 + Xe *
Datensammlung		
Röntgenquelle	Beamline 14.2, BESSY	Beamline 14.1, BESSY
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.7
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten	111.96 Å, 75.73 Å, 70.98 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 111.11^\circ$	111.95 Å, 75.18 Å, 71.44 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 111.48^\circ$
Reflexe Gesamt / Einzigartig	450,139 / 120,494	142,935 / 33,372
R _s (%) ^a	6.1 (66.3)	7.3 (21.2)
Auflösung (Å)	32.87 - 1.35 (1.40 - 1.35)	40.79 - 2.05 (2.103 - 2.05)
Vollständigkeit (%)	99.1 (92.9)	96.0 (85.3)
(I)/(σI)	13.39 (1.88)	13.15 (5.27)
Strukturverfeinerung		
Modell R/R _{free} Faktor (%) ^b	11.06 / 15.15	13.76 / 19.84
Proteinmoleküle in der ASU	1	1
B-Faktoren (Å ²)		
Durchschnitt / Protein / Wasser / C-Cluster	18.2 / 16.0 / 33.1 / 12.1	22.6 / 21.9 / 31.5 / 54.4
Ramachandran-Statistiken (%)		
Bevorzugt / erlaubt / nicht erlaubt	96.00 / 3.85 / 0.15	96.00 / 3.69 / 0.31
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie		
Bindungen (Å)	0.024	0.021
Winkel (°)	2.46	2.74
ESU (Å) ^c	0.036	0.103

Für die Verfeinerungsstatistiken wurden Friedel-Paare gemischt. *) Friedel-Paare wurden als unabhängige Beobachtungen behandelt.

Die Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

a) $R_s = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$, wobei i der Anzahl unabhängiger Beobachtungen für den Reflex h entspricht.

b) Der freie R-Faktor (R_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

c) Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode [174].

Tabelle A4: Kristallographische Datentabelle für CODH-V_{Ch}.

	S5-as-isolated	S5-reduziert	S5-reduziert Fe-Kante *
Datensammlung			
Röntgenquelle	Beamline 14.1, BESSY	Beamline 14.2, BESSY	Beamline 14.2, BESSY
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841	1.74
Raumgruppe	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
Zellkonstanten	68.34 Å, 227.87 Å, 82.32 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 99.67^\circ$	69.61 Å, 231.63 Å, 82.65 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 101.91^\circ$	69.74 Å, 231.98 Å, 82.80 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 101.89^\circ$
Reflexe Gesamt / Einzigartig	2,677,694 / 393,545	1,029,580 / 280,299	595,871 / 294,404
R _s (%) ^a	7.1 (56.3)	8.5 (52.3)	7.4 (38.2)
Auflösung (Å)	19.97 - 1.5 (1.55 - 1.50)	47.49 - 1.69 (1.75 - 1.69)	47.49 - 2.01 (2.13 - 2.01)
Vollständigkeit (%)	99.91 (99.18)	99.05 (92.07)	87.1 (31.8)
(I)/(σ)	15.64 (2.52)	11.09 (2.35)	8.64 (1.81)
Strukturverfeinerung			
Modell R/R _{free} Faktor (%) ^b	14.77 / 17.86	17.2 / 21.4	
Proteinmoleküle in der ASU	4	4	
B-Faktoren (Å ²)			
Durchschnitt / Protein / Wasser / Hybrid-Cluster	21.0 / 19.3 / 33.8 / 16.5	22.1 / 20.8 / 33.1 / 15.3	
Ramachandran-Statistiken (%)			
Bevorzugt / erlaubt / nicht erlaubt	97.00 / 2.80 / 0.20	97.00 / 2.62 / 0.38	
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie			
Bindungen (Å)	0.026	0.020	
Winkel (°)	2.43	2.15	
ESU (Å) ^c	1.271	0.086	

Für die Verfeinerungsstatistiken wurden Friedel-Paare gemischt oder *) Friedel-Paare wurden als unabhängige Beobachtungen behandelt.

Die Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

a) $R_s = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$, wobei i der Anzahl unabhängiger Beobachtungen für den Reflex h entspricht.

b) Der freie R-Faktor (R_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

c) Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode [174].

Tabelle A5: Kristallographische Datentabelle für CODH-V_{Ch}.

S5-Xe *	
Datensammlung	
Röntgenquelle	Beamline 14.2, BESSY
Wellenlänge (Å)	1.9
Raumgruppe	<i>P2</i> ₁
Zellkonstanten	69.41 Å, 230.05 Å, 82.74 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 101.52^\circ$
Reflexe Gesamt / Einzigartig	311,961 / 83,071
R _s (%) ^a	7.1 (14.4)
Auflösung (Å)	20.00 – 2.5 (2.59 - 2.50)
Vollständigkeit (%)	95.2 (92.9)
(I)/(σ I)	14.67 (7.35)
Strukturverfeinerung	
Modell R/R _{free} Faktor (%) ^b	22.34 / 28.73
Proteinmoleküle in der ASU	4
B-Faktoren (Å ²)	
Durchschnitt / Protein / Wasser / Hybrid-Cluster	22.6 / 22.50 / 9.4 / 24.0
Ramachandran-Statistiken (%)	
Bevorzugt / erlaubt / nicht erlaubt	94.00 / 5.44 / 0.56
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie	
Bindungen (Å)	0.012
Winkel (°)	1.68
ESU (Å) ^c	1.271

*) Friedel-Paare wurden als unabhängige Beobachtungen behandelt.

Die Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

a) $R_s = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$, wobei *i* der Anzahl unabhängiger Beobachtungen für den Reflex *h* entspricht.

b) Der freie R-Faktor (R_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

c) Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode [174].

Tabelle A6: Geometrie des C-Clusters in drei unterschiedlichen Zuständen.

	-600 mV + CO ₂ (d _{min} : 1.03 Å)	-600 mV + NCO ⁻ (d _{min} : 1.08 Å)	-320 mV (d _{min} : 1.05 Å)		-600 mV + CO ₂ (d _{min} : 1.03 Å)	-600 mV + NCO ⁻ (d _{min} : 1.08 Å)	-320 mV (d _{min} : 1.05 Å)
A. Bindungslängen (Å)				B. Bindungswinkel (°)			
Cluster-intern				S-M-S-Winkel			
Ni-S(1)	2.329 ± 0.007	2.309 ± 0.007	2.276 ± 0.008	S(4)-Ni-S(1)	103.4 ± 0.3	102.3 ± 0.3	103.5 ± 0.3
Ni-S(4)	2.198 ± 0.007	2.215 ± 0.007	2.205 ± 0.006	S(4)-Ni-S ^γ (C526)	166.0 ± 0.3	167.2 ± 0.3	164.81 ± 0.3
Fe(1)-S(2)	2.388 ± 0.007	2.383 ± 0.007	2.362 ± 0.006	S(1)-Ni-S ^γ (C526)	90.6 ± 0.2	90.5 ± 0.2	90.4 ± 0.2
Fe(1)-S(3)	2.283 ± 0.006	2.289 ± 0.007	2.301 ± 0.006	S(2)-Fe(1)-S(3)	100.5 ± 0.2	100.6 ± 0.2	99.4 ± 0.2
Fe(1)-S(4)	2.365 ± 0.007	2.382 ± 0.007	2.353 ± 0.006	S(2)-Fe(1)-S(4)	108.8 ± 0.2	108.8 ± 0.2	107.3 ± 0.2
Fe(3)-S(1)	2.282 ± 0.006	2.283 ± 0.006	2.268 ± 0.006	S(3)-Fe(1)-S(4)	119.7 ± 0.3	120.0 ± 0.3	122.3 ± 0.3
Fe(3)-S(2)	2.384 ± 0.007	2.381 ± 0.006	2.344 ± 0.007	S(1)-Fe(3)-S(4)	103.0 ± 0.3	101.7 ± 0.3	102.3 ± 0.3
Fe(3)-S(4)	2.261 ± 0.006	2.261 ± 0.007	2.253 ± 0.006	S(1)-Fe(3)-S(2)	106.5 ± 0.2	107.5 ± 0.2	106.2 ± 0.2
Fe(4)-S(1)	2.312 ± 0.007	2.316 ± 0.007	2.301 ± 0.007	S(2)-Fe(3)-S(4)	112.6 ± 0.2	113.2 ± 0.2	111.4 ± 0.2
Fe(4)-S(2)	2.325 ± 0.006	2.331 ± 0.006	2.304 ± 0.006	S(1)-Fe(4)-S(2)	107.5 ± 0.2	108.1 ± 0.2	106.4 ± 0.2
Fe(4)-S(3)	2.314 ± 0.008	2.334 ± 0.007	2.321 ± 0.007	S(1)-Fe(4)-S(3)	112.7 ± 0.3	113.6 ± 0.3	113.4 ± 0.3
Fe(2B)-S(3)	2.425 ± 0.014	2.507 ± 0.016	2.429 ± 0.015	S(2)-Fe(4)-S(3)	101.5 ± 0.2	100.8 ± 0.2	100.5 ± 0.2
Fe(2A)-S(3)	2.330 ± 0.008	2.262 ± 0.008	2.375 ± 0.008				
Metall-Protein				M-S-M-Winkel			
Fe(1)-S ^γ (C333)	2.227 ± 0.006	2.227 ± 0.006	2.195 ± 0.006	Ni-S(1)-Fe(3)	75.1 ± 0.2	76.7 ± 0.2	76.2 ± 0.2
Fe(2A)-S ^γ (C295a)	2.278 ± 0.021	2.225 ± 0.024	2.042 ± 0.013	Fe(4)-S(1)-Ni	100.2 ± 0.3	100.9 ± 0.27	98.4 ± 0.3
Fe(2B)-S ^γ (C295a)	ND	ND	ND	Fe(4)-S(1)-Fe(3)	71.6 ± 0.2	70.9 ± 0.2	72.5 ± 0.2
Fe(2B)-Ne(H261)	ND	ND	ND	Fe(4)-S(2)-Fe(1)	69.0 ± 0.2	68.8 ± 0.2	70.1 ± 0.2
Fe(2A)-Ne(H261)	2.158 ± 0.023	2.156 ± 0.020	2.061 ± 0.023	Fe(4)-S(2)-Fe(3)	69.6 ± 0.2	69.0 ± 0.2	71.1 ± 0.2
Fe(3)-S ^γ (C446)	2.358 ± 0.006	2.367 ± 0.006	2.337 ± 0.006	Fe(1)-S(2)-Fe(3)	65.1 ± 0.2	65.2 ± 0.2	66.8 ± 0.2
Fe(4)-S ^γ (C476a)	2.326 ± 0.006	2.336 ± 0.007	2.312 ± 0.006	Fe(1)-S(3)-Fe(4)	71.0 ± 0.2	70.3 ± 0.2	70.9 ± 0.2
Ni-S ^γ (C526)	2.111 ± 0.006	2.102 ± 0.006	2.124 ± 0.006	Fe(1)-S(3)-Fe(2B)	92.6 ± 0.5	91.5 ± 0.5	96.6 ± 0.3
				Fe(1)-S(3)-Fe(2A)	89.5 ± 0.2	89.8 ± 0.3	89.0 ± 0.2
				Fe(4)-S(3)-Fe(2B)	83.1 ± 0.4	81.8 ± 0.5	87.1 ± 0.4
				Fe(4)-S(3)-Fe(2A)	115.1 ± 0.3	114.6 ± 0.3	114.2 ± 0.3
				Fe(1)-S(4)-Fe(3)	67.4 ± 0.2	67.1 ± 0.2	68.4 ± 0.2
				Fe(1)-S(4)-Ni	94.1 ± 0.2	94.7 ± 0.3	90.6 ± 0.2
				Fe(3)-S(4)-Ni	78.1 ± 0.2	79.05 ± 0.2	78.0 ± 0.2
Liganden							
Ni-C	1.805 ± 0.031	1.808 ± 0.029	2.405 ± 0.018	Ni-C-O(1)	124.5 ± 2.3	122.9 ± 2.2	-
Ni-OH _x				Ni-C-N			
C-O(1) (CO ₂)	1.298 ± 0.030	1.392 ± 0.030	ND	Ni-C-O(2)	118.0 ± 2.1	121.9 ± 1.9	75.1 ± 0.5
C-N (NCO)				Ni-C=O			
				Ni-OH _x -Fe(2A)			
C-O(2)	1.316 ± 0.030	1.308 ± 0.029	ND	C-O(2)-Fe(2A)	107.9 ± 1.7	107.4 ± 1.6	-
C=O (NCO)				C=O-Fe(2A)			
O(2)-Fe(2A)	2.030 ± 0.018	2.036 ± 0.017	2.197 ± 0.018	O(1)-C-O(2)	117.2 ± 2.6	115.2 ± 2.4	-
OH _x -Fe(2A)							

ND: Nicht determiniert.

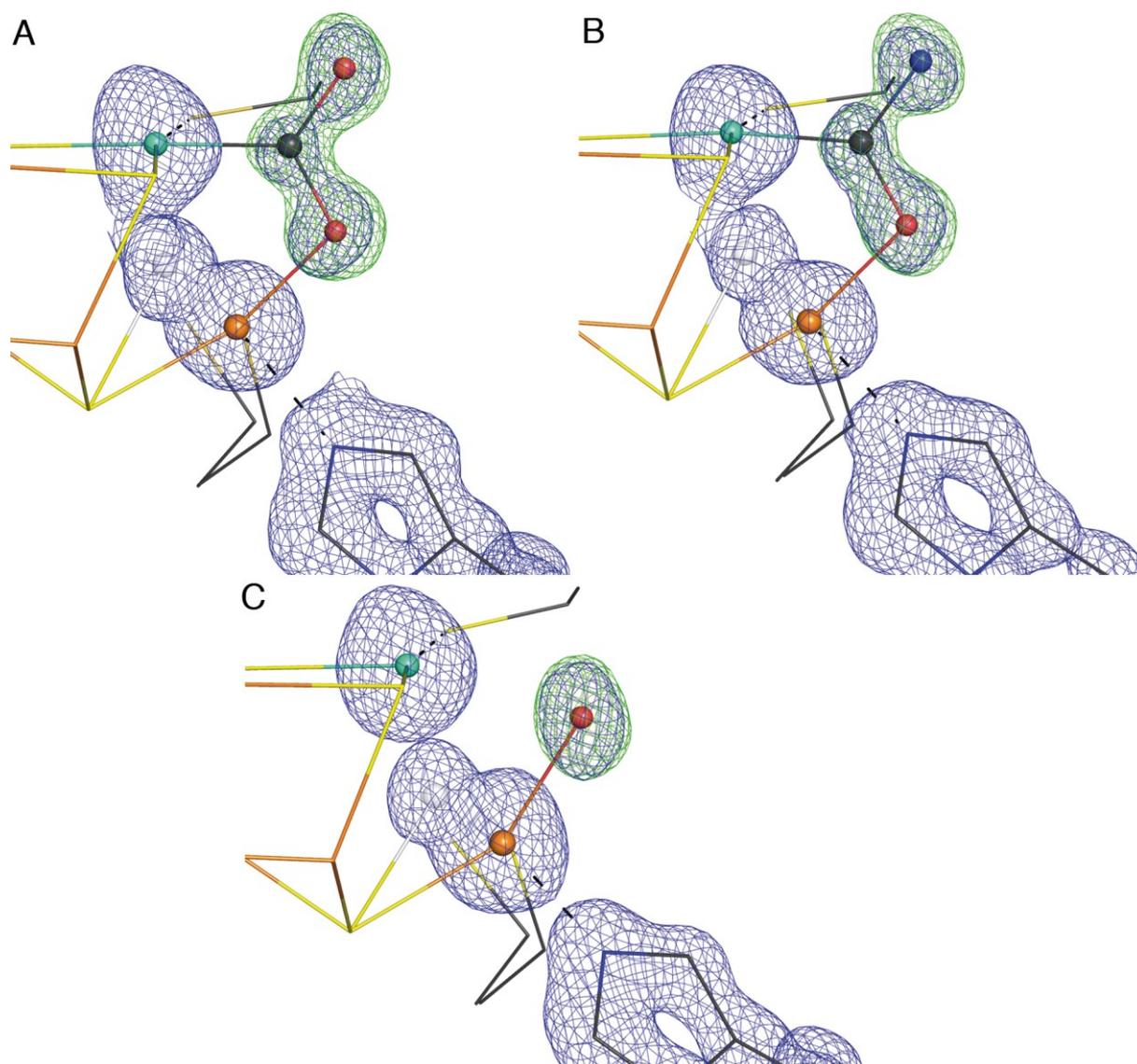


Abbildung A2: Omit-maps der Strukturen von CODH-II_{Ch} bei atomarer Auflösung. A) -600 mV + CO₂-Zustand, B) -600 mV + NCO⁻-Zustand und C) -320 mV-Zustand. Die $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarten wurden für Ni, Fe₂, His295 sowie den jeweiligen Liganden bei einem Konturlevel von 1.75σ (blau) und die *omit*- F_o-F_c -Karten bei 5σ (grün) dargestellt. Die *omit*-Karten wurden durch Auslassen des betreffenden Liganden (CO₂, NCO⁻ bzw. OH_x) aus dem Modell und nachfolgender Verfeinerung in SHELXL-2014 [108] erzeugt.

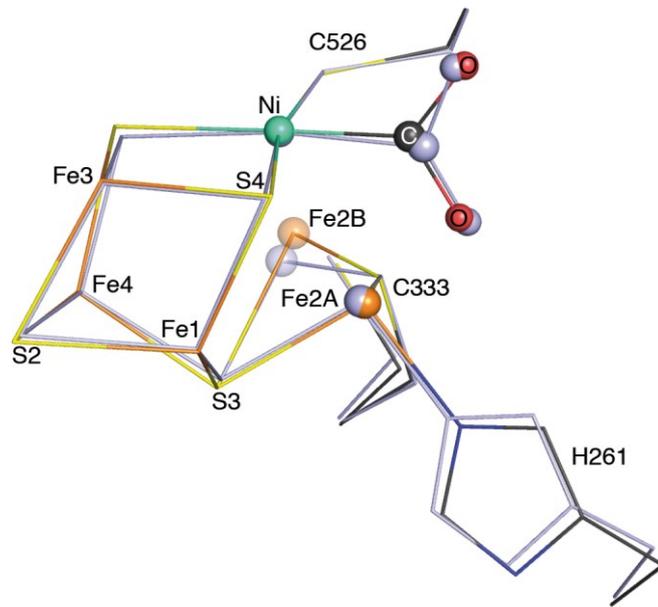


Abbildung A3: Überlagerung der CO₂-gebundene Strukturen bei mittlerer (d_{\min} : 1.5 Å, grau, PDB-ID: 3B52) [71] und atomarer Auflösung (d_{\min} : 1.04 Å, elementfarben).

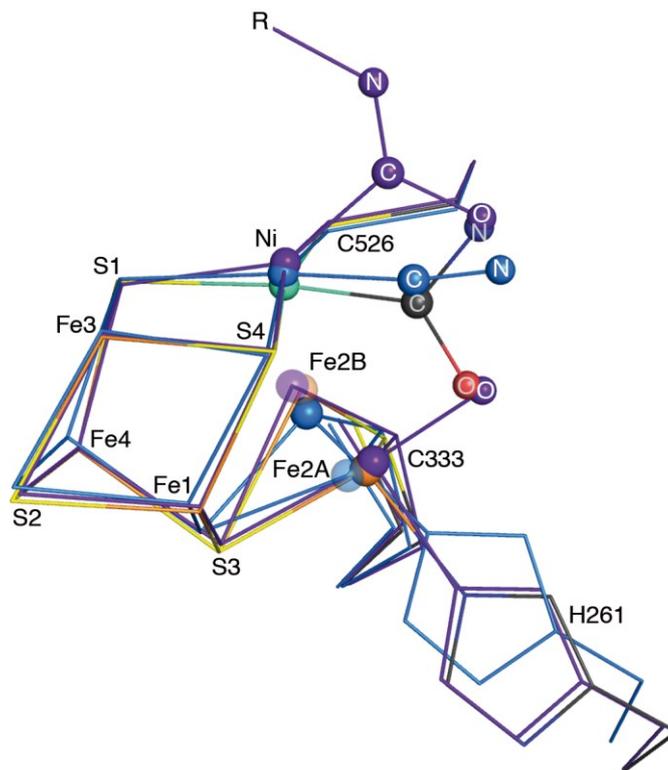


Abbildung A4: Überlagerung von inhibierten und adduktgebundenen Zuständen von CODH-II_{Ch}. Dargestellt sind die Strukturen des -600 mV + NCO⁻-Zustands (elementfarben), des Cyanid-inhibierten (marineblau, PDB-ID: 3I39) [72] und des n-Butylisocyanat-gebundenen Zustands (lila, PDB-ID 2YIV) [74]. Die Strukturen sind als Kugelstabmodelle dargestellt. R= n-Butyl.

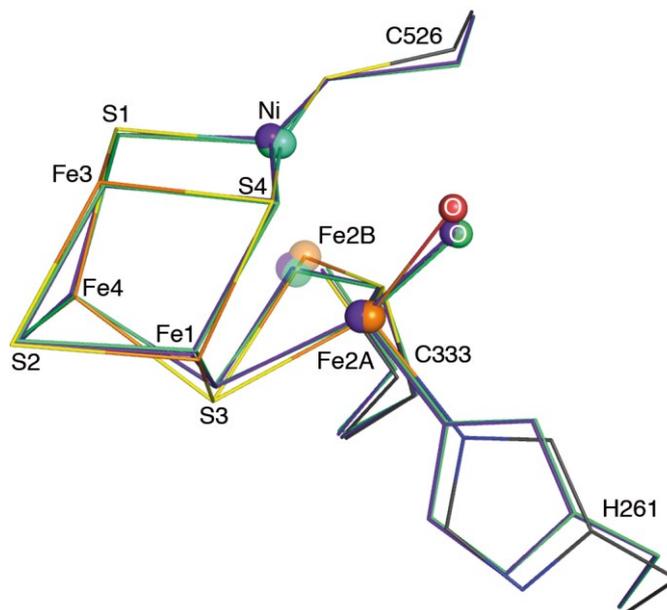


Abbildung A5: Überlagerung der Strukturen von CODH-II_{Ch} bei -600 mV (lila, PDB-ID: 3B51) und -320 mV bei mittlerer (grün, PDB-ID: 3B53) [71] und atomarer Auflösung (elementfarben). Die Distanz zwischen den O-Atomen der einzelnen Strukturen beträgt dabei 0.43 Å (-320 mV, PDB-ID: 3B53) bzw. 0.44 Å (-600 mV, PDB-ID: 3B51).

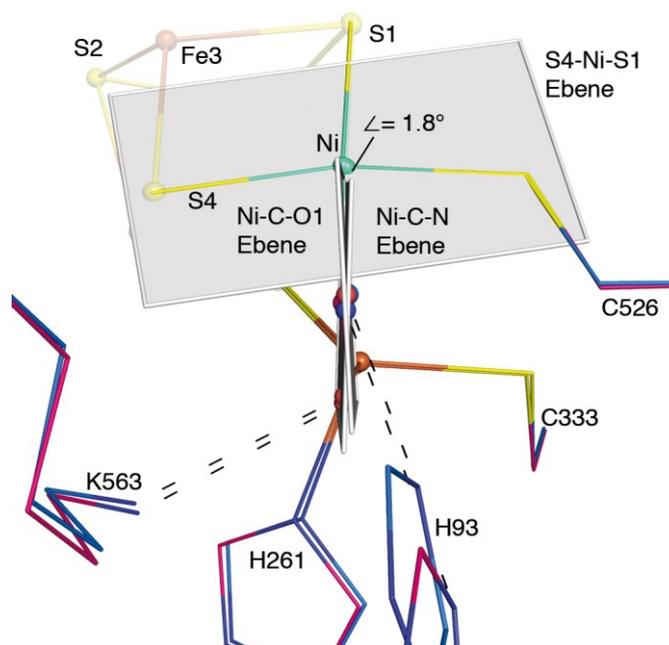


Abbildung A6: Ebenenabweichungsanalysen der CO_2 - und NCO^- -gebundenen Zustände. In der gewählten Perspektive zeigt sich ein Winkel von 1.8° zwischen den ermittelten Ni-C-O1- (für CO_2) und Ni-C-N-Ebenen (für NCO^-). Dabei sind die Kohlenstoffatome der -600 mV + CO_2 -Struktur in blau und die der -600 mV + NCO^- -Struktur in pink dargestellt. Alle anderen Atome wurden elementspezifisch gefärbt.

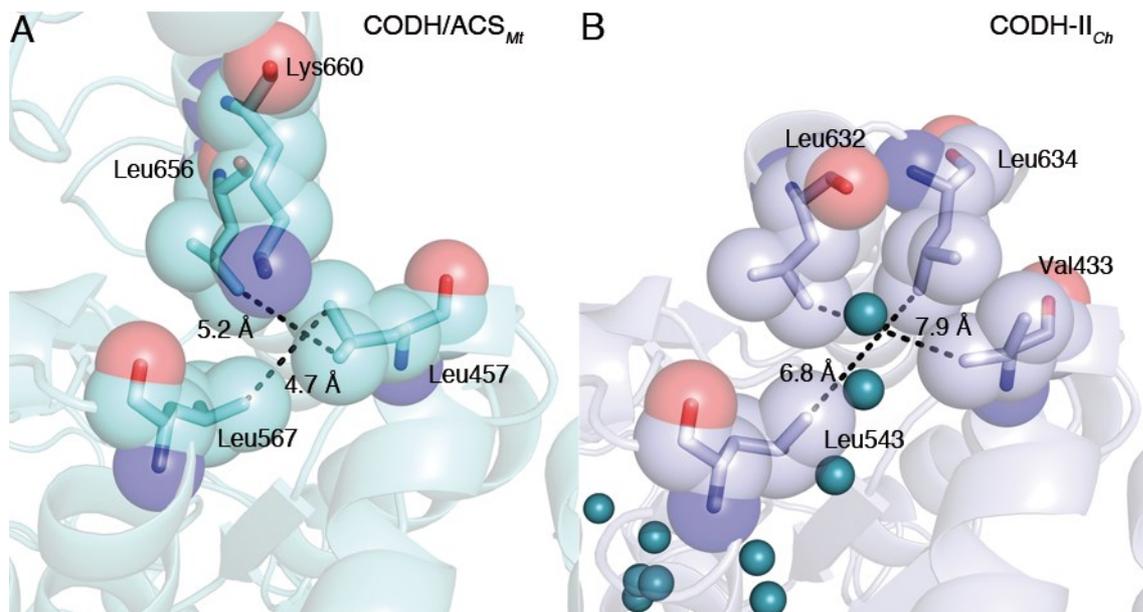


Abbildung A7: Vergleich des Tunneleingangs T1 für CODH/ACS_{Mt} und CODH-II_{Ch}. A) Der Tunneleingang in CODH/ACS_{Mt} wird von drei Leucin-Resten (Leu457, Leu567 und Leu 656) und einem Lysin-Rest (Lys660) verschlossen. Die bereitstehende Öffnung besitzt einen Durchmesser von 4.7 bzw. 5.2 Å. B) Der Tunneleingang in der monofunktionellen CODH-II_{Ch} zeichnet sich durch drei Leucin-Reste (Leu543, Leu632 und Leu634) und einen Valin-Rest (Val433) aus, wobei im Vergleich zu CODH/ACS_{Mt} ein verschließender Rest fehlt. Der Eingang besitzt einen Durchmesser von 6.8 bzw. 7.9 Å und ist deutlich größer als in der bifunktionellen CODH_{Mt}. Das Proteinrückgrat ist als Bändermodell dargestellt (cyan für A bzw. graublau für B) und die relevanten Reste sind als Kugelstabmodell zusammen mit dem van-der-Waals-Radius (transparente Sphären) gezeigt. Xenon-Atome sind für CODH-II_{Ch} als blaugüne Sphären aufgeführt.

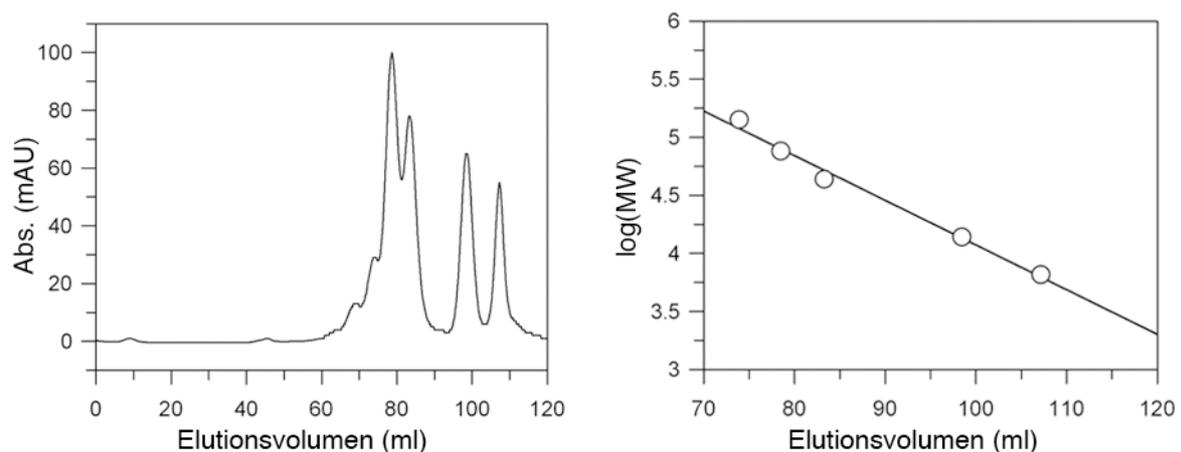


Abbildung A8: Standardkurve zur Bestimmung des Molekulargewichts mittels Gelfiltration. Als Standard wurden 2 mg/ml Laktat-Dehydrogenase (250 kDa), 1 mg/ml Conalbumin (75 kDa), 1 mg/ml Ovalbumin (43 kDa), 1 mg/ml Rnase A (13.7 kDa) und Aprotinin (6.5 kDa) auf eine HiLoad 16/600 Superdex 200 *prep-grade* Gelfiltrationssäule geladen und mit Laufpuffer (50 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaCl) isokratisch eluiert. Links: Chromatogramm des Gelfiltrationslaufs. Rechts: Bestimmung der Standardkurve. Die Gleichung der Ausgleichsgerade wurde zu $\log MW = 7.917 - 0.0385 \cdot V_e$ bestimmt.

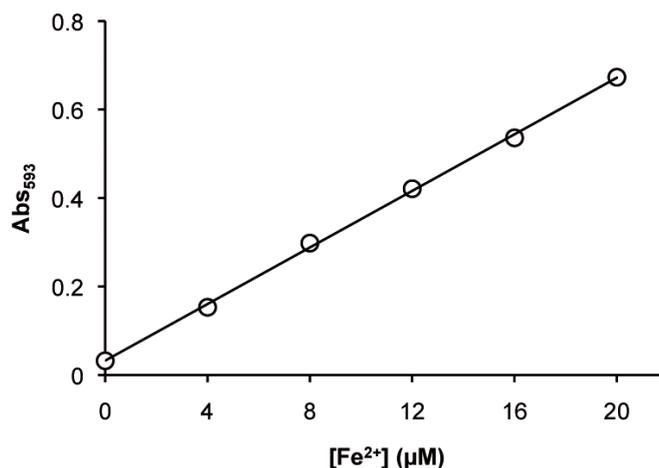


Abbildung A9: Eichgerade zur Bestimmung des nicht-Häm-Eisens (Fe²⁺) nach Fish [115]. Die Gleichung der Ausgleichsgerade wurde zu $\text{Abs}_{593} = 0.0032[\text{Fe}^{2+}] + 0.00324$ bestimmt und besitzt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.9917$.

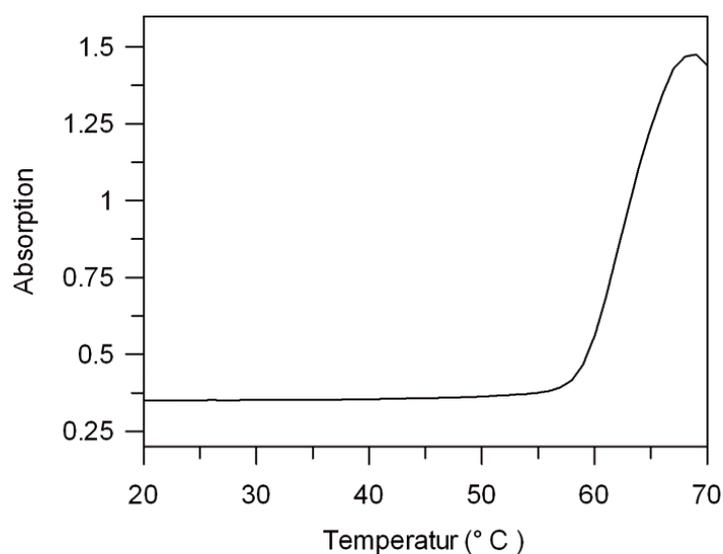


Abbildung A10: Bestimmung der Stabilität von CODH-V_{Ch}. Die Messungen wurden in einer temperierten Küvette mit 10 μM Enzym in Messpuffer (100 mM HEPES (8.0), 100 mM NaCl) bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen. Ab einer Temperatur von 57 °C beginnt CODH-V_{Ch} zu präzipitieren. Das beobachtete Signal stammt dabei hauptsächlich von Streueffekten des eingestrahnten Lichts und wohl nur in geringem Maße von Lösungsmittlexponierten spektral-aktiven Proteinseitenketten.

Tabelle A7: Relevante Bindungslängen und -winkel des Hybrid-Clusters aus *D. vulgaris* im *as-isolated* und reduzierten Zustand. Die Werte wurden aus den Koordinatendateien entnommen (*as-isolated*, PDB-ID: 1W9M und reduziert, PDB-ID: 1OA1) [155, 156].

	Bindungs- länge (Å)		Winkel (°)		Bindungs- länge (Å)		Winkel (°)
Fe1-O1	2.13	Fe1-O1-Fe2	120.5	Fe1-S3	2.34	Fe1-S3-Fe2	122.2
Fe1-O2	2.02	O1-Fe2-S2	139.0	Fe2-S3	2.35	S3-Fe2-S2	105.8
Fe2-O1	1.94	Fe1-O2-Fe3	126.3	Fe3-S3	2.29	Fe1-S3-Fe3	114.0
Fe3-O2	2.04	O2-Fe3-S2	108.8	Fe2-S2	2.29	S3-Fe3-S2	105.5
Fe2-S2	2.43	O2-Fe3-S1	122.9	Fe3-S2	2.35	S3-Fe3-S1	118.1
Fe3-S2	2.32	S1-Fe3-S2	102.6	Fe3-S1	2.28	S1-Fe3-S2	102.8
Fe3-S1	2.27	S1-Fe4-S2	107.9	Fe4-S1	2.21	S1-Fe4-S2	109.1
Fe4-S1	2.18	Fe2-S2-Fe4	83.8	Fe4-S2	2.23	Fe2-S2-Fe4	111.9
Fe4-S2	2.26	Fe3-S1-Fe4	75.2	Fe1-W1	2.78	Fe3-S1-Fe4	74.8
Fe2-O3	2.07	Fe3-S2-Fe4	72.8			Fe3-S2-Fe4	73.2
Fe4-O3	2.20						
Fe2-Sδ-	2.47						
C406							

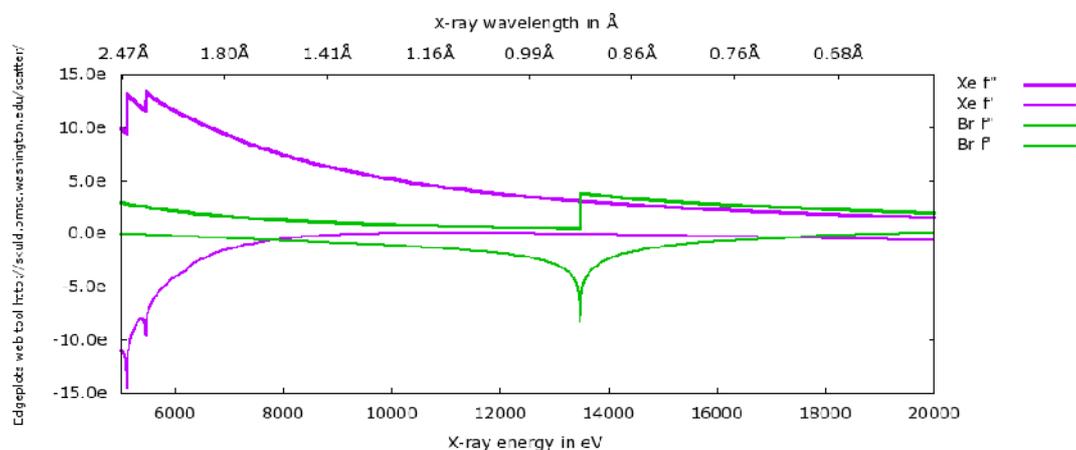


Abbildung A11: Anomale Streukoeffizienten für Xe und Br. Gezeigt sind die Kurven für die Streukoeffizienten f'' und f' in Abhängigkeit der Röntgen-Energie (eV) bzw. Wellenlänge (Å) für Xe (lila) und Br (grün). In der Region um 1.7 bis 1.9 Å, in denen auch die Wellenlänge der anomalen Datensätze für Xe-derivatisierte CODH-II_{Ch} bzw. CODH-V_{Ch} lag, übersteigt das Xe-Signal in seiner Intensität sehr deutlich das Br-Signal. Die Abbildung wurde durch ein Online-Tool auf <http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/> erstellt.

9. Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek für die Bereitstellung des spannenden und herausfordernden Themas bedanken. Es hat mir große Freude bereitet dieses selbständig und eigenverantwortlich zu bearbeiten, jedoch immer auf seine Unterstützung und seine wertvollen Ratschläge zählen zu können.

Mein persönlicher Dank gilt Dr. Jae-Hun Jeoung für die Einführung in die Thematik, das praktische *know-how* und den väterlichen Rat, den er immer für mich übrig hatte. Danke für die vielen Diskussionen wissenschaftlicher und nichtwissenschaftlicher Art, Anregungen und die Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Vielen Dank an Dr. Tobias Werther für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und die Hilfe bei der Lösung von geometrisch-mathematischen Problemen. Auch die hilfreichen Tipps und Tricks rund ums Auto und Fahrrad seien hier erwähnt sowie erfrischende Unterhaltungen politischer und philosophischer Natur.

Dr. Martin Bommer gilt mein Dank für die vielen Messzeiten, die wir zusammen an BESSY und DESY überstanden haben.

Danken möchte ich Dr. Sebastian Götzl für seine grandiose Betreuung und Einführung in die Arbeitsgruppe in meinen Anfangstagen und Dr. Brinda Selvaraj für die großartige Zeit, die wir zusammen im Labor hatten.

Meinen Laborkollegen Berta, Brinda, Christina, Friederike, Gisa, Jae-Hun, Lillith, Martin, Rainer, Sandra, Sabine, Silke, Stefan, Tobias, Tzong-Yuan, Yulia und allen HiWis (Cornelia, Peer, Noam, Stefan und Daniel) danke ich für die freundliche Atmosphäre bei der Arbeit und unsere gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors.

Danke an Barbara Franke für die Unterstützung bei allen verwaltungstechnischen Hürden und Rainer Dietrich für alles!

Abschließend möchte ich meiner Familie für all die Unterstützung danken.

10. Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 10.03.2015

Jochen M. Fessler