

**Wolframabhängige Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR):
Katalytische Eigenschaften und Maturation**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Fabian Arndt (M. Sc.)
aus Hattingen

Marburg/Lahn, im Mai 2020

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2016 bis März 2020 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Johann Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer 1180) als Dissertation angenommen am 20.08.2020

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am 26.08.2020

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:

Arndt F, Schmitt G, Winiarska A, Saft M, Seubert A, Kahnt J, Heider J (2019) Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes. *Front. Microbiol.* 10, 71, 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2019.00071

Schmitt G, Arndt F, Kahnt J, Heider J (2017) Adaptations to a loss-of-Function mutation in the Betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum*: Recruitment of Alternative Enzymes for Anaerobic Phenylalanine Degradation. *J. Bacteriol.* 199:e00383-17, 1-16. doi: 10.1128/JB.00383-17

Weitere Veröffentlichung:

Schmitt G, Saft M, Arndt F, Kahnt J, Heider J (2019) Two Different Quinohemoprotein Amine Dehydrogenases Initiate Anaerobic Degradation of Aromatic Amines in *Aromatoleum aromaticum* EbN1. *J. Bacteriol.* 199:e00281-19, 1-17. doi: 10.1128/JB.00281-19

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Zusammenfassung.....	10
Summary.....	11
Einleitung.....	12
1. Molybdän- und Wolframenzyme.....	12
1.1. Sulfit-Oxidase-Familie.....	12
1.2. Xanthin-Dehydrogenase-Familie.....	12
1.3. Dimethylsulfoxid-Reduktase-Familie.....	13
1.4. Aldehyd-Oxidoreduktase-Familie.....	14
1.5. Wolframabhängige Aldehyd-Oxidoreduktase aus <i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1.....	16
2. Maturation der Pterin-Cofaktoren.....	17
2.1. Die Biosynthese-Gene in <i>A. aromaticum</i> EbN1.....	20
3. Ziele dieser Arbeit.....	20
Material und Methoden.....	22
1. Chemikalien und Enzyme.....	22
2. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	22
2.1. Stämme.....	22
2.2. Plasmide.....	23
2.3. Oligonukleotide.....	25
3. Nährmedien und Puffer.....	27
3.1. Komplexe Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> und <i>Acidovorax</i> sp. JS42.....	27
3.2. Minimal-Medien zur Kultivierung von <i>Acidovorax</i> sp. JS42, <i>Aromatoleum evansii</i> und <i>Aromatoleum aromaticum</i>	28
3.3. Puffer und Lösungen.....	30
3.4. Antibiotika.....	32
4. Mikrobiologische Methoden.....	32
4.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	32
4.2. Kultivierung von <i>Acidovorax</i> sp. JS42.....	32
4.3. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -zellen.....	33
4.4. Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	33
4.5. Transformation von <i>Escherichia coli</i> und <i>Acidovorax</i> sp. JS42 durch Elektroporation.....	33
4.6. Flipase-Rekombination der <i>E. coli moaD</i> -Mutante.....	34

4.7. P1-Transduktion von <i>E. coli</i>	34
4.8. Kultivierung von <i>A. Evansii</i> und <i>A. aromaticum</i>	36
4.9. Konjugation von <i>A. Evansii</i> und <i>A. aromaticum</i>	36
4.10. Stammhaltung.....	37
4.11. Zellernte und Aufschluss.....	37
4.12. Heterologe Expression durch induzierbaren Tetrazyklin-Promotor.....	38
5. Molekularbiologische Methoden.....	38
5.1. Isolierung von Plasmid-DNA.....	38
5.2. Isolierung genomischer DNA.....	38
5.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	39
5.4. Hydrolyse von DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen.....	40
5.5. Agarosegelelektrophorese.....	40
5.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	40
5.7. Ligation.....	41
5.8. Kombinatorische Klonierung.....	41
5.9. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	42
5.10. DNA-Sequenzanalyse.....	42
6. Proteinbiochemische Methoden.....	43
6.1. Heterologe Produktion und Affinitätschromatographie mittels Streptavidin-Tactin.....	43
6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
6.3. <i>Ferguson-Plot</i>	44
6.4. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode.....	44
6.5. Aktivitätstest der Aldehyd-Oxidoreduktase.....	45
6.6. Quervernetzung von Proteinen.....	45
6.7. ICP-MS-Analyse.....	46
6.8. MALDI-TOF-Analyse.....	46
6.9. <i>MicroScale Thermophoresis</i> (MST).....	46
6.10. Elektronen-Paramagnetischer-Resonanz-Spektroskopie (EPR).....	47
6.11. <i>Thermal Shift Assay</i> (TSA).....	47
7. Phylogenetische Analyse.....	47
8. Strukturanalyse von MoeA2 aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.....	48
Ergebnisse.....	49
1. Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium <i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes.....	49
1.1. Zusammenfassung.....	49
1.2. Publikation.....	50
2. Sequenzierung des Promotorbereichs vor dem <i>aor</i> -Operon in <i>A. aromaticum</i>	65
3. pH-Abhängigkeit der AOR.....	65
4. EPR-Analyse der AOR.....	66
5. AOR aus <i>Acidovorax</i> sp. JS42.....	68
6. Heterologe Produktion der AOR aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.....	70

6.1. Expression in <i>Acidovorax</i> sp. JS42.....	70
6.2. Expression in <i>Aromatoleum evansii</i> KB740.....	71
7. Charakterisierung der putativen Maturationsfaktoren MoeA1-3.....	72
7.1. Phylogenetische Analyse.....	72
7.1.1. MoeA1 und MoeA2.....	72
7.1.2. MoeA3.....	74
7.2. Klonierung und Produktion von MoeA1, MoeA2 und MoeA3.....	77
7.3. Molekulare Masse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3.....	78
7.4. Untersuchung des Bindungsverhaltens der Untereinheiten mittels Quervernetzung.....	80
7.5. Untersuchung der Bindungsaffinität zu ausgewählten Oxoanionen.....	81
7.5.1. 7.5.1. Analyse der Element-Zusammensetzung (ICP-MS).....	81
7.5.2. <i>MicroScale Thermophoresis</i> (MST).....	82
7.5.3. <i>Thermal Shift Assay</i> (TSA).....	83
7.6. Untersuchung verschiedener Maturationsfaktoren durch Komplementation von <i>E. coli</i> -Mutanten.....	85
7.6.1. Komplementation einer <i>E. coli moeA</i> -Mutante mit <i>moeA1</i> , <i>moeA2</i> oder <i>moeA3</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1 und <i>Acidovorax</i> sp. JS42.....	85
7.6.2. Komplementierung von <i>E. coli moaD</i> -, <i>moaE</i> - und <i>mogA</i> -Mutanten.....	86
7.6.3. Erstellung einer <i>E. coli ΔmoaD/ΔthiS</i> -Mutante durch Phage P1-Transduktion.....	88
8. Strukturanalyse MoeA2 aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.....	90
Diskussion.....	95
1. Die Aldehyd-Oxidoreduktase aus dem mesophilen Modellorganismus <i>A. aromaticum</i> EbN1.....	95
1.1. Isolierung und Anreicherung der AOR.....	98
2. Charakterisierung von MoeA1, MoeA2 und MoeA3.....	99
2.1. Komplementation der verschiedenen Maturationsfaktoren von ausgewählten <i>E. coli</i> -Mutanten.....	101
2.2. Strukturanalyse von MoeA2 aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.....	102
2.3. Erkenntnisse über die Maturation des W-Cofaktors.....	105
2.4. Ist MoeA3 in der Maturation involviert?.....	109
3. Fazit und Ausblick.....	110
Literaturverzeichnis.....	112
Anhang.....	123
Danksagung.....	132
Lebenslauf.....	133
Erklärung Publikation.....	134
Erklärung.....	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cofaktoren der Molybdän- und Wolframenzyme.	13
Abbildung 2: Struktur der Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) von <i>Pyrococcus furiosus</i>	15
Abbildung 3: Anaerober Abbau von Phenylalanin in <i>A. aromaticum</i> EbN1.	17
Abbildung 4: Die Biosynthese des Mo-Cofaktors in <i>E. coli</i>	19
Abbildung 5: Gen-Region von <i>moeA1</i> , <i>moeA2</i> und <i>moeA3</i>	21
Abbildung 6: Operon und regulatorische Elemente des <i>aor</i> -Operons.	65
Abbildung 7: pH-Abhängigkeit der AOR aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.	66
Abbildung 8: EPR-Spektrum des W(V)-Signals des W-bis-Pterin-Cofaktors.	67
Abbildung 9: EPR-Spektrum der [4Fe-4S]-Zentren der AOR aus <i>A. aromaticum</i>	68
Abbildung 10: Messung der spezifischen Aktivität der AOR aus Extrakt von <i>Acidovorax</i> sp. JS42.	69
Abbildung 11: Aktivität der rekombinant synthetisierten AOR aus <i>A. aromaticum</i> EbN1 in Extrakt von <i>Acidovorax</i> sp. JS42.	70
Abbildung 12: Chromatogramm der Reinigung der AOR von <i>A. aromaticum</i> EbN1 aus Extrakt von <i>A. Evansii</i> KB740.	71
Abbildung 13: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Anreicherung der AOR aus Extrakt von <i>A. Evansii</i> KB740.	72
Abbildung 14: Phylogenetischer Baum von MoeA1 und MoeA2 aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.	73
Abbildung 15: Phylogenetischer Baum von MoeA3 aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.	75
Abbildung 16: Alignment von verschiedenen Protein-Sequenzen der CinA-Familie.	76
Abbildung 17: SDS-PAGE der Anreicherung von MoeA1, MoeA2 und MoeA3.	77
Abbildung 18: Ferguson-Plot-Analyse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3.	79
Abbildung 19: Untersuchung der molekularen Masse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3 mittels Quervernetzung.	80
Abbildung 20: Messung der Thermostabilität von MoeA1, MoeA2 und MoeA3 mit den Oxoanionen Molybdat und Wolframat.	84
Abbildung 21: Komplementation von <i>E. coli</i> Δ <i>moeA</i> Mutanten mit homologen <i>moeA</i> -Genen von <i>A. aromaticum</i> EbN1 und <i>Acidovorax</i> sp. JS42.	86
Abbildung 22: Komplementation von <i>E. coli</i> Δ <i>moaD</i> -, Δ <i>moaE</i> - und Δ <i>mogA</i> -Mutanten mit homologen <i>moeA</i> -Genen von <i>A. aromaticum</i> EbN1.	87
Abbildung 23: Überprüfung der Deletion von <i>thiS</i> bei der <i>E. coli</i> -Doppelmutante Δ <i>moaD</i> / Δ <i>thiS</i>	89
Abbildung 24: Agar-Überschichtungstest der FdhH-Aktivität der Doppelmutante.	90
Abbildung 25: Struktur von MoeA2 aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.	92
Abbildung 26: Sequenz von MoeA2 mit Sekundärstruktur.	93
Abbildung 27: Struktur mit Sekundärstruktur von MoeA2 aufgeteilt auf die einzelnen Domänen. Dargestellt sind Domäne 1 bis 4 (A-D). Die Sekundärstrukturen sind korrespondierend zur Sequenz markiert (s. Abb. 26).	94
Abbildung 28: Schema der Bifurkation zur Reduktion des Aldehyds zur Carbonsäure.	98
Abbildung 29: Vergleich zwischen Sequenzen und Strukturen von MoeA aus verschiedenen Prokaryoten.	103
Abbildung 30: Das PGxPV-Motiv in MoeA2 von <i>A. aromaticum</i> EbN1.	105
Abbildung 31: Genanordnung von <i>moeA</i> im Genom von <i>E. coli</i> , <i>A. aromaticum</i> und <i>S. thioaurini</i>	107
Abbildung 32: Die in dieser Arbeit verwendeten Protein- und DNA-Größenstandards.	126
Abbildung 33: Plasmidkarte von pASG-IBA105mob-AORshort-EbN1.	127
Abbildung 34: Plasmidkarte von pASG5-moeA1-EbN1.	128
Abbildung 35: Plasmidkarte von pASG5-moeA2-EbN1.	129
Abbildung 36: Plasmidkarte von pASG-IBA103-moeA3-EbN1.	130
Abbildung 37: Anreicherung der AOR aus <i>A. aromaticum</i> EbN1.	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme.	22
Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	23
Tabelle 3: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.	25
Tabelle 4: Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> und <i>Acidovorax</i> sp. JS42.	27
Tabelle 5: Nitratreduziere-Medium (NM) für <i>Acidovorax</i> sp. JS42, <i>A. evansii</i> und <i>A. aromaticum</i>	28
Tabelle 6: Puffer-Systeme und weitere Supplemente.	28
Tabelle 7: Zusammensetzung Vitamin- und Spurenelementlösungen.	29
Tabelle 8: C-Quelle für Kultivierung in NM-Medium. Für Festmedien wurde ausschließlich Na-Benzoesäure verwendet.	29
Tabelle 9: Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika mit Konzentration der Stammlösung.	32
Tabelle 10: Ansatz für die PCR.	39
Tabelle 11: Programm der PCR.	40
Tabelle 12: Ansatz zur Ligation Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau.	41
Tabelle 13: Ansätze der zwei Schritte durch kombinatorisches Klonieren mit dem Stargate®-System.	42
Tabelle 14: Zusammensetzung der Nativ-Gele.	44
Tabelle 15: Analyse des Bindungsverhaltens der Oxoanionen Molybdat und Wolframat mit MoeA1, MoeA2 und MoeA3 mittels ICP-MS.	81
Tabelle 16: Dissoziationskonstante (K_d) und Assoziationskonstante (K_a) der Proteine MoeA1 und MoeA2 gegenüber den Oxoanionen Molybdat, Wolframat oder Selenat.	82
Tabelle 17: Zusammenfassung der Kristallisationsdaten und der <i>Refinement</i> -Statistik.	91
Tabelle 18: Die für die phylogenetische Analyse von MoeA1 und MoeA2 verwendeten Protein-Sequenzen mit Accession number.	123
Tabelle 19: Die für die phylogenetische Analyse von MoeA3 verwendeten Protein-Sequenzen mit Accession number.	124
Tabelle 20: Element-Analyse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3 nach Inkubation mit den Oxoanionen Wolframat, Molybdat und Selenat.	126
Tabelle 21: Pyrophosphatase-Aktivität von MoeA1-3 aus <i>A. aromaticum</i> mit FAD als Substrat mittels Fluoreszenz.	131

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. aromaticum</i>	<i>Aromatoleum aromaticum</i>
AHT	Anhydrotetrazyklin
AOR	Aldehyd-Oxidoreduktase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
cPMP	zyklisches Pyranopterin-Monophosphat
DAP	Diaminopimelinsäure
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae, et alia;</i> und andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
HABA	2-[4'-Hydroxy-Benzoazo]-Benzoessäure
HEPPS	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Propansulfonsäure
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
MCD	Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid-Cofaktor
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-Ethansulfonsäure
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid-Cofaktor
Mo-Co	Molybdän-Cofaktor
MPT	Molybdopterin (oder Metallopterin)
NAD	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotin-Amid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	Optische Dichte
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PDH	Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-qPCR	quantitative <i>Real-time</i> Polymerase-Ketten-Reaktion
SAM	S-Adenosylmethionin
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tup	Tungsten uptake
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
W-Co	Wolfram-Cofaktor

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

Zusammenfassung

Wolframenzyme sind in den Domänen der *Archaea* und *Bacteria* zahlreich vertreten. Gerade archaelle Enzyme sind intensiv untersucht worden. In dieser Arbeit wird erstmals eine bakterielle wolframabhängige Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus einem mesophilen Bakterium charakterisiert. Bei der AOR aus *Aromatoleum aromaticum* EbN1 handelt es sich um ein Heterohexamer aus drei Untereinheiten mit einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Konformation. Die AOR besitzt ein breites Substrat-Spektrum mit Benzaldehyd und Phenylacetaldehyd mit den höchsten ermittelten Aktivitäten unter den getesteten Substraten. Die Aktivität kann sowohl mit Benzylviologen als auch mit NAD gemessen werden. Bei Sauerstoff-Exposition bleibt die AOR in Zellextrakten für einen Tag stabil und auch in angereicherter Form besteht sie einige Stunden. Dagegen werden Vertreter dieser Enzymfamilie aus *Archaea* schon nach wenigen Minuten Exposition an der Luft inaktiviert. Die Produktion der AOR erfolgte in der Regel in einer *A. aromaticum*-Mutante, die mit Phenylalanin als C-Quelle unter anaeroben Bedingungen kultiviert wurde. In dieser Mutante wurde das Gen für Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (Pdh) deletiert, einem Enzym was im anaeroben Abbau von Phenylalanin involviert ist. Mit der Etablierung einer heterologen Expression in *Aromatoleum Evansii* KB740 wurde die AOR erstmals rekombinant synthetisiert und mittels Affinitätschromatographie angereichert.

Ein wichtiger Schritt in der Maturation von Molybdän- und Wolframenzymen ist die Insertion des Übergangsmetalls in den Cofaktor. Im Genom von *A. aromaticum* sind mit *moeA1*, *moeA2* und *moeA3* drei Gene für putative Maturationsfaktoren vorhanden, die für die Ligation von Molybdän bzw. Wolfram an den Pterin-Cofaktor verantwortlich sein können. Alle drei Genprodukte wurden rekombinant in *E. coli* produziert und charakterisiert. Im Fall von MoeA2 wurde neben der Charakterisierung der Bindungsaffinitäten auch eine Struktur bestimmt. MoeA2 bildet ein Dimer und besitzt Bindungsaffinität zu Molybdat und Wolframat. Hingegen bildet das rekombinant produzierte MoeA1 kein Dimer und die Untersuchung der Bindungsaffinitäten konnte noch nicht abgeschlossen werden. Das dimere Protein MoeA3 scheint aufgrund fehlender Sequenzmotive und von Sequenzanalysen zu den ADP-Ribose-Pyrophosphatasen zu gehören. Diese Familie ist an der Regeneration von NAD beteiligt. In Komplementationsversuchen mit *E. coli*-Mutanten, in denen verschiedene Gene für Synthese-Enzyme des Cofaktors deletiert sind, zeigten verschiedene Synthese-Enzyme aus *A. aromaticum*, dass sie die Biosynthese des Cofaktors wiederherstellen, was anhand der Aktivität des Molybdänenzym Formiat-Dehydrogenase H (FdhH) gezeigt wurde.

Summary

Tungstoenzymes are abundant among *Archaea* and *Bacteria*. The best-characterized are enzymes from *Archaea*. This thesis presents the characterization of a tungsten-containing aldehyde oxidoreductase (AOR) from a mesophilic bacterium for the first time. AOR from *Aromatoleum aromaticum* EbN1 forms a heterohexamer of three subunits in a $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ conformation. It shows a broad substrate spectrum with benzaldehyde and phenylacetaldehyde as the best tested substrates. The activity was measured with benzylviologen and NAD as well. AOR shows stability in cell extracts under oxygen exposure and pure enzyme still shows activity after hours. In contrast, AORs from *Archaea* lose their activity under oxygen exposure in a few minutes. Usually the AOR was purified from cells of an *A. aromaticum* mutant which lacks the phenylacetaldehyde dehydrogenase (Pdh) and overproduce the AOR under nitrate reducing conditions with phenylalanine as sole carbon source. As alternative, recombinantly produced AOR was purified from *Aromatoleum evansii* KB740 cells by affinity chromatography.

The ligation of the transition metal to the cofactor is an important step in maturation of molybdenum and tungsten enzymes. With *moeA1*, *moeA2* and *moeA3* three putative maturation factors are coded in the genome, which are related to the ligation of the metal to the pterine cofactor. All three gene products were recombinantly produced in *E. coli* and biochemically characterized. Additionally, the MoeA2 protein was structural analyzed. The protein MoeA2 forms a dimer and shows affinity to molybdate and tungstate as well. MoeA1 do not form a dimer and do not show affinity to W or Mo. The shorter MoeA3 forms a dimer and, based on sequence analysis, MoeA3 appears to be a putative ADP ribose pyrophosphatase. Complementation studies with different *E. coli* deletion mutants of genes, which are involved in the cofactor maturation, show that corresponding synthetic enzymes from *A. aromaticum* rescue the pterine cofactor biosynthetic pathway and recover activity of the molybdenum-dependent formate dehydrogenase H (FdhH).

Einleitung

1. Molybdän- und Wolframenzyme

In allen Domänen des Lebens sind Molybdänenzyme zu finden. Dagegen sind Wolframenzyme bisher nur aus *Archaea* und *Bacteria* bekannt. Die Molybdän- und Wolframenzyme werden in die Sulfit-Oxidase-Familie, Xanthin-Dehydrogenase-Familie, DMSO-Reduktase-Familie und die Aldehyd-Oxidoreduktase-Familie unterteilt. (Übersicht in Iobbi-Nivol und Leimkühler, 2013; Bevers *et al.*, 2009). Sie sind bedeutend für die globalen Nährstoff-Zyklen und sind vor allem an Hydroxylierung und Oxo-Transfer-Reaktionen beteiligt (Hille, 2002; Hille *et al.*, 2014). Das Übergangsmetall bildet zusammen mit einem trizyklischen Pterin den Cofaktor. Doch variiert die Anzahl der Pterine zwischen einem und zwei je nach Enzymfamilie. Die Pterin-Reste sind darüber hinaus bei den Enzymen der DMSO-Reduktase-Familie und der Xanthin-Dehydrogenase-Familie mit den Dinukleotiden Guanosin bzw. Cytidin modifiziert.

1.1. Sulfit-Oxidase-Familie

Bei der Sulfit-Oxidase-Familie (SOX) liegt der Cofaktor in der einfachsten Form vor. Durch Ligation von Molybdän mit dem Molybdopterin wird der Molybdän-Molybdopterin (Mo-MPT) gebildet (s. Abb. 1). Der Mo-Co wird von einem Cystein im Protein koordiniert und liegt im oxidierten Enzym als *di-oxo*-Form ($\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2$) vor. Die Vertreter dieser Familie transferieren ein Sauerstoff-Anion zwischen Wasser und einem Substrat. Ein bekanntes Enzym dieser Familie ist die humane Sulfit-Oxidase. Die Sulfit-Oxidase ist ein heterodimeres Metallohemoprotein mit Protohäm als prosthetische Gruppe (Cohen *et al.*, 1971). Diese katalysiert die Oxidation von Sulfit zu Sulfat im inneren der Mitochondrien-Membran. Bei Unterfunktion oder als *knock-out*-Mutation wird Sulfit angereichert und dies führt zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoff-Spezies und Abnahme des ATP-Spiegels in der Zelle (Zhang *et al.*, 2004). Diese Aberration führt zu einer neurodegenerative Erkrankung, die schon im frühen Kindesalter letal ist (Tan *et al.*, 2005).

1.2. Xanthin-Dehydrogenase-Familie

Bei der Xanthin-Dehydrogenase-Familie (XDH) liegt der Cofaktor modifiziert als Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD) vor. Das Molybdän ist koordiniert an der Dithiolen-Gruppe und ein Sauerstoff-Atom oder ein Schwefel-Atom dienen als zusätzliche Liganden am Molybdän ($\text{Mo}^{\text{VI}}\text{OS}(\text{OH})$) (s. Abb. 1).

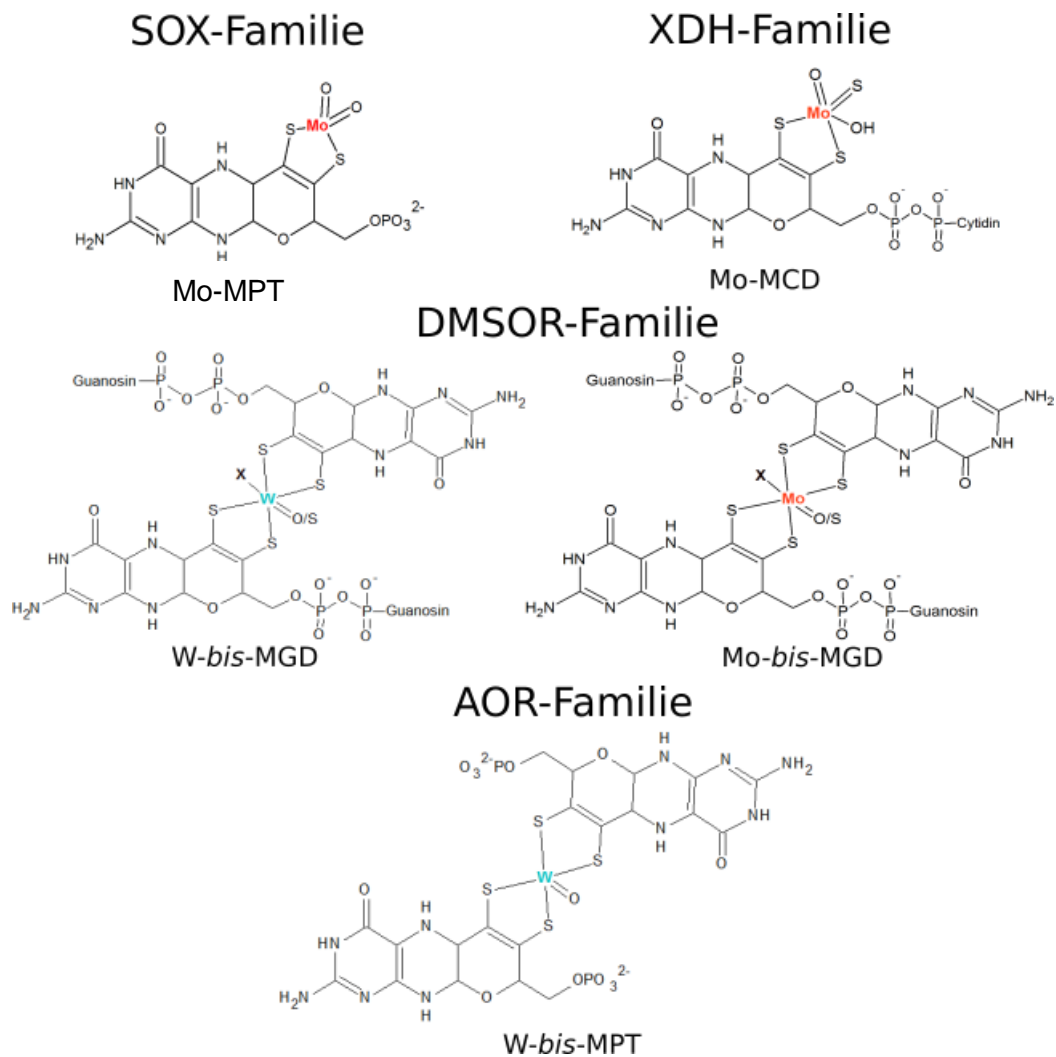


Abbildung 1: Cofaktoren der Molybdän- und Wolframenzyme. In der Sulfit-Oxidase(SOX)-Familie wird der Mo-MPT als Cofaktor verwendet. In der Xanthin-Dehydrogenase(XDH)-Familie ist der Mo-MCD vorhanden. Die Vertreter der Dimethylsulfoxid-Reduktase(DMSOR)-Familie besitzen als Cofaktor entweder Mo-bis-MGD oder W-bis-MGD. In der Aldehyd-Oxidoreduktase(AOR)-Familie liegt als Cofaktor der W-bis-MPT vor.

Diese Enzyme sind typischerweise an Zwei-Elektronen-Übergängen bei Hydroxylierungen von heterozyklischen Aromaten oder Aldehyden beteiligt (Übersicht in Hille *et al.*, 2014). Innerhalb dieser Familie lassen sich Enzyme mit unterschiedlicher Funktion finden, unter anderem die bovine Xanthin-Dehydrogenase, die CO-Dehydrogenase, die im Abbau von CO unter aeroben Bedingungen beteiligt ist, und verschiedene prokaryotische und eukaryotische Aldehyd-Oxidoreduktasen (Enroth *et al.*, 2000; Jacobitz und Meyer, 1989; Übersicht in Hille *et al.*, 2014) Ein gut untersuchtes Enzym ist die heterotrimere Aldehyd-Oxidoreduktase PaoABC von *Escherichia coli*. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von verschiedenen Aldehyden zu den korrespondierenden Carbonsäuren. Der Komplex besteht aus der großen katalytisch aktiven Untereinheit PaoC mit dem MCD-Cofaktor, der FAD-Untereinheit PaoB und der Elektronentransfer-Untereinheit mit zwei [2S-2Fe]-Zentren (Neumann *et al.*, 2009).

1.3. Dimethylsulfoxid-Reduktase-Familie

Bei der Dimethylsulfoxid-Reduktase-Familie (DMSOR) ist das Übergangsmetall an zwei Pterin-Reste koordiniert und das Pterin liegt als Molybdopterin-Guanosin-Dinukleotid (MGD) vor, was zusammen den typischen Mo-*bis*-MGD-Cofaktor ergibt (s. Abb. 1). Sowohl Molybdän- und einige Wolframenzyme mit unterschiedlicher Funktion werden in dieser Familie zusammengefasst (Hille *et al.*, 2014). Das Metallzentrum wird durch die beiden Dithiolen-Gruppen der beiden Pterine koordiniert und als zusätzlicher Ligand liegt entweder ein Sauerstoff-Atom oder ein Schwefel-Atom vor (Raaijmakers und Romão, 2006). Als sechster Ligand können Serin, Cystein, Selenocystein, Aspartat, Hydroxyl-Gruppen oder Wasser dienen ($\text{MPT}_2\text{-Mo}^{\text{VI}}\text{O(X)}$, mit X als sechsten Ligand) (Übersicht in Iobbi-Nivol und Leimkühler, 2013). Innerhalb dieser Familie sind verschiedene Enzyme mit unterschiedlichen Substratspezifika zu finden. Unter anderem befinden sich darunter die namensgebende DMSO-Reduktase, Formiat-Dehydrogenase, Acetylen-Hydratasen, die dissimilatorische Nitrat-Reduktase als auch die Ethylbenzol-Dehydrogenase (Übersicht in Hille *et al.*, 2014). Viele der Wolframenzyme sind dabei innerhalb der Gruppe der Formiat-Dehydrogenasen (FDH) zu finden. Generell katalysieren diese Enzyme die reversible Oxidation von Formiat zu Kohlenstoffdioxid (Maia *et al.*, 2015). Die FDH von *Desulfovibrio gigas* ist ein Heterodimer und besitzt einen W-*bis*-MGD-Cofaktor (Almendra *et al.*, 1999). Die große katalytische Untereinheit besitzt den W-*bis*-MGD-Cofaktor und ein [4Fe-4S]-Zentrum und die kleine Untereinheit besitzt drei [4Fe-4S]-Zentren (Raaijmakers *et al.*, 2002). Als weiterer Vertreter mit W-*bis*-MGD-Cofaktor werden auch die Acetylen-Hydratasen in dieser Familie zusammengefasst (Bever *et al.*, 2009; Seiffert *et al.*, 2007). Dieses Enzym wurde erstmals aus *Pelobacter acetylenicus* beschrieben und katalysiert die Hydratisierung von Acetylen zu Acetaldehyd (Schink, 1985; Rosner und Schink, 1995).

1.4. Aldehyd-Oxidoreduktase-Familie

In dieser Familie sind bisher fast ausschließlich Wolframenzyme zu finden. Ebenso wie bei der DMSOR-Familie wird das Metall von zwei Pterinen koordiniert, aber diese werden nicht modifiziert, sodass der Cofaktor als W-*bis*-MPT in diesem Enzym vorliegt (Chan *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1999) (s. Abb. 1). Die bisher untersuchten Enzyme dieser Familie kommen vor allem aus hypertermophilen *Archaea* (Kletzin und Adams, 1996). Die AOR-Familie kann in mehrere Subfamilien unterteilt werden. Alleine von *Pyrococcus furiosus* sind fünf verschiedene Enzyme beschrieben worden, die jeweils zu separaten Subfamilien von Wolframenzymen gehören. Die

fünf Enzyme sind die Aldehyd-Oxidoreduktasen im engeren Sinne (AOR), die Formaldehyd-Oxidoreduktasen (FOR), die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Oxidoreduktasen (GAPOR) sowie die wolframabhängigen Oxidoreduktasen WOR4 und WOR5.

Die archaeelle AOR ist ein Homodimer mit je einem Wolfram-Cofaktor (W-Co) und einem [4Fe-4S]-Zentrum. Zwischen den Monomeren ist ein Fe-Ion lokalisiert (Chan *et al.*, 1995) (s. Abb. 2). Die AOR besitzt ein breites Substrat-Spektrum und hat ein Temperatur-Optimum von 80°C (Mukund und Adams, 1991).



Abbildung 2: Struktur der Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) von *Pyrococcus furiosus*. Diese AOR ist ein Homodimer und besitzt ein W-bis-MPT (W-Atom, lila) und [4Fe-4S]-Zentrum. Zwischen den Monomeren ist ein Fe-Atom lokalisiert. Struktur wurde in dem Artikel Chan *et al.* (1995) publiziert.

Die FOR ist ein Homotetramer, das verschiedene C1-C3-Aldehyde oxidiert (Roy *et al.*, 1999). Die GAPOR ist ein Monomer mit einem W-Co und einem [4Fe-4S]-Zentrum und oxidiert Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphglycerat mit Ferredoxin als Elektronenakzeptor und ist im modifizierten Embden-Meyerhof-Abbauweg involviert (Mukund und Adams, 1995). Bei den beiden wolframabhängigen Enzymen WOR4 und WOR5 ist die physiologische Rolle bisher ungeklärt. Beide sind Homodimere mit einem W-Co und einem [4Fe-4S]-Zentrum pro Untereinheit (Roy und Adams, 2002; Bevers *et al.*, 2005). Aber im Gegensatz zu WOR4, wofür bisher keine Aktivität gefunden worden ist, oxidiert WOR5 ähnlich wie die AOR verschiedene Aldehyde zu den korrespondierenden Carbonsäuren (Bevers *et al.*, 2005).

Innerhalb der AOR-Familie sind weitere Vertreter aus Bakterien näher untersucht worden. Die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Oxidoreduktase (GOR, vormals XOR) aus dem thermophilen Cellulose-Verwerter *Caldicellulosiruptor bescii* oxidiert wie die GAPOR aus Archaeen Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat mit Ferredoxin als Elektronenakzeptor, aber

besteht aus zwei Untereinheiten in einer $\alpha_4\beta_4$ -Anordnung (Scott *et al.*, 2015, Scott *et al.*, 2019). In der großen Untereinheit ist ein W-Co und ein [4Fe-4S]-Zentrum koordiniert und in der kleinen Untereinheit sind vier [4Fe-4S]-Zentren koordiniert, wie aus den enthaltenen Sequenzmotiven abzuleiten ist (Scott *et al.*, 2019).

Mit der Benzoyl-CoA-Reduktase (BCR) Klasse II aus *Geobacter metallireducens* ist der bisher größte Vertreter innerhalb der AOR-Familie untersucht worden. Dieses Metalloenzym ist ein multimerer Komplex aus zwanzig Untereinheiten mit einer molekularen Masse von ungefähr 1 MDa und reduziert unabhängig von ATP Benzoyl-CoA zu Dienoyl-CoA mit Ferredoxin als Elektronendonator (Kung *et al.*, 2009; Huwiler *et al.*, 2019). Die Reduktion von Benzoyl-CoA findet an einer heterotetrameren Bam(BC)₂-Domäne statt. Das katalytische Zentrum mit dem W-Co und einem [4Fe-4S]-Zentrum ist in BamB lokalisiert und BamC besitzt drei weitere [4Fe-4S]-Zentren (Weinert *et al.*, 2015).

Viele Aldehyd-Oxidoreduktasen (AOR) aus Bakterien besitzen im Gegensatz zu den Vertretern aus der Domäne der *Archaea* drei Untereinheiten. Die AOR aus *Moorella thermoacetica* ist die erste bakterielle AOR die untersucht worden ist. Sie wurde erst als „Carbonsäure-Reduktase“ (CAR) beschrieben, wurde aber aufgrund der wesentlich stärkeren Fähigkeit, Aldehyde zu den korrespondierenden Carbonsäure zu oxidieren, ebenfalls als Aldehyd-Oxidoreduktase klassifiziert (White *et al.*, 1989; Strobl *et al.*, 1992). Diese AOR besitzt neben dem W-Co und FeS-Zentren einen FAD-Cofaktor und kann NADP als Elektronenakzeptor verwenden (Huber *et al.*, 1995).

Doch sind innerhalb dieser Familie nicht nur Wolframenzyme zu finden. Mit einer putativen α -Hydroxysäure-Oxidoreduktase aus *Proteus vulgaris* und YdhV aus *E. coli* sind zwei orthologe Enzyme mit einem Mo-bis-MPT-Cofaktor beschrieben worden (Trautwein *et al.*, 1994; Reschke *et al.*, 2019). Die physiologische Aufgabe sowie die Substratspezifität sind bei YdhV unbekannt, doch zeigt die Aminosäure-Sequenz eine Identität von ca. 45 % zu der katalytischen Untereinheit der wolframabhängigen BamB aus *Geobacter metallireducens* und der AOR aus *Pyrococcus furiosus* auf (Reschke *et al.*, 2019).

1.5. Wolframabhängige Aldehyd-Oxidoreduktase aus

Aromatoleum aromaticum EbN1

Die AOR aus *A. aromaticum* EbN1 wurde in Proteomstudien in Kulturen identifiziert, die anaerob mit Phenylalanin als C-Quelle kultiviert wurden (Wöhlbrand *et al.*, 2007). Beim

anaeroben Abbau von Phenylalanin entsteht nach Transaminierung und Decarboxylierung als Intermediat Phenylacetaldehyd, was unter anderem durch die AOR oxidiert wird (s. Abb. 3). Doch für die Oxidation von Phenylacetaldehyd steht normalerweise hauptsächlich die spezialisierte Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (Pdh; *ebA4954*) zur Verfügung (Debnar-Daumler *et al.*, 2014).

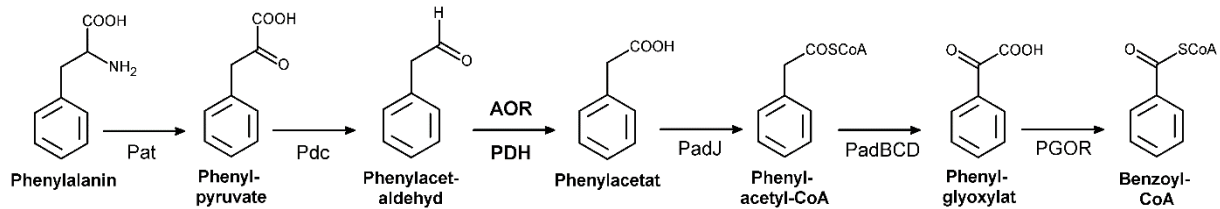


Abbildung 3: Anaerober Abbau von Phenylalanin in *A. aromaticum* EbN1. Abbau von Phenylalanin zu Benzoyl-CoA mittels Phenylalanin-Aminotransferase (Pat; *ebA596*), Phenylpyruvat-Decarboxylase (Pdc; *ebA6545*), Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (Pdh; *ebA4954*), Phenylacetat-CoA-Ligase (PadJ; *ebA5402*), Phenylacetat-CoA:Akzeptor-Oxidoreduktase (PadBCD; *ebA5393-ebA5396*) und Phenylglyoxylat:Akzeptor-Oxidoreduktase (PGOR; *ebA5397-ebA5401*). Die AOR (*ebA5005*) und Pdh (*ebA4954*) oxidieren Phenylacetaldehyd zu Phenylacetat.

In Zellextrakten zeigte sich, dass mit Verwendung von NAD und NADP verschiedene Aldehyde oxidiert wurden (Debnar-Daumler *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu Aldehyd-Dehydrogenasen kann die AOR Benzylviologen (BV) als Elektronenakzeptor verwenden und konnte dadurch einfach identifiziert und aus *A. aromaticum*-Zellextrakt angereichert werden (Heider *et al.*, 1995; Debnar-Daumler *et al.*, 2014). Im Verlauf der Anreicherung der AOR wurde anhand einer Element-Analyse auch die Anreicherung von Wolfram nachgewiesen (Debnar-Daumler *et al.*, 2014). Die AOR besitzt eine Identität von 49 % zu der AOR von *Pyrococcus furiosus* und ist in einem Operon mit fünf verschiedenen Genen organisiert (Debnar-Daumler *et al.*, 2014). Vorerst wurden die Genprodukte beschrieben als Ferredoxin (*ebA5004*) mit vier Cystein-Bindemotiven für [4Fe-4S]-Zentren, als AOR (*ebA5005*), als Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase (*ebA5007*), als Moad (*ebA5008*) und als hypothetisches Protein (*ebA5010*) (Rabus *et al.*, 2005; Debnar-Daumler *et al.*, 2014). Interessanterweise zeigt die Aminosäure-Sequenz des hypothetischen Gens *ebA5010* ebenso einen mehrfachen Glycin-Rest am C-Terminus wie die Moad-Proteine. Im Genom ist ein weiteres *moaD*-Gen in einem Operon zusammen mit *moaE*, *moeA* und *mobB* kodiert (Rabus *et al.*, 2005).

2. Maturation der Pterin-Cofaktoren

Die Biosynthese der verschiedenen Mo-Cofaktoren ist in allen Domänen des Lebens konserviert und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Übersicht in Mendel und Leimkühler, 2015). Der erste Schritt ist die Synthese eines zyklischen Pyranopterin-Monophosphats (cPMP) aus GTP. Die Synthese von cPMP erfolgt in zwei Reaktionsschritten

(Wuebbens und Rajagopalan, 1993; Wuebbens und Rajagopalan, 1995). Hierbei wird bei einer ersten radikalischen Reaktion mit dem SAM-Radikalenzym MoaA das instabile (8S)-3',8-Cyclo-7,8-Dihydroguanosin-5'-Triphosphat gebildet und durch MoaC zu cPMP weiter umgesetzt (Hover *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013) (s. Abb. 4A). Die Einführung der Dithiolen-Gruppe an den C1'- und C2'-Atomen von cPMP wird durch den MPT-Synthase-Komplex, bestehend aus MoaD und MoaE, durchgeführt (Pitterle *et al.*, 1993) (s. Abb. 4B). Das MoaE-Protein bindet das cPMP, und das MoaD-Protein ist der unmittelbare Schwefeldonor mit einer Thiocarboxyl-Gruppe am C-terminalen Glycin (Gutzke *et al.*, 2001). In der Reaktion wird der Pyran-Ring des cPMPs hydrolysiert. Nach dem Transfer des ersten Schwefel-Atoms an das C2'-Atom dissoziiert das erste MoaD. Das zweite Schwefel-Atom wird durch ein zweites MoaD an das C1'-Atom eingebracht und es entsteht das Molybdopterin (MPT) (Daniels *et al.*, 2008; Wuebbens und Rajagopalan, 2003). Die Regeneration der Thiocarboxyl-Gruppe von MoaD wird unter Verwendung von ATP durch MoeB katalysiert (Leimkühler *et al.*, 2001) (s. Abb. 4C). Durch die Bildung einer Acyl-Adenylat-Gruppe wird zunächst das Glycin am C-Terminus von MoaD aktiviert (Lake *et al.*, 2001). In der aktivierten Form kann dann das Schwefel-Atom durch eine Sulfurtransferase eingebracht werden und das regenerierte MoaD, MoeB und AMP dissoziieren (Schmitz *et al.*, 2007). In *E. coli* wurde die Sulfurtransferase IscS als Schwefeldonor für die Regeneration identifiziert. IscS gehört zu den L-Cystein-Desulfurasen, besitzt einen Pyridoxal-5'-Phosphat-Cofaktor (PLP) und katalysiert die Reaktion von Cystein zu Alanin (Übersicht in Yokoyama und Leimkühler, 2015). Das Schwefel-Atom wird durch eine Persulfid-Bindung an dem katalytischen Cystein gebunden (Zheng *et al.*, 1994). Zur weiteren Synthese des Mo-Co wird das MPT zu MPT-AMP adenyliert und anschließend mit dem Molybdän an den beiden Schwefelresten ligiert (s. Abb. 4D). In *E. coli* stehen zur Adenylierung das MogA-Protein und zur Ligation das MoeA-Protein zur Verfügung (Nichols und Rajagopalan, 2002). In *Archaea* und thermophilen Bakterien ist MoaB für die Adenylierung verantwortlich. MoaB-Proteine bilden ein Hexamer, dass bei hohen Temperaturen stabiler ist, wogegen MogA-Proteine ein Trimer bilden (Bever *et al.*, 2008).

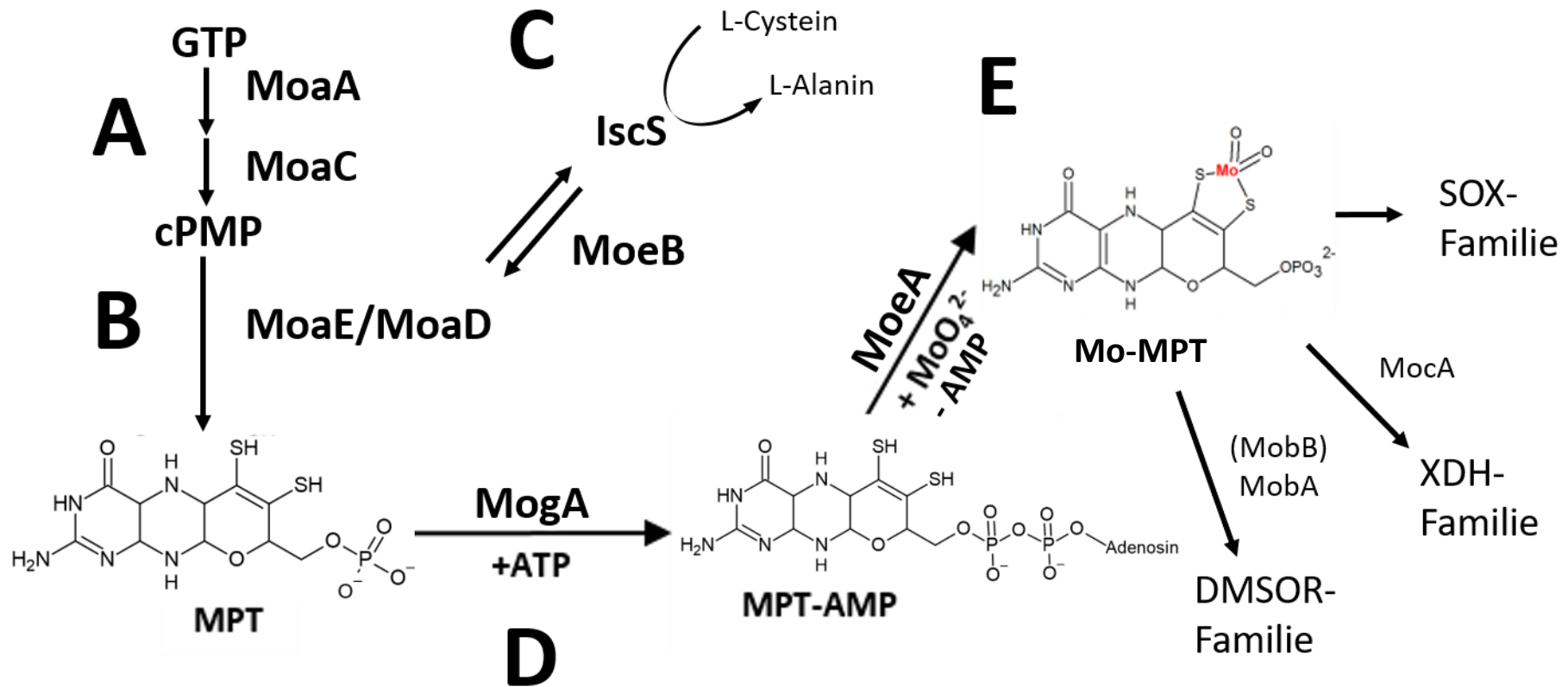


Abbildung 4: Die Biosynthese des Mo-Cofaktors in *E. coli*. **(A)** 5'-GTP wird mittels MoaA und MoaC zu cPMP umgesetzt. **(B)** Die Dithiolen-Gruppe wird durch den MPT-Synthase-Komplex bestehend aus MoaD und MoaE eingebracht und synthetisieren MPT. **(C)** Die Regeneration des Schwefels am C-Terminus von MoaD erfolgt durch MoeB. Als Schwefeldonor dient IscS, das L-Cystein zu L-Alanin umsetzt und den Schwefel als Persulfid am eigenen katalytischen Cystein bindet. **(D)** Das MPT wird durch MogA adenyliert und MoeA ligiert das Molybdän an das MPT und bildet den Mo-MPT. **(E)** Der Mo-MPT ist der Cofaktor, der in Enzymen der SOX-Familie incorporiert vorliegt. Dagegen wird bei der XDH-Familie der Cofaktor durch MocA modifiziert und für die DMSOR-Familie erfolgt die Bildung des MGD-*bis*-Pterin-Cofaktors durch MobA und MobB, wobei MobB hierfür nicht essentiell ist.

Im Gegensatz zu bakteriellen Systemen liegen bei Eukaryoten die beiden Proteine als Fusion vor. Die Molybdän-Insertase Cnx1 aus *Arabidopsis thaliana* und Gephyrin aus *Homo sapiens* bestehen aus einer G-Domäne, die die Adenylierung von MPT katalysiert und einer E-Domäne, die die Ligation des Metalls bei Hydrolyse von MPT-AMP durchführt (Stallmeyer *et al.*, 1995; Stallmeyer *et al.*, 1999; Belaidi und Schwarz, 2015). Der Mo-Co wird für die Enzyme der XDH- oder DMSOR-Familie durch Modifikation mit CTP durch das Enzym MocA zu MCD bzw. durch Modifikation mit GTP mit Hilfe der Enzyme MobA und MobB zu bis-MGD weiter umgesetzt, MobB ist dabei nicht essentiell, beschleunigt aber die Reaktion (Neumann *et al.*, 2009; Temple und Rajagopalan, 2000; McLuskey *et al.*, 2003; Vergnes *et al.*, 2004) (s. Abb. 4E). Aufgrund der Instabilität des bis-MGD-Cofaktors sind zur weiteren Inkorporation in die Zielproteine spezielle Chaperone involviert. Bei der dissimilatorische Nitrat-Reduktase in *E. coli* inkorporiert z.B. das Chaperon NarJ den Cofaktor in das Apo-Enzym (NarGHI) (Blasco *et al.*, 1998).

2.1. Die Biosynthese-Gene in *A. aromaticum* EbN1

Im Genom von *A. aromaticum* EbN1 sind einige Orthologe der Molybdän-Cofaktor-Biosynthese annotiert worden (Rabus *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu *E. coli* sind im Genom von *A. aromaticum* drei Paraloge von *moeA* (*moeA1-3*) und zwei Paraloge von *mobB* (*mobB1-2*) vorhanden. Die Gene der Maturationsfaktoren von *moaA* (*ebaA5430*), *moaC* (*ebaA7189*), *mogA* (*ebaA1027*), *moeA2* (*ebaA1078*) und *moeA3* (*ebaA4355*) liegen verteilt im Genom vor. Dagegen sind die Gene *mobA* (*ebaA2945*) und *mobB2* (*ebaA2950*) in einem zusammenhängenden Cluster kodiert. Das Gen *mobA* wird in einem Operon zusammen mit *fdhD*, das für ein Chaperon zur Maturation der molybdänabhängigen Formiat-Dehydrogenase kodiert, und einem Gen für einen Transkriptionsregulator (*ebaA2947*) flankiert. Gleich dahinter in umgekehrter Leserichtung ist *mobB2* und ein σ^{54} -abhängiger Transkriptionsregulator (*ebaA2951*) kodiert. Ebenfalls in einem Operon liegen die Gene *moaE* (*ebaA6671*), *moaD* (*ebaA6672*), *moeA1* (*ebaA6673*) und das *mobB1* (*ebaA6674*) vor (s. Abb. 5).

3. Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden zwei Hauptfragestellungen verfolgt. Die erste Fragestellung betrifft die Charakterisierung der wolframabhängigen Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus *A. aromaticum* EbN1. Viele der bisher bekannten wolframabhängige Enzyme stammen

vorrangig aus thermophilen oder strikt anaeroben Organismen. Dagegen ist *A. aromaticum* ein mesophiler fakultativ anaerober Organismus, der bei Temperaturen über 30°C nicht wachsen kann. Auch ist die Zusammensetzung aus drei Untereinheiten ungewöhnlich und unterscheidet sich deutlich von den AORs aus *Archaea*, die aus einem Homodimer bestehen.

Die zweite Fragestellung beschäftigt sich mit der Maturation der AOR, aber auch der Maturation von Wolframenzymen im Allgemeinen. Als kritischer Punkt wird die Ligation der Übergangsmetalle untersucht. Im Genom liegen drei mögliche Kandidaten mit *moeA1* (*ebA6673*), *moeA2* (*ebA1078*) und *moeA3* (*ebA4355*) für die Ligation der Übergangsmetalle vor (s. Abb. 5).

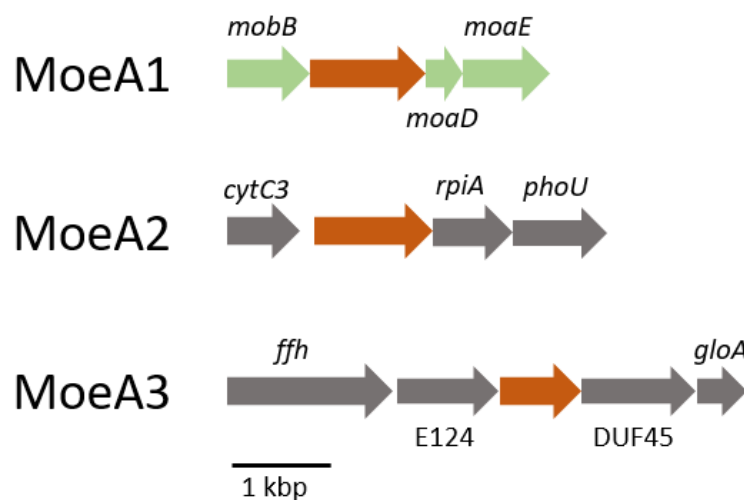


Abbildung 5: Gen-Region von *moeA1*, *moeA2* und *moeA3*. Das Gen *moeA1* (rot) liegt zusammen mit den Genen für die Maturationsfaktoren *mobB*, *moaD* und *moaE* in einem Operon. Das Gen *moeA2* (rot) liegt in einem Gen-Cluster zusammen mit den Genen *cytC3*, *rpiA*, was für eine Ribose-5-Isomerase kodiert und *phoU*, was für ein Protein kodiert, das in der Phosphat-Signaltransduktion involviert ist. Das *moeA3* (rot) wird von Genen flankiert, die für eine putativen Protease (DUF45) und einem putativen Faktor zur Wachstumskontrolle (E124) kodieren. Ebenfalls in dem Cluster enthalten sind *gloA*, ein Gen für die Lactoglutation-Lyase, und *ffh*, was für das *Signal Recognition Protein* (SRP) kodiert. Die Gene, die neben *moeA* an der Maturation beteiligt sind, sind in grün dargestellt.

Es ist unklar welches Paralog den gezielten Einbau von Wolfram vornimmt. Gerade im Hinblick darauf, dass bei Kultivierung von *A. aromaticum* mit Phenylalanin und Nitrat mindestens zwei Molybdänenzyme, nämlich die dissimilatorische Nitrat-Reduktase und die Phenylacetyl-CoA: Akzeptor-Oxidoreduktase (PadBCD) simultan mit der AOR synthetisiert werden, ist es klar, dass der Einbau strikt reguliert werden muss (Debnar-Daumler *et al.*, 2014). Daher werden die möglichen MoeA-Maturationsfaktoren angereichert und auf ihre biochemischen und strukturellen Eigenschaften, besonders auf die Bindungsaffinität mit Molybdän und Wolfram, hin untersucht.

Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität *per analysis* von den Firmen Alpha Aeser (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Gase wurden bezogen von Praxair (Düsseldorf) und Nippon Gases (Düsseldorf). Enzyme stammen von New England Biolabs (Frankfurt), Thermo Fisher Scientific (Dreieich) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim).

2. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.1. Stämme

Tabelle 1: Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (rK-mK ⁺), λ ⁻	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> BL21	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB-mB-) λ [<i>malB+</i>]K-12(λ S)	Studier und Moffatt, 1986
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>hsdr17</i> , <i>endA</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , NxS, integriertes RP4-2 (Tc::Mu, Km,::Tn7), Mobilisatorstamm	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> Δ M15 RP4 1360 Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341</i> ::[<i>erm pir</i>]	Dehio und Meyer, 1997
<i>Escherichia coli</i> JW0768-1 (Δ <i>moaE</i>)	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>moaE</i> 757:: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD- rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i> JW0767-1 (Δ <i>moaD</i>)	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>moaD</i> 756:: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD- rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i> JW0811-1 (Δ <i>moaA</i>)	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>moaA</i> 727:: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD- rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> JW0008-5 (Δ mogA)	F-, Δ mog-729:: <i>kan</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787:: <i>rrnB-3</i> , λ -, <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i> JW3955-2 (Δ <i>thiS</i>)	F, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787:: <i>rrnB-3</i> , λ -, <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, Δ <i>thiS</i> 762:: <i>kan</i> , <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	Wildtyp	Rabus und Widdel, 1995
<i>Aromatoleum aromaticum</i> SR7	Sm ^R	Wöhlbrand und Rabus, 2009
<i>Aromatoleum aromaticum</i> SR7 Δ <i>pdh</i>	Sm ^R , Δ <i>pdh</i> (<i>ebA4954</i>)	Schmitt <i>et al.</i> , 2017
<i>Aromatoleum evansii</i> KB740	Wildtyp	Anders <i>et al.</i> , 1995
<i>Aromatoleum evansii</i> pASG-IBA105mob- AORshort-EbN1	Stamm mit pASG-IBA105mob-AORshort-EbN1	Dominik Hege, Universität Marburg
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	Wildtyp	Haigler <i>et al.</i> , 1994
<i>Acidovorax</i> sp. JS42 SRF	Sm ^R	Diese Arbeit

2.2.Plasmide

Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEntry	Km ^R , ColE1 ori	IBA, Göttingen
pEntry- <i>moeA1</i> -EbN1	Km ^R , <i>ebA6673</i> , ColE1 ori	Diese Arbeit
pEntry- <i>moeA2</i> -EbN1	Km ^R , <i>ebA1078</i> , ColE1 ori	Diese Arbeit
pEntry- <i>moeA3</i> -EbN1	Km ^R , <i>ebA4355</i> , ColE1 ori	Diese Arbeit
pEntry- <i>moeA1</i> -JS42	Km ^R , <i>Ajs_3203</i> , ColE1 ori	Aline Rosin, 2018
pEntry- <i>moeA2</i> -JS42	Km ^R , <i>Ajs_1747</i> , ColE1 ori	Aline Rosin, 2018
pEntry- <i>moeA3</i> -JS42	Km ^R , <i>Ajs_1188</i> , ColE1 ori	Aline Rosin, 2018

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEntry- <i>moaD</i> -EbN1	Km ^R , <i>ebA6672</i> , ColE1 ori	Hamed Rahimi, 2019
pEntry- <i>moaE</i> -EbN1	Km ^R , <i>ebA6671</i> , ColE1 ori	Hamed Rahimi, 2019
pEntry- <i>mogA</i> -EbN1	Km ^R , <i>ebA1027</i> , ColE1 ori	Hamed Rahimi, 2019
pEntry-AORshort-EbN1	Km ^R , <i>ebA5004-5007</i> , ColE1 ori	Diese Arbeit
pASG5mobori-	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori	AG Heider
pASG5- <i>moeA1</i> -EbN1	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>ebA6673</i>	Aline Rosin, 2018
pASG5- <i>moeA2</i> -EbN1	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>ebA1078</i>	Diese Arbeit
pASG5- <i>moeA1</i> -JS42	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>Ajs_3203</i>	Aline Rosin, 2018
pASG5- <i>moeA2</i> -JS42	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>Ajs_1747</i>	Aline Rosin, 2018
pASG5- <i>moaD</i> -EbN1	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>ebA6672</i>	Hamed Rahimi, 2019
pASG5- <i>moaE</i> -EbN1	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>ebA6671</i>	Hamed Rahimi, 2019
pASG5- <i>mogA</i> -EbN1	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>ebA1027</i>	Hamed Rahimi, 2019
pASG-IBA103	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Twin-Strep-Tag, ColE1 ori	IBA, Göttingen
pASG-IBA103- <i>moeA3</i> -EbN1	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Twin-Strep-Tag, ColE1 ori, <i>ebA4355</i>	Aline Rosin, 2018
pASG-IBA103- <i>moeA3</i> -JS42	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Twin-Strep-Tag, ColE1 ori, <i>Ajs_1188</i>	Aline Rosin, 2018
pASG-IBA105mobori-	<i>Amp</i> ^R , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>tetP</i> , 5'-Twin-Strep-Tag, mob, pBBR ori	AG Heider

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pASG-IBA105mob-AORshort-EbN1	<i>Amp^R</i> , <i>lacZ⁺</i> , <i>tetP</i> , 5'-Twin-Strep-Tag, mob, pBBR ori, <i>ebA5004-5007</i>	Diese Arbeit
pCP20	<i>Amp^R</i> , <i>Cm^R</i> , Rep101, <i>flp</i>	Datsenko und Wanner, 2000

2.3.Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert. Die Stammlösungen haben eine Konzentration von 100 µM.

Tabelle 3: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Funktion
aorP for	TTAAGCTTGCATAGTTTCG CCGCTGC	Amplifikation Promotorbereich der AOR
aorP rev	AATCTAGAGGCGGGGTCA ATGTGAAGC	Amplifikation Promotorbereich der AOR
ebA6673 for	AAGCTCTTCAATGAACGCC AACATGCTC	Amplifikation <i>moeA1</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA6673 rev	AAGCTCTTCTCCCGTATAA CAACTCGCCG	Amplifikation <i>moeA1</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA1078 for	AAGCTCTTCAATGAAACAG AACTCCGGC	Amplifikation <i>moeA2</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA1078 rev	AAGCTCTTCTCCCGATCAG TCCGTCGAAAACC	Amplifikation <i>moeA2</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA4355 for	AAGCTCTTCAATGGTTTTTC GGCGCAGTCATCATCG	Amplifikation <i>moeA3</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA4355 rev	AAGCTCTTCTCCCACGCTT GTCCTGCCACTCG	Amplifikation <i>moeA3</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Funktion
ebA6672 for	AAGCTCTTCAATGAACATC AAAATCCTTTATTTTCG	Amplifikation <i>moaD</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA6672	AAGCTCTTCTCCCTCAGCC TCCGGTGACCGGC	Amplifikation <i>moeD</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA6671 for	AAGCTCTTCAATGTCGGTA AGCGTCCAGC	Amplifikation <i>moaE</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA6671 rev	AAGCTCTTCTCCCGCGCTC CGGTGACGACTCC	Amplifikation <i>moaE</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA1027 for	AAGCTCTTCAATGAGTGAA GAAATCACGATCGG	Amplifikation <i>mogA</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA1027 rev	AAGCTCTTCTCCCGGTCTT TTTCGGCCGGATCG	Amplifikation <i>mogA</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA5004-7 for	AAGCTCTTCAATGTGGAAA TCGCTTCACATTGACCCCG	Amplifikation <i>aorA-C</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
ebA5004-7 rev	AAGCTCTTACCCTCGCAC GAGCGCCATCGGTTGC	Amplifikation <i>aorA-C</i> aus <i>A. aromaticum</i> EbN1
Ajs_3203 for	AAGCTCTTCAATGAAACCC CAAGCGCGTGC	Amplifikation <i>moeA1</i> aus <i>Acidovorax</i> sp. JS42
Ajs_3203 rev	AAGCTCTTCTCCCTGACAG CAACTCCGC	Amplifikation <i>moeA1</i> aus <i>Acidovorax</i> sp. JS42
Ajs_1747 for	AAGCTCTTCAATGAAAACC ATTGACCAGATCG	Amplifikation <i>moeA2</i> aus <i>Acidovorax</i> sp. JS42
Ajs_1747 rev	AAGCTCTTCTCCCGATCAC GCCGTCAAACATC	Amplifikation <i>moeA2</i> aus <i>Acidovorax</i> sp. JS42
Ajs_1188 for	AAGCTCTTCAATGACACCG GCTTTCGG	Amplifikation <i>moeA3</i> aus <i>Acidovorax</i> sp. JS42
Ajs_1188 rev	AAGCTCTTCTCCCCATTT GCGCACCATTTCAGG	Amplifikation <i>moeA3</i> aus <i>Acidovorax</i> sp. JS42

3. Nährmedien und Puffer

Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser hergestellt. Nährmedien und Puffer wurden nach Herstellung bei 121°C und 2 bar Druck sterilisiert. Nicht autoklavierbare Medien und Puffer wurden sterilfiltriert (22 µm Ausschlussgröße). Zur Anaerobisierung wurden die Nährmedien und Puffer unter Entgasung (Vakuum) und Begasung (Stickstoff) behandelt. Dies wurde mit 15-20 Zyklen durchgeführt. Ein Zyklus entspricht Entgasung 1-3 min und Begasung 1-3 min.

3.1. Komplexe Nährmedien für *Escherichia coli* und *Acidovorax* sp. JS42

Zur Blau-Weiß-Selektion wurde X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galaktopyranosid) gelöst in DMF mit einer Konzentration im Medium von 20 µg/l verwendet.

Tabelle 4: Nährmedien für *Escherichia coli* und *Acidovorax* sp. JS42.

Medium	Zusammensetzung
LB	10 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	8 g/l NaCl
	Festmedium: 16 g/l Agar Softagar: 8 g/l Agar
LB-MC-Agar (Transduktion)	8 ml/l CaCl ₂
	5 ml/l 20 % (w/v) Glukose
TGYEP	100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,6 (66,4 g/l K ₂ HPO ₄ und 84,3 g/l KH ₂ PO ₄)
	12,5 ml/l 40 % Glukose
	10 µM Na ₂ MO ₄
	20 ml/l 50 % Na ₂ NO ₃
	10 g/l Pepton
	5 g/l Hefeextrakt
<i>Tryptic Soy Broth</i> (TS)	17 g/l Pepton
	3 g/l Soja-Pepton
	2,5 g/l Glukose
	5 g/l NaCl
	2,5 g/l K ₂ HPO ₄
	Festmedium: 16 g/l Agar

3.2. Minimal-Medien zur Kultivierung von *Acidovorax* sp. JS42, *Aromatoleum evansii* und *Aromatoleum aromaticum*

Tabelle 5: Nitratreduziere-Medium (NM) für *Acidovorax* sp. JS42, *A. evansii* und *A. aromaticum*.

Medium	Zusammensetzung
NM-Flüssigmedium	0,5 g/l KH_2PO_4
	0,3 g/l NH_4Cl
	0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
	0,1 g/l CaCl_2
	0,3 g/l NaNO_3
NM-Festmedium	0,23 g/l Na_2SO_4
	1 g/l NaCl
	2,55 g/l NaNO_3
	1,6 g/l NH_4Cl
	16 g/l Agar
MATE-Festmedium	10 g/l Trypton

Tabelle 6: Puffer-Systeme und weitere Supplemente.

Supplement	Zusammensetzung	Zugabe zum Medium
Phosphat-Puffer-System (Flüssig- und Festmedium)	1 M KH_2PO_4	4 ml/l
	1 M K_2HPO_4	16 ml/l
	1 M MgCl_2	1 ml/l
	0,6 M CaCl_2	1 ml/l
Carbonat-Puffer-System (ausschließlich Flüssigmedium)	1 M NaHCO_3	40 ml/l
	5 M HCl	1 ml/l
Alle Medien	VL-7	1 ml/l
	SL-10	1 ml/l
	Selenit-Wolframat-Lsg.	1 ml/l
	C-Quelle	s. Tab 8
MATE	1 M Pyruvat	5 ml/l
	1 M Na-Acetat	5 ml/l

Tabelle 7: Zusammensetzung Vitamin- und Spurenelementlösungen.

Lösung	Zusammensetzung
Vitaminlösung VL-7	80 mg/l 4-Aminobenzoesäure
	100 mg/l Ca-D-(+)-Pantothenat
	100 mg/l Cyanocobalamin (B ₁₂)
	20 mg/l D (+) -Biotin
	200 mg/l Nikotinsäure
	300 mg/l Pyridoxamin-HCl (B ₆)
	200 mg/l Thiamindichlorid (B ₁)
Spurenelementlösung SL-10	5,2 g/l Na ₂ EDTA
	2,1 g/l FeSO ₄ x 7 H ₂ O
	30 mg/l H ₃ BO ₃
	100 mg/l MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	24 mg/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	24 mg/l NiCl ₂ x 6H ₂ O
	29 mg/l CuCl x H ₂ O
	144 mg/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
	36 mg/l Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
Selenit-Wolframat-Lösung	6 mg/l Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O
	6 mg/l Na ₂ WO ₄ x H ₂ O
	0,4 g/l NaOH

Tabelle 8: C-Quelle für Kultivierung in NM-Medium. Für Festmedien wurde ausschließlich Na-Benzoesäure verwendet.

Substrat (C-Quelle)	Zugabe zum Medium
1 M Na-Benzoesäure	1 ml/l
0,1 M Phenylalanin	10 ml/l
0,5 M Na-Succinat	2 ml/l

3.3. Puffer und Lösungen

Lösungen für Agarosegelelektrophorese

50x TAE (pH 8,0):

2 M Tris, 50 mM EDTA, 1 M Essigsäure, pH 8 mit 5 M HCl eingestellt

10x DNA-Probenpuffer:

50 % (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,42 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8 mit 5 M HCl eingestellt

Agarosegel:

1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (Lösen durch Aufkochen)

DNA-Färbebad:

0,1 % (v/v) Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer

Lösungen für die SDS-PAGE

Trenngel-Puffer (4x):

1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % (v/v) TEMED

Sammelgel-Puffer (4x):

1,25 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % (v/v) TEMED

Polyacrylamidtrenngel (12 %):

42 % (v/v) Rotiphorese Acrylamid Gel 30, 25 % (v/v) Trenngel-Puffer (4x), 0,1 % (w/v) APS

SDS-Laufpuffer (10x):

30g/l Tris, 144 g/l Glycin, 10 g/l SDS

Protein-Probenpuffer (5x) pH 6,8

4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 5% (v/v) 2 M Tris/HCl pH 6,8, Bromphenolblau; in Glycerin gelöst

Coomassie Brilliant Blue Färbelösung:

0,25% Coomassie Blue R, 20% Ethanol, 20% Essigsäure, 60% H₂O

Entfärber:

20 % (v/v) Ethanol, 20 % (v/v) Essigsäure

Puffer zur Isolierung genomischer DNA

SET-Puffer:

0,181 g/l Tris, 0,558 g/l Na₂EDTA, 0,3 g/l Saccharose, pH 6,7 mit 5 M HCl eingestellt

TE-Puffer:

10 mM TRIS, 1 mM Na₂EDTA

Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

SOB-Medium:

2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

Transformationspuffer:

10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7 mit KOH eingestellt, nach Autoklavieren Zugabe von 55 mM MnCl₂

Lösungen für P1-Transduktion

MC-Puffer:

0,1 M MgSO₄, 0,005 M CaCl₂

Lösung für Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Tactin-Säule

Grundpuffer:

100 mM Tris/HCl, 150 mM KCl oder NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,4

Puffer für die *Ferguson-Plot-Analyse*

Nativ-Laufpuffer (10x):

1 M Tris, 1 M Glycin

Nativ-Probenpuffer:

50 mM Tris/HCl, 10 % (w/v) Glycerin, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

3.4. Antibiotika

Tabelle 9: Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika mit Konzentration der Stammlösung. Die Antibiotika wurden sterilfiltriert (0,22 µm) und im Verhältnis 1:1000 im Medium verwendet.

Antibiotikum (1000x)	Konzentration
Ampicillin	100 mg/ml
Kanamycin	50 mg/ml
Streptomycin	50 mg/ml

4. Mikrobiologische Methoden

4.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung erfolgte entweder in LB-Flüssigmedien oder auf LB-Festmedium. Von einer bebrüteten LB-Agarplatte wurde eine Einzelkolonie entnommen und in LB-Flüssigmedium überimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler. Anoxische Kultivierung erfolgte im TGYEP-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten mit Stickstoffatmosphäre. Gemäß einer vorliegenden Resistenz wurden Antibiotika dem Medium hinzugefügt.

4.2. Kultivierung von *Acidovorax* sp. JS42

Die Kultivierung erfolgte entweder aerob im TS-Flüssigmedium, auf LB/TS-Festmedium oder anaerob im NM-Flüssigmedium. Von einer bebrüteten TS-Agarplatte oder aus einer Dauerkultur in NM-Medium wurden Zellen entnommen und in TS-Flüssigmedium oder NM-Flüssigmedium überimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Dem NM-Medium wurden als C-Quelle Succinat zugesetzt. In regelmäßigen Abständen wurde die Nitrat-Konzentration mit einem Nitrat/Nitrit-Teststreifen (Quantofix®, Macherey-Nagel, Düren) gemessen und bei Verbrauch wurden 0,2 ml/100 ml Na-NO₃ sowie 0,5 ml/100 ml Succinat hinzugegeben.

4.3. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Inoue *et al.* (1990). Beginnend mit einer *E. coli*-Vorkultur, die über Nacht in 5 ml LB-Flüssigmedium kultiviert wurde, wurde eine Hauptkultur in 250 ml SOB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 bis 0,6 bei RT mit 200 rpm kultiviert. Die Kultur wurde anschließend für 10 min auf Eis inkubiert und danach mit 1500 x g bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für zehn Minuten und anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1500 x g und 4°C für zehn Minuten. Nach Aufnahme der Zellen in 20 ml Transformationspuffer wurden 7 % (v/v) steriles DMSO hinzugefügt und die Suspension erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Aliquots zu je 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.4. Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit einem Volumen von 1 bis 10 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz versetzt und mindestens für 20 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend für 1 min bei 42°C erhitzt. Danach für weitere 5–10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 600 µl LB-Flüssigmedium zu den Zellen gegeben und für 45 min bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. Abschließend wurden verschiedene Volumina (100 µl, 200 µl, Rest) sowie eine 1:10-Verdünnung auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

4.5. Transformation von *Escherichia coli* und *Acidovorax* sp. JS42 durch Elektroporation

Eine 5 ml Vorkultur wurde im LB-Flüssigmedium für *E. coli* oder TS-Flüssigmedium für *Acidovorax* sp. erstellt. Von der Vorkultur wurden 1 bis 5 ml sedimentiert bei 6000 x g und 4°C für 5-10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Sediment in 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Suspension wurde erneut bei 6000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und das entstandene Zellsediment aufgenommen. Dieser Schritt wird weitere viermal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zell-Sediment in 200 µl 10 % Glycerin aufgenommen. 100 µl von den kompetenten Zellen wurden zusammen mit 2 bis 5 µl Plasmid-DNA vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz in 0,2 cm

Elektroporationsküvetten (Peqlab, Erlangen) überführt. Zur Elektroporation im Elektroporator (MicroPulser, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) erfolgte unter den Einstellungen 2,5 kV, 200 Ω und 25 μ F. Nach erfolgtem Puls wurden die Küvetten bis zur Zugabe von LB- oder TS-Flüssigmedium auf Eis gelagert. Nach Zugabe des Mediums wurden die Zellen in frische Reaktionsgefäße überführt und für 1 h inkubiert. *E. coli* wurde bei 37°C und 750 rpm und *Acidovorax* sp. wurde bei 30°C und 350 rpm inkubiert (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg). Danach wurden die Zellen in verschiedenen Volumina (100 μ l, 200 μ l und Rest) auf Festmedium mit Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für *E. coli* bei 37°C und für *Acidovorax* sp. bei 28°C.

4.6. Flipase-Rekombination der *E. coli moaD*-Mutante

Mit Hilfe der Flipase (Flp) können aus *E. coli*-Mutanten, die aus der Keio-Kollektion stammen, die eingebrachte Kanamycin-Resistenzkassette entfernt werden (Datsenko und Wanner, 2000). Hierbei wird das Plasmid pCP20 verwendet. Auf diesem Plasmid ist die FLP-Rekombinase kodiert. Diese Rekombinase erkennt die FRT-Sequenzen an den Enden der Kassette und kann sie heraus kombinieren. Nach der Rekombination kann das Plasmid mit der Kultivierung bei 37°C oder höher aus dem Organismus wieder entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden die $\Delta moaD$ -Mutante (JW0767-1) durch Elektroporation mit dem Plasmid pCP20 transformiert und auf LB-Festmedium mit Ampicillin bei 30°C kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde entnommen und in 5 ml LB-Flüssigmedium überimpft und über Nacht bei 37°C bei 200 rpm kultiviert. Diese Kultur wurde in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-6} ausplattiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Rekombination und dem Verlust des Plasmids wurden die entstanden Einzelkolonien auf LB-Festmedium mit Ampicillin, Kanamycin und ohne Antibiotika aufgetragen. Die LB-Platten ohne Antibiotikum und mit Kanamycin wurden bei 37°C kultiviert und die LB-Platten mit Ampicillin wurden bei 30°C kultiviert. Nur die Zellen, die sowohl keine Ampicillin-Resistenz als auch keine Kanamycin-Resistenz aufweisen, wurden für die nachfolgende P1-Transduktion verwendet.

4.7. P1-Transduktion von *E. coli*

In dieser Arbeit wurde die $\Delta moaD$ -Mutante (JW0767-1) ohne Kanamycin-Resistenzkassette (s. 4.6) mit P1-Lysat transduziert, die aus einer Infektion mit der $\Delta thiS$ -Mutante (JW3955-2) stammt. Zur Erstellung dieses Lysats wurde eine Kultur der $\Delta thiS$ -Mutante in 5 ml LB-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Nach der

Kultivierung wurden 5 ml MC-Puffer der Kultur hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Parallel wurden von einem vorhanden P1-Lysat eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1:10, 1:50 und 1:100 angelegt. Nach Abschluss der Inkubation wurden 150 µl der Bakterien-Kultur und 100 µl einer Verdünnung des P1-Lysats in ein separates Gefäß überführt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Lysat angesetzt. Den Ansätzen wurden 3 ml LB-Soft-Agar zugesetzt und umgehend auf LB-MC-Festmedium aufgetragen und für 5 bis 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Phagen-Bakterien-Suspension mit deutlicher, aber nicht vollständiger Lyse wird mit 2 ml LB-Flüssigmedium benetzt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde mit einem sterilen Drigalski-Spatel die Soft-Agar-Schicht entfernt und in ein neues steriles Gefäß überführt und mit 50 µl Chloroform versetzt und mittels Vibrationsmischer (Heidolph, Schwabach) gemischt. Anschließend wurden die Reste der Zuckermatrix und das Lysat durch Zentrifugation für 15 min mit 5000 rpm bei 4°C (Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen) getrennt. Der Überstand wird in ein neues steriles Gefäß überführt und 50 µl Chloroform hinzugegeben. Der Überstand wurde bei 4°C gelagert. Mit dem Lysat erfolgte die Infektion der *ΔmoaD*-Mutante ohne Resistenzkassette (s. 4.6). Hierfür wurde eine Kultur in 5 ml LB-Flüssigmedium mit der modifizierten Mutante inokuliert und über Nacht bei 37°C bei 200 rpm kultiviert. Nach der Kultivierung wurde die Kultur mit MC-Puffer versetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Für zwei Ansätze (Kontrolle + Transduktion) wurden jeweils 2 bis 4 ml der Kultur entnommen und sedimentiert für 15 min bei 5000 rpm. Die Kontrolle wurde in 200 µl LB-Flüssigmedium resuspendiert und der Ansatz für die Transduktion in 100 µl LB-Flüssigmedium und 100 µl des P1-*ΔthiS*-Mutant-Lysats resuspendiert. Diese Ansätze wurden für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Infektion wurde mit 5 ml 1 M Na-Citrat gestoppt. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 5 ml LB-Flüssigmedium mit 0,1 ml 1 M Na-Citrat aufgenommen und erneut für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und danach wurde das Sediment in 5 ml LB-Flüssigmedium mit 0,1 ml 1 M Na-Citrat aufgenommen. Dieser Ansatz wurde komplett zur Inokulation von 20 ml LB-Flüssigmedium verwendet und für 3 h bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Kultur wurde nach Ablauf der Zeit für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml LB-Flüssigmedium und 0,1 ml 1 M Na-Citrat aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1,4 ml LB-Flüssigmedium und 40 µl 1 M Na-Citrat aufgenommen. Von dem Transduktionsansatz und der Kontrolle wurden 200 µl auf LB-Festmedium mit Kanamycin ausplattiert und bei 37°C kultiviert. Als zusätzliche Kontrolle diente 100 µl P1-*ΔthiS*-Lysat auf LB-Festmedium und Kanamycin.

4.8. Kultivierung von *A. evansii* und *A. aromaticum*

Die Kultivierung erfolgte anaerob im NM-Flüssigmedium oder auf NM-Festmedium. Aus einer Dauerkultur in Flüssigmedium oder aus einer Kryokultur wurden Zellen entnommen und im NM-Flüssigmedium überimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Dem NM-Medium wurden als C-Quelle Na-Benzoesäure oder Phenylalanin zugesetzt. Zum Start der Kultivierung mit Benzoesäure als C-Quelle wurden der Kultur 0,4 ml 1 M Na-Benzoesäure und 0,45 ml 1 M Na-NO₃ und für die Kultur mit Phenylalanin als C-Quelle wurden 1 ml 100 mM Phenylalanin hinzugegeben. In regelmäßigen Abständen wurde die Nitrat-Konzentration mit einem Nitrat/Nitrit-Teststreifen (Quantofix[®], Macherey-Nagel, Düren) gemessen und bei Verbrauch wurden 0,2 ml/100 ml Na-NO₃ und 0,1 ml/100 ml Na-Benzoesäure oder 0,7 ml/100 ml Phenylalanin je nach Kultur hinzugefügt.

4.9. Konjugation von *A. evansii* und *A. aromaticum*

Für die Konjugation von *A. evansii* und *A. aromaticum* wurden die Donorstämme *E. coli* S17-1 oder *E. coli* WM3064 verwendet. Der Donorstamm wurde durch Hitzeschock mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Der Donorstamm wurde in 5 ml LB-Flüssigmedium bei 200 rpm und 37°C kultiviert. Der Rezipient wurde anaerob im NM-Flüssigmedium inokuliert und für zwei Tage bei 30°C als Standkultur kultiviert. Zur Kultivierung von *E. coli* WM3064 wurden den Medien 0,3 mM Diaminopimelinsäure (DAP) zugesetzt. Um zwischen den Donorstämmen und den Rezipientenstämmen ein Konjugationsereignis zu erreichen, wurden sie in verschiedenen Verhältnissen gemischt und 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde zwei Mal mit jeweils 500 µl supplementiertem NM-Medium resuspendiert und für 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Das Sediment nach der zweiten Zentrifugation wurde mit 20 µl NM-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf MATE-Festmedium in der Mitte aufgetragen ohne es auszuplattieren und für 16-20 h bei 28°C kultiviert. Danach wurde die Zellsuspension in der Mitte des Mediums aufgenommen, in 500 µl NM-Flüssigmedium aufgenommen und für 2 h bei <200 rpm inkubiert. Abschließend werden verschiedene Verdünnungen auf NM-Festmedium (ohne DAP) ausplattiert und bei 28°C bebrütet. Entstandene Einzelkolonien wurden im NM-Flüssigmedium überimpft und kultiviert.

4.10. Stammhaltung

Bakterienstämme wurden zur kurzfristigen Lagerung (1-4 Wochen) auf bebrüteten Festmedium aufbewahrt. Langfristig wurden sie als 20 %ige Glycerin-Kryokultur bei -80°C aufbewahrt. Hierbei wurde *E. coli* in LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. *Acidovorax* sp. JS42, *A. evansii* und *A. aromaticum* wurden im NM-Flüssigmedium mit Antibiotikum bei 28°C kultiviert. Ein Teil der Kultur wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in der Tischzentrifuge bei 5000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Sediment wurde in Flüssigmedium (ohne Antibiotikum) resuspendiert. Davon wurden 800 µl Kultur zusammen mit 200 µl Glycerin in ein Kryoröhrchen pipettiert. Abschließend wurde das Kryoröhrchen schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.11. Zellernte und Aufschluss

Zur Zellernte stehen Zentrifugen für verschiedene Volumina zur Verfügung. Für Volumina von 15-50 ml wurde die Universal 320 R (Hettich, Tuttlingen) verwendet. Für Volumina für bis zu 4 l wurde die Sorvall RC-5B und die Sorvall RC-5B Plus (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) mit den Rotoren SLA-3000 SUPER-LITE® und Sorvall GSA verwendet. In der Regel wurden Zellen für 15-45 min bei 5000-6000 rpm und 4°C geerntet. Nach der Ernte wurden die Zellen einmal mit dem gewünschten Puffersystem gewaschen. Zur Erstellung des Zellextraktes standen das French-Press-System (French Pressure Cell Press, American Instrument Company, Silver Spring, USA) oder der Aufschluss mittels Ultraschall zur Verfügung. Beiden Verfahren wurden vor Anwendung eine Spatelspitze Lysozym und DNaseI hinzugegeben. Mit dem French-Press-System wurden die Zellen mit 1000 psi Druck aufgeschlossen. Das zweite Verfahren ist der Aufschluss durch Ultraschall. Hierfür standen zwei Geräte zur Verfügung. Zum Aufschluss bei oxischen Bedingungen (SONOPULS HD 3200, Spitze: MS73; BANDELIN Electronic, Berlin) wurden die Zellen einer Pulslänge von 260 s mit einer Abkühlphase von 220 s, einer Amplitude von 30 % und einer Gesamtzeit von 35 min aufgeschlossen. Hierbei standen die Zellen die ganze Zeit auf Eis. Unter anoxischen Bedingungen (Sonifier 250, Banson, Danbury, Connecticut, USA) wurde die Zell-Suspension mit den Einstellungen Duty Cycle 65 %, Output Control 8 und Output 30 aufgeschlossen. Die Zellen wurden nach 30 Impulsen für 1 min abgekühlt. Dies wurde drei bis viermal wiederholt. Nach dem Aufschluss wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Ultrazentrifugation mit Festwinkelrotor (Optima™ L-90K, Beckman Coulter, Krefeld) für 1 h bei 35000 rpm und 4°C abgetrennt.

4.12. Heterologe Expression durch induzierbaren Tetrazyklin-Promotor

Zur Produktion von Protein, die unter Kontrolle eines induzierbaren Tetrazyklin-Promoters stehen, wurden Kulturen entweder im LB- oder TGYEP-Flüssigmedium für *E. coli* oder NM-Flüssigmedium für *Aromatoleum* sp. oder *Acidovorax* sp. kultiviert. Bei einer OD₅₇₈ zwischen 0,5 und 0,6 wurde der Induktor Anhydrotetrazyklin (AHT; 20 mg/ml in DMF) in einer Verdünnung von 1:10000 der Kultur hinzugegeben. Inkubation erfolgte für *E. coli* für 4 h bis 16 h bei 200 rpm oder als Standkultur bei 16°C oder 28°C. Für *Aromatoleum* sp. und *Acidovorax* sp. erfolgte die Inkubation für 16 h bis 20 h als Standkultur bei 16°C oder 28°C. Danach erfolgte die Zellernte und anschließend der Aufschluss.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Plasmidisolierung wurde eine 5 ml LB-Flüssigkultur mit Antibiotikum für 16 h bei 37°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler kultiviert. Zur Isolierung wurde der Reagenziensatz GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific (Dreieich) verwendet und diese gemäß den Herstellerangaben mit Ausnahme der Elution durchgeführt. Die Elution erfolgte mit deionisiertem Wasser.

5.2. Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurde die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion angewendet. Hierfür wurden 50 ml einer Standkultur (4-7 d) von *Acidovorax* sp. oder *Aromatoleum* sp bei 5000 rpm und 30 min bei 4°C (Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Sediment wurde in einem Volumen von 10 ml SET-Puffer resuspendiert und wieder mit 5000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zell-Sediment in 3,5 ml SET-Puffer aufgenommen und in Aliquots von 560 µl in neue Reaktionsgefäße überführt. Den Ansätzen wurde 60 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung und 6 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE-Puffer) zugesetzt und für 1 h bei 55°C inkubiert. Danach wurden den Ansätzen 200 µl 5 M NaCl-Lösung zugesetzt und für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 800 µl der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) hinzugegeben und mehrmals invertiert. Danach wurden die Ansätze bei 17000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit weiteren 800 µl der

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung vermischt und mehrmals invertiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation und der Überstand wurde verwendet. Zur Degradierung der RNA wurde pro Ansatz 20 µl RNaseI (20 mg/ml in TE-Puffer) zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der DNA erfolgte die Zugabe von 1,3 vol Isopropanol und anschließend die Inkubation für mindestens 30 min bei -20°C. Anschließend wurden die Ansätze bei 17000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 300 µl 70 % (v/v) Ethanol wurden hinzugegeben und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Sediment wurde mit Hilfe eines *Speedvac*-Konzentrators (Savant, Fisher Scientific, Schwerte) getrocknet. Die gDNA wurde bei 4°C in 100 µl TE-Puffer gelöst und gelagert.

5.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA wurde die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet (Saiki *et al.*, 1988). Hierbei wird ein Bereich vervielfältigt, der zwischen einem „Forward-Primer“ und einem „Reverse-Primer“ vorliegt. Dabei dienen diese Oligonukleotide als Startpunkt der DNA-Polymerase. Zur Anwendung kamen die Standard-PCR und die Kolonie-PCR. Die Länge des PCR-Programms ist abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und der Schmelztemperatur der Oligonukleotide.

Tabelle 10: Ansatz für die PCR. Für gDNA und Plasmid-DNA wurden 2 µl einer 1:10-Verdünnung verwendet. Für eine Kolonie-PCR wurden die Kolonie aufgenommen und nach Ausstrich auf einem Festmedium in die PCR-Lösung getaucht.

Ansatz	Konzentration/Menge/Volumen
DNA	Variabel
GC Puffer (5x)	1x
Phusion-Polymerase	1 U
dNTPs	200 µM
Vorwärts-Primer	0,5 µM
Rückwärts-Primer	0,5 µM
Deionisiertes Wasser	Auf 50 µl

Tabelle 11: Programm der PCR.

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklus
Initiale Denaturierung	95 – 98	120 – 600	1
Denaturierung	95 – 98°C	30	30 -35
Anlagerung	[T _m Oligo. -2°C]	30	
Elongation	72	15/kb DNA	
Finale Elongation	72	600	1

Nach der PCR erfolgte die Reinigung der PCR-Fragmente mit dem GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Dreieich) nach Herstellerangaben mit Ausnahme der Elution. Die Elution erfolgte mit deionisiertem Wasser.

5.4. Hydrolyse von DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktion von DNA-Molekülen wurden Enzyme der Firma Thermo Scientific (Dreieich) verwendet. In einem 10 µl-Ansatz wurden 100-500 ng DNA mit 0,5 U des Restriktionsenzym mit Puffer (1x) bei 30 bis 37°C für 1 bis 2 h inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Salze wurde der Restriktions-Ansatz mit dem GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Dreieich) nach Herstellerangaben mit Ausnahme der Elution gereinigt. Die Elution erfolgte mit deionisiertem Wasser.

5.5. Agarosegelelektrophorese

Die zu trennende DNA-Lösung wurde zur Erhöhung der spezifischen Dichte mit DNA-Probenpuffer versetzt. Anhand des Bromphenolblaus konnte der Verlauf der DNA nachverfolgt werden. Zur Auftrennung wurden 1 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die DNA wurde entlang eines elektrischen Feldes in Richtung des positiv geladenen Pols bei einer Spannung von 12 V/cm in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel in einer 0,1 % (v/v) Ethidiumbromid-Lösung in 1x TAE-Puffer für 20 min gefärbt. Als Standard wurde der GeneRuler DNA Ladder mix (Thermo, Dreieich) verwendet (s. Abb. 31B).

5.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Lösung mit den verschiedenen DNA-Fragmenten wird der Größe nach mit der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Färbung des Gels werden die gewünschten Banden visualisiert und mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel präpariert. Die DNA wurde

mit dem GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Dreieich) nach Herstellerangaben mit Ausnahme der Elution aus dem Gelstück extrahiert. Die Elution erfolgte mit deionisiertem Wasser.

5.7.Ligation

Zur Ligation von verdauter DNA nach Restriktionsverdau wurde die Ligation mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt (Thermo Scientific, Dreieich). Hierbei wurde die Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten kovalent durch eine Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphat und 3'-Hydroxy-Gruppe mit einander verbunden. Die kleineren DNA-Fragmente wurden im Überschuss in den Ansatz gegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C oder für 2 h bei RT. Die einzusetzenden DNA-Mengen wurden mit der folgenden Formel berechnet:

$$m_{\text{DNA}} [\text{ng}] = MW_{\text{DNA}} [\text{kDa}] \times (\text{einzusetzende}) \text{ DNA-Menge} [\text{pmol}] \quad (1)$$

(mit $MW_{\text{DNA}} [\text{kDa}] = 660 \times \text{Länge DNA} [\text{kb}]$).

Tabelle 12: Ansatz zur Ligation von Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau.

Komponente	Konzentration/Menge/Volumen
Plasmid-DNA	0,07 pmol
DNA-Fragment	0,21 – 0,35 pmol
T4-Ligase-Puffer (5x)	2 µl
T4-Ligase	1 µl
Deionisiertes Wasser	Auf 10 µl

5.8.Kombinatorische Klonierung

Für die kombinatorische Klonierung wurde das Stargate[®]-System (IBA, Göttingen) verwendet. Dieses System erlaubt die Restriktion und die Ligation in einem Schritt. Die gewünschte DNA-Sequenz wird mit Hilfe von LguI-Schnittstellen in den ersten Vektor pEntry (IBA, Göttingen) eingebracht. Die Schnittstellen wurden durch Oligonukleotide an die DNA-Sequenz amplifiziert. Von diesem Ausgangsvektor kann durch Esp3I-Schnittstellen die gewünschte DNA-Sequenz in verfügbaren Destinationsvektoren eingebracht werden. Bei dem ersten Schritt wurden die Komponenten in einem Ansatz zusammengegeben und für 1 h bei 30°C inkubiert. Für den zweiten Schritt wurde das erstellte Plasmid mit dem gewünschten Destinationsvektor

vermengt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Jeweils nach den Inkubationen erfolgt die Transformation von 5 µl des Ansatzes mit *E. coli* DH5α-Zellen durch Hitzeschock.

Tabelle 13: Ansätze der zwei Schritte durch kombinatorisches Klonieren mit dem Stargate®-System.

1. Schritt	Mengen/Volumina	2. Schritt	Mengen/Volumina
DNA-Fragment	100 ng	Ausgangsvektor	100 ng
pEntry	25 ng	Destinationsvektor	25 ng
LguI (5 U/µl)	0,5 µl	Esp3I (5 U/µl)	0,5 µl
ATP (10 mM)	2,5 µl	ATP (10 mM)	2,5 µl
DTT (100 mM)	5 µl	DTT (100 mM)	5 µl
Puffer Tango (10x)	5 µl	Puffer Tango (10x)	5 µl
T4-Ligase (1 U/µl)	1 µl	T4-Ligase (1 U/µl)	1 µl
Auf 50 µl			

Bearbeitungen und Anfertigungen von Plasmid-Karten wurden mit dem Programm GENTle (Universität Köln) durchgeführt. Die Plasmidkarten wurden mit SnapGene (GSL Biotech, Chicago, IL, USA) erstellt und bearbeitet (s. Abb. 32-35).

5.9. Bestimmung der DNA-Konzentration

Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen wurden mit dem NDrop 1000 NanoDrop Spektrometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) durchgeführt. Hierfür wurden 1 µl der DNA-Lösung in die Apparatur pipettiert. Die Konzentration wird anhand der Absorption bei 260 nm berechnet. Die Reinheit wird aus dem Quotienten aus der Absorption von 260 nm und 280 nm überprüft. Eine hohe Reinheit ist bei einem Quotienten zwischen 1,5 und 1,9 zu erwarten (Sambrook, 1989).

5.10. DNA-Sequenzanalyse

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) und wurde von der Firma Microsynth Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Die Ansätze enthielten 800 bis 1200 ng DNA und 2 µM eines Oligonukleotids in einem Volumen von 15 µl.

6. Proteinbiochemische Methoden

6.1. Heterologe Produktion und Affinitätschromatographie mittels

Streptavidin-Tactin

Zur Anreicherung von Proteinen wurden die Gen-Sequenzen modifiziert, sodass das Genprodukt mit einem speziellen Peptid (Strep-Tag; Sequenz: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) fusioniert vorlagen. Diese mit der Peptid-Sequenz modifizierten Proteine können an Streptavidin-Tactin-Säulen binden und vom Rest des Zellextrakts getrennt werden. Die Elution erfolgt mit Desthiobiotin, was das Protein von der Säule verdrängt. Nach Produktion der rekombinanten Proteinen in *E. coli*, *Acidovorax* sp. oder *Aromatoleum evansii* wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die Säule wurde an ein Äkta-System angeschlossen (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) und mit Grundpuffer mit 5 bis 10 Säulenvolumen (SV) equilibriert. Danach wurde der Zellextrakt aufgetragen und der Durchlauf gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 5 bis 10 SV gewaschen. Zur Elution wurden 3 bis 5 SV Desthiobiotin-Lösung (2,5 mM in Grundpuffer) verwendet. Nach der Elution wurde die Säule mit 2 bis 3 SV Grundpuffer gewaschen. Abschließend wurde die Säule mit 5 bis 10 SV HABA-Lösung (1 mM HABA in Grundpuffer) regeneriert. Die Eluate wurden gesammelt und bei -20°C oder -80°C gelagert.

6.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Das Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine und lagert sich an den denaturierten Proteinen an. Dadurch wird die Eigenladung durch eine negative Ladung überdeckt und wurde anhand eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Die Polyacrylamid-Matrix wurde durch Polymerisation von Acrylamid und quervernetztem Bisacrylamid durch Zugabe von Ammoniumperoxysulfat (APS) erzeugt. Zur Anwendung kam in der Regel ein Flachbettgelsystem mit Sammel- und Trenngel. Bevor die Zellextrakte (1:10) oder Protein-Lösungen in die vorgefertigten Taschen im Sammelgel überführt wurden, wurden sie mit 0,25 vol Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auftrennung erfolgte für 10 min bei 90 V, anschließend bei 120-130 V und wurde vor Auslaufen der Bromphenol-Bande aus dem Gel gestoppt.

Nach Abbau der Apparatur und vorsichtiger Präparation des Trenngels, erfolgte die Färbung in Coomassie Brilliant Blue R-250 für 20 min auf einem Wippschüttler. Der Farbstoff lagert sich

hierbei an den basischen Seitenketten des Proteins an und durch Zugabe des Entfärbers wurde der Farbstoff so weit entfernt, dass die Proteinbanden sichtbar wurden. Als Standard wurde der PageRuler Plus Prestained (Thermo, Dreieich) verwendet (s. Abb. 31A).

6.3. Ferguson-Plot

Zur Bestimmung der molekularen Masse der angereicherten Proteine wurde eine Nativ-PAGE mit einer anschließenden Analyse mittels *Ferguson-Plot* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Gele ohne SDS mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentration hergestellt. Die Protein-Proben wurden mit den Kontroll-Proteinen (5 µg) Bovines-Serum-Albumin (BSA) und Ovalbumin aufgetrennt. Die Proteinproben wurden mit 1:2 Nativ-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde mit 100 V bei 4°C durchgeführt. Anhand des Laufverhaltens wurde eine Standardgerade erstellt. Hierfür wird die jeweilige Distanz der Probe zum Startpunkt der Probe durch die Distanz der Lauffront zum Startpunkt der Probe dividiert. Dieser Wert wird als R_f -Wert bezeichnet. Die ermittelten R_f -Werte werden logarithmisch gegen die Konzentration des Polyacrylamids im jeweiligen Gel aufgetragen. Die daraus erhaltenen Beträge der Steigungen für die Kontroll-Proteine werden wiederum gegen die Logarithmen der jeweiligen molekularen Massen aufgetragen und eine Standardgerade erstellt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Nativ-Gele.

Komponente	Konzentration an Acrylamid [%] mit verwendeten Volumina			
	6 %	7 %	8 %	10 %
30 %/0,8 % (v/v) Polyacrylamid/Bisacrylamid	3 ml	3,5 ml	4 ml	5 ml
1,5 M Tris/HCl pH8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
Deionisiertes Wasser	8,25 ml	7,75 ml	7,25 ml	6,25 ml
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
10 % (w/v) APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl

6.4. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode

Das Prinzip der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue 250 an kationischen und unpolaren Seitenketten des Proteins. Zur Kalibrierung wurde BSA in den Konzentration 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml verwendet. Die BSA-Lösungen wurden

mit 10 μl Volumen auf 200 μl mit Bradford-Reagenz aufgefüllt. Danach wurden die Proteinproben mit 10 μl Volumen auf 200 μl mit Bradford-Reagenz aufgefüllt. Die Messung erfolgte im Multiplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die resultierenden Werte der BSA-Lösungen wurden in einem Punktdiagramm als Extinktionswerte gegen die Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Kurve dient anschließend der Bestimmung der Proteinkonzentration der Proteinproben.

6.5. Aktivitätstest der Aldehyd-Oxidoreduktase

Die Enzym-Aktivitäten der Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus *A. aromaticum* EbN1 wurden unter anoxischen Bedingungen bei 28°C gemessen. Ein typischer Ansatz (1 ml) beinhaltet 1,6 mM Benzylviologen, 20 μM Dithionit, 1 mM Substrat und 1 bis 5 μl Zell-Extrakt oder gereinigte AOR (1:10). Als Puffer wurde 100 mM Tris/HCl pH 8 verwendet. Die Reaktion wurde mit der Zugabe des Substrats begonnen und wurde mit Verwendung von Benzylviologen ($\epsilon = 7400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 600 nm und bei der Verwendung von NAD ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Auswertungen der Ergebnisse wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

6.6. Quervernetzung von Proteinen

Zur Quervernetzung von Proteinen standen zwei Methoden zur Verfügung. Die erste Methode ist die Quervernetzung durch Dimethyl-Suberimidat (DMS; 6 mg/ml in 50 mM HEPES/KOH pH 8,5). Die Protein-Lösung lag in 50 mM HEPES/KOH pH 7,5 vor. Im Ansatz waren 1 mg/ml Protein und 1 mg/ml DMS und die Inkubation erfolgte für 3 h. Die erste Probe wurde vor der Zugabe von DMS entnommen. Nach der Zugabe von DMS wurden nach 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min und 240 min Proben entnommen. Der Stopp der Reaktion erfolgte mit der Zugabe von 1:10 Hydroxylamin (0,4 M in 50 mM HEPES/KOH pH 7,5). Die Proben wurden für eine SDS-PAGE-Analyse vorbereitet.

Die zweite Methode ist die Quervernetzung mittels Glutardialdehyd. Der Reaktionsansatz beinhaltet 1 mg/ml Protein (Lösung in 50 mM HEPES/KOH pH 7,5), 0,115 % Glutardialdehyd (2,3 % (v/v) in 50 mM HEPES/KOH pH 7,5) und 50 mM HEPES/KOH pH 7,5. Der Ansatz wurde für 15 min inkubiert. Vor der Zugabe von Glutardialdehyd und zu den Zeitpunkten 1 min, 3 min, 5 min, 10 min und 15 min nach Zugabe wurden die Proben entnommen. Der

Stopp der Reaktion erfolgt mit 1:10 1 M Tris/HCl pH 8 und anschließend wurden die Proben für eine SDS-PAGE-Analyse vorbereitet.

6.7. ICP-MS-Analyse

Die Element-Analyse erfolgte durch ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy*). Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine MoeA1, MoeA2 und MoeA3 in der Konzentration 2 mg/ml mit 1 mM Wolframat, Molybdat oder Selenat in Grundpuffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM KCl und pH 7,5) für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Elution mittels Größenausschluss-Chromatographie durch eine PD-10-Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) mit 10 mM MES/KOH pH 7. Die Proben wurden zusammen mit Puffer-Kontrollen durch Herrn Professor Andreas Seubert am Fachbereich Chemie (Universität Marburg) analysiert.

6.8. MALDI-TOF-Analyse

Die Identität der Proteine wurde mittels MALDI-TOF von Herrn Jörg Kahnt (MPI für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg) ermittelt. Das Protein wurde aus der Matrix des Proteingels herausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die Massen der Peptide wurden mit einem 4800 Proteomic Analyzer (MDS Sciex, Concord, ON, Kanada) gemessen. Die MS-Daten wurden mit einer Datenbank unter Verwendung von Mascot (Matrix Science, London, UK) mittels GPS Explorer Software (MDS Sciex, Concord, ON, Kanada) abgeglichen.

6.9. *MicroScale Thermophoresis*

Zur Analyse der Bindungsaffinitäten von MoeA1 und MoeA2 zu den Liganden Wolframat, Molybdat und als Kontrolle Selenat wurde die Methode der *MicroScale Thermophoresis* (MST) angewendet (Duhr und Braun, 2006). Die Experimente wurden mit dem Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH, München) bei 21°C und 50 bis 70 % LED-Intensität durchgeführt. Die Proteine wurden mit dem Monolith NT Protein Labeling Kit RED (NanoTemper Technologies GmbH, München) nach Herstellerangaben mit dem Farbstoff NT-647-Maleimid modifiziert. Als Puffersystem wurde 20 mM HEPES/KOH pH 8 verwendet. Ein Ansatz beinhaltet 200 nM Protein und 0,6 nM bis 20 µM Wolframat, Molybdat oder Selenat. Die verschiedenen Metall-Konzentrationen wurden mit einer Verdünnungsreihe in 1:2-Schritten erstellt. Die Analyse der Daten wurde von Dr. Sven-Andreas Freibert (AG Lill, Universität Marburg) durchgeführt.

6.10. Elektronen-Paramagnetischer-Resonanz-Spektroskopie (EPR)

Die Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus *A. aromaticum* EbN1 wurde wie in Arndt *et al.* (2019) beschrieben angereichert. Die Vorbereitung der Proben wurde unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden zwei Ansätze mit jeweils 200 µl der angereicherten AOR vorbereitet. Ein Ansatz wurde zur Reduktion 2 mM Dithionit hinzugegeben. Danach wurden die Ansätze jeweils in eine Glas-Kapillare frei von Gasblasen pipettiert. Die Kapillare wurde verschlossen und langsam in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Proben wurden zur Messung zur AG von Herrn Professor Antonio Pierik (TU Kaiserslautern) verschickt und dort analysiert.

6.11. *Thermal Shift Assay* (TSA)

Mit dem *Thermal Shift Assay* werden Protein-Liganden-Interaktionen untersucht (Huynh und Partch, 2016). Bei dieser Methode wurden die Protein MoeA1, MoeA2 und MoeA3 bei Gegenwart der Liganden Wolframat oder Molybdat auf Thermostabilität getestet. Zur Visualisierung wird der Farbstoff SYPRO-Orange (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) verwendet, der sich am Protein anlagert. Durch Denaturierung des Proteins dissoziiert der Farbstoff. Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 40 µl bestanden aus 50 µM Protein mit 4 µl SYPRO-Orange (1:62,5 in deionisiertem Wasser) und Wolframat oder Molybdat jeweils in den Konzentrationen 1 mM, 5 mM oder 10 mM. Die Messungen wurden mit dem Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

7. Phylogenetische Analyse

Die Sequenzen für die phylogenetische Analyse wurden mittels BLAST aus der NCBI-Datenbank gesammelt. Mit den entnommenen Sequenzen wurde ein Alignment mit dem Web-Tool ClustelOmega durchgeführt (Sievers *et al.*, 2011). Die Erstellung des phylogenetischen Baums erfolgte mit dem Web-Tool iTol (Letunic und Bork, 2007). Zur Visualisierung der Alignment-Daten wurde das Programm Jalview verwendet (Waterhouse *et al.*, 2009).

8. Strukturanalyse von MoeA2 aus *A. aromaticum* EbN1

Das Protein MoeA2 wurde rekombinant in *E. coli* produziert und mittels Affinitätschromatographie angereichert. Die Vorbereitung der verschiedenen Kristallisationsansätze wurden bei MarXtal (Fachbereich Chemie, Universität Marburg) durchgeführt. Zur weiteren Analyse der Kristalle wurden diese mit oder ohne Kryoprotektans (30 % Glycerin) in flüssigen Stickstoff gelagert und transportiert. Die Röntgenstrukturanalyse wurde an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble (Frankreich) an der Beamline ID23-1 durchgeführt. Zur Prozessierung der Daten wurden verschiedene Programme verwendet. Das Programm XDS wurde zur Indizierung und Integration verwendet (Kabsch, 2010). Die Datenreduktion wurde mit verschiedenen Applikationen der CCP4-Software (Winn *et al.*, 2010; Evans und Murshudov, 2013) durchgeführt. Die Strukturanalyse erfolgte mittels molekularem Ersatz unter Verwendung der MoeA-Struktur aus *E. coli* (PDB: 2NRP) (Nichols *et al.*, 2007). Das *Refinement* wurde mit den Programmen Phenix.refine (Adams *et al.*, 2010) und Coot (Emsley *et al.*, 2010) durchgeführt. Hierbei wurden sowohl das *Refinement* durch die Software (Phenix) anhand der Strukturfaktoren als auch manuell (Coot) durch Anpassung der Struktur in Form von Ausrichtung oder Einbringungen von Liganden anhand der Elektronendichte durchgeführt. Die Strukturauflösung erfolgte in Kooperation mit der AG von Herrn Professor Lars-Oliver Essen am Fachbereich Chemie (Universität Marburg).

Ergebnisse

Teil A: Publikation

Dieser Ergebnisteil ist in zwei Teile unterteilt. Der erste Teil ist die Veröffentlichung in *Frontiers in Microbiology* über der Charakterisierung der AOR aus *Aromatoleum aromaticum* EbN1. Der Veröffentlichung wird eine Zusammenfassung in deutscher Sprache vorangestellt. Der zweite Teil sind fortführende Ergebnisse zur AOR und der Charakterisierung der Maturationsfaktoren aus *A. aromaticum* EbN1 für die Maturation von Molybdän- und Wolframenzymen.

Folgende Publikation wird im Original in dieser Arbeit eingefügt:

Arndt F, Schmitt G, Winiarska A, Saft M, Seubert A, Kahnt J, Heider J (2019) Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes. *Front. Microbiol.* 10, 71, 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2019.00071

Eigenanteil: Planung, Analyse der Daten, Durchführung und Auswertung der Aufreinigung, Aktivitätstest und der phylogenetischen Analyse, Anfertigung des Manuskripts mit JH.

1. Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes

1.1. Zusammenfassung

In dieser Publikation werden die Ergebnisse zur Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus *Aromatoleum aromaticum* EbN1 präsentiert. Dieses Enzym wurde aus einer Mutante dieses Bakterienstamms angereichert, die anaerob mit Phenylalanin als C-Quelle kultiviert wurde. Dieser Mutante fehlt die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase, die in dem anaeroben Abbau von Phenylalanin involviert ist. Stattdessen zeigt diese Mutante eine erhöhte Synthese der

AOR, die die Funktion des fehlenden Enzyms übernimmt. Die AOR katalysiert die Oxidation von verschiedenen Aldehyden zu den korrespondierenden Carbonsäuren. Diese Reaktion findet sowohl mit Benzylviologen (BV) als auch mit NAD als Elektronenakzeptor statt. Die AOR ist ein heterohexameres Enzym, das aus drei Untereinheiten besteht, die in einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Konformation vorliegen. Die katalytische Untereinheit enthält den W-Co und ein [4Fe-4S]-Zentrum, die Elektronen werden auf eine Elektronentransfer-Untereinheit mit vier [4Fe-4S]-Zentren übertragen und die dritte Untereinheit besitzt einen FAD-Cofaktor. Die Cofaktoren wurden mittels Element-Analyse und spektroskopischen Methoden untersucht. Die AOR weist ein pH-Optimum von 8,0 auf und das Temperatur-Optimum liegt bei 40°C. Eine weitere Besonderheit ist die geringere Sensitivität gegenüber Sauerstoff im Vergleich zu archaeellen AOR. Die angereicherte AOR aus *A. aromaticum* EbN1 zeigt an Luft eine Halbwertszeit von 1 h und im Zellextrakt bleibt die Aktivität über 24 h stabil. Für ein aliphatisches und zwei aromatische Substrate wurden die kinetischen Parameter sowohl mit BV als auch mit NAD aufgenommen. Mit BV werden hierbei höhere k_{cat} erreicht. Abschließend wurde die Reduktion von Benzoat zu Benzaldehyd bei einem niedrigen pH-Wert und mit Ti(III)-Citrat als Reduktionsmittel gezeigt. Die AOR ist Teil einer neu postulierten Unterfamilie innerhalb der AOR-Familie, die im Gegensatz zu vielen bekannten AORs aus drei Untereinheiten besteht und NAD als Elektronenakzeptor verwendet.

1.2. Publikation

Artikelkopie beginnt auf der nächsten Seite.



Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes

Fabian Arndt¹, Georg Schmitt¹, Agnieszka Winiarska², Martin Saft¹, Andreas Seubert³, Jörg Kahnt⁴ and Johann Heider^{1,5*}

¹ Faculty of Biology, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany, ² Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Polish Academy of Sciences, Kraków, Poland, ³ Faculty of Chemistry, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany, ⁴ Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Germany, ⁵ LOEWE Center for Synthetic Microbiology, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Ivan A. Berg,
University of Münster, Germany

Reviewed by:

Matthias Boll,
University of Freiburg, Germany
Ralf Rabus,
University of Oldenburg, Germany

*Correspondence:

Johann Heider
heider@biologie.uni-marburg.de

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 29 November 2018

Accepted: 15 January 2019

Published: 31 January 2019

Citation:

Arndt F, Schmitt G, Winiarska A,
Saft M, Seubert A, Kahnt J and
Heider J (2019) Characterization of an
Aldehyde Oxidoreductase From
the Mesophilic Bacterium
Aromatoleum aromaticum EbN1,
a Member of a New Subfamily
of Tungsten-Containing Enzymes.
Front. Microbiol. 10:71.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00071

The biochemical properties of a new tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from the mesophilic betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (AOR_{A_B}) are presented in this study. The enzyme was purified from phenylalanine-grown cells of an overexpressing mutant lacking the gene for an aldehyde dehydrogenase normally involved in anaerobic phenylalanine degradation. AOR_{A_B} catalyzes the oxidation of a broad variety of aldehydes to the respective acids with either viologen dyes or NAD⁺ as electron acceptors. In contrast to previously known AORs, AOR_{A_B} is a heterohexameric protein consisting of three different subunits, a large subunit containing the W-cofactor and an Fe-S cluster, a small subunit containing four Fe-S clusters, and a medium subunit containing an FAD cofactor. The presence of the expected cofactors have been confirmed by elemental analysis and spectrophotometric methods. AOR_{A_B} has a pH optimum of 8.0, a temperature optimum of 40°C and is completely inactive at 50°C. Compared to archaeal AORs, AOR_{A_B} is remarkably resistant against exposure to air, exhibiting a half-life time of 1 h as purified enzyme and being completely unaffected in cell extracts. Kinetic parameters of AOR_{A_B} have been obtained for the oxidation of one aliphatic and two aromatic aldehydes, resulting in about twofold higher k_{cat} values with benzyl viologen than with NAD⁺ as electron acceptor. Finally, we obtained evidence that AOR_{A_B} is also catalyzing the reverse reaction, reduction of benzoate to benzaldehyde, albeit at very low rates and under conditions strongly favoring acid reduction, e.g., low pH and using Ti(III) citrate as electron donor of very low redox potential. AOR_{A_B} appears to be a prototype of a new subfamily of bacterial AOR-like tungsten-enzymes, which differ from the previously known archaeal AORs mostly by their multi-subunit composition, their low sensitivity against oxygen, and the ability to use NAD⁺ as electron acceptor.

Keywords: aldehyde oxidoreductase, tungsten cofactor, Fe-S cluster, flavin, enzyme kinetics

INTRODUCTION

Many bacteria and archaea use either molybdenum (Mo) or tungsten (W) as catalytic transition metals in enzymes catalyzing key steps of metabolism, many of which are of fundamental importance for global nutrient cycles (Hille, 2002; Hille et al., 2014). Molybdo- and tungstoenzymes contain the metal bound by an organic molybdopterin (MPT) cofactor and combine a variety of metabolic capabilities, particularly acting as dehydrogenases, oxidases, hydroxylases, hydratases or reductases (Kletzin and Adams, 1996; Hille, 2002; Hille et al., 2014; Maia et al., 2015). Many molybdo- or tungstoenzymes also contain Fe-S clusters and various other redox active cofactors (Hille et al., 2014; Maia et al., 2015). Based on sequence similarities of their catalytic subunits and similar cofactor compositions, these enzymes are grouped into four distinct enzyme families, the sulfite oxidase, xanthine dehydrogenase, DMSO reductase, and aldehyde oxidoreductase (AOR) families (Kletzin and Adams, 1996; Hille, 2002; Hille et al., 2014; Maia et al., 2015). Among these, W-dependent enzymes are known in the DMSO-reductase family, which contains mostly molybdoenzymes, and in the AOR family, which consists almost exclusively of tungstoenzymes. In both families, the metal is ligated to two MPT-derived cofactors which provide four sulfur ligands. The W-dependent enzymes of the DMSO reductase family contain two molybdopterin guanine dinucleotides (MGD) as ligands per W and are paralogous to Mo-containing isoenzymes, such as formate dehydrogenases, formyl-methanofuran dehydrogenases or nitrate reductases (Maia et al., 2015), whereas the enzymes of the AOR family contain two MPT per W (Chan et al., 1995; Hu et al., 1999). The only AOR-type enzyme described so far as a Mo-enzyme is a poorly characterized α -hydroxyacid oxidoreductase from *Proteus vulgaris* (Trautwein et al., 1994). Most W-dependent enzymes of the AOR family described to date are from hyperthermophilic archaea (Kletzin and Adams, 1996). For example, five hyperthermophilic and extremely O₂-sensitive W-enzymes of the AOR family are encoded in the genome of *Pyrococcus furiosus*, which have all been described as aldehyde oxidoreductases of various specificities (Kletzin and Adams, 1996; Roy and Adams, 2002; Bevers et al., 2005) and represent five separate subfamilies in a phylogenetic tree of the AOR family enzymes (Figure 1). The most important of these are the homodimeric aldehyde oxidoreductases (AOR *sensu stricto*) (Mukund and Adams, 1991), the homotetrameric formaldehyde oxidoreductases (FOR) (Mukund and Adams, 1993), whose structures have been solved (Chan et al., 1995; Hu et al., 1999), and the monomeric glyceraldehyde-3-phosphate oxidoreductases (GAPOR) (Mukund and Adams, 1995). Finally, two further tungsten-containing oxidoreductases, WOR-4 (Roy and Adams, 2002) and WOR-5 (Bevers et al., 2005) have been purified, but their physiological relevance is unknown. Further orthologs of these enzymes have also been characterized from various other hyperthermophilic archaeal species, such as *Thermococcus litoralis* (Kletzin et al., 1995), *T. paralvinellae* (Heider et al., 1995), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Bertram et al., 1994) or *Pyrobaculum aerophilum* (Hagedoorn

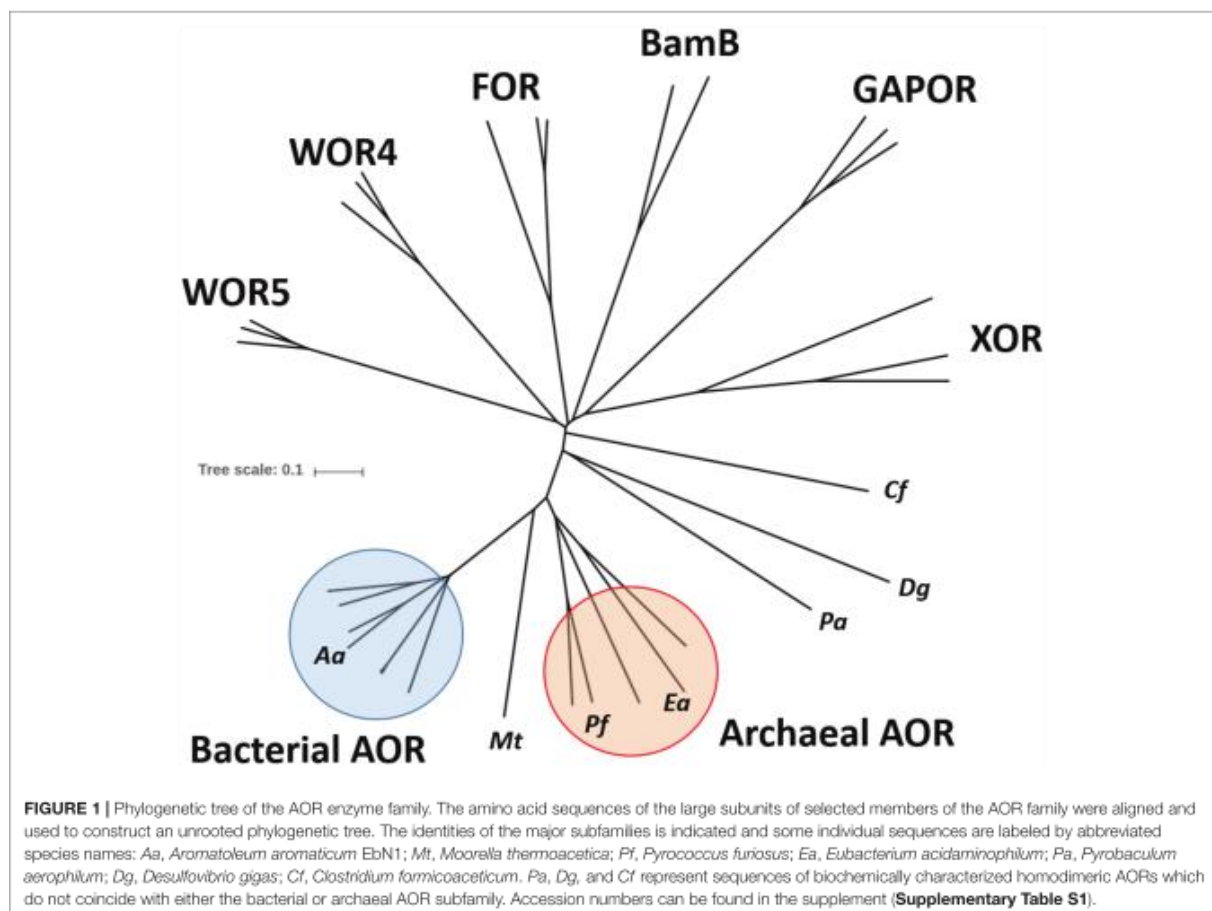
et al., 2005). In addition, they also have been described in some bacteria as "carboxylic acid reductase" (CAR, e.g., in *Moorella thermoacetica*; White et al., 1989; Strobl et al., 1992; Huber et al., 1995), or as AORs from *Clostridium formicoaceticum* (White et al., 1991), *Eubacterium acidaminophilum* (Rauh et al., 2004) or *Desulfovibrio gigas* (Hensgens et al., 1995). Recently, an enzyme of the AOR family from the anaerobic thermophilic bacterial genus *Caldicellulosiruptor* has been identified as a member of a new subclass called XOR (Scott et al., 2015). Finally, a separate branch of W-dependent enzymes of the AOR family was recently discovered in obligatory anaerobic aromatic-degrading bacteria, which were identified as benzoyl-CoA reductases (Kung et al., 2009). These enzymes are very large multi-subunit complexes and contain an AOR-type subunit with a modified W-bis-MPT cofactor, which exhibits an additional unknown small ligand to the W atom (Weinert et al., 2015).

Recently, a tungsten-dependent AOR-like enzyme was detected in the denitrifying betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (Debnar-Daumler et al., 2014). The enzyme is induced during anaerobic growth on phenylalanine (Phe) and a number of other substrates, although the degradation of aldehydes in the respective pathways occurs mainly via NAD(P)⁺-dependent dehydrogenases (Schmitt et al., 2017). Moreover, the amounts of this AOR in different cell batches are usually rather low and the specific activities vary considerably between batches. Therefore, its physiological function is assumed to be the degradation of aldehyde intermediates (e.g., phenylacetaldehyde during Phe metabolism) to avoid accumulation of toxic concentrations. To establish a more reliable source of AOR, a deletion mutant of *A. aromaticum* EbN1 was constructed which lacked the gene for the specific phenylacetaldehyde dehydrogenase (*pdh*) usually employed in anaerobic Phe metabolism. This strain indeed consistently produced AOR in high amounts and specific activities (Schmitt et al., 2017). In this report, we present the purification of *A. aromaticum* EbN1 AOR (henceforth called AOR_{Aa}) from this deletion strain and report its biochemical properties and deviant features from previously known AOR isoenzymes.

MATERIALS AND METHODS

Growth of Bacteria

Aromatoleum aromaticum EbN1 strain SR7 Δ *pdh* (Schmitt et al., 2017) was grown anaerobically in ascorbate-free minimal medium using phenylalanine as sole carbon source and nitrate as electron acceptor, as described previously (Rabus and Widdel, 1995). Phenylalanine and nitrate were supplied at concentrations of 1 and 3.5 mM, respectively, and discontinuously re-fed at the same concentrations when nitrate was consumed. Cultures were incubated at 28°C in stoppered 1 liter flasks or in a 200 L fermenter. Growth was followed by determining the increase in optical density at 578 nm and the consumption of nitrate. The standard culture medium for *A. aromaticum* EbN1 contained 150



nM Na_2MoO_4 and 23 nM Na_2WO_4 and was prepared with deionized water.

Preparation of Cell Extracts

Cells were harvested by centrifugation at $17,000 \times g$ and 4°C for 20 min. Sedimented cells were immediately frozen and stored at -80°C . All further steps were performed under anoxic conditions. For preparation of extracts, cells were suspended in one volume of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) with 10% glycerol or for subsequent chromatographic separation in 20 mM Bis-Tris buffer (pH 6.2) containing 0.05 mg DNase I per ml and 10% glycerol. Cell suspensions were disrupted by sonication or passed thrice through a French pressure cell press. Cell debris and membranes were removed by ultracentrifugation at $100,000 \times g$ and 4°C for 1 h. The supernatants were stored anaerobically with 10% (vol/vol) glycerol at -80°C until use.

Purification of Aldehyde Oxidoreductase

For purification of AOR_{Aa} a three-step strategy was applied under anoxic conditions, using thoroughly degassed buffers at 16°C while collecting fractions at 4°C . Cell extracts were

passed through a $0.45 \mu\text{m}$ filter before application to a column. First, cell-free extracts were loaded to a DEAE-sepharose Fast Flow column (26/12) equilibrated with buffer A (20 mM Bis-Tris buffer, pH 6.2) and AOR was eluted by a step gradient with added buffer B (20 mM Bis-Tris, pH 6.2, 1 M NaCl) to yield 400 mM NaCl. Active fractions were pooled and re-buffered to buffer C (5 mM MES, pH 6.8, 1 mM CaCl_2) using a HiPrep (26/10) desalting column (GE-Healthcare). In a second step, the fractions were applied to a ceramic hydroxyapatite column (CHT-I, 70 ml) equilibrated with buffer C. Fractions with AOR_{Aa} activity eluted early in a linear gradient between buffers C and D (5 mM MES, pH 6.8, 400 mM potassium phosphate pH 6.8) when 15 mM phosphate was applied. The pooled fractions of AOR_{Aa} were concentrated under anoxic conditions by ultrafiltration (Amicon) using a 30 kDa cutoff. Finally, gel filtration on Superdex 200 was performed using a 120 ml column (16/60) equilibrated with buffer E (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl). Activity assays or ultrafiltration was performed anaerobically. Each buffer were supplemented with 10% glycerol (v/v) and AOR fractions were stored anaerobically at -80°C until further use without significant loss of AOR activity.

Enzyme Activity Assays

Enzyme activity were assayed photometrically at 28°C. Activity of AOR_{Aa} was assayed under anoxic conditions as described previously (Schmitt et al., 2017), but using 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) as standard buffer. The reactions were started by the addition of different aldehydes (1 mM) and followed at 600 nm to record reduction of benzylviologen ($\epsilon = 7400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and at 340 nm for reduction of NAD⁺ to NADH ($\epsilon = 3400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectively. The reverse reaction was assayed as reduction of benzoate to benzaldehyde in 50 mM MES/KOH buffer (pH 5.0), containing 1.2 mM Ti(III) citrate, 20–100 mM benzoate and 10–20 μg of protein. This was incubated at 20°C for 15 min, then 3 mM 3-nitrophenylhydrazine were added to the reaction mixture to trap the aldehydes formed, and the assays were incubated for additional 2–3 h. The analysis of the products was performed by TLC using Silica gel 60 F₂₅₄ material (Merck). The TLC plates were loaded with 15–20 μl of the reaction mixtures or appropriate controls and developed using a mobile phase of toluene/acetone/isopropanol/acetic acid (17:3:3:1).

Flavin Cofactor Analysis

Flavin cofactor contents were determined as described in Leutwein and Heider (2002). Cofactor of purified AOR was released by denaturation for 10 min at 95°C and subsequent centrifugation (17,000 $\times g$, 10 min). The supernatant was used for UV-Vis- and fluorescence spectroscopy. Phosphodiesterase (80 mU/ml) was added to the supernatant to observe changes in flavin fluorescence. The flavin content was estimated from UV-Vis spectrum by the molar extinction coefficient of FAD at 450 nm ($\epsilon = 11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), fluorescence intensity was determined by excitation at 450 nm and emission at 524 nm. For quantification a freshly prepared FAD solution was used.

Phylogenetic Analysis

The amino acid sequences of tungsten containing oxidoreductases were analyzed by BLAST searches against the NCBI database using default settings. Alignment of selected sequences was performed by Clustal Omega¹ (Sievers et al., 2011), and phylogenetic trees were constructed by iTol² (Letunic and Bork, 2007).

Other Methods

Protein concentration was determined by the method of Bradford using bovine serum albumin as standard (Coligan et al., 2004). Proteins were separated by discontinuous SDS-PAGE. Molecular masses of proteins were estimated by gel filtration (Superdex 200) and Ferguson plots, using non-denaturing gel electrophoresis with polyacrylamide concentrations of 6, 7, 8, and 10% (Coligan et al., 2004). Standards were bovine serum albumin and its oligomers (67–268 kDa) and ovalbumin (45 kDa). Metal contents of protein fractions with enriched AOR activities and of respective controls were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The identities of proteins separated by SDS-PAGE were determined from the masses of

tryptic fragments, using a 4800 Proteomics Analyzer (MDS Sciex, Concord, ON, Canada). MS data were evaluated against an in-house database using Mascot embedded into GPS explorer software (MDS Sciex, Concord, ON, Canada).

RESULTS

Purification of AOR_{Aa}

We have reported previously that *A. aromaticum* EbN1 produces a W-containing AOR (AOR_{Aa}) when grown under nitrate-reducing conditions with phenylalanine (Phe), which catalyzes the same reaction of the degradation pathway as a simultaneously induced phenylacetaldehyde dehydrogenase (PDH), oxidation of phenylacetaldehyde to phenylacetate (Debnar-Daumler et al., 2014; Schmitt et al., 2017). Unfortunately, the amount of AOR_{Aa} present in cell extracts has been found to be unreliable in different cell batches and too low to allow its purification (Debnar-Daumler et al., 2014). Therefore, we constructed a mutant of *A. aromaticum* EbN1 in which the *pdh* gene was deleted and replaced by a gentamicin resistance gene, leaving only AOR_{Aa} to contribute to phenylacetaldehyde oxidation. When grown with Phe, this mutant indeed reliably contained five-fold higher AOR_{Aa} activities than observed in wild type cells (Schmitt et al., 2017). The mutant was grown in 30 l-scale on Phe to produce cell mass for the purification of the enzyme. Because the W-content of the first enzyme preparation was lower than expected, the tungstate concentration was increased from 23 nM of the standard medium to 400 nM for the fermenter culture. The measured doubling time of 33 h was similar to that measured in 1-l-cultures, corresponding to a derived consumption rate of 6–11 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹. The fermenter culture yielded 108 g wet cell mass per 30 L, which was used to purify AOR_{Aa}.

Cell extracts were produced by breaking the suspended cells via a French press cell and centrifugation for 1 h at 100,000 $\times g$. The extracts contained BV-coupled AOR_{Aa} activities with a specific activity of 0.278 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. AOR_{Aa} was purified by column chromatography under anoxic conditions. Purification included subsequent chromatographic steps on DEAE-sepharose, hydroxyapatite and gel filtration on Superdex 200. A typical enrichment protocol is given in Table 1, and an SDS-gel analysis of the respective fractions is shown in Figure 2. AOR was enriched about 70-fold with a recovery of 29%, suggesting an abundance of ca. 1.5% of the total soluble protein content in the cells.

Molecular and Spectroscopic Properties

Surprisingly, purified AOR_{Aa} consisted of three different subunits of 66, 46, and 17 kDa, which were separated by SDS-PAGE (Figure 2), contrasting to the previously known single subunit AORs present in Archaea (Mukund and Adams, 1991; Heider et al., 1995). Analysis of the respective Coomassie-stained bands from SDS-gels by MALDI-TOF analysis of tryptic fragments confirmed their identity as the gene products of *ebA5004*, *ebA5005*, and *ebA5007* from the genome of *A. aromaticum* EbN1 (Rabus et al., 2005), which were therefore renamed *aorABC* (Supplementary Table S2). The *aorA* gene codes for

¹<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

²<https://itol.embl.de/>

TABLE 1 | Purification of AOR_{Aa}.

Step	Protein [g]	Activity [kU]	Yield [%]	Sp. act. (PAld) [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	Enrichment
Soluble cell extract	10.4	2.9	100	0.28	1.0
DEAE Sepharose	1.40	2.1	82	1.4	5.4
Hydroxyapatite (CHT-I)	0.289	2.0	72	7.0	26
Superdex 200	0.044	0.82	29	19	70

Specific activities are given in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (U), using an enzyme assay with phenylacetaldehyde as substrate and BV as electron acceptor.

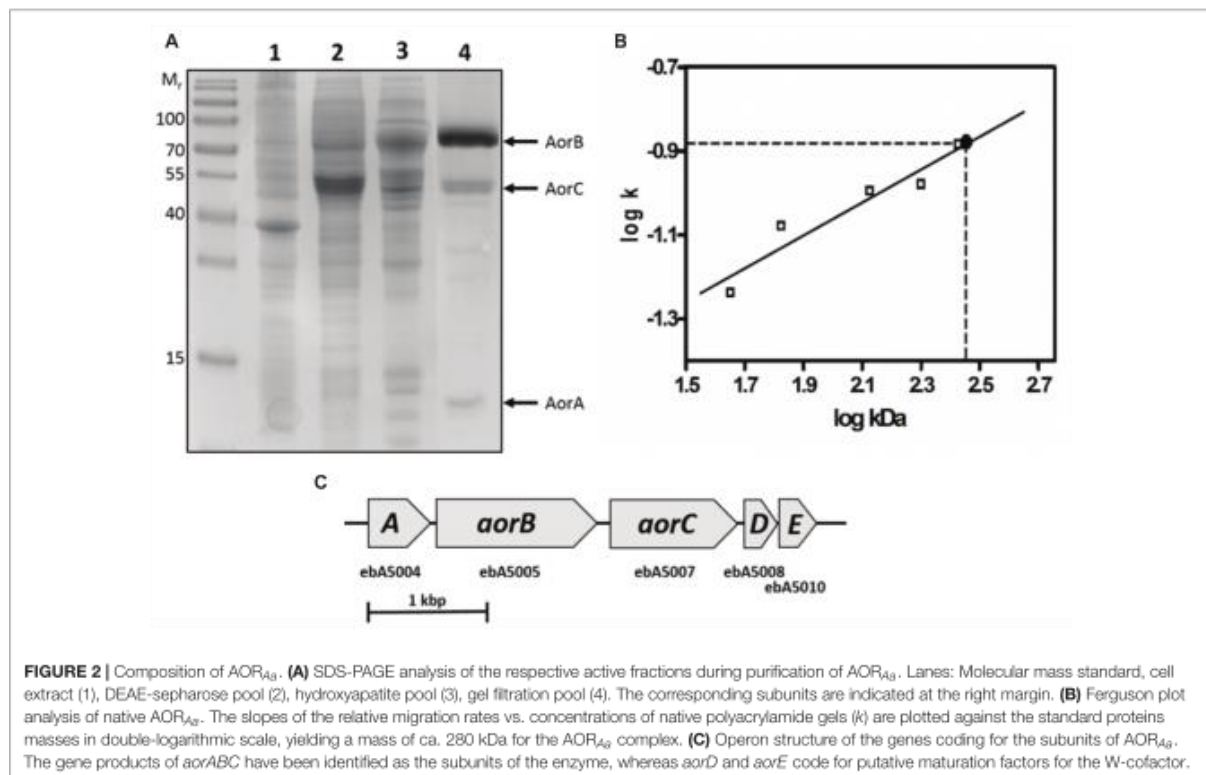


FIGURE 2 | Composition of AOR_{Aa}. **(A)** SDS-PAGE analysis of the respective active fractions during purification of AOR_{Aa}. Lanes: Molecular mass standard, cell extract (1), DEAE-sepharose pool (2), hydroxyapatite pool (3), gel filtration pool (4). The corresponding subunits are indicated at the right margin. **(B)** Ferguson plot analysis of native AOR_{Aa}. The slopes of the relative migration rates vs. concentrations of native polyacrylamide gels (k) are plotted against the standard protein masses in double-logarithmic scale, yielding a mass of ca. 280 kDa for the AOR_{Aa} complex. **(C)** Operon structure of the genes coding for the subunits of AOR_{Aa}. The gene products of *aorABC* have been identified as the subunits of the enzyme, whereas *aorD* and *aorE* code for putative maturation factors for the W-cofactor.

the small subunit which is predicted to contain four $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -clusters, *aorB* codes for the W-cofactor binding large subunit predicted to contain another $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -cluster, and *aorC* codes for a predicted FAD-containing medium-sized subunit. Moreover, the operon appears to contain two additional genes, *aorD* and *aorE* (Figure 2), which code for proteins resembling the Mo-cofactor maturation factor MoaD. These proteins were not present in the purified enzyme, but may play a role in W-cofactor biosynthesis. The native mass of AOR_{Aa} was determined by gel filtration and Ferguson plot analysis (Figure 2) as approximately 280 kDa, suggesting an $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ composition of the enzyme.

An elemental analysis of purified AOR_{Aa} by ICP-MS analysis revealed the presence of 1.8 W, 38 Fe, 6.2 P, and 2.3 Mg per $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ holoenzyme, whereas no traces of Mo were detected (Table 2). Except for the P-content, these values fit very well with the expected cofactor content based on the structure of archaeal AOR and the predictions from the sequences, namely two W (in AorB), ten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -clusters (in AorA and AorB), two Mg and four

P as constituents of the W-cofactors in AorB, and four more P in the FAD cofactors of AorC. We only recorded a lower content of P than expected (6.2 instead of 8) which may be explained by a partial occupancy of the AorC subunits with FAD cofactors. This interpretation is supported by the element composition of a preliminary batch of purified AOR_{Aa} from cells grown with a lower tungstate concentration, which contained only 0.4 W, 4.4 P, and 1.0 Mg, but 50 Fe per $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ holoenzyme, suggesting a full $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -cluster content, but only partial occupancy of both the W- and the FAD-cofactors in this preparation (Table 2). Taking the Mg content of this preparation as indication of the presence of total MPT cofactors (1 Mg corresponds to 2 P), the remaining P content of 2.4 suggests a very similar FAD content in both AOR_{Aa} preparations.

The presence of FAD in AOR_{Aa} was confirmed by fluorescence spectroscopy. The supernatant of heat-inactivated enzyme exhibited a typical flavin spectrum with an excitation maximum at 450 nm, and an emission maximum at 528 nm. Subsequent

TABLE 2 | Elemental composition of AOR_{Aa}.

Element	AOR _{Aa} batch 1 [mol/mol AOR]	AOR _{Aa} batch 2 [mol/mol AOR]	Expected
W	0.37	1.77	2
Mo	n.d.	n.d.	0
Fe	50.9	38.3	40
P	4.37	6.19	8
Mg	1.01	2.32	2

ICP/MS analysis of two batches of purified AOR from *A. aromaticum* EbN1. Batch 1 was from cells grown in standard medium (23 nM tungstate), batch 2 was from cells supplied with an elevated tungstate concentration (400 nM). Values are calculated for a predicted size of the AOR_{Aa} complex of 260 kDa. The expected values are based on a hypothetical $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ composition containing the predicted cofactors. n.d., not detected.

treatment with phosphodiesterase led to a five-fold increased fluorescence at pH 7, indicating the presence of FAD (Figure 3). The flavin content was estimated by comparing the fluorescence at 528 nm after phosphodiesterase treatment with an FMN standard and yielded 0.6 mol flavin per mol $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ holoenzyme. This represents an even lower FAD content than inferred by the P content, suggesting that some flavin may have been lost by coprecipitation with the denatured protein.

The UV-Vis spectrum of AOR_{Aa} is indicative of a protein containing [Fe₄S₄]-clusters, exhibiting a broad absorption shoulder at 400–450 nm. The flavin cofactors were not visible in the spectra, probably because the Fe-S-clusters dominated the spectra due to their high extinction coefficients (Roat-Malone, 2003). As expected, the absorbance of the [Fe₄S₄]-clusters was quenched upon their reduction, either by the substrate phenylacetaldehyde or by the unspecific reductant dithionite (Figure 3). The recorded absorption value of 0.3 at 390 nm for the preparation of AOR_{Aa} used in this experiment (2 μ M of holoenzyme) is consistent with the expected value for 10 [Fe₄S₄]-clusters (assuming a partial extinction coefficient per Fe

of 3.8 mM⁻¹ cm⁻¹; Roat-Malone, 2003). Moreover, stepwise reduction with either phenylacetaldehyde or dithionite indicated full reduction at 15–20 μ M reductant (Figure 3), which correlates well with the predicted electron loading capacity of 18 electrons per AOR holoenzyme (two W-cofactors equal four, 10 [Fe₄S₄]-clusters equal ten, and two FAD cofactors equal four electrons).

Dependence of AOR_{Aa} on pH and Temperature

We have recorded the pH dependence of the BV- and NAD⁺-coupled reactions of AOR_{Aa} separately and obtained optima at pH 8.0 for the oxidation of phenylacetaldehyde with either electron acceptor, using a Tris-HCl buffer system (data not shown). Moreover, we recorded the temperature dependence of AOR, using the BV-coupled oxidation of phenylacetaldehyde. We obtained a relatively high temperature optimum of 40°C, compared to the growth range of the host organism which does not extend to more than 30°C (Rabus and Widdel, 1995). The activity profile of AOR fitted well to the Arrhenius equation between 4°C and the maximum at 40°C, then the activity declined steeply to none at more than 50°C (Figure 4). We calculated an activation energy of 33 kJ/mol from the exponential part of the curve.

In contrast to archaeal AOR, AOR_{Aa} appeared to be much more stable when exposed to air, especially in crude cell extracts. We therefore investigated its stability to air exposure at different stages of the purification. We confirmed our initial observation that AOR_{Aa} is completely unaffected by air in cell extracts and still showed 100% activity after 24 h of exposure, as compared to control experiments with anaerobically incubated enzyme. However, oxygen sensitivity of the enzyme was observed at the later steps during its purification, which apparently increased with the purity of AOR_{Aa} (Figure 5). Pure AOR_{Aa} showed a half-life time of 1 h in air and was almost completely inactivated after 3 h, whereas an anaerobically incubated aliquot retained

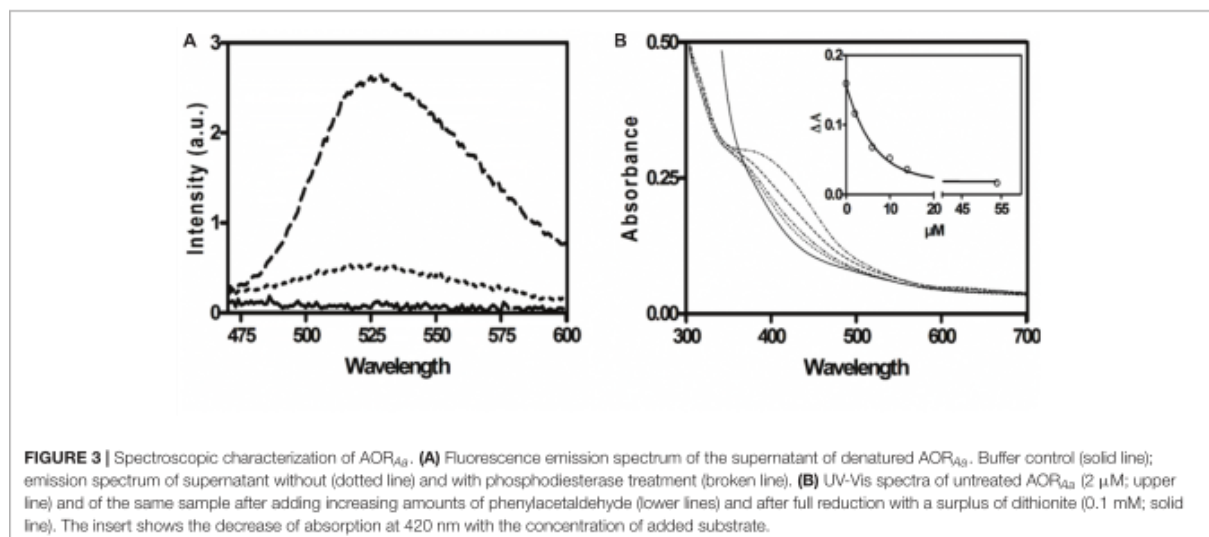


FIGURE 3 | Spectroscopic characterization of AOR_{Aa}. **(A)** Fluorescence emission spectrum of the supernatant of denatured AOR_{Aa}. Buffer control (solid line); emission spectrum of supernatant without (dotted line) and with phosphodiesterase treatment (broken line). **(B)** UV-Vis spectra of untreated AOR_{Aa} (2 μ M; upper line) and of the same sample after adding increasing amounts of phenylacetaldehyde (lower lines) and after full reduction with a surplus of dithionite (0.1 mM; solid line). The insert shows the decrease of absorption at 420 nm with the concentration of added substrate.

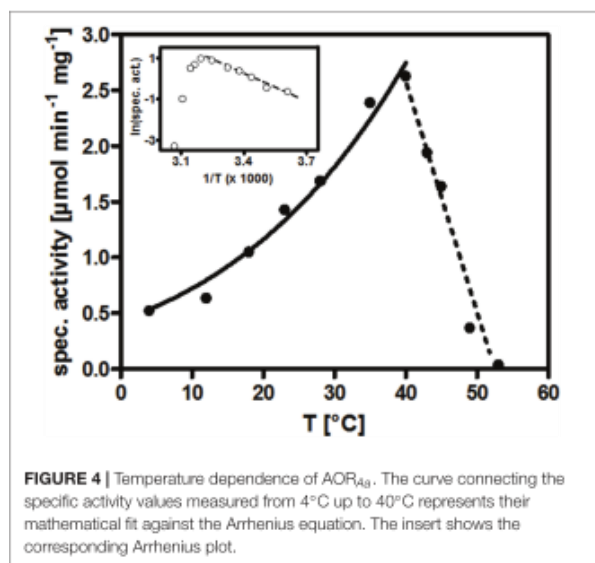


FIGURE 4 | Temperature dependence of AOR_{Aa}. The curve connecting the specific activity values measured from 4°C up to 40°C represents their mathematical fit against the Arrhenius equation. The insert shows the corresponding Arrhenius plot.

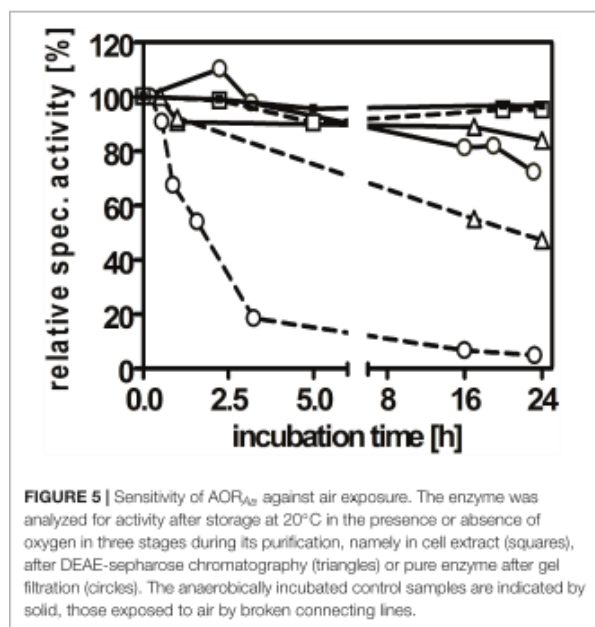


FIGURE 5 | Sensitivity of AOR_{Aa} against air exposure. The enzyme was analyzed for activity after storage at 20°C in the presence or absence of oxygen in three stages during its purification, namely in cell extract (squares), after DEAE-spharose chromatography (triangles) or pure enzyme after gel filtration (circles). The anaerobically incubated control samples are indicated by solid, those exposed to air by broken connecting lines.

full activity for 24 h (Figure 5). Therefore, AOR_{Aa} appears to be protected by additional factors against oxygen inactivation in the extract, but the pure enzyme still is remarkably stable in air on its own, compared to the archaeal AOR enzymes, which are inactivated within minutes of exposure (Mukund and Adams, 1991; Heider et al., 1995).

Catalytic Properties of AOR_{Aa}

Because of the presence of the additional subunits of AOR_{Aa} compared to the archaeal enzymes, we presumed that it may accept NAD⁺ or NADP⁺ as additional electron acceptors next

TABLE 3 | Substrate spectrum of AOR_{Aa}.

Substrate	Spec. activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Electron acceptor
Phenylacetaldehyde	25.1	BV
Benzaldehyde	23.6	BV
Acetaldehyde	19.9	BV
Propionaldehyde	12.3	BV
Crotonaldehyde	12.0	BV
Glyceraldehyde	10.3	BV
2-Aminobenzaldehyde	6.58	BV
Glutardialdehyde	6.11	BV
Formaldehyde	4.14	BV
p-Hydroxybenzaldehyde	3.74	BV
Benzaldehyde	12.0	NAD ⁺
Phenylacetaldehyde	11.2	NAD ⁺
Acetaldehyde	9.60	NAD ⁺
Crotonaldehyde	8.95	NAD ⁺

Substrate specificity of AOR from *A. aromaticum* EbN1 with either benzyl viologen (BV) or NAD⁺ as electron acceptors. Standard deviations were less than 15%.

to viologen dyes. Indeed, we recorded high activities of aldehyde oxidation with NAD⁺ as electron acceptor using purified AOR_{Aa}, but none with NADP⁺. The NAD⁺-coupled specific activities were lower than those coupled with BV and ranged at around 45–75% of the latter, dependent on the substrate used (Table 3). AOR_{Aa} showed a very broad substrate range and oxidized every tested aldehyde to some extent. The highest activities were obtained with phenylacetaldehyde and benzaldehyde, but also many aliphatic aldehydes like acetaldehyde, propionaldehyde, crotonaldehyde, and glyceraldehyde were turned over with high rates. The rates were somewhat lower for substituted aromatic aldehydes, glutardialdehyde and formaldehyde (Table 3).

Finally, we determined the kinetic parameters for the oxidation of three model substrates with either BV or NAD⁺ as electron acceptors. The selected substrates consisted of one aliphatic and two aromatic aldehydes, acetaldehyde, phenylacetaldehyde, and benzaldehyde. All of them exhibited a 2 to 2.6-fold higher apparent maximal turnover rate with BV than with NAD⁺ as electron acceptor and their kinetics could be fitted well against the Michaelis–Menten equation (Table 4). The measured V_{max} values were similar to the previously observed rates in the survey of various substrates (Table 4) and represent apparent turnover numbers (k_{cat} values) of 81–103 s⁻¹ with BV, and of 35–43 s⁻¹ with NAD⁺ as electron acceptors. The highest apparent K_m value were recorded for acetaldehyde, whereas that for phenylacetaldehyde was about 50% lower, and the lowest value was obtained for benzaldehyde. The latter substrate also showed significantly different apparent K_m values in its reactions with the two electron acceptors (sevenfold lower with NAD⁺), whereas the apparent K_m values of the other two substrates were similar with either electron acceptor. Because of the low apparent K_m values, the catalytic efficiency was best for benzaldehyde, followed by that for phenylacetaldehyde and acetaldehyde. This may be taken as indication that AOR_{Aa} may have evolved to convert mainly aromatic aldehydes generated from the very

TABLE 4 | Apparent kinetic parameters of AOR_{Aa}.

Substrate	V _{max} [μmol min ⁻¹ mg ⁻¹]	K _m [μM]	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _m [μM ⁻¹ s ⁻¹]	R ²	Electron acceptor
Phenylacetaldehyde	9.3	75	40	0.53	0.98	NAD ⁺
Phenylacetaldehyde	18.9	82	81	0.99	0.96	BV
Benzaldehyde	8.0	10	35	3.50	0.86	NAD ⁺
Benzaldehyde	21.4	67	92	1.38	0.94	BV
Acetaldehyde	10.1	155	43	0.27	0.83	NAD ⁺
Acetaldehyde	23.8	141	103	0.73	0.89	BV
NAD ⁺	12.5	63	54	0.86	0.94	n.a.
BV	21.2	23	91	3.96	0.84	n.a.

The oxidation of three different aldehydes was assayed with either BV or NAD⁺ as electron acceptors, the apparent kinetic parameters for BV and NAD⁺ were assayed with 1 mM benzaldehyde as substrate. Values for k_{cat} are given per AOR holoenzyme (α₂β₂γ₂-complex of 260 kDa). R² values indicate the respective quality of mathematical fitting against the Michaelis–Menten equation. n.a., not applicable.

extensive metabolism of aromatic compounds in *A. aromaticum* EbN1 (Rabus et al., 2005; Wöhlbrand et al., 2007; Rabus et al., 2014). The apparent kinetic parameters were also determined for the electron acceptors BV and NAD⁺ with phenylacetaldehyde as substrate, establishing plausible apparent K_m values of 12.5 μM for NAD⁺ and 21.2 μM for BV.

The previously described thermophilic AOR orthologs from Archaea or *M. thermoacetica* have been reported to slowly reduce organic acids directly to the corresponding aldehydes, if the thermodynamic equilibrium is favorable for this reaction by low pH values and/or the presence of semicarbazide or alcohol dehydrogenases removing the aldehydes from equilibrium (White et al., 1989; Heider et al., 1995; Huber et al., 1995). Therefore, we tested AOR_{Aa} for this activity, using benzoate as substrate in the presence of 3-nitrophenylhydrazine to trap the generated aldehydes, and either reduced methyl viologen (MV) or Ti(III) citrate as electron donors. None of the experiments with dithionite-reduced MV showed any indications of generating the expected benzaldehyde (data not shown), but we identified a red colored conversion product from benzoate in assays with Ti(III) citrate by TLC analysis and compared it to products of non-enzymatic controls, in which benzaldehyde and 3-nitrophenylhydrazine had been co-incubated under the same conditions (Figure 6). All compounds present in the assay were identified by comigrating controls and showed the following R_f values: benzoate, 0.65; benzaldehyde, 0.88; 3-nitrophenylhydrazine, 0.76. Mixtures of benzaldehyde and 3-nitrophenylhydrazine yielded two different products in the absence or presence of Ti(III) citrate, which migrated with R_f values of 0.84 and 0.38, respectively (Figure 6). The product observed in the enzyme assays comigrated with the latter compound (R_f = 0.38). The apparent generation of benzaldehyde was also observed when small concentrations of MV (1–10 μM) were added to the assay [containing 1.2 mM Ti(III) citrate], but not in the presence of equimolar concentrations of both redox mediators (both 1 mM). Because of the high concentration of Ti(III) citrate and the long incubation periods necessary to detect products (2–3 h), which precluded any spectrophotometric assay, we could only estimate the rates of this reaction by comparing the intensities of the observed spots on TLC plates with various concentrations of control assays with benzaldehyde. Based on these data, we observed very slow rates of 1–20 nmol min⁻¹ mg

protein⁻¹ for the reverse reaction of AOR_{Aa}, which equal to less than 0.1% of the rate of the forward reaction.

DISCUSSION

AOR_{Aa} is the first aldehyde-oxidizing tungstoenzyme isolated from a mesophilic and facultatively anaerobic bacterium. The previously known members of this enzyme family are all from obligatory anaerobic Archaea or Bacteria, and the best characterized examples are from hyperthermophilic *Thermococcus* or *Pyrococcus* species or from the thermophilic bacterium *Moorella thermoacetica* (Huber et al., 1995; Kletzin and Adams, 1996). All of the previously characterized isoenzymes of the AOR subfamily have been characterized as homodimers of one subunit, except for AOR of *M. thermoacetica* (AOR_{Mt}) which has been described with different subunit compositions in different studies (White et al., 1989; Strobl et al., 1992; Huber et al., 1995). Since the operon structures are identical between *A. aromaticum* EbN1 and *M. thermoacetica* it is very likely that the enzymes of both species consist of three subunits in an α₂β₂γ₂ composition, as indicated in the latest available study on AOR_{Mt} (Huber et al., 1995). We assume that the work on AOR_{Mt} suffered from the same complications we experienced with AOR_{Aa}, which was only accessible in sufficient amounts for proper purification after the cells were forced to produce it for Phe degradation after deleting the *pdh* gene (Schmitt et al., 2017). Both AOR_{Aa} and AOR_{Mt} do not contain two typical conserved amino acids of archaeal AOR which are involved in binding a single bridging iron ion between the subunits of the homodimer, providing additional evidence for a structural difference. The composition of AOR_{Aa} as heterohexamer of three different subunits led us to propose a hypothetical structure of the enzyme as shown in Figure 7, which connects the active site W-cofactor in AorB via the Fe-S clusters of AorB and AorA to the FAD cofactor in AorC, which represents the most likely reactive site for electron transfer to NAD⁺. The alternative electron acceptor BV probably receives electrons by interacting directly with one of the Fe-S clusters of the electron transfer pathway, as assumed for the archaeal AORs (Kletzin and Adams, 1996).

AOR_{Aa} shows the typical broad substrate specificity recognized for archaeal AOR or AOR_{Mt} (Heider et al., 1995;

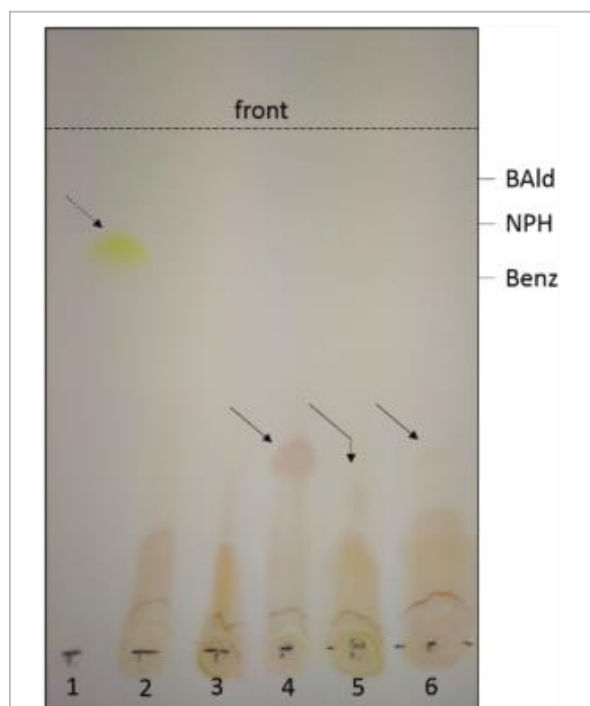


FIGURE 6 | Reverse reaction of AOR_{Aa}. Only the visible spots observed after TLC analysis are shown; the migration positions of benzoate (Benz), benzaldehyde (BAld) and 3-nitrophenylhydrazine (NPH) were detected by fluorescence quenching using the respective pure compounds as controls. The broken arrow shows the product formed from BAld and NPH in the absence, the solid arrows the product formed in the presence of Ti(III) citrate. Lanes: (1) apparent hydrazone formed from mixing BAld and NPH (without reductant); all other lanes show experiments containing 1.2 mM Ti(III) citrate; (2) control of NPH; (3) control of mixed NPH and Benz (60 mM); (4) control of mixed NPH and BAld; (5) purified AOR with NPH and Benz (100 mM), and (6) with NPH and Benz (60 mM). The slightly deviant migration of the product in lane (5) appears to be an experimental artifact, since the same sample comigrated with the control in a subsequent TLC analysis.

Huber et al., 1995). We have already shown previously that *A. aromaticum* EbN1 produces this enzyme under various growth conditions, especially when a substrate is degraded via an aldehyde intermediate, for example during degradation of benzyl alcohol or benzaldehyde (Schmitt et al., 2017). These observations substantiate a potential primary function of AOR-type enzymes in aldehyde detoxification (Kletzin and Adams, 1996; Schmitt et al., 2017). The observed reactivity of AOR_{Aa} with BV as electron acceptor indicates that a ferredoxin acts as natural electron acceptor in the cells, as known for archaeal AOR (Kletzin and Adams, 1996). Since the genome of *A. aromaticum* EbN1 contains multiple genes for ferredoxins (Rabus et al., 2005), we still have to identify which ferredoxin may be physiologically linked to AOR_{Aa}. This will then open up further studies to study the reaction for either competitive or synergistic effects of the two electron acceptors, ferredoxin and NAD⁺. The observed differences in specific activities with either BV or NAD⁺ as

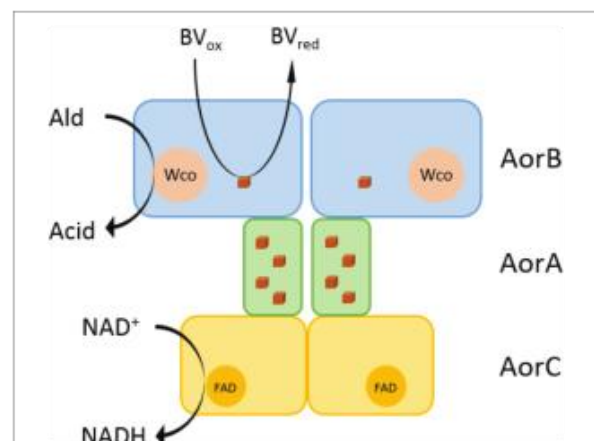


FIGURE 7 | Hypothetical structure of the AOR_{Aa} enzyme complex. AOR_{Aa} is proposed to consist of three subunits in an $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ composition. AorB is predicted to contain the tungsten cofactor (Wco) as catalytic center and one Fe₄S₄ cluster. The electron transfer subunit AorA contains four Fe₄S₄ clusters, and AorC contains an FAD cofactor, which are involved in proposed electron transfer pathways from aldehyde oxidation either to benzyl viologen or NAD⁺ as electron acceptors.

electron acceptor may either reflect different preferences of AOR_{Aa} for the respective reactants or may be a consequence of the recorded partial lack of FAD cofactors, which may slow down the reaction with NAD⁺.

A very profound difference between AOR_{Aa} and archaeal AORs is the observed high tolerance against oxygen. While AOR isoenzymes from Archaea belong to the most oxygen-sensitive enzymes known, the enzyme complex from *A. aromaticum* EbN1 retained full activity after 24 h of exposure to air in extracts and was inactivated only relatively slowly as a purified enzyme, using BV as electron acceptor. Since a similar half-life time after exposure to air as observed for AOR_{Aa} was also reported for AOR_{Mt} (Huber et al., 1995), it may be speculated that the additional redox cofactors in these enzymes complex could be involved in protecting the active site from damage by reactive oxygen species by keeping it in the oxidized state. The additional stabilization in cell extract that we observed for AOR_{Aa} is obviously mediated by other factors, probably by consuming oxygen fast enough to prevent it from interacting with AOR_{Aa}.

Another obvious difference of AOR_{Aa} to archaeal AOR relates to the temperature dependence of the enzymes. Looking at similar predicted enzymes from sequenced genomes, AOR_{Aa} belongs to a large branch of enzymes from mesophilic bacteria with an aerobic or denitrifying physiology. The data on AOR_{Aa} showed a temperature optimum of 40°C, which is 10°C higher than the maximum growth temperature of *A. aromaticum* EbN1 (Rabus and Widdel, 1995), whereas the enzymes from hyperthermophilic archaea are virtually inactive at these temperatures and reach their optima only at 90–100°C (Mukund and Adams, 1991; Heider et al.,

1995). Interestingly, the structurally related AOR_{Mt} shows a very similar temperature optimum of 46°C (Huber et al., 1995), despite coming from a thermophilic bacterium with an optimum growth temperature of 60°C (Wiegel, 2009). Adaptation of AOR_{Mt} to higher temperatures seems to consist in a shallower temperature-dependent deactivation curve than observed for AOR_{Aa}, because the enzyme was reported to show still 60% activity at 70°C (Huber et al., 1995). Therefore, the complex “bacterial” type of AOR may be better suited for reactivity at lower to moderately thermophilic temperatures, whereas the more compact homodimeric structures of archaeal AOR may confer more intrinsic stability against denaturation, allowing reactivity at higher temperatures.

A characteristic property only known from members of the subfamily of AOR-like enzymes is their ability to catalyze the reverse reaction, direct reduction of acids to the respective aldehydes (Kletzin and Adams, 1996; Basen et al., 2014). In particular, this has been observed for archaeal AOR, using reduced MV (Heider et al., 1995), and for AOR_{Mt}, using reduced carbamoyl methyl viologen as electron donor, both at low pH values around pH 5–6 (Huber et al., 1995). However, the rates of the reverse reactions were very low and ranged only at less than 0.3% of the respective aldehyde oxidation rates. We did not observe acid reduction by AOR_{Aa} under the previously described conditions, but needed to set up even more favorable reaction conditions, including low pH, high substrate concentrations, trapping of the aldehydes by hydrazine derivatives, and applying the strong reductant Ti(III) citrate ($E^{\circ'} = -480$ mV) to observe very slow reduction of benzoate to benzaldehyde. Therefore, the discrepancy between the rates of aldehyde oxidation and the estimated value of acid reduction seems to be even larger for AOR_{Aa} than for the previously investigated AORs. A potential explanation of these differences might involve the influence of temperature on the thermodynamics of the process. Using Gibbs enthalpies of formation $\Delta G_f^{\circ'}$ (Dean, 1992), a redox potential of $E^{\circ'} = -0.51$ V can be calculated for the redox couple benzaldehyde/benzoic acid ($\Delta G_f^{\circ'}$ is only available for undissociated benzoic acid). This calculated value is a good estimation for the upper limit for the couple benzaldehyde/aqueous benzoate, since the experiments were performed at pH values close to its pK_a (4.2). For comparison, the calculated standard potential of the redox couple acetaldehyde/acetic acid is $E^{\circ'} = -0.51$ V, whereas those for the couple acetaldehyde/acetate are $E^{\circ'} = -0.62$ V at pH 7 and $E = -0.56$ V at pH 5 (using $\Delta G_f^{\circ'}$ values from Thauer et al., 1977). Therefore, benzoate (or acetate) reduction is endergonic under standard conditions with either reduced MV ($E^{\circ'} = -0.44$ V) or Ti(III) citrate ($E^{\circ'} = -0.48$ V) as electron donor and only becomes feasible under non-standard conditions according to $\Delta G' = \Delta G^{\circ'} + RT \ln K$. To achieve this, the equilibrium term K needs to yield a negative $\ln K$ value (i.e., higher substrate concentrations than those of the products to pull the reaction), and higher temperatures promote this effect. Therefore, the stronger reductant Ti(III) citrate may be required to catalyze acid reduction at room temperature, while reduced MV is sufficient under hyperthermophilic conditions.

The potential direct reduction of acids to aldehydes by AOR-like enzymes has recently been recognized as interesting biotechnological asset, because this would enable the production of alcohols from syngas, a cheap resource consisting of CO, CO₂, and H₂. Acetogenic microorganisms are able to grow by converting syngas to acetate, but do not generate enough energy to allow an ATP-dependent activation of acetate, which is required for any other known pathway of acid reduction. It has already been shown that fermentation pathways normally ending with acetate can indeed be redirected toward ethanol generation by coupling an endogenous acetate-reducing AOR reaction to the further reduction of acetaldehyde to ethanol by a recombinantly synthesized alcohol dehydrogenase in *Pyrococcus furiosus* (Basen et al., 2014; Keller et al., 2017). AOR_{Aa} and the related enzymes from mesophilic bacteria may be employed in similar processes in mesophilic oxygen-tolerant organisms, which should be handled with much more ease in biotechnology laboratories than strictly anaerobic hyperthermophiles.

A view on the amino acid sequence relatedness of the large subunits of the members of the AOR enzyme family (Figure 1) shows that archaeal and bacterial AOR should be regarded as separate subfamilies in addition to the previously known ones, represented by FOR, GAPOR, WOR4, WOR5, XOR, and benzoyl-CoA reductase (BamB subunit). All these subfamilies are clearly distinct entities, as indicated by the respective sequence identity values, which are shown in Table 5 for the subunits of AOR_{Aa} and some selected members of the various subfamilies. Note that the previously known archaeal AORs also contain some sequences from anaerobic bacterial species, such as *E. acidaminophilum*, while the bacterial AORs are found in aerobic/denitrifying mesophilic bacteria. As judged from the organization of the respective operons, all enzymes of the archaeal AOR branch are homodimeric, whereas all bacterial

TABLE 5 | Identities of the subunits of selected members of the AOR family in relation to those of AOR_{Aa}.

Species	Type	AorA	AorB	AorC
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	AOR	100%	100%	100%
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	AOR	69%	74%	62%
<i>Moraxella thermoacetica</i>	AOR	40%	54%	34%
<i>Pyrococcus furiosus</i>	AOR	n.a.	50%	n.a.
	FOR	n.a.	34%	n.a.
	WOR4	n.a.	34%	n.a.
	WOR5	n.a.	31%	n.a.
	GAPOR	n.a.	20%	n.a.
<i>Thermococcus paralvinellae</i>	AOR	n.a.	50%	n.a.
<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	XOR	29%	27%	n.a.
<i>Geobacter metallireducens</i>	BamBC	27% (BamC)	29% (BamB)	n.a.

The values indicate sequence identities between the corresponding subunits between AOR_{Aa} and members from the various AOR subfamilies (see Figure 1). Potential additional subunits homologous to AorA or AorC are included when they are encoded in a common operon with the gene for the respective tungsten-containing subunit. n.a., not applicable.

AORs are composed of the three subunits found in AOR_{Aa}. Curiously, AOR_{Mt}, which represents the only characterized example of a three-subunit AOR from a strictly anaerobic and (moderately) thermophilic bacterium, seems to be a special case, branching out between the two AOR subfamilies (Figure 1). This feature may be connected with AOR_{Mt} evolving toward a more temperature-resistant variant and adopting some of the sequence modules of the archaeal AORs. In addition to the bacterial AOR subfamily (plus AOR_{Mt}), only the benzoyl-CoA reductases and the XOR subfamily appear to harbor additional subunits. The benzoyl-CoA reductases are known to form huge complexes in which the W-containing subunit is associated as a sub-module with a small Fe-S cluster containing subunit (Weinert et al., 2015), and the XOR-like enzymes also appear to contain an additional small subunit containing Fe-S clusters (Scott et al., 2015). However, the respective sequences of these additional subunits do not show large similarities to the small subunits of bacterial AORs (Table 5), suggesting that the acquisition of the extra subunits may have occurred independently in the different subfamilies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JH, FA, and GS designed the research project and interpreted the data. FA and GS performed most experiments. AW and

MS contributed to AOR activity tests. AS performed the ICP-MS. JK performed the MALDI-TOF analysis. JH and FA wrote the manuscript.

FUNDING

This study was supported by a research grant from Deutsche Forschungsgemeinschaft via the priority program SPP1927 “Iron-sulfur for life” to JH and by the Synmikro Center, Marburg. AW acknowledges financial support for a research exchange by the Polish National Center of Science (PRELUDIUM 2017/27/N/ST4/02676) as well as the EU Project POWR.03.02.00-1004/16A.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Iris Schall and Gabriele Höff for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00071/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Basen, M., Schut, G. J., Nguyen, D. M., Lipscomb, G. L., Benn, R. A., Prybol, C. J., et al. (2014). Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 17618–17623. doi: 10.1073/pnas.1413789111
- Bertram, P. A., Schmitz, R. A., Linder, D., and Thauer, R. K. (1994). Tungstate can substitute for molybdate in sustaining growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Identification and characterization of a tungsten isoenzyme of formylmethanofuran dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* 161, 220–228. doi: 10.1007/BF00248696
- Beyers, L. E., Bol, E., Hagedoorn, P. L., and Hagen, W. R. (2005). WOR5, a novel tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* with a broad substrate specificity. *J. Bacteriol.* 187, 7056–7061. doi: 10.1128/JB.187.20.7056-7061.2005
- Chan, M. K., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M. W. W., and Rees, D. C. (1995). Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science* 267, 1463–1469. doi: 10.1126/science.7878465
- Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. E., Speicher, D. W., and Wingfield, P. T. (2004). *Current Protocols in Protein Science*. New York, NY: John Wiley & sons.
- Dean, J. A. (1992). *Lange's Handbook of Chemistry*, 14th Edn. New York, NY: McGraw-Hill.
- Debnar-Daumler, C., Seubert, A., Schmitt, G., and Heider, J. (2014). Simultaneous involvement of a tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase and a phenylacetaldehyde dehydrogenase in anaerobic phenylalanine metabolism. *J. Bacteriol.* 196, 483–492. doi: 10.1128/JB.00980-13
- Hagedoorn, P. L., Chen, T., Schröder, I., Piersma, S. R., de Vries, S., and Hagen, W. R. (2005). Purification and characterization of the tungsten enzyme aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic denitrifier *Pyrobaculum aerophilum*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10, 259–269. doi: 10.1007/s00775-005-0637-5
- Heider, J., Ma, K., and Adams, M. W. W. (1995). Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1. *J. Bacteriol.* 177, 4757–4764. doi: 10.1128/jb.177.16.4757-4764.1995
- Hensgens, C., Hagen, W. R., and Hansen, T. A. (1995). Purification and characterization of a benzylviologen-linked, tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 177, 6195–6200. doi: 10.1128/jb.177.21.6195-6200.1995
- Hille, R. (2002). Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem. Sci.* 27, 360–367. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02107-2
- Hille, R., Hall, J., and Basu, P. (2014). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* 114, 3963–4038. doi: 10.1021/cr400443z
- Hu, Y., Faham, S., Roy, R., Adams, M. W. W., and Rees, D. C. (1999). Formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*: the 1.85 Å resolution crystal structure and its mechanistic implications. *J. Mol. Biol.* 286, 899–914. doi: 10.1006/jmbi.1998.2488
- Huber, C., Skopan, H., Feicht, R., White, H., and Simon, H. (1995). Pterin cofactor, substrate specificity, and observations on the kinetics of the reversible tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* 164, 110–118. doi: 10.1007/BF02525316
- Keller, M. W., Lipscomb, G. L., Nguyen, D. M., Crowley, A. T., Schut, G. J., Scott, I., et al. (2017). Ethanol production by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by expression of bacterial bifunctional alcohol dehydrogenases. *Microb. Biotechnol.* 10, 1535–1545. doi: 10.1111/1751-7915.12486
- Kletzin, A., and Adams, M. W. W. (1996). Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 5–63. doi: 10.1111/j.1574-6976.1996.tb00226.x
- Kletzin, A., Mukund, S., Kelley-Crouse, T. L., Chan, M. K., Rees, D. C., and Adams, M. W. W. (1995). Molecular characterization of the genes encoding the tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* and formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* 177, 4817–4819. doi: 10.1128/jb.177.16.4817-4819.1995
- Kung, J. W., Löffler, C., Dörner, K., Heintz, D., Gallien, S., Van Dorsselaer, A., et al. (2009). Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17687–17692. doi: 10.1073/pnas.0905073106
- Letunic, I., and Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127–128. doi: 10.1093/bioinformatics/btl529

- Leutwein, C., and Heider, J. (2002). (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Arch. Microbiol.* 178, 517–524. doi: 10.1007/s00203-002-0484-5
- Maia, L. B., Moura, J. J., and Moura, I. (2015). Molybdenum and tungsten-dependent formate dehydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 287–309. doi: 10.1007/s00775-014-1218-2
- Mukund, S., and Adams, M. W. W. (1991). The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway. *J. Biol. Chem.* 266, 14208–14216. doi: 10.1016/0162-0134(91)84247-7
- Mukund, S., and Adams, M. W. W. (1993). Characterization of a novel tungsten-containing formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. A role for tungsten in peptide catabolism. *J. Biol. Chem.* 268, 13592–13600.
- Mukund, S., and Adams, M. W. W. (1995). Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 270, 8389–8392. doi: 10.1074/jbc.270.15.8389
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., et al. (2005). The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* 183, 27–36. doi: 10.1007/s00203-004-0742-9
- Rabus, R., Trautwein, K., and Wöhlbrand, L. (2014). Towards habitat-oriented systems biology of “*Aromatoleum aromaticum*” EbN1: chemical sensing, catabolic network modulation and growth control in anaerobic aromatic compound degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3371–3388. doi: 10.1007/s00253-013-5466-9
- Rabus, R., and Widdel, F. (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163, 96–103. doi: 10.1007/BF00381782
- Rauh, D., Graentzdorfer, A., Granderath, K., Andreesen, J. R., and Pich, A. (2004). Tungsten-containing aldehyde oxidoreductase of *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 271, 212–219. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03922.x
- Roat-Malone, R. M. (2003). *Bioinorganic Chemistry: A Short Course*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Roy, R., and Adams, M. W. W. (2002). Characterization of a fourth tungsten-containing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 184, 6952–6956. doi: 10.1128/JB.184.24.6952-6956.2002
- Schmitt, G., Arndt, F., Kahnt, J., and Heider, J. (2017). Adaptations to a loss-of-function mutation in the betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum*: recruitment of alternative enzymes for anaerobic phenylalanine degradation. *J. Bacteriol.* 199:e00383-17. doi: 10.1128/JB.00383-17
- Scott, I. M., Rubinstein, G. M., Lipscomb, G. L., Basen, M., Schut, G. J., Rhaesa, A. M., et al. (2015). A new class of tungsten-containing oxidoreductase in *Caldicellulosiruptor*, a genus of plant biomass-degrading thermophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7339–7347. doi: 10.1128/AEM.01634-15
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75
- Strobl, G., Feicht, R., White, H., Lottspeich, F., and Simon, H. (1992). The tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum* and its complex with a viologen-accepting NADPH oxidoreductase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373, 123–132. doi: 10.1515/bchm3.1992.373.1.123
- Thauer, R. K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180.
- Trautwein, T., Krauss, F., Lottspeich, F., and Simon, H. (1994). The (2R)-hydroxycarboxylate-viologen-oxidoreductase from *Proteus vulgaris* is a molybdenum-containing iron-sulphur protein. *Eur. J. Biochem.* 222, 1025–1032. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18954.x
- Weinert, T., Huwiler, S. G., Kung, J. W., Weidenweber, S., Helliwig, P., Stärk, H. J., et al. (2015). Structural basis of enzymatic benzene ring reduction. *Nat. Chem. Biol.* 11, 586–591. doi: 10.1038/nchembio.1849
- White, H., Feicht, R., Huber, C., Lottspeich, F., and Simon, H. (1991). Purification and some properties of the tungsten-containing carboxylic acid reductase from *Clostridium formicoaceticum*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 372, 999–1005. doi: 10.1515/bchm3.1991.372.2.999
- White, H., Strobl, G., Feicht, R., and Simon, H. (1989). Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes. *Eur. J. Biochem.* 184, 89–96. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14993.x
- Wiegel, J. (2009). “Genus *Moorella*,” in *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 3, 2nd Edn, eds P. DeVos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, and W. B. Whitman (New York, NY: Springer).
- Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R., et al. (2007). Functional proteomic view of metabolic regulation in “*Aromatoleum aromaticum*” strain EbN1. *Proteomics* 7, 2222–2239. doi: 10.1002/pmic.200600987

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Arndt, Schmitt, Winiarska, Saft, Seubert, Kahnt and Heider. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.3. Supplement

Table S1: Accession numbers for phylogenetic analysis of the AOR family. The subfamily affiliations and source organisms of the selected entries are indicated.

Subfamily	Species	Accession number
Bacterial AOR	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	WP_011238652
Bacterial AOR	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	WP_011807029
Bacterial AOR	<i>Azoarcus toluclasticus</i>	WP_018990435
Bacterial AOR	<i>Caldimonas manganoxidans</i>	WP_019559976
Bacterial AOR	<i>Methyloversatilis discipulorum</i>	WP_020164287
Bacterial AOR	<i>Methyloversatilis universalis</i>	WP_018229612
Bacterial AOR	Candidatus <i>Accumulibacter</i> sp. SK-02	KFB75060
Bacterial AOR	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	WP_011807029
	<i>Moorella thermoacetica</i>	WP_071520516
Archaeal AOR	<i>Pyrococcus furiosus</i>	WP_011011461
Archaeal AOR	<i>Thermococcus paralvinellae</i>	WP_042681437
Archaeal AOR	<i>Hippea jasoniae</i>	WP_035589419
Archaeal AOR	<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>	WP_011343719
Archaeal AOR	<i>Eubacterium acidaminophilum</i> (<i>Peptoclostridium acidaminophilum</i>)	WP_025436835
	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	AAL62901
	<i>Desulfovibrio gigas</i>	WP_021759675
	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	WP_070964744
XOR	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	WP_013403731
XOR	<i>Methanospirillum hungatei</i>	WP_011448034
XOR	<i>Coprothermobacter platensis</i>	WP_018963763
GAPOR	<i>Pyrococcus furiosus</i>	WP_011011581
GAPOR	<i>Pyrococcus abyssi</i>	WP_010868698
GAPOR	<i>Thermococcus onnurineus</i>	WP_012572460
BamB	<i>Geobacter metallireducens</i>	WP_004514579
BamB	<i>Geobacter metallireducens</i>	WP_004512044
FOR	<i>Pyrococcus furiosus</i>	WP_014835355
FOR	<i>Pyrococcus_abyssi</i>	WP_010868317
FOR	<i>Thermofilum</i> sp. ex4484 82	OYT29225
WOR4	<i>Pyrococcus furiosus</i>	WP_011013103
WOR4	<i>Thermococcus celericrescens</i>	WP_058938613
WOR4	<i>Palaeococcus ferrophilus</i>	WP_048150761
WOR5	<i>Pyrococcus furiosus</i>	WP_014835423
WOR5	<i>Thermococcus litoralis</i>	WP_004070105
WOR5	<i>Thermococcus sibiricus</i>	WP_048160352

Table S2: MALDI-TOF analysis of AOR_{Aa} subunits. Peptide count and protein score values of the three subunits after separation by SDS-PAGE are given with corresponding accession numbers. The identity of proteins with AorABC is evident from their high protein scores, while potential co-migrating contaminants are represented by much lower protein score values.

Spot	Name	Accession number	Peptide count	Protein score
1	AorB	WP_011238652	39	1030
2	AorC	WP_018990436	29	877
	phenylglyoxylate:acceptor oxidoreductase	WP_041646480	24	110
3	AorA	WP_011238651	12	289
	SecB	WP_011236410	5	70

Teil B: Weiterführende Ergebnisse

2. Sequenzierung des Promotorbereichs vor dem *aor*-Operon in *A. aromaticum*

Für die Produktion der wolframabhängigen Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) wurde die Mutante *Aromatoleum aromaticum* SR7 Δ *pdh* etabliert (Schmitt *et al.*, 2017; Arndt *et al.*, 2019). Das *pdh*-Gen kodiert für die spezifische Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase, die im anaeroben Abbau von Phenylalanin die Oxidation von Phenylacetaldehyd zu Phenylacetat katalysiert. Hintergrund der Deletion ist, dass dadurch alternative Enzyme für die Oxidation hoch reguliert werden. Einer dieser Mutanten, die eine erhöhte Produktion der AOR zeigt, wurde für fortfolgende Untersuchungen und Produktion der AOR ausgewählt. Doch es ist unklar, welcher Umstand für die erhöhte Produktion verantwortlich ist. Eine Möglichkeit wäre eine Mutation im Promotor-Bereich des *aor*-Operons. Daher soll anhand einer Sequenzierung des Promoter-Bereichs festgestellt werden, ob eine Mutation vorliegt.

Für die Sequenzierung wurden die Primer *aorP-for* und *aorP-rev* (s. Tab. 3) verwendet. Die Sequenzierung deckt etwa 800 bp ab und beinhaltet die nicht translatierte 5'-Region wie auch den Promotor-Bereich mit einem möglichen regulatorischen Element oberhalb des Promotors.

ccggtgctactttcgggaaagcaa/32/cggaccgctcggcgccaggcagtcgaaagcc/54/atg
 -24 -12 +1

Abbildung 6: Operon und regulatorische Elemente des *aor*-Operons. In rot ist die Base dargestellt, die als Punktmutation von G \rightarrow T in *A. aromaticum* SR7 Δ *pdh* vorliegt. Mit Pfeilen werden mögliche symmetrische regulatorische Sequenzen angezeigt. Der σ^{54} -Promotor ist in grün und der Transkriptionsstartpunkt ist unterstrichen dargestellt. Die Sequenz ist verkürzt dargestellt und Basen die ausgelassen wurden, sind mit Anzahl angegeben. Verändert nach Schmitt *et al.* (2017).

In der untersuchten Sequenz sind mit einem σ^{54} -Promotor und einer symmetrischen Sequenzabfolge, die als Konsensus-Sequenz dienen könnte, zwei regulatorische Sequenzen vorhanden (s. Abb. 6). Oberhalb der symmetrischen Sequenz zeigt sich im Vergleich mit der Wildtyp-Sequenz eine Punktmutation von einem Guanin zu einem Thymin.

3. pH-Abhängigkeit der AOR

Die AOR aus *A. aromaticum* EbN1 zeigt ein Maximum der spezifischen Aktivität bei einem pH von 8,0 (Arndt *et al.*, 2019). In dieser Arbeit wurde dies wiederholt und zusätzlich mit NAD als Elektronenakzeptor getestet. Als Puffersystem wurde 100 mM Tris/HCl in einem pH-Bereich zwischen 7,0 bis 9,0 verwendet. Archaeelle AORs zeigen am Beispiel von

Thermococcus paralvinellae ES-1 ein Maximum der spezifischen Aktivität bei pH 8,5 (Heider *et al.*, 1995).

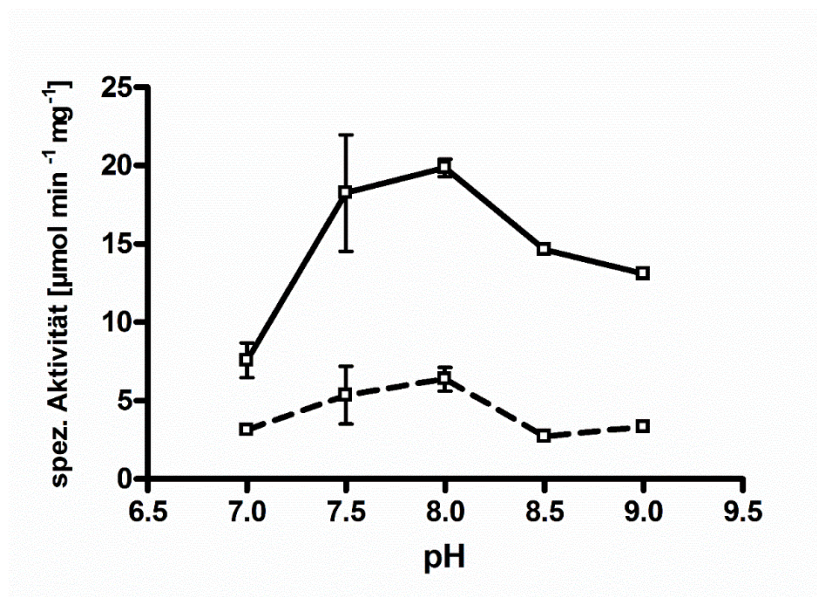


Abbildung 7: pH-Abhängigkeit der AOR aus *A. aromaticum* EbN1. Die Aktivitäts-Messungen sind zwischen pH 7 und pH 9 photometrisch (BV bei 600 nm; NAD bei 340 nm) vermessen worden. Bei beiden Messreihen der verschiedenen verwendeten Elektronakzeptoren liegt das Maximum bei pH 8.

Bei der erneuten Bestimmung der pH-Abhängigkeit der AOR wird ein Maximum der spezifischen Aktivität von $20 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei pH von 8,0 erreicht. Ebenso wird bei der Verwendung von NAD als Elektronakzeptor ein Maximum der spezifischen Aktivität von $5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bei einem pH von 8,0 erreicht (s. Abb. 7).

4. EPR-Analyse der AOR

Für die Analyse mittels Elektronen-Paramagnetischer-Resonanz-Spektroskopie (EPR-Spektroskopie) wurde angereicherte AOR aus *A. aromaticum* SR7 Δ *pdh* unbehandelt und reduziert mit 2 mM Dithionit analysiert. Ergebnisse der EPR-Spektroskopie werden anhand der Magnetfeldstärke in T (entspricht 10^4 Gauss) aufgetragen. Aus den Absorptionsmaxima ergeben sich die jeweiligen dimensionslosen g-Faktoren als Maß für das effektive magnetische Moment der Elektronen, was sich aus dem Eigenspin und dem Bahndrehimpuls zusammensetzt. Bei dieser Methode können nur paramagnetische Teilchen mit einem Spin der nicht 0 beträgt, in denen also nicht gepaarte Elektronen vorliegen, analysiert werden. Durch diese Analyse werden drei Merkmale der AOR untersucht, nämlich die vier [4Fe-4S]-Zentren in der Untereinheit AorA, das [4Fe-4S]-Zentrum und der Wolfram-Cofaktor in AorB. Für die

Identifizierung des Wolfram-Atoms muss dieses als W(V) vorliegen. Nur in diesem Zustand liegt ein ungepaartes Elektron vor. Die Messungen zum W-Cofaktor wurden bei einer Temperatur von 58 K und mit einer Mikrowellenenergie von 6,4 mW durchgeführt und für die Messungen von den FeS-Zentren bei 10 K und mit 2 mW bzw. 20 mW.

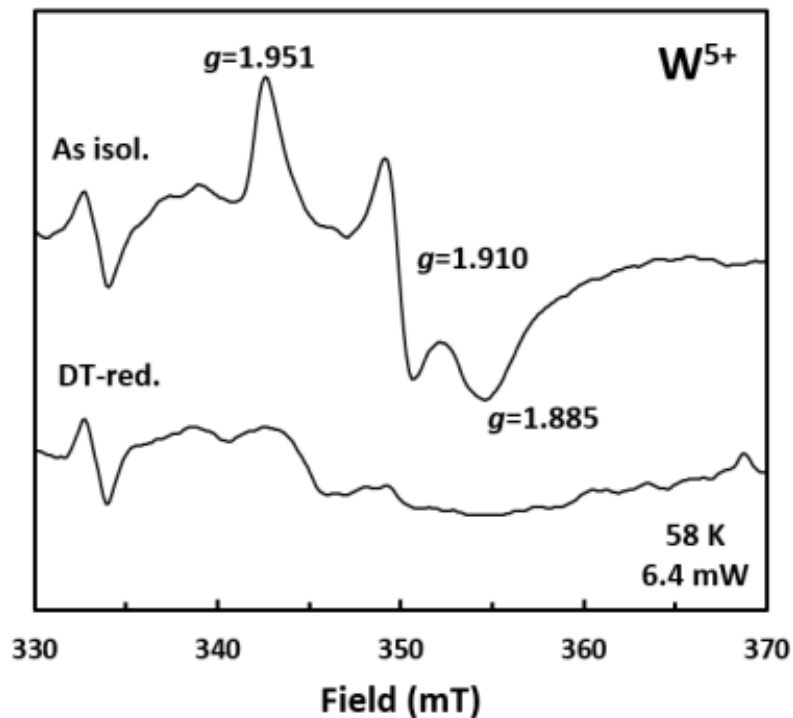


Abbildung 8: EPR-Spektrum des W(V)-Signals des W-bis-Pterin-Cofaktors. Gezeigt sind die Messungen der isolierten und unbehandelten Probe (as isol.) und der mit Dithionit reduzierten Probe (DT-red). Der g-Faktor wird gegen die Magnetfeldstärke (Field; mT = 10 Gauss) aufgetragen. Der g-Faktor ist dimensionslos. Messungen wurden bei 58 K und mit einer Mikrowellenenergie von 6,4 mW durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein rhombisches Signal mit $g_{xyz} = 1,951, 1,910, 1,885$. Abbildung verändert nach Prof. Antonio Pierik (TU Kaiserslautern).

In der Analyse des W-Cofaktors ist ein rhombisches EPR-Signal sichtbar mit $g_{xyz} = 1,951, 1,910, 1,885$ (s. Abb. 8). In der reduzierten Probe nimmt die Intensität des Signals ab. Durch Reduktion von W(V) zu W(IV) entsteht ein Elektronenpaar, das nicht EPR-aktiv ist. Untersuchungen von anderen Wolframenzymen zeigten typische g-Werte der W-Cofaktoren von 1,99 bis 1,83 (Übersicht in Johnson *et al.*, 1996). Für die Analyse der [4Fe-4S]-Zentren muss die Temperatur unter 10 K betragen, da bei höheren Temperaturen die Resonanz nicht messbar ist.

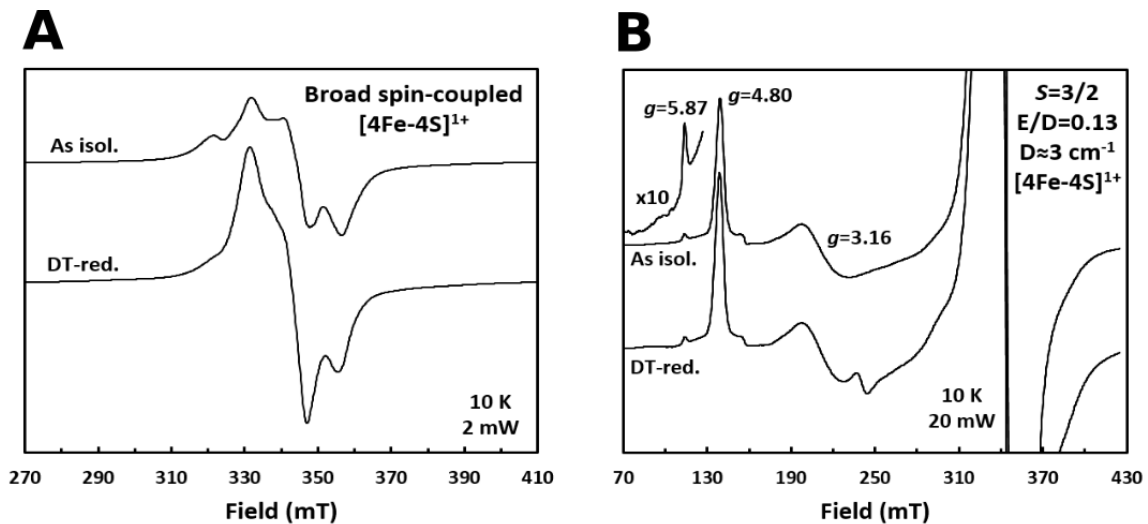


Abbildung 9: EPR-Spektrum der $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren der AOR aus *A. aromaticum*. Dargestellt sind die Messungen der isolierten und unbehandelten Probe (as isol.) und der mit Dithionit reduzierten Probe (DT-red.). Der g-Faktor wird gegen die Magnetfeldstärke (Field; mT = 10 Gauss) aufgetragen. Der g-Faktor ist dimensionslos. (A) Die $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren aus der Untereinheit AorA zeigen ein rhombisches Signal. Messungen wurden bei 10 K und mit einer Mikrowellenenergie von 2 mW durchgeführt. (B) In der katalytischen Untereinheit AorB zeigt das $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum ein $S = 3/2$ -Signal. Ein Teil des Signals wird durch die Zentren der AorA-Untereinheit überlagert. Messungen wurden bei 10 K und mit einer Mikrowellenenergie von 20 mW durchgeführt. Abbildung verändert nach Prof. Antonio Pierik (TU Kaiserslautern).

Die $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren der AorA-Untereinheit zeigen im Magnetfeld zwischen 320 und 370 mT überlagerte rhombische Signale, die durch Zugabe des Reduktionsmittels Dithionit an Intensität zunehmen (s. Abb. 9A). Durch Reduktion entsteht ein ungepaartes Elektron, was zu einer Resonanz führt. Doch schon im unbehandelten Enzym ist ersichtlich, dass die Zentren zum Teil reduziert vorliegen. Das $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum in der katalytischen Untereinheit AorB zeigt hingegen ein $S = 3/2$ -Signal (s. Abb. 9B), das ebenfalls bereits bei analogen archaellen AORs beobachtet wurde. Dieses Signal ist wie bei den AOR aus *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus paralvinellae* ein rhombisches Signal (Mukund *et al.*, 1990; Heider *et al.*, 1995). Bei diesem Signal handelt es sich um eine Spin-Spin-Interaktion mit einem zweiten paramagnetischen Zentrum mit einem niedrigeren Reduktionspotential (Mukund *et al.*, 1990). Bei der AOR aus *A. aromaticum* wird ein Teil des Signals durch die $[4\text{Fe-4S}]$ -Signale von der Untereinheit AorA überlagert.

5. AOR aus *Acidovorax* sp. JS42

Als möglicher Wirt für die heterologe Produktion der AOR wurde das Bakterium *Acidovorax* sp. JS42 (vormals *Pseudomonas* sp. JS42) in Betracht gezogen. *Acidovorax* sp. JS42 wurde aus Grundwasser- und Erdproben isoliert, die mit Nitrobenzol kontaminiert waren (Haigler *et al.*, 1994). Dieses Bakterium gehört zu der Familie der

Comamonadaceae und ist der Familie der *Rhodocyclaceae*, in der *A. aromaticum* eingeteilt ist, weitläufig verwandt, aber beide besitzen ein *aor*-Operon. Die phylogenetische Analyse der AOR zeigt, dass die katalytische Untereinheit AorB von *Acidovorax* sp. JS42 im Vergleich mit der Untereinheit der AOR von *A. aromaticum* eine Identität von 74 % aufweist (Arndt *et al.*, 2019). Um zu testen, ob sich *Acidovorax* als Wirt eignet, wurde die Aktivität der intrinsischen AOR getestet. Durch den Nachweis einer aktiven AOR wird gezeigt, dass eine Maturation einer rekombinant eingebrachten AOR möglich ist und welche Wachstumsbedingungen sich dafür eignen. Hierfür wurde das Bakterium in Flüssigmedium mit 1-Butanol als C-Quelle anaerob kultiviert. Bei dem Abbau von Butanol entsteht Butanaldehyd als Intermediat und dies soll zur Produktion der AOR führen, wenn auch hier die AOR zur Detoxifizierung von Aldehyden dient. Zur Kontrolle dient eine *Acidovorax*-Kultur, die mit Succinat als C-Quelle kultiviert wurde, da Succinat ohne Aldehyd-Intermediat abgebaut wird. Die Kulturen wurden aufgeschlossen und zentrifugiert und der Zellextrakt wurde für die Aktivitäts-Messungen mit Benzylviologen als Elektronakzeptor verwendet. Als Substrate dienten Benzaldehyd (BzAld), Phenylacetaldehyd (PAAld), Propionaldehyd (PrAld), Crotonaldehyd (CrAld), Acetaldehyd (AcAld) und Formaldehyd (FoAld). Die Aktivität des Kontrolleextrakts wurde mit Benzaldehyd gemessen.

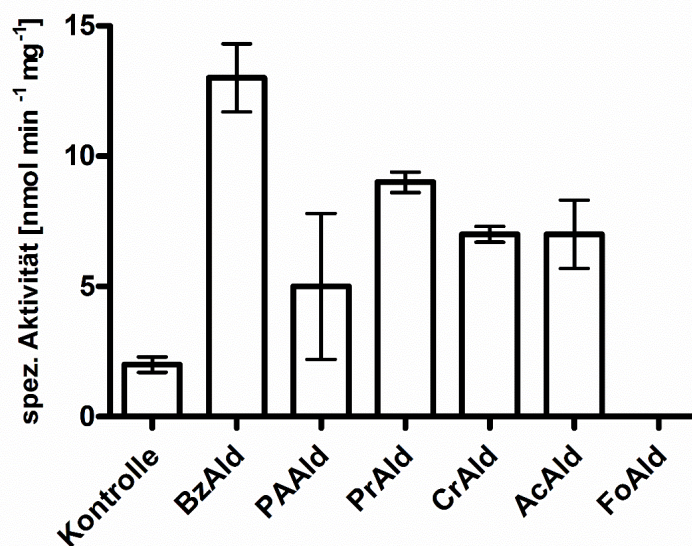


Abbildung 10: Messung der spezifischen Aktivität der AOR aus Extrakt von *Acidovorax* sp. JS42. Die gemessenen Aktivitäten ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein) wurden gegen die verwendeten Substrate Benzaldehyd (BzAld), Phenylacetaldehyd (PAAld), Propionaldehyd (PrAld), Crotonaldehyd (CrAld), Acetaldehyd (AcAld), Formaldehyd (FoAld) und Kontrolle mit Benzaldehyd als Substrat (Kontrolle) aufgetragen. Der Extrakt für die Kontrolle wurde erstellt aus Zellen, die mit Succinat als C-Quelle kultiviert wurden.

Der Zellextrakt der mit Butanol kultivierten Zellen weist eine höhere Aktivität der AOR im Vergleich mit dem Kontrolleextrakt auf (s. Abb. 10). Die höchste spezifische Aktivität von ca.

14 mU/mg ist mit BzAld messbar. Im Vergleich zur AOR aus *A. aromaticum* ist die Aktivität der AOR aus *Acidovorax* mit PAAld deutlich geringer. Die AOR aus *A. aromaticum* besitzt vergleichbare Aktivität von PAAld und BzAld als Substrat (Arndt *et al.*, 2019). Dieser Versuch zeigt, dass die Verwendung von *Acidovorax* sp. JS42 als möglicher Produktionsstamm für die Produktion der AOR möglich ist, da alle Maturationsfaktoren für die Synthese der wolframabhängigen AOR vorhanden sind.

6. Heterologe Produktion der AOR aus *A. aromaticum* EbN1

Für die rekombinante Produktion der AOR wurden Vektoren verwendet, in denen eine verkürzte Version des *aor*-Operons (*aorA-C*) unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors vorliegt. Als Induktor dient Anhydrotetrazyklin (AHT). Die Anreicherung erfolgte durch Affinitätschromatographie mittels einer Peptid-Modifikation (Strep-Tag) der AorC- oder AorA-Untereinheit.

6.1. Expression in *Acidovorax* sp. JS42

Für die Anreicherung der AOR aus *A. aromaticum* EbN1 in *Acidovorax* sp. JS42 wurden sowohl ein einfacher Strep-Tag, wie auch ein Twin-Strep-Tag verwendet. Bei dem Twin-Tag handelt es sich um eine doppelte Anordnung der Peptid-Sequenz mit einem Abstand von zwölf Aminosäuren. Die Vektoren wurden mittels Elektroporation (EPO) in *Acidovorax* eingebracht und gemäß der Resistenz (amp^R) selektiv mit Ampicillin und mit Succinat als C-Quelle kultiviert. Nach Zugabe des Induktors erfolgte die Inkubation bei 16°C über Nacht. Die Zellen wurden geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde für die ersten Aktivitätsmessungen mit Benzylviologen (BV) verwendet.

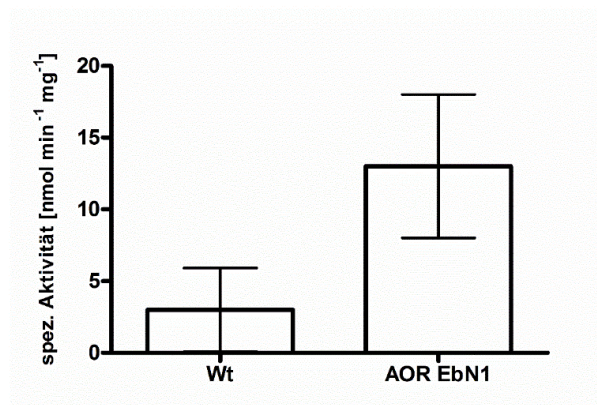


Abbildung 11: Aktivität der rekombinant synthetisierten AOR aus *A. aromaticum* EbN1 in Extrakt von *Acidovorax* sp. JS42. Sowohl die Kontrolle (Wt) als auch der Expressionsstamm mit Expressionsvektor mit kodierter AOR (AOR EbN1) wurden mit Succinat als C-Quelle kultiviert. Aufgetragen ist die Aktivität ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) gegen die untersuchten Stämme. Die Messung zeigt im Extrakt des Expressionsstammes (AOR EbN1) eine höhere Aktivität.

Die Aktivität der AOR im Expressionsstamm beträgt $13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und ist im Vergleich mit der Kontrolle ohne *aor*-Expressionsvektor mit $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ um mehr als das Vierfache höher (s. Abb. 11). Doch konnte die AOR nicht durch eine anschließende Affinitätschromatographie angereichert werden (Daten nicht gezeigt).

6.2.Expression in *Aromatoleum evansii* KB740

Als möglicher zweiter Expressionsstamm für die AOR wurde die verwandte Art *Aromatoleum evansii* KB740 (vormals in der Gattung *Azoarcus* eingeteilt) ausgewählt. Für die Expression wurde der Vektor mit den drei Strukturgenen *aorA-C* mit der Fusion aus *aorA* und dem Twin-Strep-Tag-Sequenz verwendet. Die Einführung des Vektors erfolgte mittels Konjugation und wurde von Dominik Hege durchgeführt (AG Mikrobielle Biochemie, Universität Marburg). Die Kultivierung erfolgte im Nitratreduzierer-Medium mit Benzoat als C-Quelle. Die Produktion startet mit der Zugabe des Induktors AHT.

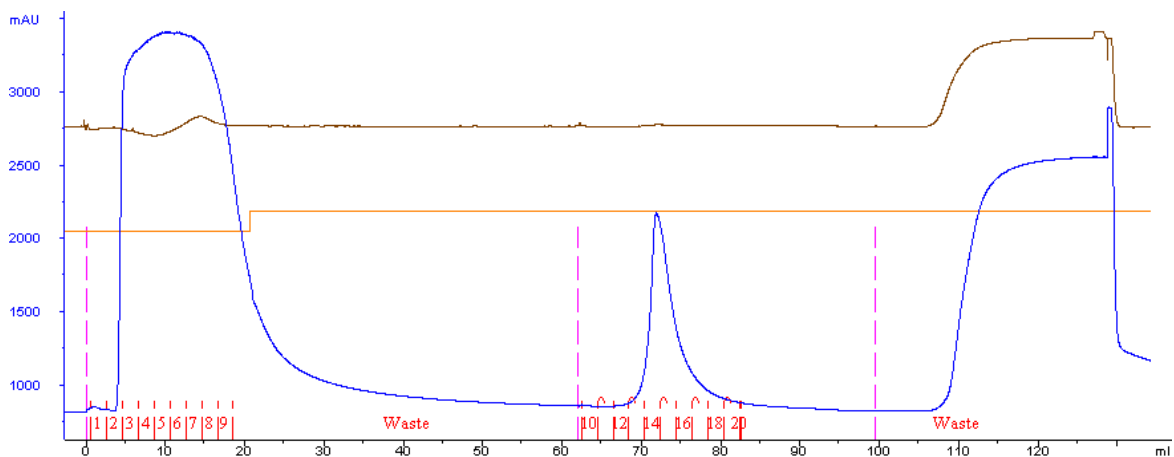


Abbildung 12: Chromatogramm der Reinigung der AOR von *A. aromaticum* EbN1 aus Extrakt von *A. evansii* KB740. Anreicherung erfolgte mittels Streptavidin-Tactin-Affinitätschromatographie. Nach 70 ml beginnt die Elution der rekombinant produzierten AOR wovon dann Eluat 14 und 15 zusammengefasst wurden. Eluate 1-9 sind der Durchlauf und wurden ebenso für ein SDS-PAGE vorbereitet. Nach Abschluss der Elution (Waste) erfolgte die Regeneration der Säule. Die Erfassung des Proteins erfolgt photometrisch (blau) in Milli-Absorbance Units (mAU). Weitere Kurven sind die Flussgeschwindigkeit (orange) ohne Angabe (in der Regel 0,75-1 ml/min) und die Leitfähigkeit (braun) ohne Angabe.

Nach Herstellung des Zellextrakts wurde die AOR mittels Streptavidin-Tactin-Affinitätschromatographie angereichert (s. Abb. 12). Die AOR eluierte nach etwa 70 ml Durchlaufvolumen. Die Elution der AOR beginnt ab Eluat 13. Die Eluate 13 bis 17 wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

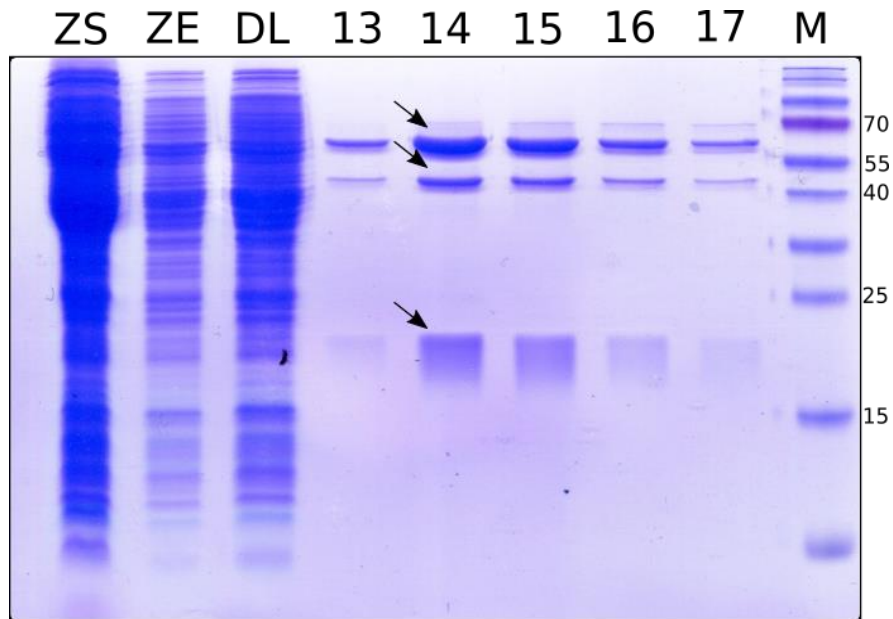


Abbildung 13: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Anreicherung der AOR aus Extrakt von *A. Evansii* KB740. Verwendet wurden Zellsediment (ZS), Zellextrakt (ZE), der Durchlauf der Reinigung (DL) sowie die Eluate 12-17 und der Proteinstandard (M). Die drei Untereinheiten sind AorA (17 kDa), AorB (66 kDa) und AorC (46 kDa).

Bei den Eluaten sind deutlich die drei Untereinheiten (AorA-C) erkennbar (s. Abb. 13). Die Eluate 14 und 15 wurden zusammengefasst und eine Aktivitätsbestimmung mit Benzaldehyd und Acetaldehyd durchgeführt. Für die Messungen wurden BV oder NAD als Elektronenakzeptoren verwendet. Die Konzentration der Probe entspricht 0,6 mg/ml. Die angereicherte AOR weist mit Benzaldehyd eine spezifische Aktivität von $3,88 (\pm 0,53) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit BV und von $1,77 (\pm 0,18) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit NAD auf. Mit Acetaldehyd sind Aktivitäten von $2,18 (\pm 0,16) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit BV und $1,8 (\pm 0,22) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit NAD messbar. Im Vergleich zeigt angereicherte AOR aus *A. aromaticum* eine vierfach höhere spezifische Aktivität von ca. 20 U/mg auf (Arndt *et al.*, 2019).

7. Charakterisierung der putativen Maturationsfaktoren MoeA1-3

7.1. Phylogenetische Analyse

7.1.1. MoeA1 und MoeA2

Im Genom von *A. aromaticum* EbN1 sind zwei Sequenzen vorhanden, die eine Sequenzidentität mit *moeA* aus *E. coli* aufweisen. Dies sind *moeA1* (*ebA6673*) und *moeA2* (*ebA1078*). Die Aminosäuresequenz von MoeA1 besitzt eine Identität von 39 % zu der Sequenz von MoeA aus *E. coli*. Dagegen weist MoeA2 eine leicht höhere Identität von 46 % auf. MoeA1 und MoeA2 besitzen eine Identität von 41 % zueinander. Die Identitäten wurden mit dem

Programm ClustalOmega ermittelt. Durch einen Datenbankabgleich mittels BLAST wurden Homologe von verschiedenen Organismen gesammelt und zu einem phylogenetischen Baum zusammengefasst (s. Abb. 14).

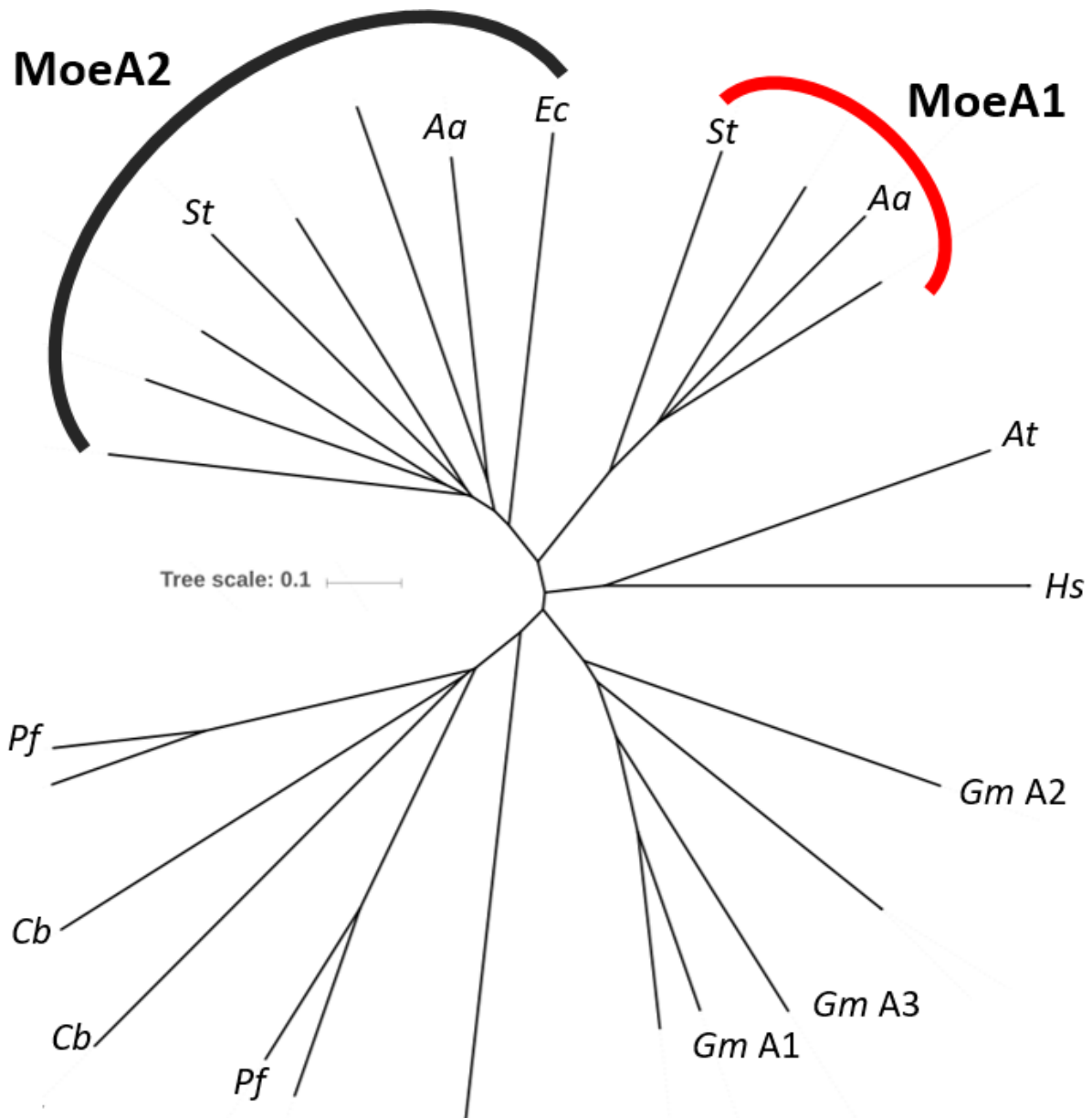


Abbildung 14: Phylogenetischer Baum von MoeA1 und MoeA2 aus *A. aromaticum* EbN1. Hierfür wurden mit den Sequenzen MoeA1 (ebA6673), MoeA2 (ebA1078) und verschiedener anderer Orthologe aus unterschiedlichen Domänen ein Alignment durchgeführt und in einem ungewurzelten phylogenetischen Baum zusammengefasst. Die Gruppen mit den orthologen Maturationsfaktoren zu MoeA1 (rot) und MoeA2 (schwarz) aus *A. aromaticum* wurden hervorgehoben. Einige individuelle Sequenzen werden benannt: Aa, *Aromatoleum aromaticum*; At, *Arabidopsis thaliana*; Cb, *Caldicellulosiruptor bescii*; Ec, *Escherichia coli*; Gm, *Geobacter metallireducens*; Hs, *Homo sapiens*; Pf, *Pyrococcus furiosus*; St, *Sedimenticola thiotaurini*. Für *Geobacter* sind die drei paralogen Sequenzen der eigenen MoeA-Proteine mit A1, A2 und A3 dargestellt. Die verwendeten Accession numbers sind im Anhang aufgeführt (s. Tab. 18).

Die Sequenzen von MoeA1 und MoeA2 lassen sich zueinander abgrenzen. In diesen Gruppen sind vor allem Proteine aus α -, β - und γ -Proteobakterien zu finden. MoeA aus *E. coli* ist zu der MoeA2-Gruppe zuzuordnen. Als Beispiel für ein δ -Proteobakterium mit wolframabhängigen

Enzymen besitzt *Geobacter metallireducens* ebenfalls mehrere Paraloge von MoeA. Die Gensequenz für *moeA1* (*Gm A1*; *Gmet_1038*) liegt in einem Operon zusammen mit den *tupABC*-Genen, die für das Wolfram-Aufnahme-System kodieren. In einer weiteren Gruppe sind MoeAs von dem Archaeum *Pyrococcus furiosus* (*Pf*) und dem thermophilen Cellulose-Verwerter *Caldicellulosiruptor bescii* (*Cb*) zusammengefasst. Beide Organismen synthetisieren W-Cofaktoren und besitzen je zwei paraloge Sequenzen von MoeA. Des Weiteren wurde die AOR aus *P. furiosus* rekombinant und aktiv in *C. bescii* produziert (Scott *et al.*, 2015). Eine eigene Gruppe bilden auch die Proteine aus den Eukaryoten *Arabidopsis thaliana* und *Homo sapiens*. Diese liegen im Gegensatz zu den prokaryotischen MoeAs als Fusion von MogA (G-Domäne) und MoeA (E-Domäne) vor.

7.1.2. MoeA3

A. aromaticum enthält zusätzlich mit dem MoeA3 ein drittes Protein, das Ähnlichkeiten zu MoeA aufweist. Im Gegensatz zu *moeA1* (1206 bp) und *moeA2* (1254 bp) ist *moeA3* (750 bp) eine um einiges kürzer und die Aminosäure-Sequenz von MoeA3 besitzt eine Identität von 21 % zu MoeA aus *E. coli*. Darüber hinaus werden in einer Datenbank-Abgleich mittels BLAST von MoeA3 vor allem Sequenzen gefunden, die zu CinA-Proteinen (*Competence/damage inducible protein A*) assoziiert sind. Bei diesen Proteinen handelt es sich häufig um bifunktionale NMN(Nicotinoat-Mononukleotid)-Deamidasen/ADPR(Adenosin-Diphosphat-Ribose)-Pyrophosphatasen, die auch als PncC-Proteine (*pnc*; *pyridine nucleotide cycle*) bezeichnet werden und an der Regeneration von NAD involviert sind (Galeazzi *et al.* 2011; Cialabrini *et al.* 2013). Diese Domänen liegen aber auch als monofunktionale Proteine vor. Gerade die ADPR-Pyrophosphatase-Domäne wird aufgrund von Sequenzidentitäten wie bei den MoeA-Proteinen als MocF-Domäne bezeichnet. Die ADPR-Pyrophosphatasen (ADPR-PP) zeigen nicht nur Aktivität mit ADPR, sondern können auch die Pyrophosphat-Bindung von FAD, NAD und NADH hydrolysieren (Cialabrini *et al.* 2013).

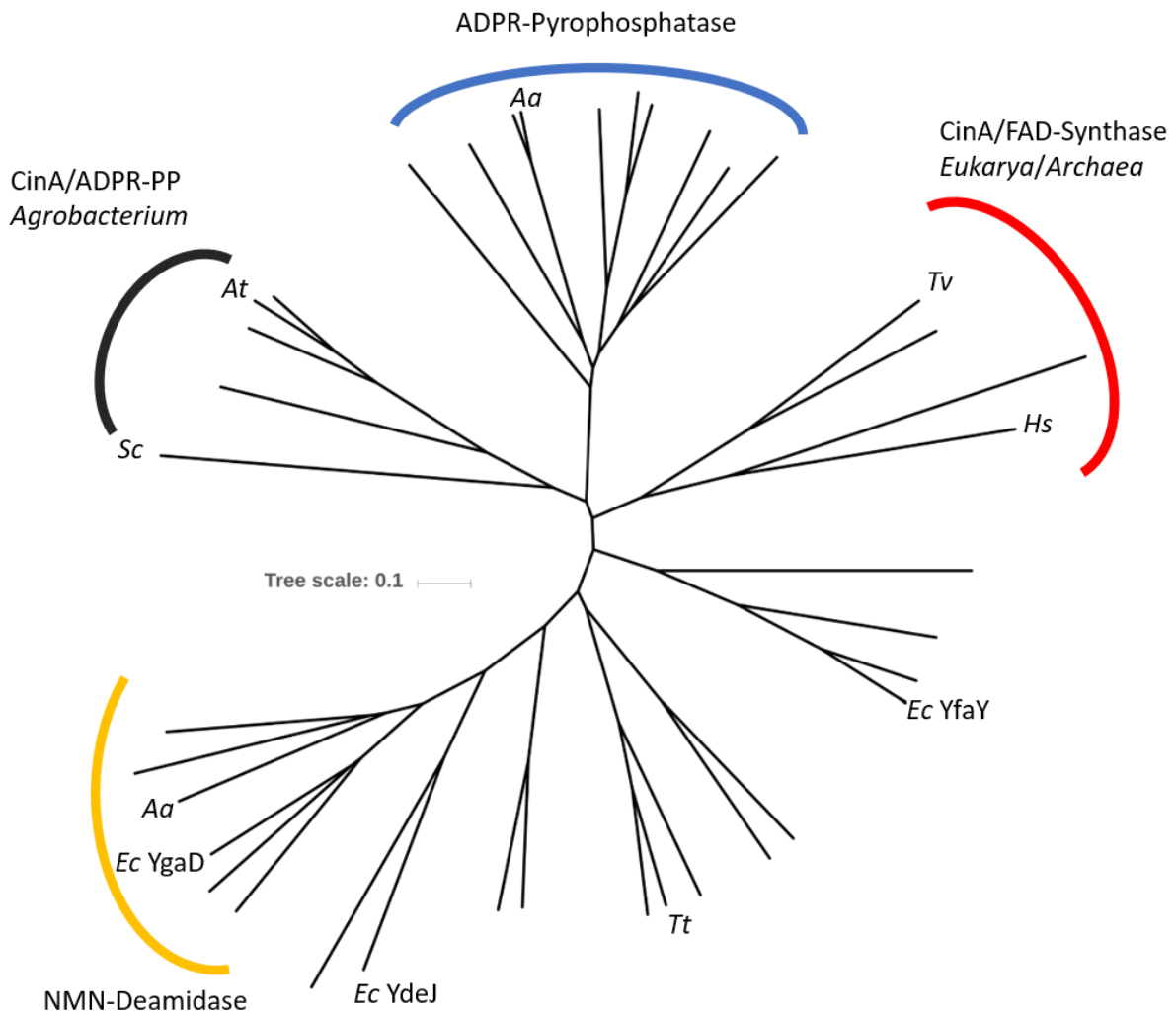


Abbildung 15: Phylogenetischer Baum von MoeA3 aus *A. aromaticum* EbN1. Hierfür wurden mit den Sequenzen von MoeA3 (*ebA4355*) verschiedener anderer Orthologe aus unterschiedlichen Domänen ein Alignment durchgeführt und in einem ungewurzelten phylogenetischen Baum zusammengefasst. Die Gruppen mit der monofunktionalen ADP-Ribose-Pyrophosphatase (ADPR-PP) mit MoeA3 (blau), der monofunktionalen CinA/ADPR-PP vor allem *Agrobacterium* sp. (schwarz), der bifunktionalen CinA/FAD-Synthase aus *Archaea* und *Eukarya* (rot) und die monofunktionalen NMN-Deamidasen (gelb) wurden hervorgehoben. Innerhalb der NMN-Deamidasen ist mit *ebA3399* eine weitere Aminosäure-Sequenz aus *A. aromaticum* aufgeführt. Einige Sequenzen werden benannt: *Aa*, *Aromatoleum aromaticum*; *At*, *Agrobacterium tumefaciens* (veraltet; neu: *Rhizobium radiobacter*); *Ec*, *Escherichia coli*; *Hs*, *Homo sapiens*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Tt*, *Thermus thermophilus*; *Tv*, *Thermoplasma volcanium*. Die verwendeten *Accession numbers* sind im Anhang aufgeführt (Tab. 19).

Im Genom von *A. aromaticum* ist mit *ebA3399* ein weiteres *cinA*-Gen kodiert, dessen Genprodukt im Baum zusammen in einer Gruppe von monofunktionalen NMN-Deamidasen wie *YgaD* aus *E. coli* (s. Abb. 15) gruppiert ist. Die monofunktionalen ADPR-Pyrophosphatasen mit MoeA3 liegen in einer völlig anderen Gruppe des phylogenetischen Baumes. Bei *Eukarya* und *Archaea* wird neben der ADPR-PP-Domäne eine FAD-Synthase-Domäne annotiert.

Ergebnisse

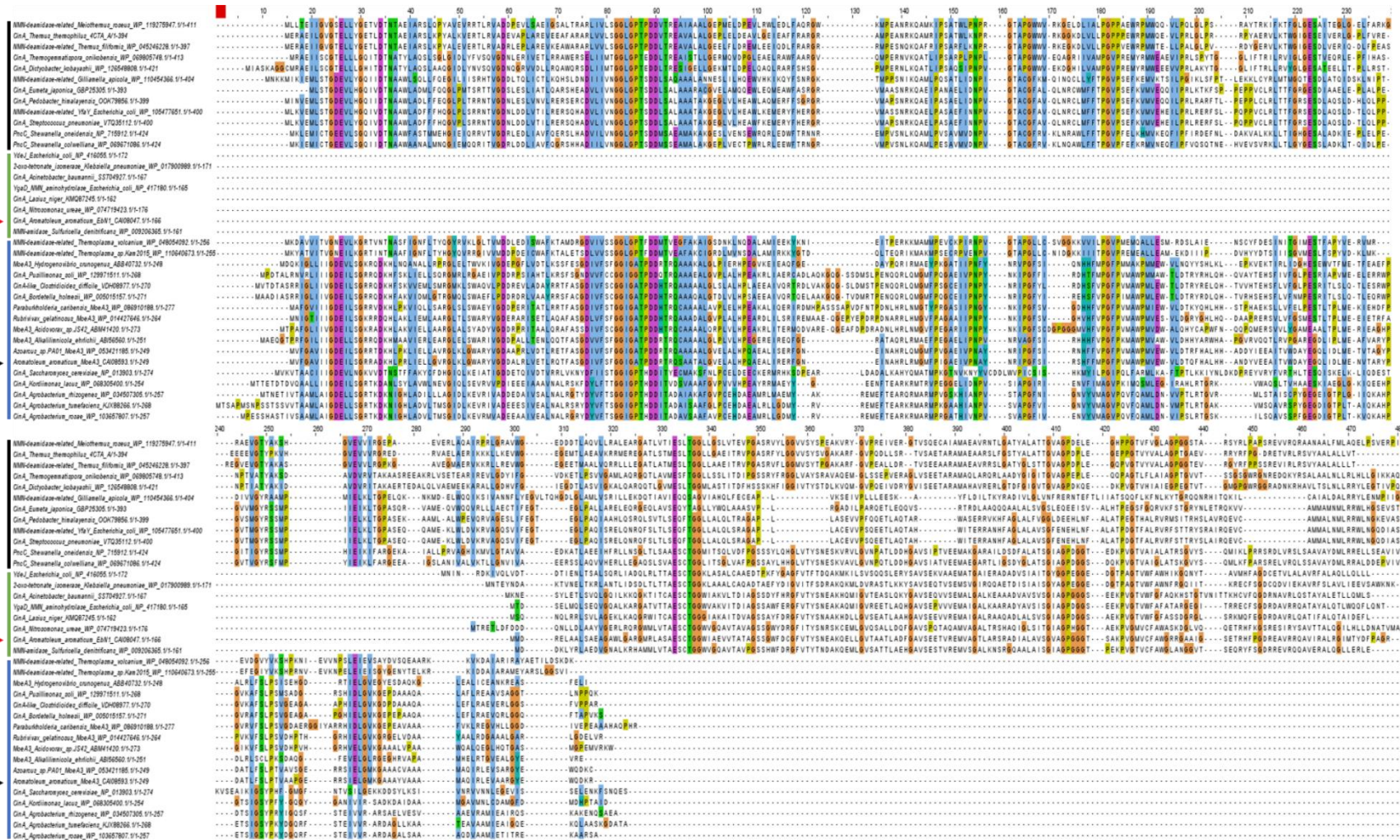


Abbildung 16: Alignment von verschiedenen Protein-Sequenzen der CinA-Familie. Die Sequenzen sind eingeteilt in bifunktionale CinA-Proteine mit ADPR-PP-Domäne (MocF-Domäne) bis ca. Position 300 und NMN-Deamidase-Domäne ab Position 300 (Schwarz), in monofunktionale NMN-Deamidase (grün) und monofunktionale ADPR-PP-Proteine mit MocF-Domäne (blau). Hervorgehoben sind CinA aus *A. aromaticum* (ebA3399) (roter Pfeil) mit Übereinstimmungen mit der NMN-Deamidase-Domäne und MoeA3 aus *A. aromaticum* (ebA4355) mit Übereinstimmungen mit der MocF-Domäne (schwarzer Pfeil).

Im Alignment der Sequenzen, die für den phylogenetischen Baum verwendet wurden (s. Abb. 16), ist ersichtlich, dass die bifunktionalen Proteine zwei klar unterscheidbare Domänen aufweisen. Hier zeigt MoeA3 nur Übereinstimmungen mit der vorderen ADPR-PP-Domäne auf. Der Vergleich der ersten 250 Aminosäuren der CinA-Sequenz aus *Agrobacterium rhizogenes* mit der Sequenz von MoeA3 ergibt eine Identität von ca. 30 % (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigt das zweite CinA-ähnliche Protein aus *A. aromaticum* im Vergleich eine Übereinstimmung mit den bifunktionalen Proteinen ab ca. Position 300, was der NMN-Deamidase-Domäne entspricht. Dies könnte darauf schließen, dass beide Faktoren in der Regeneration von NAD involviert sein könnten und MoeA3 nicht in der Maturation der Pterin-Cofaktoren involviert ist.

7.2. Klonierung und Produktion von MoeA1, MoeA2 und MoeA3

Zur Maturation von Molybdänenzymen werden verschiedenen Maturationsfaktoren benötigt. In dieser Arbeit stehen vor allem die Faktoren im Fokus, die für die Ligation von W oder Mo an den Cofaktor verantwortlich sind. *A. aromaticum* EbN1 kodiert für drei Genprodukte, die zu MoeA aus *E. coli* eine gewisse Identität aufweisen. Für die Isolierung wurden Fusionsprodukte mit Strep-Tag hergestellt. Diese konnten dann mittels Affinitätschromatographie angereichert werden. Die *in silico* ermittelten molekularen Massen sind für MoeA1 42,6 kDa, für MoeA2 43,9 kDa und für MoeA3 27,8 kDa (ermittelt mit Gentle, Universität Köln). Die Gensequenzen von *moeA1* und von *moeA2* wurden mit der Strep-Tag-Sequenz am 5'-Ende fusioniert. Dagegen liegt bei *moeA3* eine Fusion mit einer Twin-Strep-Tag-Sequenz am 3'-Ende vor. Für die Produktion dieser Proteine wurden sowohl der *E. coli* DH5 α als auch der Stamm BL21 verwendet.

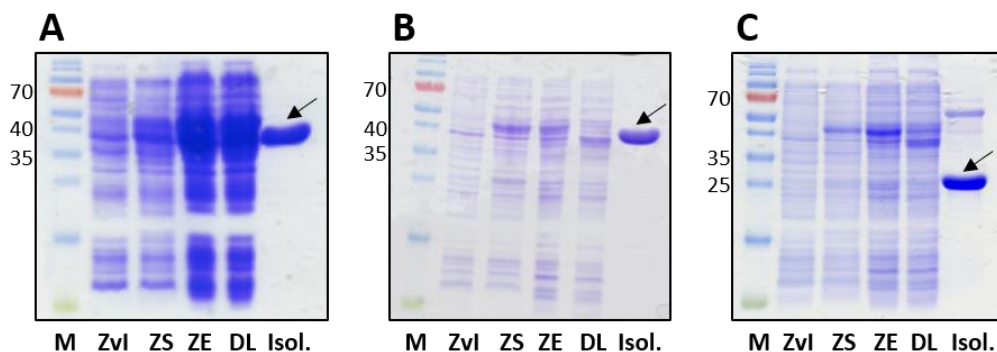


Abbildung 17: SDS-PAGE der Anreicherung von MoeA1, MoeA2 und MoeA3. Angegeben sind die relevanten relativen molekulare Massen des Markers (M). Aufgetragen wurden Zellextrakt vor Induktion (Zvl), Zellsediment (ZS), Zellextrakt (ZE), der Durchlauf der Affinitätschromatographie (DL) und das jeweilige isolierte Protein (Isol.). (A) MoeA1 zeigt eine molekulare Masse von etwa 40 kDa (Pfeil). (B) Ebenso zeigt MoeA2 eine molekulare Masse von etwa 40 kDa (Pfeil). (C) Die relevante Bande für MoeA3 liegt bei einer molekularen Masse von etwa 25 kDa (Pfeil).

Alle Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie angereichert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. MoeA1 und MoeA2 zeigen eine molekulare Masse um ca. 40 kDa und MoeA3 um ca. 25 kDa (s. Abb. 17A-C). Diese Werte sind vergleichbar mit den *in silico* ermittelten Werten. Des Weiteren wurden die Identitäten der isolierten Proteine mittels MALDI-TOF-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt).

7.3. Molekulare Masse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3

Zur Analyse der molekularen Masse der nativen untersuchten Proteine wurden zwei Methoden angewendet, nämlich Nativ-PAGE-Analyse und Quervernetzung mit Glutardialdehyd oder Dimethyl-Suberimidat (s. Ergebnisse 7.4.). Die Nativ-PAGE-Methode wird durch einen *Ferguson-Plot* ausgewertet. Bei dieser Methode werden die Proteine mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, d.h. durch Abwesenheit von SDS bleibt eine Denaturierung der Proteine aus und sie behalten ihre Struktur bei. Durch Verwendung von verschiedenen Konzentrationen von Polyacrylamid kann dann anhand des Laufverhaltens des Proteins im Gel die molekulare Masse ermittelt werden. Hierfür wird die jeweilige Distanz der Probe zum Startpunkt der Probe durch die Distanz der Lauffront zum Startpunkt der Probe dividiert. Dieser Wert wird als R_f -Wert (*related front*; häufig verwendet bei der Dünnschichtchromatographie) bezeichnet. Die ermittelten R_f -Werte werden logarithmisch gegen die Konzentration des Polyacrylamids im jeweiligen Gel aufgetragen (s. Abb. 18A). Als Kontrollen dienen BSA (Bovines Serum Albumin), das als Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer vorliegt und Ovalbumin. Die Mess-Punkte jedes Proteins werden als lineare Graphen verbunden. Die daraus erhaltenen Beträge der Steigungen für die Kontroll-Proteine werden wiederum gegen die Logarithmen der jeweiligen molekularen Massen aufgetragen. Mit den bekannten molekularen Massen der Kontroll-Proteine kann so eine Standardgerade erstellt werden. Anhand dieser Gerade erfolgt dann die Ermittlung der molekularen Masse der zu untersuchenden Proteine (s. Abb. 18B und C).

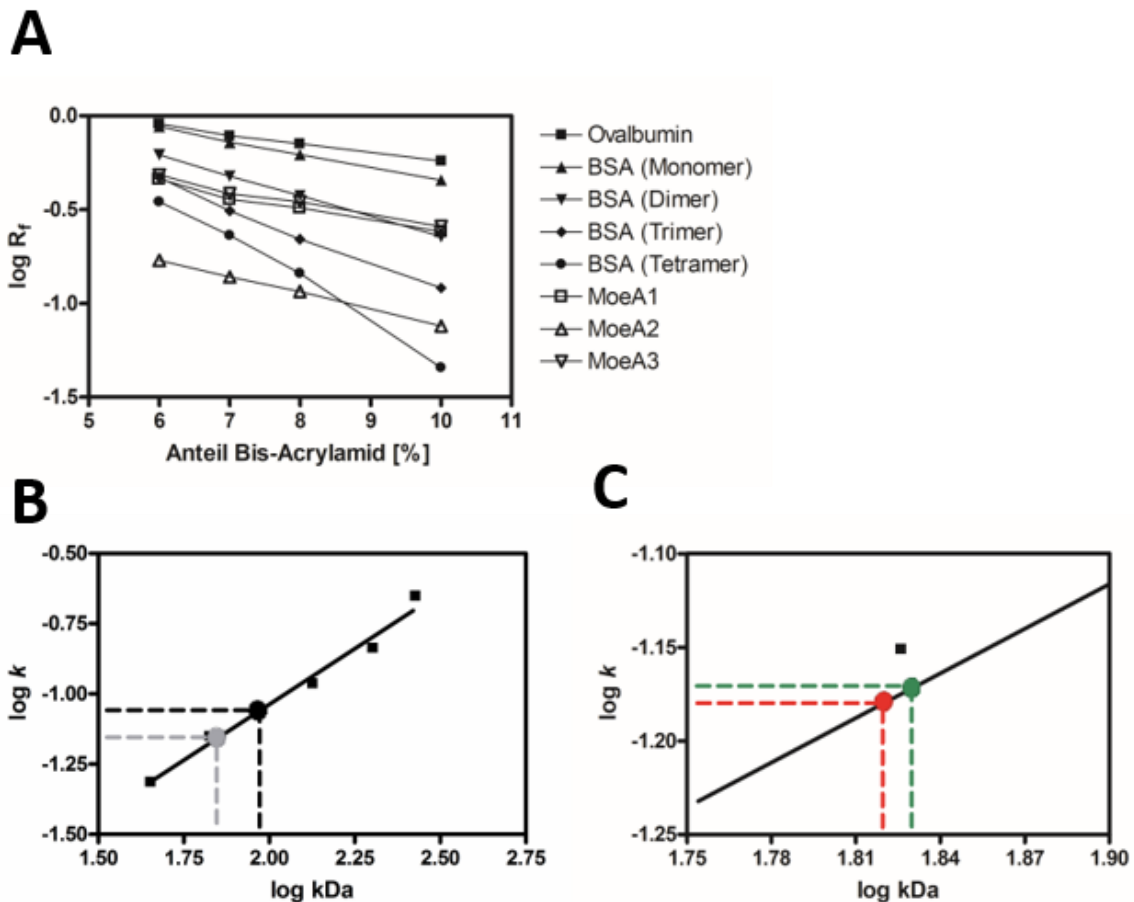


Abbildung 18: Ferguson-Plot-Analyse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3. (A) Logarithmische Auftragung der R_f -Werte gegen die Polyacrylamid-Konzentration. (B) Die Beträge der Steigungen der Kontroll-Proteine mit bekannten molekularen Massen werden gegen den Logarithmus der molekularen Masse in kDa aufgetragen. Anhand der Standardgeraden können die molekularen Massen von MoeA1 und MoeA3 (grauer Punkt) zusammen mit MoeA2 (schwarzer Punkt) ermittelt werden. MoeA1 und MoeA3 liegen bei etwa 57 kDa und MoeA2 bei 92 kDa. (C) Vergrößerung des Bereiches um den grauen Punkt. MoeA1 (grüner Punkt) zeigt hier eine leicht größere molekulare Masse als MoeA3 (roter Punkt). Die Kontrollen sind BSA als Monomer (67 kDa), als Dimer (134 kDa), als Trimer (201 kDa) und als Tetramer (268 kDa) und Ovalbumin (45 kDa).

Die molekulare Masse von MoeA2 beträgt nach dieser Analyse 92 kDa. Dies entspricht in etwa einer dimeren Anordnung von MoeA2 mit einer molekularen Masse von 46 kDa pro Untereinheit (s. Abb. 18B, schwarzer Punkt). Dagegen zeigen MoeA1 und MoeA3 jeweils eine molekulare Masse von ca. 57 kDa (s. Abb. 18B, grauer Punkt). Der Unterschied der beiden Proteine ist marginal, aber MoeA1 zeigt eine leicht größere molekulare Masse (s. Abb. 18C). Dies bedeutet für MoeA1 mit den theoretischen 42,6 kDa, dass hier wahrscheinlich ein Monomer vorliegt. Dagegen liegt MoeA3 mit der ca. doppelten molekularen Masse des Genprodukts ebenso wie MoeA2 als Dimer vor.

7.4. Untersuchung des Bindungsverhaltens der Untereinheiten mittels Quervernetzung

Eine weitere Methode zur Untersuchung der molekularen Masse ist die Quervernetzung der Proteine durch Glutardialdehyd oder Dimethyl-Suberimidat. Mit beiden Quervernetzer können freie Aminogruppen zwischen den Untereinheiten kovalent gebunden werden. Dadurch bleiben die Untereinheiten nach Denaturierung aneinandergelassen. Abhängig von dem verwendeten Quervernetzer wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und für eine SDS-PAGE-Analyse vorbereitet.

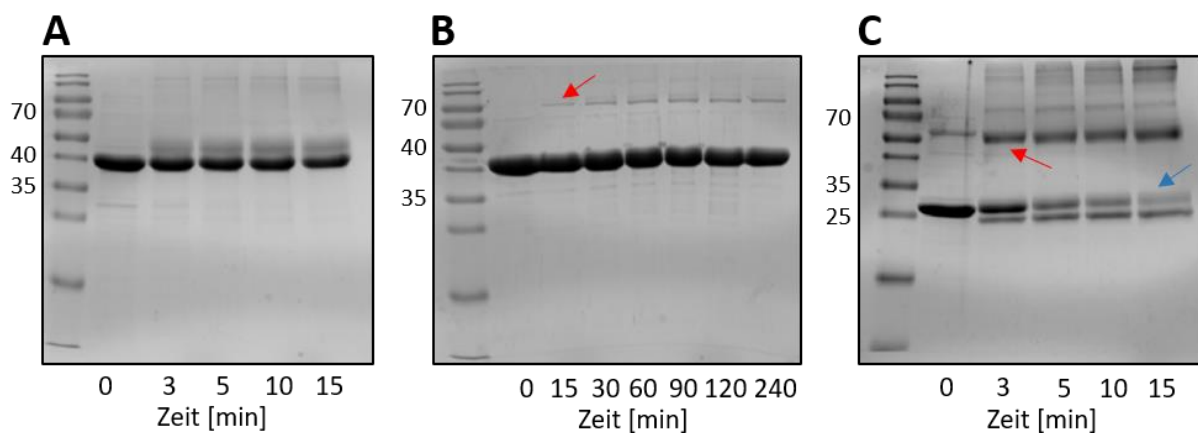


Abbildung 19: Untersuchung der molekularen Masse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3 mittels Quervernetzung. (A) MoeA1 (42,6 kDa) mit Glutardialdehyd als Quervernetzer zeigt keine Dimerisierung. (B) Bei MoeA2 mit Verwendung von Dimethyl-Suberimidat als Quervernetzer entsteht leicht oberhalb der 70 kDa eine Bande (roter Pfeil). (C) Bei MoeA3 mit Verwendung von Glutardialdehyd als Quervernetzer entstehen diverse Banden. Eine mögliche Dimerisierung ist bei etwa 40 kDa sichtbar (roter Pfeil). Im Laufe des Experiments nimmt die Bande des monomeren MoeA3 ab (blauer Pfeil).

Bei dem Ergebnis mit MoeA1 ist wie im vorangegangenen *Ferguson-Plot* keine Dimerisierung sichtbar (s. Abb. 19A). Zwar ist oberhalb von MoeA1 (ca. zwischen 40 kDa und 70 kDa) eine zusätzliche Bande entstanden, doch diese Bande kann aufgrund der Größe nicht einem MoeA1-Dimer zugeordnet werden. Auch die Verwendung von Dimethyl-Suberimidat zeigt keine Dimerisierung (Daten nicht gezeigt). Dagegen ist bei MoeA2 bei Verwendung von Dimethyl-Suberimidat als Quervernetzer nach 15 min eine schwache Bande etwas oberhalb von 70 kDa zu erkennen (s. Abb. 19B). Das Dimer von MoeA2 hat eine theoretische molekulare Masse von 88 kDa, sodass es sich wahrscheinlich um ein Dimer handelt. Bei MoeA3 mit der Verwendung von Glutardialdehyd als Quervernetzer ist nach 3 min eine Dimerisierung bei etwa 40 kDa sichtbar (s. Abb. 19C). Des Weiteren wird im Verlauf des Experiments die Bande von MoeA3 deutlich reduziert. Zusätzlich entstehen bei diesem Versuch weitere Banden, aber ob es sich hierbei um weitere Multimere oder Abbauprodukte von MoeA3 handelt, ist unklar.

7.5. Untersuchung der Bindungsaffinität zu ausgewählten Oxoanionen

Das Protein MoeA ligiert das Übergangsmetall Molybdän aus Molybdat mit dem Vorläufer MPT zu dem Mo-Co. Doch kann durch das gleiche Enzym auch Wolfram ligiert werden. Die Aufnahme der Metalle in die Zelle erfolgt in Form der Oxoanionen Molybdat oder Wolframat (Übersicht in Bevers *et al.*, 2009). Im Folgenden wurde die Affinität der verschiedenen Maturationsfaktoren gegenüber den beiden Oxoanionen Molybdat und Wolframat untersucht. Vor allem im Fokus stehen hier MoeA1 und MoeA2.

7.5.1. Analyse der Element-Zusammensetzung (ICP-MS)

Mit der Methode der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, kurz ICP-MS) können Element-Zusammensetzungen analysiert werden. In dieser Arbeit wurde dies zur Analyse der AOR, aber auch zur Analyse des Bindungsverhaltens der Oxoanionen Wolframat und Molybdat an den Maturationsfaktoren MoeA1 und MoeA2 und der putativen ADPR-PP MoeA3 (s. Ergebnisse 7.1.2.) verwendet. Zu diesem Zweck wurde isoliertes Protein mit den getesteten Oxoanionen inkubiert und anschließend mit einer Entsalzungssäule von den überschüssigen Oxoanion-Salzen getrennt. Ein Teil der Ergebnisse sind Bestandteil der Bachelorarbeit von Aline Rosin (2018).

Tabelle 15: Analyse des Bindungsverhaltens der Oxoanionen Molybdat und Wolframat mit MoeA1, MoeA2 und MoeA3 mittels ICP-MS. Die Werte sind in mol Element pro mol Monomer angegeben. Als Kontrolle zu den Daten mit den Oxoanionen (+) wurden die Proteine ohne Inkubation mit den jeweiligen Oxoanionen (-) gemessen. Der komplette Datensatz ist im Anhang in Tabelle 20 zu finden.

Element	MoeA1		MoeA2		MoeA3		Erwartung
	+	-	+	-	+	-	
Mo	0,03	<0,01	0,72	<0,01	0,62	<0,01	1
W	0,02	<0,01	0,31	<0,01	0,39	<0,01	1

Die isolierten Proteine zeigen ohne Inkubation mit einem der Oxoanionen weniger als 0,01 mol der Oxoanionen zu mol Monomer auf (s. Anhang Tab. 20). Im Vergleich dazu ist der Wert von Molybdän und Wolfram nach Inkubation erhöht (s. Tab. 15). Bei den Proben mit MoeA1 sind 0,03 mol Mo und 0,02 mol W pro Monomer gemessen worden, also kaum mehr als im unbehandelten Protein. Dagegen sind die Werte von Molybdän und Wolfram bei MoeA2 mit 0,72 mol Mo zu 0,30 mol W und bei MoeA3 mit 0,62 mol Mo zu 0,39 mol W pro Monomer des jeweiligen Proteins wesentlich erhöht. Zudem sind bei MoeA2 und MoeA3 die Werte von gebundenem Mo zweifach höher verglichen mit den Werten mit W. Als drittes Oxoanion mit

ähnlicher chemischer Struktur wie Molybdat oder Wolframat wurde auch Selenat als potentieller Ligand untersucht. Hier wurden MoeA2 und MoeA3 mit Selenat inkubiert und anschließend entsalzt. Beide Proben zeigen eine deutlich erhöhte Menge an Selen von 3,48 mol bei MoeA2 und 6,9 mol bei MoeA3 (s. Anhang Tab. 20). Der komplette Datensatz zeigt auch erhöhte Werte für Phosphor bei den Kontrollen ohne Oxoanionen von 2,13 mol bei MoeA1, 3,43 mol bei MoeA2 und 5,85 mol bei MoeA3 (s. Anhang Tab. 20). Jedoch sind diese Werte bei MoeA2 und MoeA3 nach Inkubation mit den jeweiligen Oxoanionen weitaus geringer. Mit dieser Methode zeigen MoeA2 und MoeA3 Bindungsaffinitäten gegenüber Molybdat und Wolframat auf.

7.5.2. *MicroScale Thermophoresis* (MST)

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstante (K_d) und der Assoziationskonstante (K_a) von MoeA1 und MoeA2 mit den Oxoanionen Molybdat oder Wolframat wurde die Methode der *MicroScale Thermophoresis* (MST) verwendet. Hierfür wurden die Proteine MoeA1 und MoeA2 an einem Cystein kovalent mit Fluorophoren markiert. Die getestete Lösung bestand aus 200 nM Protein mit verschiedenen Konzentrationen der Übergangmetalle als Oxoanion. Als Kontrolle dient Selenat.

Tabelle 16: Dissoziationskonstante (K_d) und Assoziationskonstante (K_a) der Proteine MoeA1 und MoeA2 gegenüber den Oxoanionen Molybdat, Wolframat oder Selenat. Angabe des K_d -Wertes in nM und des K_a -Wertes in μM^{-1} . Werte in Klammern stehen für die Standardabweichung (SD). Die Anmerkung n.d. steht für nicht detektierbar. Der R^2 -Wert ist ein Gütemaß der linearen Regression.

Protein	Mo			W			Se		
	K_d [nM]	K_a [μM^{-1}]	R^2	K_d [nM]	K_a [μM^{-1}]	R^2	K_d [nM]	K_a [μM^{-1}]	R^2
MoeA1	n. d.	n. d.	n. d.	1625,4 ($\pm 1087,5$)	0,6 ($\pm 0,4$)	0,74	51,1 ($\pm 13,4$)	19,6 ($\pm 5,1$)	0,95
MoeA2	45,9 ($\pm 17,0$)	21,8 ($\pm 8,1$)	0,98	36,8 ($\pm 3,0$)	27,2 ($\pm 2,2$)	0,99	n. d.	n. d.	n. d.

Anhand der Konstanten ist ein Unterschied des Bindungsverhaltens zwischen MoeA1 und MoeA2 erkennbar (s. Tab. 16). MoeA1 zeigt mit Selenat einen K_d -Wert von 51,1 nM und damit eine starke Bindung. Dagegen ist die Affinität zu Wolframat sehr gering und zeigt einen hohen K_d -Wert von 1625,4 nM. Auch deutet dabei der niedrige R^2 -Wert auf eine größere Messungenauigkeit hin. Mit Molybdat kann überhaupt keine Affinität festgestellt werden. Bei MoeA2 sind hohe Affinitäten vor allem mit Molybdat und Wolframat messbar. Mit Molybdat

wird ein K_d -Wert von 45,9 nM und mit Wolframat von 36,8 nM erreicht. Dagegen zeigt MoeA2 mit Selenat zeigt keine Affinität.

7.5.3. *Thermal Shift Assay* (TSA)

Mit dem *Thermal Shift Assay* wird die Thermostabilität von Proteinen bei Anwesenheit eines Bindungspartners untersucht. Der Bindungspartner stabilisiert das Protein gegen Denaturierung. Mit dieser Methode werden die Proteine MoeA1, MoeA2 und MoeA3 zusammen mit den möglichen Bindungspartnern Molybdat oder Wolframat untersucht. Hierfür sind 50 μ M des Proteins mit 1 mM, 5 mM und 10 mM des jeweiligen Oxoanions mit zunehmender Temperatur inkubiert worden. Zur Visualisierung wurde der Fluoreszenz-Farbstoff SYPRO-Orange verwendet. Durch die zunehmende Entfaltung des Proteins erhöht sich die Fluoreszenz. Mit Aggregation des Proteins sinkt die Fluoreszenz durch Dissoziation des Farbstoffs. Am jeweiligen Umschlagpunkt wird dann die Schmelztemperatur ermittelt. Mit der Anpassung der y-Achse als Funktion der Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit (dF/dT) kann die Schmelztemperatur am Maximum abgelesen werden. Die Schmelztemperatur von unbehandeltem MoeA1 beträgt ca. 53°C (s. Abb. 20A). Diese Schmelztemperatur ändert sich bei der Anwesenheit von Molybdat bei allen Konzentrationen oder 1 mM Wolframat nicht, aber bei den Messungen mit 5 mM bzw. 10 mM Wolframat erfolgt eine Erhöhung um etwa 2°C bis 3°C. Ebenso ist eine Verschiebung der Schmelztemperatur bei MoeA3 von ca. 52°C auf ca. 55°C bei der Anwesenheit von 5 mM bzw. 10 mM Wolframat sichtbar.

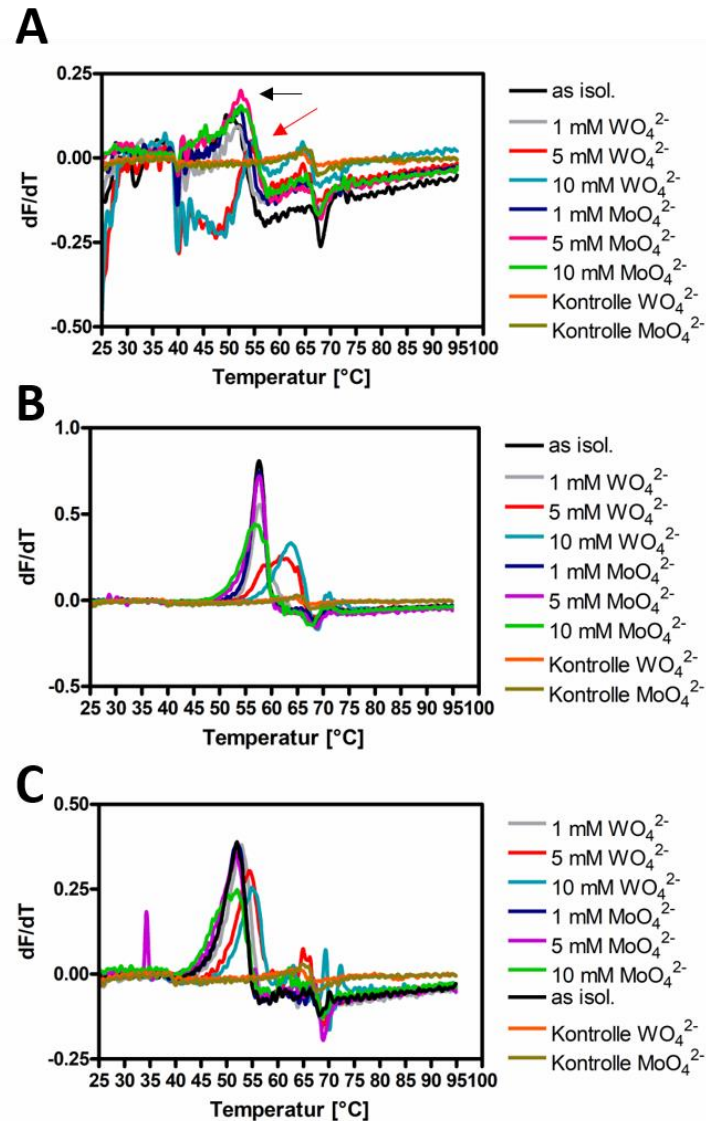


Abbildung 20: Messung der Thermostabilität von MoeA1, MoeA2 und MoeA3 mit den Oxoanionen Molybdat und Wolframat. Die Veränderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Temperatur (dF/dT) wird gegen die Temperatur aufgetragen. Die Proben wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Molybdat (MoO_4^{2-}) oder Wolframat (WO_4^{2-}) inkubiert. Als Kontrolle dienen Ansätze ohne Protein mit MoO_4^{2-} (oliv) oder WO_4^{2-} (orange). Verwendet wurden 1 mM MoO_4^{2-} (lila), 5 mM MoO_4^{2-} (pink), 10 mM MoO_4^{2-} (grün), 1 mM WO_4^{2-} (grau), 5 mM WO_4^{2-} (rot) und 10 mM WO_4^{2-} (türkis). (A) Die Schmelztemperatur von MoeA1 liegt bei 53°C (schwarzer Pfeil). Mit 5 mM und 10 mM WO_4^{2-} ist eine Verschiebung von 2°C bis 3°C sichtbar (roter Pfeil). (B) Die Schmelztemperatur von MoeA2 liegt bei 55°C. Mit 5 mM und 10 mM WO_4^{2-} ist eine Verschiebung von 10°C sichtbar. (C) Die Schmelztemperatur von MoeA3 liegt bei 52°C. Mit 5 mM und 10 mM WO_4^{2-} ist eine Verschiebung von 2°C bis 3°C sichtbar.

Eine noch deutlichere Verschiebung in Gegenwart von Wolframat ist bei MoeA2 beobachtbar (s. Abb. 20B). MoeA2 selber besitzt eine Schmelztemperatur von ca. 55°C. Während bei Anwesenheit von Molybdat keine Änderung erfolgt ist mit Wolframat-Konzentration von 5 mM und 10 mM eine Erhöhung der Schmelztemperatur bis auf 65°C messbar. MoeA2 zeigt hier eine deutlichere Erhöhung der Schmelztemperatur, was auf eine erhöhte Affinität zu Wolframat hindeuten könnte.

7.6. Untersuchung verschiedener Maturationsfaktoren durch Komplementation von *E. coli*-Mutanten

Die Maturation von Molybdänenzymen ist in *E. coli* weitreichend untersucht worden. Im Genom von *E. coli* ist nur ein MoeA für die Ligation des Metalls kodiert (Nichols und Rajagopalan, 2002). Dagegen sind mit MoeA1 und MoeA2 mindestens zwei mögliche paraloge Kandidaten aus *A. aromaticum* mit etwa der gleichen Größe bekannt. Ebenso zeigt MoeA3 eine gewisse Ähnlichkeit auf. Um die Funktionalität der MoeA-Analoga und anderer Maturationsfaktoren aus *A. aromaticum* weiter *in vivo* zu testen, wurden sie auf genetische Komplementation der jeweiligen *E. coli*-Mutanten getestet. Zusätzlich wurden die jeweiligen homologen *moeA*-Gene aus *Acidovorax* sp. JS42 getestet, der ebenso wie *A. aromaticum* eine AOR besitzt (s. Ergebnisse 5.) und als möglicher Wirt zur Produktion dienen könnte. Der Erfolg der Komplementation wird anhand der Aktivität des *E. coli*-Molybdänenzymes Formiat-Dehydrogenase H (FdhH) getestet. Dieses Enzym oxidiert unter Gährbedingungen Formiat zu CO₂ und H₂. Zur Visualisierung werden die Kulturen, die auf LB-Festmedium anaerob kultiviert wurden, mit Top-Agar beschichtet, der das Substrat Formiat und den Elektronakzeptor Benzylviologen enthält. Durch die Reduktion von Benzylviologen erfolgt ein Farbumschlag zu violett. Des Weiteren wurden so auch die Maturationsfaktoren Moad, Moae und MogA aus *A. aromaticum* mit den jeweiligen *E. coli*-Mutanten getestet.

7.6.1. Komplementation einer *E. coli* *moeA*-Mutante mit *moeA1*, *moeA2* oder *moeA3* aus *A. aromaticum* EbN1 und *Acidovorax* sp. JS42

Für die Komplementation der *E. coli* Δ *moeA*-Mutante (JW0811-1) wurde die Mutante mit Plasmiden transformiert, die die Gene *moeA1*, *moeA2* oder *moeA3* aus *A. aromaticum* oder aus *Acidovorax* sp. JS42 enthielten. Eine Zugabe des Induktors Anhydrotetrazyklin (AHT) ist nicht nötig und hatte keinen Einfluss auf das Endergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Kulturen wurden unter N₂-Atmosphäre kultiviert und direkt nach Exposition an der Luft mit dem Top-Agar beschichtet. Innerhalb weniger Minuten zeigte sich der Farbumschlag durch die Reaktion der FdhH (s. Abb. 21).

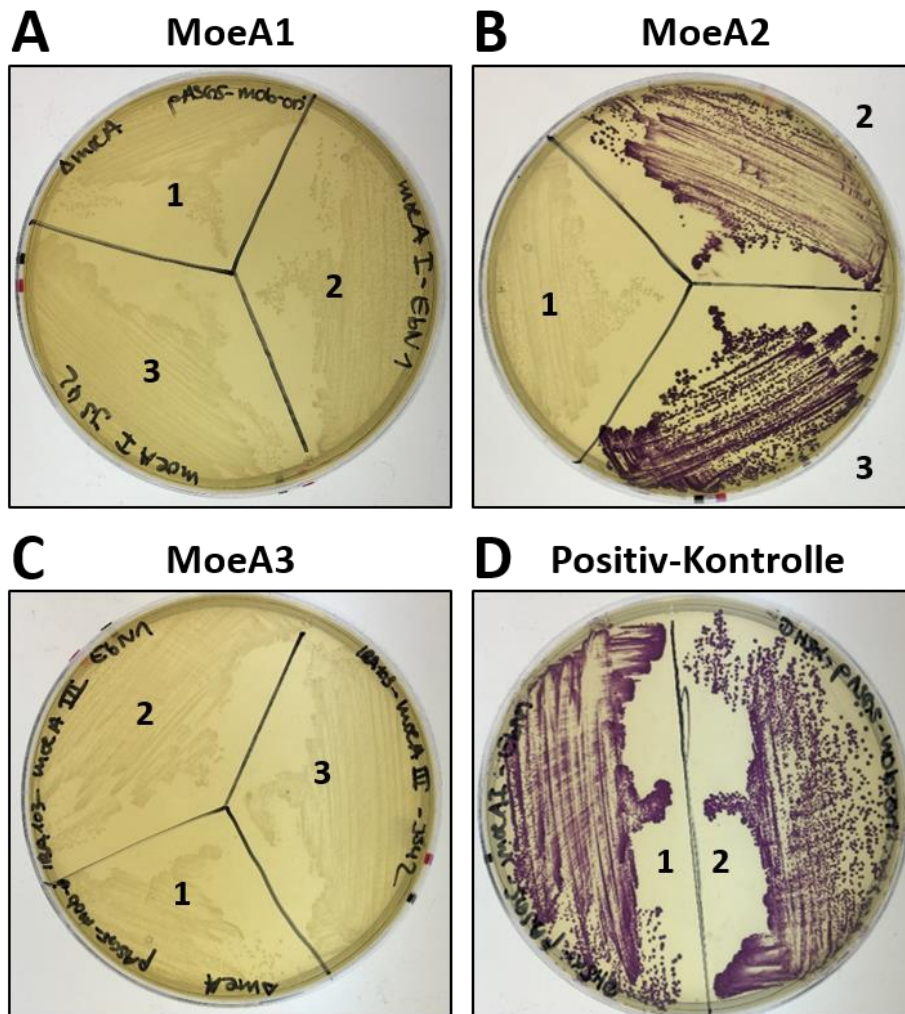


Abbildung 21: Komplementation von *E. coli* $\Delta moeA$ Mutanten mit homologen *moeA*-Genen von *A. aromaticum* EbN1 und *Acidovorax* sp. JS42. Nachweis der Wiederherstellung des Phänotyps durch Aktivitäts-Messung der FdhH. Die Reaktion wird mittels Farbnachweis durch Reduktion von Benzylviologen gezeigt. Nummerierung bei A-C ist *E. coli*-Mutante mit Leervektor (1), Transformante mit *moeA*-Vektor mit Sequenz aus *A. aromaticum* (2) und aus *Acidovorax* sp. (3). (A) Der Phänotyp der Mutante wird mit der Komplementation von MoeA1 nicht wiederhergestellt. (B) Dagegen ist bei den Mutanten mit MoeA2 eine Aktivität sichtbar. (C) Die Zellen mit *moeA3*-Vektor zeigen keine Aktivität. (D) Die Positiv-Kontrolle *E. coli* DH5 α mit *moeA1*-Vektor (1) als auch die Kontrolle mit Leervektor (2) zeigen Aktivität.

Von den getesteten Komplementationen ist nur bei der Mutante mit den eingebrachten *moeA2*-Genen aus *A. aromaticum* und *Acidovorax* sp. JS42 eine Aktivität der FdhH festzustellen (s. Abb. 21B). Dagegen ist bei den Zellen mit *moeA1* und *moeA3* keine Aktivität erkennbar (s. Abb. 21A und C). Als Kontrolle wurde mit DH5 α ein typischer Laborstamm mit einer funktionellen Maturations-Maschinerie verwendet (s. Abb. 21D).

7.6.2. Komplementierung von *E. coli moaD*-, *moaE*- und *moga*-Mutanten

Mit dieser Methode wurden ebenso weitere Proteine untersucht, die in der Maturation des Cofaktors in *A. aromaticum* beteiligt sind. MoaD und MoaE bilden den MPT-Synthase-Komplex. Dieser synthetisiert MPT indem die Dithiolen-Gruppe in cPMP eingebracht werden.

MogA adenyliert MPT zu MPT-AMP, welches MoeA dann durch Ligation des Übergangmetalls zu dem fertigen Cofaktor umsetzt. Die verwendeten Mutanten sind daher eine $\Delta moaD$ -Mutante (JW0767-1), eine $\Delta moaE$ -Mutante (JW0768-1) und eine $\Delta mogA$ -Mutante (JW0008-5). Diese Mutanten wurden mit dem jeweils korrespondierenden Genen aus *A. aromaticum* komplementiert und auf Festmedium anaerob kultiviert. Nach Kultivierung erfolgt der Test auf Aktivität der FdhH (s. Abb. 22).

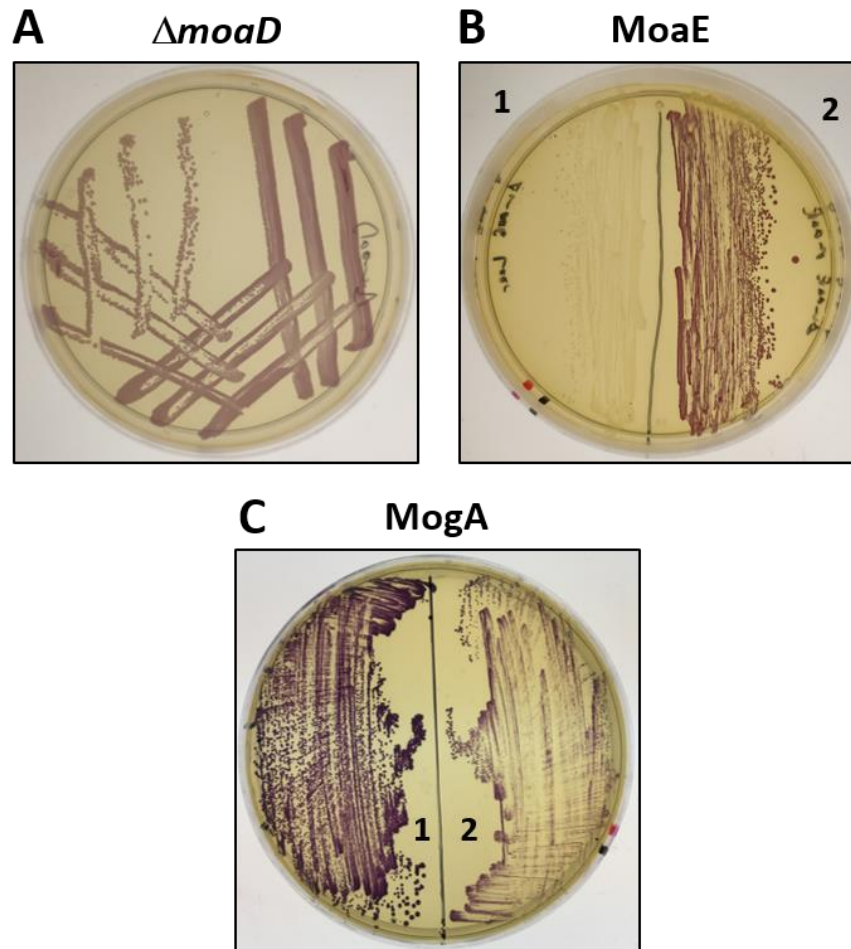


Abbildung 22: Komplementation von *E. coli* $\Delta moaD$ -, $\Delta moaE$ - und $\Delta mogA$ -Mutanten mit homologen *moeA*-Genen von *A. aromaticum* EbN1. Nachweis der Wiederherstellung des Phänotyps durch Aktivitäts-Messung der FdhH. Die Reaktion wird mittels Farbnachweis durch Reduktion von Benzylviologen gezeigt. (A) Der Phänotyp der $\Delta moaD$ -Mutante zeigt bereits FdhH-Aktivität. (B) Dagegen ist bei der $\Delta moaE$ -Mutante mit Leervektor (1) und *moaE*-Vektor (2) deutlich die Aktivität mit dem eingebrachten *MoaE* sichtbar. (C) Die $\Delta mogA$ -Mutante zeigt mit Leervektor (2) eine geringe Aktivität, aber bei der Komplementante ist die Aktivität höher, da die Intensität deutlich stärker ausgeprägt ist (1).

Bei der $\Delta moaD$ -Mutante ist schon ohne Komplementation eine Aktivität der FdhH sichtbar (s. Abb. 22A). Dagegen ist bei den komplementierten *moaE*-Mutante und *mogA*-Mutante ein starker Unterschied der FdhH-Aktivität erkennbar (s. Abb. 22B und C). Bei der $\Delta moaE$ -Mutante mit Leervektor ist keine Aktivität sichtbar, aber durch Komplementation wird der Phänotyp wiederhergestellt (s. Abb. 22B). Dagegen zeigt die $\Delta mogA$ -Mutante mit Leervektor

bereits eine geringere FdhH-Aktivität, dennoch ist die Intensität im Vergleich zu der komplementierten Mutante deutlich geringer (s. Abb. 22C). Hier zeigt sich, dass bei der $\Delta moaD$ -Mutante und bei der $\Delta moaE$ -Mutante Faktoren vorhanden sind, die die FdhH-Aktivität wiederherstellen.

7.6.3. Erstellung einer *E. coli* $\Delta moaD/\Delta thiS$ -Mutante durch Phage P1-Transduktion

Aufgrund der FdhH-Aktivität der $\Delta moaD$ -Mutante (s. Abb. 22A) wurde untersucht, ob das funktionell ähnliche ThiS-Protein das fehlende MoaD ersetzt. ThiS ist an dem Einbau des Schwefel-Atoms bei der Synthese des Thiazolrings im Thiamin-Biosyntheseweg involviert (Übersicht in Begley *et al.*, 1999). ThiS besitzt dazu ebenso wie MoaD einen Glycin-Rest am C-Terminus, an dem das Schwefel-Atom vorübergehend gebunden wird. Deshalb sollte mit der Erstellung einer $\Delta moaD/\Delta thiS$ -Doppelmutante durch Deletion des *thiS*-Gens überprüft werden, ob ThiS für den Phänotyp verantwortlich ist. Für die Erstellung der Doppelmutante wurde zuerst die Kanamycin-Resistenzkassette aus der $\Delta moaD$ -Mutante mit Hilfe der FLP-Rekombinase entfernt (Datsenko und Wanner, 2000). Mit dieser Rekombinase können Sequenzen die flankiert sind von FRT-Sequenzen, wie die Kanamycin-Resistenzkassetten der Stämme aus der Keio-Kollektion, aus dem Genom heraus kombiniert werden. Hierfür wurde ein Plasmid mit der kodierten Rekombinase in die Mutante eingebracht. Nach Selektion der Zellen ohne Kassette und ohne Plasmid wurden diese Zellen mit P1-Phagen inkubiert, die aus der Infektion mit der $\Delta thiS$ -Mutante (JW3955-2) stammen. Durch Selektion mit Kanamycin wurden die Doppelmutante isoliert. Zur Überprüfung der Doppelmutanten wurden diese auf Minimalmedium mit und ohne Thiamin kultiviert (s. Abb.23).

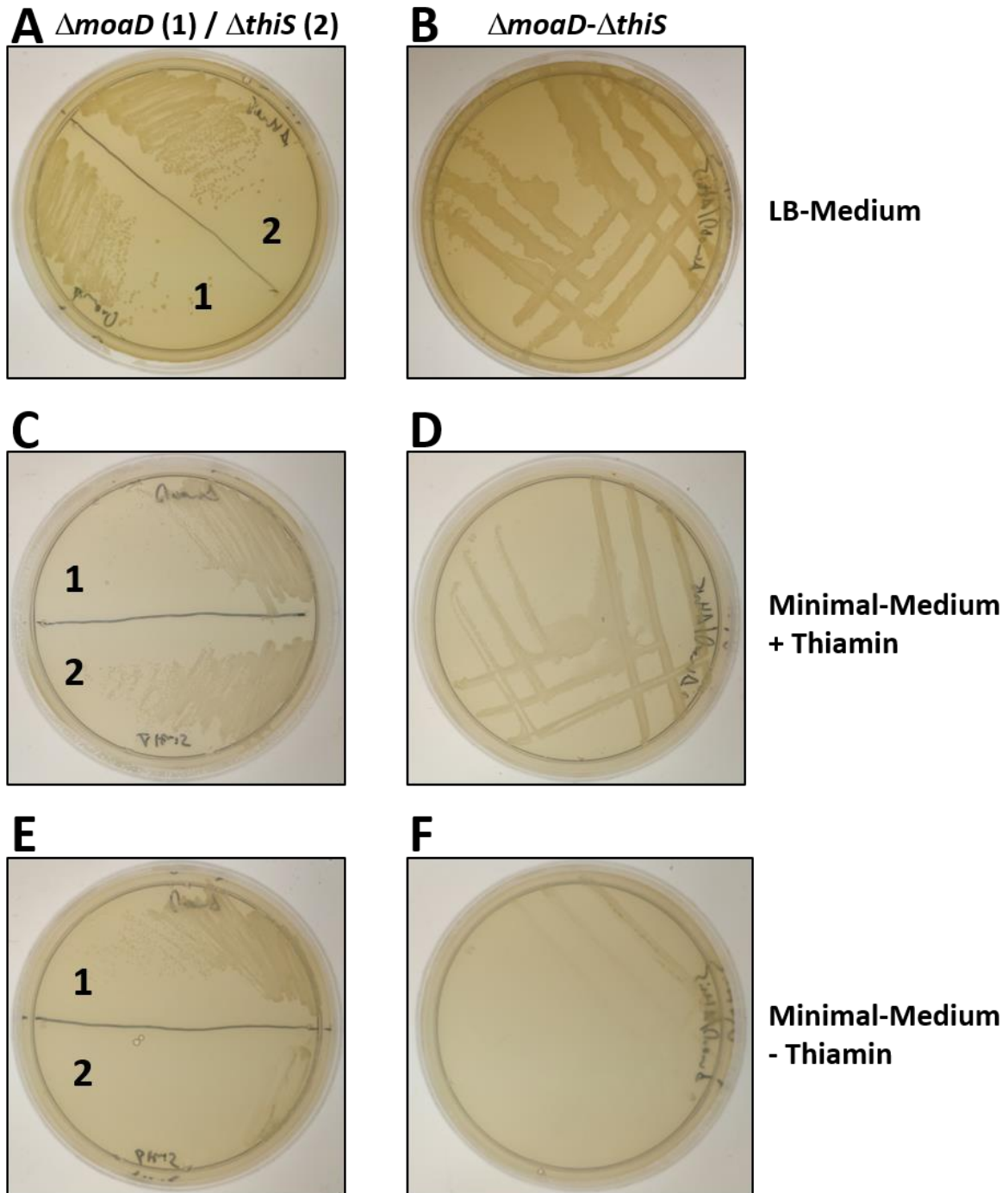


Abbildung 23: Überprüfung der Deletion von *thiS* bei der *E. coli*-Doppelmutante $\Delta moaD/\Delta thiS$. (A) $\Delta moaD$ -Mutante (1) und $\Delta thiS$ -Mutante (2) auf LB-Festmedium zeigen Wachstum. (B) Die Doppelmutante zeigt ebenfalls Wachstum. (C) Auch die Kultivierung auf Minimalmedium mit Thiamin zeigt keinen Unterschied in Bezug auf Wachstum bei der $\Delta moaD$ -Mutante (1) und $\Delta thiS$ -Mutante (2). (D) Die Doppelmutante zeigt ebenfalls Wachstum auf Minimalmedium mit Thiamin. (E) Dagegen ist bei Abwesenheit von Thiamin ein deutlicher Unterschied zwischen der $\Delta moaD$ -Mutante (1) und der $\Delta thiS$ -Mutante (2) erkennbar. Die $\Delta thiS$ -Mutante zeigt hier nur schwaches Wachstum (F) Vergleichbar mit dem Wachstum von der $\Delta thiS$ -Mutanten auf Minimalmedium ohne Thiamin weist auch die Doppelmutante ein Wachstumsdefizit auf.

Sowohl die Einzelmutanten ($\Delta moaD$ oder $\Delta thiS$) als auch die Doppelmutante ($\Delta moaD/\Delta thiS$) zeigen kein Wachstumsdefizit auf LB-Festmedium und auf Minimal-Festmedium mit Thiamin (s. Abb.23A-D). Dagegen wird auf Minimalmedium ohne Thiamin deutlich, dass sowohl die

$\Delta thiS$ -Mutante als auch die Doppelmutante nur schwach wachsen und einen ähnlichen Phänotyp aufweisen (s. Abb. 23E und F). Die $\Delta moaD$ -Mutante zeigt auf Minimalmedium ohne Thiamin kein Wachstumsdefizit (s. Abb. 23E).

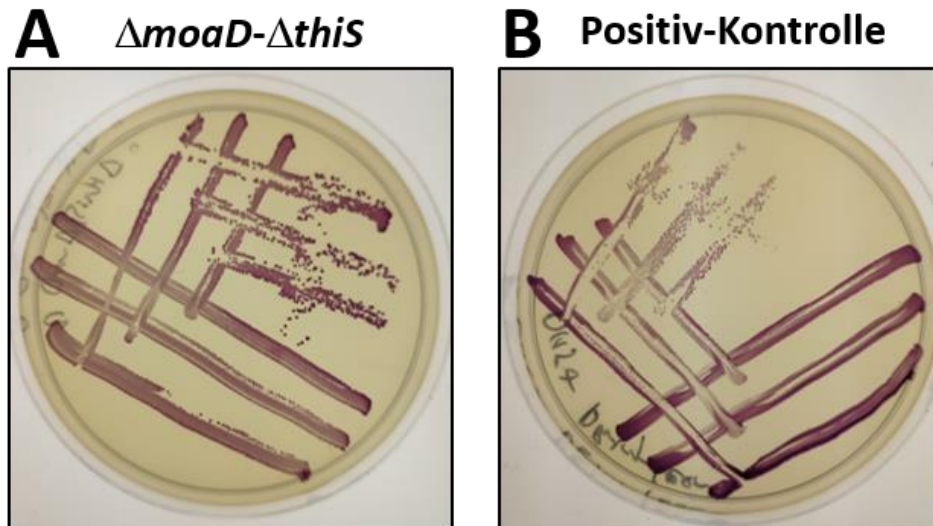


Abbildung 24: Agar-Überschichtungstest der FdhH-Aktivität der Doppelmutante. Nachweis der Wiederherstellung des Phänotyps durch Aktivitäts-Messung der FdhH. Die Reaktion wird mittels Farbnachweis durch Reduktion von Benzylviologen gezeigt. (A) Doppelmutante ohne *moaD* und *thiS* zeigt Aktivität der FdhH. (B) Als Positiv-Kontrolle dient *E. coli* DH5 α mit Leervektor.

Nach Erstellung der Doppelmutante erfolgt wieder ein Test auf Aktivität der FdhH durch Überschichtung mit Top-Agar mit Formiat und Benzylviologen. Ebenfalls wurden diese Kulturen anaerob kultiviert. Doch auch mit der erstellten Doppelmutante ist eine Aktivität der FdhH sichtbar (s. Abb. 24). Daher ist ThiS nicht für den Phänotyp verantwortlich und es bleibt unklar was diesen Phänotyp verursacht.

8. Strukturanalyse MoeA2 aus *A. aromaticum* EbN1

Mit der Strukturanalyse von MoeA2 aus *A. aromaticum* steht die zweite Struktur eines bakteriellen MoeA-Maturationsfaktors neben der Struktur von MoeA aus *E. coli* zur Verfügung. Die Kristallisation von MoeA2 mit einer Proteinkonzentration von 14 mg/ml erfolgte in 12,5 % PEG 1000, 12,5 % PEG 3350 und 12,5 % Methylpentadiol (MPD) zur Präzipitation. Als Additive dienen 0,03 M von verschiedenen Halogeniden und als Puffersystem dient 0,1 M MOPS/HEPES pH 7,5. Die Daten der Kristallisation und der nachfolgenden *Refinements* sind in Tab. 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Kristallisationsdaten und der *Refinement*-Statistik. Die Daten in Klammern stehen für die Resultate mit höchster Auflösung.

Facility	ESRF Grenoble, Beamline ID23-1
Wavelength (Å)	0,972
Resolution (Å)	48,55 – 2,1 (2,175 – 2,1)
Space Group	I222
Unit Cell <i>a</i> (Å); <i>b</i> (Å); <i>c</i> (Å); $\alpha \equiv \beta \equiv \gamma$ (°)	85.599; 97.107; 143.98; := 90
Unique Reflections	35119 (3446)
Completeness	99,25 (99,60)
Wilson B-Faktor (Å ²)	51,68
Reflections used in Refinement	35111 (3445)
Reflections used for R-free	1729 (183)
R-Work	0,1961 (0,3370)
R-free	0,2387 (0,3655)
Number of non-hydrogen atoms	3227
Macromolecules	2972
Ligands	17
Solvent	238
Protein residues	401
RMS (bonds)	0,021
RMS (angles)	1,80
Ramachandran favored (%)	93,45
Ramachandran allowed (%)	4,53
Ramachandran outliers (%)	2,02
Rotamer outliers (%)	0,33
Clashscore	18,97
Average B-factor	65,46
Macromolecules	65,14
Ligands	127,58
Solvent	64,99

Die Struktur-Auflösung erfolgte über molekularen Ersatz anhand einer bereits gelösten Struktur von MoeA aus *E. coli* (PDB: 2NRP) (Nichols *et al.*, 2007). Die Analyse zeigt, dass MoeA2 ein Dimer mit zwei L-förmigen Monomeren bildet (s. Abb. 25A und B). Die Abmessungen des Monomers betragen ca. 95 Å x 51 Å x 40 Å. Die L-förmige Struktur wird durch die Bildung des Dimers stabilisiert. Die Abmessung des Dimers beträgt ungefähr 110 Å x 52 Å x 52 Å mit einer Oberfläche von annäherungsweise 85 kÅ² und mit einer *solvent accessible surface area* (SASA) von annäherungsweise 33 kÅ². In der Originalarbeit Schrag *et al.* aus dem Jahr 2001 mit der ersten gelösten Struktur von MoeA von *E. coli*, wurden vier diskrete Domänen beschrieben. Diese Domänen können auch in dieser Struktur von MoeA2 beschrieben werden (s. Abb. 25).

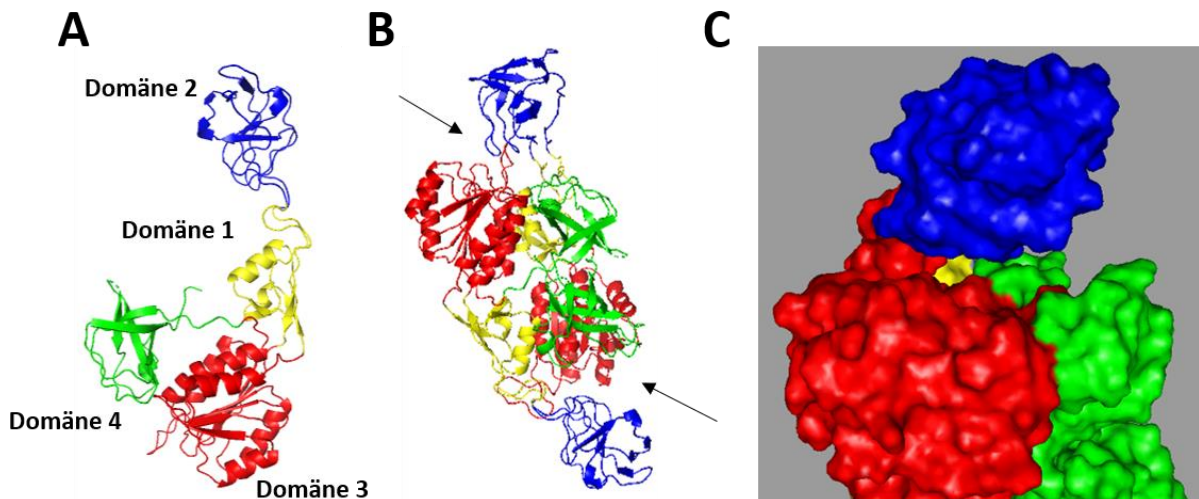


Abbildung 25: Struktur von MoeA2 aus *A. aromaticum* EbN1. (A) L-förmiges Monomer mit den vier Domänen, die aus der Arbeit von Schrag *et al.* (2001) übernommen worden sind. (B) Das Dimer besitzt zwei aktive Zentren (schwarzer Pfeil). (C) Das aktive Zentrum wird durch Domäne 2 von einem Monomer und durch Domäne 3 und 4 von dem anderen Monomer gebildet.

Die Aufteilung erfolgt vom N-Terminus mit Domäne 3 (rot) über Domäne 1 (gelb), Domäne 2 (blau) zurück über Domäne 1 und den Hauptanteil der Domäne 3 zur Domäne 4 (grün) mit dem C-Terminus (s. Abb. 25). Das aktive Zentrum wird durch die Domänen 3 und 4 von einem Monomer und der Domäne 2 von dem anderen Monomer gebildet (s. Abb. 25C).



Abbildung 26: Sequenz von MoeA2 mit Sekundärstruktur. Die Domänen-Abschnitte sind farblich hervorgehoben. Domäne 1 umfasst die Aminosäuren W35 bis V58 und A154 bis R185 (gelb). Domäne 2 erstreckt sich von P59 bis L153. Domäne 3 umfasst P14 bis G34 und R186 bis L336 (rot) und Domäne 4 erstreckt sich von P337 bis I417 mit dem N-Terminus (grün). Die Struktur weist 9 α -Helices (Sequenz unterstrichen) und 21 β -Faltblätter (Sequenz in Fettdruck) auf. Die Struktur konnte vom C-Terminus bis S13 und von D367 bis T371 nicht aufgelöst werden (grau).

Die Struktur besteht aus neun α -Helices und 21 β -Faltblättern (s. Abb. 26). Dabei sind in Domäne 1 zwei α -Helices (α 2 und α 4) und vier β -Faltblätter (β 1-2 und β 9-10) vorhanden. Die beiden Aminosäure-Ketten (W35-V58 und A154-R185) verlaufen antiparallel. Sowohl β 1 und β 10 als auch β 2 und β 9 bilden antiparallele β -Faltblattstrukturen-Paare (s. Abb. 27A). Die α -Helices sind zwischen den β -Faltblättern lokalisiert. Die Domäne 2 enthält eine α -Helix (α 3) und sechs β -Faltblattstrukturen (β 3-8) und verbindet die beiden Aminosäure-Ketten der Domäne 1 (P59-L153). Die Faltblattstrukturen β 4, β 8 und β 7 liegen antiparallel zueinander sowie die Faltblätter β 5, β 3 und β 6. Die α -Helix α 3 liegt hinter der Faltblattstruktur β 3 (s. Abb. 27B). Die Domäne 3 ist die größte Domäne mit zwei Aminosäure-Ketten (P14-G35 und R186-L335) und enthält fünf α -Helices (α 1 und α 5-8) und sechs β -Faltblattstrukturen (β 11-16). Die β -Faltblattstrukturen β 11-14 und β 16 liegen parallel zueinander. Dies wird unterbrochen durch ein antiparalleles β -Faltblatt (β 15) zwischen β 14 und β 16 (s. Abb. 27C).

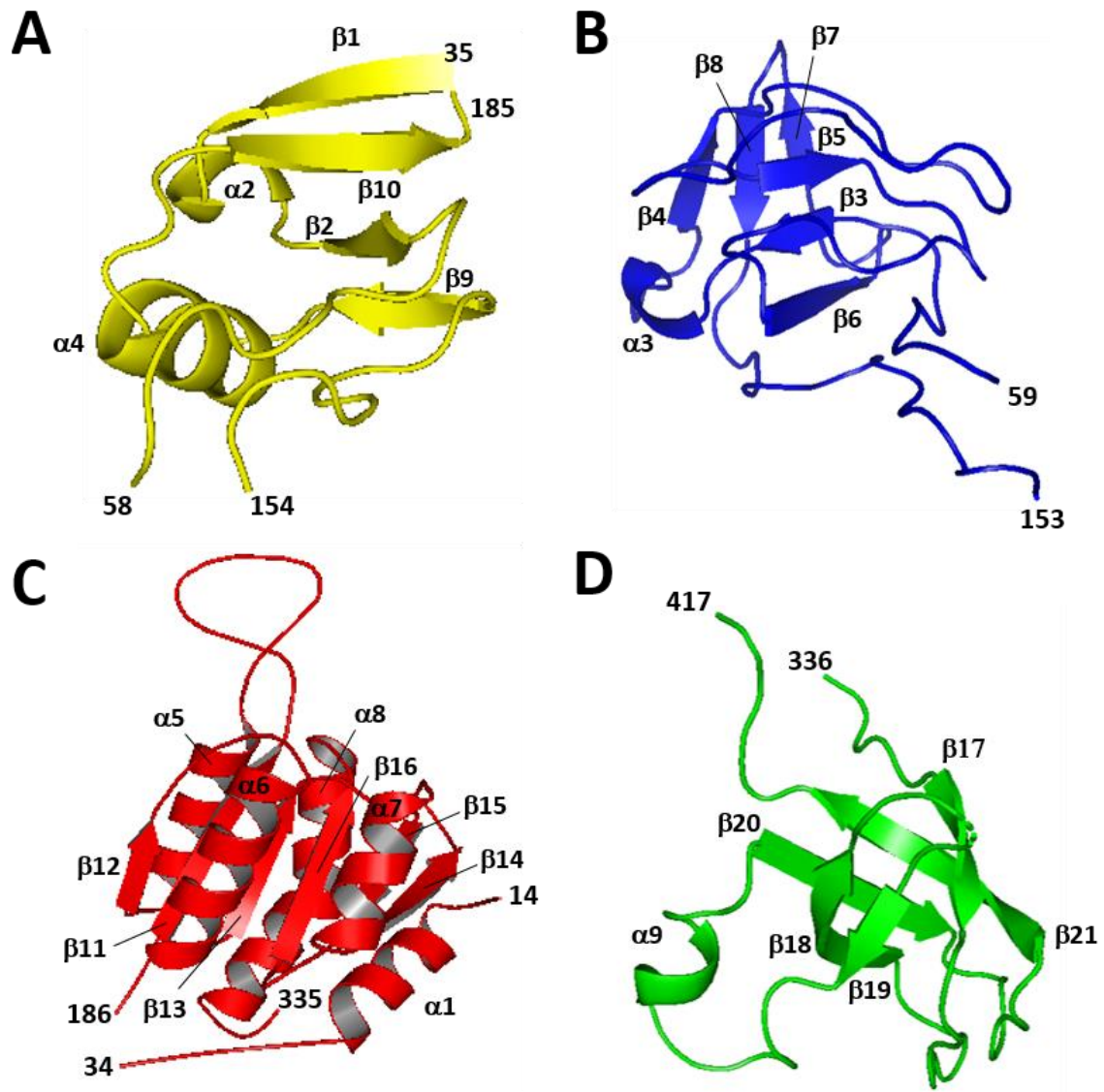


Abbildung 27: Struktur mit Sekundärstruktur von MoeA2 aufgeteilt auf die einzelnen Domänen. Dargestellt sind Domäne 1 bis 4 (A-D). Die Sekundärstrukturen sind korrespondierend zur Sequenz markiert (s. Abb. 26).

Die Domäne 4 erstreckt sich von P336 bis zum C-Terminus. Diese Domäne enthält eine α -Helix ($\alpha 9$) und fünf β -Faltblattstrukturen ($\beta 17$ -21). Hier bilden die β -Faltblattstrukturen eine kleinere Fass-Struktur aus. Die α -Helix $\alpha 9$ liegt zwischen $\beta 19$ und $\beta 20$ (s. Abb. 27D). Sowohl der N-Terminus bis P14 als auch der *Loop* bei D367 bis T371 zeigen keine ausreichende Elektronendichte und können nicht aufgelöst werden.

Diskussion

1. Die Aldehyd-Oxidoreduktase aus dem mesophilen Modellorganismus

A. aromaticum EbN1

Mit der wolframabhängigen Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus *A. aromaticum* EbN1 wurde die erste AOR aus einem mesophilen Bakterium beschrieben (Arndt *et al.*, 2019). Diese AOR wird kodiert durch das *aor*-Operon mit den drei Strukturgenen *aorA-C* und zwei kleineren Genen *aorD-E* (Schmitt *et al.*, 2017; Arndt *et al.*, 2019). Die besten getesteten Substrate sind Benzaldehyd und Phenylacetaldehyd, aber die AOR besitzt ein breites Substratspektrum und kann auch aliphatische Aldehyde wie Acetaldehyd oxidieren (Arndt *et al.*, 2019). Dieses Enzym besitzt die höchste spezifische Aktivität bei einer Temperatur von etwa 40°C und bei einem pH von 8,0 (Arndt *et al.*, 2019) (s. Abb. 7). Als Elektronenakzeptoren können sowohl Benzylviologen als auch NAD dienen, wobei die spezifische Aktivität mit NAD geringer ausfällt (Arndt *et al.*, 2019). Die Aktivität der AOR wurde zuerst in Zellextrakten von Kulturen mit Phenylalanin als C-Quelle gefunden, doch kann die Aktivität auch in Kulturen mit anderen C-Quellen detektiert werden (Debnar-Daumler *et al.*, 2014; Schmitt *et al.*, 2017; Schmitt *et al.*, 2019). Unter anderem zeigt sich Aktivität der AOR mit Kulturen, die auf 2-Phenylethylamin als auch Benzylamin als C-Quelle wachsen, da beim Abbau dieser Substrate Aldehyd-Intermediate entstehen. Innerhalb dieser Abbauwege sind normalerweise weitaus spezialisiertere Aldehyd-Dehydrogenasen beteiligt, wie die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase beim anaeroben Abbau von Phenylalanin, daher dient die AOR wahrscheinlich vor allem zur Entgiftung unter Aldehyd-Stress (Schmitt *et al.*, 2019; Arndt *et al.*, 2019).

Bisher waren vor allem verschiedene AORs aus hyperthermophilen *Archaea* oder thermophilen Bakterien beschrieben worden. Die bekannteste Untersuchung ist hierbei die Strukturanalyse der AOR aus *Pyrococcus furiosus* mit der ersten Struktur eines W-*bis*-Pterin-Cofaktors (Chan *et al.*, 1995). Im selben Zeitraum wurde unter anderem auch die archaeelle AOR aus *Thermococcus paralvinellae* untersucht (Heider *et al.*, 1995). Diese archaeelle AOR zeigte in der spektroskopischen Untersuchung mittels EPR die Anwesenheit eines W-Cofaktors im W(V)-Redoxzustand sowie ein [4Fe-4S]-Zentrum mit einem ungewöhnlichen Spin-Status $S = 3/2$ an. In dieser Arbeit wurden ähnliche EPR-Signale erstmals in einer bakteriellen AOR identifiziert (s. Abb. 8 und 9B). Das [4Fe-4S]-Zentrum mit dem $S = 3/2$ -Signal weist eine ungewöhnlich Geometrie der Cysteine auf, die das Zentrum koordinieren. In der Regel besteht

das Bindemotiv der [4Fe-4S]-Zentren aus vier Cysteinen in einer CxxCxxCxxxC-Anordnung. Am Beispiel der AOR aus *P. furiosus* besteht das Bindemotiv aus einem CxxCxxxC-Motiv (C289, C292, C296) und das vierte Cystein (C495) komplementiert das Bindemotiv erst nach Abschluss der Faltung (Chan *et al.*, 1995). Die in *A. aromaticum* homologen Cysteine sind C295, C298, C302 und C509. Zwar liegt von der AOR aus *A. aromaticum* keine Struktur vor, aber das vierte Cystein (C509) kann durch die Aminosäure-Sequenzabfolge DSAGxC identifiziert werden, die auch in der Struktur von *P. furiosus* konserviert vorliegt. Diese Sequenz ist an der Bindung des Pterins involviert (Chan *et al.*, 1995). Im Unterschied zu der AOR aus *Archaea* sind bei der AOR aus *A. aromaticum* allerdings noch weitere EPR-Signale mit $S = 1/2$ nachgewiesen, die durch Anwesenheit der zusätzlichen kleinen Untereinheit AorA mit den vier [4Fe-4S]-Zentren zustande kommen (s. Abb. 9A-B).

Ein großer Unterschied zwischen den AORs aus *Archaea* und der bakteriellen AOR aus dieser Arbeit ist die Sensitivität der AOR gegenüber Sauerstoff-Exposition. Vor allem in Zellextrakten ist nach einem Tag bei 20°C keine Abnahme der Aktivität der AOR aus *A. aromaticum* gemessen worden (Arndt *et al.*, 2019). Allerdings nimmt die Sauerstoff-Sensitivität im Verlauf der Anreicherung mit zunehmender Reinheit des Enzyms zu. Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigt die Aktivität eine Halbwertszeit von 1 h bei Exposition an Luft (Arndt *et al.*, 2019). Archaeelle AORs werden an der Luft dagegen bereits nach wenigen Minuten inaktiviert (Mukund und Adams, 1991; Heider *et al.*, 1995). Einer der Gründe für die höhere Beständigkeit der AOR aus *A. aromaticum* könnte hier die Anwesenheit der zusätzlichen Untereinheit bzw. die Assoziation des Enzyms mit verschiedenen weiteren Faktoren im Extrakt sein. Bei der Anreicherung der AOR wird häufig ein weiteres bräunliches Protein angereichert (s. Anhang Abb. 36). Das durch Analyse mit MALDI-TOF als Genprodukt des Gens *ebA5289* identifiziert wurde (Jörg Kahnt, MPI Marburg, Daten nicht gezeigt). Hierbei handelt es sich um ein Ferredoxin, das im Operon von der Benzoyl-CoA-Reduktase (*bzd*-Typ) kodiert vorliegt. Bei diesem Ferredoxin könnte es sich um einen physiologischen Redox-Partner der AOR neben NAD handeln. Zur physiologischen Rolle der AOR sollte deshalb neben der Entgiftung von Aldehyd-Intermediaten auch eine mögliche Beeinflussung des NAD- und Ferredoxin-Spiegels unter anaeroben Bedingungen berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit ist die AOR auch in Extrakten von *Acidovorax* sp. JS42 nachgewiesen worden. Durch Kultivierung mit 1-Butanol unter anaeroben Bedingungen sollte ein Aldehyd-Intermediat entstehen, das eventuell von der AOR entgiftet wird. Anders als bei der AOR aus *A. aromaticum* zeigt sich, dass dieses Enzym zwar ebenfalls Benzaldehyd bevorzugt, aber eine

geringere Aktivität mit Phenylacetaldehyd als auch Acetaldehyd aufweist (s. Abb. 10). Die AOR aus *Acidovorax* weist eine Identität von 74 % (AorB) zu der AOR aus *A. aromaticum* auf und besteht aus drei Untereinheiten, die in einem Operon aus fünf Genen (*aorA-E*) kodiert vorliegen (Arndt *et al.*, 2019). In der Literatur ist die Untersuchung von AORs aus *Bacteria* nicht ohne Präzedenz. Die AOR aus *Moorella thermoacetica* ist die erste untersuchte AOR mit mehreren Untereinheiten. Aufgrund der Reduktion von Carbonsäuren zu den korrespondierenden Aldehyden wurde dieses Enzym zuerst als *Carboxylic acid reductase* (CAR) beschrieben (White *et al.*, 1989). Aber aufgrund der wesentlich höheren Aktivität bei der Oxidation von Aldehyden, wurde dieses Enzym in die AOR-Familie eingeteilt (Strobl *et al.*, 1992). Die Reduktion von Carbonsäuren wurde unter anderem auch bei der archaellen AOR aus *Thermococcus paralvinellae* nachgewiesen, (Heider *et al.*, 1995). Dass die Reduktion von Carbonsäure eine physiologische Rolle besitzen könnte, wurde mit Transkriptions-Daten aus *Sporomusa ovata* schon gezeigt (Ammam *et al.*, 2016). Hierbei handelt es sich um ein acetogenen Organismus der als Modell-System in der *Microbial Electrosynthesis* (MES) verwendet wird. *S. ovata* besitzt sechs verschiedene Paraloge der AOR im Genom. Vier von diesen AORs zeigen mittels RT-qPCR in Kulturen eine erhöhte Expression, die mit Acetat als C-Quelle kultiviert worden sind (Ammam *et al.*, 2016). Dies ist ein interessanter Aspekt für biotechnologische Anwendungen in Hinblick auf Verwendung von Synthesegas (H_2 , CO, CO_2) zur Synthese von Ethanol durch Fermentation (Basen *et al.*, 2014; Keller *et al.*, 2017). Unklar ist wie die Säure-Reduktion unter physiologischen Bedingungen abläuft. Zur Untersuchung der Reduktion mit der AOR aus *A. aromaticum* wurde mit Ti(III)-Citrat ein starkes Reduktionsmittel bei einem pH-Wert von 5-6 verwendet und die Produktion von Benzaldehyd aus Benzoat wurde mittels Dünnschicht-Chromatographie nachgewiesen (Arndt *et al.*, 2019). Als möglicher Mechanismus für die Rückreaktion könnte hier eine Elektronen-Bifurkation vorliegen. Bei der Elektronen-Bifurkation wird bei einem Elektronenpaar eines der Elektronen die Reduktions-Energie auf Kosten des anderen Elektrons erhöht, d.h. ein Elektron kann zu einem negativeren Redoxpotential hin transferiert werden, während das andere Elektronen zu einem positiveren Redoxpotential hin transferiert wird (Übersicht in Buckel und Thauer, 2013). Als physiologische Partner können hier das putative Ferredoxin (*ebA5289*, s.o.) und das bereits in der Hinreaktion involvierte NAD dienen (Arndt *et al.*, 2019). Ausgehend von zwei Ferredoxinen ($E^{0'} = -400$ mV) wird mit zwei Elektronen das NAD zu NADH ($E^{0'} = -320$ mV) und mit den anderen beiden Elektronen die Carbonsäure zu dem Aldehyd (z. B. Acetaldehyd/Essigsäure $E^{0'} = -580$ mV [Heider *et al.*, 1995]) reduziert (s. Abb. 28). Aber die

Involvierung eines W-Cofaktors oder Mo-Cofaktors an der Bifurkation wurde bisher noch nicht beschrieben und würde ein Novum darstellen.

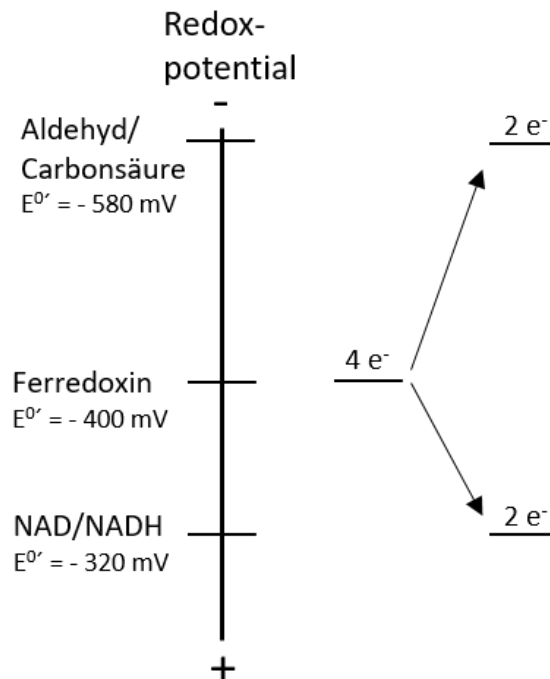


Abbildung 28: Schema der Bifurkation zur Reduktion des Aldehyds zur Carbonsäure. Angegeben sind die Redoxpotentiale unter Standard-Bedingungen. Die Energie zur Reduktion des Aldehyds, die ein negatives Redoxpotential aufweist als Ferredoxin, wird durch die Reduktion von NAD gekoppelt, das ein positives Redoxpotential als Ferredoxin besitzt.

1.1. Isolierung und Anreicherung der AOR

Die Anreicherung der AOR erfolgte in der Regel aus Zellextrakten von der *A. aromaticum*-Mutante SR7 Δ *pdh* nach Kultivierung mit Phenylalanin als C-Quelle (Schmitt *et al.*, 2017; Arndt *et al.*, 2019). Bei der Mutante wurde das Gen für die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase durch homologe Rekombination entfernt und durch eine Resistenz-Kassette für Gentamycin ausgetauscht (Schmitt *et al.*, 2017). Die Mutante SR7 Δ *pdh* weist eine erhöhte Aktivität der AOR im Vergleich zu den Zellextrakten mit dem Wildtyp EbN1 auf, da dieses Enzym die fehlende Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase im Abbauweg ersetzt (Schmitt *et al.*, 2017). Die Analyse der Region vor dem *aor*-Operon zeigt eine Punktmutation vor den vermuteten regulatorischen Elementen des σ^{54} -Promotors auf. Diese Mutation könnte für die erhöhte Produktion der AOR verantwortlich sein (s. Abb. 6) (Schmitt *et al.*, 2017). Erst durch diese

Mutante ist es möglich Zellmengen mit einem ausreichenden Anteil an AOR zu erhalten (Schmitt *et al.*, 2017; Arndt *et al.*, 2019). Die Anreicherung erfolgte in drei Schritten und wurde komplett unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Da die Anreicherung über mehrere Tage ablief, wurde versucht ein alternatives rekombinantes System zu etablieren, das durch Strep-Tag die Anreicherung in einem Schritt über Affinitätschromatographie ermöglicht. Erste Versuche mit *Acidovorax* sp. JS42 scheiterten an zu geringen Mengen des rekombinanten Enzyms, obwohl dieser Stamm ebenfalls eine funktionierende AOR und somit alle nötigen Maturationsfaktoren besitzt. Daher wird als Alternative die Art *Aromatoleum evansii* KB740 verwendet. Dieser Stamm liegt nur zum Teil sequenziert vor, aber dieser Stamm ist ein naher Verwandter von *A. aromaticum* EbN1. Die Strukturgene wurden mit einem mobilisierbaren Vektor mittels Konjugation eingebracht. Der Zellextrakt zeigt eine hohe AOR-Aktivität und die AOR kann mittels Affinitätschromatographie angereichert werden (s. Abb. 12). Die Aktivitäten der AOR wiesen im Vergleich zu den Daten mit der angereicherten AOR aus *A. aromaticum* zunächst nur etwa ein Viertel der Aktivität auf. Erste Analysen mittels ICP-MS zeigen eine niedrigere Inkorporation von W auf, was die niedrigere Aktivität der AOR erklären könnte (pers. Kommunikation Dominik Hege, Universität Marburg). Erste Versuche mit Kultivierung mit erhöhter Wolfram-Konzentration hatten zu keiner Erhöhung der spezifischen Aktivität geführt (pers. Kommunikation Dominik Hege, Universität Marburg). Hier könnte die Maturation des W-Cofaktors der kritische Punkt sein. Daher könnte die Kultivierung mit einer C-Quelle in deren Abbau ein Aldehyd-Intermediat entsteht zur Maturation von mehr W-Cofaktor dienen.

2. Charakterisierung von MoeA1, MoeA2 und MoeA3

Die Proteine MoeA1 und MoeA2 gehören phylogenetisch zu den Enzymen, die für die Ligation des Übergangsmetalls an das Molybdopterin (MPT) verantwortlich sind. Beide besitzen eine vergleichbare molekulare Masse von 42,6 kDa bzw. 43,9 kDa. In der *Ferguson-Plot*-Analyse zeigte allerdings nur MoeA2 die Bildung eines Dimers (s. Abb. 18). Ebenso konnte die Dimerisierung von MoeA2 durch Quervernetzung mittels Dimethyl-Suberimidat festgestellt werden (s. Abb. 19B). Bei MoeA1 ist unklar warum keine Dimerisierung stattfindet. Möglichkeiten wären hier ein störender Einfluss des Strep-Tags am N-Terminus oder das Fehlen weiterer Faktoren, die für die Dimerisierung benötigt werden. Das Protein MoeA3 unterscheidet vor allem in der Größe zu den beiden anderen MoeAs. Mit einer molekularen

Masse von 27,8 kDa ist es deutlich kleiner. Sowohl die *Ferguson-Plot*-Analyse als auch die Quervernetzung zeigen, dass MeoA3 ein Dimer bildet (s. Abb. 18 und Abb. 19C).

Die Tatsache, dass mindestens zwei verschiedene MoeAs im Genom kodiert vorliegen, könnte darauf hindeuten, dass beide unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Molybdän oder Wolfram aufweisen oder auf andere Weise spezifisch für den Einbau des jeweiligen Metalls sind. Zur Analyse des Bindungsverhaltens wurden verschiedene Methoden angewendet. In der ICP-MS-Analyse weist MoeA1 für Molybdän keine Bindung von Molybdat oder Wolframat auf während für MoeA2 die Bindung beider Oxoanionen nachgewiesen wurde (s. Tab. 15). Molybdän wurde dabei in einer zweifach höheren Konzentration nachgewiesen als Wolfram. Das unterschiedlichen Verhalten von MoeA1 und MoeA2 kann aber eventuell auch auf die fehlende Dimerisierung von MoeA1 zurückzuführen sein. Für MoeA3 wurde ein ähnliches Bindungsverhalten beobachtet wie für MoeA2. Als Kontrolle wurde auch die Bindung von Selenat mit den MoeA-Paralogen untersucht, weil Selenat sich stereochemisch gegenüber den beiden anderen Oxoanionen ähnelt (s. Anhang Tab. 20). Sowohl MoeA2 als auch MoeA3 zeigen hohe Konzentrationen von gebundenem Selenat auf, die sogar überstöchiometrisch gegenüber den vorhandenen Untereinheiten waren. Aus diesem Grund ist es fragwürdig, ob dies eine physiologische Funktion darstellt oder auf eine unspezifische Bindung hindeutet.

Mit dem *Thermal Shift Assay* (TSA) wird die Stabilität von Biomolekülen in Abhängigkeit der Temperatur bei Bindung von Liganden getestet. In dieser Analyse wurden die Proteine bei Anwesenheit eines Fluoreszenz-Farbstoffs mit verschiedenen Konzentrationen von Wolframat und Molybdat inkubiert und über einen steigenden Temperatur-Gradienten vermessen. Mit Zunahme der Temperatur erfolgt die Denaturierung, wobei durch Anwesenheit eines Liganden die Schmelztemperatur stabilisiert werden kann. Alle MoeA-Paraloge aus *A. aromaticum* zeigten eine Erhöhung der Schmelztemperatur mit Wolframat als Ligand, aber mit Molybdat war keine Erhöhung sichtbar (s. Abb. 20). Für MoeA2 ist sogar eine Erhöhung der Schmelztemperatur von 10°C messbar (s. Abb. 20B). Im Gegensatz dazu zeigten MoeA1 und MoeA3 eine Erhöhung von max. 3°C (s. Abb. 20A und C). Dies könnte darauf hindeuten, dass MoeA2 eine höhere Affinität zu Wolframat besitzt. Doch sind die verwendeten Konzentration nicht physiologisch.

Mit der *MicroScale Thermophoresis* (MST) wird die Dissoziationskonstante (K_d) ermittelt. In dieser Analyse wurden mit MoeA1 Affinitäten mit Wolframat und Selenat und von MoeA2 mit Molybdat und Wolframat gemessen (s. Tab. 16). MoeA1 zeigt mit Wolframat eine schwache Affinität und mit Selenat eine hohe Affinität auf (s. Tab. 16). Auch hier könnte die fehlende

Dimerisierung von MoeA1 dazu führen, dass Molybdat und Wolframat nicht gebunden werden. MoeA2 dagegen zeigt mit Wolframat und Molybdat eine starke Affinität auf, wobei mit Wolframat eine leicht bessere Bindungsaffinität gemessen wurde (s. Tab. 16). Das beide Oxoanionen um die Bindungsstelle konkurrieren ist mit MoeA aus *E. coli in vitro* bei der Rekonstitution von Apo-Protein der humanen Sulfid-Oxidase untersucht worden (Nichols und Rajagopalan, 2005). Vor allem inhibiert Wolframat die Ligation von Molybdän an den Cofaktor, dagegen wird das Wolfram nur in einem geringeren Maß ligiert (Nichols und Rajagopalan, 2005). Auch die homologe Cnx1 aus *Arabidopsis thaliana* mit der E-Domäne, die für die Ligation verantwortlich ist, zeigte in Bindungsstudien, dass Wolframat und Molybdat um die Bindungsstelle konkurrieren (Llamas *et al.*, 2006).

2.1. Komplementation verschiedener Maturationsfaktoren von ausgewählten *E. coli*-Mutanten

Mit der Auswahl verschiedener *E. coli*-Mutanten (Keio-Kollektion) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Funktionsfähigkeit verschiedener Mo-Cofaktor-Maturationsfaktoren aus *A. aromaticum* getestet. Die verschiedenen *E. coli*-Mutanten wurden dabei mit einem Plasmid transformiert, das das jeweiligen Gen für einen dieser Faktoren aus *A. aromaticum* enthält, und anaerob auf LB-Festmedium kultiviert. Durch Überschichtung mit Top-Agar, welches das Substrat Formiat und Benzylviologen enthält, wurde dann die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase (FdhH) getestet, die in den Mutanten erst durch Komplementation mit den entsprechenden Fremdgenen aktiv wird. Die Komplementation der $\Delta moeA$ -Mutante mit MoeA1, MoeA2 und MoeA3 zeigte, dass nur MoeA2 in *E. coli* funktionell ist, während MoeA1 und MoeA3 die Mo-Cofaktoren-Synthese nicht wiederherstellen (s. Abb. 21). Hier könnte, wie vorher bei der Charakterisierung festgestellt wurde, die fehlende Dimerisierung von MoeA1 der Grund für die Inaktivität in *E. coli* sein, während dieser Befund bei MoeA3 den Verdacht erhärtet, dass dieses Protein nichts mit der Mo-Cofaktor-Biosynthese zu tun hat.

Mit MoaD, MoaE und MogA wurden weitere Maturationsfaktoren auf Komplementation getestet. MoaE bildet zusammen mit MoaD den MPT-Synthase-Komplex, der die Dithiolengruppe in das cPMP einführt (s. Abb. 4). Für MoaE wurde die Komplementation nachgewiesen, während bei der verwendeten *moaD*-Mutante den Phänotyp einer aktiven FdhH bereits zeigte (s. Abb. 22A und B). Hier ist die Annahme, dass ein Protein aus *E. coli* selber den Phänotyp wiederherstellt. Ein Kandidat ist hierbei das Protein ThiS. Dieses Protein ist ebenso wie MoaD ein Schwefeldonor und ist in der Biosynthese von Thiamin involviert

(Übersicht in Begley *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde die Doppelmutante $\Delta moaD/\Delta thiS$ durch Phagen-Transduktion erstellt (s. Ergebnisse 7.6.3). Doch die Deletion hatte kein Effekt auf den Phänotyp und die FdhH bleibt weiterhin aktiv (s. Abb. 24). In diesem Fall sind zwei Möglichkeiten denkbar. Erstens im Genom ist ein weiterer Faktor, der in der Maturation des Pterin-Cofaktors das MoaD ersetzen kann oder zweitens die Mutante besitzt immer noch ein *moaD*-Gen. Mit der $\Delta moaD$ -Mutante MJ7 *chlM* (DE3) ist es möglich das cPMP zu isolieren (Leimkühler und Rajagopalan, 2001; Santamaria-Araujo *et al.*, 2004). Das bedeutet, dass das cPMP in dieser *moaD*-Mutante nicht zu MPT umgesetzt wird. Bei dieser Mutante handelt es sich um ein Derivat von BL21 (DE3) und besitzt ebenfalls die Thiamin-Biosynthese-Gene (Genom: CP010816). Das deutet darauf hin, dass der in dieser Arbeit verwendete Stamm (JW0767-1) immer noch ein aktives MoaD besitzt und nicht durch einen anderen Faktor wiederhergestellt wird.

Bei der $\Delta mogA$ -Mutante von *E. coli* war ebenfalls eine geringe Aktivität der FdhH beobachtbar, aber im Gegensatz zu dem Wildtyp ist ein deutlicher Unterschied erkennbar (vgl. Abb. 21D und 22). Bei dieser Mutante könnte das MoaB von *E. coli* den Phänotyp der Mutante teilweise wiederherstellen. MoaB ist wie MogA eine Pterin-Adenylyl-Transferase, die in vielen Mikroorganismen vorkommen (Bever *et al.*, 2008). In der Regel besitzen mesophile Organismen MogA und thermophile Organismen MoaB. Vor allem ist MoaB zahlreich in der Domäne der *Archaea* vertreten (Bever *et al.*, 2008). MoaB bildet ein Hexamer, welches bei hohen Temperaturen eine höhere Stabilität gewährleistet (Havarushka *et al.*, 2014). Obwohl bei *E. coli* MogA für die MPT-Synthese identifiziert wurde und das MoaB als inaktiv in *E. coli* gilt, könnte es doch noch eine Restaktivität aufweisen und so die geringe FdhH-Aktivität ermöglichen.

2.2. Strukturanalyse von MoeA2 aus *A. aromaticum* EbN1

Als Teil dieser Arbeit wurde eine Röntgen-Strukturanalyse von MoeA2 durchgeführt, eines der beiden Paraloga aus *A. aromaticum* mit einer Identität von mehr als 40 % zu MoeA aus *E. coli*. Die Analyse zeigt eine L-förmige Struktur mit neun α -Helices und 21 β -Faltblättern auf (s. Abb. 25 und 26). Auch können die vorher identifizierten vier Domänen von MoeA in dieser Struktur bestimmt werden. Für die Ligation von MPT-AMP mit dem Übergangsmetall bilden beide Monomere das katalytische Zentrum (s. Abb. 25C). Wie in den vorherigen Arbeiten mit MoeA aus *E. coli*, zeigen auch die Strukturdaten zu MoeA2, dass es sich um einen Dimer handelt (Schrag *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2001; Nichols *et al.*, 2007).

A

Ident	Organismus	<u>D59</u>	<u>T100</u>	<u>R137</u>	<u>E188</u>	<u>D228</u>	<u>D259</u>	<u>K275 + 279</u>	<u>P298</u>	<u>R350</u>	<u>S371</u>
100	<i>E. coli</i> K-12	M..[56]..MDGYA..[34]..RIMT <u>GAP</u> ..[32]... <u>IRR</u> ..[45]..G <u>DEL</u> ..[37]..RDD.[20]..SGGVS <u>VGEADY</u> ..[14]..KLAIK <u>PG</u> ..[15]..LPGN <u>PV</u> ..[46]..QRG.[18]...G <u>SH</u> ..[39]									
46	<i>A. aromaticum</i> A2	M..[64]..MDGYA..[36]..RIMT <u>GAP</u> ..[32]..L <u>RR</u> ..[47]..G <u>DEL</u> ..[37]..PDN.[20]..SGGVS <u>VGEADF</u> ..[14]..KIDIK <u>PG</u> ..[15]..LPGN <u>PV</u> ..[46]..L <u>RG</u> ..[18]..G <u>SG</u> ..[36]									
39	<i>A. aromaticum</i> A1	M..[54]..MDGYA..[34]...RIFT <u>GAP</u> ..[32]..V <u>RL</u> ..[47]..G <u>DEL</u> ..[37]..PDR.[20]..SGGVS <u>VGEEDH</u> ..[14]..KIAMK <u>PG</u> ..[16]..LPGN <u>PV</u> ..[46]..L <u>RA</u> ..[18]..L <u>SS</u> ..[32]									
33	<i>P. horikoshii</i> B	M..[54]..VDGYA..[39]...YIST <u>GAM</u> ..[43]..G <u>RL</u> ..[37]..G <u>NEI</u> ..[37]..RDD.[20]..SGGASG <u>GTKDL</u> ..[13]..HGIAIQ <u>PG</u> ..[15]..LPGY <u>PV</u> ..[39]..G <u>RR</u> ..[17]..G <u>SG</u> ..[35]									
27	<i>P. horikoshii</i> A	M..[57]..VDGYA..[39]...KVL <u>TGTR</u> ..[23]...L <u>RP</u> ..[56]..G <u>SEL</u> ..[39]..PDD.[20]..TGGASFGD <u>KDY</u> ..[9]..HGTTIK <u>PG</u> ..[12]...SG <u>YPV</u> ..[39]..G <u>RR</u> ..[18]..G <u>SG</u> ..[39]									
21	<i>A. aromaticum</i> A3	M.....[7].....G <u>DEI</u>[52].....FGGIGATP <u>DDR</u>[66].....MPGFP <u>V</u> ..[46]..A <u>RG</u> ..[55]									

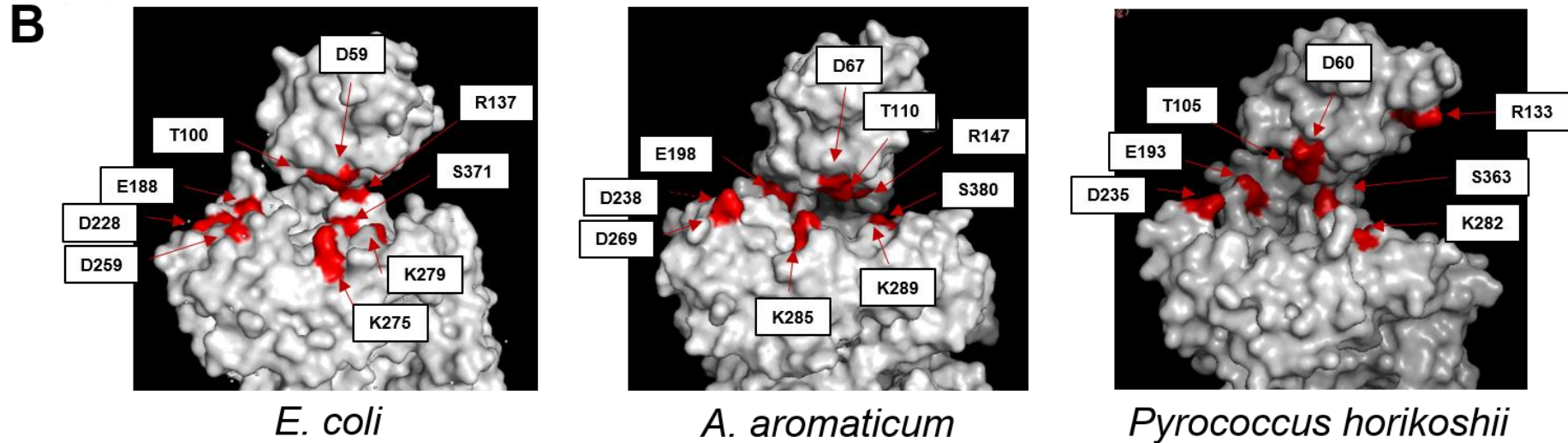


Abbildung 29: Vergleich zwischen Sequenzen und Strukturen von MoeA aus verschiedenen Prokaryoten. (A) Dargestellt sind Sequenzen von MoeA aus *E. coli* K-12, *A. aromaticum* EbN1 und *P. horikoshii*. Die Sequenzen wurden anhand der Identität zu der Sequenz von MoeA aus *E. coli* sortiert. Sequenzbereiche die der Ablauf der Reaktion betreffen (durchgängige Linie) und die Bindung (durchtrennte Linie) betreffen werden unterschieden (Nichols *et al.*, 2007). Aminosäuren die in allen Sequenzen konserviert sind, sind unterstrichen. Auch liegt der Bereich um P298 (grün) in den verschiedenen Sequenzen konserviert vor (B) Darstellung von aufgelösten Strukturen von MoeA aus *E. coli* (PDB: 1G8L), *A. aromaticum* (diese Arbeit) und *P. horikoshii* (PDB: 1X18). Die konservierten analysierten Aminosäuren (A, rot) werden mit Position in der jeweiligen Struktur hervorgehoben (rot).

Mit der MoeA-Struktur aus dem Archaeum *Pyrococcus horikoshii* (PDB: 1XI8) stehen MoeA-Strukturen von drei verschiedenen Prokaryoten zur Verfügung. Am Beispiel von MoeA aus *E. coli* (PDB: 1G8L) wurden durch Mutagenese wichtige Aminosäuren für die katalytische Funktion identifiziert (Nichols *et al.*, 2007). Die Aminosäuren D59, T100, E188, D228 und D259 sind vor allem der Ligations-Reaktion zuzuordnen. Dagegen sind an der Bindung des MPT-Rests die Aminosäuren R137, K275, K179 und R350 involviert. Die Aminosäure S371 ist sowohl in der Reaktion als auch an der Bindung von MPT involviert (Nichols *et al.*, 2007). Im Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von MoeA aus *E. coli* K-12 mit den drei MoeA-Paralogen aus *A. aromaticum* EbN1 und der beiden MoeA-Paralogen aus *P. horikoshii* sind diese Aminosäuren zum größten Teil konserviert und werden häufig von weiteren konservierten Aminosäuren flankiert (s. Abb. 29A). Eine Ausnahme ist hier MoeA3 aus *A. aromaticum*, das mit 21 % die geringste Identität zu MoeA aus *E. coli* aufweist. Vor allem fehlen einige universell konservierte Aminosäuren, wie D59, T100, R137, D228, K275, K179 und S371 (s. Abb. 29A). Hier ist auffällig, dass insbesondere die relevanten Aminosäuren bis auf R350 für die Bindung mit MPT fehlen.

Eine Besonderheit bei den MoeA-Sequenzen von *P. horikoshii* ist bei den konservierten Aminosäuren K275 und K279 zu erkennen. Eines der beiden MoeAs (MoeA_A) besitzt zwar K279, aber nicht K275, während bei dem anderen Paralogen (MoeA_B) sogar beide Aminosäuren fehlen und durch ein Glutamin K279Q ersetzt ist (s. Abb. 28A). Eine K275Q-Mutante von MoeA von *E. coli* zeigte in Mutagenese-Experimenten keinen Unterschied zum MoeA aus dem Wildtyp in Bezug auf Reaktion und Bindung des MPT, doch die K279Q-Mutante wies eine deutlich schwächere Bindung des MPT-Rests auf (Nichols *et al.*, 2007). Daher ist es unklar wie genau sich dieses Binde-Motiv bei den MoeA-Paralogen von *P. horikoshii* zusammensetzt.

In den drei Strukturen sind alle diese konservierten Aminosäuren klar als Bestandteile des aktiven Zentrums sichtbar (s. Abb. 29B). Hierbei liegen die Aminosäuren E188, D228 und D259 in der Domäne 3 in räumlicher Nähe zueinander, die Aminosäuren K275, K279 und S371 sind in Domäne 4 ebenfalls in räumlicher Nähe zu finden. Diesen Aminosäuren liegen D59, T100 und R137 aus der Domäne 4 gegenüber (s. Abb. 29B). Eine weitere Sequenz die in den MoeAs häufig unverändert auftritt, ist ein Motiv um P298 mit der Abfolge PGxPV (s. Abb. 29A). Zwar variiert die dritte Aminosäure aber die anderen sind meistens konserviert. Diese Sequenz liegt zum Beispiel bei MoeA2 von *A. aromaticum* tiefer im aktiven Zentrum hinter

den Seitenketten von K285 und K289 (*E. coli*: K275 und K279). Die Lage der jeweiligen Seitenkette in MoeA2 ist in Abb. 30 dargestellt.

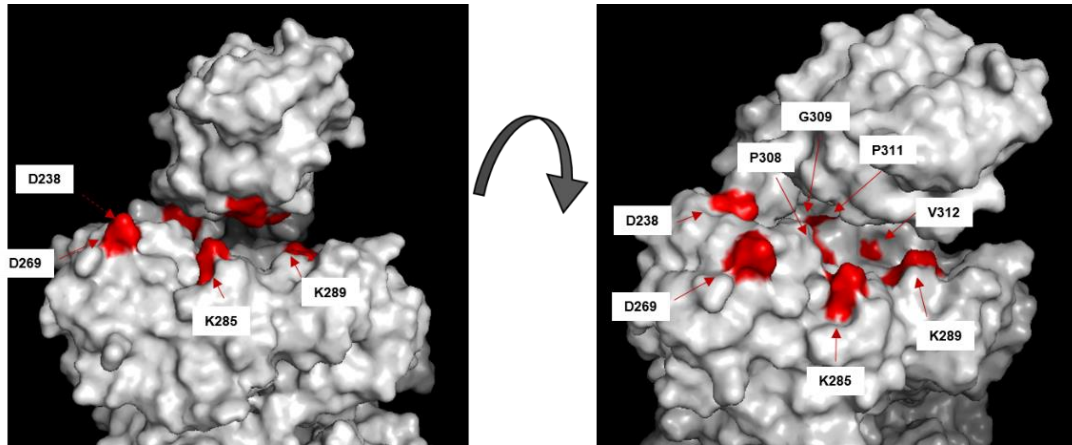


Abbildung 30: Das PGxPV-Motiv in MoeA2 von *A. aromaticum*. Diese Motiv ist im aktiven Zentrum zu finden. Dargestellt sind neben den PGxPV-Motiv auch weitere Aminosäuren zur Einordnung der Position (s. Abb. 29).

Mit der homologen Struktur des eukaryotischen MoeA-Orthologen Cnx1 aus *Arabidopsis thaliana* wurden kürzlich Röntgen-Strukturen mit verschiedenen Bindungspartnern wie AMP, Wolframat und Molybdat publiziert. Die Analyse zeigte, dass die Hydrolyse von MPT-AMP bei Cnx1 abhängig von Magnesium ist. Die Aminosäuren, die in Cnx1-Struktur für die Bindung von Magnesium wichtig sind, sind dabei auch in prokaryotischen MoeAs konserviert, so dass die Magnesium-Abhängigkeit wahrscheinlich auch für prokaryotische MoeAs gilt (Hercher *et al.*, 2020). Die homologen Aminosäuren von MoeA aus *E. coli* sind E188, D228 und D259. Es wird angenommen, dass D274 (*E. coli*: D259) direkt an der Hydrolyse involviert ist, da die Mutation dieser Aminosäure diese inaktiviert (Hercher *et al.*, 2020). Für die Molybdat-Bindung wurden die zur *E. coli*-MoeA-Sequenz homologen Motive bei K275/279, P298, R350 und S371 identifiziert (Krausze *et al.*, 2017; Krausze *et al.*, 2018). Auch mit Wolframat wurde eine Bindung gezeigt, aber diese unterscheidet sich in Form des Bindungsorts von Molybdat. Dies könnte auf die Diskriminierung von Wolframat zugunsten von Molybdat hindeuten, da Cnx1E kein Wolfram an MPT ligieren kann (Krausze *et al.*, 2018). Doch sind keine Rückschlüsse zu MoeA2 möglich, da unklar ist welche Aminosäuren diese Diskriminierung ermöglichen.

2.3. Erkenntnisse über die Maturation des W-Cofaktors

Die Charakterisierung von MoeA1, MoeA2 und MoeA3 sowie die Strukturanalyse von MoeA2 zeigen keine eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf Affinität zu den beiden Metallen Wolfram

oder Molybdän auf. Bei der Komplementation der *E. coli* $\Delta moeA$ -Mutante zeigt nur MoeA2 eine Wiederherstellung des Phänotyps. Doch zeigt die Charakterisierung auch, dass MoeA1 kein Dimer bildet (s. Abb. 18 und 19). Daher kann die fehlende Dimerisierung der Grund für die schwache Affinität zu Molybdat und Wolframat sein. Interessanterweise zeigt der *Thermal Shift Assay* mit MoeA2 mit Wolframat eine deutliche Zunahme der Schmelztemperatur (s. Abb. 20B). Aber mit dem *MicroScale Thermophoresis* ist bei MoeA2 mit Molybdat und Wolframat eine ähnliche Affinität gemessen worden (s. Tab. 16). Daher kann eine Aussage, welcher der Faktoren für die Maturation des W-Co verantwortlich ist nicht eindeutig getroffen werden.

Auch aus der Genom-Umgebung der *moeA*-Gene können keine größeren Rückschlüsse gezogen werden, da *moeA2* bei *A. aromaticum* und vielen weiteren Arten mit MoeA2-Orthologen von Genen umgeben ist, die keine bekannte Funktion in der Mo-Cofaktor-Maturation haben. Dagegen liegt *moeA1* in einem Operon zusammen mit *mobB*, *moaD* und *moaE*, deren Genprodukte Teil der Maturations-Maschinerie sind. Einer der wenigen Organismen mit mehreren *moeA*-Genen, der aus seiner Genomanordnung einen Hinweis für ihre Funktion liefert, ist *Sedimenticola thiotaurini* (s. Abb. 30). *S. thiotaurini* besitzt wie *A. aromaticum* zwei *moeA*-Sequenzen mit etwa der gleichen Größe und Identität der Genprodukte zu MoeA aus *E. coli*. Das Protein MoeA3 wird im nächsten Abschnitt (s. Punkt 2.4.) näher besprochen. Die MoeA-Sequenz aus *E. coli* zeigt jeweils die größte Identität mit MoeA2 aus *A. aromaticum* und *S. thiotaurini* auf. In *E. coli* bildet das *moeA* zusammen mit *moeB* ein Operon, während das *moeA2* von *A. aromaticum* zusammen mit den Genen für Cytochrom c (*cytC*), eine Ribose-5-Isomerase (*rpiA*) und ein Gen für ein Protein, das in der Phosphat-Transduktion involviert ist (*phoU*), kodiert ist, und *moeA2* aus *S. thiotaurini* in einem apparenten Operon zusammen mit den *tup*-Genen für ein Wolfram-Aufnahmesystem vorliegt. Zudem liegt der Promotor der *tup*-Gene in dieser Art auf einem gemeinsamen DNA-Segment mit dem Promotor des gegenläufigen *aor*-Operons (s. Abb. 30). Dies könnte daraufhin deuten, dass *moeA2* in der Maturation des W-Cofaktors beteiligt ist. Bisher fehlen aber hierfür aber weitere Evidenzen.

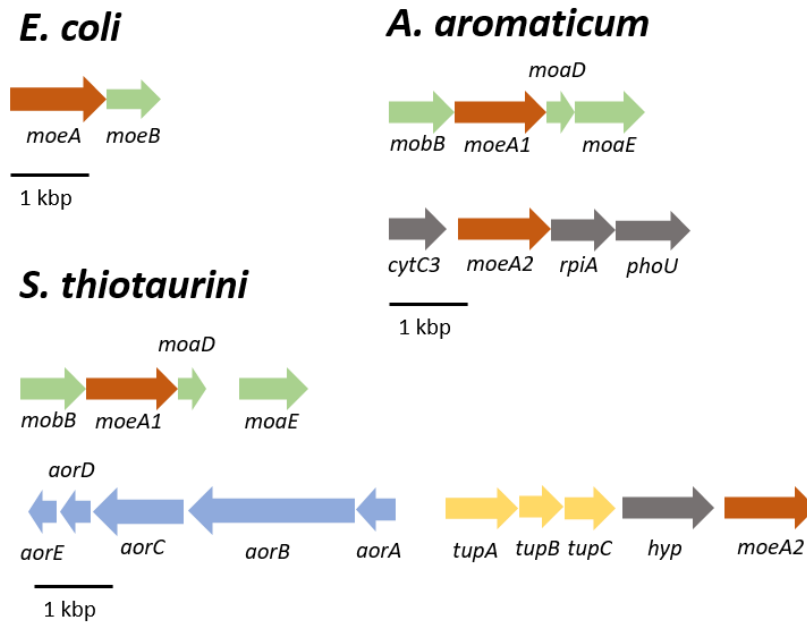


Abbildung 31: Genanordnung von *moeA* im Genom von *E. coli*, *A. aromaticum* und *S. thioaurini*. Hervorgehoben sind die *moeA*-Sequenzen (rot), die Gene, die in der Maturation der Pterin-Cofaktors involviert sind (grün), ebenso die, die für die Wolframat-Aufnahme zuständig sind (gelb) als auch Gene die für die wolframabhängige AOR kodieren oder im *aor*-Operon liegen (blau). Gene deren Funktion nicht bekannt sind (*hyp*) als auch Gene deren Genprodukte nicht zu Maturation oder AOR assoziiert sind, wie *cytC* (Cytochrom c), *rpiA* (Ribose-5-Isomerase) und *phoU* (Phosphat-Signaltransduktion) sind in grau dargestellt.

Zur Analyse, welche Genprodukte tatsächlich in der Maturation der Mo- und W-Enzyme involviert sind, sollte jeweils einer der beiden *moeA*-Sequenzen gezielt deletiert werden, um dann die Auswirkungen auf die jeweiligen Enzyme zu untersuchen. Leider haben diese Versuche bisher mit *A. aromaticum* wegen der schlechten genetischen Zugänglichkeit nicht funktioniert (Daten nicht gezeigt). Mit *A. Evansii* und *Acidovorax* sp. JS42 stehen zwei Alternativen mit besserer genetischer Zugänglichkeit zur Verfügung.

Mit Maturationsfaktoren aus *E. coli* wurde die Maturation der humanen Sulfit-Oxidase (SO) bereits *in vitro* durchgeführt (Nichols und Rajagopalan, 2005). Zur Rekonstitution von Apo-SO wurden dabei im ersten Schritt die MPT-Synthase mit den beiden Proteinen Moad mit Schwefel-Rest (Moad-SH) und MoadE zusammen mit MoadA und Molybdat inkubiert. Nach einigen Minuten wurde die Apo-SO hinzugegeben und wurde mit dem Mo-Co beladen (Nichols und Rajagopalan, 2005). Bemerkenswert ist, dass für die *in vitro*-Ligation kein MogA benötigt wurde (Nichols und Rajagopalan, 2005).

Mit MoadA1 war eine biochemische Charakterisierung durch die fehlende Dimerisierung schwierig. Hier könnten mögliche Interaktionspartner in der Dimerisierung involviert sein. Ein möglicher Interaktionspartner wäre MobB, da dieser im Operon zusammen mit *moadA1* kodiert

vorliegt. Zwar ist MobB in *E. coli* als nicht essentiell in der Synthese des Cofaktors beschrieben worden, doch könnte die Rolle bei *A. aromaticum* wichtiger sein.

Die unterschiedlichen Gen-Loci von *moeA1* und *moeA2* können daraufhin deuten, dass sie unter Kontrolle unterschiedlicher Regulatoren stehen. Gerade in Bezug auf die wolframabhängige AOR wären hier Regulatoren im Fokus, die sensitiv gegenüber Wolframat sind. Durch einen Datenbank-Angleich mittels BLAST sind zwei interessante Kandidaten für solche Regulatoren gefunden worden, die Identitäten mit dem kürzlich charakterisierten Transkriptions-Regulator TaoR aufweisen (Rajeev *et al.*, 2019). Dieser Regulator wurde in dem δ -Proteobakterium *Desulfovibrio alaskensis* G20 beschrieben und ist in der Regulation vom *tup*-Operon, *aor*-Operon und weiteren Genen beteiligt, die für Molybdän- und Wolframenzyme kodieren (Rajeev *et al.*, 2019). Der Regulator besteht aus einer HTH₁₇- und einer PBP-Domäne. Die PBP-Domäne (*Periplasmic binding protein*) ist häufig zu Transkriptionsregulatoren assoziiert, die Molybdät und Wolframat binden können. Die beiden Kandidaten im Genom von *A. aromaticum* EbN1 sind *ebA3600* mit einer Identität von 32 % und *ebA2947* mit einer Identität von 29 % zu der Sequenz aus *D. alaskensis* G20. Für das Genprodukt von *ebA2947* ist eine HTH₁₇-Domäne annotiert, und das *ebA2957*-Gen liegt zusammen mit *mobA* und *mobB* im Genom vor. Das *ebA3600*-Gen teilt sich dagegen die Promotor-Region mit dem *tup*-Operon. Beide Kandidaten können daher wichtige Regulatoren für die Aufnahme und die Maturation von Mo-Co und W-Co sein. Interessanterweise ist im Genom von *A. aromaticum* keine homologe Sequenz von *modE* zu finden, das bei anderen Organismen als Regulator für Molybdät-Aufnahme und verschiedenen Molybdänenzymen dient. Auch können mit dem Web-Tool Riboswitch Scanner (Singh *et al.*, 2009; Mukherjee und Sengupta, 2016) im Genom von *A. aromaticum* keine Riboswitches identifiziert werden, die Mo-Co als Liganden binden können.

Für die Maturation der wolframabhängigen AOR aus *A. aromaticum* sind noch zwei weitere Genprodukte von Interesse. Im *aor*-Operon sind nach den Strukturgenen *aorA-C* zwei weitere Gene mit *aorD* und *aorE* vorhanden, die auch in den entsprechenden Operon vieler anderer Bakterien zu finden sind. Das Genprodukt von *aorD* ist homolog zu *moaD*, während das *aorE*-Genprodukt zu keinem anderen Protein eine Ähnlichkeit aufweist. Aber AorD und AorE zeigen ein ähnliches Aminosäure-Sequenz-Motiv mit konservierten Glycin-Reste am C-Terminus, das ebenfalls MoaD und ThiS besitzen und dort für den Transfer des Schwefel-Atoms essentiell ist (Gutzke *et al.*, 2001). Dies kann darauf hinweisen, dass bei der Maturation der AOR die Anwesenheit von AorD und AorE als Schwefeldonoren von Bedeutung ist. Doch es ist noch

unklar, ob diese beiden Proteine wie MoeA mit MoeE interagieren oder ob sie anders involviert sind.

2.4. Ist MoeA3 in der Maturation involviert?

Die Besonderheit bei MoeA3 ist, dass eine gewisse Identität mit MoeA aus *E. coli* besteht, aber in der Sequenz von MoeA3 einige wichtige strukturelle Motive fehlen, die an der Molybdat-Bindung und der Metall-Transfer-Reaktion beteiligt sind (s. Abb. 29A). Dagegen können Motive identifiziert werden, die möglicherweise in der AMP-Hydrolyse involviert sind. Zum Beispiel sind bei MoeA aus *E. coli* E188 und D259 an der MPT-AMP-Hydrolyse beteiligt, die auch bei MoeA3 als E11 und D73 konserviert vorliegen (Nichols *et al.*, 2007; Hercher *et al.*, 2020). Mit einer Datenbank-Abgleich mittels BLAST gegen die MoeA3-Sequenz wurden vor allem ähnliche Proteine gefunden, die als NMN-Deamidasen und ADP-Ribose-Pyrophosphatasen (ADPR-PP) eingeordnet wurden. Beide Enzyme sind in der Regeneration von NAD involviert (Galeazzi *et al.*, 2011). Die NMN-Deamidase setzt dabei Nicotin-Mononukleotid zu Nicotinoat-Mononukleotid um, das anschließend mit ATP zu Nicotinoat-Adenosin-Dinukleotid und abschließend zu NAD umgesetzt wird. Die ADPR-PP hydrolysiert die Pyrophosphat-Bindung von ADP-Ribose (Cialabrini *et al.*, 2013). Häufig liegen ADPR-PP und NMN-Deamidasen als bifunktionelle Enzyme mit jeweils einer ADPR-PP- und einer NMN-Domäne vor (Cialabrini *et al.*, 2013; Karupiah *et al.*, 2014). Besonders die Vertreter der ADPR-PP besitzen Sequenzähnlichkeiten mit MoeA (Cialabrini *et al.*, 2013). Im Alignment von verschiedenen ADPR-PP, NMN-Deamidasen und bifunktionellen Enzymen zeigt sich, dass MoeA3 wesentlich ähnlicher zu den ADPR-PP-Domänen der bifunktionellen Enzyme ist als zu identifizierten Vertretern des MoeA-Zweigs (s. Abb. 16). Das Gen *ebA3399* im Genom von *A. aromaticum* kodiert für eine NMN-Deamidase, die zusammen mit MoeA3 die Funktion eines ADPR-PP-/NMN-Fusionsproteins übernehmen könnte. Die ADPR-PP verwenden neben ADP-Ribose unter anderem auch FAD als Substrat und hydrolysieren es zu FMN und AMP (Cialabrini *et al.*, 2013). Erste biochemische Versuche mit FAD als Substrat zeigen tatsächlich diese Aktivität von MoeA3 (s. Anhang Tab. 21), doch auch mit MoeA1 oder MoeA2 wurde eine solche Aktivität gemessen. Für die Reaktion der drei Proteine werden zusätzlich zu Magnesium- oder Cobalt-Ionen auch Kalium-Ionen benötigt. Die Abhängigkeit von Kalium-Ionen ist für ADPR-PP bekannt, aber für MoeAs bisher noch nicht beobachtet worden (Cialabrini *et al.*, 2013). Bei der Maturation des Mo-Cofaktors *in vitro* wurden keine zugesetzten Kalium-Ionen benötigt (Nichols und Rajagopalan, 2005). Mit den divalenten Ionen Calcium und Mangan kann keine Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Zur

Bestätigung, dass es sich bei MoeA3 um eine ADPR-PP handelt, steht die Untersuchung mit ADP-Ribose als Substrat noch aus.

3. Fazit und Ausblick

Mit der Untersuchung der wolframabhängigen Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus *A. aromaticum* EbN1 ist die erste Charakterisierung einer AOR aus einem mesophilen Bakterium unternommen worden. Einige untersuchte Eigenschaften der AOR, wie die Sauerstoff-Toleranz, das Temperatur-Optimum und die Rückreaktion mit der Reduktion von Carbonsäuren zu Aldehyden können biotechnologisch relevant sein. Gerade Letzteres ist im Stoffwechsel von acetogenen Organismen im Fokus des Interesses, z. B. im Hinblick auf Produktion von Alkoholen mit Synthesegas. Aber für die Grundlagenforschung ist auch die weitere Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung und der detaillierte Reaktions-Mechanismus von Hin- und Rückreaktion interessant. Gerade für AOR-Strukturen ist die Datenlage eher dünn und nur wenige Vertreter aus der Domäne der *Archaea* sind bisher in ihrer Struktur bekannt. Mit der Etablierung von *A. evansii* KB740 als heterologe Expressionsplattform sind jetzt auch Mutagenesen mit anschließender Anreicherung der AOR-Varianten möglich. Gerade die Involvierung der FeS-Zentren in der Katalyse und im Mechanismus sind hier von Bedeutung.

Die Maturation der Wolframenzyme ist bisher wenig bekannt und die bisherigen Hypothesen beruhen im Wesentlichen auf den Erkenntnissen bei der Erforschungen der Mo-Cofaktor-Biosynthese. Die Anwesenheit mehrerer paraloger Maturationsfaktoren, vor allem von MoeA im letzten Schritt der Ligation des Metalls, könnten hier Aufschluss geben. Die paraloge MoeA1, MoeA2 und MoeA3, die am Einbau von Mo oder W beteiligt sein können, wurden in dieser Arbeit untersucht. Das Protein MoeA2 zeigte zu beiden Oxoanionen Molybdat und Wolframat eine hohe Affinität und konnte die *E. coli* $\Delta moeA$ -Mutante komplementieren. Die Strukturauflösung zeigt ein Dimer mit den bekannten konservierten Bereichen im Vergleich zu *E. coli* MoeA und dem eukaryotischen Ortholog Cnx1. Doch abschließend kann für MoeA1 aufgrund der fehlenden Charakterisierung bisher keine Aussage getroffen werden, ob dieser Maturationsfaktor oder doch MoeA2 für den Einbau von W zuständig ist. Bei MoeA3 könnte es sich um eine ADP-Ribose-Pyrophosphatase handeln, die in der Regeneration von NAD von ADP-Ribose beteiligt ist. Eine Analyse mit dem putativen Substrat ADP-Ribose steht allerdings noch aus. Zur weiteren Untersuchung von MoeA1 und MoeA2 bieten sich Mutagenese-

Experimente an. Diese Mutanten könnten anhand der Aktivität der AOR oder dissimilatorische Nitrat-Reduktase auf Maturation des Mo-Co oder W-Co getestet werden. Eine weitere Möglichkeit der weiteren Charakterisierung ist die Etablierung eines *in vitro*-Synthesewegs des Mo-Co oder W-Co mit angereicherten rekombinant produzierten Maturationsfaktoren und Verwendung von Apo-AOR. Die Apo-AOR kann hierfür mit dem bereits etablierten Expressionsstamm von *A. evansii* KB740 mit den auf einem Plasmid kodierten *aor*-Genen in Medium ohne Wolfram synthetisiert werden. Parallel kann die Synthese des Mo-Cofaktors mit Apo-Formen von Molybdäenzymen getestet werden, wie z. B. mit der eukaryotischen Sulfit-Oxidase oder Nitrat-Reduktase von *Neurospora crassa* (Nichols und Rajagopalan, 2005; Ringel *et al.*, 2013).

Literaturverzeichnis

- Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221. <https://doi.org/10.1107/S09074444909052925>
- Almendrea, M.J., Brondino, C.D., Gavel, O., Pereira, A.S., Tavares, P., Bursakov, S., Duarte, R., Caldeira, J., Moura, J.J.G., Moura, I., 1999. Purification and characterization of a tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Biochemistry* 38, 16366–16372. <https://doi.org/10.1021/bi990069n>
- Ammam, F., Tremblay, P.L., Lizak, D.M., Zhang, T., 2016. Effect of tungstate on acetate and ethanol production by the electrosynthetic bacterium *Sporomusa ovata*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0576-0>
- Anders, H., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., Fuchs, G., 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45, 327–333. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-327>
- Arndt, F., Schmitt, G., Winiarska, A., Saft, M., Seubert, A., Kahnt, J., Heider, J., 2019. Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes. *Front. Microbiol.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00071>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Basen, M., Schut, G.J., Nguyen, D.M., Lipscomb, G.L., Benn, R.A., Prybol, C.J., Vaccaro, B.J., Poole, F.L., Kelly, R.M., Adams, M.W.W., 2014. Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 17618–17623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413789111>
- Begley, T.P., Downs, D.M., Ealick, S.E., McLafferty, F.W., Van Loon, A.P.G.M., Taylor, S., Nino Campobasso, N., Chiu, H.-J., Kinsland, C., Reddick, J.J., Xi, J., 1999. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 171, 293–300.
- Belaidi, A.A., Schwarz, G., 2015. Metal insertion into the molybdenum cofactor: product–substrate channelling demonstrates the functional origin of domain fusion in gephyrin. *Biochem. J.* 450, 639–639. <https://doi.org/10.1042/bj4500639>

- Bevers, L.E., Bol, E., Hagedoorn, P.L., Hagen, W.R., 2005. WOR5, a novel tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* with a broad substrate specificity. *J. Bacteriol.* 187, 7056–7061. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.7056-7061.2005>
- Bevers, L.E., Hagedoorn, P.L., Hagen, W.R., 2009. The bioinorganic chemistry of tungsten. *Coord. Chem. Rev.* 253, 269–290. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.017>
- Bevers, L.E., Hagedoorn, P.L., Santamaria-Araujo, J.A., Magalon, A., Hagen, W.R., Schwarz, G., 2008. Function of MoaB proteins in the biosynthesis of the molybdenum and tungsten cofactors. *Biochemistry* 47, 949–956. <https://doi.org/10.1021/bi7020487>
- Blasco, F., Santos, J.-P. Dos, Magalon, A., Frixon, C., Guigliarelli, B., Santini, C.-L., Rard Giordano, G., 1998. NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28, 435–447.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buckel, W., Thauer, R.K., 2013. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 94–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.07.002>
- Chan, M., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M.W.W., Rees, D., 1995. Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science* 267, 1463–1469. <https://doi.org/10.1126/science.7878465>
- Cialabrini, L., Ruggieri, S., Kazanov, M.D., Sorci, L., Mazzola, F., Orsomando, G., Osterman, A.L., Raffaelli, N., 2013. Genomics-Guided Analysis of NAD Recycling Yields Functional Elucidation of COG1058 as a New Family of Pyrophosphatases. *PLoS One* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065595>
- Cohen, H., Fridovich, I., Rajagopalan, K., 1971. Hepatic Sulfite Oxidase. *J. Biol. Chem.* 246, 374–382.
- Daniels, J.N., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K. V., Schindelin, H., 2008. Crystal structure of a molybdopterin synthase-precursor Z complex: Insight into its sulfur transfer mechanism and its role in molybdenum cofactor deficiency. *Biochemistry* 47, 615–626. <https://doi.org/10.1021/bi701734g>
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6640–6645.
- Debnar-Daumler, C., Seubert, A., Schmitt, G., Heider, J., 2014. Simultaneous involvement of a tungsten-containing aldehyde: Ferredoxin oxidoreductase and a phenylacetaldehyde dehydrogenase in anaerobic phenylalanine metabolism. *J. Bacteriol.* 196, 483–492. <https://doi.org/10.1128/JB.00980-13>

- Dehio, C., Meyer, M., 1997. Maintenance of Broad-Host-Range Incompatibility Group P and Group Q Plasmids and Transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following Conjugal Plasmid Transfer from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 538–540.
- Duhr, S., Braun, D., 2006. Why molecules move along a temperature gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 19678–19682.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, T., Pai, E.F., 2000. Crystal Structures of Bovine Milk Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase: Structure-Based Mechanism of Conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10723–10728.
<https://10.1073/pnas.97.20.10723>
- Evans, P.R., Murshudov, G.N., 2013. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 69, 1204–1214.
<https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
- Galeazzi, L., Bocci, P., Amici, A., Brunetti, L., Ruggieri, S., Romine, M., Reed, S., Osterman, A.L., Rodionov, D.A., Sorci, L., Raffaelli, N., 2011. Identification of nicotinamide mononucleotide deamidase of the bacterial pyridine nucleotide cycle reveals a novel broadly conserved amidohydrolase family. *J. Biol. Chem.* 286, 40365–40375.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275818>
- Gutzke, G., Fischer, B., Mendel, R.R., Schwarz, G., 2001. Thiocarboxylation of Molybdopterin Synthase Provides Evidence for the Mechanism of Dithiolene Formation in Metal-binding Pterins. *J. Biol. Chem.* 276, 36268–36274.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105321200>
- Hagedoorn, P.L., Chen, T., Schröder, I., Piersma, S.R., De Vries, S., Hagen, W.R., 2005. Purification and characterization of the tungsten enzyme aldehyde:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic denitrifier *Pyrobaculum aerophilum*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10, 259–269. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0637-5>
- Haigler, B.E., Nishino, S.F., Spain, J.C., 1994. Biodegradation of 4-methyl-5-nitrocatechol by *Pseudomonas* sp. strain DNT. *J. Bacteriol.* 176, 3433–3437.
<https://doi.org/10.1128/jb.176.11.3433-3437.1994>
- Havarushka, N., Fischer-Schrader, K., Lamkemeyer, T., Schwarz, G., 2014. Structural basis of thermal stability of the tungsten cofactor synthesis protein MoaB from *Pyrococcus furiosus*. *PLoS One* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086030>
- Heider, J., Ma, K., Adams, M.W.W., 1995. Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1. *J. Bacteriol.* 177, 4757–4764. <https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4757-4764.1995>

- Hercher, T.W., Krausze, J., Hoffmeister, S., Zwerschke, D., Lindel, T., Blankenfeldt, W., Mendel, R.R., Kruse, T., 2020. Insights into the Cnx1E catalyzed MPT-AMP hydrolysis. *Biosci. Rep.* 40, 1-12. <https://doi.org/10.1042/BSR20191806>
- Hille, R., 2002. Molybdenum and tungsten in biology. *Trends Biochem. Sci.* 27, 360–367. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02107-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02107-2)
- Hille, R., Hall, J., Basu, P., 2014. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* 96, 2757–2816. <https://doi/10.1021/cr400443z>
- Hover, B.M., Lokszejn, A., Ribeiro, A.A., Yokoyama, K., 2013. Identification of a cyclic nucleotide as a cryptic intermediate in molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 7019–7032. <https://doi.org/10.1021/ja401781t>
- Hu, Y., Faham, S., Rees, D.C., 1999. Formaldehyde Ferredoxin Oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*: The 1.85 Å Resolution Crystal Structure and its Mechanistic Implications. *J. Mol. Biol.* 286, 899.
- Huber, C., Skopan, H., Feicht, R., White, H., Simon, H., 1995. Pterin cofactor, substrate specificity, and observations on the kinetics of the reversible tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* 164, 110–118. <https://doi.org/10.1007/s002030050242>
- Huwiler, S.G., Löffler, C., Anselmann, S.E.L., Stärk, H.-J., von Bergen, M., Flechsler, J., Rachel, R., Boll, M., 2019. One-megadalton metalloenzyme complex in *Geobacter metallireducens* involved in benzene ring reduction beyond the biological redox window. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 2259–2264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819636116>
- Huynh, K., Partch C.L., 2016. Current Protocols in Protein Science: Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 79, 28.9.1-28.9.14. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2809s79>.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids (Competent cell; strain DH5; pBR322 vector; simple and efficient method (SEM); cDNA library; electroporation; frozen-stock; stability). *Gene* 96, 23–28.
- Iobbi-Nivol, C., Leimkühler, S., 2013. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biophys Biochem Acta* 1827, 1086–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.007>
- Jacobitz, S., Meyer, O., 1989. Removal of CO Dehydrogenase From *Pseudomonas Carboxydovorans* Cytoplasmic Membranes, Rebinding of CO Dehydrogenase to Depleted Membranes, and Restoration of Respiratory Activities. *J. Bacteriol.* 171, 6294–6299. <https://10.1128/jb.171.11.6294-6299.1989>
- Johnson, M.K., Rees, D.C., Adams, M.W.W., 1996. Tungstoenzymes. *Chem. Rev.* 96, 2817–2839. <https://doi.org/10.1021/cr950063d>
- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>

- Karuppiah, V., Thistlethwaite, A., Dajani, R., Warwicker, J., Derrick, J.P., 2014. Structure and mechanism of the bifunctional CinA enzyme from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 289, 33187–33197. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608448>
- Keller, M.W., Lipscomb, G.L., Nguyen, D.M., Crowley, A.T., Schut, G.J., Scott, I., Kelly, R.M., Adams, M.W.W., 2017. Ethanol production by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by expression of bacterial bifunctional alcohol dehydrogenases. *Microb. Biotechnol.* 10, 1535–1545. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12486>
- Kletzin, A., Adams, M.W.W., 2002. Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 5–63. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(95\)00025-9](https://doi.org/10.1016/0168-6445(95)00025-9)
- Krausze, J., Hercher, T.W., Zwerschke, D., Kirk, M.L., Blankenfeldt, W., Mendel, R.R., Kruse, T., 2018. The functional principle of eukaryotic molybdenum insertases. *Biochem. J.* 475, 1739–1753. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170935>
- Krausze, J., Probst, C., Curth, U., Reichelt, J., Saha, S., Schafflick, D., Heinz, D.W., Mendel, R.R., Kruse, T., 2017. Dimerization of the plant molybdenum insertase Cnx1E is required for synthesis of the molybdenum cofactor. *Biochem. J.* 474, 163–178. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160846>
- Kung, J.W., Lö Ffler, C., Dö Rner B, K., Heintz, D., Bastien Gallien, S., Van Dorselaer, A., Friedrich, T., Boll, M., 2009. Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17687–17692.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lake, M., Wuebbens, M., Rajagopalan, K., Schindelin, H., 2001. Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* 414, 325–329. <https://doi.org/10.1038/35104586>
- Leimkühler, S., Rajagopalan, K. V., 2001. A Sulfurtransferase Is Required in the Transfer of Cysteine Sulfur in the in Vitro Synthesis of Molybdopterin from Precursor Z in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 22024–22031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102072200>
- Leimkühler, S., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K. V., 2001. Characterization of *Escherichia coli* MoeB and Its Involvement in the Activation of Molybdopterin Synthase for the Biosynthesis of the Molybdenum Cofactor. *J. Biol. Chem.* 276, 34695–34701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102787200>
- Letunic, I., Bork, P., 2007. Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127–128. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>
- Llamas, A., Otte, T., Multhaup, G., Mendel, R.R., Schwarz, G., 2006. The mechanism of nucleotide-assisted molybdenum insertion into molybdopterin: A novel route toward metal cofactor assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 18343–18350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601415200>

- Maia, L.B., Moura, J.J.G., Moura, I., 2015. Molybdenum and tungsten-dependent formate dehydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 287–309. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1218-2>
- McLuskey, K., Harrison, J.A., Schüttelkopf, A.W., Boxer, D.H., Hunter, W.N., 2003. Insight into the role of *Escherichia coli* MobB in molybdenum cofactor biosynthesis based on the high resolution crystal structure. *J. Biol. Chem.* 278, 23706–23713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301485200>
- Mehta, A.P., Abdelwahed, S.H., Begley, T.P., 2013. Molybdopterin biosynthesis: Trapping an unusual purine ribose adduct in the MoaA-catalyzed reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10883–10885. <https://doi.org/10.1021/ja4041048>
- Mendel, R.R., Leimkühler, S., 2015. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *J. Biol. Inorg. Chem.* 20, 337–347. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1173-y>
- Mukherjee, S., Sengupta, S., 2016. Riboswitch Scanner: an efficient pHMM-based web-server to detect riboswitches in genomic sequences. *Bioinformatics* 32, 776–778. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv640>
- Mukund, S., Adams, M.W.W., 1990. Characterization of a tungsten-iron-sulfur protein exhibiting novel spectroscopic and redox properties from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 265, 11508–11516.
- Mukund, S., Adams, M.W.W., 1995. Glyceraldehyde-3-phosphate Ferredoxin Oxidoreductase, a Novel Tungsten-containing Enzyme with a Potential Glycolytic Role in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 270, 8389–8392.
- Mukund, S., Adams, M.W.W., 1991. The Novel Tungsten-Iron-Sulfur Protein of the Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, Is an Aldehyde Ferredoxin Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 266, 14208–14216.
- Neumann, M., Mittelstädt, G., Iobbi-Nivol, C., Saggi, M., Lenzian, F., Hildebrandt, P., Leimkühler, S., 2009. A periplasmic aldehyde oxidoreductase represents the first molybdopterin cytosine dinucleotide cofactor containing molybdo-flavoenzyme from *Escherichia coli*. *FEBS J.* 276, 2762–2774. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07000.x>
- Neumann, M., Mittelstädt, G., Seduk, F., Iobbi-Nivol, C., Leimkühler, S., 2009. MocA is a specific cytidyltransferase involved in molybdopterin cytosine dinucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284, 21891–21898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008565>
- Nichols, J.D., Rajagopalan, K. V., 2005. *In vitro* molybdenum ligation to molybdopterin using purified components. *J. Biol. Chem.* 280, 7817–7822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413783200>
- Nichols, J.D., Xiang, S., Schindelin, H., Rajagopalan, K. V., 2007. Mutational analysis of *Escherichia coli* MoeA: Two functional activities map to the active site cleft. *Biochemistry* 46, 78–86. <https://doi.org/10.1021/bi061551q>

- Nichols, J., Rajagopalan, K. V., 2002. *Escherichia coli* MoeA and MogA. *J. Biol. Chem.* 277, 24995–25000. <https://doi.org/10.1074/jbc.m203238200>
- Pitterle, D.M., Johnson, J.L., Rajagopalan, K. V, 1993. Structural Characterization of a Molybdopterin Precursor. *J. Biol. Chem.* 268, 13506–13509.
- Raaijmakers, H., Macieira, S., Dias, J.M., Teixeira, S., Bursakov, S., Huber, R., Moura, J.J.G., Moura, I., Romão, M.J., 2002. Gene sequence and the 1.8 Å crystal structure of the tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Structure* 10, 1261–1272. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00826-2)
- Raaijmakers, H., Romão, M.J., 2006. Formate-reduced *E. coli* formate dehydrogenase H: The reinterpretation of the crystal structure suggests a new reaction mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem* 11, 849-854. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0129-2>
- Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F., Reinhardt, R., 2005. The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* 183, 27–36. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0742-9>
- Rabus, R., Widdel, F., 1995. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163, 96–103.
- Rahimi, H., 2019. Maturation der Wolfram-abhängigen Aldehyd Oxidoreduktase. Bachelorarbeit, Universität Marburg.
- Rajeev, L., Garber, M.E., Zane, G.M., Price, M.N., Dubchak, I., Wall, J.D., Novichkov, P.S., Mukhopadhyay, A., Kazakov, A.E., 2019. A new family of transcriptional regulators of tungstoenzymes and molybdate/tungstate transport. *Environ. Microbiol.* 21, 784–799. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14500>
- Reschke, S., Duffus, B.R., Schrapers, P., Mebs, S., Teutloff, C., Dau, H., Haumann, M., Leimkühler, S., 2019. Identification of YdhV as the First Molybdoenzyme Binding a Bis-Mo-MPT Cofactor in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 58, 2228–2242. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00078>
- Ringel, P., Krausze, J., Van den Heuvel, J., Curth, U., Pierik, A.J., Herzog, S., Mendel, R.R., Kruse, T., 2013. Biochemical Characterization of Molybdenum Cofactor-free Nitrate Reductase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 288, 14657–14671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457960>
- Rosin, A., 2018. Maturation der bakteriellen Aldehyd:Ferredoxin-Oxidoreduktase. Bachelorarbeit, Universität Marburg.
- Rosner, B.M., Schink, B., 1995. Purification and characterization of acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*, a tungsten iron-sulfur protein. *J. Bacteriol.* 177, 5767–5772. <https://doi.org/10.1128/jb.177.20.5767-5772.1995>
- Roy, R., Adams, M.W.W., 2002. Characterization of a fourth tungsten-containing enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 184, 6952–6956. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.6952-6956.2002>

- Roy, R., Mukund, S., Dunn, D.M., Weiss, R., Adams, M.W.W., 1999. Purification and Molecular Characterization of the Tungsten-Containing Formaldehyde Ferredoxin Oxidoreductase from the Hyperthermophilic Archaeon. *J. Bacteriol.* 181, 1171–1180.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring harbor laboratory Press*, Plainview, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467.
- Santamaria-Araujo, J.A., Fischer, B., Otte, T., Nimtz, M., Mendel, R.R., Wray, V., Schwarz, G., 2004. The Tetrahydropyranopterin Structure of the Sulfur-free and Metal-free Molybdenum Cofactor Precursor. *J. Biol. Chem.* 279, 15994–15999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311815200>
- Schink, B., 1985. Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 142, 295–301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00693407>
- Schmitt, G., Arndt, F., Kahnt, J., Heider, J., 2017. Adaptations to a Loss-of-Function Mutation in the Betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum*: Recruitment of Alternative Enzymes for Anaerobic Phenylalanine Degradation. *J. Bacteriol.* 199, 1–16. <https://doi.org/10.1128/jb.00383-17>
- Schmitt, G., Saft, M., Arndt, F., Kahnt, J., Heider, J., 2019. Two different quinoxinoprotein amine dehydrogenases initiate anaerobic degradation of aromatic amines in *Aromatoleum aromaticum* EbN1. *J. Bacteriol.* 201, 1–17. <https://doi.org/10.1128/jb.00281-19>
- Schmitz, J., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K. V., Leimkühler, S., 2007. Role of the C-terminal Gly-Gly motif of *Escherichia coli* MoeD, a molybdenum cofactor biosynthesis protein with a ubiquitin fold. *Biochemistry* 46, 909–916. <https://doi.org/10.1021/bi062011w>
- Schrag, J.D., Huang, W., Sivaraman, J., Smith, C., Plamondon, J., Larocque, R., Matte, A., Cygler, M., 2001. The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA, a protein from the molybdopterin synthesis pathway. *J. Mol. Biol.* 310, 419–431. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4771>
- Scott, I.M., Rubinstein, G.M., Lipscomb, G.L., Basen, M., Schut, G.J., Rhaesa, A.M., Lancaster, W.A., Poole, F.L., Kelly, R.M., Adams, M.W.W., 2015. A new class of tungsten-containing oxidoreductase in *Caldicellulosiruptor*, a genus of plant biomass-degrading thermophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7339–7347. <https://doi.org/10.1128/AEM.01634-15>

- Scott, I.M., Rubinstein, G.M., Poole, F.L., Lipscomb, G.L., Schut, G.J., Williams-Rhaesa, A.M., Stevenson, D.M., Amador-Noguez, D., Kelly, R.M., Adams, M.W.W., 2019. The thermophilic biomass-degrading bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* utilizes two enzymes to oxidize glyceraldehyde 3-phosphate during glycolysis. *J. Biol. Chem.* 294, 9995–10005. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007120>
- Seiffert, G.B., Ullmann, G.M., Messerschmidt, A., Schink, B., Kroneck, P.M.H., Einsle, O., 2007. Structure of the non-redox-active tungsten/[4Fe:4S] enzyme acetylene hydratase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3073–3077. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610407104>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791. <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
- Singh, P., Bandyopadhyay, P., Bhattacharya, S., Krishnamachari, A., Sengupta, S., 2009. Riboswitch Detection Using Profile Hidden Markov Models. *BMC Bioinformatics* 10, 325. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-325>
- Stallmeyer, B., Nerlich, A., Schiemann, J., Brinkmann, H., Mendel, R., 1995. Molybdenum co-factor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 8, 751–762. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1995.08050751.x>
- Stallmeyer, B., Schwarz, G., Schulze, J., Nerlich, A., Reiss, J., Kirsch, J., Mendel, R.R., 1999. The neurotransmitter receptor-anchoring protein gephyrin reconstitutes molybdenum cofactor biosynthesis in bacteria, plants, and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1333–1338.
- Strobl, G., Feicht, R., White, H., Lottspeich, F., Simon, H., 1992. The Tungsten-Containing Aldehyde Oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum* and its Complex with a Viologen-Accepting NADPH Oxidoreductase. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 373, 123–132. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1992.373.1.123>
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130.
- Tan, W.-H., Eichler, F.S., Hoda, S., Lee, M.S., Hagit, B., Hanley, C.A., Grant, E., Krishnamoorthy, K.S., Shih, V.E., 2005. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency: A Case Report With a Novel Mutation and Review of the Literature. *Pediatrics* 116, 757–766. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1897>
- Temple, C.A., Rajagopalan, K. V., 2000. Mechanism of assembly of the bis(molybdopterin guanine dinucleotide)molybdenum cofactor in *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.* 275, 40202–40210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007407200>

- Trautwein, T., I, F.K., Lottspeich, F., Simon, H., 1994. The (2*R*)-hydroxycaboxylate-viologen-oxidoreductase from *Proteus vulgaris* is a molybdenum-containing iron-sulphur Protein. *Eur. J. Biochem.* 1032, 1025–1032.
- Vergnes, A., Gouffi-Belhabich, K., Blasco, F., Giordano, G., Magalon, A., 2004. Involvement of the molybdenum cofactor biosynthetic machinery in the maturation of the *Escherichia coli* nitrate reductase A. *J. Biol. Chem.* 279, 41398–41403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407087200>
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Weinert, T., Huwiler, S.G., Kung, J.W., Weidenweber, S., Hellwig, P., Stärk, H.J., Biskup, T., Weber, S., Cotelesage, J.J.H., George, G.N., Ermler, U., Boll, M., 2015. Structural basis of enzymatic benzene ring reduction. *Nat. Chem. Biol.* 11, 586–591. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1849>
- White, H., Strobl, G., Feicht, R., Simon, H., 1989. Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes. *Eur. J. Biochem.* 184, 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14993.x>
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S., 2011. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr* 67, 235-242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
- Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R., Rabus, R., 2007. Functional proteomic view of metabolic regulation in “*Aromatoleum aromaticum*” strain EbN1. *Proteomics* 7, 2222–2239. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600987>
- Wöhlbrand, L., Rabus, R., 2009. Development of a genetic system for the denitrifying bacterium “*Aromatoleum aromaticum*” strain EbN1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 17, 41–52. <https://doi.org/10.1159/000159194>
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., Decruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Grahml, M.W., 1989. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Nucleic Acid Res.* 17, 3469–3478.
- Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K. V., 2003. Mechanistic and mutational studies of *Escherichia coli* molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 14523–14532. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300453200>
- Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K. V., 1993. Structural Characterization of a Molybdopterin Precursor. *J. Biol. Chem.* 268, 13493–13498.

- Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K. V, 1995. Investigation of the early steps of molybdopterin biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of in vivo labeling studies. *J. Biol. Chem.* 270, 1082–1087.
- Xiang, S., Nichols, J., Rajagopalan, K. V, Schindelin, H., 2001. The Crystal Structure of *Escherichia coli* MoeA and Its Relationship to the Multifunctional Protein Gephyrin, *Structure* 9, 299-310.
- Yokoyama, K., Leimkühler, S., 2015. The role of FeS clusters for molybdenum cofactor biosynthesis and molybdoenzymes in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1335-1349. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.021>
- Zhang, X., Vincent, A.S., Halliwell, B., Wong, K.P., 2004. A mechanism of sulfite neurotoxicity: Direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 279, 43035–43045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402759200>
- Zheng, L., White, R., Cash, V., Dean, D., 1994. Mechanism for the Desulfurization of L-Cysteine Catalyzed by the *nifS*. *Biochemistry* 33, 4714–4720. <https://doi.org/10.1021/bi00181a031>

Anhang

Tabelle 18: Die für die phylogenetische Analyse von MoeA1 und MoeA2 verwendeten Protein-Sequenzen mit *Accession number*.

Organismus	Protein	<i>Accession number</i>
<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	MoeA2	WP_015907371.1
<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	MoeA1	WP_015907370.1
<i>Escherichia coli</i> K-12	MoeA	WP_000397340.1
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	MoeA1	WP_011239589.1
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	MoeA2	WP_011236421.1
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	MoeA1	PDB: 1WU2
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	MoeA2	PDB: 1UZ5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cnx1	NP_197599.1
<i>Rattus norvegicus</i>	Gephyrin	NP_074056.2
<i>Homo sapiens</i>	Gephyrin	NP_065857.1
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MoeA1	WP_011011660.1
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MoeA2	WP_011012924.1
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	MoeA2	WP_011806324.1
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	MoeA1	ABM43326.1
<i>Geobacter metallireducens</i>	MoeA2	ABB30579.1
<i>Geobacter metallireducens</i>	MoeA1	ABB31278.1
<i>Geobacter metallireducens</i>	MoeA3	ABB32033.1
<i>Methylophaga aminisulfidivorans</i>	MoeA	WP_040576269.1
<i>Nitrosococcus halophilus</i>	MoeA	WP_013033416.1
<i>Beggiatoa alba</i>	MoeA2	WP_002683939.1
<i>Beggiatoa alba</i>	MoeA1	EIJ42129.1
<i>Desulfuromonas soudanensis</i>	MoeA	WP_053552302.1
<i>Desulfuromonas soudanensis</i>	MoeA2	WP_053549596.1
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	MoeA2	WP_072286465.1
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	MoeA3	WP_083558403.1
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	MoeA1	WP_072502116.1
<i>Rugamonas rubra</i>	MoeA	WP_093390298.1
<i>Sedimenticola thiotaurini</i>	MoeA1	WP_046860219.1

Organismus	Protein	Accession number
<i>Sedimenticola thiotaurini</i>	MoeA2	WP_046859003.1
<i>Desulfovibrio gigas</i>	MoeA	AGW12792.1
<i>Desulfovibrio gigas</i>	MoeA2	AGW14043.1
<i>Desulfovibrio gigas</i>	MoeA/LysR	AGW12551.1
<i>Desulfuromonas acetexigens</i>	MoeA	WP_092053757.1
<i>Halodesulfovibrio marinisediminis</i>	MoeA	WP_074216766.1
<i>Halodesulfovibrio marinisediminis</i>	MoeA	SIN91838.1
<i>Desulfuromonas acetexigens</i>	MoeA2	WP_092055681.1
<i>Desulfobacula toluolica</i>	MoeA2	WP_014955829.1
<i>Desulfobacula toluolica</i>	MoeA1	CCK78473.1
<i>Desulfobacula toluolica</i>	MoeA3	CCK82505.1
<i>Desulfobacula toluolica</i>	MoeA4	CCK82513.1

Tabelle 19: Die für die phylogenetische Analyse von MoeA3 verwendeten Protein-Sequenzen mit *Accession number*.

Organismus	Protein	Accession number
<i>Azoarcus</i> sp. PA01	MoeA3	WP_053421185.1
<i>Paraburkholderia caribensis</i>	MoeA3	WP_086910188.1
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	MoeA3	CAI08593.1
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1	CinA	CAI08047.1
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	MoeA3	WP_014427646.1
<i>Thermus thermophilus</i>	CinA	PDB: 4CTA_A
<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i>	MoeA3	ABI56560.1
<i>Hydrogenovibrio crunogenus</i>	MoeA3	ABB40732.1
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	MoeA3	ABM41420.1
<i>Escherichia coli</i>	YfaY	WP_105477651.1
<i>Escherichia coli</i>	YdeJ	NP_416055.1
<i>Escherichia coli</i>	YgaD	NP_417180.1
<i>Pedobacter himalayensis</i>	CinA	OOK79856.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CinA	VTQ35112.1
<i>Gilliamella apicola</i>	NMN-Deamidase	WP_110454366.1

Organismus	Protein	Accession number
<i>Eumeta japonica</i>	CinA	GBP25305.1
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	CinA	WP_034507305.1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CinA	KJX88266.1
<i>Agrobacterium rosae</i>	CinA	WP_103657807.1
<i>Clostridioides difficile</i>	CinA	VDH08977.1
<i>Bordetella holmesii</i>	CinA	WP_005015157.1
<i>Pusillimonas soli</i>	CinA	WP_129971511.1
<i>Kordiimonas lacus</i>	CinA	WP_068305400.1
<i>Thermogemmatispora onikobensis</i>	CinA	WP_069805748.1
<i>Meiothermus roseus</i>	NMN-Deamidase	WP_119275947.1
<i>Dictyobacter kobayashii</i>	CinA	WP_126548808.1
<i>Thermus filiformis</i>	NMN-Deamidase	WP_045246228.1
<i>Shewanella oneidensis</i>	PncC	NP_715912.1
<i>Shewanella colwelliana</i>	PncC	WP_069671086.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2-oxo-Tetronat-Isomerase	WP_017900989.1
<i>Sulfuricella denitrificans</i>	NMN-Deamidase	WP_009206365.1
<i>Nitrosomonas ureae</i>	CinA	WP_074719423.1
<i>Lasius niger</i>	CinA	KMQ87245.1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CinA	SST04927.1
<i>Thermoplasma volcanium</i>	CinA	WP_048054092.1
<i>Thermoplasma</i> sp. Kam2015	CinA	WP_110640673.1
<i>Homo sapiens</i>	CinA/FAD-Synthase	NP_001171820.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CinA	NP_013903.1

Tabelle 20: Element-Analyse von MoeA1, MoeA2 und MoeA3 nach Inkubation mit den Oxoanionen Wolframat, Molybdat und Selenat. Als Kontrolle ist unbehandeltes isoliertes Protein gemessen worden. Elemente die im Puffer gemessen wurden, sind den Werten abgezogen worden.

Element	MoeA1	MoeA1 + W	MoeA1 + Mo	MoeA2	MoeA2 + W	MoeA2 + Mo	MoeA2 + Se	MoeA3	MoeA3 + W	MoeA3 + Mo	MoeA3 + Se
P	2.132	3.325	3.022	3.436	0.615	0.786	0.436	5.851	0.643	0.622	0.790
Cu	0.008	0.009	0.012	0.020	0.004	0.004	0.003	0.012	-0.032	-0.024	-0.026
Zn	0.101	0.010	0.016	0.311	0.004	0.004	0.002	0.278	0.005	0.004	0.003
Se	0.029	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	3.481	0.020	0.008	0.011	6.594
Mo	0.001	0.000	0.017	0.001	0.000	0.715	0.008	0.000	0.000	0.623	0.003
W	0.000	0.028	0.002	0.000	0.308	0.013	0.005	0.000	0.390	0.000	0.073

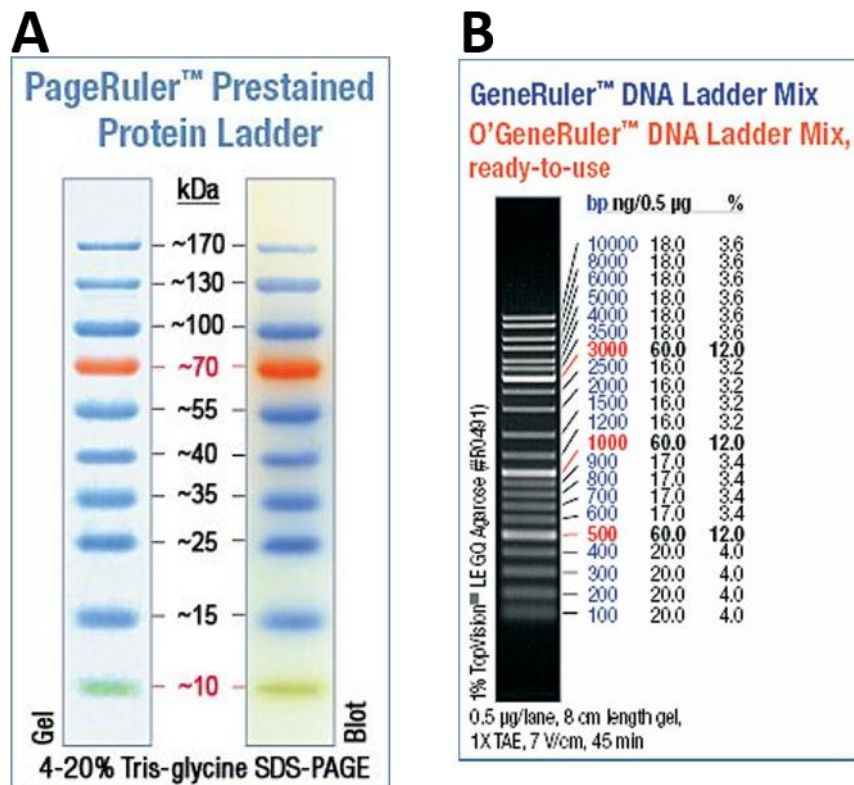


Abbildung 32: Die in dieser Arbeit verwendeten Protein- und DNA-Größenstandards. (A) Protein-Größenstandard von Thermo Fischer Scientific (Dreieich). (B) DNA-Größenstandard von Thermo Fisher Scientific (Dreieich). Beide Abbildungen verändert von Thermo Fisher Scientific (Dreieich).



Abbildung 33: Plasmidkarte von pASG-IBA105mob-AORshort-EbN1. Auf diesem Plasmid sind die Gene *aorA* (*ebA5004*), *aorB* (*ebA5005*) und *aorC* (*ebA5007*) des *aor*-Operons kodiert. Das Gen *aorA* ist am 5'-Ende mit einem *Twin-Strep-Tag* fusioniert. Das Operon steht unter Kontrolle eines Tetracyclin-Promoters (*tetR/tetA*). Der *Origin* ist ein *broad-host-origin* aus *Bordetella bronchiseptica* und benötigt das Replikationsprotein (*pBBR1 Rep*). Zur Konjugation steht ein *OriT* (*mob*) zur Verfügung. Als Selektionsmarker dient eine Ampicillin-Resistenz (*AmpR*).



Abbildung 34: Plasmidkarte von pASG5-*moeA1*-EbN1. Auf diesem Plasmid ist das Gen *moeA1* (*ebA6673*) kodiert. Das Gen ist am 5'-Ende mit einem *Srep-Tag II* fusioniert. Die Gensequenz steht unter Kontrolle eines Tetrazyklin-Promoters (*tetR/tetA*). Der *Origin* ist ein *broad-host-origin* aus *Bordetella bronchiseptica* und benötigt das Replikationsprotein (pBBR1 Rep). Zur Konjugation steht ein *OriT* (*mob*) zur Verfügung. Als Selektionsmarker dient eine Ampicillin-Resistenz (*AmpR*).



Abbildung 35: Plasmidkarte von pASG5-*moeA2*-EbN1. Auf diesem Plasmid ist das Gen *moeA2* (*ebA1078*) kodiert. Das Gen ist am 5'-Ende mit einem *Strep-Tag II* fusioniert. Die Gensequenz steht unter Kontrolle eines Tetrazyklin-Promoters (*tetR/tetA*). Der *Origin* ist ein *broad-host-origin* aus *Bordetella bronchiseptica* und benötigt das Replikationsprotein (pBBR1 Rep). Zur Konjugation steht ein OriT (*mob*) zur Verfügung. Als Selektionsmarker dient eine Ampicillin-Resistenz (AmpR).



Abbildung 36: Plasmidkarte von pASG-IBA103-*moeA3*-EbN1. Auf diesem Plasmid ist das Gen *moeA3* (*ebA4355*) kodiert. Das Gen ist am 3'-Ende mit einem *Twin-Strep-Tag* fusioniert. Die Gensequenz steht unter Kontrolle eines Tetrazyklin-Promoters (*tetR/tetA*). Der Replikationsursprung ist ein *ColE1-Origin*. Als Selektionsmarker dient eine Ampicillin-Resistenz (*AmpR*).

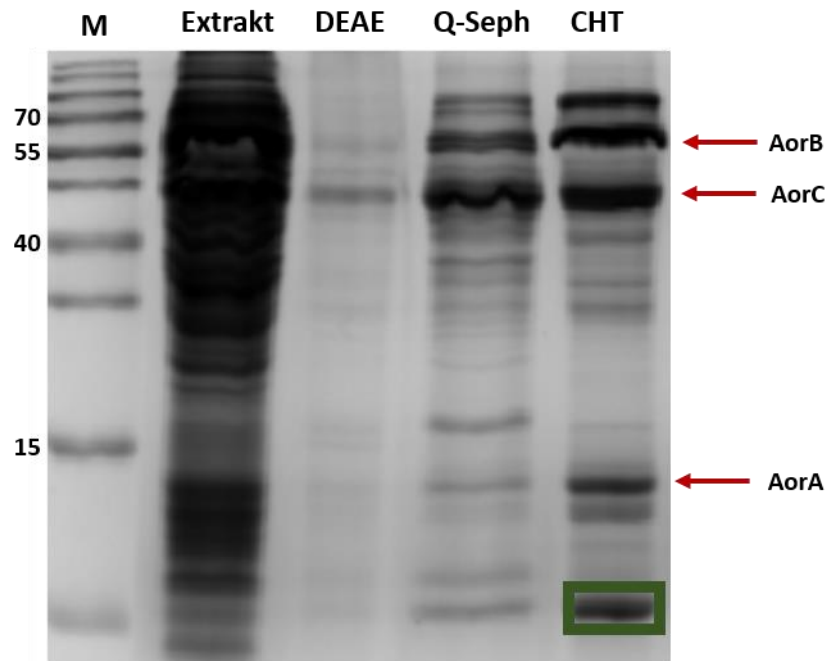


Abbildung 37: Anreicherung der AOR aus *A. aromaticum* EbN1. Bei dieser Anreicherung wurde entgegen des Standard-Protokolls nach DEAE-Sepharose eine weitere Anreicherung mittels Q-Sepharose durchgeführt. Bei der Anreicherung entstand unterhalb der 15 kDa eine weitere distinkte Bande (grüner Kasten). Das Eluat wurde zur MALDI-TOF-Analyse (Jörg Kahnt, MPI Marburg) gegeben und ergab die Sequenz für das Genprodukt aus *ebA5289*, einem Ferredoxin aus dem Operon der *bzd*-Typ Benzoyl-CoA-Reduktase.

Tabelle 21: Pyrophosphatase-Aktivität von MoeA1-3 aus *A. aromaticum* mit FAD als Substrat mittels Fluoreszenz. Ansätze enthielten in der Regel 100 mM KCl, 10 mM CoCl_2 oder MgCl_2 , 80 μg BSA und 60 μg Protein mit 100 mM Tris-HCl pH 7,5. Der molare Extinktionskoeffizient von FMN ist $11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Messungen wurden an dem Spektrofluorophotometer RF-5301pc (Shimadzu, Duisburg) bei einer Exzitation von 450 nm und einer Emission von 528 nm durchgeführt.

Protein	Ion	Spez. Aktivität [mU/mg]
MoeA1	Mg^{2+}	40,0 ($\pm 11,0$)
	Co^{2+}	58,8 ($\pm 46,5$)
MoeA2	Mg^{2+}	45,0 ($\pm 21,5$)
	Co^{2+}	63,0 ($\pm 12,6$)
MoeA3	Mg^{2+}	27,5 ($\pm 7,20$)
	Co^{2+}	28,1 ($\pm 4,60$)

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Professor Johann Heider für die Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit. Auch bedanke ich mich für die Möglichkeit ein breites Methodenspektrum von moderner Biochemie bis klassischer Mikrobiologie kennen gelernt zu haben.

Ich bedanke mich bei Professor Wolfgang Buckel für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Professor Antonio Pierik danke ich für die EPR-Analyse.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Andreas Seubert für die Durchführung der ICP-MS-Analysen.

Ich danke Viktoria Reithofer von der AG von Herrn Professor Lars-Oliver Essen für die Strukturauflösung und die Hilfe bei dem Refinement.

Ich bedanke mich bei Dr. Sven-Andreas Freibert für die Analyse der MST-Daten.

Bei Jörg Kahnt von der AG von Herrn Dr. Timo Glatter bedanke ich mich für die Durchführung der MALDI-TOF-Analysen.

Ein großer Dank geht an die komplette AG Heider mit Gabi Höff, Iris Schall, Andrea Schmidt, Dr. Karola Schühle, Galina Bauer, Silke Werner, Marianne Ploch, Diane Krupper, Dr. Georg Schmitt, Martin Saft und meinen Doktor-Geschwistern Iryna Sali, Christina Böhringer, Ammar Alhaj Zein und Dominik Hege. Speziell bedanke ich mich für die Freitagsgespräche ab Dienstag und all den anderen (Un)sinn.

Ich danke Georg für die Einführung in das Thema und für die jährliche Feuerzangenbowle.

Bei meiner Banknachbarin Gabi bedanke ich mich für ihre Geduld mit mir und dafür, dass sie mir auf ihre Weise immer Mut zugesprochen hat. Merci!

Bei Iris bedanke ich mich für die ganze Hilfe mit den Klonierungen und Reinigungen.

Auch ein Dankeschön an die AG Bremer und besonders Jochen Sohn für die Hilfe mit den Computern und den Unsinn, den wir sonst so getrieben haben, bro fist!

Binäres Danke an Marco Mock geb. Hornung für die ganze Hilfe mit den Computer- und Server-Problemen.

Auch möchte ich mich bei meinen BachelorstudentInnen Aline Rosin und Hamed Rahimi bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Thanks to you, Agnieszka Winiarska, for your work to the paper and I wish you success with your thesis. Seventy-four!

Ein Dankeschön an die Korrektur-Leser Niclas Schwarze, Julian Mawick und Dominik Hege.

Bei meiner Familie bedanke ich mich für die große Unterstützung der ganzen Jahre.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Name Fabian Arndt
Geburtsort Hattingen (Ruhr)

Hochschulbildung

2008 – 2011 **Bachelor of Science (B. Sc.)** im Fach Biologie
Ruhr-Universität Bochum
Thema: Etablierung eines induzierbaren Promotorsystems für *Sordaria macrospora*

2011 – 2015 **Master of Science (M. Sc.)** im Fach Biologie
Schwerpunkt: Molekulare Botanik und Mikrobiologie
Ruhr-Universität Bochum
Thema: Nutzbarmachung pflanzlicher CYP450-Enzyme durch Autodisplay

2016 – 2020 **Promotion (Dr. rer. nat.)** am Fachbereich Biologie, Betreuer: Prof. Dr. Johann Heider
Philipps-Universität Marburg
Thema: Wolframabhängige Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR): Katalytische Eigenschaften und Maturation

Vorträge und Poster

2016 – 2019 Diverse Vorträge und Poster-Präsentation im Schwerpunkt-Programm der DFG „Iron Sulfur for Life“ SPP 1927

2018 Poster-Präsentation auf der Konferenz der VAAM (Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie)

2019 Vortrag auf der Konferenz der VAAM
Titel: Aldehyde oxidoreductase (AOR) from *Aromatoleum aromaticum*: characterization and maturation factors

2019 Vortrag und Poster-Präsentation auf der MoTEC (Molybdenum and Tungsten Enzyme Conference)
Titel: Properties and maturation of bacterial tungsten-containing aldehyde oxidoreductases (AOR): differential molybdenum- and tungsten cofactor biosynthesis

Publikationen

Arndt F, Schmitt G, Winiarska A, Saft M, Seubert A, Kahnt J, Heider J (2019) Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes. *Front. Microbiol.* 10, 71, 1-12.

Schmitt G, Arndt F, Kahnt J, Heider J (2017) Adaptations to a loss-of-Function mutation in the Betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum*: Recruitment of Alternative Enzymes for Anaerobic Phenylalanine Degradation. *J. Bacteriol.* 99:e00383-17, 1-16.

Schmitt G, Saft M, Arndt F, Kahnt J, Heider J (2019) Two Different Quinohemoprotein Amine Dehydrogenases Initiate Anaerobic Degradation of Aromatic Amines in *Aromatoleum aromaticum* EbN1. *J. Bacteriol.* 199:e00281-19, 1-17.

Erklärung Publikation

Folgende Publikation wird im Original in dieser Arbeit eingefügt:

Arndt F, Schmitt G, Winiarska A, Saft M, Seubert A, Kahnt J, Heider J (2019) Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes. *Front. Microbiol.* 10, 71, 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2019.00071

Eigenanteil: Planung, Analyse der Daten, Durchführung und Auswertung der Aufreinigung, Aktivitätstest und der phylogenetischen Analyse, Anfertigung des Manuskripts mit JH.

Erklärung zum Eigenanteil und Bestätigung durch einen Koautor:

(Fabian Arndt)

(Prof. Dr. Johann Heider)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)