
Epsilonproteobakterielle Hydroxylamin-Oxidoreduktase (ϵ Hao): Charakterisierung eines “missing links” innerhalb der Multihäm Cytochrom *c* Familie



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biologin Doreen Haase

aus Lauchhammer

1. Referent: Prof. Dr. Jörg Simon

2. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 28.03.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2017

Darmstadt 2017

D17

Familienbande

Die Jahre vergingen und nach harter Arbeit ist das Ziel nur endlich geschafft,
auch wenn mein Doktorthema mir so manche schlaflose Nächte eingebracht,

doch Eines lernt man als Doktorand von Anfang an:

»Verliere nie den Mut und glaube daran«,

denn am Ende des Weges haben sich alle Mühen gelohnt

und man wird mit viel Erfahrung, neuem Wissen und dem Dokortitel belohnt.

Doch ohne meine Eltern hätte ich es nicht geschafft,

die mir durch ihre Liebe und Unterstützung so manch schwere Zeit erträglich gemacht,

drum schrieb ich eines Nachts diesen kleinen Reim,

denn ich werde für alles, was ihr für mich getan, ewig dankbar sein!

Doreen Haase 11.01.2015, Darmstadt

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	4
2.1 Der biogeochemische Stickstoffkreislauf	4
2.2 Funktion von Multihäm Cytochromen <i>c</i> im biogeochemischen Stickstoffkreislauf	6
2.2.1 Hydroxylamin-Oxidoreduktasen in aeroben nitrifizierenden Bakterien (<i>NeHao</i>)	7
2.2.2 Multihäm Cytochrome <i>c</i> in Anammox-Bakterien	9
2.2.3 Pentahäm Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase (<i>NrfA</i>)	10
2.2.4 Hydroxylamin-Oxidoreduktasen anaerober nitrat-ammonifizierender Bakterien (<i>εHao</i>)	11
2.3 <i>Wolinella succinogenes</i>	12
2.3.1 <i>W. succinogenes</i> als Wirts- und Modellorganismus	12
2.3.2 Respiratorische Nitrat-Ammonifikation von <i>W. succinogenes</i>	13
2.4 Ziele der Arbeit	15
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien	16
3.1.1 Chemikalien	16
3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	18
3.2 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	19
3.2.1 Organismen	19
3.2.2 Plasmide	22
3.2.3 Oligonukleotide	26
3.3 Medien und Medienzusätze	30
3.3.1 Nährmedium für die Kultivierung von <i>Wolinella succinogenes</i>	30
3.3.2 Medienzusätze	31
3.3.3 Nährmedien für die Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	32
3.3.4 Antibiotika	32
3.4 Kultivierungsbedingungen von Bakterien	32
3.4.1 Zellzucht von <i>Wolinella succinogenes</i>	32
3.4.2 Zellzucht von <i>Escherichia coli</i>	33
3.4.3 Bestimmung der Zelldichte durch Photometrie	33
3.4.4 Zellernte	33

3.4.5 Zellaufschluss mittels French Press und Zellfraktionierung	33
3.5 Molekularbiologische Methoden	34
3.5.1 Polymerasekettenreaktion	34
3.5.2 Zielgerichtete Mutagenese	35
3.5.3 Reinigung von DNA-Fragmenten	36
3.5.4 DNA-Restriktion	36
3.5.5 Phosphorylierung von DNA-Amplifikaten	36
3.5.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	36
3.5.7 Ligation	36
3.5.8 Konstruktion der Expressionsplasmide pMK9 und pTMH	36
3.5.8.1 Erstellung des Vektors pMK9	36
3.5.8.2 Konstruktion des Expressionsplasmids pTMH	37
3.5.9 Plasmide zur Expression von ϵ Hao-Proteinen	37
3.5.10 Agarose-Gelelektrophorese	37
3.5.11 Isolierung von Nukleinsäuren	38
3.5.12 DNA-Konzentrationsbestimmung	39
3.5.13 Sequenzanalyse	39
3.6 Mikrobiologische Methoden	39
3.6.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	39
3.6.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	40
3.6.3 Transformation von <i>Wolinella succinogenes</i>	40
3.6.4 Kultivierung und Charakterisierung von <i>W. succinogenes</i> Transformanden	40
3.7 Proteinbiochemische Methoden	41
3.7.1 Heterologe Proteinproduktion in <i>Wolinella succinogenes</i>	41
3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode mit KCN	42
3.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford	42
3.7.4 Erstellung von Cytochrom c-Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie	43
3.7.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.7.6 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	44
3.7.6.1 <i>Strep</i> -Tactin Affinitätschromatographie	44
3.7.6.2 Nickel-Nitriloessigsäure (NTA) Affinitätschromatographie	45

3.7.6.3 Proteinreinigung mittels MBP-Chromatographie	46
3.7.6.4 Spaltung von Fusionsproteinen mit der TEV-Protease	46
3.7.7 Konventionelle Proteinreinigung	47
3.7.7.1 Diethylaminoethyl (DEAE) - Anionenaustauschchromatographie	47
3.7.7.2 Gelfiltration	47
3.8 Proteinanalytische Methoden	48
3.8.1 Coomassie-Färbung	48
3.8.2 Häm-Färbung	48
3.8.3 Western Blot und ELISA	49
3.8.3.1 Western Blot	49
3.8.3.2 ELISA	50
3.8.4 Blau-Nativ-Elektrophorese (BN-PAGE)	50
3.8.5 Isoelektrische Fokussierung	51
3.8.6 Ammoniumnachweis	52
3.8.7 Hydroxylaminbestimmung	53
3.8.8 Nitritnachweis	54
3.9 Enzymaktivitätsbestimmungen	54
3.9.1 Messung von Reduktase-Aktivitäten	54
3.9.2 Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität	55
3.9.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M)	56
3.9.4 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums	56
3.9.5 Produktbestimmungen enzymatischer Reaktionen	57
3.9.5.1 Nitritreduktion	57
3.9.5.2 Hydroxylamin-Oxidation	57
4. ERGEBNISSE	59
4.1 Heterologe Produktion von ϵHao-MBP Fusionsproteinen	59
4.2 Charakterisierung der ϵHao-MBP Fusionsproteine <i>CfHao</i>, <i>CcuHao</i> und <i>CmHao</i>	61
4.2.1 Enzymaktivitätsmessung mit verschiedenen Substraten	62
4.2.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten	63
4.2.3 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums	65

4.2.4 Substrat- und Produktbestimmung	67
4.2.4.1 Nitritreduktion	67
4.2.4.2 Hydroxylamin-Oxidation	68
4.2.5 Erstellung von Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie	69
4.2.6 Bestimmung der Multimerisierungseigenschaften von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen mittels analytischer Gelfiltration	71
4.2.7 Blau-Nativ-Elektrophorese (BN-PAGE)	73
4.2.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	74
4.3 Heterologe Produktion und Charakterisierung der ϵ Hao aus <i>Nautilia profundicola</i> (<i>NpHao</i>)	75
4.4 Heterologe Produktion und Reinigung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine <i>CmHao_W464Y</i> , <i>CcuHao_W428Y</i> und <i>CfHao_W434Y</i>	77
4.5 Charakterisierung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine <i>CmHao_W464Y</i> , <i>CcuHao_W428Y</i> und <i>CfHao_W434Y</i>	81
4.5.1 Enzymaktivitätsmessung mit verschiedenen Substraten	81
4.5.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten	82
4.5.3 Substrat- und Produktbestimmung	84
4.5.3.1 Nitritreduktion	84
4.5.3.2 Hydroxylamin-Oxidation	85
4.5.4 Erstellung von Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie	86
4.6 Erstellung von ϵ Hao-MBP Varianten <i>CmHao_V450Y</i> , <i>CcuHao_V414Y</i> und <i>CfHao_V422Y</i>	87
4.7 Charakterisierung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine <i>CmHao_V450Y</i> , <i>CcuHao_V414Y</i> und <i>CfHao_V422Y</i>	89
4.7.1 Enzymaktivitätsmessung mit verschiedenen Substraten	89
4.7.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante	90
4.7.3 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums	92
4.7.4 Substrat- und Produktbestimmung	94
4.7.4.1 Nitritreduktion	94
4.7.4.2 Hydroxylamin-Oxidation	95

4.7.5 Erstellung von Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie	96
4.7.6 Bestimmung der Multimerisierungszustände mittels analytischer Gelfiltration	98
4.7.7 Blau-Nativ-Elektrophorese (BN-PAGE)	99
4.7.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	100
4.8 Bioinformatische Analysen	101
4.8.1 Untersuchung ausgewählter HaoA-Proteinsequenzen	101
4.8.2 Identifizierung potenzieller Redoxpartner der ϵ Hao	103
4.9 Weitere Vorgehensweisen zur Produktion und Reinigung der <i>CmHao</i> und <i>CcuHao</i> sowie der HaoA aus <i>N. europaea</i> (<i>NeHao</i>)	106
4.9.1 Heterologe Produktion und Reinigung der <i>CmHao</i> und <i>CcuHao</i> mit einem einfachen C-terminalen <i>Strep</i> -Tag	106
4.9.2 Heterologe Produktion und Reinigung der <i>CmHao</i> mit einem doppelten C-terminalen <i>Strep</i> -Tag	107
4.9.3 Heterologe Produktion und Reinigung der <i>CmHao</i> mit einem N- und C-terminalen <i>Strep</i> -Tag	109
4.9.4 Heterologe Produktion und Reinigung der <i>CmHao</i> mit einem einfachen C-terminalen His-Tag	110
4.9.5 Konventionelle Reinigung der <i>CmHao</i>	112
4.9.6 Heterologe Produktion und ortsspezifische Veränderung der HaoA aus <i>Nitrosomonas europaea</i> (<i>NeHao</i>)	113
4.9.6.1 Heterologe Produktion des Hao-MBP Fusionsproteins <i>NeHao</i>	113
4.9.6.2 Heterologe Produktion der Hao-MBP Variante <i>NeHao_Y467V</i>	116
5. DISKUSSION	118
5.1 Heterologe Produktion von ϵHao-MBP Fusionsproteinen in <i>W. succinogenes</i>	118
5.2 Enzymatische Eigenschaften und physiologische Funktion von ϵHao-Proteinen	120
5.3 Charakterisierung der ϵHao-MBP Varianten	125
5.3.1 Enzymatische Eigenschaften der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine <i>CmHao_W464Y</i> , <i>CcuHao_W428Y</i> und <i>CfHao_W434Y</i>	125
5.3.2 Enzymatische Eigenschaften der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine <i>CmHao_V450Y</i> , <i>CcuHao_V414Y</i> und <i>CfHao_V422Y</i>	127
5.4 Rolle der ϵHao innerhalb der Evolution von Multihäm Cytochromen <i>c</i> (MCC)	130

5.5 Modell zur Funktionalität der ϵ Hao	131
6. VERZEICHNISSE	133
6.1 Literaturverzeichnis	133
6.2 Abkürzungsverzeichnis	144
6.3 Abbildungsverzeichnis	148
6.4 Tabellenverzeichnis	151
7. ANHANG	153
7.1 Alignment der HaoA-Proteinsequenzen	153
7.2 Alignment der HaoB-Proteinsequenzen	159
7.3 Identitätsmatrix von ϵ Hao-Proteinen, <i>W. succinogenes</i> NrfA und <i>N. europaea</i> Hao	162
7.4 Publikationen	163
7.5 Lebenslauf	164
7.6 Ehrenwörtliche Erklärung	165
8. DANKSAGUNG	166

1. Zusammenfassung

Die Familie der prokaryotischen Multihäm Cytochrome *c* (MCC) besitzt eine zentrale Rolle im biogeochemischen Stickstoffkreislauf. Zwei bedeutende Multihäm Cytochrome *c*, die am Umsatz von Stickstoffverbindungen beteiligt sind, sind die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA) und die Oktahäm Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao). Die Nitritreduktase ist dabei in den anaeroben Stoffwechselprozess der Ammonifikation involviert wohingegen die Hydroxylamin-Oxidoreduktase an dem aeroben Prozess der Nitrifikation beteiligt ist. Vertreter der MCC-Familie weisen zumeist einen vielseitigen enzymatischen Charakter auf. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Nitritreduktase (NrfA), welche neben der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion zu Ammonium ebenfalls die Detoxifikation reaktiver Stickstoff-Spezies katalysiert. Die Oktahäm Cytochrom *c* Hydroxylamin-Oxidoreduktasen (fakultativ) anaerober Nitrat-Ammonifizierer (ϵ Hao) sind ebenfalls der MCC-Familie zugehörig. Strukturell weisen ϵ Hao-Proteine Identitäten von bis zu 22 % zur Hydroxylamin-Oxidoreduktase der nitrifizierenden Bakterien auf. Epsilonproteobakterielle Hydroxylamin-Oxidoreduktasen (ϵ Hao), die in den Genomen diverser Nitrat/Nitrit-Ammonifizierer identifiziert wurden, wurden jedoch bislang weder biochemisch noch enzymatisch charakterisiert. Interessant ist jedoch, dass diese Organismen bis auf wenige Ausnahmen kein Homolog der periplasmatischen Nitritreduktase NrfA besitzen. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass die entsprechenden Bakterien über einen bisher nicht untersuchten Weg der Nitritverwertung verfügen. Weiterhin wurde angenommen, dass ϵ Hao-Proteine maßgeblich an diesem neuen Reaktionsweg beteiligt sein könnten. Die Ziele dieser Arbeit waren daher die heterologe Produktion diverser epsilonproteobakterieller Hydroxylamin-Oxidoreduktasen im Wirtsorganismus *Wolinella succinogenes*, die Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie und die ortsspezifische Mutagenese ϵ Hao-kodierender *haoA*-Gene. Weiterhin sollten die enzymatische Charakterisierung der Proteine unter Verwendung verschiedener Substrate sowie die Analyse des Substrat- und Produktspektrums erfolgen, um Rückschlüsse auf die biologische Funktion der epsilonproteobakteriellen Hydroxylamin-Oxidoreduktasen zu ziehen. Zusätzlich wurde das Vorkommen, die Lage der entsprechenden Gene im Genom sowie die strukturelle Diversität der Hydroxylamin-Oxidoreduktasen (ϵ Hao) mit Hilfe von bioinformatischen Analysen untersucht.

Innerhalb dieser Arbeit wurden affinitätsmarkierte epsilonproteobakterielle Hydroxylamin-Oxidoreduktasen der wirtsassoziierten Epsilonproteobakterien *Campylobacter fetus* (CfHao) und *Campylobacter curvus* (CcuHao) sowie der Tiefsee-Bakterien *Caminibacter mediatlanticus* (CmHao) und *Nautilia profundicola* (NpHao) unter Verwendung des Expressionsplasmids pTMH heterolog als ϵ Hao-MBP (Maltose-Bindeprotein) Fusionsproteine in *W. succinogenes* produziert. Durch doppelt homologe Rekombination erfolgte der Austausch des *nrfA* Gens von *W. succinogenes*

gegen die *haoA* Gene der oben aufgeführten Epsilonproteobakterien. Nachfolgend wurden die ϵ Hao-Proteine gereinigt und hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten im Vergleich zu bereits charakterisierten Enzymen (*W. succinogenes* NrfA; *Nitrosomonas europaea* Hao) untersucht. Innerhalb der Enzymaktivitätsmessungen wurden Nitrit, Hydroxylamin, Sulfid und Hydrazin als potenzielle Substrate verwendet. Bei allen vier charakterisierten Enzymen war die für Nitritreduktasen des NrfA-Typs charakteristische Katalyse von Nitrit und Hydroxylamin nachweisbar, wobei bei der Nitritreduktion Ammonium als Produkt gebildet wurde. Hinsichtlich der Hydroxylamin-Oxidation sowie Hydrazin- und Sulfid-Reduktion konnten hingegen keine signifikanten spezifischen Aktivitäten ermittelt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die ortsspezifische Mutagenese von Genen, die für epsilonproteobakterielle Hydroxylamin-Oxidoreduktasen kodieren. ϵ Hao-Proteine besitzen im Gegensatz zur *N. europaea* Hao (*NeHao*) keinen Tyrosinrest im aktiven Zentrum, welcher für die Ausbildung eines Häm P460 essentiell ist. Dieses Häm P460 weist zwei kovalente Bindungen zwischen einem konservierten Tyrosin-Rest und der Häm *c*-Gruppe des aktiven Zentrums eines benachbarten Hao-Monomers auf. Es bedingt daher vermutlich die oxidative Funktion der *NeHao* und ist ursächlich für die Ausbildung einer homotrimeren Struktur, in der die einzelnen Untereinheiten kovalent miteinander verknüpft sind. Mittels Mutagenese der entsprechenden *haoA*-Gene wurde die Aminosäure Tyrosin an den zur *NeHao* äquivalenten Positionen in die Proteine *CcuHao*, *CfHao* und *CmHao* eingebracht. Nachfolgend wurden die Proteinvarianten hinsichtlich der Ausbildung eines Häm P460, einer Trimerisierung und der Enzymaktivität geprüft. Bei keiner der generierten ϵ Hao-Varianten war jedoch eine erhöhte Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität oder ein für das Häm P460 charakteristisches Absorptionsmaximum bei 460 nm nachweisbar.

Zusätzlich wurde eine bioinformatische Analyse von ϵ Hao-kodierenden *haoA*-Gensequenzen durchgeführt, die Aufschluss über das Vorkommen der *haoA*-Gene, deren Lage im Genom sowie mögliche Interaktionspartner geben sollte. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen wurde ermittelt, dass 18 der insgesamt 40 identifizierten HaoA-Proteine der Klasse der Epsilonproteobakterien zugeordnet werden können. Allerdings wiesen auch die Genome diverser Gamma- und Deltaproteobakterien sowie Angehörige der Phyla Aquificae und Thermodesulfobacteria vorhergesagte HaoA-Proteine auf. Mit Hilfe der vorhandenen Genomdaten war es möglich, in einem Großteil der Organismen das Gen *haoB* nachzuweisen, welches für ein Tetrahäm Cytochrom *c* der NapC/NrfH-Familie kodiert und in vielen Fällen stromaufwärts des *haoA*-Gens gelegen ist. Dieses Resultat lässt die Ausbildung eines membrangebundenen HaoBA-Komplexes vermuten, der eine funktionelle Ähnlichkeit zu dem gut charakterisierten Nitritreduktase-

Komplex NrfHA aufweisen sollte. Bedeutend ist hierbei, dass die beiden Tiefseebakterien *C. mediatlanticus* und *N. profundicola* als Nitrat-ammonifizierende Organismen beschrieben wurden, obwohl in deren Genomen keine Gene für die periplasmatische Nitritreduktase NrfA vorhanden sind. Somit ist der ammonifizierende Metabolismus dieser Bakterien durch das Vorhandensein von *haoA*- (und *haoB*-) Genen erklärbar. Aufgrund dessen besitzt die ϵ Hao in diesen Organismen vermutlich eine physiologische Rolle innerhalb der Nitrit-Respiration und/oder Nitrit-Assimilation. Weiterhin ist unter Einbeziehung der biochemischen Ergebnisse eine Funktion der Proteine im Rahmen der Hydroxylamin- und/oder NO-Detoxifizierung denkbar, was den vielseitigen metabolischen Charakter von Vertretern der MCC-Familie unterstreicht. Die konservierte Anordnung der Häm-Gruppen, die Sequenzhomologie zur Hao sowie die mögliche funktionelle Ähnlichkeit zu NrfA-Proteinen lassen die Hypothese zu, dass ϵ Hao-Proteine möglicherweise eine bedeutende Rolle als "missing link" innerhalb der Evolution von NrfA- und Hao-Enzymen einnehmen.

2. Einleitung

2.1 Der biogeochemische Stickstoffkreislauf

Stickstoff ist ein wesentlicher Bestandteil des Lebens und wird primär zur Synthese wichtiger Biomoleküle, wie zum Beispiel Aminosäuren, DNA oder Kofaktoren genutzt. Stickstoff kommt in gebundener Form in der Natur als Salpeter (KNO_3) oder Chilesalpeter (NaNO_3) vor (Greenwood & Earnshaw, 1990). Das wohl größte Vorkommen wird jedoch durch elementaren Stickstoff abgedeckt, welcher als inertes Gas einen atmosphärischen Anteil von 78 % besitzt. Ein wichtiges Charakteristikum von atmosphärischem Stickstoff ist das Vorhandensein einer hohen Bindungsdissoziationsenthalpie. Daher war die biologische Fixierung von Stickstoff durch Mikroorganismen (Nitrogenase-abhängige Reaktion) lange Zeit die einzige Möglichkeit um diesen für den Menschen verfügbar zu machen. Dieser energieaufwendige Prozess wird allerdings nur von Prokaryoten durchgeführt, wenn alternative Stickstoffquellen fehlen. Erst nach Einführung des Haber-Bosch Verfahrens war es daher möglich, molekularen Stickstoff in deutlich größeren Mengen zu fixieren. Stickstoff unterliegt einem biogeochemischen Kreislauf (Abb. 1), dessen Energiestoffwechselreaktionen von Metalloproteinen katalysiert werden. Diese besitzen in ihren Aktivzentren Kupfer, Eisen oder Molybdän (Berks *et al.*, 1995; Einsle & Kroneck, 2004).

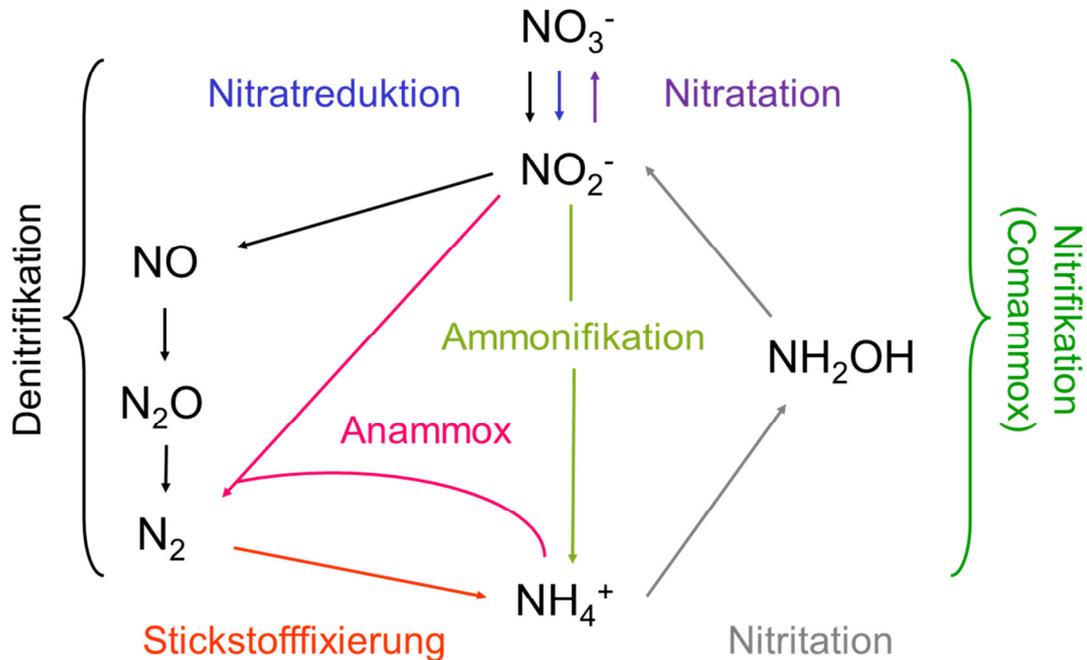


Abbildung 1: Einfache Darstellung des biogeochemischen Stickstoffkreislaufs. Mit Ausnahme der Stickstofffixierung kommen alle gezeigten Prozesse in mikrobiellen Energiestoffwechselreaktionen vor (modifiziert nach Kern & Simon, 2009).

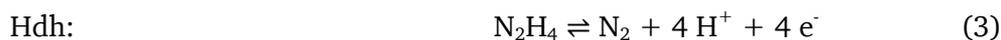
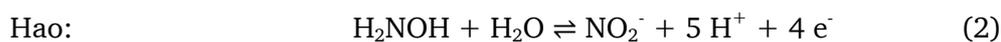
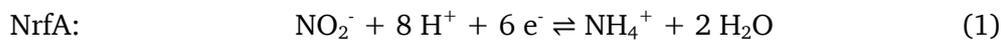
Zwei bedeutende Energiestoffwechselreaktionen des Stickstoffkreislaufs sind die dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) sowie die Denitrifikation. Beide Prozesse nutzen hierbei das Substrat Nitrat, welches nachfolgend zu Nitrit reduziert wird. Nitrit fungiert anschließend in weiteren anaeroben Stoffwechselwegen als Elektronenakzeptor. Ammonifizierer katalysieren hierbei die direkte Reduktion von Nitrit zu Ammonium. Dieser Prozess, bei dem keine zusätzlichen freien Intermediate gebildet werden, wird von ammonifizierenden Nitritreduktasen katalysiert. Im Gegensatz dazu wird bei der Denitrifikation das Intermediat Nitrit über drei aufeinanderfolgende enzymkatalysierte Reaktionen zu Distickstoff reduziert, wobei die gasförmigen Intermediate Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid gebildet werden. Ein weiterer Weg der Nitritverwertung ist die Anammox-Reaktion. Bei diesem Prozess wird Nitrit zunächst zu Stickstoffmonoxid reduziert, welches in Verbindung mit Ammonium zu dem Intermediat Hydrazin umgesetzt wird. Anschließend wird das entstandene Hydrazin zu molekularem Stickstoff oxidiert.

Ein ebenfalls bedeutender mikrobieller Energiestoffwechselweg innerhalb des Stickstoffkreislaufs ist die Nitrifikation. Bei diesem Prozess fungiert das beispielsweise durch Abbau organischer Verbindungen freigesetzte Ammonium als Substrat. Dieses kann unter aeroben Bedingungen von Ammonium-oxidierenden Bakterien (AOB) und Archaeen (AOA) über Hydroxylamin zu Nitrit oxidiert werden. Der erste Reaktionsschritt, bei dem Ammonium zu Hydroxylamin umgesetzt wird, wird von der Ammoniummonooxygenase (AMO) katalysiert. Nachfolgend wird dann in einer zweiten Reaktion das entstandene toxische Intermediat Hydroxylamin mit Hilfe der Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao) in nitrifizierenden Bakterien (AOB) zu Nitrit oxidiert (Nitrifikation). Das Enzym, welches in den entsprechenden Archaeen (AOA) die Hydroxylamin-Oxidation katalysiert, ist bisher unbekannt. Anschließend wird Nitrit von Nitrit-oxidierenden Bakterien (NOB) zu Nitrat oxidiert (Nitrifikation).

Die Nitrifikation ist ein von Mikroorganismen durchgeführter Prozess, welcher aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten besteht. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die zwei Reaktionsschritte der Nitrifikation von zwei verschiedenen Mikroorganismen (Ammonium-Oxidierer, Nitrit-Oxidierer) durchgeführt werden. Daher wurde vermutet, dass erst durch die Zusammenarbeit von Ammonium-Oxidierern und Nitrit-Oxidierern die Nitrifikation vollständig abläuft. Allerdings wurden im Jahr 2015 Vertreter der Gattung *Nitrospira* identifiziert, die die komplette Nitrifikation allein durchführen und alle notwendigen Gene für die Ammonium- und Nitrit-Oxidation besitzen. Für diese neu entdeckten Nitrifikanten wurde der Begriff "Comammox" (complete ammonia oxidizer) eingeführt (Daims *et al.*, 2015; van Kessel *et al.*, 2015).

2.2 Funktion von Multihäm Cytochromen *c* im biogeochemischen Stickstoffkreislauf

Die Familie der prokaryotischen Multihäm Cytochrome *c* (MCC) besitzt eine zentrale Rolle im biogeochemischen Stickstoffkreislauf (Abb. 1) sowie innerhalb des Schwefelkreislaufs (Einsle *et al.*, 2002; Mowat & Chapman, 2005; Klotz *et al.*, 2008; Einsle, 2011; Kern *et al.*, 2011a; Simon *et al.*, 2011; Hermann *et al.*, 2015; Kartal & Keltjens, 2016). Das Vorhandensein einer bzw. mehrerer kovalent gebundener Häm-Gruppen in einem Cytochrom bedingt dessen Funktion als Redoxenzym und/oder Elektronenüberträger. Ein Charakteristikum dieser Proteine ist die Gegenwart eines Häm-Bindemotivs (i.d.R. CX₂CH), welches für die kovalente Verknüpfung zwischen einer Häm-Gruppe und dem Apocytochrom benötigt wird. Die Häm-Gruppen sind hierbei über zwei Thioetherbrücken kovalent an das Protein gebunden. Diese Verknüpfung erfolgt zwischen den Vinylgruppen des Porphyrinrings und den Sulfhydrylgruppen der Cysteine des konservierten Häm-Bindemotivs. Vertreter der MCC Familie weisen einen vielseitigen enzymatischen Charakter auf. Das bedeutet, dass einige Enzyme zwar identische Substrate nutzen und strukturell hoch konservierte Häm *c* Arrangements besitzen, jedoch unterschiedliche biochemische Reaktionen katalysieren. Drei bedeutende Multihäm Cytochrome *c*, die am Umsatz von Stickstoffverbindungen beteiligt sind, sind die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA, Reaktion 1), die Oktahäm Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao, Reaktion 2) und die Oktahäm Hydrazin-Dehydrogenase (Hdh, Reaktion 3).



Diese Proteine sind in Stoffwechselprozesse der dissimilatorischen Nitrat/Nitrit-Reduktion zu Ammonium (DNRA), der Nitrifikation und der anaeroben Ammonium-Oxidation (Anammox-Reaktion) involviert (Abb. 1; Simon & Klotz, 2013; Stein & Klotz, 2016). Sie katalysieren innerhalb der Stoffwechselwege entweder reduktive oder oxidative Reaktionen unter Verwendung von Substraten, welche ein einzelnes Paar an Valenzelektronen für die direkte Bindung des Substrats an die zentrale Häm *c* Gruppe (proximale Ligandenposition) im aktiven Zentrum bereitstellen. Interessanterweise katalysieren viele Vertreter der MCC-Familie mehr als eine biochemische Reaktion. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA), welche neben der Reaktion (1) sowohl den Umsatz von Hydroxylamin sowie Stickstoffmonoxid zu Ammonium, Sulfid zu Sulfid und Wasserstoffperoxid zu Wasser katalysiert (Poock *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2011b; Einsle, 2011). Ein ähnliches

Verhalten wurde auch bei der Oktahäm Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao) von *Nitrosomonas europaea* beobachtet. Dieses Enzym katalysiert neben der Reaktion (2) auch die Oxidation von Hydrazin zu Stickstoff, den Umsatz von Hydroxylamin zu Stickstoffmonoxid sowie die Oxidation von Stickstoffmonoxid zu Ammonium, wobei innerhalb dieser Reaktion als Nebenprodukt Hydroxylamin gebildet wird (Hooper & Nason, 1965; Hooper & Terry, 1977; Hooper *et al.*, 1997; Hooper *et al.*, 2004; Kostera *et al.*, 2008; Kostera *et al.*, 2010).

2.2.1 Hydroxylamin-Oxidoreduktasen in aeroben nitrifizierenden Bakterien (*NeHao*)

Die homotrimere Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea* (*NeHao*) katalysiert innerhalb des biogeochemischen Stickstoffkreislaufs einen Teilschritt des oxidativen Prozesses der aeroben bakteriellen Nitrifikation, nämlich die Umsetzung des toxischen Intermediats Hydroxylamin zu Nitrit (Hooper & Nason, 1965). Als Elektronenakzeptor innerhalb der Reaktion fungiert Cytochrom c_{554} (Yamanaka & Shinra, 1974). Unter Sauerstoffmangel wurde beobachtet, dass das nitrifizierende Bakterium *N. europaea* ebenfalls denitrifizierende Stoffwechselreaktionen katalysieren kann. Dies führt jedoch zu einer Anhäufung toxischer Intermediate wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (Hooper & Terry, 1979). Auch ein reduktiver Reaktionsmechanismus wurde für die *NeHao* nachgewiesen (Kostera *et al.*, 2010). Dabei werden toxische Intermediate wie Hydroxylamin zu Ammonium umgewandelt, um möglicherweise eine Anhäufung dieser Stoffe in der Zelle zu verlangsamen (Kostera *et al.*, 2008). Der charakteristische, oxidative Reaktionsmechanismus der homotrimeren *NeHao* wurde auf die Anwesenheit von zwei kovalenten Bindungen zwischen einem konservierten Tyrosin-Rest und der Häm *c*-Gruppe des aktiven Zentrums eines benachbarten Hao-Monomers zurückgeführt (Häm P460; Abb. 2). Dieser sogenannte Tyrosin Cross-Link weist ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 460 nm auf und wird daher als P460 bezeichnet (Igarashi *et al.*, 1997; Bergmann *et al.*, 1998; Elmore *et al.*, 2007; Poret-Peterson *et al.*, 2008; Cedervall *et al.*, 2013). Das Häm P460 hat dabei nicht nur Einfluss auf die Katalysefähigkeit des Enzyms (Hooper & Terry, 1977) sondern ist für die Ausbildung des Homotrimers der *NeHao* essentiell.

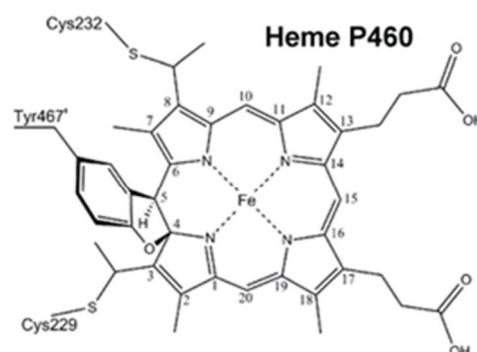


Abbildung 2: Tyrosin Cross-Link innerhalb der Hao-Struktur (Cedervall *et al.*, 2013).

Auch andere Enzyme, wie zum Beispiel die Nitritreduktase von *W. succinogenes* (NrfA), sind in der Lage die Substrate Nitrit und Hydroxylamin umzusetzen. Hierbei handelt es sich jedoch um einen reduktiven Reaktionsmechanismus, bei dem Ammonium als Endprodukt gebildet wird (Einsle *et al.*, 2002). Auch bezüglich der Kristallstruktur gibt es signifikante Unterschiede zwischen der homotrimeren NeHao (Igarashi *et al.*, 1997; Abb. 3) und NrfA aus *W. succinogenes*, welche als Homodimer vorliegt (Einsle *et al.*, 2000).

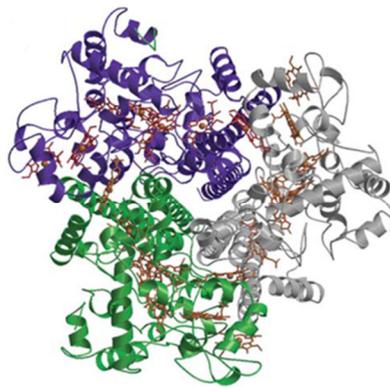


Abbildung 3: Strukturmodell der homotrimeren Hao von *Nitrosomonas europaea*. Die einzelnen Untereinheiten der Hao sind farblich gekennzeichnet. Die Häm *c*-Gruppen sind innerhalb der Struktur rot hervorgehoben (Mowat & Chapman, 2005).

Obwohl sich die Strukturen der beiden Proteine deutlich unterscheiden und nur eine geringfügige Sequenzidentität von 9 % vorliegt (Kap. 7.3), weist die räumliche Anordnung der Häm-Gruppen dennoch außergewöhnliche Übereinstimmungen auf (Abb. 4). Interessanterweise lassen sich die fünf Häm *c*-Gruppen der Nitritreduktase NrfA und die Häm-Gruppen 4-8 der NeHao nahezu deckungsgleich anordnen (Einsle *et al.*, 2000). Die konservierte Anordnung der Häm-Gruppen sowie die enge Verwandtschaftsbeziehung zwischen Pentahäm Cytochromen *c* und Oktahäm Cytochromen *c* (Klotz *et al.*, 2008; Kern *et al.*, 2011) lässt Vermutungen über einen potenziellen, gemeinsamen Ursprung dieser Enzyme zu (Bergmann *et al.*, 2005).

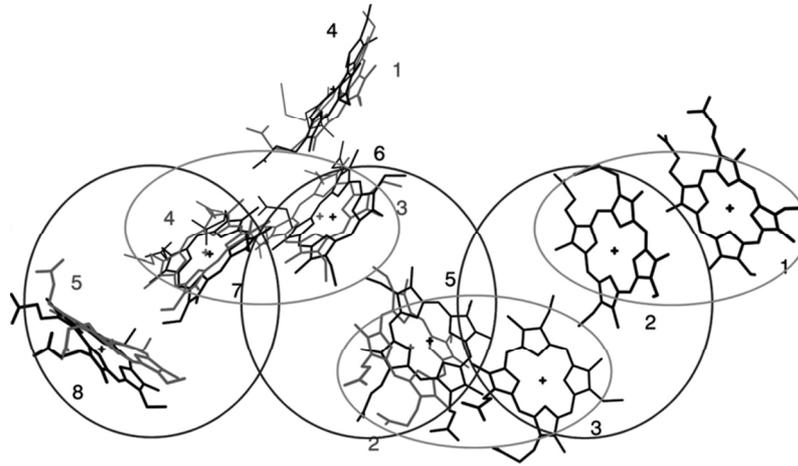


Abbildung 4: Anordnung der Häm-Gruppen in *W. succinogenes* NrfA (grau) und *N. europaea* Hao (schwarz). Parallel orientierte Häm-Gruppen sind grau umrandet und senkrecht zueinander orientierte Häm-Gruppen sind durch schwarze Kreise hervorgehoben. Die Häm-Gruppen sind nach der Reihenfolge ihrer Bindemotive innerhalb der Primärstruktur nummeriert (Einsle *et al.*, 2000).

2.2.2 Multihäm Cytochrome *c* in Anammox-Bakterien

Anammox-Bakterien weisen eine Vielzahl an Multihäm Cytochromen *c* auf. Ein prominentes Beispiel ist die Oktahäm Cytochrom *c* Hydrazin-Dehydrogenase (Hdh), die innerhalb der anaeroben Ammonium-Oxidation den Umsatz von Hydrazin zu molekularem Stickstoff katalysiert (Reaktion 3). Auch dieses Enzym besitzt genau wie die Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao) einen oxidativen Reaktionsmechanismus (Maalcke *et al.*, 2016). Eine weitere Gemeinsamkeit ist das Vorhandensein eines Tyrosin Cross-Links, welcher an äquivalenter Position bei der Oktahäm Hydrazin-Dehydrogenase (Hdh) des Anammox-Bakteriums *Candidatus* *Kuenenia stuttgartiensis* nachgewiesen wurde (Maalcke *et al.*, 2016; Kartal & Keltjens, 2016). Trotz alledem wurde im Gegensatz zur Hao bei diesem Enzym keine Hydroxylamin- oder Stickstoffmonoxid-Oxidase-Aktivität berichtet. Interessant ist jedoch, dass die Genome der Anammox-Bakterien *Candidatus* *K. stuttgartiensis* und *Candidatus* *Brocadia anammoxidans* bis zu 10 Hao-Paraloga aufweisen, von denen einige ebenfalls aufgrund der Anwesenheit eines Tyrosin-Rests einen Tyrosin Cross-Link besitzen könnten (de Almeida *et al.*, 2011; Kartal & Keltjens, 2016). Bei einigen dieser Hao-Paraloga wurden wiederum oxidative Enzymaktivitäten (Hydroxylamin-Oxidation zu Stickstoffmonoxid; Hydrazin-Oxidation zu Stickstoff) nachgewiesen (Schalk *et al.*, 2000; Strous *et al.*, 2006; de Almeida *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2011; Maalcke *et al.*, 2014). Es ist jedoch vorstellbar, dass aufgrund der großen Anzahl an verschiedenen Multihäm Cytochromen *c* in den Genomen der Anammox-Bakterien noch weitere, bisher unbekannte Enzymaktivitäten existieren.

2.2.3 Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase (NrfA)

Im biogeochemischen Stickstoffkreislauf nimmt das Intermediat Nitrit eine zentrale Rolle ein. Um eine Anhäufung des toxischen Nitrits zu vermeiden, wird es durch die periplasmatische Cytochrom *c* Nitritreduktase NrfA zu Ammonium reduziert (Reaktion 1). Die Nitritreduktase NrfA ist hierbei durch verschiedene Elektronentransportwege an den Chinol-Pool angebunden. In Gammaproteobakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, liegt die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase NrfA als lösliches periplasmatisches Protein vor, welches durch NrfB (Cytochrom *c*), NrfC (4Fe-4S- Untereinheit) und NrfD (Transmembranprotein) mit Elektronen aus dem Chinol-Pool versorgt wird (Simon & Klotz, 2013). In Delta- und Epsilonproteobakterien wird die Nitritreduktion zu Ammonium jedoch von dem NrfHA-Komplex katalysiert (Simon *et al.*, 2000; Simon, 2002; Rodrigues *et al.*, 2006), wobei die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase NrfA innerhalb des Komplexes die katalytische, periplasmatisch lokalisierte Untereinheit darstellt. Das Tetrahäm Cytochrom *c* NrfH ist hingegen ein membranständiges Protein, welches zur NapC/NrfH-Familie gehört (Gross *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006; Marritt *et al.*, 2012; Simon & Klotz, 2013) und die Elektronenübertragung von Menachinol zur Nitritreduktase NrfA katalysiert. Innerhalb dieser Reaktion werden sechs Elektronen übertragen (Einsle *et al.*, 2002). Das homodimere NrfA (Abb. 5) besitzt pro Monomer fünf über Thioetherbrücken mit dem Protein verknüpfte Häm-Gruppen (Einsle *et al.*, 1999). In *W. succinogenes* weist die Cytochrom *c* Nitritreduktase neben vier klassischen Häm-Bindemotiven (CXXCH) ein weiteres außergewöhnliches Motiv auf, bei dem ein Histidin durch die Aminosäure Lysin ersetzt ist (CXXCK; Häm 1 im aktiven Zentrum). Darüberhinaus gibt es jedoch auch NrfA-Proteine, die kein außergewöhnliches Häm-Bindemotiv besitzen und stattdessen fünf klassische CXXCH-Motive aufweisen (z.B. *Campylobacter* NrfA).

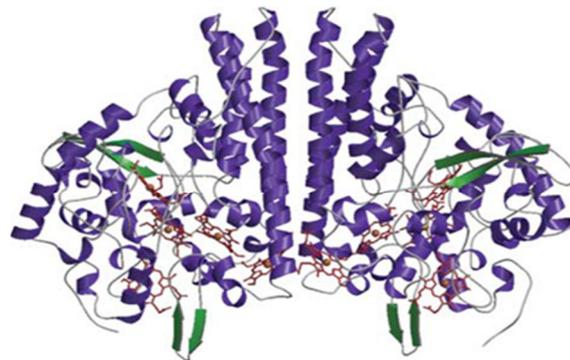


Abbildung 5: Strukturmodell der homodimeren NrfA von *Wolinella succinogenes*. Die Häm-Gruppen sind innerhalb der Struktur rot hervorgehoben (Mowat & Chapman, 2005).

2.2.4 Hydroxylamin-Oxidoreduktasen anaerober nitrat-ammonifizierender Bakterien (ϵ Hao)

Die Oktahäm Cytochrom *c* Hydroxylamin-Oxidoreduktasen (ϵ Hao) anaerober Nitrat-Ammonifizierer sind ebenfalls der Familie der Multihäm Cytochrome *c* (MCC) zugehörig. Diese Vertreter wurden bislang jedoch weder biochemisch noch enzymatisch charakterisiert. ϵ Hao-Proteine wurden seit ihrer Ersterwähnung (Kern & Simon, 2009; Campbell *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2011) in den Genomsequenzen der wirtsassoziierten Epsilonproteobakterien *Campylobacter fetus*, *Campylobacter curvus* und *Campylobacter concisus* nachgewiesen. Sie kommen jedoch auch in Tiefsee-Bakterien, wie zum Beispiel *Caminibacter mediatlanticus* und *Nautilia profundicola* vor (Kern & Simon, 2009; Campbell *et al.*, 2009). Die zuvor erwähnten fünf Organismen wurden als Nitrat-/Nitrit-Ammonifizierer beschrieben, besitzen jedoch mit Ausnahme von *C. fetus* keine Homologe der periplasmatischen Nitritreduktase NrfA. Weiterhin fehlen bei allen fünf Organismen Gene für die Nitritreduktase NirS (Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase). Aufgrund dieses Sachverhaltes wurde vermutet, dass diverse Epsilonproteobakterien über einen bisher unbekanntem Weg der Nitritverwertung verfügen. Weiterhin wurde angenommen, dass ϵ Hao-Proteine maßgeblich an diesem neuen Reaktionsweg beteiligt sein könnten.

Strukturell weisen ϵ Hao-Proteine große Identitäten (16-22 %; Kap. 7.3) zur Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao) der nitrifizierenden Bakterien (Tab. 1) und zur Hydrazin-Dehydrogenase (Hdh) der Anammox-Bakterien auf. Trotz der strukturellen Homologie, existiert dennoch ein erheblicher Unterschied. Ein wichtiges Charakteristikum innerhalb der Hao/Hdh-Struktur ist das Vorhandensein eines Tyrosin Cross-Links (P460). Der für die Ausbildung des Tyrosin Cross-Links essentielle Tyrosin-Rest fehlt jedoch an entsprechender Stelle in den ϵ Hao-Proteinen. Dies lässt die Vermutung zu, dass ϵ Hao-Proteine funktionell keine oxidativen Reaktionen katalysieren, sondern als Reduktasen fungieren.

Tabelle 1: Gemeinsamkeiten und Unterschiede von ϵ Hao-Proteinen im Vergleich zur Nitritreduktase (NrfA), Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao) und Hydrazin-Dehydrogenase (Hdh)

	NrfA	Hao	Hdh	ϵ Hao
Anzahl der Häm <i>c</i> -Gruppen	5	8	8	8
Reaktion	Reduktion $\text{NO}_2^- + 8 \text{H}^+ + 6 \text{e}^- \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	Oxidation $\text{H}_2\text{NOH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NO}_2^- + 5 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$	Oxidation $\text{N}_2\text{H}_4 \rightleftharpoons \text{N}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$	unbekannt
Strukturelle Begebenheit	Dimer	Trimer	Trimer	unbekannt
Besonderheiten bzgl. der Häm <i>c</i> -Bindung	CXXCK (Häm 1)/CXXCH	P460 (Häm 4)	P460	unbekannt

2.3 *Wolinella succinogenes*

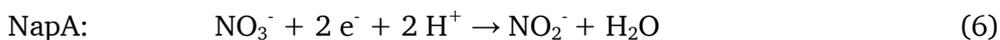
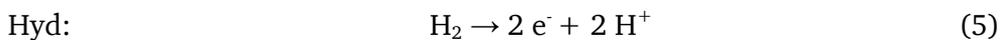
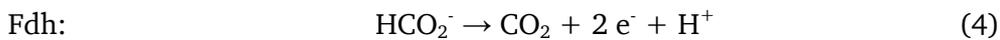
2.3.1 *W. succinogenes* als Wirts- und Modellorganismus

Das Gram-negative, nicht-fermentative Epsilonproteobakterium *W. succinogenes* wurde erstmals 1961 aus dem Pansen von Rindern isoliert, wo es kommensalisch vorkommt (Wolin *et al.*, 1961). Zugehörig zur Ordnung der Campylobacterales und Familie Helicobacteraceae weist *W. succinogenes* im Vergleich zu anderen Vertretern dieser Ordnung keine Tier- oder Humanpathogenität auf. *W. succinogenes* ist unter Verwendung der Elektronendonoren Formiat, Wasserstoff und Sulfid sowohl anaerob als auch mikroaerob kultivierbar. Als Elektronenakzeptoren fungieren die Substrate Fumarat, Nitrat, Nitrit, Sulfit, Distickstoffmonoxid, DMSO und Polysulfid (Bokranz *et al.*, 1983; Hedderich *et al.*, 1999; Kern *et al.*, 2011a; Kröger *et al.*, 2002; Lorenzen *et al.*, 1993). Die leichte Kultivierbarkeit in definierten Medien zu relativ hohen Zelldichten, die hohe Wachstumsrate sowie die genetische Manipulierbarkeit von *W. succinogenes* bedingen dessen Rolle als Modellorganismus für die anaerobe Atmung (Kern & Simon, 2011).

W. succinogenes stellt hinsichtlich der heterologen Produktion von Multihäm Cytochromen *c* eine Alternative zu dem oft verwendeten Wirtsorganismus *Escherichia coli* dar. In *E. coli* gewährleistet das Ccm-System (Cytochrom c Maturation), welches aus acht Proteinen besteht (CcmABCDEFGH), die Reifung der Cytochrome *c* (Ferguson, 2012). Das Ccm-System ist jedoch nur unter anoxischen Bedingungen aktiv, sodass die Zell- und Proteinausbeuten in *E. coli* deutlich vermindert sind. Eine aerobe Produktion von Cytochromen *c* ist jedoch unter Zuhilfenahme des Expressionsplasmids pEC86 möglich. Dieses Plasmid beinhaltet das *E. coli* eigene *ccm*-Gencluster und wird konstitutiv exprimiert (Arslan *et al.*, 1998). *W. succinogenes* besitzt hingegen das Ccs-System (Cytochrom c Synthese), welches vermutlich nur drei Proteine beinhaltet (CcsB-CcsA-Fusionsprotein, ResA, CcdA) und eine effektive und reproduzierbare Produktion von affinitätsmarkierten Multihäm Cytochromen *c* in *W. succinogenes* gewährleistet (Simon & Hederstedt, 2011; Simon & Kern, 2011; Kern *et al.*, 2010).

2.3.2 Respiratorische Nitrat-Ammonifikation von *W. succinogenes*

Die respiratorische Nitrat-Ammonifikation ist ein wesentlicher dissimilatorischer Prozess des biogeochemischen Stickstoffkreislaufes, welcher unter anaeroben Bedingungen erfolgt. Innerhalb der anaeroben Atmung wird der Elektronenakzeptor Nitrat (NO_3^-) schrittweise über das Intermediat Nitrit (NO_2^-) zu Ammonium (NH_4^+) reduziert. Als Elektronendonatoren fungieren sowohl organische als auch anorganische Verbindungen. Für die vollständige Reduktion von einem Molekül Nitrat zu Ammonium werden acht Elektronen benötigt. Diese können in *W. succinogenes* durch die Oxidation von vier Molekülen Formiat oder Wasserstoff bereitgestellt werden (Reaktion 1 und 4-6).



Die Reduktion des Elektronenakzeptors Nitrat wird von periplasmatischen und Membran-gebundenen Nitratreduktasen katalysiert. Das Vorkommen dieser Enzyme ist in ammonifizierenden Bakterien variabel. Während *W. succinogenes* und andere Epsilonproteobakterien lediglich die periplasmatische Nitratreduktase NapA besitzen, verfügt der Organismus *E. coli* neben dem periplasmatischen Enzym zusätzlich über den membrangebundenen NarGHI-Komplex. Die enzymatische Ausstattung hinsichtlich der terminalen Nitratreduktasen wurde in *W. succinogenes* experimentell verifiziert. Eine Deletion des Gens *napA* resultierte in der Unfähigkeit des entsprechenden Stammes durch Nitratatmung zu wachsen (Simon *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis bestätigt, dass *W. succinogenes* im Gegensatz zum Modellorganismus *E. coli* tatsächlich nur eine Nitratreduktase besitzt. Durch die Sequenzierung des Genoms von *W. succinogenes* im Jahr 2003 wurde die Abwesenheit von Genen gezeigt, die für membrangebundene oder assimilatorische Nitratreduktasen kodieren (Baar *et al.*, 2003).

Die periplasmatische Nitratreduktase von *W. succinogenes* wird durch das *nap*-Gencluster kodiert, welches aus insgesamt sieben Einzelgenen (*napAGHBFLD*) besteht (Simon *et al.*, 2003). Dabei wird die Nitratreduktion zu Nitrit vom löslichen NapAB-Komplex katalysiert (Kern & Simon, 2008; Abb. 6A). Die dafür benötigten Elektronen werden vermutlich über die Proteine NapG und NapH bereitgestellt, welche den Elektronentransport vom Menachinol zum NapAB-Komplex vermitteln. Die nachfolgende Nitritreduktion zu Ammonium wird vom NrfHA-Komplex katalysiert (Abb. 6B). Der Elektronentransport vom Menachinol zur periplasmatischen Cytochrom *c* Nitritreduktase NrfA erfolgt hierbei durch das Membran-assoziierte Protein NrfH (Simon *et al.*,

2000). Wie oben beschrieben, besitzt der NrfHA-Komplex neben seiner Funktion innerhalb der Nitritreduktion auch eine bedeutende Rolle in der Detoxifikation reaktiver Stickstoff-Sauerstoff-Spezies (Kern *et al.*, 2011b). Nach Durchführung von Hemmhoftests wurde eine Beteiligung des NrfHA-Komplexes bei der NO-Stressabwehr nachgewiesen (Kern *et al.*, 2011b). Die potenziellen Endprodukte dieser Reaktion wurden jedoch bisher nicht identifiziert. Für die Nitritreduktase aus *Sulfurospirillum deleyianum* konnte jedoch experimentell gezeigt werden, dass bei der NO-Detoxifikation Ammonium als Produkt gebildet wird (Stach *et al.*, 2000).

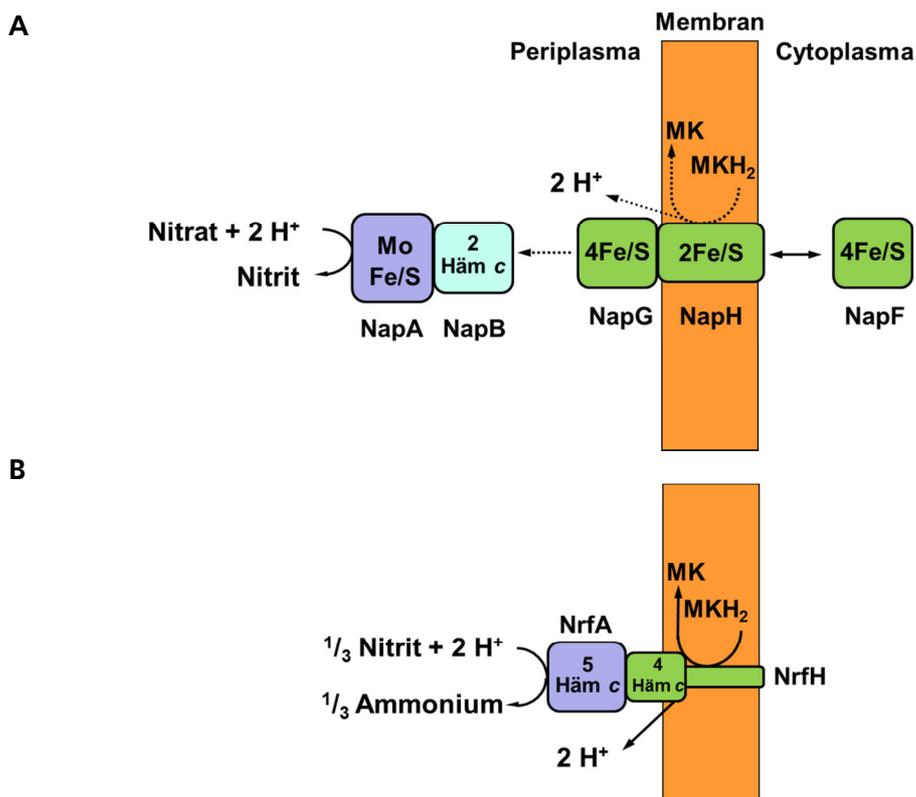


Abbildung 6: Nitrat-Ammonifikation im Modellorganismus *Wolinella succinogenes*. (A) Periplasmatische Nitratreduktion in *W. succinogenes*; (B) Nitritreduktion zu Ammonium mit Hilfe des Cytochrom *c* Nitritreduktase-Komplexes NrfHA. Hypothetische Reaktionswege wurden mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. MK: Menachinon, MKH₂: Menachinol (modifiziert nach Kern & Simon, 2009).

2.4 Ziele der Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die heterologe Produktion diverser epsilonproteobakterieller Hydroxylamin-Oxidoreduktasen (ϵ Hao) im Wirtsorganismus *Wolinella succinogenes*. Die auf diesem Wege produzierten Proteine sollten nachfolgend mittels Affinitätschromatographie gereinigt und hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten charakterisiert werden. Innerhalb der Enzymaktivitätsmessungen sollten sowohl die im Stickstoffkreislauf vorkommenden Stickstoffverbindungen Nitrit und Hydroxylamin als auch die Moleküle Sulfid und Hydrazin als potenzielle Substrate untersucht werden. Anhand der ermittelten spezifischen Aktivitäten und Substrataffinitäten sollten im Vergleich zu bereits untersuchten und charakterisierten Enzymen (*W. succinogenes* NrfA; *Nitrosomonas europaea* Hao) Rückschlüsse auf eine mögliche biologische Funktion der epsilonproteobakteriellen Hydroxylamin-Oxidoreduktasen gezogen werden. Zusätzlich sollte anhand der vorliegenden Daten ein Modell zur Funktionalität der ϵ Hao-Proteine unter Einbeziehung möglicher Elektronentransferwege erstellt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die ortsgerichtete Veränderung der Hydroxylamin-Oxidoreduktasen von *Campylobacter curvus* (CcuHao), *Campylobacter fetus* (CfHao) und *Caminibacter mediatlanticus* (CmHao). Diese Proteine besitzen im Gegensatz zur *Nitrosomonas europaea* Hao (NeHao) keinen Tyrosin-Rest im aktiven Zentrum, welcher für die Ausbildung des kritischen Tyrosin Cross-Links P460 essentiell ist und eine Trimerisierung der NeHao bedingt. Mittels ortsgerichteter Mutagenese sollte ein Tyrosin-Rest in die *haoA*-Gene von *C. curvus*, *C. fetus* und *C. mediatlanticus* an äquivalenten Positionen eingebracht werden. Nachfolgend sollten die Proteine hinsichtlich der Ausbildung eines Häm P460, einer Trimerisierung und Veränderungen der Reaktivitäten sowie Enzymaktivitäten überprüft werden.

Auch das Vorkommen, die Lage der entsprechenden Gene im Genom sowie die Diversität der Hydroxylamin-Oxidoreduktasen (ϵ Hao) sollten mit Hilfe von bioinformatischen Analysen untersucht werden. Die konservierte Anordnung der Häm-Gruppen, die Sequenzhomologie zur Hao sowie eine mögliche funktionelle Ähnlichkeit zu NrfA-Proteinen lassen die Hypothese zu, dass ϵ Hao-Proteine möglicherweise einen "missing link" innerhalb der NrfA- und Hao-Evolution darstellen. Anhand der neu generierten bioinformatischen Daten und biochemischen Charakterisierungen sollte die evolutionäre Rolle der ϵ Hao-Proteine innerhalb der Multihäm Cytochrom c Evolution bestimmt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Hersteller sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Lösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Albumin Fraktion biotinfrei	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Benzylviologen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BHI (Brain Heart Infusion)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BHI-Agar	Fluka Analytical (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
BisTris	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
4-Chloro-1-naphthol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dianisidin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR, Darmstadt
DNaseI	VWR, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 % vergällt (v/v)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96 % vergällt (v/v)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid-Lösung	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Fumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guanidin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hydroxylammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumnitrit	Fluka Analytical (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
LB (Lennox)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB-Agar (Lennox)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Maltose Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methylviologen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-(1-Naphthyl)- ethylendiamindihydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcitrat tribasisch Dihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumformiat	Fluka Analytical (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumsalicylat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Chemikalie	Hersteller
Neßlers Reagenz	Merck, Darmstadt
PMS (Phenazinmethosulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
8-Quinolinol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sulfanilamid	Fluka Analytical (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	VWR, Darmstadt

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller sind in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-His-HRP	Roth, Karlsruhe
ColorPlus™ Prestained Protein Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Crimson Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HisTrap excel Affinitätssäule	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
MBPTrap HP Affinitätssäule	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
OneTaq® DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PfuUltra II Fusion HotStart DNA Polymerase	Agilent Technologies, Frankfurt am Main
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main

<i>Strep</i> MAB-Classic, HRP conjugate	IBA, Göttingen
<i>Strep</i> -Tactin®-HRP conjugate	IBA, Göttingen
<i>Strep</i> -Tactin® Superflow® Affinitätssäule	IBA, Göttingen
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), MAGV (Rabenau-Londorf) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

3.2 Verwendete Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

3.2.1 Organismen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verwendete Mikroorganismen

Bezeichnung	Charakteristika (Genotyp, Eigenschaften)	Referenz
<i>W. succinogenes</i> DSM 1740	Wildstamm	DSMZ
<i>W. succinogenes napA::cat</i>	Insertion von Cm ^R anstelle von <i>napA</i>	Melanie Kern, unveröffentlicht
<i>W. succinogenes</i> MK-CmHao <i>kan napA::cat</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Caminibacter mediatlanticus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> MK1-CmHao <i>kan napA::cat</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Caminibacter mediatlanticus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , C-terminaler <i>Strep</i> -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> MK1-NStrep- CmHao <i>kan napA::cat</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Caminibacter mediatlanticus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , C- und N- terminaler <i>Strep</i> -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> MK2-CmHao <i>kan napA::cat</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Caminibacter mediatlanticus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , doppelter C-terminaler <i>Strep</i> -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit

Bezeichnung	Charakteristika (Genotyp, Eigenschaften)	Referenz
<i>W. succinogenes</i> MK9-CmHao <i>kan napA::cat</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Caminibacter mediatlanticus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , C-terminaler His ₆ -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> CmHao-MBP <i>kan</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Caminibacter mediatlanticus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , CmHao besitzt am C-Terminus eine TEV-Erkennungssequenz, das Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einen His ₆ -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> CmHao_V450Y-MBP <i>kan</i>	Derivat des Stammes CmHao-MBP <i>kan</i> , Einfügen des Aminosäureaustausches V450Y, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> CmHao_W464Y-MBP <i>kan</i>	Derivat des Stammes CmHao-MBP <i>kan</i> , Einfügen des Aminosäureaustausches W464Y, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> MK-CcuHao <i>kan napA::cat</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Campylobacter curvus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> MK1-CcuHao <i>kan napA::cat</i>	Austausch von <i>W. succinogenes nrfA</i> gegen <i>haoA</i> von <i>Campylobacter curvus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , C-terminaler Strep-Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> CcuHao-MBP <i>kan</i>	Austausch des <i>nrfA</i> Gens gegen die <i>haoA</i> von <i>Campylobacter curvus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , CcuHao besitzt am C-Terminus eine TEV-Erkennungssequenz, das Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einen His ₆ -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> CcuHao_V414Y-MBP <i>kan</i>	Derivat des Stammes CcuHao-MBP <i>kan</i> , Einfügen des Aminosäureaustausches V414Y, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> CcuHao_W428Y-MBP <i>kan</i>	Derivat des Stammes CcuHao-MBP <i>kan</i> , Einfügen des Aminosäureaustausches W428Y, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> CfHao-MBP <i>kan</i>	Austausch des <i>nrfA</i> Gens gegen die <i>haoA</i> von <i>Campylobacter fetus</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , CfHao besitzt am C-Terminus eine TEV-Erkennungssequenz, das Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einen His ₆ -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit

Bezeichnung	Charakteristika (Genotyp, Eigenschaften)	Referenz
<i>W. succinogenes</i> <i>CfHao_V422Y-MBP kan</i>	Derivat des Stammes <i>CfHao-MBP kan</i> , Einfügen des Aminosäureaustausches V422Y, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> <i>CfHao_W434Y-MBP kan</i>	Derivat des Stammes <i>CfHao-MBP kan</i> , Einfügen des Aminosäureaustausches W434Y, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> <i>NpHao-MBP kan</i>	Austausch des <i>nrfA</i> Gens gegen die <i>haoA</i> von <i>Nautilia profundicola</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , <i>NpHao</i> besitzt am C-Terminus eine TEV-Erkennungssequenz, das Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einen His ₆ -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> <i>NeHao-MBP kan</i>	Austausch des <i>nrfA</i> Gens gegen die <i>haoA</i> von <i>Nitrosomonas europaea</i> im Stamm <i>W. succinogenes napA::cat</i> , <i>NeHao</i> besitzt am C-Terminus eine TEV-Erkennungssequenz, das Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einen His ₆ -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> <i>NeHao_Y467V-MBP kan</i>	Derivat des Stammes <i>NeHao-MBP kan</i> , Einfügen des Aminosäureaustausches V467Y, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>W. succinogenes</i> <i>WsNrfA-MBP kan</i>	Modifikation des <i>W. succinogenes nrfA</i> Gens durch Einbringen einer TEV-Erkennungssequenz, des Maltose-Binde-Proteins und einem His ₆ -Tag, Cm ^R , Km ^R	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ ΔlacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	Agilent Technologies

3.2.2 Plasmide

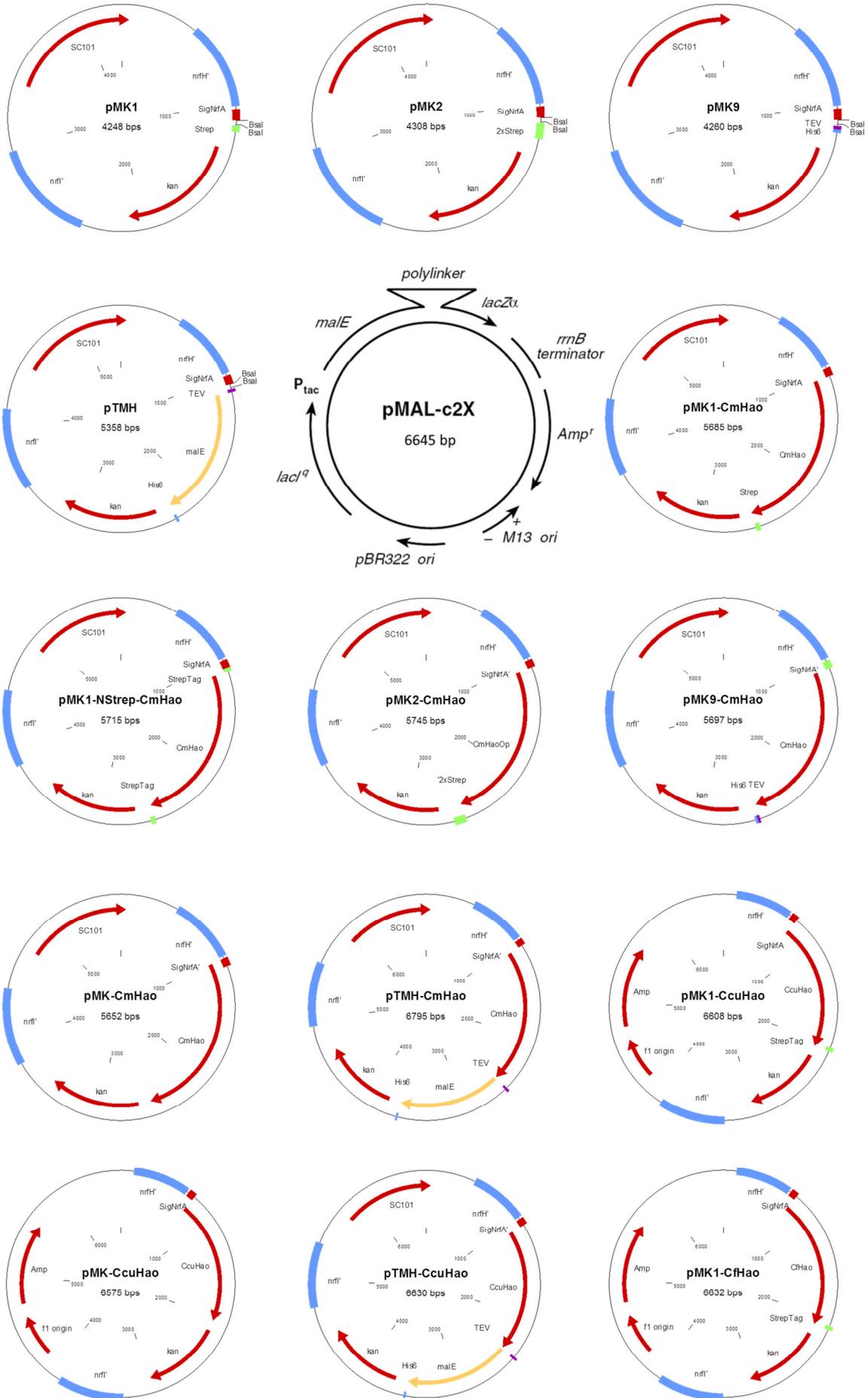
Ausgehend von den zur Verfügung gestellten Plasmiden pMK1 und pMK2 wurden zahlreiche Derivate erstellt (Abb. 7). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Merkmale	Referenz
pMK1	<i>W. succinogenes</i> Expressionsvektor zur genomischen Integration, nativer <i>nrf</i> -Promotor, C-terminaler <i>Strep</i> -Tag, Km ^R	Melanie Kern, unveröffentlicht
pMK2	<i>W. succinogenes</i> Expressionsvektor zur genomischen Integration, nativer <i>nrf</i> -Promotor, doppelter C-terminaler <i>Strep</i> -Tag, Km ^R	Kern & Simon, 2011
pMK9	<i>W. succinogenes</i> Expressionsvektor zur genomischen Integration, nativer <i>nrf</i> -Promotor, C-terminaler His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH	<i>W. succinogenes</i> Expressionsvektor zur genomischen Integration, nativer <i>nrf</i> -Promotor, C-terminale TEV-Erkennungssequenz, Maltose-Binde-Protein (MBP), His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pMAL-c2X	<i>E. coli</i> Expressionsvektor zur cytoplasmatischen Expression von MBP-Fusionsproteinen, <i>tac</i> -Promotor, <i>malE</i> , Faktor Xa, <i>lacZα</i> , <i>lacI^q</i> , pBR322, Amp ^R	New England Biolabs
pMK1-CmHao	<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i> mit C-terminalem <i>Strep</i> -Tag, Km ^R	Melanie Kern, unveröffentlicht
pMK1-NStrep-CmHao	<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i> mit C- und N-terminalem <i>Strep</i> -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pMK2-CmHao	<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i> mit doppeltem C-terminalem <i>Strep</i> -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pMK9-CmHao	<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i> mit C-terminalem His-Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pMK-CmHao	<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i> ohne Affinitäts-Tag, Km ^R	Diese Arbeit

Plasmid	Merkmale	Referenz
pTMH-CmHao	<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i> mit C-terminaler TEV-Erkennungssequenz, dem Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einem His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-CmHao_V450Y	Derivat von pTMH-CmHao mit eingefügter Mutation für den Aminosäureaustausch V450Y, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-CmHao_W464Y	Derivat von pTMH-CmHao mit eingefügter Mutation für den Aminosäureaustausch W464Y, Km ^R	Diese Arbeit
pMK1-CcuHao	<i>haoA</i> aus <i>C. curvus</i> mit C-terminalem Strep-Tag , Km ^R	Melanie Kern, unveröffentlicht
pMK-CcuHao	<i>haoA</i> aus <i>C. curvus</i> ohne Affinitäts-Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-CcuHao	<i>haoA</i> aus <i>C. curvus</i> mit C-terminaler TEV-Erkennungssequenz, Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einem His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-CcuHao_V414Y	Derivat von pTMH-CcuHao mit eingefügter Mutation für den Aminosäureaustausch V414Y, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-CcuHao_W428Y	Derivat von pTMH-CcuHao mit eingefügter Mutation für den Aminosäureaustausch W428Y, Km ^R	Diese Arbeit
pMK1-CfHao	<i>haoA</i> aus <i>C. fetus</i> mit C-terminalem Strep-Tag , Km ^R	Melanie Kern, unveröffentlicht
pTMH-CfHao	<i>haoA</i> aus <i>C. fetus</i> mit C-terminaler TEV-Erkennungssequenz, Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einem His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-CfHao_V422Y	Derivat von pTMH-CfHao mit eingefügter Mutation für den Aminosäureaustausch V422Y, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-CfHao_W434Y	Derivat von pTMH-CfHao mit eingefügter Mutation für den Aminosäureaustausch W434Y, Km ^R	Diese Arbeit
pMK1-NpHao	<i>haoA</i> aus <i>N. profundicola</i> mit C-terminalem Strep-Tag , Km ^R	Melanie Kern, unveröffentlicht

Plasmid	Merkmale	Referenz
pTMH-NpHao	<i>haoA</i> aus <i>N. profundicola</i> mit C-terminaler TEV-Erkennungs-sequenz, Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einem His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pMK1-NeHao	<i>haoA</i> aus <i>N. europaea</i> mit C-terminalem <i>Strep</i> -Tag , Km ^R	Melanie Kern, unveröffentlicht
pTMH-NeHao	<i>haoA</i> aus <i>N. europaea</i> mit C-terminaler TEV-Erkennungs-sequenz, Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einem His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-NeHao_Y467V	Derivat von pTMH-NeHao mit eingefügter Mutation für den Aminosäureaustausch Y467V, Km ^R	Diese Arbeit
pTMH-WsNrfA	<i>nrfA</i> aus <i>W. succinogenes</i> mit C-terminaler TEV-Erkennungs-sequenz, Maltose-Binde-Protein (MBP) sowie einem His ₆ -Tag, Km ^R	Diese Arbeit



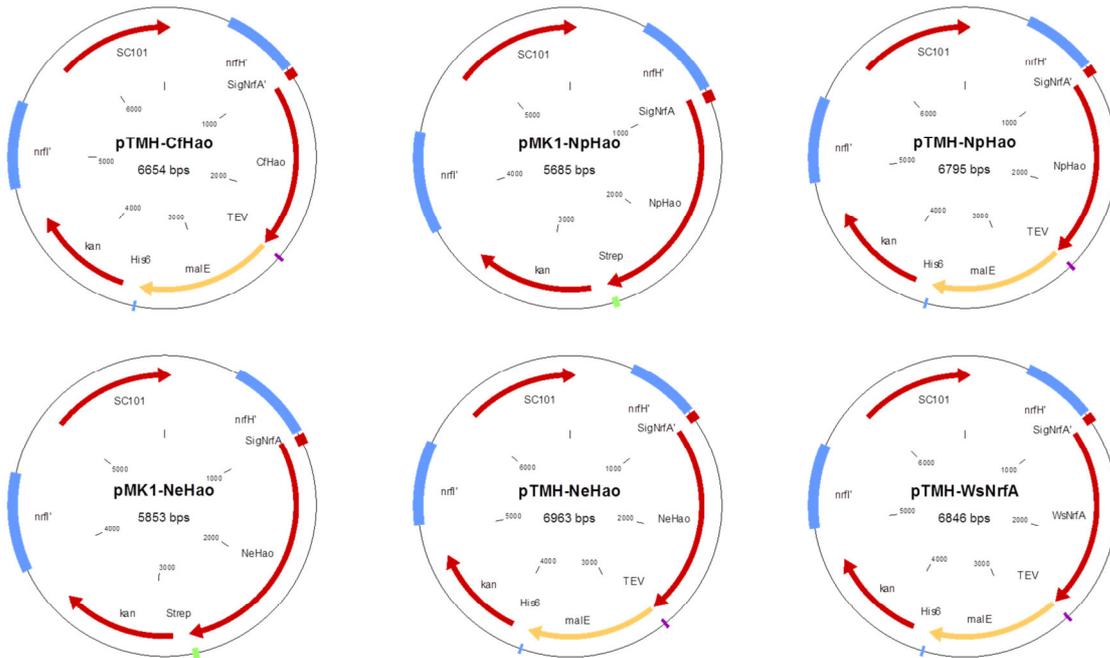


Abbildung 7: Karten aller in Tabelle 4 aufgeführten Plasmide. Die Erstellung erfolgte mit dem Programm Clone Manager Professional Version 9. Die Vektorkarte des Expressionsplasmids pMAL-c2X wurde von der Firma New England Biolabs übernommen.

3.2.3 Oligonukleotide

Die zur Amplifikation und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Primersequenzen

(eingefügte Mutationen sind unterstrichen dargestellt; *Bsa*I-Schnittstellen sind mit einer Umrandung gekennzeichnet)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	T _m [°C]
nrfA-3'	CTCAATGATTCTAGGAACATCAGAG	Nachweis des <i>nrfA</i> -Fragments	60,0
nrfA-5'	GGCTGGATATCCCTTCTCTAAGGAC	Nachweis des <i>nrfA</i> -Fragments	65,0
PCR755	GCCCTCTAGTGTGAAGTTATTTGAC	Nachweis des <i>haoA</i> -Inserts	63,0
Ycf-24	CGAGGTTGTGCGTGAAGCG	Nachweis des <i>haoA</i> -Inserts	66,0
SeqMK-F	CCGAAGTCTAACCGCCACAC	Sequenzierprimer	65,0
SeqMK-R	GCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATG	Sequenzierprimer	61,0

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	T _m [°C]
BsaICmHaoOp-F	ATGGTA GGTCTC ACGCGGCTAATAGC CTCGATAGCAATC	Amplifizierung der <i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i>	76,0
BsaICmHaoOp-R	ATGGTA GGTCTC CGCGCTCTCGTGGG TCACCAC	Amplifizierung der <i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i>	79,0
Cm ohne Tag_F	TAAGGATCCAAAGCCACGTTGTG	Entfernung des doppelten <i>Strep</i> -Tags aus dem Plasmid pMK2-CmHao	68,8
Cm ohne Tag_R	CTCGTGGGTCACCACGGGC	Entfernung des doppelten <i>Strep</i> -Tags aus dem Plasmid pMK2-CmHao	73,7
pMK-CcuHao_R	GTGGGCTTTCCGCTCTCG	Entfernung des <i>Strep</i> -Tags aus dem Plasmid pMK1-CcuHao	69,3
CmHao-NStrep-F	TGGAGCCATCCCAATTTGAGAAGGC GAGCGCTAATAGCCTCGATAGCAATC C	Einfügen eines N-terminalen <i>Strep</i> -Tags in das Plasmid pMK1-CmHao	89,1
NStrep-R	CGCGAGTAACCCCATAGAGACG	Einfügen eines N-terminalen <i>Strep</i> -Tags in das Plasmid pMK1-CmHao	68,6
N-Strep	CGCCTTCTCAAATTGGG	Nachweis des N-terminalen <i>Strep</i> -Tags	61,8
pMK9-F	TAAGGATCCAAAGCCACGTTGTGTC	Konstruktion des Plasmids pMK9; Entfernung des doppelten <i>Strep</i> -Tags aus dem Plasmid pMK2	70,5

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	T _m [°C]
pMK9-R	GTGATGGTGTGATGGTGTGATGCCCTGGA AGTACAGGTTTTCCGCGCTGAGACCA TG	Konstruktion des Plasmids pMK9; Einfügen einer TEV- Protease Erkennungssequenz und eines (His) ₆ - Tags	90,7
malE-F	AAAATCGAAGAAGGTAAACTGGTAAT CTGGATTAACGGCGATAAAGGCTATA ACGGTCTGGCTGAAGTCGGTAAGAAA TTCGAGAAAGATACC	Amplifikation von <i>malE</i> aus dem Plasmid pMal-c2x	87,3
malE-R	AGTCTGCGCGTCTTTCAGGGCTTCAT CG	Amplifikation von <i>malE</i> aus dem Plasmid pMal-c2x	79,3
MK9-F	CATCACCATCACCATCACTAAGGATC CAAAG	Konstruktion des Plasmids pTMH; Linearisierung des Vektor pMK9	74,0
MK9-R	TCCCTGGAAGTACAGGTTTTCCGCGC TGAGAC	Konstruktion des Plasmids pTMH; Linearisierung des Vektor pMK9	80,4
BsaI _{NeHaoOp} -F	ATGGTAGGTCTCACGCGGATATCAGC ACCGTGCCCGATG	Amplifizierung der <i>hao</i> aus <i>N. europaea</i>	80,0
BsaI _{NeHaoOp} -R	ATGGTAGGTCTCACGCGGATATCAGC ACCGTGCCCGATG	Amplifizierung der <i>hao</i> aus <i>N. europaea</i>	79,0
BsaI-CfHao-F2	ATGGTAGGTCTCACGCGGATAGCGTG GGAAATATCAATCTC	Amplifizierung der <i>haoA</i> aus <i>C. fetus</i>	75,0
BsaI-CfHao-R	ATGGTAGGTCTCCGCGCTCTCGATTT TTCCGCTTTTGATTTCG	Amplifizierung der <i>haoA</i> aus <i>C. fetus</i>	77,0
NrfA-F	ATGGTAGGTCTCACGCGATGACAAAA TTCAAGTTGTTACTTGCGGGATCAC	Amplifizierung der <i>nrfA</i> aus <i>W. succinogenes</i>	78,0
NrfA-R	ATGGTAGGTCTCCGCGCTTTTTTTGG TTTTATCGTAGTAAGAAGACTTCTCA TCCACTCC	Amplifizierung der <i>nrfA</i> aus <i>W. succinogenes</i>	78,0
BsaI _{CcuHaoOp} -F	ATGGTAGGTCTCACGCGACCGATGGA AATAAAACCGAGGCCATC	Amplifizierung der <i>haoA</i> aus <i>C. curvus</i>	86,1

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	T _m [°C]
BsaIccuHaoOp-R	ATGGTA <u>GGTCTC</u> CGCGCTGTGGGCTT TTCCGCTCTCGATGCGC	Amplifizierung der <i>haoA</i> aus <i>C. curvus</i>	91,4
TEV_malE_F	CCTGTACTTCCAGGGAAAAATCGAAG AAGGTAAAC	Konstruktion des Plasmids pTMH	73,9
TEV_malE_R	GTTTACCTTCTTCGATTTTTCCCTGGA AGTACAGG	Konstruktion des Plasmids pTMH	73,9
TEV-R	TCCCTGGAAGTACAGGTTTTCCG	Entfernung eines doppelt eingebauten <i>malE</i> Gens aus dem Vektor pTMH	66,0
Ccu1928	GCTTCGCACCAAAGGATATG	Sequenzierprimer	64,4
CM1613	CCACGGAACCATCATCAAAC	Sequenzierprimer	65,2
Ne_intern-F	ACACCCGACACGAGTTTAGC	Sequenzierprimer	64,0
CF1617	AATGCCTATCCCGATGGAAG	Sequenzierprimer	61,0
NpHao_intern-F	TATCCCGATGGCGGAGTGAG	Sequenzierprimer	65,0
Ccu_V414Y_F	CACGGCGTGTTTGAGTACAAAAATGA TATCCGC	Mutagenese-Primer	71,0
Ccu_V414Y_R	GCGGATATCATTTTTGTACTCAAACA CGCCGTG	Mutagenese-Primer	71,0
Ccu_W-Y_F	CCCGATTATAGCCACTACCACGGCGT GTTTGAG	Mutagenese-Primer	74,0
Ccu_W-Y_R	CTCAAACACGCCGTGGTAGTGGCTAT AATCGGG	Mutagenese-Primer	74,0
CfHao_V422Y-F	CACGGCGTGTTTGAGTACCAACAAGA TATC	Mutagenese-Primer	69,0
CfHao_V422Y-R	GATATCTTGTTGGTACTCAAACACGC CGTG	Mutagenese-Primer	69,0
Cf_W-Y_F	CCTGATTATGCCACTACCACGGCGT GTTTGAG	Mutagenese-Primer	74,0
Cf_W-Y_R	CTCAAACACGCCGTGGTAGTGGGCAT AATCAGG	Mutagenese-Primer	74,0
CM_V450Y_F	CACGGCGTGTTTCAATACATGCAAGA TATCCGC	Mutagenese-Primer	72,0
CM_V450Y_R	GCGGATATCTTGCATGTATTGAAACA CGCCGTG	Mutagenese-Primer	72,0

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	T _m [°C]
Cm_W-Y_F	CCTGATTATGCCC <u>ACT</u> ACCACGGCGT GTTTCAAG	Mutagenese-Primer	74,0
Cm_W-Y_R	CTTGAAACACGCCGTGGT <u>AGT</u> GGGCA TAATCAGG	Mutagenese-Primer	74,0
NeHao_mut-F2	CTGGCGGATGGACCGT <u>G</u> ACCGAG	Mutagenese-Primer	73,0
NeHao_mut-R2	GATTCACGTGGGCGAGTCC	Mutagenese-Primer	65,0

3.3 Medien und Medienzusätze

3.3.1 Nährmedium für die Kultivierung von *Wolinella succinogenes*

Die Zusammensetzungen des Formiat/Fumarat-Mediums und Formiat/Fumarat-Agars, welche für die Kultivierung von *W. succinogenes* verwendet wurden, sind nachfolgend aufgelistet.

Formiat/Fumarat-Medium (1-fach konzentriert)

Tris	50 mM
Fumarsäure	90 mM
Natriumformiat	100 mM
K ₂ HPO ₄	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM
NH ₄ Cl	5 mM
Natriumacetat	20 mM
Glutamat	1 mM
MgCl ₂ *	1 mM
CaCl ₂ *	0,2 mM
KOH	200 mM
Spurenelementlösung	2 ml/l
pH 7,9-8,0	

* Zugabe erfolgte vor dem Autoklavieren aus einer 1000-fachen Ca/Mg-Stammlösung

Formiat/Fumarat-Agar

Formiat/Fumarat-Medium(10x)	5,0 ml
BHI-Agar (2,6 %, w/v)	1,3 g
Ca/Mg-Stammlösung (1000x)	0,05 ml
ad 50 ml H ₂ O bidest.	

Der Formiat/Fumarat-Agar wurde vor dem Gebrauch anaerobisiert und anschließend 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Formiat/Fumarat-Flüssigmedium

Formiat/Fumarat-Medium(10x)	25,0 ml
BHI	0,1 – 0,5 % (w/v)
Ca/Mg-Stammlösung (1000x)	0,25 ml
<hr/>	
ad 250 ml H ₂ O bidest.	

Das Formiat/Fumarat-Flüssigmedium wurde vor dem Gebrauch anaerobisiert und anschließend 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

3.3.2 Medienzusätze

Spurenelementelösung SL8 (Pfennig & Trüper, 1981)

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	5,2 g
FeCl ₂	1,5 g
ZnCl ₂	70 mg
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	62 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	17 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg
<hr/>	
ad 1000 ml H ₂ O bidest.	

Die Spurenelementelösung wurde vor dem Gebrauch sterilfiltriert.

Ca/Mg-Stammlösung (1000-fach konzentriert)

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,74 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,1 g
<hr/>	
ad 100 ml H ₂ O bidest.	

Lösung wurde bei 121 °C 20 Minuten autoklaviert.

3.3.3 Nährmedien für die Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Herstellung des LB-Mediums und LB-Agars, welche für die Kultivierung von *E. coli* verwendet wurden, ist nachfolgend aufgeführt.

LB-Medium (Lennox)

20 g LB-Fertigmedium wurden in 1 l H₂O bidest. gelöst und anschließend 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

LB-Agar (Lennox)

35 g LB-Agar wurden in 1 l H₂O bidest. gelöst und anschließend 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

3.3.4 Antibiotika

Zur selektiven Kultivierung der Mikroorganismen wurden die Medien mit Antibiotika versetzt. Die Konzentrationen der Antibiotika-Stammlösungen sowie die Endkonzentrationen in den Medien sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Konzentration der Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium (<i>W. succinogenes</i>)	Endkonzentration im Medium (<i>E. coli</i>)
Kanamycin	5 g/l	25 mg/l	50 mg/l
Chloramphenicol	2,5 g/l	12,5 mg/l	34 mg/l

3.4 Kultivierungsbedingungen von Bakterien

3.4.1 Zellzucht von *Wolinella succinogenes*

Die Kultivierung von *W. succinogenes* Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen mit Formiat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenakzeptor. Zur Zellzucht wurden luftdicht verschlossene Hungate-Röhrchen (10 ml), Müller-Krempel-Flaschen (800 ml) oder Enghals-Standflaschen (10 l) genutzt. Das zur Kultivierung verwendete Formiat/Fumarat-Medium wurde je nach Kulturvolumen mit 0,5 % (w/v) BHI (100-500 ml Ansätze) bzw. 0,1 % (w/v) BHI (10 l Ansätze) supplementiert. Um ideale Wachstumsbedingungen für *W. succinogenes* Zellen zu schaffen, wurden alle Medien insgesamt dreimal für 10 Minuten mittels alternierendem Evakuieren durch eine Vakuumpumpe und Begasen mit molekularem Stickstoff anaerobisiert und nachfolgend bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika und die Inokulation der Medien erfolgten mit Hilfe steriler Einwegspritzen. Flüssigkulturen wurden nach

der Inokulation bis zu 16 h stehend bei 37 °C inkubiert. Transformierte Zellen wurden hingegen in Weichagar (2,6 % BHI-Agar, w/v) eingegossen und wenigstens zwei Tage bei 37 °C in Anaerobentöpfen inkubiert. Zur Selektion von Transformanden wurden die Medien nach Bedarf mit Chloramphenicol und Kanamycin versetzt.

3.4.2 Zellzucht von *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* Zellen wurde LB-Medium verwendet, welches nach dem Autoklavieren mit Kanamycin und/oder Chloramphenicol versetzt wurde. Die Zellzucht von *E. coli* erfolgte unter aeroben Bedingungen in geeigneten Kulturgefäßen. Flüssigkulturen (50-100 ml) wurden nach der Inokulation bis zu 16 h schüttelnd (Kreisschüttler KS 501 digital, IKA Labortechnik) bei 160 rpm und 37 °C inkubiert. Transformierte Zellen und Vereinzelungsausstriche wurden auf festen Nährböden kultiviert und bis zu 24 h bei 37 °C inkubiert.

3.4.3 Bestimmung der Zelldichte durch Photometrie

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch photometrische Messung (Spectrophotometer GENESYS™ 10S UV-VIS, Thermo Scientific) der optischen Dichte bei 578 nm (*W. succinogenes*) und 600 nm (*E. coli*). Als Leerwert wurde Medium verwendet.

3.4.4 Zellernte

W. succinogenes Kulturen (10 l Ansätze) wurden in der stationären Wachstumsphase durch Tangentialfiltration (Pellicon® 2 Cassette, Merck Millipore) konzentriert. Die Zellsuspensionen wurden dafür mit einer Pumpe angesaugt und über einen Filter mit definierter Porengröße (0,45 µm) weitergeleitet. Die Zellen gelangten nachfolgend zurück in die 10 l Enghals-Standflasche während das filtrierte Medium abgelassen wurde. Danach wurden die Zellen 10 Minuten bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 6-16KS, Sigma-Aldrich). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 30 ml Äquilibrierungspuffer (20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM DTT; pH 7,4) pro 10 l Ausgangskultur sowie einer Spatelspitze DNaseI resuspendiert.

3.4.5 Zellaufschluss mittels French Press und Zellfraktionierung

Die resuspendierten *W. succinogenes* Zellen (30-100 ml) wurden mit Hilfe der French Press (SLM Aminco) bei einem Druck von 1.200 bar aufgeschlossen. Durch eine 60-minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 38.000 rpm (Ultrazentrifuge XL-100K, Beckmann Optima, Rotor 45 Ti) wurde das Zellhomogenat in lösliche Fraktion und Membranfraktion getrennt. Die lösliche Fraktion wurde nachfolgend direkt für die Proteinreinigung verwendet. Die Membranfraktion wurde bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis & Faloona, 1987) diente zur Amplifikation von DNA-Fragmenten und zur Verifizierung von Transformanden. Die PCR-Reaktionen wurden je nach Größe und Verwendung des Amplifikats mit der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), der Crimson Taq Polymerase (New England Biolabs), der One Taq Polymerase (New England Biolabs) oder der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies) in einem Thermocycler (Professional TRIO Thermocycler, Biometra) durchgeführt.

Die Charakterisierung von Transformanden erfolgte mittels Kolonie-PCR. Dafür wurden 50 μl einer *W. succinogenes*- oder *E. coli*-Kultur 5 Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 50 μl Aqua dest. resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Für die Kolonie-PCR wurde 1 μl dieser Suspension als Template-DNA eingesetzt. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte mit der Crimson Taq Polymerase und der One Taq Polymerase. In Tabelle 8 ist die Zusammensetzung für einen Standardansatz aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes unter Verwendung der Crimson Taq Polymerase oder One Taq Polymerase

Komponenten	Crimson Taq Polymerase /One Taq Polymerase
10 μM Primer	je 0,5 μl
10 mM dNTP	0,5 μl
Puffer	5,0 μl
Polymerase	0,125 μl (\cong 1,25 U/50 μl PCR)
Template-DNA	1,0 μl
Aqua dest.	17,375 μl
Reaktionsvolumen	25 μl

Die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	30 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	45-68 °C	1 min	
Extension	68 °C	1 min/kb	
Finale Extension	68 °C	5 min	

Für Plasmidkonstruktionen wurde die Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase verwendet, welche eine Proofreading-Aktivität besitzt. In Tabelle 9 ist die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes unter Verwendung der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase aufgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes unter Verwendung der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase

Komponenten	Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase
10 μ M Primer	je 2,5 μ l
10 mM dNTP	1,0 μ l
Puffer	10,0 μ l
Polymerase	0,5 μ l (\pm 0,02 U/ μ l)
Template-DNA	variabel (genomische DNA: 1 ng-1 μ g; Plasmid-DNA: 1 pg-1 ng)
Aqua dest.	variabel
Reaktionsvolumen	50 μ l

DNA-Amplifikationen wurden mit der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	} 25-35 Zyklen
Annealing	50-72 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s/kb	
Finale Extension	72 °C	2 min	

3.5.2 Zielgerichtete Mutagenese

Der Austausch von einzelnen Nukleotiden in einem rekombinanten Plasmid wurde mit Hilfe der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies) durchgeführt. Dafür wurde das jeweilige Plasmid (30 ng) mit 10 μ M Mutagenese-Primern linearisiert, die den Nukleotidaustausch beinhalten (Tab. 6). Die Linearisierung der Vektoren wurde mit dem folgenden PCR-Programm durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 18 Zyklen
Annealing	55 °C	1 min	
Extension	68 °C	1 min/kb	
Finale Extension	68 °C	5 min	

Nach der Linearisierung des Vektors erfolgte die Zugabe der Endonuklease *DpnI* (20 U/ μ l), welche den Verdau methylierter DNA gewährleistet. Anschließend wurden *E. coli* XL1-Blue Zellen mit 5 μ l des Plasmids transformiert.

3.5.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Amplifikate wurden nach der PCR mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend über das GenEluteTM PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) laut Herstellerangaben gereinigt, um überschüssige Primer, dNTPs, den Reaktionspuffer und die Polymerase aus dem Ansatz zu entfernen. DNA-Extraktionen aus Agarose-Gelen wurden mit dem GenEluteTM Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5.4 DNA-Restriktion

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA-Amplifikaten und Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs nach Angaben des Herstellers.

3.5.5 Phosphorylierung von DNA-Amplifikaten

Die Phosphorylierung von DNA-Amplifikaten wurde mit der T4 Polynukleotidkinase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Die Dephosphorylierung von Plasmiden erfolgte mit der Antarktischen Phosphatase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers.

3.5.7 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Verhältnis von Insert und Vektor wurde dabei so gewählt, dass ein Überschuss an Insert im Reaktionsansatz vorhanden war. Bei Ligation mit überhängenden Enden wurde ein Insert:Vektor-Verhältnis von 3:1 gewählt, wohingegen bei einer blunt-end-Klonierung ein Verhältnis von 5:1 vorlag.

3.5.8 Konstruktion der Expressionsplasmide pMK9 und pTMH

3.5.8.1 Erstellung des Vektors pMK9

Als Matrize für die Konstruktion des Vektors pMK9 wurde das Plasmid pMK2 genutzt (Kap. 3.2.2), welches einen doppelten C-terminalen *Strep*-Tag aufweist. Mit Hilfe des Primerpaares pMK9-F und pMK9-R war es möglich, diesen doppelten C-terminalen *Strep*-Tag aus dem Ursprungsvektor pMK2 zu entfernen und zeitgleich eine TEV-Protease Erkennungssequenz sowie einen (His)₆-Tag am C-Terminus einzufügen. Mittels PCR wurde nachfolgend unter Verwendung

der Primer pMK9-F und pMK9-R ein lineares Fragment des Vektors erstellt. Das durch PCR erhaltene Fragment wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* hydrolysiert, über glatte Enden ligiert und durch Transformation in den *E. coli* Stamm XL1-Blue eingebracht. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR und anschließender Sequenzierung unter Verwendung des Primerpaares SeqMK-F und SeqMK-R überprüft.

3.5.8.2 Konstruktion des Expressionsplasmids pTMH

Als Matrize für die Konstruktion des Vektors pTMH (TEV-Erkennungssequenz, MBP-Tag, His-Tag) wurde das zuvor erstellte Plasmid pMK9 genutzt. Mit Hilfe der beiden Primer MK9-F und MK9-R wurde ein lineares Fragment des Vektors erstellt. Anschließend erfolgte die Amplifikation des *malE* Gens mit dem Primerpaar malE-F und malE-R aus dem Plasmid pMal-c2X (Tab. 5). Beide durch PCR erhaltene Fragmente wurden nachfolgend über glatte Enden ligiert und durch Transformation in den *E. coli* Stamm XL1-Blue eingebracht. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR und anschließender Sequenzierung unter Verwendung des Primerpaares SeqMK-F und SeqMK-R überprüft.

3.5.9 Plasmide zur Expression von ϵ Hao-Proteinen

Die *haoA* Gene wurden mit Primern amplifiziert, die an ihrem 5'-Ende jeweils eine *BsaI*-Schnittstelle besaßen (Tab. 6). Nach Restriktion der Amplifikate erfolgte die Ligation über zwei *BsaI*-Schnittstellen in zuvor restringierte Vektoren (pTMH, pMK9, pMK, pMK1, pMK1-NStrep, pMK2). Anschließend wurden *E. coli* XL1-Blue Zellen mit den so erstellten Konstrukten transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin selektiert. Die Plasmid-Derivate wurden nachfolgend durch Sequenzierung überprüft.

3.5.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren, bei dem eine Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld erfolgt. Die für diese Methode verwendeten Agarose-Konzentrationen (0,8-1,8 %, w/v) variierten in Abhängigkeit von der Größe des zu trennenden DNA-Fragmentes. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6xLadepuffer versetzt und konnten nachfolgend bei einer angelegten Spannung von 100-120 V in 1xTAE-Puffer aufgetrennt werden. Als Größenstandard diente der Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Nach einer 20-minütigen Färbung des Agarose-Gels in Ethidiumbromid (1 μ g/ml) und einer 15-minütigen Inkubation in Wasser, konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators visualisiert und dokumentiert werden. Die Zusammensetzungen des verwendeten Laufpuffers und des 6xLadepuffers sind nachfolgend aufgelistet.

TAE-Laufpuffer (50-fach konzentriert; pH 8,0)

Tris	242 g
0,5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml
Eisessig	57,1 ml
<hr/>	
	ad 1000 ml H ₂ O

6xLadepuffer

Orange G	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
<hr/>	
gelöst in 30 % iger (w/v) wässriger Glycerin-Lösung	

3.5.11 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Nukleinsäuren erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden, die nachfolgend näher erläutert sind.

Präparative Plasmidisolierung mit kommerziellen Kits

Die für Klonierungen und Sequenzierungen benötigte Plasmid-DNA wurde mit dem GenElute™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt. Diese Methode wurde genutzt, um möglichst reine und hoch konzentrierte Plasmid-DNA zu erhalten.

Analytische Plasmidisolierung

Eine kostengünstigere Variante der Plasmidisolierung ist die analytische Präparation von Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurden 1,5 ml einer Bakteriensuspension bei 13.200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 150 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Puffer 2 und mehrmaligem Invertieren, kam es zur alkalischen Lyse. Nach Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer 3 und erneutem Invertieren, wurde das Gemisch nachfolgend für 10 Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand, welcher renaturierte Plasmid-DNA beinhaltet, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einer zwei-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 13.200 rpm) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde abschließend mit 500 µl Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen und erneut zentrifugiert (2 Minuten, 13.200 rpm). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet nach Trocknung bei 37 °C

in 20-30 μl Aqua dest. resuspendiert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgeführt.

Puffer 1

Tris/HCl (pH 8.0)	50 mM
EDTA	10 mM
RNaseA	100 $\mu\text{g/ml}$
<hr/>	
Lagerung bei 4 °C	

Puffer 2

NaOH	0,2 M
SDS	1,0 % (w/v)
<hr/>	
Lagerung bei RT	

Neutralisationspuffer 3

Kaliumacetat	0,8 M
Guanidin Hydrochlorid	4,0 M
<hr/>	
pH 4,2 mit Eisessig eingestellt	

3.5.12 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Dafür wurden das Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000 der Firma Peqlab oder das Spektrophotometer DS-11+ der Firma DeNovix nach Angaben der Hersteller verwendet.

3.5.13 Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse nach Sanger wurde durch den Sequenzierservice der LMU München bzw. der Firma SeqLab-Microsynth (Göttingen) durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit den Programmen Clone Manager 9 und FinchTV.

3.6 Mikrobiologische Methoden

3.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden 100 ml Kultur bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6 schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und 5 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend dekantiert und das Zellsediment in 2,7 ml steriler, eiskalter 100 mM Calciumchloridlösung resuspendiert. Nach Zugabe von 2,3 ml steriler, eiskalter Glycerin-Lösung

(50 % v/v) wurde die Zellsuspension aliquotiert (100 μ l Aliquots), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden 100 μ l chemisch kompetente Zellen (*E. coli* XL1-Blue) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit einem kompletten Ligationsansatz (10 μ l; 50 ng Plasmid-DNA, 150-250 ng Insert) oder 200 ng gereinigter Plasmid-DNA versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis und einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden wurde der Transformationsansatz weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l sterilem LB-Flüssigmedium wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der komplette Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und 18 h bei 37 °C inkubiert.

3.6.3 Transformation von *Wolinella succinogenes*

Für die Transformation von *W. succinogenes*-Zellen wurden 10 ml Formiat/Fumarat-Medium mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur inokuliert und 3 h bei 37 °C inkubiert ($OD_{578nm} \sim 0,3$). Die Zellsuspension wurde nachfolgend in sterile 15 ml Schraubröhrchen überführt und 10 Minuten bei 5.300 rpm zentrifugiert (Labofuge 200, Heraeus SEPATECH). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 10 ml kalter, anaerobisierter 0,3 M Saccharoselösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5.300 rpm, 10 Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in der verbliebenden Saccharoselösung (150-200 μ l) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nachfolgend mit 2-10 μ g Plasmid-DNA vermischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei einer elektrischen Kapazität von 25 μ F, einer Spannung von 1.250 V und einem Widerstand von 800 Ω durchgeführt (BioRad Pulse Controller, BioRad Gene Pulser). Der Elektroporationsansatz wurde im Anschluss mit 1 ml gekühltem Formiat/Fumarat-Medium versetzt und in ein steriles, anaerobisiertes Hungate-Röhrchen überführt. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde die komplette Zellsuspension in Antibiotika-haltigen Formiat/Fumarat-Weichagar eingegossen. Die Platten wurden 2 Tage bei 37 °C in Anaerobentöpfen (OXOID) unter N₂-Atmosphäre inkubiert.

3.6.4 Kultivierung und Charakterisierung von *W. succinogenes* Transformanden

Nach erfolgreicher Transformation von *W. succinogenes* Zellen wurden die sich auf den Platten befindlichen Kolonien mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Weichagar entfernt und in ein steriles Hungate-Röhrchen mit 1 ml Formiat/Fumarat-Medium überführt. Die Hungate-Röhrchen wurden anschließend unter Verwendung eines Sterilfilters anaerobisiert und 24 h stehend bei 37 °C inkubiert. Die Transformanden wurden nachfolgend mittels zwei verschiedener PCR-

Reaktionen genetisch überprüft. Die doppelt homologe Rekombination und die daraus resultierende Insertion eines *haoA* Gens wurden mit Hilfe der Primer PCR755 und Ycf-24 (Tab. 6) nachgewiesen, die außerhalb der Rekombinationsbereiche binden (Abb. 8). Der erfolgreiche Austausch des *nrfA* Gens von *W. succinogenes* gegen ein *haoA* Gen wurde mit Hilfe des Primerpaares *nrfA*-3' und *nrfA*-5' überprüft. Gesuchte Transformanden wurden in 10 ml Formiat/Fumarat-Medium überführt, mit den Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol versetzt und 16 h stehend bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Transformanden erneut genetisch mittels PCR überprüft. Die Produktion der Zielproteine wurde mit SDS-PAGE und nachfolgender Häm-Färbung nachgewiesen.

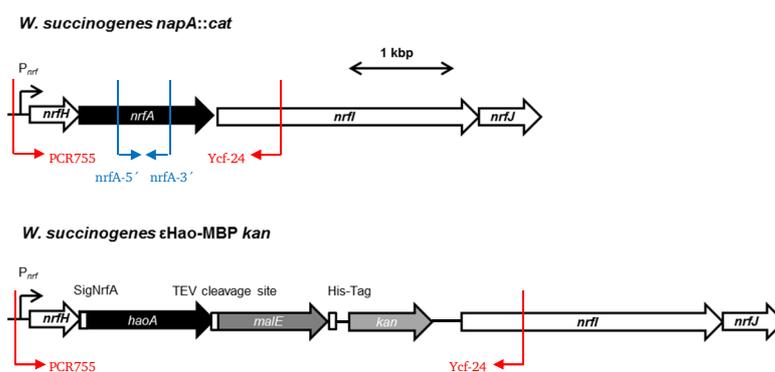


Abbildung 8: Strategie zur Erstellung der Stämme *W. succinogenes* εHao-MBP *kan* durch Transformation von *W. succinogenes* *napA::cat* mit verschiedenen pTMH-Derivaten. Die Insertion der *haoA* Gene wurde mit den Primern PCR755 und Ycf-24 nachgewiesen (rot). Dieses Primerpaar bindet außerhalb der Rekombinationsbereiche, wodurch für *W. succinogenes* *napA::cat* ein Fragment von 3075 bp und für einen Transformanden ein Amplifikat von 5250 bp erwartet wird. Der Austausch des *nrfA* Gens von *W. succinogenes* gegen die *haoA* Gene wurde mit Hilfe des Primerpaares *nrfA*-3' und *nrfA*-5' überprüft (blau). Dabei wurde lediglich für *W. succinogenes* *napA::cat* ein Amplifikat mit einer Größe von 175 bp erwartet.

3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.7.1 Heterologe Proteinproduktion in *Wolinella succinogenes*

Für die heterologe Proteinproduktion in *W. succinogenes* wurden Kulturvolumina von insgesamt 30-110 l Formiat/Fumarat-Medium benötigt, die mit jeweils 0,1 % BHI supplementiert waren. Die Enghals-Standflaschen (je 10 l) wurden vor der Inokulation 15 Minuten mit Stickstoff begast und anaerobisiert. Anschließend wurden 10 l Formiat/Fumarat-Medium mit jeweils einer frischen 100 ml Vorkultur inokuliert und 16-18 h bei 37 °C stehend inkubiert. Um die Produktion rekombinanter Proteine zu unterstützen, wurde das Medium nach Bedarf mit einer Eisen-Vitamin-Lösung (0,4 ‰ v/v) und mit 0,9 mM δ-Aminolävulinat versetzt.

Eisen-Vitamin-Lösung

FeSO ₄	0,5 M
Ascorbinsäure	0,5 M

Die Eisen-Vitamin-Lösung wurde in destilliertem Wasser gelöst und vor dem Gebrauch sterilfiltriert. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei -20 °C.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode mit KCN

Die Proteinbestimmung von Zelllysaten oder ganzen Zellen wurde mit der Biuret-Methode (Bode *et al.*, 1968) durchgeführt. 100 μl Probe (maximal 1 mg Protein) wurden mit 200 μl 1 M Trichloressigsäure und 700 μl Wasser vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Ansätze erfolgte eine Zentrifugation bei 13.200 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 500 μl Biuret-Reagenz resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze mit 500 μl Wasser aufgefüllt und in eine Küvette überführt. Nachdem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 546 nm (E_1) gemessen wurde, erfolgte die Zugabe von einer Spatelspitze Kaliumcyanid (KCN). Nachfolgend wurde die Extinktion erneut bestimmt (E_2) und die Proteinkonzentration mit folgender Formel berechnet:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{(E_1 - E_2) - (E_{1\text{Blindwert}} - E_{2\text{Blindwert}})}{d \times \varepsilon} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Verdünnungsfaktor: 10

Schichtdicke der Küvette (d): 1 cm

$\varepsilon_{546\text{nm}}$: 0,266 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Blindwert: Verwendung von Wasser anstelle einer Probe

Biuret-Reagenz

CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,5 g
K-Na-Tartrat x 4 H ₂ O	4,5 g
NaOH	4,0 g
Kaliumjodid	2,5 g

Die Chemikalien wurden in der angegebenen Reihenfolge in H₂O gelöst (Endvolumen: 500 ml).

3.7.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde mit gereinigten Proteinproben durchgeführt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde gebrauchsfertiges Bradford-Reagenz der Firma Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurden 980 μl Bradford-Reagenz mit 20 μl einer gereinigten Proteinprobe (0,05-0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) vermischt

und 5 Minuten unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Absorption der Probe wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert (1 ml Bradford-Reagenz) bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichgerade. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit einer 10 mg/ml BSA-Stammlösung hergestellt (Konzentrationen: 0 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml und 1 mg/ml). Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.7.4 Erstellung von Cytochrom *c*-Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme von Cytochrom *c*-Absorptionsspektren erfolgte mit oxidierten und reduzierten Proteinproben (Endkonzentration 5-8 μ M) in einem Wellenlängenbereich von 300-800 nm (Spectrophotometer GENESYS™ 10S UV-VIS, Thermo Scientific). Die Oxidation der Cytochrom *c* Proteine erfolgte hierbei durch den Luftsauerstoff. Die Analyse eines reduzierten Cytochrom *c*-Absorptionsspektrums erfolgte nach vorheriger Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit zur Proteinlösung (5-8 μ M). Als Referenz wurde 50 mM Tris/HCl-Puffer verwendet.

3.7.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ganze Zellen oder gereinigte Proteinfractionen wurden hinsichtlich der Produktion des Zielproteins und zur Kontrolle des Reinigungsverlaufes mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) überprüft. Bei dieser Methode werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen hinsichtlich ihrer molekularen Masse getrennt. Durch Zugabe des negativ geladenen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) im Auftragspuffer entsteht an den Polypeptiden eine negative Ladung, die sich proportional zu deren Molekulargewicht verhält. Daher wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese entscheidend von ihrer Masse beeinflusst wird. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4-fach konzentriertem Denaturierungspuffer (Roti Load1, Carl Roth) versetzt und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Gelelektrophorese wurde mit Stromstärken vom 30 mA (Sammelgel) und 50 mA (Trenngel) pro SDS-Gel in vertikalen Gelkammern (Bio-Rad, Mini PROTEAN® Tetra Cell) durchgeführt. Als Größenstandards dienten der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) und der Color Prestained Protein Standard (New England Biolabs). Die Zusammensetzungen der verwendeten Gele, Puffer und Lösungen sind nachfolgend aufgeführt.

Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer	Acrylamid-Stammlösung (37,5:1)
1,5 M Tris/HCl	0,5 M Tris/HCl	30 % Acrylamid
pH 8,8	pH 6,8	0,8 % Bisacrylamid

Laufpuffer (10-fach konzentriert)

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
<hr/>	
ad 2000 ml Aqua dest.	

Zusammensetzung des Trenngels (2 Gele; Schichtdicke 1,5 mm)

	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamid	5,0 ml	6,25 ml	7,5 ml
H ₂ O	6,0 ml	4,75 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl	150 µl	150 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	25 µl	25 µl	25 µl

Zusammensetzung des Sammelgels (2 Gele; Schichtdicke 1,5 mm; 4 %)

Acrylamid	1,0 ml
H ₂ O	3,4 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml
10 % (w/v) SDS	60 µl
10 % (w/v) APS	20 µl
TEMED	12 µl

3.7.6 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

3.7.6.1 *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit N- und/oder C-terminal angefügtem *Strep*-Tag erfolgte mit einer *Strep*-Tactin® Superflow Säule der Firma IBA GmbH (Göttingen). Die Kultivierung, Ernte und Fraktionierung der Zellen wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.4.4, 3.4.5, 3.7.1) durchgeführt. Für die Reinigung der Proteine wurde eine Säule mit 1 ml Bettvolumen (Bindepazität: 50-100 nmol rekombinantes *Strep*-Tag® Protein) verwendet, welche zunächst mit 5 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert wurde. Nachfolgend wurde die Säule mit der gesamten löslichen Fraktion beladen und mit 5 Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Der

Durchlauf sowie die Waschfraktionen wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt. Anschließend erfolgte die Elution des gebundenen Zielproteins durch 6-malige Zugabe von 0,5 Säulenvolumen Puffer E. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen und mittels SDS-PAGE überprüft. Nach Beendigung der Reinigung wurde die *Strep-Tactin*® Säule durch Zugabe von 15 Säulenvolumen Puffer R regeneriert. Anschließend wurde die Säule erneut mit 8 Säulenvolumen Puffer W gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgelistet.

Puffer W

100 mM Tris/HCl (pH 8,0)
150 mM NaCl

Puffer E

100 mM Tris/HCl (pH 8,0)
150 mM NaCl
2,5 mM Desthiobiotin

Puffer R

100 mM Tris/HCl (pH 8,0)
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM HABA (Hydroxyphenylazo benzoic acid)

3.7.6.2 Nickel-Nitriloessigsäure (NTA) Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit C-terminal angefügtem His-Tag erfolgte mit einer HisTrap™ excel Säule der Firma GE Healthcare Life Sciences (Freiburg). Für die Reinigung der Proteine wurde eine Säule mit 5 ml Bettvolumen (Bindekapazität: 10 mg Protein/ml sedimentiertes Medium) verwendet, die an einen ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences) angeschlossen wurde. Vor Beginn der Reinigung erfolgte die Äquilibrierung der Säule mit 5 Säulenvolumen Puffer W. Nachfolgend wurde die Säule mit der gesamten löslichen Fraktion beladen und mit 5 Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Der Durchlauf sowie die Waschfraktionen wurden in 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Elution von Proteinen erfolgte durch Zugabe von Puffer E mit einem linearen Imidazolgradienten (10-250 mM Imidazol) über 35 Säulenvolumen. Das Eluat wurde in 2,5 ml Fraktionen aufgefangen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Nach Beendigung der Reinigung wurde die HisTrap™ Säule durch Zugabe von 3 Säulenvolumen 0,5 M NaOH und 8 Säulenvolumen Aqua dest. regeneriert. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Ethanol (20 % (v/v)) überschichtet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist nachfolgend aufgeführt.

Puffer W

300 mM NaCl
10 mM Imidazol
50 mM NaH₂PO₄

pH 8,0

Puffer E

300 mM NaCl
250 mM Imidazol
50 mM NaH₂PO₄

pH 8,0

3.7.6.3 Proteinreinigung mittels MBP-Chromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit einem C-terminal angefügten MBP-Tag erfolgte mit einer MBPTrapTM HP Säule der Firma GE Healthcare Life Sciences (Freiburg). Für die Reinigung der Proteine wurden Säulen mit 1 ml bzw. 5 ml Bettvolumen (Bindekapazität: 7 mg MBP-ΔSal/ml Medium, 16 mg MBP-βGal/ml Medium) verwendet, welche zunächst mit 5 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert wurden. Nachfolgend wurden die Säulen mit der gesamten löslichen Fraktion beladen und mit 10 Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Der Durchlauf sowie die Waschfraktionen wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt. Anschließend erfolgte die Elution des gebundenen Zielproteins durch 3-malige Zugabe von 1 Säulenvolumen Puffer E (Stoß-Elution). Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen und bezüglich des Reinheitsgrades mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie- und Häm-Färbung überprüft. Nach Beendigung der Reinigung wurden die MBPTrapTM Säulen durch Zugabe von 3 Säulenvolumen 0,5 M NaOH und 10 Säulenvolumen Aqua dest. regeneriert. Anschließend wurden die Säulen mit 3 Säulenvolumen Ethanol (20 % (v/v)) überschichtet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgelistet.

Puffer W

200 mM NaCl
20 mM Tris
1 mM DTT

pH 7,4

Puffer E

200 mM NaCl
20 mM Tris
10 mM Maltose
1 mM DTT

pH 7,4

3.7.6.4 Spaltung von Fusionsproteinen mit der TEV-Protease

Die Spaltung zwischen Zielprotein und Fusionspartner (MBP) erfolgte an einer eingefügten Erkennungssequenz (ENLYFQG) durch Zugabe der TEV-Protease (Tobacco etch virus). Die Proteolyse wurde in einem Standard-Äquilibrierungspuffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 200 mM NaCl; pH 7,4) durchgeführt. 25-100 μg gereinigtes Fusionsprotein wurden mit je 1 μg TEV-Protease (Quelle: heterolog in *Escherichia coli* produziert; c = 0,7 mg/ml; erhalten von Dr. Oliver

Klimmek und Michael Brecht) versetzt und 3-4 Stunden bei 30 °C leicht schüttelnd inkubiert. Die Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft.

3.7.7 Konventionelle Proteinreinigung

3.7.7.1 Diethylaminoethyl (DEAE) - Anionenaustauschchromatographie

Für die Reinigung der Proteine mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie wurde eine Säule mit 500 ml Bettvolumen verwendet, die an einen ÄKTApurifier (GE Healthcare Life Sciences) angeschlossen wurde. Die nach dem Zellaufschluss und der Fraktionierung erhaltene lösliche Fraktion wurde auf eine mit Puffer W äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule beladen. Nachdem die Säule mit 0,5 Säulenvolumen Puffer W gewaschen worden war, erfolgte die Zugabe von Puffer E (500 ml) und die Elution der Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-1M) über 1 Säulenvolumen. Cytochrom *c*-haltige Eluatfraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Beendigung der Reinigung wurde die DEAE-Sepharose Säule durch Zugabe von 1 Säulenvolumen 0,5 M NaOH und 2 Säulenvolumen Aqua dest. regeneriert. Anschließend wurde die Säule mit 1 Säulenvolumen Ethanol (20 % (v/v)) äquilibriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgeführt.

Puffer W

50 mM Kaliumphosphat-Puffer
pH 7,5

Puffer E

50 mM Kaliumphosphat-Puffer
1 M NaCl
pH 7,5

3.7.7.2 Gelfiltration

Mittels Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie) werden Proteine hinsichtlich ihres hydrodynamischen Volumens aufgetrennt. Hierfür wird ein hochporöses Säulenmaterial aus einem kovalent vernetzten Agarose-Dextran Polymer genutzt. Dieses Polymer ermöglicht kleinen Molekülen in die Säulenmatrix einzudringen, wodurch sie am Passieren der Säule gehindert werden. Größere Moleküle können hingegen nicht in die Säulenmatrix eindringen und durchlaufen die Säule somit wesentlich schneller.

Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde zur Bestimmung der Multimerisierungszustände von Fusionsproteinen verwendet. Dafür wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule (Bettvolumen: 24 ml; maximale Flussgeschwindigkeit: 0,75 ml/min; Probenvolumen: 25-500 µl; Trennbereich: 10-600 kDa) der Firma GE Healthcare Life Sciences (Freiburg) eingesetzt, die an einen

ÄKTApurifizier (GE Healthcare Life Sciences) angeschlossen wurde. Pro Lauf wurden 400 μ l gereinigtes Protein auf eine äquilibrierte Sephadex 200 Säule aufgetragen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,4 ml min⁻¹, um eine möglichst gute Trennung der Multimerisierungszustände zu erreichen. Die Absorptionen der eluierten Proteinfractionen wurden mit Hilfe eines UV-Vis Monitors (UV-900, GE Healthcare Life Sciences) bei 260 nm, 280 nm und 410 nm bestimmt. Durch die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Proteinen bekannter Größe (Ovalbumin: 43 kDa, BSA: 66 kDa, Aldolase: 158 kDa, Katalase: 232 kDa, Ferritin: 440 kDa, Blue Dextran 2000: 2000 kDa) lassen sich die ungefähren Molekülmassen der untersuchten Proteine über das Retentionsvolumen berechnen. Dabei verhält sich die Molekülmasse umgekehrt proportional zum Elutionsvolumen.

Äquilibrierungspuffer

50 mM Kaliumphosphat-Puffer

pH 7,4

3.8 Proteinanalytische Methoden

3.8.1 Coomassie-Färbung

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen im SDS-Gel erfolgte die Detektion der Proteine mit einer Coomassie-Färbung. Das SDS-Gel wurde vor der Färbung mit Wasser überschichtet, 30 Sekunden in der Mikrowelle erhitzt und nachfolgend 5-10 Minuten leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Wasser entfernt und das Gel mit Coomassie-Färbelösung bedeckt, die erneut 30 Sekunden erhitzt wurde. Das SDS-Gel wurde anschließend gefärbt bis die gewünschte Bandenintensität erreicht war. Nachfolgend wurde der Hintergrund bei Raumtemperatur für mindestens 16 Stunden mit Aqua dest. entfärbt.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie® Brilliant Blue G250	80 mg
Salzsäure	35 mM
<hr/>	
ad 1 l H ₂ O bidest.	

80 mg Coomassie® Brilliant Blue G250 (Serva) wurden in 1 l H₂O bidest. gelöst und 3 Stunden gerührt. Anschließend wurden unter ständigem Rühren 3 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben und die Lösung bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt gelagert.

3.8.2 Häm-Färbung

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen im SDS-Gel erfolgte die Detektion der Cytochrome c mittels Häm-Färbung (Francis & Becker, 1984). Das SDS-Gel wurde

vor der Färbung mit TCA-Lösung (12,5 % w/v) überschichtet und 30 Minuten fixiert. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und mit der frisch angesetzten Färbelösung für 60 Minuten auf einen wippenden Plattformschüttler (DUOMAX 1030, Heidolph Instruments) inkubiert.

Häm-Färbelösung

o-Dianisidin Dihydrochlorid	100 mg
0,5 M Natriumcitrat (pH 4,4)	10 ml
H ₂ O ₂ 30 % (w/w)	200 µl
<hr/>	
ad 100 ml Aqua dest.	

100 mg o-Dianisidin Dihydrochlorid wurden in 90 ml destilliertem Wasser gelöst und 15 Minuten gerührt. Anschließend wurden 10 ml 0,5 M Natriumcitrat-Lösung und 200 µl H₂O₂ zugegeben.

3.8.3 Western Blot und ELISA

3.8.3.1 Western Blot

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dafür wurde die Membran zunächst mit destilliertem Wasser und Anodenpuffer II befeuchtet. Für den Aufbau des Blots wurden vier Whatman-Papiere in Anodenpuffer I getränkt und auf die Anodenplatte der Blotapparatur (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) überführt. Anschließend wurden zwei in Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere, die vorbehandelte Nitrocellulosemembran und das SDS-Gel luftblasenfrei aufgelegt. Den Abschluss bildeten 6 Whatman-Papiere, die in Kathodenpuffer inkubiert worden waren. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,04 A pro cm² für 90 Minuten. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist nachfolgend aufgeführt.

Anodenpuffer I

Tris/HCl	0,3 M
Methanol	20 % (v/v)
<hr/>	
pH 10,4	

Anodenpuffer II

Tris/HCl	25 mM
Methanol	20 % (v/v)
<hr/>	
pH 10,4	

Kathodenpuffer

Tris/HCl	25 mM
Methanol	20 % (v/v)
Aminohexansäure	40 mM
<hr/>	
	pH 9,4

3.8.3.2 ELISA

Nachdem die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen worden waren, wurde diese über Nacht in 1-fach konzentriertem PBS-Puffer mit 3 % (w/v) Albumin Fraktion V (BSA) oder 5 % (w/v) Milchpulver leicht schüttelnd inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran 15 Minuten mit 1-fach konzentriertem PBS-Puffer gewaschen und mit dem entsprechenden Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten Antikörper (Anti-His-HRP, Roth; *Strep*MAB-Classic HRP conjugate, *Strep*-Tactin®-HRP conjugate, IBA) wurden nach den Angaben der Hersteller verdünnt. Nach erneutem 15-minütigem Waschen der Membran mit 1-fach konzentriertem PBS-Puffer erfolgte die Zugabe der frisch hergestellten Chloronaphthol-Lösung. Die dadurch hervorgerufene chromogene Reaktion wurde mit dem Erreichen der gewünschten Bandenintensität durch Zugabe von destilliertem Wasser abgestoppt.

PBS-Puffer (10-fach konzentriert)

NaCl	72,0 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	14,2 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,8 g
<hr/>	
	ad 1 l Aqua dest.

Chloronaphthol-Lösung

4-Chloro-1-Naphthol	30 mg
Ethanol (p.a.)	5 ml
H ₂ O ₂ 30 % (w/w)	20 µl
<hr/>	
	ad 50 ml PBS-Puffer (1-fach konzentriert)

30 mg 4-Chloro-1-Naphthol wurden in 5 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurden 45 ml PBS-Puffer und 20 µl H₂O₂ zugegeben.

3.8.4 Blau-Nativ-Elektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE wurde mit Fertiggelelektrophoren der Firma Serva (SERVAGel™ N Native Gels 3-12 %) durchgeführt. Die gereinigten Proteinproben wurden zu gleichen Volumenanteilen mit 2-fachem

Probenpuffer gemischt. 30 μ l Probe wurde auf das native Gel aufgetragen. Die BN-PAGE wurde bei einer Spannung von 50 V für 30 Minuten gestartet. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht und BN-Elektrophorese für weitere 120 Minuten fortgesetzt. Nachfolgend wurde das Gel in 20 % (w/v) Trichloressigsäure fixiert und mit SERVA Blau R (Serva, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

Probenpuffer (2-fach konzentriert)

6-Aminocapronsäure	1 M
BisTris-HCl (pH 7,0)	100 mM
NaCl	100 mM
Glycerin	20 %
Serva Blue G250	0,1 %

Anodenpuffer

BisTris-HCl	50 mM
	pH 7,0

Kathodenpuffer

Tricin	50 mM
BisTris	15 mM

3.8.5 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde mit Fertiggelelektroden der Firma Serva (SERVAGel™ IEF Starter Kit, pH 3,5-10,7) durchgeführt. Die gereinigten Proteinproben wurden zu gleichen Volumenanteilen mit dem IEF-Probenpuffer gemischt. 30 μ l Probe wurde auf das Gel aufgetragen. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit umgekehrten Polaritäten (Non-Equilibrium-pH-Gradient-Electrophoresis = NEPHGE-Protokoll) bei einer Spannung von 100 V für 60 Minuten gestartet um auch die Auftrennung von Proteinen mit einem pI > 7 gewährleisten zu können (O'Farrell *et al.*, 1977). Anschließend wurde die Spannung auf 300 V erhöht und Elektrophorese für weitere 60 Minuten fortgesetzt. Nachfolgend wurde das Gel in 20 % (w/v) Trichloressigsäure fixiert und mit SERVA Violet 17 (Serva, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

Probenpuffer (2-fach konzentriert)

Servalyt™	4 % (w/v)
Glycerin	30 % (w/v)
Phenolrot	0,005 % (w/v)

Kathodenpuffer

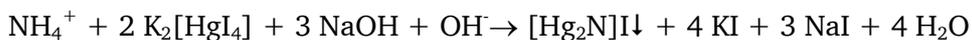
NaOH 20 mM

Anodenpuffer

Glutaminsäure 40 mM

3.8.6 Ammoniumnachweis

Der Ammoniumnachweis wurde mit Neßlers Reagenz durchgeführt. Das Reagenz beinhaltet Kaliumtetraiodomercurat $K_2[HgI_4]$, welches mit Ammoniak oder Ammonium in alkalischer Lösung einen gelben Farbkomplex $[Hg_2N]I\downarrow$ bildet. Dieser Farbkomplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 475 nm (Lange & Zdenek, 1980), sodass mit Hilfe dieser Methode Ammonium- oder Ammoniakkonzentrationen photometrisch bestimmt werden können.



Für den Ammoniumnachweis wurden 100 μ l Probe (0-2,0 mM Ammonium) mit 900 μ l Neßlers Reagenz vermischt und 15 Minuten bei 25 °C leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 475 nm gegen einen Blindwert (1ml Neßlers Reagenz) bestimmt. Die Berechnung der Ammoniumkonzentrationen erfolgte mit einer zuvor erstellten Eichgerade (Abb. 9). Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit einer 10 mM Ammoniumsulfat-Stammlösung hergestellt (Konzentrationen: 0 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,6 mM; 0,8 mM; 1,0 mM; 1,2 mM; 1,4 mM; 1,6 mM; 1,8 mM und 2,0 mM). Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

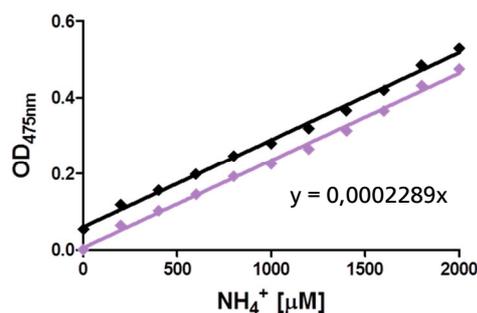


Abbildung 9: Eichgerade des Ammoniumnachweises mittels Neßlers Reagenz. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit einer 10 mM Ammoniumsulfat-Stammlösung hergestellt (Konzentrationsbereich: 0-2 mM). Die Messung der Verdünnungsreihe erfolgte als Dreifachbestimmung bei einer Wellenlänge von 475 nm gegen einen Blindwert (1 ml Neßlers Reagenz). Die Erstellung der Eichgerade wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5 durchgeführt. Schwarz: Messwerte der Eichgerade ohne Einbeziehung des Blindwertes; Violett: Messwerte der Eichgerade nach Abzug des Blindwertes ($y = 0,0002289x$).

3.8.7 Hydroxylaminbestimmung

Hydroxylaminkonzentrationen wurden mit einem modifizierten Protokoll nach Frear und Burrell (1955) bestimmt. Für den Hydroxylaminnachweis wurden 200 μl Probe (0 bis 1 mM Hydroxylamin), 200 μl Natriumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6,8) und 160 μl destilliertes Wasser vermischt. Anschließend wurden 40 μl TCA-Lösung (12 % w/v) und 200 μl 8-Chinolinol-Lösung hinzugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und mit 200 μl Natriumcarbonat-Lösung (1 M) versetzt. Nach einer 1-minütigen Inkubation bei 95 °C erfolgte die Inkubation der Ansätze für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 705 nm gegen einen Blindwert bestimmt. Die Berechnung der Hydroxylaminkonzentrationen erfolgte mit zuvor erstellten Eichgeraden (exemplarisch in Abb. 10 gezeigt). Für die Standardkurven wurden Verdünnungsreihen mit einer 250 μM und 1 mM Hydroxylaminhydrochlorid-Stammlösung hergestellt (Konzentrationen 250 μM Stammlösung: 0 nmol; 1,25 nmol; 2,5 nmol; 5 nmol; 10nmol; 15 nmol; 20 nmol; 25 nmol; 30 nmol; 40 nmol; 45 nmol und 50 nmol; Konzentrationen 1 mM Stammlösung: 0 mM; 0,050 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,2 mM; 0,25 mM; 0,3 mM; 0,35 mM; 0,4 mM; 0,45 mM; 0,5 mM; 0,55 mM; 0,6 mM; 0,65 mM; 0,7 mM; 0,75 mM; 0,8 mM; 0,85 mM; 0,9 mM; 0,95 mM und 1,0 mM). Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

8-Chinolinol-Lösung

1 g 8-Chinolinol wurde in 100 ml Ethanol (100 % (v/v)) gelöst.

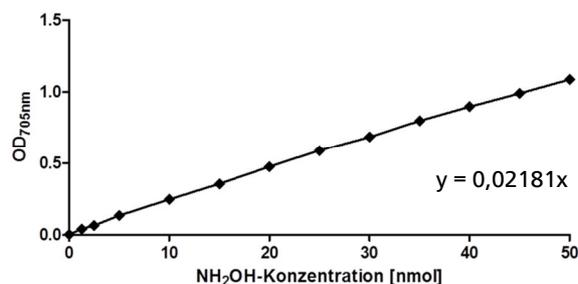


Abbildung 10: Eichgerade der Hydroxylaminbestimmung. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit einer 250 μM Hydroxylaminhydrochlorid-Stammlösung hergestellt (Konzentrationsbereich: 0-50 nmol). Die Messung der Verdünnungsreihe erfolgte als Dreifachbestimmung bei einer Wellenlänge von 705 nm gegen einen Blindwert (200 μl destilliertes Wasser anstelle einer Probe). Die Erstellung der Eichgerade wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5 durchgeführt ($y = 0,02181x$).

3.8.8 Nitritnachweis

Nitritkonzentrationen wurden photometrisch bestimmt. Das im Testansatz befindliche Nitrit diazotiert mit dem zugegebenen Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz. Dieses Diazoniumsalz bildet nachfolgend mit N-(1-Naphthyl)ethyldiamin einen farbigen Komplex, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann (Rider & Mellon, 1946). Für den Nitritnachweis wurden 200 μl Probe (0-0,1 mM Nitrit) mit 200 μl Sulfanilamid [1 % (w/v) in 2,5 N HCl] vermischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 μl N-(1-Naphthyl)ethyldiamin (0,1 %, w/v) hinzugegeben. Die Ansätze wurden erneut gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 μl destilliertem Wasser wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen einen Blindwert bestimmt. Die Berechnung der Nitritkonzentrationen erfolgte mit folgender Formel:

$$c[\text{mM}] = \frac{\Delta OD}{\epsilon} \times 5 \qquad \epsilon_{546\text{nm}} = 50 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3.9 Enzymaktivitätsbestimmungen

3.9.1 Messung von Reduktase-Aktivitäten

Die Messung der Nitrit-, Hydrazin- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm nach einem Protokoll von Bokranz *et al.* (1983). Für die Messung wurden 970 μl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) in eine mit Gummistopfen verschlossene, anaerobisierte Quarzküvette (d=0,5 cm) überführt und 5 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 μl Natriumdithionit (1 M Stammlösung) und 10 μl einer 0,1 M Benzylviologen-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde nachfolgend erneut 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Hinzufügen der gewünschten Menge gereinigten Enzyms (Nitrit-Reduktion: 2,5-70 μg ; Hydroxylamin-Reduktion: 0,95-8,1 μg ; Hydrazin-Reduktion: 25-99 μg je nach Proteinpräparation) wurde die Reaktion durch Zugabe des jeweiligen Substrats gestartet. Als Substrate wurden 10 μl einer 1 M Kaliumnitrit-, Hydrazin- oder Hydroxylamin-Stammlösung verwendet.

Die Messung der Sulfit-Reduktase-Aktivität erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm nach einem Protokoll von Zehnder und Wuhrmann (1976). Für die Messung wurden wie zuvor beschrieben 970 μl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5) in eine anaerobisierte Quarzküvette überführt und 5 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 μl einer 0,1 M Methylviologen-Lösung und 10 μl des Reduktionsmittels Titan(III)-citrat hinzugegeben. Nach einer erneuten zweiminütigen Inkubation des Ansatzes bei 37 °C wurde die gewünschte Menge gereinigten Enzyms (25-99 μg) hinzugefügt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Natriumsulfit gestartet.

Die Berechnungen der Volumenaktivität und spezifischen Aktivität wurden mit folgenden Formeln durchgeführt:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \times \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \times 2}{\varepsilon}$$

$$\text{spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{\text{Volumenaktivität [U/ml]}}{\text{Proteinkonzentration [mg/ml]}}$$

$$\text{Benzylviologen } \varepsilon_{546\text{nm}} = 19,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} (2 e^-)$$

$$\text{Methylviologen } \varepsilon_{578\text{nm}} = 19,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} (2 e^-)$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Volumen in der Küvette}}{\text{Volumen der Probe}}$$

$$\text{Faktor 2} = \frac{1}{d}$$

$$d = \text{Schichtdicke (0,5 cm)}$$

$$1 \text{ Unit (U)} = \text{Oxidation von } 2 \mu\text{mol Benzylviologen bzw. Methylviologen pro Minute}$$

Standardabweichungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel und GraphPad Prism 5 bestimmt.

3.9.2 Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität

Die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm. Für die Messung wurden 970 μl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) in eine zuvor anaerobisierte Quarzküvette überführt und 5 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 μl Phenazinmethosulfat (PMS, 2 mM Stammlösung) und 10 μl einer 40 mM MTT-Lösung (Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromid) hinzugegeben (Shimamura *et al.*, 2008). Der Ansatz wurde nachfolgend erneut 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Hinzufügen der gewünschten Menge gereinigten Enzyms (je nach Proteinpräparation 25-99 μg) wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Hydroxylamin gestartet.

Für die Berechnungen der Volumenaktivität und spezifischen Aktivität wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \times \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \times 2}{\varepsilon}$$

$$\text{spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{\text{Volumenaktivität [U/ml]}}{\text{Proteinkonzentration [mg/ml]}}$$

$$\varepsilon_{578\text{nm}} = 16,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} (2 e^-)$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Volumen in der Küvette}}{\text{Volumen der Probe}}$$

$$\text{Faktor 2} = \frac{1}{d}$$

$$d = \text{Schichtdicke (0,5 cm)}$$

$$1 \text{ Unit (U)} = \text{Reduktion von } 1 \mu\text{mol MTT pro Minute}$$

Standardabweichungen wurden mit den Programmen Microsoft Excel und GraphPad Prism 5 ermittelt.

3.9.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M)

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten unter Verwendung verschiedener Substratkonzentrationen erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben. Die K_M -Werte wurden graphisch mit dem Programm GraphPad Prism 5 durch Auftrag der Substratkonzentrationen gegen die Enzymaktivitäten bestimmt.

3.9.4 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden Puffer mit pH-Werten zwischen 5,5 und 8,0 verwendet. Zur Ermittlung des Temperatur-Optimums wurden die Messansätze bei Temperaturen zwischen 37 °C und 70 °C inkubiert. Die verwendeten Puffer sind nachfolgend aufgelistet.

Puffer	Konzentration	pH-Wert
Citronensäure/Natriumcitrat-Puffer	50 mM	5,5
Kaliumphosphat-Puffer	50 mM	6,0
Kaliumphosphat-Puffer	50 mM	6,5
Kaliumphosphat-Puffer	50 mM	7,0
Kaliumphosphat-Puffer	50 mM	7,5
Kaliumphosphat-Puffer	50 mM	8,0

Die verwendeten Kaliumphosphat-Puffer wurden im entsprechenden Mischungsverhältnis aus einer 1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung und einer 1 M Dikaliumhydrogenphosphat-Stammlösung hergestellt.

3.9.5 Produktbestimmungen enzymatischer Reaktionen

3.9.5.1 Nitritreduktion

Die Messung der Nitrit-Reduktase-Aktivität erfolgte wie in Kapitel 3.9.1 beschrieben. Für die Messung wurden 950 μl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) in eine zuvor anaerobisierte Quarzküvette überführt und 5 Minuten bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 μl einer 1 M Natriumdithionit-Lösung und 10 μl einer 0,1 M Benzylviologen-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde nachfolgend erneut 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Hinzufügen der gewünschten Menge an gereinigtem Enzym (50 μg) wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mM Nitrit gestartet. Die Messansätze wurden insgesamt 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei das Reduktionsmittel Natriumdithionit stufenweise bis zu einer Endkonzentration von 30 mM zugegeben wurde. Anschließend wurden die Messansätze auf Eis gelagert, um die enzymatische Reaktion abzustoppen und einer Nitrit-, Hydroxylamin- sowie Ammoniumbestimmung unterzogen. Als Kontrollen wurden Messansätze ohne Substrat aber mit Protein und Messansätze mit Substrat aber ohne Protein mitgeführt. Hinsichtlich der Nitritbestimmung wurden Messansätze mit Substrat aber ohne Protein genutzt, um die Nitritkonzentrationen vor der Enzymzugabe zu bestimmen. Messansätze ohne Substrat aber mit Protein hatten hingegen keinen Einfluss innerhalb der Nitritbestimmung. Im Fall der Hydroxylaminbestimmung hatten die mitgeführten Kontrollen keinen Einfluss auf die erhaltenen Messwerte. Hinsichtlich der Ammoniumbestimmung wurde ein Einfluss der zugegebenen Proteine auf die Messwerte festgestellt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden die ermittelten Ammoniumfunktionswerte um den Wert korrigiert, der mit Kontrollen ohne Substrat aber mit Protein bestimmt wurde. Messansätze mit Substrat aber ohne Protein hatten hingegen keinen Einfluss innerhalb der Ammoniumbestimmung. Die Konzentrationen der Substrate und Endprodukte wurden mit Hilfe von zuvor erstellten Eichgeraden berechnet.

3.9.5.2 Hydroxylamin-Oxidation

Die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben. Nach Hinzufügen der gewünschten Menge an gereinigtem Enzym (50 μg) wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mM Hydroxylamin gestartet. Die Messansätze wurden insgesamt 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Nachfolgend wurden Nitrit- sowie Hydroxylaminbestimmungen durchgeführt. Als Kontrollen wurden Messansätze ohne Substrat aber mit Protein sowie Messansätze mit Substrat aber ohne Protein mitgeführt. Hinsichtlich der Hydroxylaminbestimmung wurden Messansätze mit Substrat aber ohne Protein genutzt, um die Hydroxylaminkonzentrationen vor der Enzymzugabe zu bestimmen. Messansätze ohne Substrat aber mit Protein hatten hingegen keinen Einfluss innerhalb der Hydroxylaminbestimmung. Hinsichtlich der Nitritbestimmung wurden Kontrollen

mit Substrat aber ohne Protein von den eigentlichen Messwerten abgezogen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Messansätze ohne Substrat aber mit Protein hatten hingegen keinen Einfluss auf die erhaltenden Messwerte. Die Nitrit- und Hydroxylaminkonzentrationen wurden mit Hilfe von zuvor erstellten Eichgeraden ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Heterologe Produktion von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen

Für die heterologe Produktion der epsilonproteobakteriellen Hydroxylamin-Oxidoreduktasen im *nrf*-Operon von *Wolinella succinogenes* wurde das Plasmid pTMH (TEV-Erkennungssequenz, MBP, His-Tag) erstellt (Kap. 3.5.8.2). Dieses Plasmid ermöglichte es erstmals ϵ Hao-MBP Fusionsproteine in *W. succinogenes* zu produzieren, die nachfolgend gereinigt und charakterisiert wurden. Die Expression des Zielgens (*haoA*) wird hierbei nicht durch einen Induktor gesteuert, sondern durch das Vorhandensein des *nrf*-Promotors reguliert. Die Konstruktion des Expressionsplasmids pTMH und dessen Derivate (Tab. 5) wurde wie in den Kapitel 3.5.8 und 3.5.9 beschrieben durchgeführt. Der Vektor pTMH besitzt neben den zwei partialen, flankierenden Genabschnitten *nrfH* und *nrfI* eine Kanamycin-Resistenzkassette, welche die Selektion der Transformanden ermöglichte. Weiterhin sind eine TEV-Erkennungssequenz, welche für die Spaltung der Fusionsproteine essentiell ist, und ein MBP-Tag vorhanden. Der 40 kDa große MBP-Tag wurde genutzt, um eine bessere Bindung der periplasmatisch lokalisierten Zielproteine im Vergleich zu *Strep*- oder His-Tag-markierten Proteinvarianten an eine Affinitätssäule zu erreichen (Kap. 4.9). Die Vektorkarte des Plasmids pTMH-CmHao sowie die Strategie der Mutantenkonstruktion sind exemplarisch in Abb. 11 dargestellt.

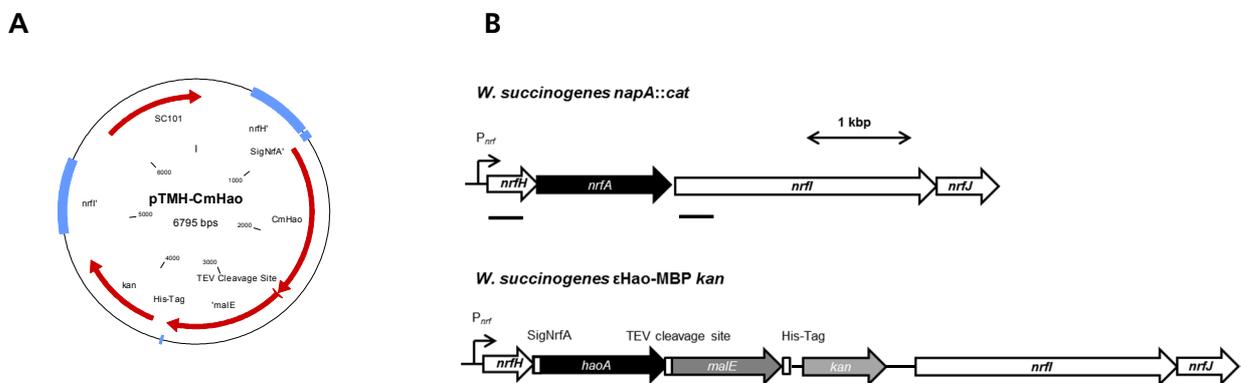


Abbildung 11: (A) Vektorkarte des Expressionsplasmids pTMH-CmHao mit dem Zielgen *haoA* aus *C. mediatlanticus*, (B) Strategie zur Erstellung der Mutanten *W. succinogenes* ϵ Hao-MBP *kan* durch Transformation von *W. succinogenes napA::cat* mit verschiedenen pTMH-Derivaten, homologe Bereiche zwischen dem *W. succinogenes* Genom und dem Expressionsplasmid pTMH sind durch schwarze Balken gekennzeichnet.

Die Erstellung der Mutanten *W. succinogenes* ϵ Hao-MBP *kan* wurde wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Die Transformanden wurden nachfolgend mittels zweier verschiedener PCR-Reaktionen auf Integration des jeweiligen *haoA*-Gens und Verlust des *W. succinogenes nrfA*-Gens überprüft (Kap. 3.6.4). Die Produktion der Zielproteine wurde mit SDS-PAGE und nachfolgender Häm-Färbung nachgewiesen. Zellen der entsprechenden Transformanden wurden anschließend im 10 l-Maßstab (insgesamt bis zu 110 l) in Formiat/Fumarat-Medium vermehrt,

mittels Tangentialfiltration (Kap. 3.4.4) gerettet und nachfolgend zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend resuspendiert und die Zellen mittels French Press aufgeschlossen (Kap. 3.4.5). Durch eine 60-minütige Ultrazentrifugation wurde das Zellhomogenat in lösliche Fraktion und Membranfraktion separiert. Die anschließende Reinigung des periplasmatisch lokalisierten Zielproteins wurde wie in Kapitel 3.7.6.3 beschrieben durchgeführt. Sowohl in Zellsuspensionen als auch Elutionsfraktionen konnte mittels Coomassie- und Häm-Färbung das jeweilige Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 100 kDa sowie das MBP-freie Zielprotein mit einer Größe von etwa 57 kDa nachgewiesen werden (Abb. 12). Das Vorhandensein der MBP-freien Proteinspezies war unerwartet und ist möglicherweise auf eine spontane Proteolyse oder Instabilität des MBP-Tags zurückzuführen. Durch die Konstruktion und Etablierung des neuen Expressionsplasmids pTMH war es möglich insgesamt 13 Fusionsproteine (*CmHao*, *CmHao_W464Y*, *CmHao_V450Y*, *CcuHao*, *CcuHao_W428Y*, *CcuHao_V414Y*, *CfHao*, *CfHao_W434Y*, *CfHao_V422Y*, *NpHao*, *NeHao*, *NeHao_Y467V* und *WsNrfA*) heterolog bzw. homolog in *W. succinogenes* zu produzieren. Abbildung 12 zeigt exemplarisch sechs dieser Proteine, die mittels SDS-PAGE, anschließender Coomassie- und Häm-Färbung sowie mit Hilfe einer Immunodetektion nachgewiesen wurden.

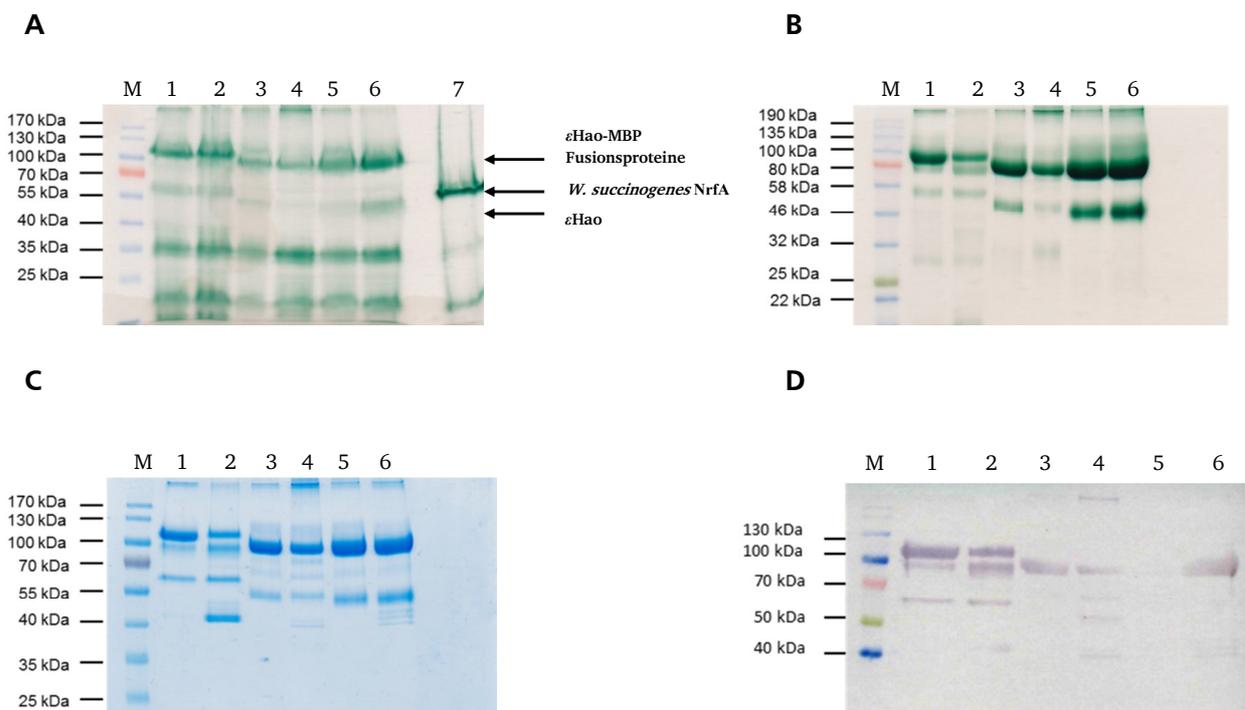


Abbildung 12: (A) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen (200 μ g Probe pro Spur); M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Bild A und C, Thermo Scientific), Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Bild D, Thermo Scientific), Color Prestained Protein Standard Broad Range (Bild B, New England Biolabs); Spur 1, *CmHao*; Spur 2, *CmHao_V450Y*; Spur 3, *CfHao*; Spur 4, *CfHao_V422Y*; Spur 5, *CcuHao*; Spur 6, *CcuHao_V414Y*; Spur 7, *W. succinogenes napA::cat* (150 μ g); (B) Häm-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 30 μ g Probe in jeder Spur; (C) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 7,5 μ g Probe pro Spur, (D) Western Blot und ELISA zum Nachweis von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen unter Verwendung des primären Antikörpers Anti-His-HRP (Roth), 7,5 μ g gereinigtes Protein pro Spur.

Die mittels dieser Methode produzierten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine besitzen neben dem MBP-Tag noch einen weiteren Affinitäts-Tag (His₆-Tag), der am C-Terminus des Maltose-Binde-Proteins lokalisiert ist und bei der Proteolyse der Fusionsproteine eine bedeutende Rolle übernimmt. Die Spaltung zwischen Zielprotein (Hao) und Fusionspartner (MBP), die für eine nachfolgende Kristallisation der Proteine entscheidend sein kann, erfolgte an einer eingefügten Erkennungssequenz (ENLYFQG). Nach Zugabe der TEV-Protease (Kap. 3.7.6.4), die ebenfalls einen His₆-Tag besitzt, und einer weiteren Reinigung mittels einer Ni-NTA Säule konnten auf diesem Wege die TEV-Protease sowie der MBP-Tag vom Zielprotein entfernt werden. Die Proteolyse wurde mit den ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen *CmHao*, *CmHao_W464Y*, *CcuHao*, *CcuHao_W428Y*, *CfHao* und *CfHao_W434Y* durchgeführt und ist exemplarisch in Abb. 13 dargestellt.

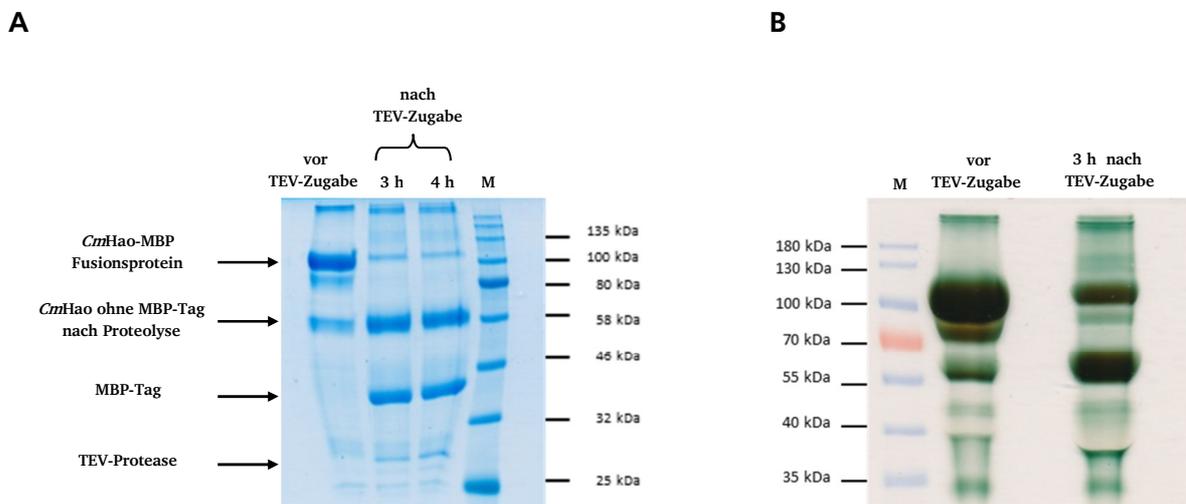


Abbildung 13: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Coomassie-Färbung des gereinigten Fusionsproteins *CmHao*-MBP vor und nach Zugabe der TEV-Protease, 7,5 μ g Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, *CmHao*-MBP Fusionsprotein vor Zugabe der TEV-Protease; Spur 2, *CmHao*-MBP Fusionsprotein nach Zugabe der TEV-Protease und 3-stündiger Inkubation bei 30 °C (Kap. 3.7.6.4); Spur 3, *CmHao*-MBP Fusionsprotein nach Zugabe der TEV-Protease und 4-stündiger Inkubation bei 30 °C. (B) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung des gereinigten Fusionsproteins *CmHao*-MBP vor und nach Zugabe der TEV-Protease, 50 μ g Probe in jeder Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); Spur 1, *CmHao*-MBP Fusionsprotein vor Zugabe der TEV-Protease; Spur 2, *CmHao*-MBP Fusionsprotein nach Zugabe der TEV-Protease und 3-stündiger Inkubation bei 30 °C.

4.2 Charakterisierung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine *CfHao*, *CcuHao* und *CmHao*

Wie aus Abbildung 12 und 13 ersichtlich, wurden neben den ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen auch geringe Anteile an MBP-freien Proteinspezies mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Diese Gemische der verschiedenen Proteinspezies werden nachfolgend als *CfHao*-, *CcuHao*-, *CmHao*- und *NpHao*-Präparationen bezeichnet, welche von Enzymen der Organismen *C. fetus*,

C. curvus, *C. mediatlanticus* und *N. profundicola* heterolog in *W. succinogenes* erhalten wurden.

4.2.1 Enzymaktivitätsmessung mit verschiedenen Substraten

Die mittels MBP-Affinitätschromatographie gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine aus *C. curvus*, *C. fetus* und *C. mediatlanticus* wurden nachfolgend hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten näher untersucht. Die Messung von Reduktase-Aktivitäten erfolgte hierbei durch Zugabe des Dithionit-reduzierten künstlichen Elektronendonors Benzylviologen, dessen Oxidation bei 546 nm photometrisch bestimmt wurde (Kap. 3.9.1). Als potenzielle Substrate wurden Kaliumnitrit, Hydroxylamin, Natriumsulfit und Hydrazin verwendet. Die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität (Kap. 3.9.2) erfolgte ebenfalls photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm durch Zugabe des Elektronenakzeptors MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid) und des Redoxmediators Phenazinmethosulfat (PMS). Für die Ermittlung der Reduktase- und Oxidase-Aktivitäten wurden voneinander unabhängige Messungen mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt. Das NrfA-MBP-Fusionsprotein aus *W. succinogenes* (*WsNrfA*-MBP) wurde als Kontrolle für die Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität mitgeführt. Als Positivkontrolle für die Hydroxylamin-Oxidation wurde die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea* genutzt, die in aeroben Nitrifizierern die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit katalysiert. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen sind für jeweils zwei biologische Replikate in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Spezifische Aktivitäten der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten. N/A: keine Messungen durchgeführt.

Protein	Spezifische Aktivität (U min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)				
	Kaliumnitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydrazin Reduktion	Natriumsulfit Reduktion	Hydroxylamin Oxidation
<i>CmHao</i>	1,0 ± 0,02	158,0 ± 2,0	0,05 ± 0,005	≤ 0,01	0,1 ± 0,03
<i>CcuHao</i>	27,0 ± 5,0	68,0 ± 3,0	≤ 0,01	≤ 0,01	0,03 ± 0,0002
<i>CfHao</i>	181,0 ± 3,0	149,0 ± 17,0	≤ 0,01	≤ 0,01	0,07 ± 0,05
<i>WsNrfA</i>	1066,0 ± 27,0	159,0 ± 6,0	N/A	N/A	≤ 0,01
<i>NeHao</i>	0,55 ± 0,02	13,0 ± 0,4	N/A	N/A	4,1 ± 0,13

Anhand der Tabelle 10 wird ersichtlich, dass alle getesteten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine sowohl Nitrit als auch Hydroxylamin reduzierten. Die gemessenen Hydroxylamin-Reduktase-Aktivitäten der *CmHao*, *CcuHao* und *CfHao* waren mit der Positivkontrolle *W. succinogenes* NrfA-MBP vergleichbar, wohingegen deutlich geringere Nitritreduktase-Aktivitäten detektiert wurden. Bei der *CfHao* war die Nitritreduktion im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 5, bei der *CcuHao* um den Faktor 40 und bei der *CmHao* sogar um den Faktor 1066 erniedrigt. Auffällig war, dass

bei der *CcuHao* und der *CmHao* während der Nitritreduktion die Bildung von Gasbläschen auftrat (Abb. 14). Diese Gasbildung war bei einer Substratkonzentration von 10 mM bereits 60 Sekunden nach Zugabe der Enzyme optisch nachweisbar und wurde weder bei *NrfA-MBP* noch bei *CfHao* beobachtet. Erwartungsgemäß wiesen die ϵ Hao Enzyme im Vergleich zum Kontrollprotein *NeHao* nur sehr geringe Hydroxylamin-Oxidase-Aktivitäten auf. Für die Hydrazin- und Natriumsulfit-Reduktion konnte bei keinem getesteten Enzym unter den gegebenen Messbedingungen eine signifikante Aktivität nachgewiesen werden.

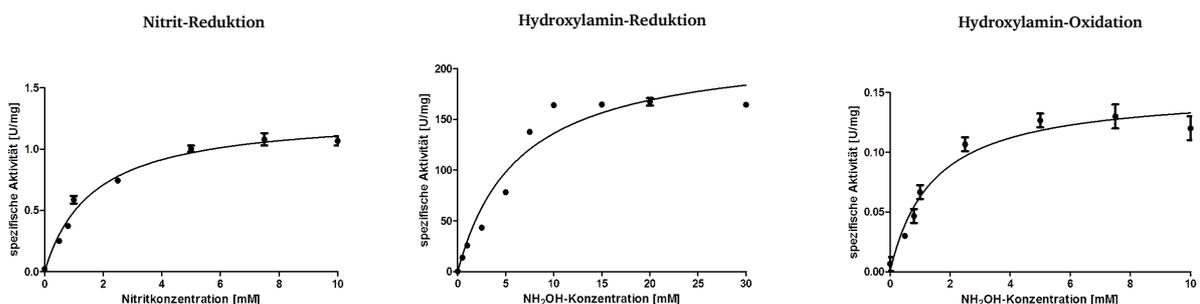


Abbildung 14: Gasbildung bei der Durchführung des Nitrit-Reduktase-Enzymtests zwei Minuten nach Zugabe der *CmHao*.

4.2.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten

Die heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine aus *C. curvus*, *C. fetus* und *C. mediatlanticus* wurden hinsichtlich ihrer Substrataffinität untersucht. Dafür wurden die Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) für Nitrit (Reduktion) sowie Hydroxylamin (reduktiv und oxidativ) ermittelt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten unter Verwendung verschiedener Substratkonzentrationen erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben. Die K_M -Werte wurden graphisch durch Auftrag der Substratkonzentrationen gegen die Enzymaktivitäten ermittelt. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für die Substrate Nitrit und Hydroxylamin erfolgte mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten. Die Enzym-Kinetik der untersuchten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine ist für jeweils ein biologisches Replikat in Abbildung 15 graphisch dargestellt.

A



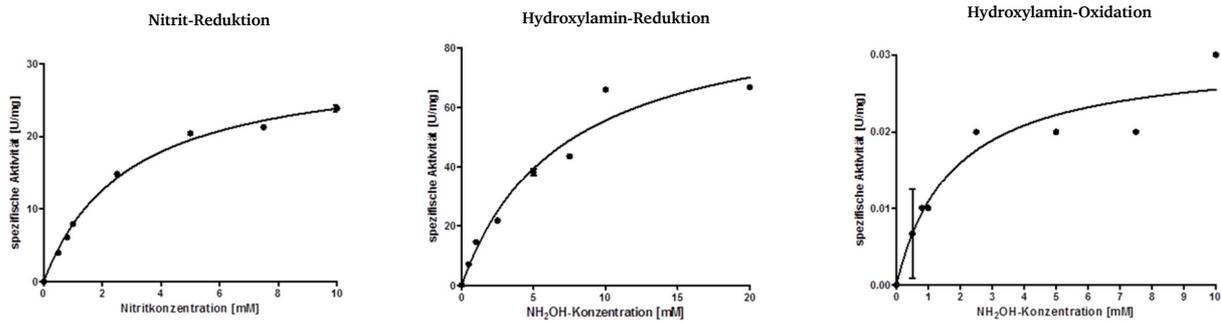
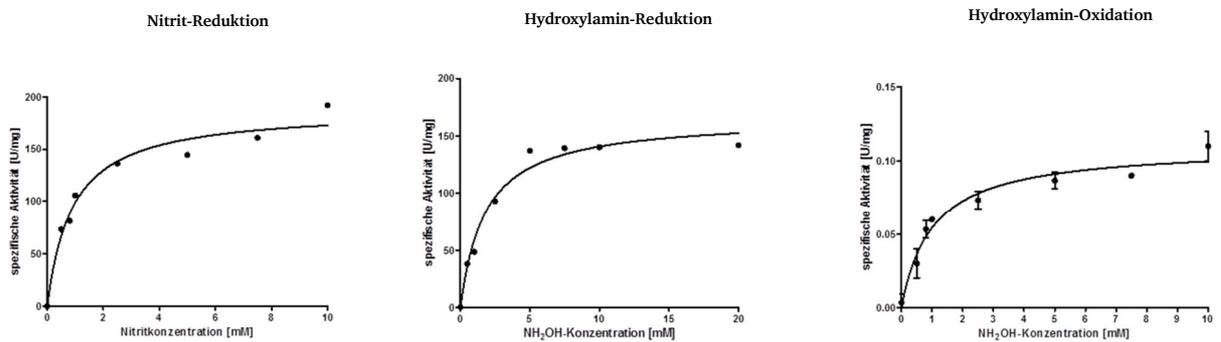
B**C**

Abbildung 15: Enzym-Kinetik von heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen bei der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion sowie der Hydroxylamin-Oxidation. Die Substrataffinitäten der *Cm*Hao (A), *Ccu*Hao (B) und *Cf*Hao (C) wurden durch Zugabe verschiedener Substratkonzentrationen ermittelt. Die Messung der Nitritreduktase- und Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte mit 0; 0,5; 0,8; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 und 10 mM Substratzugabe. Für die Messung der Hydroxylamin-Reduktion wurden Substratkonzentration von 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 und 20 mM verwendet. Die Messung der Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität der *Cm*Hao wurde mit zwei zusätzlichen Substratkonzentrationen (15 und 30 mM) durchgeführt.

Abbildung 15 legt nahe, dass die drei untersuchten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine aus *C. mediatlanticus*, *C. curvus* und *C. fetus* einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik folgen. Die Graphen weisen einen charakteristischen hyperbolen Verlauf auf. In Abbildung 15 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Michaelis-Menten-Kinetik der untersuchten Enzyme überwiegend einen deutlichen Sättigungsbereich aufweist. Innerhalb dieses Sättigungsbereiches erreicht die spezifische Aktivität der Enzyme einen Maximalwert und kann auch durch eine höhere Substratzugabe nicht weiter gesteigert werden (Tab. 11).

Anhand von Tabelle 11 wird ersichtlich, dass für alle untersuchten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine sowohl für die Nitritreduktion als auch die Hydroxylamin-Oxidation vergleichbare K_M -Werte im Bereich von 0,9-2,7 mM ermittelt werden konnten. Hinsichtlich der Hydroxylamin-Reduktion wurden für die *Cm*Hao und *Ccu*Hao deutliche höhere K_M -Werte von 6,0-6,6 mM bestimmt. Lediglich die *Cf*Hao wies innerhalb der Hydroxylamin-Reduktion einen geringeren K_M -Wert von 1,88 mM auf. Im Vergleich dazu wurden für das Substrat Nitrit für *W. succinogenes* NrfA

(*WsNrfA*) und das *NrfA*-Protein aus *E. coli* (*EcNrfA*) deutlich geringere K_M -Werte von 0,08 mM bzw. 0,05 mM ermittelt (Lockwood *et al.*, 2015). Für das Substrat Hydroxylamin wurden hingegen vergleichbare K_M -Werte von 2 mM (*WsNrfA*) bzw. 30 mM (*EcNrfA*) ermittelt (Lockwood *et al.*, 2015).

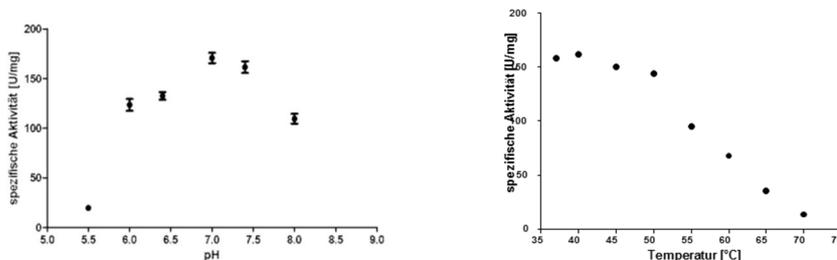
Tabelle 11: K_M -Wert-Bestimmung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten

Protein	K_M -Werte (mM)			v_{max} -Werte (U min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)		
	Nitrit-Reduktion	Hydroxylamin-Reduktion	Hydroxylamin-Oxidation	Nitrit-Reduktion	Hydroxylamin-Reduktion	Hydroxylamin-Oxidation
<i>CmHao</i>	1,46 ± 0,25	6,03 ± 0,45	1,43 ± 0,004	1,21 ± 0,11	211,6 ± 15,7	0,13 ± 0,025
<i>CcuHao</i>	2,66 ± 0,28	6,63 ± 0,56	1,46 ± 0,42	34,9 ± 6,09	95,5 ± 1,3	0,029 ± 0,002
<i>CfHao</i>	0,89 ± 0,014	1,88 ± 0,1	1,02 ± 0,001	181,0 ± 9,9	177,3 ± 15,9	0,074 ± 0,05

4.2.3 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums

Neben der enzymatischen Aktivität und der Michaelis-Menten-Kontante wurde das pH- und Temperatur-Optimum der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine untersucht. Da sowohl der pH-Wert als auch die Temperatur die Aktivität eines Enzyms stark beeinflussen können, sind diese beiden Kenngrößen innerhalb der Charakterisierung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen von großer Bedeutung. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden Puffer mit pH-Werten zwischen 5,5 und 8,0 verwendet. Zur Ermittlung des Temperatur-Optimums wurden die Messansätze bei Temperaturen zwischen 37 °C und 70 °C inkubiert. Die Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums erfolgte mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen sind für jeweils ein biologisches Replikat exemplarisch in Abbildung 16 dargestellt.

A



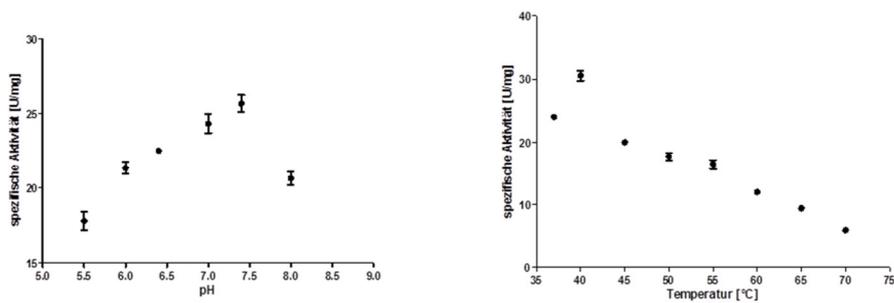
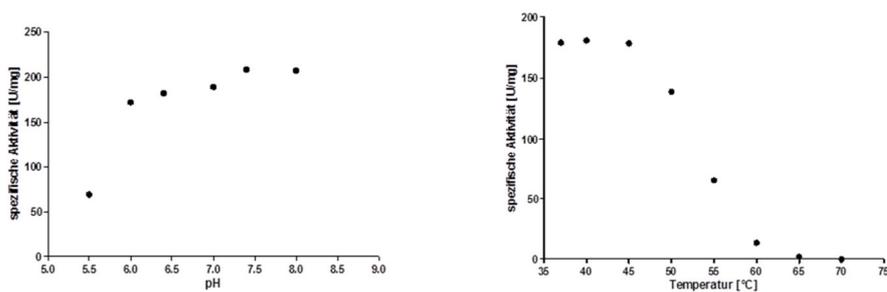
B**C**

Abbildung 16: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen. (A) Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität der *CmHao* bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen, (B) Nitritreduktion der *CcuHao* bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen, (C) Nitritreduktase-Aktivität der *CfHao* bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen.

Die drei untersuchten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine aus *C. mediatlanticus*, *C. curvus* und *C. fetus* wiesen vergleichbare pH- und Temperatur-Optima auf. Sowohl für die *CcuHao* als auch die *CfHao* wurde innerhalb der Nitrit- und Hydroxylaminreduktion ein pH-Optimum im Bereich von pH 7,0-8,0 bestimmt (Tab. 12). Das Temperatur-Optimum der beiden Enzyme konnte in einem Temperaturbereich von 37-50 °C ermittelt werden. Die ϵ Hao aus dem thermophilen Organismus *C. mediatlanticus* wies innerhalb der Hydroxylaminreduktion ein Temperatur-Optimum von 37-50 °C auf. Dieses war mit der *CfHao* und *CcuHao* vergleichbar, sodass trotz der Thermophilie von *C. mediatlanticus* kein erhöhtes Temperatur-Optimum bei der heterolog produzierten *CmHao* nachweisbar war.

Das pH-Optimum der *CmHao* konnte in einem pH-Bereich von 6,5-7,5 bestimmt werden und war damit im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Enzymen nicht signifikant geringer (Tab. 12). Auch bei einem pH-Wert von 8,0 sowie bei pH 5,5 waren Enzymaktivitäten bei den ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen nachweisbar (Abb. 16). Des Weiteren wurden auch bei Temperaturen über 60 °C noch Restaktivitäten detektiert.

Tabelle 12: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen nach Messung von jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten. N/A: keine Messungen aufgrund geringer spezifischer Aktivität durchgeführt.

Protein	Nitrit-Reduktion		Hydroxylamin-Reduktion	
	pH	Temperatur [°C]	pH	Temperatur [°C]
<i>CmHao</i>	N/A	N/A	6,5-7,5	37-50
<i>CcuHao</i>	7,0-8,0	37-45	7,0-8,0	37-45
<i>CfHao</i>	7,0-8,0	37-50	7,0-8,0	37-45

4.2.4 Substrat- und Produktbestimmung

4.2.4.1 Nitritreduktion

Im Rahmen der Charakterisierung der epsilonproteobakteriellen Hydroxylamin-Oxidoreduktasen wurde das Produktspektrum bei der Nitritreduktion bestimmt. Durch photometrische Konzentrationsbestimmungen der Substrate und Produkte ließen sich weitere Rückschlüsse auf die physiologische Funktion der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine ziehen. Die Messung der Nitrit-Reduktase-Aktivität erfolgte wie in Kapitel 3.9.5.1 beschrieben. Anschließend wurden die Messansätze auf Eis gelagert, um die enzymatische Reaktion abzustoppen und einer Nitrit-, Hydroxylamin- sowie Ammoniumbestimmung unterzogen (Kap. 3.8.6-3.8.8). Als Kontrollen wurden Messansätze ohne Substrat aber mit Protein und Messansätze mit Substrat aber ohne Protein mitgeführt. Als Blindwert für die Ammoniumbestimmung wurden Messansätze ohne Substrat aber mit Protein verwendet, um einen Einfluss des zugegebenen Proteins auf die photometrische Messung auszuschließen. Als Positivkontrolle fungierte das NrfA-MBP-Fusionsprotein aus *W. succinogenes* (*WsNrfA-MBP*). Um einen Einfluss des MBP-Tags auf die Messung auszuschließen, wurde ebenfalls die Nitritreduktase NrfA aus *Campylobacter jejuni* mitgeführt, die einen einfachen C-terminalen *Strep*-Tag besitzt (bereitgestellt von Sascha Hein). Die Substrat- und Produktbestimmung der Messansätze erfolgte vor und nach Enzymzugabe mit jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Berechnung der Nitrit-, Hydroxylamin- und Ammoniumkonzentrationen erfolgte mit zuvor erstellten Eichgeraden. Die Ergebnisse der Substrat- und Endproduktbestimmung bei der Nitritreduktion wurden in der nachfolgenden Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Ergebnisse der Substrat- und Endproduktbestimmung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen bei der Nitritreduktion nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Menge des eingesetzten Proteins betrug jeweils 50 μ g. N/A: keine Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Hydroxylamin-Bestimmung wurden aufgrund sehr geringer ermittelter Konzentrationen nicht genauer angegeben.

Protein	Reaktionsansätze vor Proteinzugabe			Reaktionsansätze nach Proteinzugabe			Nitritumsatz zu Ammonium [%]
	Nitrit [mM]	Hydroxylamin [nmol]	Ammonium [μ M]	Nitrit [mM]	Hydroxylamin [nmol]	Ammonium [μ M]	
<i>CmHao</i>	5,65 \pm 0,4	\leq 1.5	N/A	4,61 \pm 0,5	\leq 1.5	74,0 \pm 15,7	7,1
<i>CcuHao</i>	5,56 \pm 0,2	\leq 1.5	N/A	4,34 \pm 0,2	\leq 1.5	433,0 \pm 75,0	35,5
<i>CfHao</i>	5,16 \pm 0,12	\leq 1.5	N/A	4,64 \pm 0,2	\leq 1.5	401,9 \pm 30,6	77,3
<i>W.succ. NrfA</i>	7,51 \pm 0,2	\leq 1.5	N/A	5,44 \pm 0,09	\leq 1.5	359,5 \pm 22,0	17,4
<i>CjNrfA</i>	5,25 \pm 0,3	\leq 1.5	N/A	4,15 \pm 0,4	\leq 1.5	477,6 \pm 38,0	43,4

Bei allen getesteten Proteinen war ein Nitritumsatz zu Ammonium nachweisbar. Die geringste Ammoniumkonzentration wurde bei der *CmHao*-Präparation detektiert, die lediglich 7,1 % des verbrauchten Nitrits zu Ammonium umgesetzt hat. Deutliche höhere Ammoniumkonzentrationen konnten bei der *CcuHao* und *CfHao* photometrisch nachgewiesen werden. Während die *CcuHao* 35,5 % des Nitrits zu Ammonium reduzieren konnte, waren es bei der *CfHao* sogar 77,3 %. Auffällig war jedoch, dass bei der *CfHao* im Vergleich zu den anderen untersuchten Enzymen ein deutlich geringerer Nitritverbrauch von 0,5 mM detektiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei den anderen getesteten Proteinen ein Nitritverbrauch von 1,04-2,07 mM nachgewiesen. Weiterhin wird ersichtlich, dass bei den *CcuHao*-, *CfHao*- und *CmHao*-Präparationen kein kompletter Umsatz des verbrauchten Nitrits zu Ammonium detektiert wurde. Dies war unter den gegebenen Messbedingungen auch bei den beiden Positivkontrollen *WsNrfA* und *CjNrfA* der Fall. Die Reaktionsansätze wurden ebenfalls auf das mögliche Produkt Hydroxylamin getestet. Dieses war jedoch nicht nachweisbar.

4.2.4.2 Hydroxylamin-Oxidation

Das Produktspektrum der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine wurde ebenfalls für die Hydroxylamin-Oxidation untersucht. Die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte wie in Kapitel 3.9.5.2 beschrieben. Nach Hinzufügen der gewünschten Menge an gereinigtem Enzym (50 μ g) wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mM Hydroxylamin gestartet. Die Messansätze wurden insgesamt 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Nachfolgend wurden Nitrit- sowie Hydroxylaminbestimmungen durchgeführt (Kapitel 3.8.7-3.8.8). Als Kontrollen wurden Messansätze ohne Substrat aber mit Protein sowie Messansätze mit Substrat aber ohne Protein mitgeführt. Als Positivkontrolle fungierte die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea* (*NeHao*), die die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit katalysiert (Kap. 2.2.1). Die Substrat- und Endproduktbestimmung der Messansätze erfolgte vor und nach Enzymzugabe mit

jeweils einem biologischen und drei technischen Replikaten. Die Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung sind in 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen bei der Hydroxylamin-Oxidation nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Menge des eingesetzten Proteins betrug jeweils 50 μ g. N/A: keine Messungen durchgeführt.

Protein	Reaktionsansätze ohne Proteinzugabe		Reaktionsansätze nach Proteinzugabe		Hydroxylamin-Oxidation zu Nitrit [%]
	Hydroxylamin [mM]	Nitrit [μ M]	Hydroxylamin [mM]	Nitrit [μ M]	
<i>CmHao</i>	5,5 \pm 0,06	N/A	4,55 \pm 0,01	4,8 \pm 0,25	0,5
<i>CcuHao</i>	4,95 \pm 0,1	N/A	3,66 \pm 0,07	6,7 \pm 0,6	0,5
<i>CfHao</i>	4,49 \pm 0,1	N/A	3,4 \pm 0,06	5,2 \pm 1,2	0,48
<i>NeHAO</i>	3,6 \pm 0,2	N/A	3,02 \pm 0,09	149,0 \pm 0,004	25,7

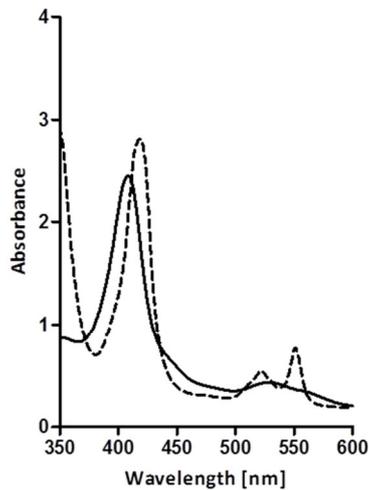
Anhand von Tabelle 14 wird ersichtlich, dass die *CcuHao*-, *CmHao*- und *CfHao*-Präparation vergleichbare Hydroxylaminsätze von 0,95-1,29 mM aufwiesen. Erwartungsgemäß wurden bei den ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen aufgrund einer geringen Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität nur minimale Nitritkonzentrationen von 4,8-6,7 μ M detektiert. Deutlich höhere Nitritkonzentrationen konnten bei der Positivkontrolle *NeHao* photometrisch bestimmt werden. Während die ϵ Hao-MBP Fusionsproteine nur 0,5 % des Hydroxylamins zu Nitrit oxidieren konnten, waren es bei der *NeHao* 25,7 %. Interessanterweise erfolgte bei der Positivkontrolle auch im Rahmen dieser Messungen kein vollständiger Umsatz von Hydroxylamin zu Nitrit. Der unvollständige Hydroxylamin-Umsatz der *NeHao* kongruiert mit den Daten von Hooper und Terry (1979), die experimentell zeigen konnten, dass bei der Hydroxylamin-Oxidation zu Nitrit das Intermediat Stickstoffmonoxid gebildet wird (Hooper & Terry, 1979).

4.2.5 Erstellung von Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie

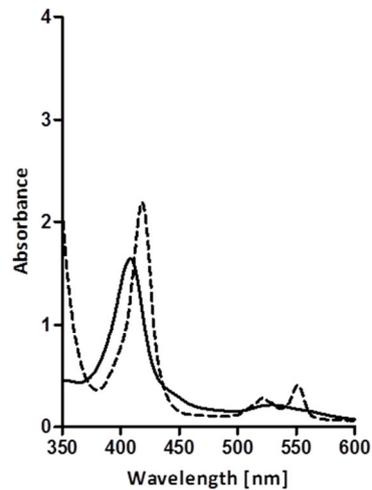
Eine biophysikalische Möglichkeit zur Charakterisierung von Multihäm Cytochrom *c* Proteinen bietet die UV/Vis-Spektroskopie. Durch Vorhandensein kovalent gebundener Hämgruppen in den ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen war es mit Hilfe dieser Methode möglich, charakteristische Cytochrom *c*-Absorptionsspektren zu erstellen. Dabei haben sowohl der Oxidationszustand der Proteine sowie die Eisen-Koordinationsphäre erheblichen Einfluss auf die Form und Lage der Absorptionsbanden. Die Absorptionseigenschaften der mittels Affinitätschromatographie gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine wurden im oxidierten und reduzierten Zustand in einem Wellenlängenbereich von 300-800 nm analysiert. Die Messung der Spektren mit oxidiertem Protein erfolgte direkt nach der Reinigung mit 1 ml verdünnter Proteinlösung (5-8 μ M), wobei die Oxidation der Probe durch den Luftsauerstoff gewährleistet wurde. Zur Messung der

reduzierten Form wurde die Proteinlösung zusätzlich mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt.

A



B



C

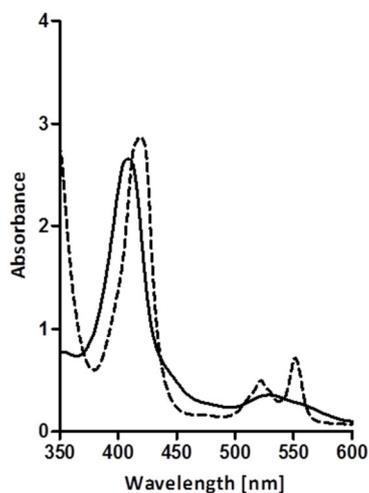


Abbildung 17: UV/Vis-Absorptionsspektren von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen. Schwarze Linie: oxidiertes Zustand, Gestrichelte Linie: reduzierter Zustand nach Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit. (A) *CmHao*, (B) *CcuHao*, (C) *CfHao*.

Die drei in Abbildung 17 gezeigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine besitzen ein klassisches Cytochrom *c*-Spektrum. In der reduzierten Form weisen die *CmHao*, *CcuHao* und *CfHao* Maxima bei 418-420 nm (Soret-Bande), 522 nm (β -Bande) und 551 nm (α -Bande) auf. In der oxidierten Form sind die Absorptionsbanden des Spektrums leicht verschoben. Die Soret-Bande ist im oxidierten Zustand

mit einem Maximum von 408-409 nm am stärksten ausgeprägt. Weiterhin ist ein lokales Maximum bei etwa 530 nm zu erkennen.

4.2.6 Bestimmung der Multimerisierungseigenschaften von ϵ Hao-MBP

Fusionsproteinen mittels analytischer Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde zur Bestimmung der Multimerisierungszustände von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen verwendet und wie in Kapitel 3.7.7.2 beschrieben durchgeführt. Für die analytische Gelfiltration wurde eine Sephadex 200 10/300 GL Säule eingesetzt, die an einen ÄKTApurifier angeschlossen wurde. Durch die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Proteinen bekannter Größe (Ovalbumin, BSA, Aldolase, Katalase, Ferritin, Blue Dextran 2000) ließen sich die apparenten Molekülgrößen der zu untersuchenden Proteine über das Retentionsvolumen berechnen (Abb. 18). Dabei verhielt sich die Molekülgröße umgekehrt proportional zum Elutionsvolumen.

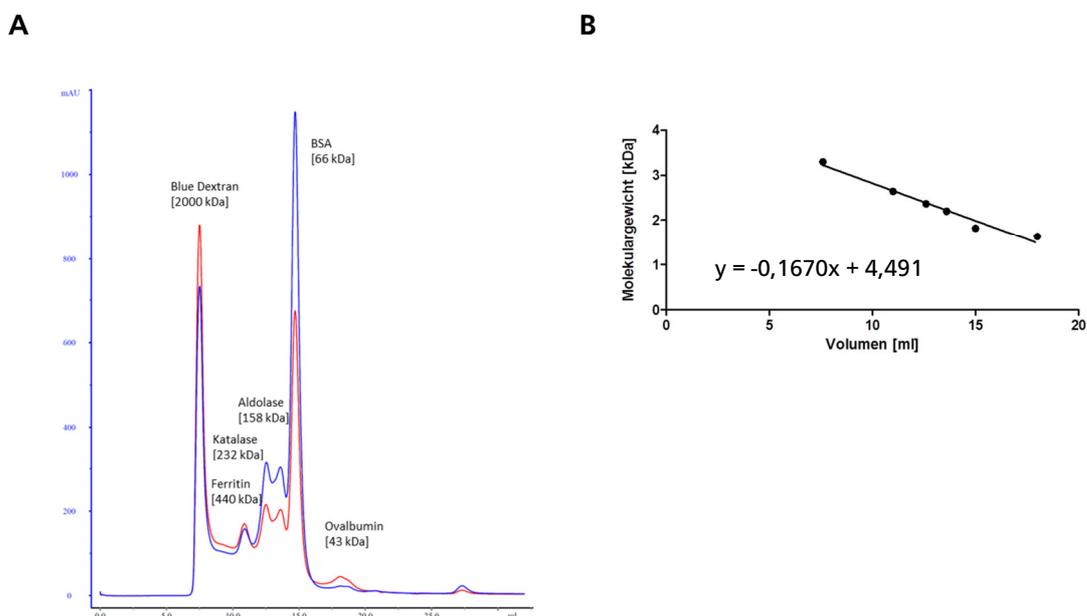


Abbildung 18: (A) Analytische Gelfiltration mit den Kalibrierproteinen Blue Dextran, Ferritin, Katalase, Aldolase, BSA und Ovalbumin. Rot: Absorption bei 260 nm, Blau: Absorption der eluierten Proteinfractionen bei 280 nm. (B) Eichgerade für die Bestimmung der Multimerisierungszustände von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen. Die Erstellung der Eichgerade wurde mit dem Programm GraphPad Prism 5 durchgeführt.

Die analytische Gelfiltration erfolgte mit jeweils einem biologischen Replikat der Proteine *CmHao*, *CcuHao* und *CfHao* (Abb. 19). Pro Lauf wurden 400 μ l gereinigtes Protein (*CmHao*: 1200 μ g, *CfHao*: 2040 μ g, *CcuHao*: 2200 μ g) auf eine äquilibrierte Sephadex 200 Säule aufgetragen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,4 ml min⁻¹, um eine möglichst gute Trennung der verschiedenen

Multimerisierungszustände zu erreichen. Die Absorptionen der eluierten Proteinfractionen wurden mit Hilfe eines UV-Vis Monitors bei 260 nm, 280 nm und 410 nm bestimmt.

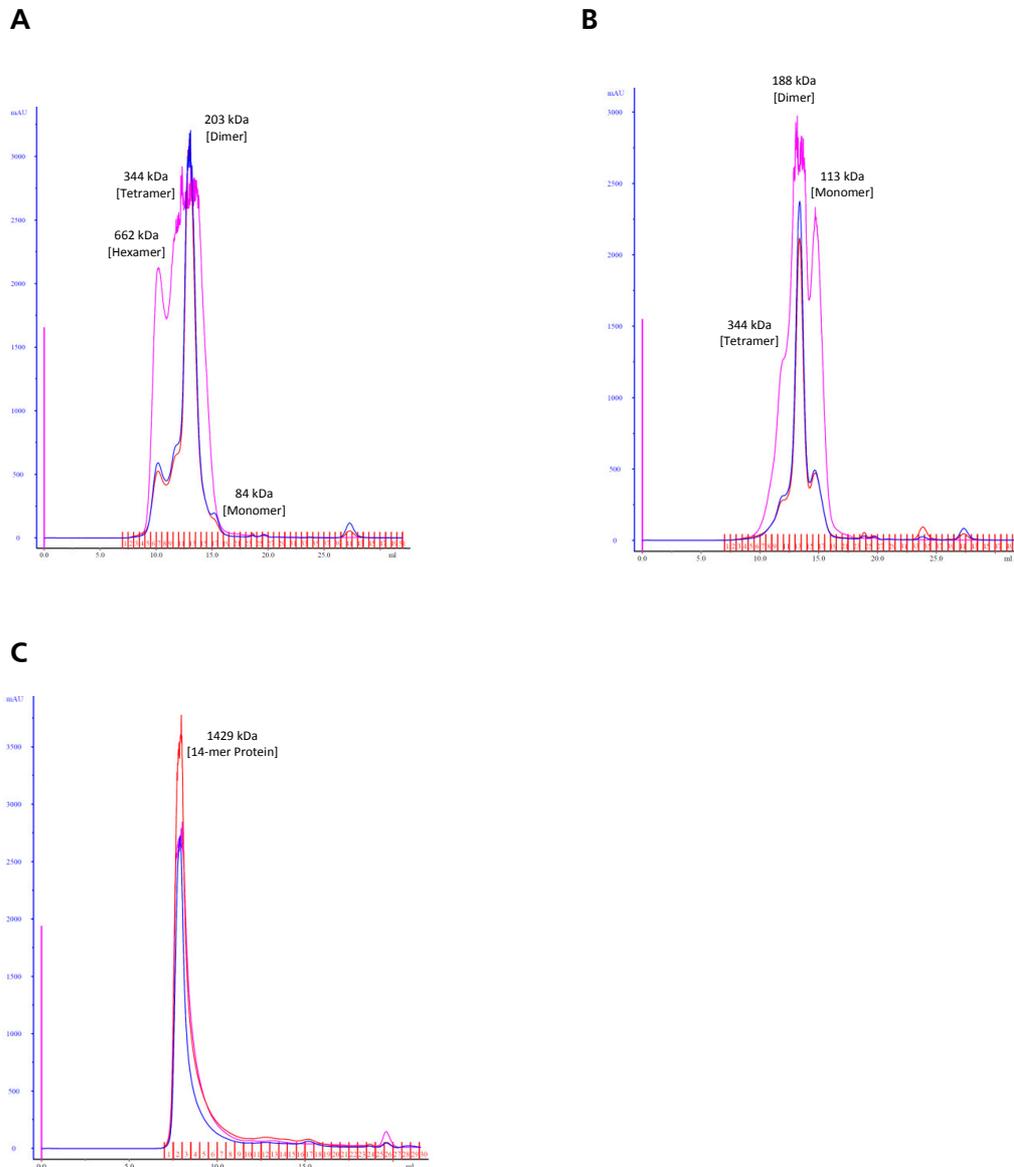


Abbildung 19: Analytische Gelfiltration von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen. Rot: Absorption bei 260 nm, Blau: Absorption der eluierten Proteinfractionen bei 280 nm, Rosa: Absorption bei 410 nm. Die analytische Gelfiltration erfolgte mit den Fusionsproteinen *CcuHao* (A), *CfHao* (B) und *CmHao* (C).

Die Analyse des Fusionsproteins *CcuHao* zeigte, dass dieses ein Elutionsprofil mit einer dominanten Proteinspezies bei 203 kDa aufwies. Diese Proteinspezies entspricht einem dimeren Multimerisierungsgrad (Abb. 19 A). Weiterhin konnte in dem Elutionsprofil ein vermeintliches Monomer bei etwa 84 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde für das ϵ Hao-MBP Fusionsprotein *CcuHao* ein hexamerer Multimerisierungszustand ermittelt. Das Fusionsprotein *CfHao* besaß ein ähnliches Elutionsprofil mit einem dominierenden Hauptpeak bei 188 kDa, was einem dimeren Multimerisierungsgrad entspricht (Abb. 19 B). Auch nach Analyse der *CfHao*-Präparation wurde

im entsprechenden Elutionsprofil ein Monomer bei 113 kDa nachgewiesen. Das Elutionsprofil der *CmHao*-Präparation (Abb. 19 C) zeigt einen dominanten Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von 7-8 ml, was einem apparenten Molekulargewicht von 1429 kDa und damit möglicherweise einem Tetradecamer (MW Tetradecamer: 1358 kDa) entspricht. Dieses Ergebnis deutet auf einen hohen Anteil an in Lösung befindlichen Aggregaten hin. Diese vermeintlichen Aggregate konnten durch verminderte Proteinkonzentrationen, erhöhte Salzkonzentrationen (0,7 M) sowie eine zusätzliche DTT- und Octyl- β -D-glucopyranosid-Zugabe nicht aufgelöst werden.

4.2.7 Blau-Nativ-Elektrophorese (BN-PAGE)

Die Analyse der gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine unter nativen Bedingungen erfolgte mit Hilfe der Blau-Nativ-Gelelektrophorese (Kapitel 3.8.4). Für die drei Fusionsproteine *CcuHao*, *CfHao* und *CmHao* konnten Unterschiede hinsichtlich des Multimerisierungsgrads beobachtet werden. Diese Unterschiede, welche mittels analytischer Gelfiltration nachgewiesen werden konnten (Kap. 4.2.6), sollten nachfolgend in einer BN-PAGE näher untersucht werden (Abb. 20).

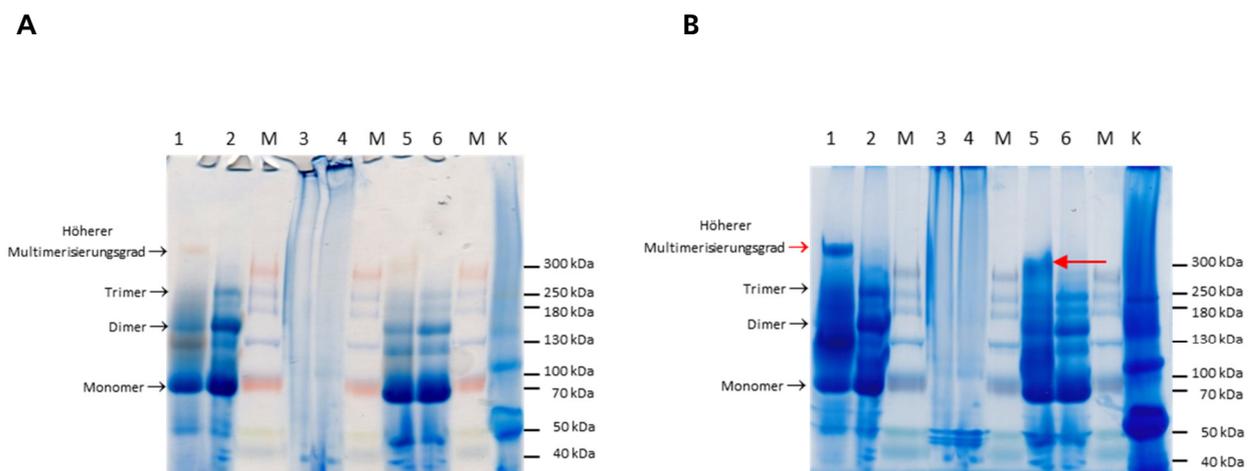


Abbildung 20: BN-PAGE der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine. Die Proteine wurden in einem 3-12 %igen BN-Gel separiert. Die apparenten Molekulargewichte der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine wurden anhand des verwendeten Markers (Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Thermo Scientific) ermittelt. Als weiterer interner Größenstandard wurden die Kalibrierproteine Ovalbumin, BSA, Aldolase, Katalase, Ferritin und Blue Dextran 2000 verwendet. (1) *CfHao*, (2) *CfHao_V422Y* (Kap. 4.7.7), (3) *CmHao*, (4) *CmHao_V450Y* (Kap. 4.7.7), (5) *CcuHao*, (6) *CcuHao_V414Y* (Kap. 4.7.7), (K) Kalibrierproteine. (A) Detektion der Multimerisierungszustände mit dem Farbstoff SERVA Blau R; (B) Detektion höherer Multimerisierungszustände nach erneuter Färbung des nativen Gels mit dem Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G250. Die entsprechenden Proteinbanden wurden mit roten Pfeilen hervorgehoben.

Die Fusionsproteine *CfHao* und *CcuHao* können über einen weiten Molekulargewichtsbereich des nativen Gels detektiert werden (Abb. 20). Bei diesen beiden Proteinen sind dominante Monomere (~ 97 kDa) und vermeintliche Dimere nachweisbar. Weiterhin konnten bei den Fusionsproteinen *CcuHao* und *CfHao* höhere Multimerisierungszustände beobachtet werden. Diese höheren Multimerisierungszustände konnten unter Verwendung des Farbstoff SERVA Blau R nicht

angefärbt werden, sondern behielten die für Cytochrom *c* Proteine charakteristische rote Farbe im BN-Gel. Erst durch eine erneute Färbung des nativen Gels mit Coomassie® Brilliant Blue G250 konnten die höheren Multimerisierungszustände eindeutig detektiert werden (Abb. 20 B). Mit Hilfe der BN-PAGE konnten noch weitere Banden identifiziert werden. Hierbei handelt es sich jedoch vermutlich um Abbauprodukte der Zielproteine oder um Multimerisierungszustände, bei denen die MBP-Affinitätstags teilweise abgespalten wurden. Die Ergebnisse, welche im Rahmen der analytischen Gelfiltration für die Proteine *CfHao* und *CcuHao* ermittelt wurden, konnten mit Hilfe der Blau-Nativ-Elektrophorese verifiziert werden. Im Fall des Fusionsproteins *CmHao* konnte keine erfolgreiche BN-PAGE durchgeführt werden, da dieses Protein nicht in das native Gel einlief. Eine mögliche Ursache dafür ist das ermittelte apparente Molekulargewicht von 1429 kDa, welches die Porengröße des 3-12 %igen Geles übersteigt, sodass das Protein vermutlich im Sammelgel zurückgehalten wurde. Weiterhin ist denkbar, dass ein hoher isoelektrischer Punkt (pI) der *CmHao* zu einer positiven Ladung des Proteins führt, die den Einlauf des Proteins in das Gel verhindert.

4.2.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Der isoelektrische Punkt, welcher proteinspezifisch ist und durch die Anzahl basischer und saurer Aminosäuren beeinflusst wird, ist eine wichtige Kenngröße innerhalb der Charakterisierung von Proteinen. Bei der isoelektrischen Fokussierung wird durch die Verwendung von niedermolekularen, zwitterionischen Trägerampholyten ein pH-Gradient im Gel erzeugt. Die zu untersuchenden Proteine wandern im Gel bis zu dem pH Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entspricht. Die Mobilität der Proteine im Gel hängt dabei von ihrer Eigenladung ab. Da bei Erreichen des pI die Ladung des Proteins gleich null ist, bewegt sich das Protein im Gel nicht mehr. Die isoelektrische Fokussierung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine *CmHao*, *CcuHao*, und *CfHao* wurde wie in Kapitel 3.8.5 beschrieben durchgeführt und ist in Abbildung 21 dargestellt. Für die Fusionsproteine *CfHao* und *CcuHao* wurden vergleichbare isoelektrische Punkte im Bereich von pI 7,0-8,0 ermittelt. Darüber hinaus konnten mehrere zusätzliche Banden im pI-Bereich von 4,7-6,0 detektiert werden. Das Fusionsprotein *CmHao* wies einen etwas höheren isoelektrischen Punkt von 8,3 auf. Auch bei diesem Protein wurden weitere diskrete Banden im Bereich von pI 5,3-8,0 detektiert (Abb. 21). Somit ist denkbar, dass das Vorhandensein mehrerer Multimerisierungszustände unterschiedliche pI-Werte der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine bedingt.

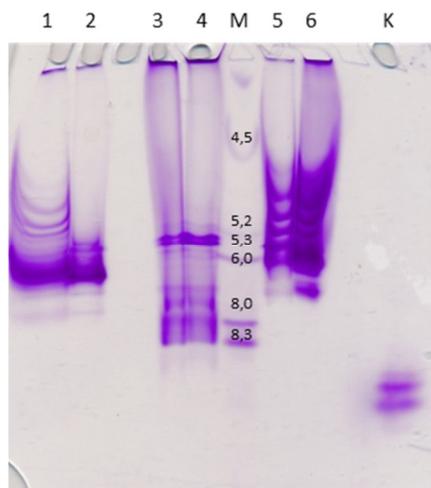


Abbildung 21: Isoelektrische Fokussierung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen. Die Proteine wurden in einem Gel mit pH-Werten von 3-10 separiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem Farbstoff SERVA Violet 17. Die apparenten isoelektrischen Punkte der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine wurden anhand des verwendeten Markers (SERVA IEF Marker 3-10) ermittelt. Als weiterer interner Größenstandard wurde das Protein RNase A mit einem pI von 9,5 verwendet. (1) *CfHao*, (2) *CfHao_V422Y* (Kap. 4.7.8), (3) *CmHao*, (4) *CmHao_V450Y* (Kap. 4.7.8), (5) *CcuHao*, (6) *CcuHao_V414Y* (Kap. 4.7.8), (K) RNase A.

4.3 Heterologe Produktion und Charakterisierung der ϵ Hao aus *Nautilia*

profundicola (*NpHao*)

Die Produktion der *NpHao* wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten von Dr. Melanie Kern mit dem Expressionsplasmid pMK1 durchgeführt (Tab. 5). Der erstellte *W. succinogenes* Stamm MK1-*NpHao kan napA::cat* wies jedoch nur eine sehr geringe Proteinproduktion auf, sodass eine Reinigung des Proteins nicht möglich war. Da es sich bei *Nautilia profundicola* jedoch ebenfalls um ein Tiefsee-Bakterium handelt, wurde erneut versucht das Protein mit dem Expressionsplasmid pTMH zu produzieren, um die *NpHao* und die *CmHao* vergleichend zu charakterisieren. Als Matrize für die Konstruktion des Vektors pTMH-*NpHao* (Kap. 3.5.8.2) wurde das Plasmid pMK1-*NpHao* genutzt (Kap. 3.2.2). Die Amplifikation des *haoA* Gens aus *N. profundicola* aus dem Ausgangsvektor pMK1-*NpHao* erfolgte unter Verwendung des Primerpaares BsaICmHaoOp-F/BsaICmHaoOp-R (Kap. 3.2.3 und 3.5.9). Die Erstellung des *W. succinogenes* Stammes *NpHao-MBP kan* sowie die Kultivierung und Charakterisierung entsprechender Transformanden wurden wie in den Kapiteln 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben durchgeführt. Die Produktion des fusionierten Zielproteins wurde mit SDS-PAGE und nachfolgender Häm-Färbung nachgewiesen. Zellen eines positiven Transformanden wurden anschließend im Maßstab von 50 l Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mit Tangentialfiltration (Kapitel 3.4.4) geerntet und nachfolgend mittels French Press aufgeschlossen (Kapitel 3.4.5). Die anschließende Reinigung des periplasmatisch lokalisierten Zielproteins wurde wie in Kapitel 3.7.6.3 beschrieben durchgeführt. Sowohl in Zellsuspensionen als auch den Elutionsfraktionen

konnte erstmals mittels Coomassie- und Häm-Färbung das Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 100 kDa und das MBP-freie Zielprotein mit einer Größe von etwa 57 kDa nachgewiesen werden (Abb. 22). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Bandenmuster der *NpHao* und *CmHao* im SDS-Gel im Vergleich zu anderen ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen identisch waren (Abb. 22 D).

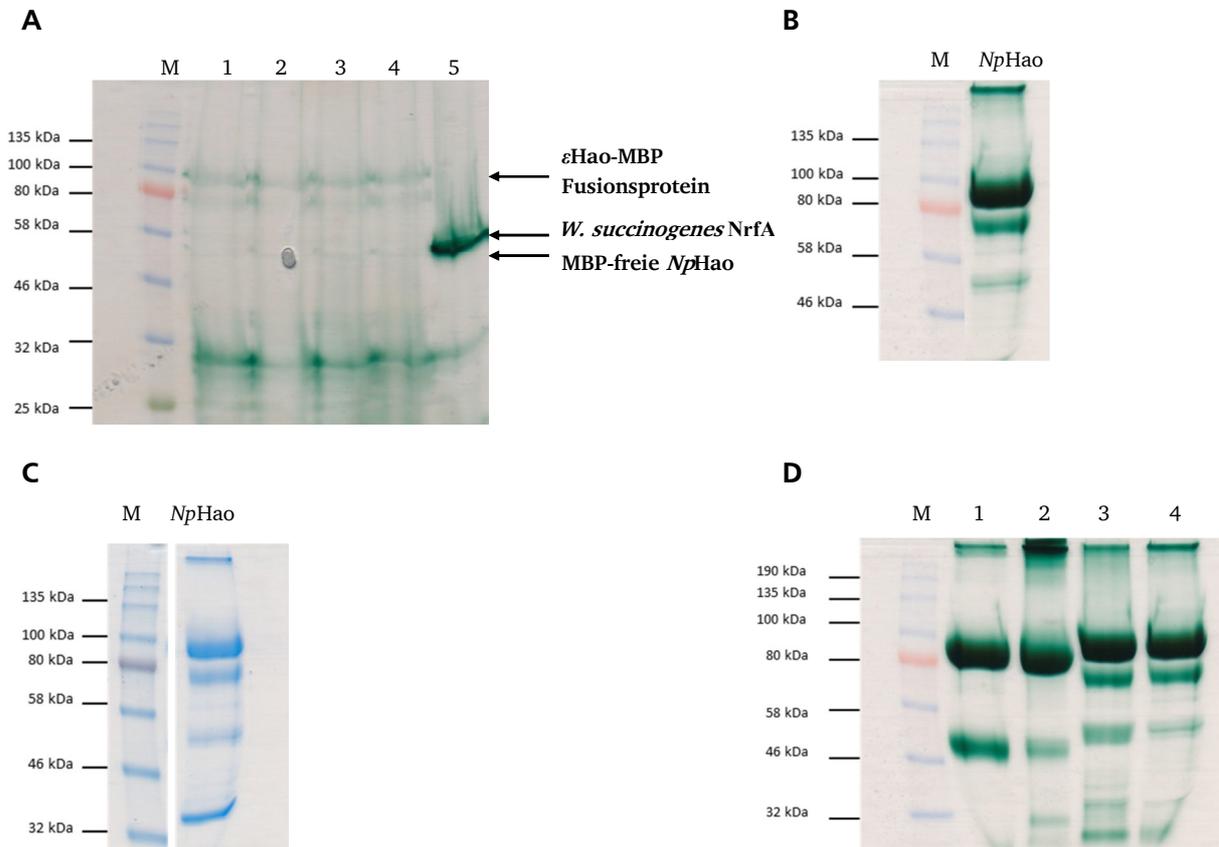


Abbildung 22: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen, 200 μ g Probe pro Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1-4, *NpHao*-Transformanten 1-4 ; Spur 5, *W. succinogenes napA::cat* (150 μ g); (B) Häm-Färbung des gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteins *NpHao*, 30 μ g Probe pro Spur; (C) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao aus *N. profundicola*, 7,5 μ g Probe pro Spur; (D) Bandenmuster der gereinigten *NpHao*- und *CmHao*-Präparationen im SDS-Gel (10 % ig) im Vergleich zu anderen ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen, 30 μ g Protein pro Spur; Spur 1, *CcuHao_V414Y*; Spur 2, *CfHao_V422Y*; Spur 3, *CmHao_V450Y*; Spur 4, *NpHao*.

Das mittels MBP-Affinitätschromatographie gereinigte Fusionsprotein *NpHao* wurde nachfolgend hinsichtlich der Enzymaktivitäten untersucht. Die Messung der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität erfolgte hierbei durch Zugabe des Dithionit-reduzierten künstlichen Elektronendonors Benzylviologen, dessen Oxidation bei 546 nm photometrisch bestimmt werden konnte (Kap. 3.9.1). Die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität wurde wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben durchgeführt. Für die Ermittlung der Reduktase- und Oxidase-Aktivität wurden Messungen mit einem biologischen und drei technischen Replikaten durchgeführt (Kapitel 3.9.1).

und 3.9.2). Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen (Tab. 15) wurden unter Berücksichtigung der bereits analysierten Kontrollproteine *WsNrfA*-MBP und *NeHao* ausgewertet (Werte aus Tab. 10 entnommen).

Tabelle 15: Spezifische Aktivitäten des ϵ Hao-MBP Fusionsproteins *NpHao* nach Messung von einem biologischen und drei technischen Replikaten. Die Werte der Proteine *CmHao*, *WsNrfA* und *NeHao* wurden aus Tabelle 10 entnommen.

Protein	Spezifische Aktivität (U min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)		
	Nitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydroxylamin Oxidation
<i>NpHao</i>	1,2 ± 0,1	29,0 ± 1,0	≤ 0,01
<i>CmHao</i>	1,0 ± 0,02	158,0 ± 2,0	0,1 ± 0,03
<i>WsNrfA</i>	1066,0 ± 27,0	159,0 ± 6,0	≤ 0,01
<i>NeHao</i>	0,55 ± 0,02	13,0 ± 0,4	4,1 ± 0,13

Anhand von Tabelle 15 wird ersichtlich, dass das getestete ϵ Hao-MBP Fusionsprotein *NpHao* sowohl Nitrit als auch Hydroxylamin reduzieren konnte. Obwohl die gemessenen Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivitäten der *NpHao* mit den spezifischen Aktivitäten der *CmHao* vergleichbar waren, wurden unter Berücksichtigung der Positivkontrolle *W. succinogenes* NrfA-MBP signifikant geringere spezifische Aktivitäten ermittelt. Während die Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität im Vergleich zur Positivkontrolle lediglich um den Faktor 5 erniedrigt war, wurde innerhalb der Nitritreduktion eine um nahezu drei Größenordnungen geringere spezifische Aktivität detektiert. Im Vergleich zum Kontrollprotein *NeHao* konnte jedoch mit der *NpHao* unter den gegebenen Messbedingungen keine Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der ermittelten Enzymaktivitäten wird deutlich, dass keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen der *NpHao* und *CmHao* bestehen bzw. nachweisbar waren. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da die beiden Proteine auch hinsichtlich der Primärstruktur eine hohe Identität von 81 % aufweisen (Kap. 7.3).

4.4 Heterologe Produktion und Reinigung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine

CmHao_W464Y, *CcuHao_W428Y* und *CfHao_W434Y*

Mit Hilfe eines aktuellen HaoA-Alignments sowie einer bisher unveröffentlichten Kristallstruktur der ϵ Hao aus *C. curvus* (Diplomarbeit Michael B. Braun, Universität Freiburg) konnten entscheidende Erkenntnisse hinsichtlich der distalen Häm *c* Eisenliganden gewonnen werden. Die Häm *c* Eisenliganden der ϵ Hao wurden nachfolgend mit denen der Hao aus *N. europaea* verglichen. Mit diesem Vergleich sollte die Position des speziellen *NeHao*-Tyrosins innerhalb der HaoA-Sequenzen identifiziert werden, um anschließend dieses Tyrosin an einer zur *NeHao* äquivalenten Position in ausgewählte ϵ Hao Sequenzen einfügen zu können. Der Tyrosin Cross-Link befindet sich innerhalb der Hao der Nitrifizierer acht Aminosäuren stromabwärts des Häm 7

ligandierenden Histidinrests (HX₇Y), der jedoch in allen untersuchten εHao Proteinen fehlt (Abb. 23). An dessen Position befindet sich in den εHao Sequenzen der konservierte distale Häm 7 Ligand Methionin, der acht Aminosäuren stromabwärts (MX₇W) die konservierte Aminosäure Tryptophan (W428 in *C. curvus*) aufweist. Dieser Tryptophanrest wurde nachfolgend gegen ein Tyrosin getauscht.

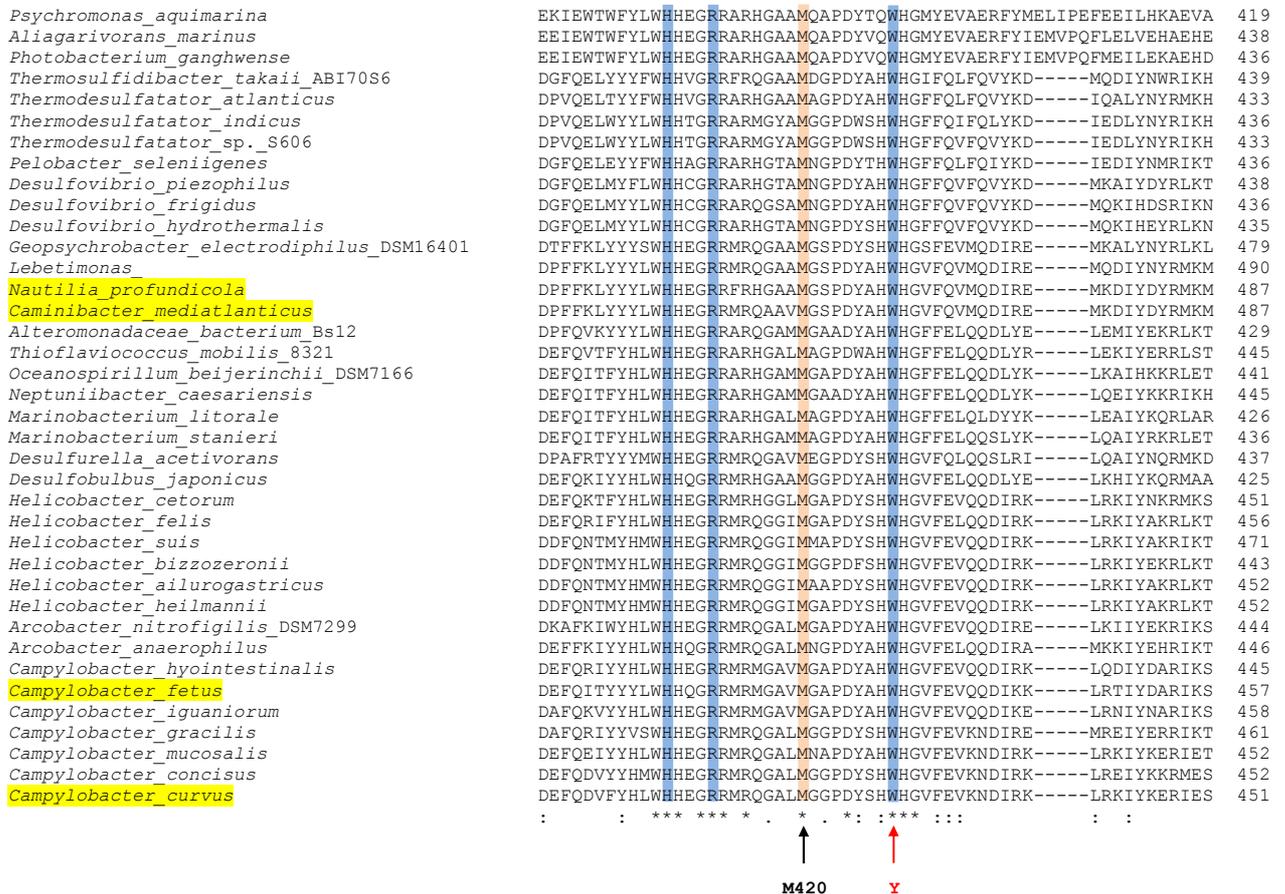


Abbildung 23: Partieller Sequenzvergleich von ausgewählten HaoA-Proteinen (Ausschnitt des Anhangs 7.1). Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal Omega (Version 1.2.3) erstellt und manuell bearbeitet, wobei die einzelnen Aminosäuren im Einbuchstabencode dargestellt wurden. Die Aminosäure Methionin M420 (*C. curvus*-Nummerierung) wurde als distaler Häm c Eisenligand in *C. curvus* identifiziert (rosa hinterlegt). Die blau-markierten Aminosäuren H408, R412 und W428 befinden sich in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums. Der Buchstabe "Y" (rot dargestellt) kennzeichnet innerhalb der εHao Sequenzen den Bereich, an dessen Position sich in der Hao der nitrifizierenden Bakterien die Aminosäure Tyrosin befindet. Organismen, deren HaoA-Proteine innerhalb dieser Arbeit untersucht wurden, sind gelb hervorgehoben.

Die Konstruktion der Plasmide pTMH-CmHao_W464Y, pTMH-CcuHao_W428Y und pTMH-CfHao_W434Y wurde wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Bezeichnung der εHao-MBP Varianten erfolgte unter Berücksichtigung der endogenen Signalsequenzen, die jedoch durch die *nrfA*-Signalsequenz von *W. succinogenes* ersetzt wurden.

Die Produktion der Zielproteine wurde mit SDS-PAGE und nachfolgender Häm-Färbung nachgewiesen. Zellen positiver Transformanden wurden anschließend in 3x10¹¹ l

Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mittels Tangentialfiltration (Kapitel 3.4.4) geerntet und nachfolgend zentrifugiert. Die Reinigung der periplasmatisch lokalisierten Zielproteine mittels MBP-Affinitätschromatographie wurde wie in Kapitel 3.7.6.3 beschrieben durchgeführt. Sowohl in Zellsuspensionen als auch Elutionsfraktionen konnte mittels Coomassie- und Häm-Färbung das jeweilige Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 100 kDa und das MBP-freie Zielprotein mit einer Größe von etwa 57 kDa erfolgreich nachgewiesen werden (exemplarisch in Abb. 24 dargestellt).

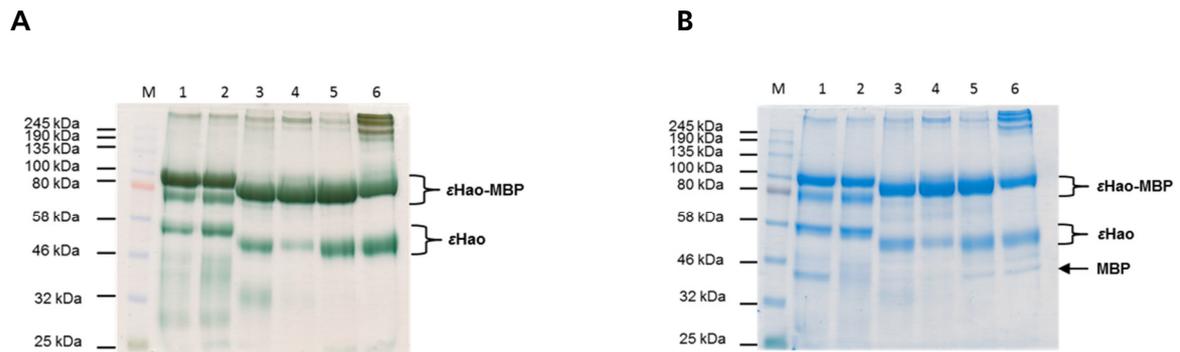


Abbildung 24: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 30 μ g Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, *CmHao*; Spur 2, *CmHao_W464Y*; Spur 3, *CfHao*; Spur 4, *CfHao_W434Y*; Spur 5, *CcuHao*; Spur 6, *CcuHao_W428Y*, (B) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 7,5 μ g Probe pro Spur.

Das heterolog in *W. succinogenes* produzierte ϵ Hao-MBP Fusionsprotein *CcuHao_W428Y* wies neben den zu erwartenden Proteinbanden bei 57 kDa und 100 kDa weitere mögliche Multimerisierungszustände bei über 245 kDa auf (Abb. 24). Um zu prüfen ob es sich bei diesen zusätzlichen Proteinbanden um Aggregate des Zielproteins handelt oder aber ein trimerer Multimerisierungszustand des Fusionsproteins *CcuHao_W428Y* vorliegt, wurde nachfolgend das Maltose-Binde-Protein unter Zugabe der TEV-Protease vom Zielprotein abgespalten. Die Proteolyse des gereinigten Fusionsproteins *CcuHao_W428Y* erfolgte in einem Standard-Äquilibriumspuffer (Kap. 3.7.6.4). Um aussagekräftige Resultate zu erhalten, wurden 100 μ g gereinigtes Fusionsprotein mit 4 μ g TEV-Protease versetzt und drei Stunden bei 30 °C leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung mit Mercaptoethanol versetzt und 30 Minuten bei 95 °C hitzebehandelt, um eine vollständige Reduktion und Denaturierung des Proteins zu gewährleisten. Das Ergebnis der Proteolyse und Denaturierung wurde anschließend mittels SDS-PAGE sowie Coomassie- und Häm-Färbung überprüft (Abb. 25).

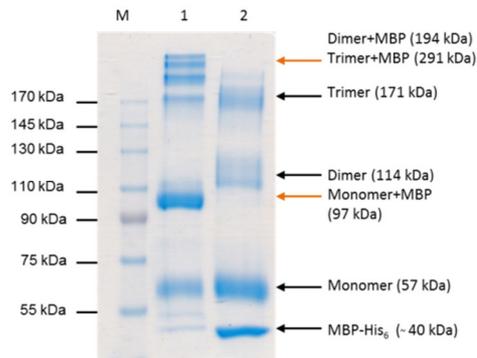
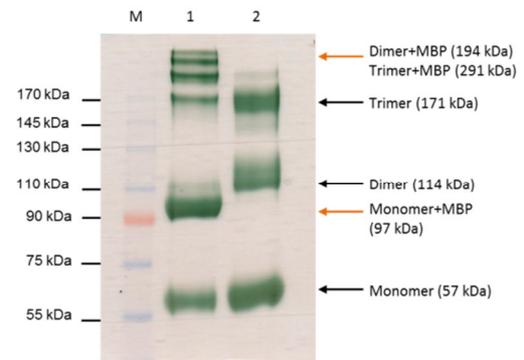
A**B**

Abbildung 25: SDS-PAGE (7,5 % iges Polyacrylamid-Gel) des gereinigten Fusionsproteins *CcuHao_W428Y* vor und nach Zugabe der TEV-Protease, M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, *CcuHao_W428Y* vor Zugabe der TEV-Protease; Spur 2, *CcuHao_W428Y* nach Zugabe der TEV-Protease und dreistündiger Inkubation bei 30 °C, (A) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteins *CcuHao_W428Y*, 7,5 μ g Probe in jeder Spur. (B) Häm-Färbung der ϵ Hao-MBP Variante *CcuHao_W428Y* vor und nach Proteolyse des Maltose-Binde-Proteins, 7,5 μ g Probe pro Spur.

Nach Auftrennung der behandelten Proteinproben im SDS-Gel konnten vor und nach Zugabe der TEV-Protease erhebliche Unterschiede innerhalb des Bandenmusters detektiert werden. Anhand von Abbildung 25 wird deutlich, dass es sich bei den zusätzlich auftretenden Proteinbanden vermutlich um monomere, dimere und möglicherweise trimere Multimerisierungszustände des Zielproteins handelt. Der durchgeführte Aminosäureaustausch könnte somit in diesem Fall entscheidenden Einfluss auf die Faltung oder Multimerisierung des Proteins genommen haben. Inwieweit diese mögliche Trimerisierung auf eine kovalente Anheftung einer weiteren Untereinheit und somit auf die Ausbildung eines Tyrosin Cross-Links zurückzuführen ist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Jedoch führten eine erhöhte Zugabe des Reduktionsmittels Mercaptoethanol, eine 30 minütige Hitzebehandlung bei 99 °C sowie erhöhte Salzkonzentrationen nicht zu einer Veränderung des Bandenmusters im SDS-Gel. Überraschenderweise wurde neben dem Monomer und potenziellen Trimer auch der dimere Multimerisierungsgrad des Proteins im SDS-Gel nachgewiesen. Die Ausbildung eines Dimers konnte bei der Hao aus *N. europaea*, welche einen Tyrosin Cross-Link besitzt, nicht gezeigt werden (Kap. 4.9.6; Abb. 41 C).

Auch die heterolog in *W. succinogenes* produzierten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine *CfHao_W434Y* und *CmHao_W464Y* wurden auf weitere mögliche Multimerisierungszustände mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie- sowie Häm-Färbung überprüft. Während die Mutante *CmHao_W464Y* keine zusätzlichen Proteinbanden aufwies, wurden im Fall der *CfHao_W434Y* neben den zu erwartenden Proteinbanden bei 57 kDa und 100 kDa weitere mögliche

Multimerisierungszustände bei über 245 kDa detektiert (Abb. 26). Diese zusätzlichen Banden waren allerdings nur bei ganzen Zellen nachweisbar (Abb. 26) und waren nach Reinigung des Proteins nicht mehr vorhanden (Abb. 24 A und B). Ursächlich hierfür könnte ein Abbau der Proteinspezies innerhalb des Reinigungsvorgangs sein.

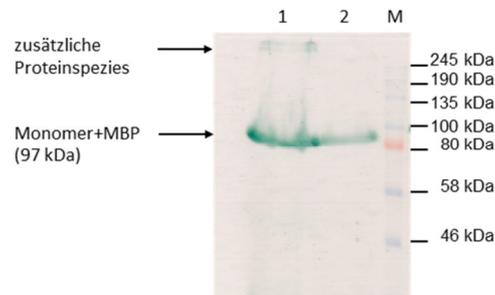


Abbildung 26: SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von ganzen Zellen der Mutante *W. succinogenes* Cfhao_W434Y-MBP kan, 200 µg Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, Cfhao_W434Y-Transformand 1; Spur 2, Cfhao_W434Y-Transformand 2.

4.5 Charakterisierung der εHao-MBP Fusionsproteine Cmhao_W464Y,

CcuHao_W428Y und Cfhao_W434Y

4.5.1 Enzymaktivitätsmessung mit verschiedenen Substraten

Die mittels MBP-Affinitätschromatographie gereinigten εHao-MBP Varianten aus *C. curvus*, *C. fetus* und *C. mediatlanticus* wurden im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten untersucht. Als potenzielle Substrate für die Reduktase-Aktivität wurden Nitrit, Hydroxylamin, Natriumsulfit und Hydrazin verwendet. Die Messung der Reduktase-Aktivitäten erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm nach Zugabe des artifiziellen Elektronendonors Benzylviologen oder des Reduktionsmittels Titancitrat. Die Messung der Oxidase-Aktivität unter Verwendung des Substrats Hydroxylamin wurde ebenfalls photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm durchgeführt. Das NrfA-MBP-Fusionsprotein aus *W. succinogenes* (*WsNrfA*-MBP) wurde als Kontrolle für die Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität mitgeführt. Als Positivkontrolle für die Hydroxylamin-Oxidation fungierte die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea*. Die Ermittlung der Reduktase- und Oxidase-Aktivitäten erfolgte in mehreren voneinander unabhängigen Messungen mit jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten (Kapitel 3.9.1 und 3.9.2). Für die Substrate Hydrazin und Natriumsulfit konnte mit keinem getesteten Enzym unter den gegebenen Messbedingungen eine spezifische Aktivität ermittelt werden. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen sind in der nachfolgenden Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Spezifische Aktivitäten der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten. N/A: nicht angegeben; \uparrow : Erhöhung der spezifischen Aktivität; \downarrow : Verringerung der spezifischen Aktivität

Protein	Spezifische Aktivität (U min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)			Prozentuale Abweichung zum unveränderten Enzym [%]		
	Nitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydroxylamin Oxidation	Nitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydroxylamin Oxidation
<i>CmHao_W464Y</i>	2,9 ± 0,3	98,0 ± 3,0	≤ 0,01	Faktor 2,9 (± 190 % \uparrow)	38 \downarrow	90 \downarrow
<i>CcuHao_W428Y</i>	8,0 ± 0,02	77,0 ± 6,0	0,04 ± 0,001	70 \downarrow	13 \uparrow	33 \uparrow
<i>CfHao_W434Y</i>	16,7 ± 0,2	225,0 ± 0,6	≤ 0,01	90 \downarrow	51 \uparrow	86 \downarrow
<i>WsNrfA</i>	1066,0 ± 27,0	159,0 ± 6,0	≤ 0,01	N/A	N/A	N/A
<i>NeHao</i>	0,55 ± 0,02	13,0 ± 0,4	4,1 ± 0,13	N/A	N/A	N/A

Im direkten Vergleich zu den unveränderten Enzymen wurden mit den ϵ Hao-MBP Varianten *CcuHao_W428Y* und *CfHao_W434Y* deutlich geringere Nitrit-Reduktase-Aktivitäten detektiert, wobei bei der *CcuHao_W428Y* 30 % und bei der *CfHao_W434Y* 10 % Restaktivität erhalten blieb. Auffällig war, dass bei der *CmHao_W464Y* eine Erhöhung der Nitrit-Reduktase-Aktivität um den Faktor 2,9 detektiert werden konnte. Im Hinblick auf die Hydroxylamin-Reduktion konnten bei allen drei erstellten ϵ Hao-MBP Varianten vergleichbare spezifische Aktivitäten ermittelt werden (Tab. 16). Bei dem Enzym *CfHao_W434Y* war die Hydroxylamin-Reduktion im Vergleich zur *CfHao* sogar um 51 % erhöht. Die ϵ Hao-MBP Variante *CcuHao_W428Y* wies im Vergleich zum Kontrollprotein *NeHao* eine sehr geringe Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität auf, die jedoch mit dem Wildtyp-Enzym *CcuHao* vergleichbar war. Bei den Enzymen *CfHao_W434Y* und *CmHao_W464Y* konnte keine Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität ermittelt werden. Somit wurde auch nach Einfügen eines Tyrosin-Rests keine Verschiebung der Enzymaktivität in die oxidative Richtung beobachtet.

4.5.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten

Die heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Varianten *CmHao_W464Y*, *CfHao_W434Y* und *CcuHao_W428Y* wurden hinsichtlich ihrer Substrataffinität untersucht. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten unter Verwendung verschiedener Substratkonzentrationen wurde dafür wie in den Kapiteln 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für die Substrate Nitrit und Hydroxylamin erfolgte in mehreren voneinander unabhängigen Messungen mit jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Enzym-Kinetik der untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten ist für jeweils ein biologisches Replikat in Abbildung 27 graphisch dargestellt.

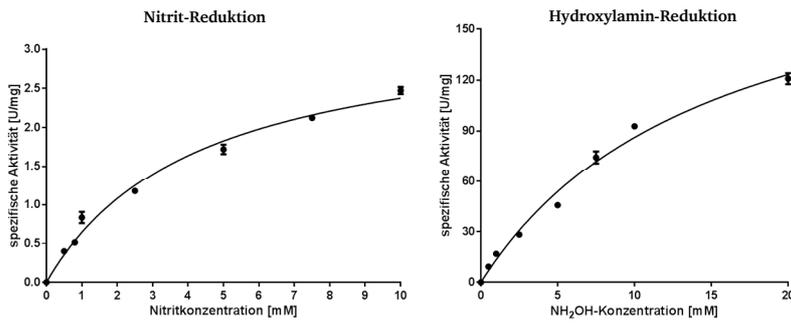
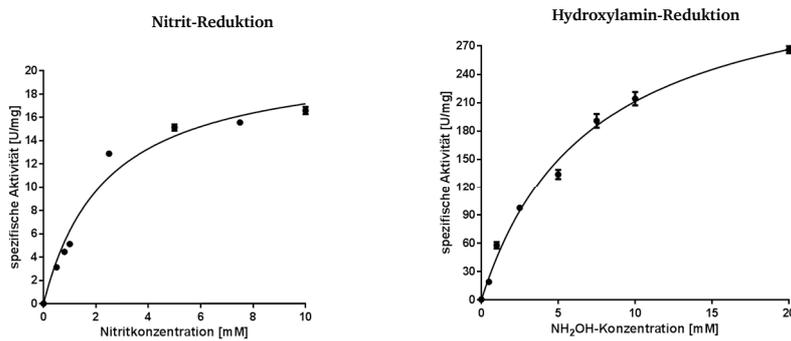
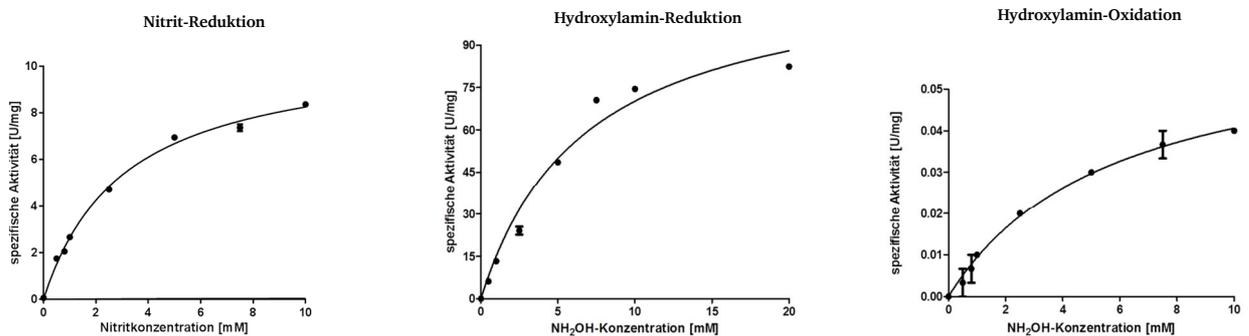
A**B****C**

Abbildung 27: Enzym-Kinetik von heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Varianten bei der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion sowie der Hydroxylamin-Oxidation. Die Substrataffinitäten der Enzyme *CmHao_W464Y* (A), *CfHao_W434Y* (B) und *CcuHao_W428Y* (C) wurden durch Zugabe verschiedener Substratkonzentrationen ermittelt. Die Messung der Nitritreduktase- und Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte mit 0; 0,5; 0,8; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 und 10 mM Substratzugabe. Für die Messung der Hydroxylamin-Reduktion wurden Substratkonzentration von 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 und 20 mM verwendet.

Für die ϵ Hao-MBP Varianten konnten sowohl für die Nitritreduktion als auch die Hydroxylamin-Oxidation vergleichbare K_M -Werte im Bereich von 2,39-5,3 mM ermittelt werden (Tab. 17). Die Affinitäten der Enzyme *CfHao_W434Y* und *CmHao_W464Y* zum Substrat Hydroxylamin wurden im Hinblick auf die Hydroxylamin-Oxidation nicht untersucht, da die Proteine nach Einfügen des Tyrosinrests keine Aktivitäten aufwiesen. Nach Messung der Hydroxylamin-Oxidation konnte jedoch für die *CcuHao_W428Y* ein K_M -Wert ermittelt werden, der im Vergleich zum Wildtyp-Enzym um den Faktor 3 erhöht war (Tab. 17). Hinsichtlich der Hydroxylamin-Reduktion wurden

für alle drei ϵ Hao-MBP Varianten hohe K_M -Werte im Bereich von 6,75-16,9 mM bestimmt. Bei dem Enzym *CfHao_W434Y* war der K_M -Wert im Vergleich zum Wildtyp-Enzym sogar 4-fach höher.

Tabelle 17: K_M -Wert-Bestimmung der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten. N/A: nicht angegeben; ↑: Erhöhung des K_M -Werts; ↓: Verringerung des K_M -Werts

Protein	K_M -Werte (mM)			Prozentuale Abweichung zum unveränderten Enzym [%]		
	Nitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydroxylamin Oxidation	Nitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydroxylamin Oxidation
<i>CmHao_W464Y</i>	4,6 ± 0,4	16,9 ± 2,6	N/A	215 ↑ (≙ Faktor 3)	180 ↑ (≙ Faktor 2,8)	N/A
<i>CcuHao_W428Y</i>	2,99 ± 0,1	6,75 ± 0,08	5,3 ± 0,7	12 ↑	1,8 ↑	263 ↑ (≙ Faktor 3,6)
<i>CfHao_W434Y</i>	2,39 ± 0,015	7,4 ± 0,6	N/A	168 ↑ (≙ Faktor 2,7)	293 ↑ (≙ Faktor 3,9)	N/A

4.5.3 Substrat- und Produktbestimmung

4.5.3.1 Nitritreduktion

Im Rahmen der Charakterisierung der ϵ Hao-MBP Varianten wurde das Substrat- und Produktspektrum bei der Nitritreduktion untersucht. Die Messung der Nitrit-Reduktase-Aktivität erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.5.1 und 4.2.4.1 beschrieben. Nachfolgend wurden die Messansätze auf Eis gelagert, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Anschließend erfolgten Nitrit-, Hydroxylamin- sowie Ammoniumbestimmungen (Kapitel 3.8.6-3.8.8). Als Positivkontrolle fungierte das NrfA-MBP-Fusionsprotein aus *W. succinogenes* (*WsNrfA-MBP*). Die Substrat- und Produktbestimmung der Messansätze erfolgte vor und nach Enzymzugabe mit jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Nitrit-, Hydroxylamin- und Ammoniumkonzentrationen wurden mit zuvor erstellten Eichgeraden berechnet. Die Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung wurden in der nachfolgenden Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Menge des eingesetzten Proteins betrug jeweils 50 μ g. N/A: keine Messungen durchgeführt; ↓: Verringerung des Nitritumsatzes zu Ammonium. Die Ergebnisse der Hydroxylamin-Bestimmung wurden aufgrund sehr geringer ermittelter Konzentrationen nicht genauer angegeben.

Protein	Reaktionsansätze ohne Proteinzugabe			Reaktionsansätze nach Proteinzugabe			Nitritumsatz zu Ammonium [%]	Prozentuale Abweichung zum unveränderten Enzym [%]
	Nitrit [mM]	Hydroxylamin [nmol]	Ammonium [μ M]	Nitrit [mM]	Hydroxylamin [nmol]	Ammonium [μ M]		
<i>CmHao_W464Y</i>	5,51	≤ 1.5	N/A	2,61	≤ 1.5	201,0	6,9	0,2 ↓
<i>CcuHao_W428Y</i>	4,88	≤ 1.5	N/A	1,61	≤ 1.5	463,0	14,2	21,3 ↓
<i>CfHao_W434Y</i>	5,81	≤ 1.5	N/A	1,75	≤ 1.5	310,0	7,6	69,7 ↓
<i>W.succ. NrfA</i>	7,51	≤ 1.5	N/A	5,44	≤ 1.5	359,5	17,4	N/A
<i>CjNrfA</i>	5,25	≤ 1.5	N/A	4,15	≤ 1.5	477,6	43,4	N/A

Anhand von Tabelle 18 wird ersichtlich, dass bei allen drei ϵ Hao-MBP Varianten ein Nitritumsatz zu Ammonium nachweisbar war. Nach Zugabe der Enzyme zu den Messansätzen wurden Nitritverbräuche von 2,9-4,0 mM sowie Ammoniumkonzentrationen von 200,0-463,0 μ M detektiert. Innerhalb der photometrischen Messungen konnte sowohl bei den ϵ Hao-MBP Varianten als auch der Positivkontrolle kein kompletter Umsatz des verbrauchten Nitrits zu Ammonium nachgewiesen werden. Lediglich 6,9-14,2 % des Nitrits wurden nach Zugabe der ϵ Hao-MBP Varianten zu Ammonium reduziert. Im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen fiel auf, dass die Proteine *CcuHao_W428Y* und *CfHao_W434Y* 21-70 % weniger Nitritumsatz zu Ammonium aufwiesen (Tab. 18). Die Reaktionsansätze wurden ebenfalls auf das mögliche Produkt Hydroxylamin getestet. Dieses war jedoch nicht nachweisbar.

4.5.3.2 Hydroxylamin-Oxidation

Das Substrat- und Produktspektrum der ϵ Hao-MBP Varianten wurde ebenfalls hinsichtlich der Hydroxylamin-Oxidation untersucht. Die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.5.2 und 4.2.4.2 beschrieben. Als Positivkontrolle diente die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea* (*NeHao*). Die Substrat- und Produktbestimmung der Messansätze erfolgte vor und nach Enzymzugabe mit jeweils einem biologischen und drei technischen Replikaten. Auf die Bestimmung der Substrate und Produkte wurde bei den Enzymen *CfHao_W434Y* und *CmHao_W464Y* verzichtet, da nachweislich keine signifikanten Hydroxylamin-Oxidase-Aktivitäten vorhanden waren. Hydroxylamin- und Nitritkonzentrationen wurden nachfolgend mit zuvor erstellten Eichgeraden berechnet und sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Ergebnisse der Substrat- und Endproduktbestimmung der ϵ Hao-MBP Variante *CcuHao_W428Y* bei der Hydroxylamin-Oxidation. Die Menge des eingesetzten Proteins betrug jeweils 50 μ g. N/A: keine Messungen durchgeführt; †: Erhöhung der Hydroxylamin-Oxidation zu Nitrit.

Protein	Reaktionsansätze ohne Proteinzugabe		Reaktionsansätze nach Proteinzugabe		Hydroxylamin-Oxidation zu Nitrit [%]	Prozentuale Abweichung zum unveränderten Enzym [%]
	Hydroxylamin [mM]	Nitrit [μ M]	Hydroxylamin [mM]	Nitrit [μ M]		
<i>CcuHao_W428Y</i>	3,54	N/A	3,08	32,7	7,1	6,6 †
<i>NeHao</i>	3,6	N/A	3,02	149,0	25,7	N/A

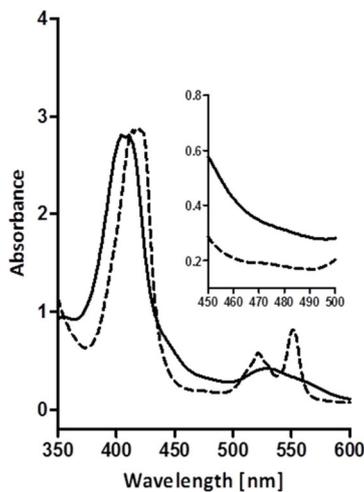
Das Enzym *CcuHao_W428Y* wies im Vergleich zur *CcuHao* bei der Hydroxylamin-Oxidation eine 5-fach erhöhte Konzentration des Produkts Nitrit auf (*CcuHao*: 6,7 μ M Nitrit; Kap. 4.2.4.2; Tab. 14). Nach Zugabe der ϵ Hao-MBP Variante zum Messansatz konnten Nitritkonzentrationen von 32,7 μ M detektiert werden. Während das Enzym *CcuHao_W428Y* nur maximal 7,1 % des Hydroxylamins zu Nitrit oxidieren konnten, waren es bei der *NeHao* 25,7 %. Ein Einfluss des Aminosäureaustausches auf die spezifische Oxidase-Aktivität und den Hydroxylaminsatz zu

Nitrit konnte auch für die ϵ Hao-MBP Variante *CcuHao_W428Y* nicht abschließend nachgewiesen werden.

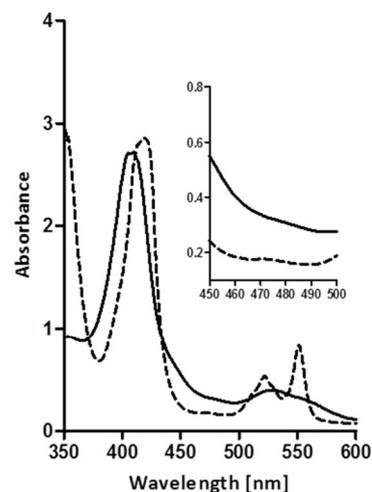
4.5.4 Erstellung von Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie

Die Absorptionseigenschaften der mittels Affinitätschromatographie gereinigten ϵ Hao-MBP Varianten wurden im oxidierten und reduzierten Zustand in einem Wellenlängenbereich von 300-800 nm analysiert. Die Messung der Spektren mit oxidiertem Protein erfolgte direkt nach der Reinigung, wobei die Oxidation der Probe durch den Luftsauerstoff gewährleistet wurde. Zur Messung der reduzierten Form wurde die Proteinlösung zusätzlich mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt. Als Kontrolle wurde die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea* (*NeHao*) mitgeführt. Dieses Protein verfügt über einen charakteristischen Tyrosin Cross-Link (P460), welcher unter reduzierten Bedingungen ein Absorptionsmaximum bei 460 nm aufweist. Innerhalb der Proteinstruktur der *NeHao* führt der Tyrosin Cross-Link zur kovalenten Verknüpfung mit einem weiteren Monomer und bedingt somit letztlich die Trimerisierung des Proteins. Die ϵ Hao-MBP Varianten, denen mittels ortsspezifischer Mutagenese ein Tyrosin-Rest an einer zur *NeHao* äquivalenten Position eingefügt wurde, wurden auf das Vorhandensein eines Absorptionsmaximums bei 460 nm überprüft. In Abbildung 28 sind die Absorptionsspektren der ϵ Hao-MBP Varianten im Vergleich zur *NeHao* dargestellt.

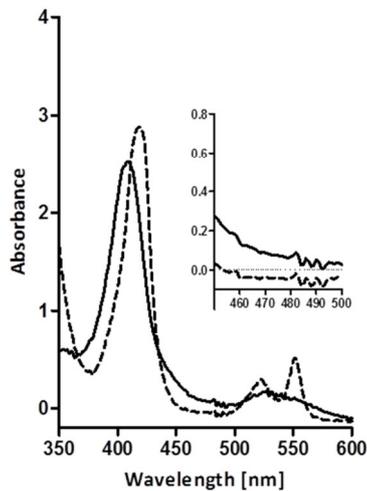
A



B



C



D

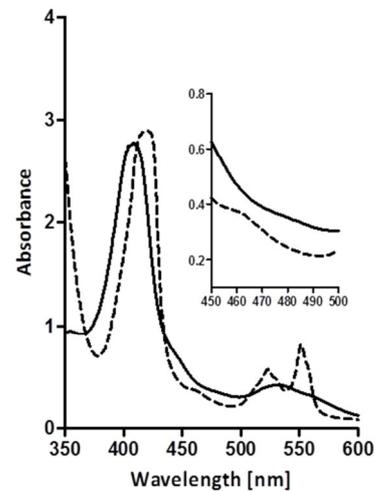


Abbildung 28: UV/Vis-Spektrum der ϵ Hao-MBP Varianten im Vergleich zur *NeHao*. Ausschnittsvergrößerungen im Wellenlängenbereich von 450-500 nm sollten Aufschluss über das Vorhandensein eines Absorptionsmaximums bei 460 nm geben. Schwarze Linie: oxidiertes Protein, gestrichelte Linie: reduziertes Protein nach Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit, (A) Absorptionsspektrum der *CcuHao_W428Y*, (B) Spektrum der ϵ Hao-MBP Variante *CmHao_W464Y*, (C) Cytochrom *c*-Spektrum der *CfHao_W434Y*, (D) Spektrum der *NeHao*. Mit reduzierten Protein konnten Maxima bei 421 nm (Soret-Bande), 460 nm (P460), 523 nm und 551 nm ermittelt werden.

Alle untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten besitzen ein klassisches Cytochrom *c*-Spektrum. In der reduzierten Form weisen die Fusionsproteine *CmHao_W464Y*, *CcuHao_W428Y* und *CfHao_W434Y* Maxima bei 418-420 nm (Soret-Bande), 522 nm (β -Bande) und 551 nm (α -Bande) auf (Abb. 28). In der oxidierten Form sind die Soret-Banden mit Maxima von 409-411 nm am stärksten ausgeprägt. Weiterhin sind lokale Maxima bei 530 nm zu erkennen. Im Vergleich zur *NeHao* wurde bei keiner der untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten ein Absorptionsmaximum bei 460 nm nachgewiesen.

4.6 Erstellung von ϵ Hao-MBP Varianten *CmHao_V450Y*,

CcuHao_V414Y und *CfHao_V422Y*

Im Rahmen der zielgerichteten Modifikation erfolgte in den Aminosäuresequenzen der ϵ Hao-Proteine von *C. fetus*, *C. curvus* und *C. mediatlanticus* ein ortsspezifischer Aminosäureaustausch. Dafür wurden zunächst bioinformatische Analysen der C-Termini von Hao- und ϵ Hao Proteinen aus dem Jahr 1997 genutzt, mit denen die Position des Tyrosin-Rests innerhalb der Hao-Struktur ermittelt werden konnte (Abb. 23 und 44). An dieser Position befand sich in den ϵ Hao-Proteinen nach früheren Erkenntnissen die Aminosäure Valin, die daraufhin in dieser Arbeit gegen ein Tyrosin ausgetauscht wurde. Die Konstruktion der Plasmide pTMH-*CmHao_V450Y*, pTMH-

CcuHao_V414Y und *pTMH-CfHao_V422Y* wurde wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Bezeichnung der ϵ Hao-MBP Varianten erfolgte ohne Einbeziehung der endogenen Signalsequenzen, da diese durch die *nrfA*-Signalsequenz von *W. succinogenes* ersetzt wurden.

Die Produktion der Zielproteine wurde mit SDS-PAGE und nachfolgender Häm-Färbung nachgewiesen. Zellen entsprechender Transformanden wurden anschließend in 3×10^1 l Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mittels Tangentialfiltration (Kap. 3.4.4) geerntet und nachfolgend zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in Äquilibriumspuffer resuspendiert und die Zellen mittels French Press aufgeschlossen (Kap. 3.4.5). Durch eine 60-minütige Zentrifugation wurde das Zellhomogenat in lösliche Fraktion und Membranfraktion separiert. Die anschließende Reinigung der periplasmatisch lokalisierten Zielproteine mittels MBP-Affinitätschromatographie wurde wie in Kapitel 3.7.6.3 beschrieben durchgeführt. Sowohl in Zellsuspensionen als auch Elutionsfraktionen konnte mittels Coomassie- und Häm-Färbung das jeweilige Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 100 kDa und das MBP-freie Zielprotein mit einer Größe von etwa 57 kDa erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 29). Die mittels dieser Methodik produzierten ϵ Hao-MBP Varianten wurden anschließend hinsichtlich der Enzymaktivitäten, UV/Vis-Spektren, Substrataffinitäten (K_M -Wert) sowie pH- und Temperatur-Optima im Vergleich zu den unveränderten Enzymen untersucht.

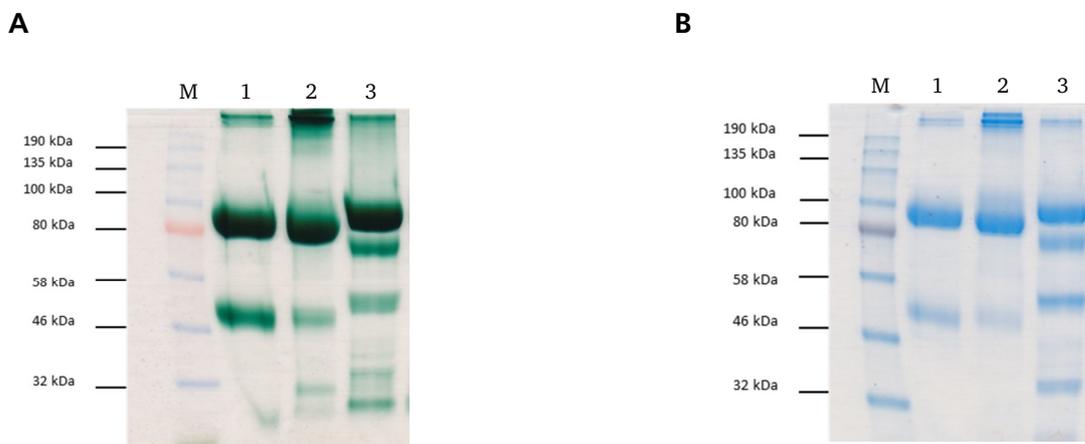


Abbildung 29: (A) SDS-PAGE (10 % igees Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Varianten, 30 μ g Protein pro Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, *CcuHao_V414Y*; Spur 2, *CfHao_V422Y*; Spur 3, *CmHao_V450Y*; (B) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Varianten, 7,5 μ g Probe pro Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, *CcuHao_V414Y*; Spur 2, *CfHao_V422Y*; Spur 3, *CmHao_V450Y*.

4.7 Charakterisierung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y*

4.7.1 Enzymaktivitätsmessung mit verschiedenen Substraten

Die mittels MBP-Affinitätschromatographie gereinigten ϵ Hao-MBP Varianten aus *C. curvus*, *C. fetus* und *C. mediatlanticus* wurden im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen hinsichtlich ihrer Enzymaktivitäten untersucht. Als potenzielle Substrate für die Reduktase-Aktivität wurden Nitrit, Hydroxylamin, Natriumsulfit und Hydrazin verwendet. Die Messung der Reduktase-Aktivitäten erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm nach Zugabe des artifiziellen Elektronendonors Benzylviologen oder des Reduktionsmittels Titancitrat. Das NrfA-MBP-Fusionsprotein aus *W. succinogenes* (*WsNrfA*-MBP) wurde als Kontrolle für die Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität mitgeführt. Die Messung der Oxidase-Aktivität unter Verwendung des Substrats Hydroxylamin wurde ebenfalls photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm durch Zugabe des Elektronenakzeptors MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid) und des Redoxmediators Phenazinmethosulfat (PMS) durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Hydroxylamin-Oxidation fungierte die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea*. Die Ermittlung der Reduktase- und Oxidase-Aktivitäten erfolgte nach mehreren voneinander unabhängigen Messungen mit jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten (Kap. 3.9.1 und 3.9.2). Für die Substrate Hydrazin und Natriumsulfit konnte mit keinem getesteten Enzym unter den gegebenen Messbedingungen eine spezifische Aktivität ermittelt werden. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen sind in der nachfolgenden Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Spezifische Aktivitäten der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten. N/A: nicht angegeben; \uparrow : Erhöhung der spezifischen Aktivität; \downarrow : Verringerung der spezifischen Aktivität. Die Werte der Proteine *WsNrfA* und *NeHao* wurden aus Tabelle 10 entnommen.

Protein	Spezifische Aktivität (U min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)			Prozentuale Abweichung zum unveränderten Enzym [%]		
	Nitrit	Hydroxylamin	Hydroxylamin	Nitrit	Hydroxylamin	Hydroxylamin
	Reduktion	Reduktion	Oxidation	Reduktion	Reduktion	Oxidation
<i>CmHao_V450Y</i>	0,39 ± 0,1	46,0 ± 0,3	0,03 ± 0,002	61 ↓	71 ↓	70 ↓
<i>CcuHao_V414Y</i>	0,55 ± 0,1	48,0 ± 2,0	≤ 0,01	98 ↓	30 ↓	N/A
<i>CfHao_V422Y</i>	≤ 0,01	34,0 ± 3,0	0,03 ± 0,002	100 ↓	78 ↓	N/A
<i>WsNrfA</i>	1066,0 ± 27,0	159,0 ± 6,0	≤ 0,01	N/A	N/A	N/A
<i>NeHao</i>	0,55 ± 0,02	13,0 ± 0,4	4,1 ± 0,13	N/A	N/A	N/A

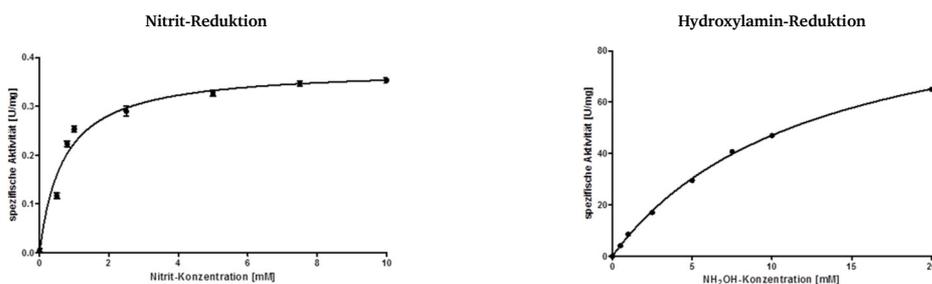
Mit den untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten konnten analoge Enzymaktivitäten ermittelt werden. Im direkten Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen wurden jedoch deutlich geringere Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivitäten detektiert (Tab. 20). Bei der *CfHao_V422Y* war die Hydroxylamin-Reduktion im Vergleich zum Wildtyp-Enzym um 78 %, bei der *CcuHao_V414Y* um

30 % und bei der *CmHao_V450Y* um 71 % erniedrigt. Sowohl die *CmHao_V450Y* als auch die *CcuHao_V414Y* wiesen im Vergleich zur Positivkontrolle *W. succinogenes* NrfA-MBP und den Wildtyp-Enzymen deutlich geringere Nitrit-Reduktase-Aktivitäten auf, wobei jedoch im Fall der *CmHao_V450Y* 39 % Restaktivität erhalten blieb. Bei der *CcuHao_V414Y* war die Nitritreduktion im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen um 98 % und bei der *CmHao_V450Y* um 61 % erniedrigt. Auffällig war, dass bei der *CfHao_V422Y* eine komplette Inaktivierung innerhalb der Nitrit-Reduktion auftrat. Die ϵ Hao-MBP Varianten wiesen im Vergleich zum Kontrollprotein *NeHao* und den Wildtyp-Enzymen sehr geringe Hydroxylamin-Oxidase-Aktivitäten auf. Daher konnte mit Hilfe des eingefügten Tyrosin-Rests keine Verschiebung der Enzymaktivität in die oxidative Richtung erreicht werden. Ein Einfluss des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität konnte dennoch anhand der signifikant erniedrigten Reduktase-Aktivitäten nachgewiesen werden.

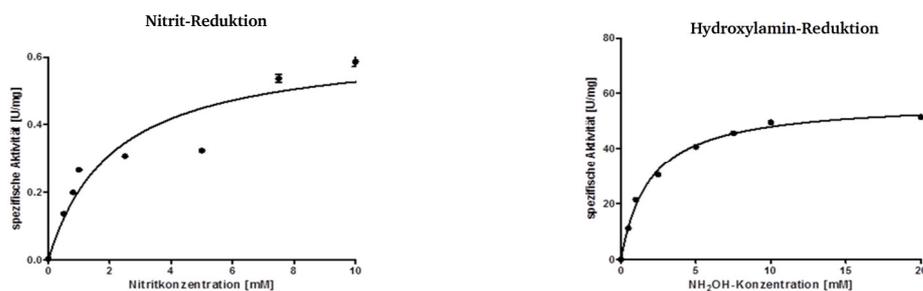
4.7.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante

Die heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Varianten wurden hinsichtlich ihrer Substrataffinität untersucht. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten unter Verwendung verschiedener Substratkonzentrationen wurde wie in den Kapiteln 3.9 und 4.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für die Substrate Nitrit und Hydroxylamin erfolgte in mehreren voneinander unabhängigen Messungen mit jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Enzym-Kinetik der untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten ist für jeweils ein biologisches Replikat in Abbildung 30 graphisch dargestellt.

A



B



C

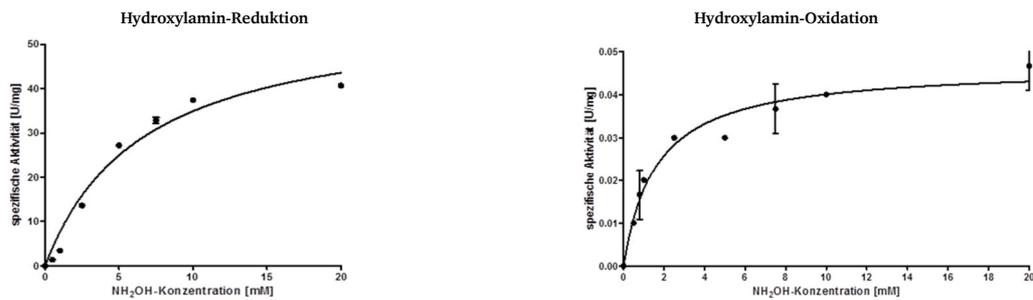


Abbildung 30: Enzym-Kinetik von heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Varianten bei der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion sowie der Hydroxylamin-Oxidation. Die Substrataffinitäten der *CmHao_V450Y* (A), *CcuHao_V414Y* (B) und *CfHao_V422Y* (C) wurden durch Zugabe verschiedener Substratkonzentrationen ermittelt. Die Messung der Nitritreduktase- und Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte mit 0; 0,5; 0,8; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 und 10 mM Substratzugabe. Für die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität wurde eine zusätzliche Substratkonzentration (20 mM) mitgeführt. Die Messung der Hydroxylamin-Reduktion wurde mit Substratkonzentrationen von 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 und 20 mM durchgeführt.

Anhand von Abbildung 30 wird ersichtlich, dass die drei ϵ Hao-MBP Varianten *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik mit hyperbolem Kurvenverlauf folgen. Für die ϵ Hao-MBP Varianten konnten sowohl für die Nitritreduktion als auch die Hydroxylamin-Oxidation vergleichbare K_M -Werte im Bereich von 0,8-2,35 mM ermittelt werden (Tab. 21). Die Affinität der *CfHao_V422Y* zum Substrat Nitrit wurde nicht untersucht, da das Protein nach Einfügen der Mutation keine Nitritreduktase-Aktivität mehr aufwies. Im Rahmen der Hydroxylamin-Oxidation konnte jedoch für die *CfHao_V422Y* ein K_M -Wert ermittelt werden, der im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym um 69 % erhöht war. Auffällig war ebenfalls, dass bei der ϵ Hao-MBP Variante *CmHao_V450Y* im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ein um 45 % geringerer K_M -Wert innerhalb der Nitritreduktion nachgewiesen werden konnte. Hinsichtlich der Hydroxylamin-Reduktion wurden für die *CmHao_V450Y* und *CfHao_V422Y* sehr hohe K_M -Werte im Bereich von 6,7-12,0 mM bestimmt. Bei beiden Enzymen konnten somit im Vergleich zur *CmHao* und *CfHao* deutlich erhöhte K_M -Werte innerhalb der Hydroxylamin-Reduktion detektiert werden. Dabei war der K_M -Wert der *CmHao_V450Y* um 99,5 % und im Fall der *CfHao_V422Y* um sogar 255 % erhöht. Lediglich die *CcuHao_V414Y* wies im Vergleich zu den beiden anderen ϵ Hao-MBP Varianten innerhalb der Hydroxylamin-Reduktion einen um 67-82 % geringeren K_M -Wert von 2,16 mM auf, der im Vergleich zur *CcuHao* 67 % geringer war.

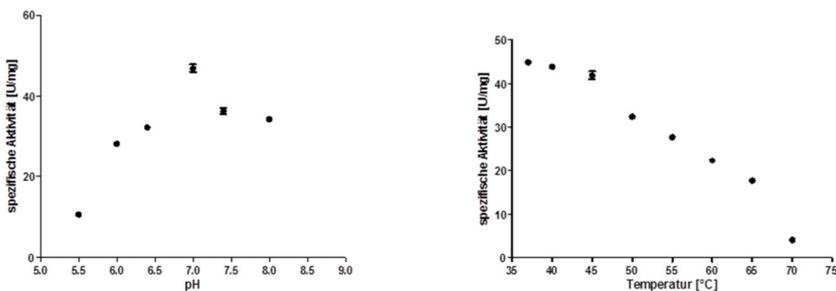
Tabelle 21: K_M -Wert-Bestimmung der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten. N/A: nicht angegeben; \uparrow : Erhöhung des K_M -Werts; \downarrow : Verringerung des K_M -Werts

Protein	K_M -Werte (mM)			Prozentuale Abweichung zum unveränderten Enzym [%]		
	Nitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydroxylamin Oxidation	Nitrit Reduktion	Hydroxylamin Reduktion	Hydroxylamin Oxidation
<i>CmHao_V450Y</i>	0,79 ± 0,14	12,03 ± 0,62	N/A	45 ↓	99,5 ↑	N/A
<i>CcuHao_V414Y</i>	2,35 ± 0,35	2,16 ± 0,29	N/A	12 ↓	67 ↓	N/A
<i>CfHao_V422Y</i>	N/A	6,69 ± 0,096	1,73 ± 0,19	N/A	255 ↑	69 ↑

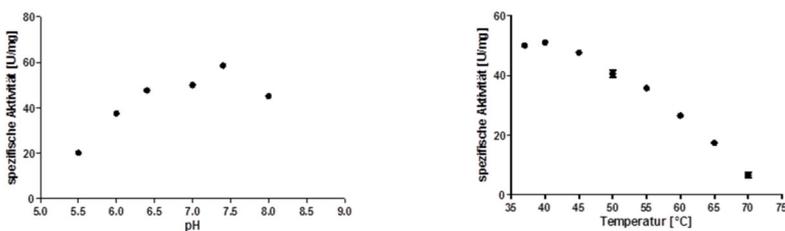
4.7.3 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums

Neben der enzymatischen Aktivität und der Michaelis-Menten-Kontante wurde das pH- und Temperatur-Optimum der ϵ Hao-MBP Varianten untersucht. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden Puffer mit pH-Werten zwischen 5,5 und 8,0 verwendet. Die Ermittlung des Temperatur-Optimums erfolgte durch Inkubation der Messansätze bei Temperaturen zwischen 37 °C und 70 °C. Die Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums wurde mit jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen sind für jeweils ein biologisches Replikat in Abbildung 31 dargestellt.

A



B



C

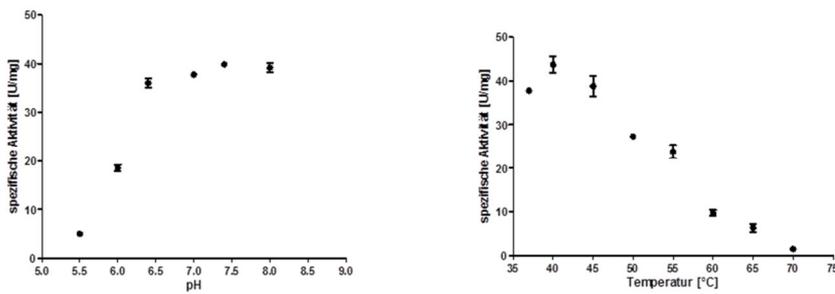


Abbildung 31: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Varianten. (A) Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität der *CmHao_V450Y* bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen, (B) Hydroxylamin-Reduktion der *CcuHao_V414Y* bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen, (C) Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität der *CfHao_V422Y* bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen.

Die drei untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* wiesen vergleichbare pH- und Temperatur-Optima auf, bei denen die höchsten Enzymaktivitäten detektiert werden konnten. Sowohl für die *CcuHao_V414Y* als auch die *CfHao_V422Y* wurde innerhalb der Hydroxylaminreduktion ein Temperatur-Optimum im Bereich von 37-45 °C bestimmt (Tab. 22). Das pH-Optimum der beiden Enzyme konnte in einem Bereich von pH 6,5/7,0-8,0 ermittelt werden. Die *CmHao_V450Y* wies innerhalb der Hydroxylamin-Reduktion ein Temperatur-Optimum von 37-50 °C und ein pH-Optimum von 6,5-7,5 auf. Im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen waren weder bei der *CfHao_V422Y* noch bei der *CcuHao_V414Y* signifikante Unterschiede detektierbar.

Tabelle 22: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten. N/A: keine Messungen aufgrund geringer spezifischer Aktivität durchgeführt.

Protein	Nitrit-Reduktion		Hydroxylamin-Reduktion	
	pH	Temperatur [°C]	pH	Temperatur [°C]
<i>CmHao_V450Y</i>	5,5-6,5	40-50	6,5-7,5	37-50
<i>CcuHao_V414Y</i>	N/A	N/A	7,0-8,0	37-45
<i>CfHao_V422Y</i>	N/A	N/A	6,5-8,0	37-45

Lediglich mit dem Fusionsprotein *CmHao_V450Y* konnte innerhalb der Nitritreduktion im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen *CfHao* und *CcuHao* ein geringeres pH-Optimum in einem Bereich von 5,5-6,5 detektiert werden (Abb. 32). Auch bei einem pH-Wert von 8,0 sowie bei pH 5,5 waren Enzymaktivitäten bei den ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen nachweisbar. Des Weiteren wurden auch bei Temperaturen von über 60 °C noch Restaktivitäten detektiert (Abb. 31).

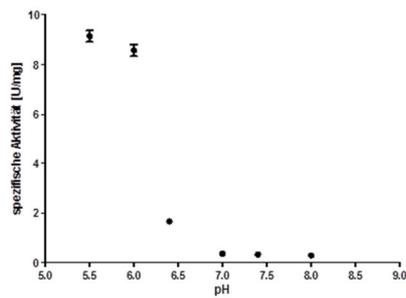


Abbildung 32: Temperatur-Optimum des Enzyms *CmHao_V450Y* während der Nitritreduktion.

4.7.4 Substrat- und Produktbestimmung

4.7.4.1 Nitritreduktion

Im Rahmen der Charakterisierung der ϵ Hao-MBP Varianten wurde das Substrat- und Produktspektrum bei der Nitritreduktion untersucht. Die Messung der Nitrit-Reduktase-Aktivität erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.5.1 und 4.5.3.1 beschrieben. Nachfolgend wurden die Messansätze auf Eis gelagert, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Anschließend erfolgten Nitrit-, Hydroxylamin- sowie Ammoniumbestimmungen (Kapitel 3.8.6-3.8.8). Als Kontrollen wurden Messansätze ohne Substrat aber mit Protein und Messansätze mit Substrat aber ohne Protein mitgeführt. Für die Ammoniumbestimmung mittels Neßlers Reagenz wurden Messansätze ohne Substratzusatz aber mit Protein als Blindwerte verwendet. Diese Kontrollen sollten den Einfluss der zugegebenen Proteine auf die photometrischen Messungen minimieren. Als Positivkontrolle fungierte das NrfA-MBP-Fusionsprotein aus *W. succinogenes* (*WsNrfA-MBP*). Die Substrat- und Produktbestimmung der Messansätze erfolgte vor und nach Enzymzugabe mit jeweils einem biologischen und drei technischen Replikaten. Die Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung wurden in der nachfolgenden Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten. Die Menge des eingesetzten Proteins betrug jeweils 50 μ g. N/A: keine Messungen durchgeführt bzw. Daten nicht angegeben; ↓: Verringerung des Nitritumsatzes zu Ammonium. Die Ergebnisse der Hydroxylamin-Bestimmung wurden aufgrund sehr geringer ermittelter Konzentrationen nicht genauer angegeben.

Protein	Reaktionsansätze ohne Proteinzugabe			Reaktionsansätze nach Proteinzugabe			Nitritumsatz zu Ammonium [%]	Prozentuale Abweichung zum unveränderten Enzym [%]
	Nitrit [mM]	Hydroxylamin [nmol]	Ammonium [μ M]	Nitrit [mM]	Hydroxylamin [nmol]	Ammonium [μ M]		
<i>CmHao_V450Y</i>	5,41 \pm 0,05	\leq 1.5	N/A	5,39 \pm 0,08	\leq 1.5	N/A	N/A	7,1 ↓
<i>CcuHao_V414Y</i>	5,24 \pm 0,1	\leq 1.5	N/A	4,42 \pm 0,3	\leq 1.5	166,0 \pm 43,0	20,2	15,3 ↓
<i>W.succ. NrfA</i>	7,51 \pm 0,2	\leq 1.5	N/A	5,44 \pm 0,09	\leq 1.5	359,5 \pm 22,0	17,4	N/A

Anhand von Tabelle 23 wird ersichtlich, dass lediglich bei der *CcuHao_V414Y*-Präparation ein Nitritumsatz zu Ammonium nachweisbar war. Nach Zugabe der *CcuHao_V414Y* zum Messansatz wurde ein Nitritverbrauch von 0,82 M sowie eine Ammoniumkonzentration von 166,0 μM detektiert. Mit Hilfe der photometrischen Messungen konnte sowohl bei dem Enzym *CcuHao_V414Y* als auch der Positivkontrolle kein kompletter Umsatz des verbrauchten Nitrits zu Ammonium nachgewiesen werden. Lediglich 17-20 % des Nitrits wurden zu Ammonium reduziert. Weiterhin fiel auf, dass die ϵ Hao-MBP Variante *CcuHao_V414Y* im Vergleich zum Wildtyp-Enzym *CcuHao* 15,5 % weniger Nitritumsatz zu Ammonium aufwies. Im Gegensatz dazu konnte bei der *CmHao_V450Y*-Präparation weder ein signifikanter Nitritverbrauch noch eine Umsetzung des Nitrits zu Ammonium nachgewiesen werden. Mit der ϵ Hao-MBP Variante *CfHao_V422Y* wurden keine Messungen durchgeführt, da dieses Fusionsprotein eine komplette Inaktivierung innerhalb der Nitrit-Reduktion aufwies. Die Reaktionsansätze wurden ebenfalls auf das mögliche Endprodukt Hydroxylamin getestet. Dieses war jedoch nicht signifikant nachweisbar.

4.7.4.2 Hydroxylamin-Oxidation

Das Substrat- und Produktspektrum der ϵ Hao-MBP Varianten wurde ebenfalls für die Hydroxylamin-Oxidation untersucht. Die Messung der Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität erfolgte wie in den Kapiteln 3.9.5.2 und 4.5.3.2 beschrieben. Die Messansätze wurden insgesamt 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert, um die enzymatische Reaktion abzustoppen. Nachfolgend wurden Nitrit- sowie Hydroxylaminbestimmungen durchgeführt (Kapitel 3.8.7-3.8.8). Als Kontrollen wurden Messansätze ohne Substrat aber mit Protein sowie Messansätze mit Substrat aber ohne Protein mitgeführt. Als Positivkontrolle diente die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea* (*NeHao*). Die Substrat- und Produktbestimmung der Messansätze erfolgte vor und nach Enzymzugabe mit jeweils einem biologischen und drei technischen Replikaten. Auf die Bestimmung der Substrate und Produkte wurde bei dem Enzym *CcuHao_V414Y* verzichtet, da nachweislich keine signifikante Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität vorhanden war. Die Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Varianten bei der Hydroxylamin-Oxidation. Die Menge des eingesetzten Proteins betrug jeweils 50 μg . N/A: keine Messungen durchgeführt

Protein	Reaktionsansätze ohne Proteinzugabe		Reaktionsansätze nach Proteinzugabe		Hydroxylamin-Oxidation zu Nitrit [%]
	Hydroxylamin [mM]	Nitrit [μM]	Hydroxylamin [mM]	Nitrit [μM]	
<i>CmHao_V450Y</i>	3,4 \pm 0,05	N/A	2,48 \pm 0,1	5,08 \pm 0,21	0,55
<i>CfHao_V422Y</i>	3,5 \pm 0,16	N/A	2,5 \pm 0,1	5,3 \pm 0,32	0,53
<i>NeHAO</i>	3,6 \pm 0,2	N/A	3,02 \pm 0,09	149,0 \pm 0,004	25,7

Die Enzyme *CmHao_V450Y* und *CfHao_V422Y* wiesen vergleichbare Hydroxylaminumsätze von 0,92-1,0 mM auf. Bei den ϵ Hao-MBP Varianten wurden aufgrund einer geringen Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität nur minimale Nitritkonzentrationen von 5,08-5,3 μ M detektiert. Diese Ergebnisse waren mit den Wildtyp-Enzymen *CmHao* und *CfHao* vergleichbar (4,8-5,2 μ M; Tab. 14; Kap. 4.2.4.2), sodass mit Hilfe des eingefügten Tyrosin-Rests keine Verschiebung der enzymatischen Aktivität in die oxidative Richtung erreicht werden konnte. Deutlich höhere Nitritkonzentrationen konnten jedoch erwartungsgemäß bei der Positivkontrolle *NeHao* photometrisch nachgewiesen werden, obwohl bei diesem Enzym der geringste Hydroxylaminverbrauch von 0,58 mM bestimmt wurde. Während die ϵ Hao-MBP Varianten nur maximal 0,55 % des Hydroxylamins zu Nitrit oxidieren konnten, waren es bei der *NeHao* 25,7 %. Ein Einfluss des Aminosäureaustausches auf die Oxidase-Aktivität und den Hydroxylaminumsatz zu Nitrit konnte mit keinem der getesteten Enzyme nachgewiesen werden.

4.7.5 Erstellung von Spektren mittels UV/Vis-Spektroskopie

Die Absorptionseigenschaften der mittels Affinitätschromatographie gereinigten ϵ Hao-MBP Varianten wurden im oxidierten und reduzierten Zustand in einem Wellenlängenbereich von 300-800 nm analysiert. Die Messung der Spektren mit oxidiertem Protein erfolgte direkt nach der Reinigung mit 1 ml verdünnter Proteinlösung (5-8 μ M Protein), wobei die Oxidation der Probe durch den Luftsauerstoff gewährleistet wurde. Zur Messung der reduzierten Form wurde die Proteinlösung zusätzlich mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt. Als Kontrolle wurde die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *Nitrosomonas europaea* (*NeHao*) mitgeführt. Dieses Protein katalysiert die Oxidation von Hydroxylamin zu Nitrit und verfügt über einen charakteristischen Tyrosin Cross-Link (P460), welcher unter reduzierten Bedingungen ein Absorptionsmaximum bei 460 nm aufweist. Bei den erstellten ϵ Hao-MBP Varianten *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese die Aminosäure Valin gegen einen Tyrosin-Rest ausgetauscht. Daher wurden diese Proteine nachfolgend auf das Vorhandensein eines Absorptionsmaximums bei 460 nm überprüft (Abb. 33).

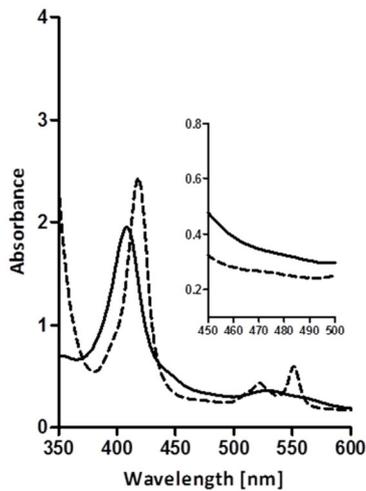
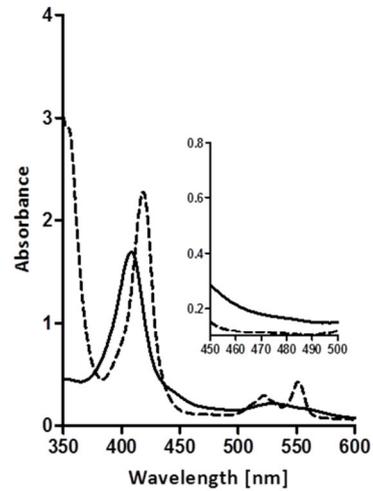
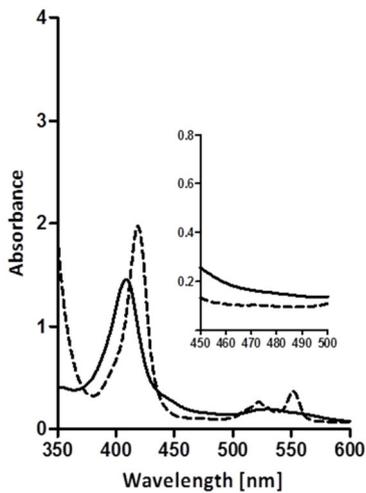
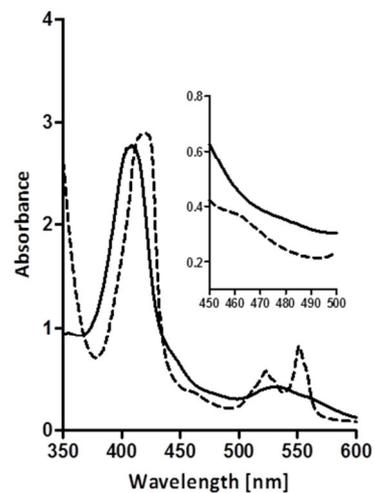
A**B****C****D**

Abbildung 33: UV/Vis-Spektrum der ϵ Hao-MBP Varianten. Ausschnittsvergrößerungen im Wellenlängenbereich von 450-500 nm sollten Aufschluss über das Vorhandensein eines Absorptionsmaximums bei 460 nm geben. Schwarze Linie: oxidiertes Zustand, Gestrichelte Linie: reduzierter Zustand nach Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit. (A) Cytochrom *c*-Spektrum der *CmHao_V450Y*, (B) Spektrum der *CcuHao_V414Y*, (C) Cytochrom *c*-Spektrum der *CfHao_V422Y*, (D) Spektrum der *NeHao* mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 460 nm.

Anhand von Abbildung 33 wird deutlich, dass alle untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten ein klassisches Cytochrom *c*-Spektrum besitzen. In der reduzierten Form weisen die Fusionsproteine *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* Maxima bei 418-419 nm (Soret-Bande), 522 nm (β -Bande) und 551 nm (α -Bande) auf. In der oxidierten Form wurden die Soret-Banden mit Maxima von 408-409 nm sowie lokale Maxima bei 530 nm nachgewiesen. Weiterhin wird ersichtlich, dass keine der untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten im Vergleich zur *NeHao* ein Absorptionsmaximum bei 460 nm aufweist (Abb. 33 D). Ein Einfluss des eingefügten Tyrosin-

Rests auf die Cytochrom *c*-Spektren konnte daher mittels UV/Vis-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden.

4.7.6 Bestimmung der Multimerisierungszustände mittels analytischer Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde zur Bestimmung der Multimerisierungszustände der ϵ Hao-MBP Varianten verwendet und wie in Kapitel 3.7.7.2 beschrieben durchgeführt. Pro Lauf wurden 400 μ l gereinigtes Protein auf eine äquilibrierte Sephadex 200 Säule aufgetragen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,4 ml min⁻¹, um eine möglichst gute Trennung der verschiedenen Multimerisierungszustände zu erreichen. Die Absorptionen der eluierten Proteinfractionen wurden mit Hilfe eines UV-Vis Monitors bei 260 nm, 280 nm und 410 nm bestimmt. Die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration sind in Abbildung 34 dargestellt.

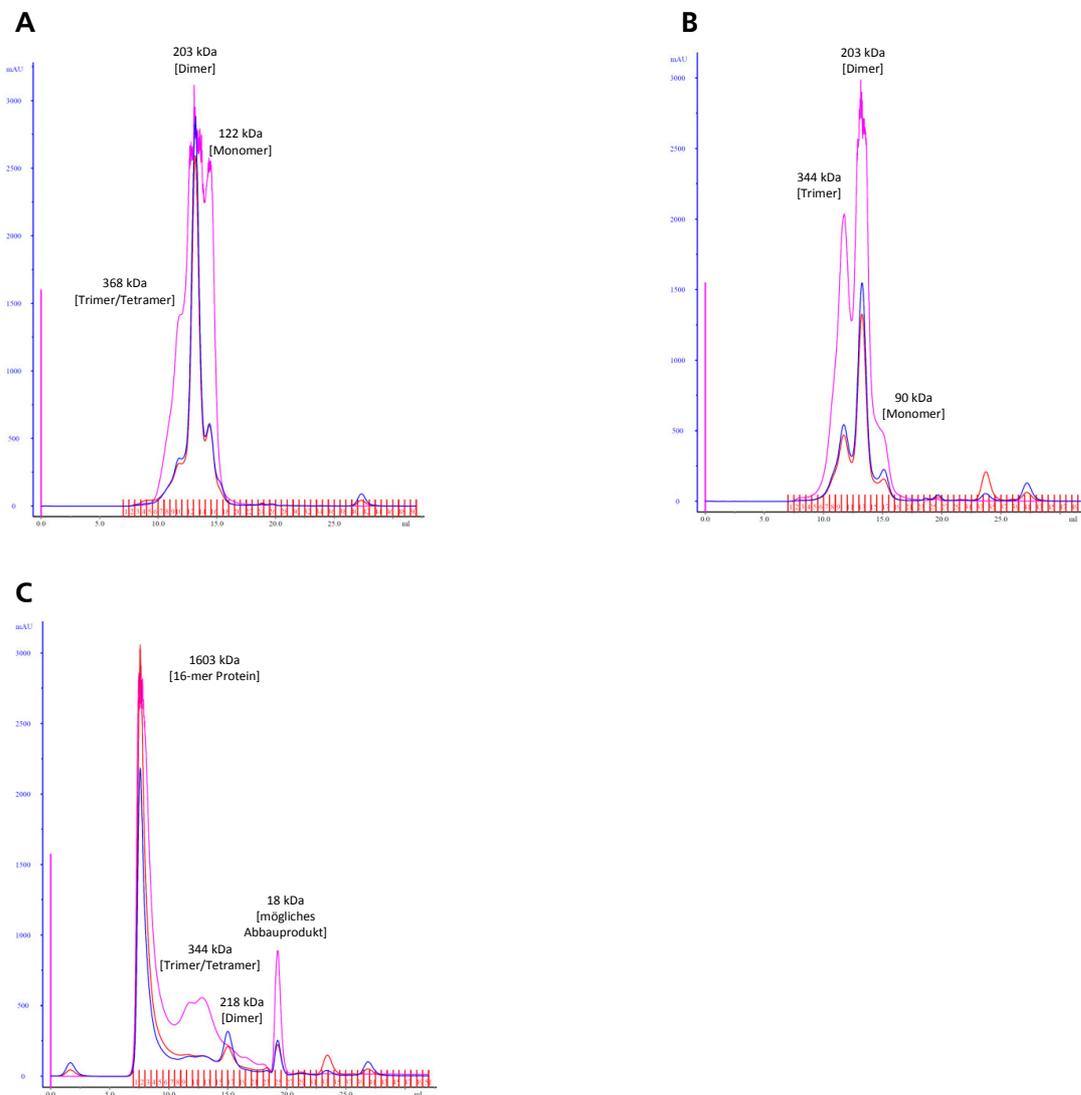


Abbildung 34: Analytische Gelfiltration von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen. Rot: Absorption bei 260 nm, Blau: Absorption der eluierten Proteinfractionen bei 280 nm, Rosa: Absorption bei 410 nm. Die analytische Gelfiltration erfolgte mit den Fusionsproteinen CcuHao_V414Y (A), C#Hao_V422Y (B) und CmHao_V450Y (C).

Die Analyse des Fusionsproteins *CcuHao_V414Y* zeigte, dass dessen Elutionsprofil einen dominanten Hauptpeak bei 203 kDa aufweist. Dieser Hauptpeak entspricht einem dimeren Multimerisierungsgrad (Abb. 34 A). Weiterhin konnte ein potenzielles Monomer bei 122 kDa nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym *CcuHao* war jedoch kein hexamerer Multimerisierungszustand nachweisbar (Kap. 4.2.6; Abb. 19 A). Das Fusionsprotein *CfHao_V422Y* besaß ein ähnliches Elutionsprofil mit einem dominierenden Hauptpeak bei 203 kDa, was einem dimeren Multimerisierungsgrad entspricht (Abb. 34 B). Weiterhin war ein entsprechendes Monomere bei 90 kDa nachweisbar. Interessanterweise wurde nach Gelfiltration der ϵ Hao-MBP Variante *CfHao_V422Y* ein weiterer dominanter Peak bei 344 kDa ermittelt. Dieser Peak entspricht einem trimeren Multimerisierungsgrad (Abb. 34 B), der bei der *CfHao*-Präparation nicht nachgewiesen werden konnte (Kap. 4.2.6; Abb. 19 B). Das Elutionsprofil des Fusionsproteins *CmHao_V450Y* (Abb. 34 C) zeigte einen dominanten Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von 7-8 ml, was einem apparenten Molekulargewicht von 1603 kDa und damit einem Hexadecamer (MW Hexadecamer: 1552 kDa) entspricht. Ein ähnliches Ergebnis wurde ebenfalls für das Wildtyp-Enzym *CmHao* nachgewiesen (Kap. 4.2.6; Abb. 19 C) und deutet auf einen für beide Proteine identisch hohen Anteil an löslichen Aggregaten hin. Diese vermeintlichen Aggregate konnten jedoch auch bei der *CmHao_V450Y*-Präparation nicht durch verminderte Proteinkonzentrationen, erhöhte Salzkonzentrationen (0,7 M) sowie zusätzliche DTT- und Octyl- β -D-glucopyranosid-Zugaben aufgelöst werden. Anhand der Abbildung 34 wird verdeutlicht, dass ein Einfluss der Mutationen V414Y und V422Y auf die Multimerisierungszustände der Fusionsproteine *CcuHao* und *CfHao* nachgewiesen werden konnte. Während die Mutation V414Y im Fusionsprotein *CcuHao* zum Verlust eines hexameren Multimerisierungsgrads führt, konnte bei der ϵ Hao-MBP Variante *CfHao_V422Y* im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine mögliche Trimerisierung nachgewiesen werden.

4.7.7 Blau-Nativ-Elektrophorese (BN-PAGE)

Die Analyse der gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine unter nativen Bedingungen erfolgte mit Hilfe der Blau-Nativ-Gelelektrophorese (Kapitel 3.8.4). Sowohl für das Protein *CcuHao_V414Y* als auch *CfHao_V422Y* konnten im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen Veränderungen hinsichtlich des Multimerisierungsgrads beobachtet werden. Diese Veränderungen, welche mittels analytischer Gelfiltration nachgewiesen werden konnten, sollten nachfolgend in einer BN-PAGE näher untersucht werden. Die Fusionsproteine *CfHao_V422Y* und *CcuHao_V414Y* können über einen weiten Molekulargewichtsbereich des nativen Gels detektiert werden (Kap. 4.2.7; Abb. 20). Bei beiden Proteinen sind dominante Monomere (\sim 97 kDa) und vermeintliche Dimere nachweisbar. Weiterhin konnten bei den unveränderten Proteinen *CcuHao* und *CfHao* höhere Multimerisierungszustände beobachtet werden, die jedoch in den dazugehörigen ϵ Hao-MBP

Varianten *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* nicht nachweisbar waren (Abb. 20). Interessanterweise war bei der ϵ Hao-MBP Variante *CfHao_V422Y* eine zusätzliche Proteinbande im Gel vorhanden, die im Wildtyp-Enzym nicht vorkam. Diese Bande mit einer Größe von über 250 kDa würde für eine Trimerisierung des Proteins sprechen. Mit Hilfe der BN-PAGE konnten noch weitere Banden identifiziert werden. Hierbei handelt es sich jedoch vermutlich um Abbauprodukte der Zielproteine oder um Multimerisierungszustände, bei denen die MBP-Affinitätstags teilweise abgespalten wurden. Die Veränderungen des Multimerisierungsgrads, welche im Rahmen der analytischen Gelfiltration bei den Proteinen *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* beobachtet wurden, konnten mit Hilfe der Blau-Nativ-Elektrophorese verifiziert werden. Im Fall des Fusionsproteins *CmHao_V450Y* konnte wie beim unveränderten Protein *CmHao* keine erfolgreiche BN-PAGE durchgeführt werden.

4.7.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* wurde wie in Kapitel 3.8.5 beschrieben durchgeführt und ist in Abbildung 21 (Kap. 4.2.8) dargestellt. Innerhalb der isoelektrischen Fokussierung waren keine Unterschiede zwischen den unveränderten ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen (*CfHao*, *CmHao*, *CcuHao*) und den dazugehörigen Proteinvarianten nachweisbar. Für die Fusionsproteine *CfHao_V422Y* und *CcuHao_V414Y* wurden vergleichbare isoelektrische Punkte im Bereich von pI 7,0-8,0 ermittelt. Das Protein *CmHao_V450Y* wies einen etwas höheren isoelektrischen Punkt von 8,3 auf. Darüber hinaus wurden bei den drei Proteinvarianten ebenso wie bei den unveränderten Fusionsproteinen mehrere zusätzliche Banden im pI-Bereich von 4,7-8,0 detektiert (Abb. 21). Dies verdeutlicht, dass das Vorhandensein mehrerer Multimerisierungszustände unterschiedliche pI-Werte der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine bedingt.

4.8 Bioinformatische Analysen

4.8.1 Untersuchung ausgewählter HaoA-Proteinsequenzen

Seit der Erstbeschreibung der ϵ Hao (Kern & Simon, 2009; Campbell *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2011) ist die Anzahl der anfangs fünf verfügbaren *haoA*-Gensequenzen der Epsilonproteobakterien *C. fetus*, *C. curvus*, *C. concisus*, *N. profundicola* und *C. mediatlanticus* auf über 38 Sequenzen angestiegen (Tab. 25). Aufgrund dessen wurden neue bioinformatische Analysen durchgeführt, die Aufschluss über das Vorkommen der *haoA*-Gene sowie deren Lage im Genom geben sollten. Weiterhin wurden mit Hilfe der neuen *haoA*-Gensequenzen mögliche Interaktionspartner und konservierte Sequenzbereiche bzw. Häm *c*-Eisenliganden identifiziert. Anhand der neu verfügbaren *haoA*-Sequenzen wurde ermittelt, dass der Großteil der HaoA-Proteine unterschiedlichen *Campylobacter* und *Helicobacter* Spezies zugeordnet werden kann. Neben den Epsilonproteobakterien wiesen jedoch auch die Genome diverser Gamma- und Deltaproteobakterien sowie Vertreter der Phyla Aquificae und Thermodesulfobacteria HaoA-Proteine auf (Tab. 25). Neben dem Vorkommen der HaoA-Proteine wurde auch deren Aminosäureanzahl überprüft. Dabei fiel auf, dass die nicht prozessierten Proteine eine variable Länge zwischen 429 und 513 Aminosäuren aufwiesen, wobei die längsten Proteinsequenzen die der Tiefseebakterien *N. profundicola*, *C. mediatlanticus*, *Lebetimonas* sp. JH292 und *G. electrodiphilus* sind. Die Unterschiede hinsichtlich der Aminosäureanzahl konnten unter Einbeziehung eines neu erstellten Alignments auf spezifische epsilonproteobakterielle Einschübe innerhalb der Aminosäuresequenz bzw. am C-Terminus zurückgeführt werden (Kap. 7.1). Weiterhin war es möglich mit Hilfe der Alignment-Daten sowie einer bisher unveröffentlichten Kristallstruktur der ϵ Hao aus *C. curvus* (Diplomarbeit Michael B. Braun, Universität Freiburg) bei allen bioinformatisch untersuchten HaoA-Proteinsequenzen acht Hämbindemotive (CXXCH) und hoch konservierte distale Häm *c*-Eisenliganden (für *C. curvus*: H70, H95, H128, H210, H243, H288, M420) zu identifizieren. Der charakteristische Tyrosin-Rest, welcher in der Hao der Nitrifizierer acht Aminosäuren stromabwärts des Häm 7 Liganden Histidin gelegen ist (HX₇Y), fehlt in allen untersuchten ϵ Hao-Proteinsequenzen. An dessen Position befindet sich in den ϵ Hao-Sequenzen im selben Abstand zu dem konservierten distalen Häm 7 Liganden Methionin (MX₇W) die konservierte Aminosäure Tryptophan (W428). Eine Ligandierung mit Methionin wurde ebenfalls für das Oktahäm Cytochrom *c* aus *Ignicoccus hospitalis* (IhOCC) nachgewiesen. In diesem Protein liegt eine axiale Ligandierung der Häm *c*-Gruppen 3 und 7 mit den konservierten Aminosäuren Histidin und Methionin vor (Parey *et al.*, 2016).

Tabelle 25: Ausgewählte Organismen, deren Genom ein HaoA-Homolog kodiert.

Organismus ¹	εHao (HaoA)		HaoB ³	
	Länge ² (Aminosäurereste)	Accessionnummer	Länge (Aminosäurereste)	Accessionnummer
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 82-40 (ε)	461	WP_002849252	183	WP_002849250
<i>Campylobacter curvus</i> 595.92 (ε)	455	WP_011992073	190	WP_011992072
<i>Campylobacter concisus</i> 13826 (ε)	456	WP_012001403	190	WP_012001402
<i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236 (ε)	466	WP_005870908	185	WP_005870909
<i>Campylobacter iguaniorum</i> strain 1485E (ε)	463	WP_038454501	183	WP_038455627
<i>Campylobacter mucosalis</i> DSM 21682 (ε)	456	WP_034968130	190	WP_034968127
<i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i> CCUG 27631 (ε)	449	WP_063998037	183	WP_063998982
<i>Helicobacter ailurogastricus</i> (ε)	457	WP_053940990	200	WP_053940991
<i>Helicobacter bizzozeronii</i> (ε)	448	WP_050955528	153	WP_006017429
<i>Helicobacter cetorum</i> (ε)	456	WP_014660638	210	WP_043902585
<i>Helicobacter felis</i> ATCC 49179 (ε)	461	WP_013469246	224	WP_013469245
<i>Helicobacter heilmannii</i> (ε)	457	WP_053825411	200	WP_015106135
<i>Helicobacter suis</i> (ε)	476	WP_006564945	230	WP_050780243
<i>Arcobacter nitrofigilis</i> DSM 7299 (ε)	449	WP_013135666	181	WP_013135667
<i>Arcobacter anaerophilus</i> (ε)	450	WP_044417848	181	WP_044417850
<i>Caminibacter mediatlanticus</i> TB-2 (ε)	510	WP_007473950		nicht vorhanden
<i>Nautilia profundicola</i> AmH (ε)	510	WP_015902282		nicht vorhanden
<i>Lebetimonas</i> sp. JH292 (ε)	513	WP_024789242		nicht vorhanden
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> DSM 16401 (δ)	502	WP_020677351		nicht vorhanden
<i>Desulfurella acetivorans</i> A63 (δ)	452	AHF97263	189	AHF97262
<i>Desulfovibrio frigidus</i> DSM 17176 (δ)	451	WP_034602861	189	WP_031480646
<i>Desulfovibrio piezophilus</i> C1TLV30 (δ)	453	WP_015416066	189	WP_015416067
	459	WP_015414537	195	WP_015414536
<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> AM13 (δ)	450	WP_015335051	189	WP_015335050
<i>Desulfohalobium japonicum</i> DSM 18378 (δ)	429	WP_028580853		nicht vorhanden
<i>Pelobacter selenigenes</i> DSM 18267 (δ)	451	WP_029914943	189	WP_036683091
	459	WP_029917017	175	WP_029917015
<i>Aliagarivorans marinus</i> (γ)	493 ⁴	WP_026972422	196	WP_035480418
<i>Psychromonas aquimarina</i> (γ)	469 ⁴	WP_051303197	200	WP_051303193
<i>Photobacterium ganghwense</i> (γ)	489 ⁴	WP_047884198	186	WP_047884197
Alteromonadaceae bacterium Bs12 (γ)	434	WP_045861428	185	WP_045859606
<i>Oceanospirillum beijerinckii</i> DSM 7166 (γ)	446	WP_051227586	177	WP_036566238
<i>Marinobacterium litorale</i> DSM 23545 (γ)	433	WP_027854051	186	WP_051298887
<i>Marinobacterium stanieri</i> S30 (γ)	441	WP_010322583	179	WP_010322582
<i>Neptuniibacter caesariensis</i> (γ)	450	WP_040661545	183	WP_007020264
<i>Thioflavicoccus mobilis</i> 8321 (γ)	449	WP_015280314	181	WP_015280313
<i>Thermosulfidibacter takaii</i> ABI70S6 (Aquificae)	454	BAT72016	181	BAT72015
<i>Thermodesulfatator indicus</i> DSM 15286 (Thermodesulfobacteria)	451	WP_013908801	186	WP_013908802
<i>Thermodesulfatator autotrophicus</i> (Thermodesulfobacteria)	448	OAG28037	186	OAG28038
<i>Thermodesulfatator atlanticus</i> DSM 21156 (Thermodesulfobacteria)	448	WP_022853624	186	WP_022853623

¹ Proteobakterielle Klassen oder Phyla sind in Klammern angegeben. Die innerhalb dieser Arbeit untersuchten HaoA-Proteine wurden fett markiert.

² Die angegebene Länge der HaoA-Proteinsequenzen inkludiert Signalpeptide. Die außergewöhnlichen langen Sequenzen der epsilonproteobakteriellen Tiefsee-Bakterien sowie des marinen Bakteriums *Geopsychrobacter electrodiphilus* wurden fett hervorgehoben.

³ Identifikation der haoB-Gene, welche unmittelbar stromaufwärts des haoA-Gens gelegen sind und für ein Tetrahäm Cytochrom c der NapC/NrFH-Familie kodieren.

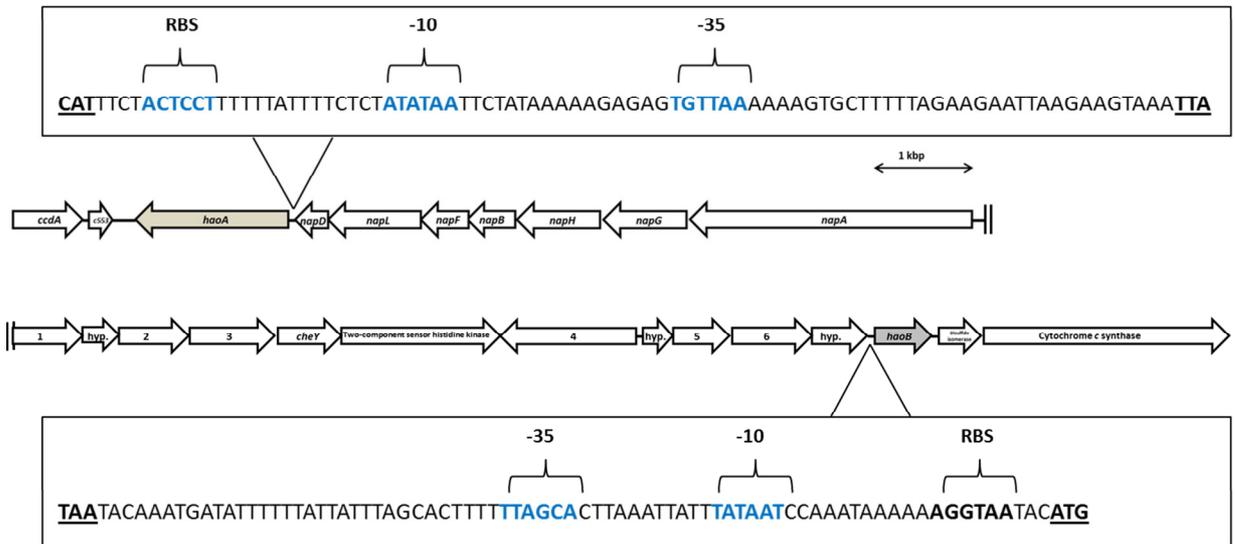
⁴ Die εHao-Proteine der Organismen *A. marinus*, *P. ganghwense* und *P. aquimarina* weisen im Vergleich zur durchschnittlichen Länge der HaoA-Sequenzen eine höhere Aminosäureanzahl auf. Ursächlich hierfür ist eine zusätzliche C-terminale Aminosäuresequenz (Kap. 7.1).

4.8.2 Identifizierung potenzieller Redoxpartner der ϵ Hao

Nach Durchsicht aller vorhandenen Genomdaten war es möglich in einem Großteil der in Tabelle 25 aufgelisteten Organismen ein Tetrahäm Cytochrom *c* des NapC/NrfH Typs (Gross *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006; Marritt *et al.*, 2012; Simon and Klotz, 2013) als möglichen Redoxpartner der HaoA Proteine zu identifizieren. Ursächlich hierfür war die Lage des entsprechenden Gens, welches sich in unmittelbarer Nähe zu den *haoA*-Gensequenzen befindet und daher nachfolgend als *haoB* bezeichnet wurde. Die Anordnung der beiden Gene zueinander lässt vermuten, dass eine HaoBA-Komplexbildung vorliegen könnte. Als mögliche Funktion von HaoB wäre eine Elektronenübertragung von einem membranständigen Chinol, beispielsweise Menachinol, zur ϵ Hao denkbar. Eine ähnliche Konstellation tritt beim NrfHA-Komplex auf, welcher in Delta- und Epsilonproteobakterien zu finden ist (Simon *et al.*, 2000; Simon, 2002; Rodrigues *et al.*, 2006). Mit Hilfe der Genomdaten konnten jedoch auch Organismen identifiziert werden, die kein *haoB*-Gen in unmittelbarer Nähe zur *haoA* aufweisen. Dieses war bei *C. mediatlanticus*, *N. profundicola*, *Lebetimonas* sp. JH292, *Geopsychrobacter electrodiphilus* und *Desulfobulbus japonicus* der Fall (Tab. 25). Jedoch besitzen sowohl *C. mediatlanticus*, *N. profundicola* als auch *Lebetimonas* sp. JH292 ein Monohäm Cytochrom *c*, welches stromabwärts des *haoA* Gens in entgegengesetzter Leserichtung gelegen ist (exemplarisch in Abb. 35 A und B dargestellt). Interessanterweise konnten in *C. mediatlanticus*, *N. profundicola* und *Lebetimonas* sp. JH292 Gene identifiziert werden, die für Tetrahäm Cytochrome *c* des NapC/NrfH-Typs kodieren und sich in der Nähe der respiratorischen, periplasmatischen Nitratreduktase (*nap*-Operon) befinden. Diese Gene sind vermutlich weder in einem Operon organisiert noch werden sie zusammen mit anderen Genen transkribiert (Abb. 35 A-C). Neben der einzigartigen Lage der *haoB*- bzw. *haoBA*-Gene im Bereich des *nap*-Operons konnten in diesen drei Organismen sowie *Arcobacter anaerophilus* potenzielle Promotorbereiche unmittelbar stromaufwärts von *haoB* bzw. *haoA* ermittelt werden (Abb. 35 A-D). Mit Hilfe eines Sequenzalignments (Kap. 7.2) konnten bei allen bioinformatisch untersuchten HaoB Proteinsequenzen vier Hämbindemotive (CXXCH) sowie Kandidaten für drei distale (Histidine) und ein proximaler Häm *c*-Eisenligand (Methionin) identifiziert werden. Interessant ist jedoch, dass die Funktion des distalen Häm *c*-Eisenliganden im Fall der *D. vulgaris* NrfH von einem Lysinrest des NrfA Proteins übernommen wird. Dieses Lysin ist jedoch in den analysierten ϵ Hao/HaoA-Proteinen nicht konserviert, sodass vermutlich ein Histidin der HaoB-Proteine als entsprechender distaler Ligand fungiert (Kap. 7.2).

A

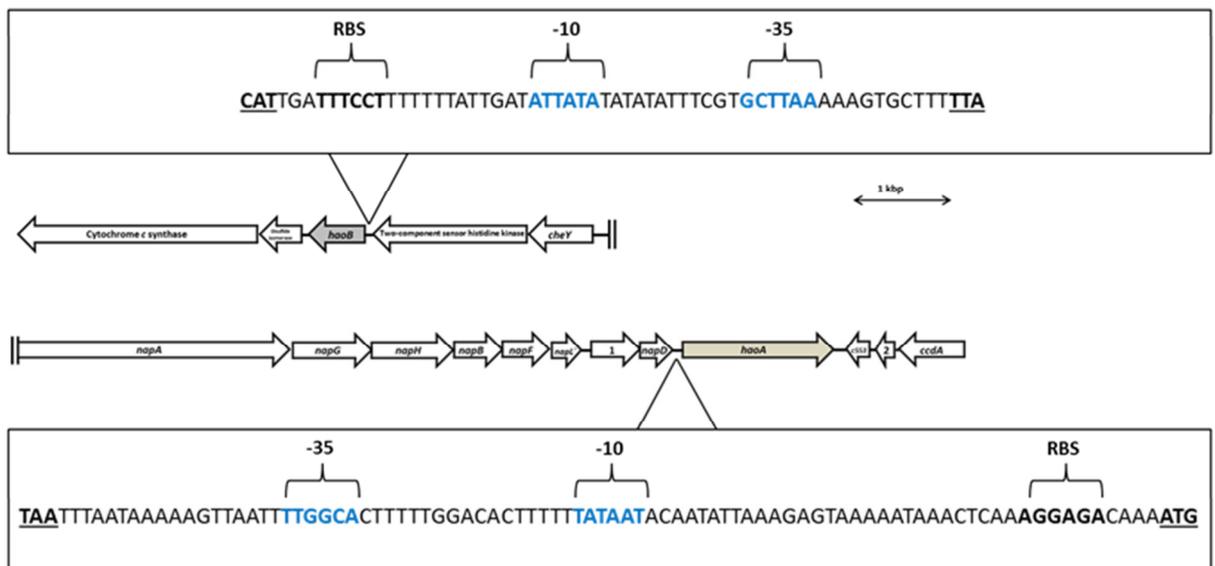
Caminibacter mediatlanticus TB-2



- 1: Molybdat ABC Transporter Substratbindeprotein
- 2: Molybdän ABC Transporter Permease-Untereinheit
- 3: Molybdän ABC Transporter ATP-Bindeprotein
- 4: Transkriptionsregulator der GntR-Familie
- 5: Clavaminat-Synthase-ähnliches Protein (Oxidase)
- 6: Membranprotein

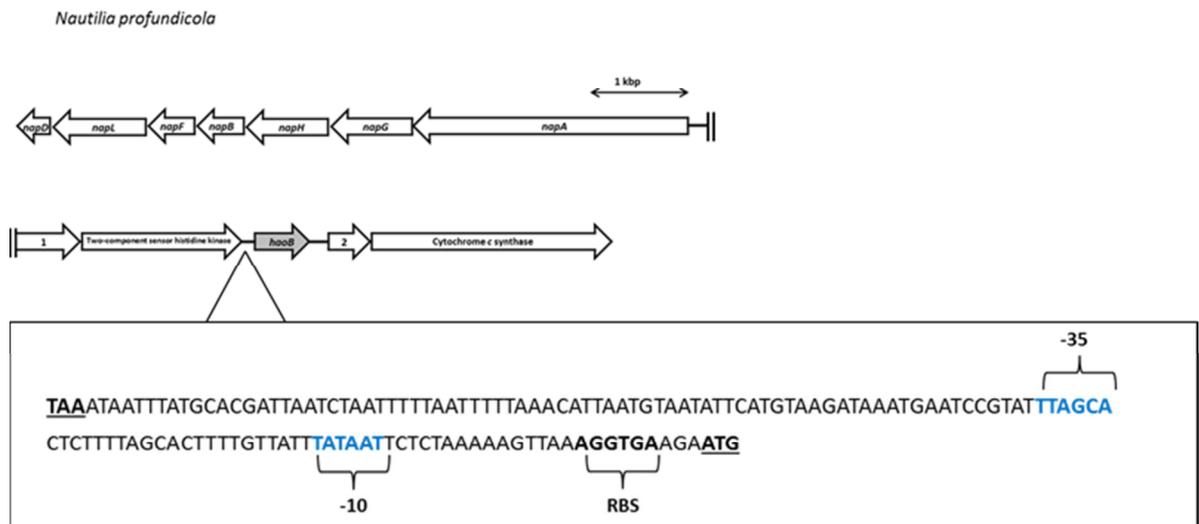
B

Lebetimonas sp. JH292



- 1: Hypothetisches Protein
- 2: Hypothetisches Protein

C



D

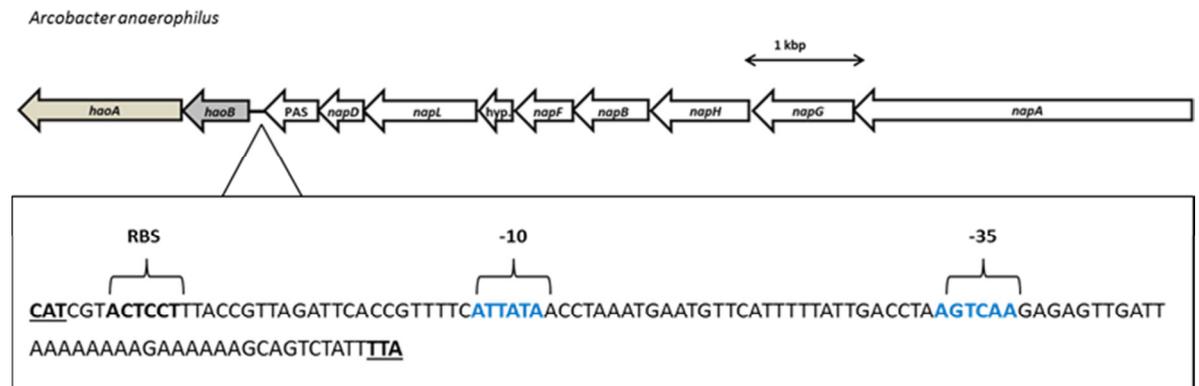


Abbildung 35: Genomische Organisation des *nap*-Genclusters in den Tiefseebakterien *C. mediatlanticus* TB-2 (A), *Lebetimonassp.* JH292 (B), *N. profundicola* (C) und *A. anaerophilus* (D). Die Gene *haoA* und *haoB* wurden braun bzw. grau hervorgehoben. Potenzielle Promotorbereiche, welche stromaufwärts der Gene *haoA* bzw. *haoB* identifiziert wurden, sind in einem Kasten dargestellt. Die ermittelten Nukleotidsequenzen weisen Start- und Stop-Codons (fett gedruckt und unterstrichen), mögliche Ribosomenbindestellen (RBS) und vermeintliche -10 und -35-Promotorregionen (blau) auf. Mit Ziffern bezeichnete Gene kodieren die jeweils unter der Abbildung angegebenen Proteine.

4.9 Weitere Vorgehensweisen zur Produktion und Reinigung der *CmHao* und *CcuHao* sowie der *HaoA* aus *N. europaea* (*NeHao*)

Vor der Konstruktion und Erstellung des Expressionsplasmids pTMH wurden hinsichtlich der heterologen Produktion und Reinigung der ϵ Hao-Proteine aus *C. mediatlanticus* (*CmHao*) und *C. curvus* (*CcuHao*) im Verlauf dieser Arbeit verschiedene Vorgehensweisen getestet, welche in Tabelle 26 zusammengefasst sind und in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert werden. Aufgrund der Heterogenität der gereinigten ϵ Hao-Proteine *CmHao* und *CcuHao* sowie geringer Proteinkonzentrationen wurde auf eine enzymatische Charakterisierung der Proteine verzichtet. Weiterhin wurde versucht die Hydroxylamin-Oxidoreduktase des Betaproteobakteriums *N. europaea* unter Verwendung des Expressionsplasmids pTMH heterolog in *W. succinogenes* zu produzieren. Dies führte jedoch nicht zur Expression eines intakten und enzymatisch aktiven Proteins.

Tabelle 26: Vorgehensweisen zur Produktion und Reinigung der ϵ Hao-Proteine *CmHao* und *CcuHao* sowie der *NeHao*. Die Expression aller nachfolgend aufgeführten Zielgene erfolgte im *nrf*-Locus von *W. succinogenes* unter der Kontrolle des natürlichen *nrf*-Promotors.

Zielgen	Affinitäts-Tag	Lokalisation (Terminus)	Plasmid	Bezeichnung
<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i>	<i>Strep</i> -Tag	C	pMK1- <i>CmHao</i>	<i>W. succinogenes</i> MK1- <i>CmHao kan napA::cat</i>
<i>haoA</i> aus <i>C. curvus</i>	<i>Strep</i> -Tag	C	pMK1- <i>CcuHao</i>	<i>W. succinogenes</i> MK1- <i>CcuHao kan napA::cat</i>
<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i>	zweifacher <i>Strep</i> -Tag	C	pMK2- <i>CmHao</i>	<i>W. succinogenes</i> MK2- <i>CmHao kan napA::cat</i>
<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i>	<i>Strep</i> -Tag	N und C	pMK1-N <i>Strep</i> - <i>CmHao</i>	<i>W. succinogenes</i> MK1-N <i>Strep</i> - <i>CmHao kan napA::cat</i>
<i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i>	His ₆ -Tag	C	pMK9- <i>CmHao</i>	<i>W. succinogenes</i> MK9- <i>CmHao kan napA::cat</i>
<i>haoA</i> aus <i>N. europaea</i>	MBP-Tag, His ₆ -Tag	C	pTMH- <i>NeHao</i>	<i>W. succinogenes</i> <i>NeHao</i> -MBP <i>kan</i>
<i>haoA</i> aus <i>N. europaea</i>	MBP-Tag, His ₆ -Tag	C	pTMH- <i>NeHao</i> _Y467V	<i>W. succinogenes</i> <i>NeHao</i> _Y467V-MBP <i>kan</i>

4.9.1 Heterologe Produktion und Reinigung der *CmHao* und *CcuHao* mit einem einfachen C-terminalen *Strep*-Tag

Für die Produktion der affinitätsmarkierten Multihäm Cytochrome *c* *CmHao* und *CcuHao* wurden die Mutanten *W. succinogenes* MK1-*CmHao kan napA::cat* und *W. succinogenes* MK1-*CcuHao kan napA::cat* erstellt (Kap. 3.2.2, 3.5.9, 3.6.3, 3.6.4). Zellen beider Mutanten wurden in bis zu 3x10¹¹ Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mittels French Press aufgeschlossen (Kapitel 3.4.5) und nach einer 60-minütigen Zentrifugation in lösliche Fraktion und Membranfraktion separiert. Die Reinigung der Proteine erfolgte wie in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben. Der Reinheitsgrad der Eluate wurde mittels SDS-PAGE sowie Coomassie- und Häm-Färbung überprüft (Abb. 36).

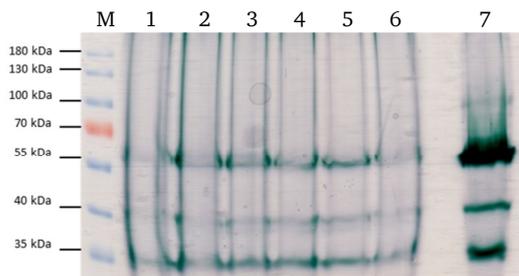
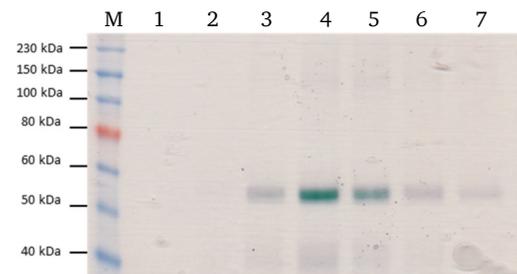
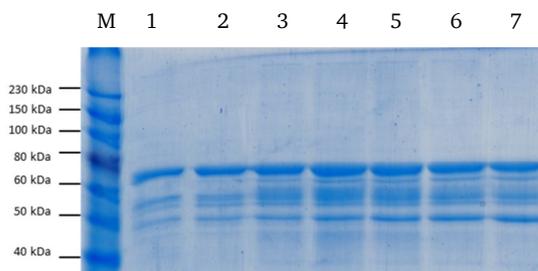
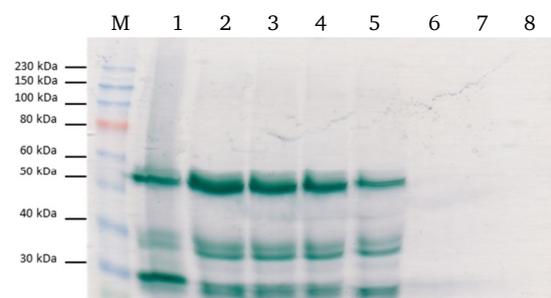
A**B****C****D**

Abbildung 36: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen, 300 µg Probe in jeder Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1-6, *W. succinogenes* MK1-*CmHao kan napA::cat* Transformanden; Spur 7, *W. succinogenes napA::cat* (150 µg); (B) Häm-Färbung der Elutionsfraktionen nach Reinigung der *CmHao*, 50 µl Probe in jeder Spur; M, ColorPlus™ Prestained Protein Ladder Broad Range; Spur 1-7, Eluate 1-7; (C) Coomassie-Färbung der Eluate nach Reinigung der *CmHao*, 5,0 µg Probe pro Spur; M, ColorPlus™ Prestained Protein Ladder Broad Range; Spur 1-7, Eluate 1-7; (D) Häm-Färbung der während der Reinigung gesammelten Fraktionen, 300 µg Probe pro Spur; M, ColorPlus™ Prestained Protein Ladder Broad Range; Spur 1, Homogenat; Spur 2, Lösliche Fraktion; Spur 3, Durchlauf; Spur 4-8, Waschfraktionen 1-5.

Sowohl in Zellsuspensionen als auch Elutionsfraktionen konnte mittels Coomassie- und Häm-Färbung die ϵ Hao aus *C. mediatlanticus* mit einer Größe von 57 kDa nachgewiesen werden (Abb. 36 A-B). Die Reinigung mittels *Strep*-Tactin® -Affinitätschromatographie erwies sich jedoch nach näherer Betrachtung als ineffizient, da eine große Anzahl an Fremdproteinen in den Elutionsfraktionen detektiert wurde (Abb. 36 C). Das Zielprotein wurde ebenfalls im Durchlauf und den Waschfraktionen nachgewiesen (Abb. 36 D), sodass nur eine unzureichende Bindung des C-terminalen *Strep*-Tags an das Säulenmaterial vorlag. Vergleichbare Ergebnisse konnten ebenfalls nach der Reinigung der *CcuHao* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Ineffizienz der Proteinreinigung wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

4.9.2 Heterologe Produktion und Reinigung der *CmHao* mit einem doppelten

C-terminalen *Strep*-Tag

Um die Effizienz der *Strep*-Tactin®-Affinitätschromatographie zu erhöhen und eine Bindung des *Strep*-Tags an das Säulenmaterial zu erreichen, wurde die *CmHao* mit einem doppelten C-

terminalen *Strep*-Tag versehen. Als Matrize für die Konstruktion des Vektors pMK2-*CmHao* wurde das bereits vorhandene Plasmid pMK1-*CmHao* genutzt (Kap. 3.2.2 und 3.5.9). Die Erstellung des *W. succinogenes* Stammes MK2-*CmHao kan napA::cat* wurde wie in den Kapiteln 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben durchgeführt. Für die Produktion des Zielproteins wurden Zellen eines mittels PCR und Häm-Färbung überprüften Transformanden in 3x10 l Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, aufgeschlossen (Kapitel 3.4.5) und durch Ultrazentrifugation in lösliche Fraktion und Membranfraktion separiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte wie in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben unter Verwendung einer *Strep*-Tactin® Superflow Säule der Firma IBA GmbH (Göttingen) mit 5 ml Bettvolumen. Die im Rahmen der Reinigung aufgefangenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE sowie anschließender Coomassie- und Häm-Färbung auf Produktion und Reinheitsgrad der *CmHao* untersucht (Abb. 37).

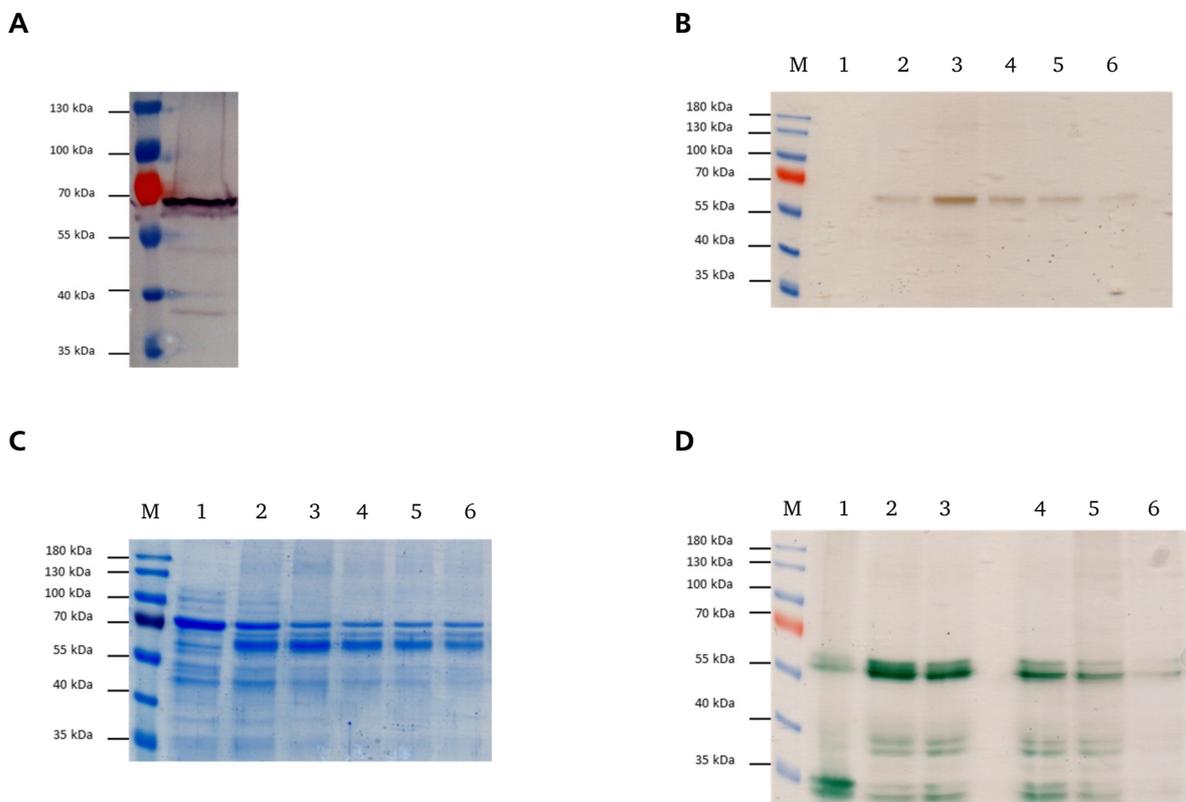


Abbildung 37: (A) Western Blot (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und ELISA einer Zellsuspension der Mutante *W. succinogenes* MK2-*CmHao kan napA::cat* zum Nachweis der *CmHao* unter Verwendung des Antikörpers *Strep*-Tactin®-HRP conjugate (IBA), 70 µg Probe pro Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (B) Häm-Färbung der Elutionsfraktionen nach Reinigung der *CmHao*, 50 µl Probe in jeder Spur; Spur 1-6, Eluate 1-6; (C) Coomassie-Färbung der Eluate nach Reinigung der *CmHao*, 50 µl Probe pro Spur; Spur 1-6, Eluate 1-6; (D) Häm-Färbung der im Rahmen der Reinigung aufgefangenen Fraktionen, 250 µg Probe pro Spur; Spur 1, Homogenat; Spur 2, Lösliche Fraktion; Spur 3, Durchlauf; Spur 4-6, Waschfraktionen 1-3.

Die *CmHao* mit einer Größe von 57 kDa konnte in den Elutionsfraktionen 2-6 mittels Coomassie- und Häm-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 37 B-C). Auch in der Zellsuspension der Mutante

W. succinogenes MK2-*CmHao kan napA::cat* wurde das Zielprotein, welches mit einem doppelten C-terminalen *Strep*-Tag versehen war, zweifelsfrei mit einer Immunfärbung detektiert (Abb. 37 A). Dennoch war auch dieser Reinigungsansatz ineffizient und nicht für die Produktion und Reinigung der *CmHao* im großen Maßstab geeignet, da erneut eine nicht unerhebliche Anzahl von Fremdproteinen in den Eluatn nachweisbar war (Abb. 37 C). Das Zielprotein wurde trotz der Verlängerung des Affinitäts-Tags zum wiederholten Mal im Durchlauf und den Waschfraktionen detektiert (Abb. 37 D), sodass ein positiver Effekt des zusätzlichen zweiten C-terminalen *Strep*-Tags auf die Bindung der *CmHao* an das Säulenmaterial ausgeschlossen werden kann.

4.9.3 Heterologe Produktion und Reinigung der *CmHao* mit einem N- und C-terminalen *Strep*-Tag

Da das Anbringen eines einfachen und doppelten C-terminalen *Strep*-Tags wider Erwarten zu keiner effizienten Reinigung der *CmHao* führte, wurde nachfolgend ein N-terminaler *Strep*-Tag zum einfachen C-terminalen Tag hinzugefügt. Dieser sollte eine Bindung des Zielproteins an das *Strep*-Tactin® begünstigen. Für diesen Produktionsansatz wurde das Expressionsplasmid pMK1-NStrep-*CmHao* erstellt (Kap. 3.2.2). Als Matrize für die Konstruktion des Vektors wurde das bereits vorhandene Plasmid pMK1-*CmHao* genutzt (Kap. 3.2.2). Die Amplifikation des Zielgens erfolgte mit dem Primerpaar *CmHao*-NStrep-F/NStrep-R (Kap. 3.2.3). Die Erstellung des *W. succinogenes* Stammes MK1-NStrep-*CmHao kan nap::cat* sowie die Kultivierung und Charakterisierung entsprechender Transformanden wurden wie in den Kapiteln 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben durchgeführt. Die Produktion des Zielproteins wurde mit SDS-PAGE (Kap. 3.7.5) und nachfolgender Häm-Färbung (3.8.2) nachgewiesen. Zellen des *W. succinogenes*-Stammes MK1-NStrep-*CmHao kan nap::cat* wurden in 2x10 l Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mittels French Press aufgeschlossen und in lösliche Fraktion und Membranfraktion separiert (Kap. 3.4.5). Die Reinigung der *CmHao* wurde wie in Kapitel 3.7.6.1 durchgeführt, jedoch war bei keiner der Elutionsfraktionen die charakteristische Rotfärbung des Multihäm Cytochromes *c* nachweisbar. Dennoch wurden die während der Reinigung aufgefangenen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und hinsichtlich der Produktion des Zielproteins überprüft (Abb. 38). Die affinitätsmarkierte *CmHao* konnte mit einer erwarteten Größe von 57 kDa in sehr geringen Konzentrationen in den Eluatn nachgewiesen werden (Abb. 38 A-B). Der Reinheitsgrad des Proteins entsprach jedoch nicht den Erwartungen, da zusätzlich zur *CmHao* eine große Anzahl an Fremdproteinen unspezifisch von der Affinitätssäule eluiert wurde. Weiterhin konnte wiederholt beobachtet werden, dass das Zielprotein in hohen Konzentrationen im Durchlauf und den

Waschfraktionen vorhanden ist (Abb. 38 C). Bei diesen Fraktionen wurden im SDS-Gel Doppelbanden detektiert, die auf einen möglichen Abbau der *CmHao* hindeuten (Abb. 38 C).

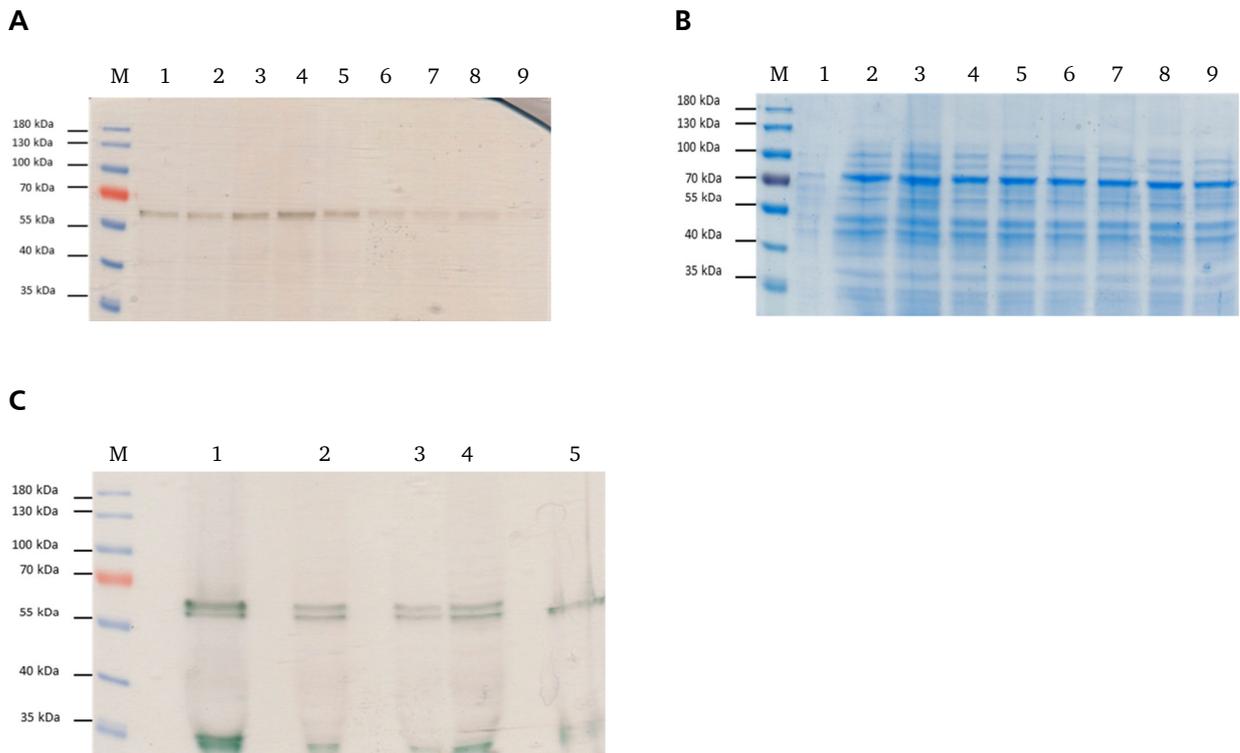


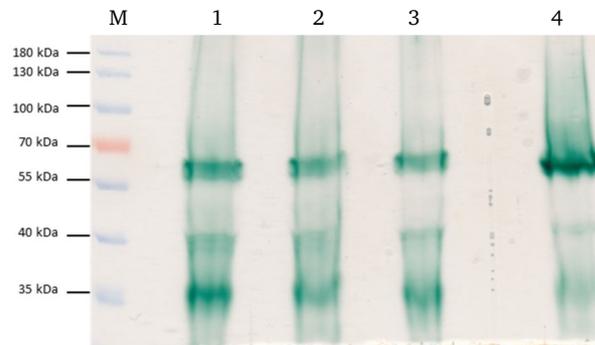
Abbildung 38: (A) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung der Eluate nach Reinigung der *CmHao* mit einfachem C- und N-terminalem *Strep*-Tag, 50 μ l Probe pro Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1-9, Eluate 1-9; (B) Coomassie-Färbung der Eluate, 50 μ l Probe in jeder Spur; Spur 1-9, Eluate 1-9; (C) Häm-Färbung der restlichen aufgefangenen Fraktionen, 200 μ g Protein pro Spur; Spur 1, Lösliche Fraktion; Spur 2, Durchlauf; Spur 3-4, Waschfraktion 1-2; Spur 5, Kontrollstamm *W. succinogenes napA::cat*, 150 μ g Protein.

4.9.4 Heterologe Produktion und Reinigung der *CmHao* mit einem einfachen C-terminalen His-Tag

Da mit Hilfe von C- und N-terminalen *Strep*-Tags nur eine unzureichende Reinigung der *CmHao* möglich war, wurde ein Wechsel des Affinitäts-Tags vorgenommen. Der nachfolgend verwendete His-Tag sollte primär den *Strep*-Tag als mögliche Ursache für die unzureichende Bindung des Zielproteins an das Säulenmaterial ausschließen. Weiterhin sollte unter Verwendung eines linearen Imidazolgradienten die Anzahl der Fremdproteine limitiert und so die Reinheit des Zielproteins erhöht werden. Für diesen neuen Ansatz wurde das Expressionsplasmid pMK9, wie zuvor in Kapitel 3.5.8.1 beschrieben, erstellt. Die Konstruktion des Plasmid-Derivates pMK9-*CmHao* (Kap. 3.2.2) wurde wie in Kapitel 3.5.9 beschrieben durchgeführt. Als Matrize wurde das bereits vorhandene Plasmid pMK1-*CmHao* genutzt (Kap. 3.2.2). Die Amplifikation des Zielgens erfolgte unter Verwendung des Primerpaares BsaICmHaoOp-F/BsaICmHaoOp-R (Kap. 3.2.3). Die Erstellung des *W. succinogenes* Stammes MK9-*CmHao kan nap::cat* sowie die Kultivierung und

Charakterisierung entsprechender Transformanden wurden wie in den Kapiteln 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben durchgeführt. Die Produktion des Zielproteins wurde mittels SDS-PAGE, anschließender Häm-Färbung sowie einer Immunodetektion überprüft (Abb. 39).

A



B

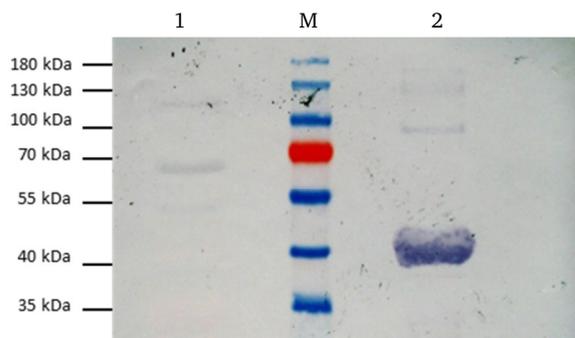


Abbildung 39: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen, 250 µg Probe in jeder Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1-3, *W. succinogenes* MK9-*CmHao kan napA::cat* Transformanden; Spur 4, *W. succinogenes napA::cat* (150 µg); (B) Western Blot (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und ELISA einer Zellsuspension des Stammes *W. succinogenes* MK9-*CmHao kan napA::cat* zum Nachweis der *CmHao* unter Verwendung des Antikörpers Anti-His-HRP (Roth), 70 µg Probe pro Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1, Zellsuspension eines *W. succinogenes* MK9-*CmHao kan napA::cat* Transformanden; Spur 2, Positivkontrolle (Schwefeltransferase; bereitgestellt von Dr. Oliver Klimmek).

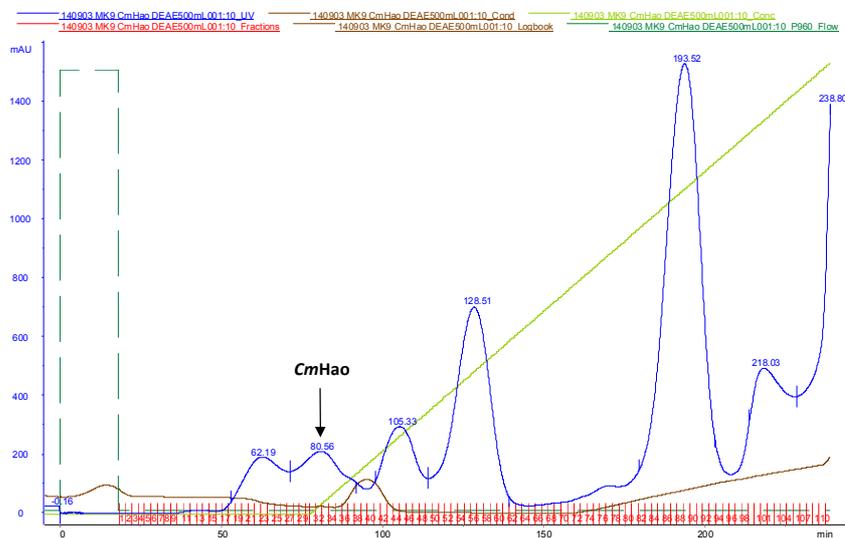
Das affinitätsmarkierte *CmHao* wurde mit einer Größe von 57 kDa sowohl mittels Häm-Färbung als auch Immunodetektion in Zellsuspensionen des Stammes *W. succinogenes* MK9-*CmHao kan napA::cat* nachgewiesen (Abb. 39 A und B). Für die Reinigung des Proteins wurden Zellen des *W. succinogenes*-Stammes MK9-*CmHao kan napA::cat* in 10 l Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mittels French Press aufgeschlossen und in lösliche Fraktion und Membranfraktion separiert (Kap. 3.4.5). Die anschließende Nickel-Nitriloessigsäure (NTA) Affinitätschromatographie wurde wie in Kapitel 3.7.6.2 beschrieben durchgeführt. Jedoch wurde auch nach einem Wechsel des Affinitäts-Tags keine zufriedenstellende Reinigung der *CmHao* erreicht (Daten nicht gezeigt). Das Zielprotein war erneut in den Waschfraktionen nachweisbar, was vermutlich auf einen

unzugänglichen His-Tag zurückgeführt werden kann. Die Reinigung der *CmHao* unter Nutzung kleiner Affinitäts-Tags wurde anschließend nicht weiter verfolgt.

4.9.5 Konventionelle Reinigung der *CmHao*

Da mittels Ni-NTA- und *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie keine effiziente und reproduzierbare Reinigung der *CmHao* erreicht werden konnte, wurde nachfolgend auf konventionelle Reinigungsmethoden zurückgegriffen. Die konventionelle Reinigung von Proteinen mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie oder Gelfiltration ist vollkommen unabhängig von C- oder N-terminal angefügten Affinitäts-Tags, sodass die Zielproteine allein hinsichtlich ihrer Ladung oder Molekülgröße angereichert werden können. Die Reinigungen von Zellen der *W. succinogenes* Stämme MK2-*CmHao kan napA::cat* und MK9-*CmHao kan napA::cat* erfolgten mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie (Kap. 3.7.7.1) unter Verwendung von Frischzellen und/oder gefrorenen Zellen (2x10 l Maßstab). Die gesamten Reinigungsverläufe wurden mit Hilfe von Chromatogrammen dokumentiert und analysiert (exemplarisch in Abb. 40 A dargestellt). Der Nachweis der *CmHao* erfolgte mittels SDS-PAGE sowie anschließender Coomassie- und Häm-Färbung und ist exemplarisch in Abbildung 40 dargestellt.

A



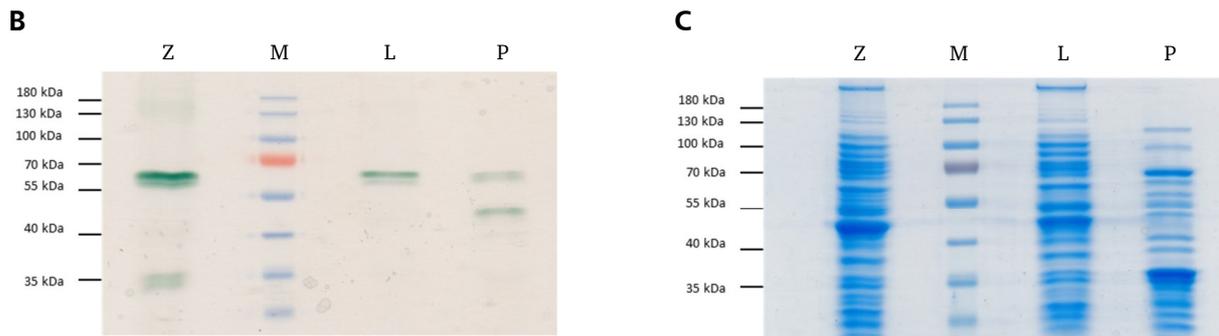


Abbildung 40: (A) Chromatogramm nach Reinigung des *W. succinogenes* Stammes MK9-*CmHao kan napA::cat* mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie. Für die Reinigung wurde ein Kaliumphosphat-Puffer verwendet (50 mM, pH 7,5, ermittelter pI der *CmHao*: 8,3). Das Zielprotein wurde innerhalb der Waschfraktionen 30-34 bei einem Prozessvolumen von 160 ml und einem maximalen UV-Signal von 200 mAU detektiert. (B) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung der *CmHao*, 50 µg Protein pro Spur; Z, Zellhomogenat; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; L, Lösliche Fraktion; P, vereinigte und ankonzentrierte Cytochrom c-haltige Fraktionen; (C) Coomassie-Färbung der *CmHao* mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie, 20 µg Probe in jeder Spur.

Die ϵ Hao aus *Caminibacter mediatlanticus* wurde nach Etablierung einer konventionellen Reinigungsmethode mit einer erwarteten Größe von 57 kDa in den Waschfraktionen 30-34 nachgewiesen (Abb. 40 A). Nach SDS-PAGE und anschließender Coomassie- und Häm-färbung des Zellhomogenats, der löslichen Fraktion sowie der vereinigten und ankonzentrierten Waschfraktionen war ein direkter Vergleich des Reinheitsgrades der *CmHao* vor und nach Durchführung der Anionenaustauschchromatographie möglich. Dabei wurde ersichtlich, dass bereits mit Hilfe eines schwachen Anionenaustauschers eine große Anzahl von Fremdproteinen entfernt werden konnte (Abb. 40 C). Dennoch war die Reinigung der *CmHao* unter Zuhilfenahme einer konventionellen Methode nicht erfolgsversprechend, da bereits nach Durchführung der DEAE-Anionenaustauschchromatographie ein Abbau des Zielproteins beobachtet werden konnte (Abb. 40 B). Ursächlich für die Proteindegradation war hierbei die lange Verweildauer des Zielproteins auf der Säule während des Reinigungsvorgangs. Die Degradation der *CmHao* sowie die Tatsache, dass mindestens ein weiterer Reinigungsschritt erforderlich wäre, um den Reinheitsgrad des Zielproteins deutlich zu erhöhen und adäquate Proteinausbeuten zu erhalten, führten nachfolgend dazu, dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

4.9.6 Heterologe Produktion und ortsspezifische Veränderung der HaoA aus *Nitrosomonas europaea* (*NeHao*)

4.9.6.1 Heterologe Produktion des Hao-MBP Fusionsproteins *NeHao*

Als Matrize für die Amplifikation des *haoA*-Gens der *NeHao* wurde das bereits vorhandene Plasmid pMK1-*NeHao* genutzt (Kap. 3.2.2). Die Amplifikation des Zielgens erfolgte unter Verwendung des Primerpaares BsaI*NeHao*Op-F/BsaI*NeHao*Op-R (Kap. 3.2.3 und 3.5.9). Die

Erstellung des *W. succinogenes* Stammes *NeHao-MBP kan* sowie die Kultivierung und Charakterisierung entsprechender Transformanten wurden wie in den Kapiteln 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben durchgeführt. Die Produktion des fusionierten Zielproteins wurde mit SDS-PAGE und nachfolgender Häm-Färbung nachgewiesen. Die Zellen wurden anschließend im Maßstab von 60 l Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mit Tangentialfiltration (Kapitel 3.4.4) geerntet und nachfolgend mittels French Press aufgeschlossen (Kapitel 3.4.5). Die anschließende Reinigung des periplasmatisch lokalisierten Zielproteins wurde wie in Kapitel 3.7.6.3 beschrieben durchgeführt. Nachfolgend wurde die Elutionsfraktion 2 auf das Vorhandensein der fusionierten *NeHao* sowie das Vorkommen eines trimeren Multimerisierungsgrads überprüft (Abb. 41).

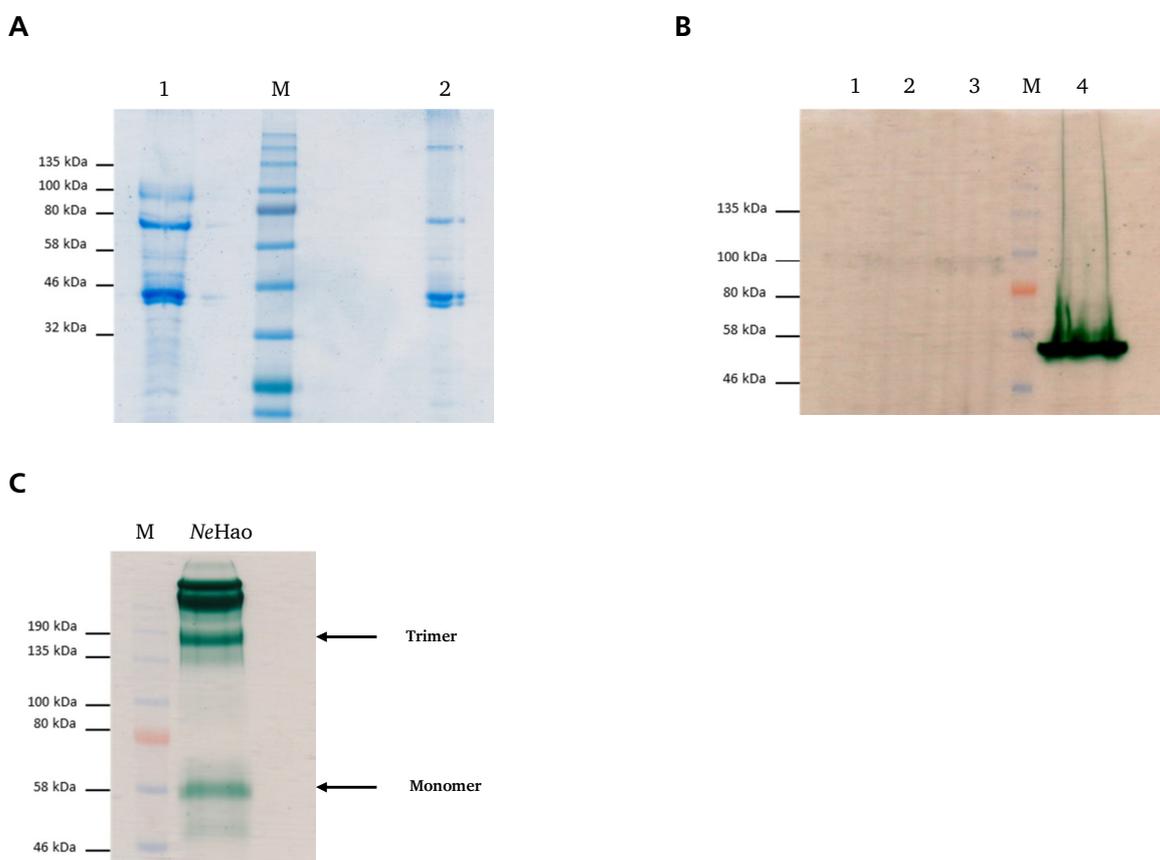


Abbildung 41: (A) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Coomassie-Färbung des gereinigten *Hao-MBP* Fusionsproteins *NeHao*, 7,5 µg Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, *NeHao* nach Zugabe von Mercaptoethanol; Spur 2, *NeHao* ohne Zusatz reduzierender Detergenzien; (B) Häm-Färbung nach Reinigung der *NeHao* mittels MBP-Affinitätschromatographie, 90 µg Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1-3, Elutionsfraktionen 1-3; Spur 4, *W. succinogenes napA::cat* (150 µg); (C) SDS-PAGE (7,5 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung der gereinigten *NeHao* (bereitgestellt von Prof. Alan Hooper), 30 µg Probe pro Spur.

In den Elutionsfraktionen konnte nach Reinigung der *NeHao* keine rötliche Färbung beobachtet werden. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine unzureichende Häm-Beladung der *NeHao* (Abb. 41 B). Dieses Phänomen wurde bereits bei der heterologen Produktion des Proteins in

E. coli beobachtet (Mehrotra *et al.*, 2012). Dennoch war es möglich im Eluat 2 sowohl das Fusionsprotein mit einer Masse von 104 kDa als auch das MBP-freie Zielprotein mit einer Masse von etwa 64 kDa sowie den bereits abgespaltenen MBP-Tag (40 kDa) mit einer SDS-PAGE und anschließenden Coomassie-Färbung nachzuweisen (Abb. 41 A). Ebenfalls wurde ohne Zusatz des reduzierenden Detergens β -Mercaptoethanol ein weiterer möglicher Multimerisierungszustand bei 190 kDa detektiert (Abb. 41 A). Inwieweit es sich bei dieser zusätzlichen Proteinbande um ein Aggregat des Zielproteins handelt oder aber ein trimerer Multimerisierungszustand (Trimer MBP-freie *NeHao*: 192 kDa; Trimer Fusionsprotein: 312 kDa) vorliegt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Um die Funktionalität des produzierten *Hao*-MBP Fusionsproteins *NeHao* zu überprüfen, wurden Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt. Bei keiner dieser Messungen war jedoch eine signifikante Reduktase- oder Oxidase-Aktivität nachweisbar. Auch die Untersuchung des Absorptionsverhaltens mittels UV/Vis-Spektroskopie gestaltete sich schwierig, da aufgrund der geringen Häm-Beladung des Proteins auch nach Messung einer unverdünnten Proteinprobe kein aussagekräftiges Cytochrom *c*-Spektrum ermittelt werden konnte (Abb. 42). Aufgrund dessen wurde die von Prof. Alan Hooper bereitgestellte *NeHao*-Präparation (Abb. 41 C) als Kontrolle für die zuvor gezeigten Enzymaktivitätsmessungen und UV/Vis-Spektroskopie verwendet.

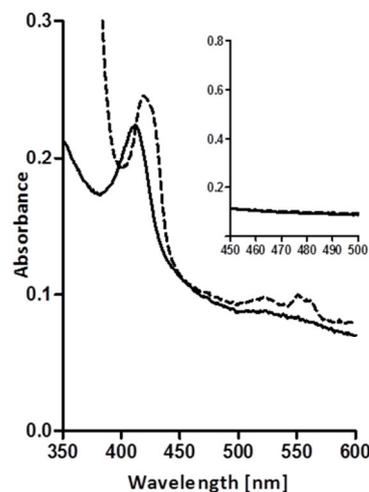
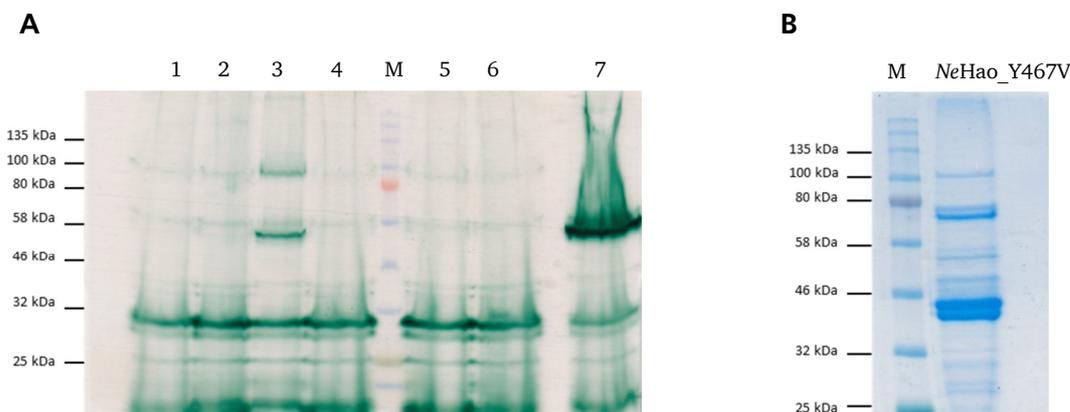


Abbildung 42: UV/Vis-Spektrum des in *W. succinogenes* heterolog produzierten *Hao*-MBP Fusionsproteins *NeHao*. Die Messung erfolgte mit 3 mg Protein. Schwarze Linie: oxidiertes Zustand, Gestrichelte Linie: reduzierter Zustand nach Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit.

4.9.6.2 Heterologe Produktion der Hao-MBP Variante *NeHao_Y467V*

Im Rahmen der zielgerichteten Mutagenese sollte ein Tyrosin-Rest der *NeHao*, welcher für die Ausbildung des charakteristischen Tyrosin Cross-Links essentiell ist, entfernt werden. Ziel der Mutagenese war es, die durch den Tyrosin Cross-Link bedingte Trimerisierung der *NeHao* aufzulösen und somit eine möglicherweise bessere Häm-Beladung des Proteins zu erreichen. Weiterhin sollte das Protein hinsichtlich struktureller und funktioneller Veränderungen untersucht werden. Als Matrize für die Konstruktion des Vektors pTMH-*NeHao_Y467V* wurde das zuvor erstellte Plasmid pTMH-*NeHao* genutzt (Kap. 3.2.2). Die Amplifikation des Zielgens erfolgte unter Verwendung der Mutagenese-Primer *NeHao_mut-F2* und *NeHao_mut-R2* (Kap. 3.2.3, 3.5.1-3.5.2). Die Erstellung des *W. succinogenes* Stammes *NeHao_Y467V-MBP kan* sowie die Kultivierung und Charakterisierung entsprechender Transformanden wurden wie in den Kapiteln 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben durchgeführt. Die Produktion des fusionierten Zielproteins wurde mit SDS-PAGE und nachfolgender Häm-Färbung nachgewiesen. Zellen eines entsprechenden Transformanden (Abb. 43 A) wurden anschließend in 5x10 l Formiat/Fumarat-Medium vermehrt, mit einer Tangentialfiltrationseinheit (Kapitel 3.4.4) geerntet und mittels French Press aufgeschlossen (Kapitel 3.4.5). Die anschließende Reinigung des Zielproteins mittels MBP-Affinitätschromatographie wurde wie in Kapitel 3.7.6.3 beschrieben durchgeführt. Nachfolgend wurde die Elutionsfraktion 2 auf das Vorhandensein der fusionierten *NeHao_Y467V* sowie das Vorkommen eines trimeren Multimerisierungsgrads überprüft (Abb. 43 B).



C

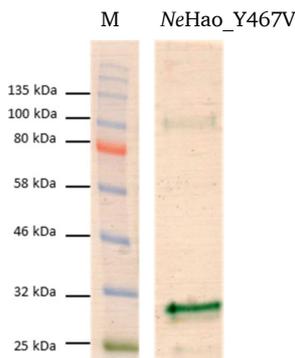


Abbildung 43: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen, 200 µg Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1-6, *W. succinogenes* NeHao_Y467V-MBP *kan* Transformanden 1-6 ; Spur 7, *W. succinogenes* *napA::cat* (150 µg); (B) Coomassie-Färbung des gereinigten Hao-MBP Fusionsproteins NeHao_Y467V ohne Zusatz der Detergens β -Mercaptoethanol, 15 µg Probe pro Spur; (C) Häm-Färbung des gereinigten Hao-MBP Fusionsproteins NeHao_Y467V ohne Zusatz von β -Mercaptoethanol, 40 µg Probe pro Spur.

Sowohl in den Zellsuspensionen als auch Eluaten konnten mittels Coomassie- und Häm-Färbung das Fusionsprotein NeHao_Y467V (104 kDa) und das MBP-freie Zielprotein (64 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 43 A-C). Auch nach der zielgerichteten Mutagenese konnte nach Reinigung der NeHao_Y467V keine rötliche Färbung der Elutionsfraktionen beobachtet werden. Ein Einfluss des Tyrosin-Rests auf die Häm-Beladung der NeHao kann somit ausgeschlossen werden. Interessanterweise wurde jedoch kein trimerer Multimerisierungsgrad detektiert. Lediglich die fusionierten und unfusionierten Monomere waren mittels Coomassie- und Häm-Färbung nachweisbar (Abb. 43 B und C). Mit dem gereinigten Fusionsprotein NeHao_Y467V wurden trotz geringer Häm-Beladung Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt, jedoch wurde bei keiner dieser Messungen eine signifikante Reduktase- oder Oxidase-Aktivität nachgewiesen. Auch die Untersuchung des Absorptionsverhaltens mittels UV/Vis-Spektroskopie blieb ergebnislos, da kein aussagekräftiges Cytochrom *c*-Spektrum ermittelt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

5. Diskussion

5.1 Heterologe Produktion von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen in *W. succinogenes*

Für die Produktion der HaoA-Proteine in *W. succinogenes* wurde zunächst eine bereits etablierte Methode genutzt (Kern & Simon, 2011). Mit Hilfe dieser Methode konnten die jeweiligen Hydroxylamin-Oxidoreduktasen aus *C. mediatlanticus* und *C. curvus* zwar heterolog produziert werden, jedoch war keine effiziente Reinigung der beiden Proteine mittels *Strep*-Tactin- bzw. Ni-NTA-Affinitätschromatographie möglich (Kap. 4.9.1-4.9.4). Dies ist vermutlich auf eine Unzugänglichkeit der angefügten *Strep*- bzw. His-Tags zurückzuführen, sodass je nach Faltung der Zielproteine nur eine beeinträchtigte Bindung der Affinitäts-Tags am Säulenmaterial vorlag. Folglich wurden nur geringe Mengen der Zielproteine von der Affinitätssäule eluiert. Auch die konventionelle Reinigung der CmHao (Kap. 4.9.5) war nicht erfolgsversprechend, da bereits nach Durchführung einer DEAE-Anionenaustauschchromatographie ein Abbau des Zielproteins beobachtet wurde (Abb. 40 B). Ursächlich für die Proteindegradation war vermutlich die lange Verweildauer des Zielproteins auf der Säule während des Reinigungsvorgangs. Da sowohl affinitätschromatographische als auch konventionelle Reinigungsmethoden nur geringe Proteinausbeuten und eine hohe Heterogenität der gereinigten ϵ Hao Proteine zur Folge hatten, konnten keine aussagekräftigen enzymatischen Charakterisierungen der Proteine durchgeführt werden. Dieser Umstand bedingte nachfolgend die Konstruktion des Expressionsplasmids pTMH (Kap. 3.5.8.2). Dieses Plasmid ermöglichte es erstmals ϵ Hao-MBP Fusionsproteine im Kontext des *nrf*-Operons von *W. succinogenes* zu produzieren. Als Produktionsstamm fungierte die Insertionsmutante *W. succinogenes napA::cat*, in welcher das für die periplasmatische Nitratreduktase NapA kodierende Gen durch eine eingefügte Chloramphenicol-Genkassette unterbrochen wurde. Interessanterweise weist diese Mutante aufgrund von unbekanntem, vermutlich regulatorischen Effekten eine erhöhte Transkription des *nrf*-Operons während des Wachstums durch Fumarat-Atmung auf.

Durch die Konstruktion des Expressionsplasmids pTMH wurde die etablierte Methode von Kern & Simon (2011) zur Produktion von Multihäm Cytochromen *c* in *W. succinogenes* für die Produktion von ϵ Hao-Proteinen optimiert. Die Verwendung des Maltose-Binde-Proteins als Affinitäts-Tag ist eine für *E. coli* etablierte Methode, um rekombinante MBP-Fusionsproteine zu produzieren. Diese Methodik war jedoch für die heterologe Proteinproduktion im Wirtsorganismus *W. succinogenes* neuartig und literarisch nicht belegt. Nach Etablierung dieses neuen Ansatzes war es möglich insgesamt 11 Fusionsproteine (CmHao, CmHao_V450Y, CmHao_W464Y, CcuHao, CcuHao_V414Y, CcuHao_W428Y, CfHao, CfHao_V422Y, CfHao_W434Y, NpHao und WsNrfA) unter anaeroben Bedingungen mit Formiat als Elektronendonator und Fumarat als

Elektronenakzeptor in *W. succinogenes* zu produzieren. Die Reinigung der HaoA-Proteine erfolgte mittels Dextrin-Sepharose Affinitätschromatographie, wobei maximale Proteinausbeuten von 0,9 mg Protein pro l Medium erreicht wurden. Der Reinheitsgrad der HaoA-Proteine wurde mittels SDS-PAGE sowie anschließender Coomassie- und Häm-Färbung überprüft. Dabei konnten die jeweiligen Fusionsproteine mit einer Größe von etwa 100 kDa nachgewiesen werden (Abb. 11). Weiterhin wurden MBP-freie Proteinspezies mit einer Größe von etwa 57 kDa detektiert, die auf eine proteolytische Abspaltung des MBP-Proteins vom Cytochrom hindeuten. Die einzige Ausnahme hinsichtlich der Expression eines intakten und enzymatisch aktiven Proteins bildete die Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus *N. europaea*. Dieses Protein konnte zwar in *W. succinogenes* produziert werden, wies jedoch nicht die charakteristische Rotfärbung von Multihäm Cytochromen c auf (Kapitel 4.9.6). Dieses Phänomen wurde bereits bei der heterologen Produktion des Proteins in *E. coli* beobachtet (Mehrotra *et al.*, 2012). Auch nach Zusatz unterstützender Metabolite des Häm-Biosyntheseweges (0,9 mM δ -Aminolävulinat; 0,4‰ Eisen-Vitamin-Lösung; Kap. 3.7.1) zu Zellen des *W. succinogenes* Stammes *NeHao-MBP kan* war keine Verbesserung hinsichtlich der Bildung des Holocytochroms nachweisbar. Da der Einbau von Häm-Gruppen im Periplasma von *W. succinogenes* erfolgt (Simon & Hederstedt, 2011), sollte durch die Verwendung des *W. succinogenes* eigenen *nrfA*-Signalpeptides zumindest der Transport der *NeHao* in das Periplasma gewährleistet worden sein. Dort erfolgte dann möglicherweise jedoch nur ein beeinträchtigter Einbau von Häm-Gruppen in das Protein. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine fehlerhafte Faltung der *NeHao* nach der heterologen Produktion in *W. succinogenes* sein. Weiterhin ist denkbar, dass für die Häm-Beladung und Ausbildung des Häms P460 der *NeHao* Co-Faktoren oder weitere Proteine notwendig sind, die in *W. succinogenes* fehlen. Mit dem gereinigten Fusionsprotein wurden dennoch Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt, jedoch wurde bei keiner dieser Messungen eine Reduktase- oder Oxidase-Aktivität nachgewiesen. Auch die Untersuchung des Absorptionsverhaltens mittels UV/Vis-Spektroskopie gestaltete sich schwierig, da aufgrund der geringen Häm-Beladung des Proteins auch nach Messung einer unverdünnten Proteinprobe kein aussagekräftiges Cytochrom c-Spektrum ermittelt werden konnte (Abb. 42).

5.2 Enzymatische Eigenschaften und physiologische Funktion von ϵ Hao-Proteinen

Nach Etablierung der Produktion und Reinigung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen konnten diese erstmals mittels Enzymaktivitätsmessungen biochemisch charakterisiert werden. Die ermittelten Enzymaktivitäten zeigten, dass alle untersuchten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine reduktive Reaktionen mit den Substraten Hydroxylamin und Nitrit katalysieren (Tab. 10). Nach Messung der Hydroxylamin-Oxidation wurden für die ϵ Hao-MBP Fusionsproteine im Vergleich zur *NeHao* nur geringfügige spezifische Aktivitäten von 0,03-0,1 U min⁻¹ mg⁻¹ detektiert. Dementsprechend waren nach der Oxidation von Hydroxylamin im Fall der *CfHao*, *CcuHao* und *CmHao* nur geringe Konzentrationen des Endprodukts Nitrit von 4,8-6,6 μ M (~0,5 %) mittels photometrischer Messungen nachweisbar (Tab. 14). Mit der Positivkontrolle *NeHao* konnten erwartungsgemäß deutliche höhere Nitritkonzentration von 149 μ M (~26 %) detektiert werden.

Für die Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion wurden vergleichbare spezifische Aktivitäten ermittelt (Nitrit-Reduktase-Aktivität: 1,0-181,0 U min⁻¹ mg⁻¹, Hydroxylamin-Reduktase-Aktivität: 29-158 U min⁻¹ mg⁻¹). Die spezifischen Nitrit-Reduktase-Aktivitäten waren jedoch im Vergleich zur Nitritreduktase aus *W. succinogenes* (NrfA) wenigstens sechsfach kleiner. Die geringsten Aktivitäten innerhalb der Nitritreduktion wurden bei den HaoA-Proteinen der Tiefseebakterien *C. mediatlanticus* (*CmHao*) und *N. profundicola* (*NpHao*) ermittelt. Die spezifischen Aktivitäten der *CmHao* und *NpHao* waren im Vergleich zu den Proteinen der *Campylobacter* Spezies (*CcuHao*, *CfHao*) um den Faktor 181 erniedrigt. Somit war bei allen vier charakterisierten Enzymen die für Nitritreduktasen des NrfA-Typs charakteristische Katalyse von Nitrit und Hydroxylamin nachweisbar, wobei bei der Nitritreduktion Ammonium als Produkt gebildet wurde (Tab. 13). Diese Ergebnisse machen eine Funktion der ϵ Hao-Proteine als Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktasen wahrscheinlich. In den Epsilonproteobakterien *C. fetus*, *C. curvus*, *N. profundicola* und *C. mediatlanticus* katalysieren diese Enzyme somit vermutlich die Reduktion von Nitrit zu Ammonium, für die sechs Elektronen bereitgestellt werden müssen. Neben den Epsilonproteobakterien weisen jedoch auch die Genome diverser Gamma- und Deltaproteobakterien sowie Vertreter der Phyla Aquificae und Thermodesulfobacteria HaoA-Proteine auf (Tab. 25). Um weiterführende Aussagen bezüglich der physiologischen Funktion der HaoA-Proteine treffen zu können, sollten auch HaoA-Homologe dieser Vertreter auf ihre Aktivitäten überprüft werden. Eine Gemeinsamkeit aller bisher identifizierten Vertreter ist jedoch, dass in diesen entweder eine Nitrat-/Nitritreduktion oder aber die Nitritreduktion zu Ammonium experimentell nachgewiesen werden konnte (Tab. 27). Interessanterweise besitzen diese Organismen jedoch größtenteils weder respiratorische (NrfA) noch assimilatorische Nitritreduktasen (NasB, NirBD, NirA, NiR/SiR).

Die periplasmatisch lokalisierte Nitritreduktase NrfA besitzt neben ihrer Funktion in der anaeroben Respiration noch eine zweite entscheidende Aufgabe innerhalb des Stickstoffkreislaufs. Die Fähigkeit des Enzyms sowohl Stickstoffmonoxid als auch Hydroxylamin zu reduzieren (Poock *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2011b; Simon and Klotz, 2013), bedingt dessen Rolle bei der Abwehr von nitrosativem Stress und der Hydroxylamin-Detoxifizierung. Eine ähnliche Funktion wäre auch für die ϵ Hao-Proteine denkbar. Die hohen K_M -Werte, welche innerhalb der Enzymaktivitätsmessungen ermittelt wurden, widersprechen jedoch in gewissem Maße einer vorhergesagten physiologischen Funktion als Nitrit- bzw. Hydroxylamin-Reduktase (Tab. 11). Diesbezüglich muss jedoch bedacht werden, dass die ϵ Hao-MBP Fusionsproteine heterolog in *W. succinogenes* produziert und die spezifischen Aktivitäten und K_M -Werte nach Zusatz von artifiziellen Elektronendonoren und -akzeptoren ermittelt wurden. Diese Faktoren hatten möglicherweise Einfluss auf die Reaktionskinetik und Substratspezifität der getesteten Enzyme. Weiterhin wurden die spezifischen Aktivitäten und K_M -Werte unter *in vitro* Bedingungen getestet. So erfolgten die Enzymaktivitätsmessungen im Hinblick auf die epsilonproteobakteriellen Hydroxylamin-Oxidoreduktasen der Tiefseebakterien *C. mediatlanticus* und *N. profundicola* bei einer unphysiologisch niedrigen Temperatur von 37 °C sowie eines teilweise unphysiologisch hohen pH-Werts von 7,0 (optimale Wachstumsbedingungen von *N. profundicola*: 40 °C; pH 7,0; 3 % NaCl – mit molekularem Wasserstoff oder Formiat als Elektronendonoren und Schwefel als Elektronenakzeptor; *C. mediatlanticus*: 55 °C; pH 5,5; 30 g NaCl l⁻¹ - bei einem Wachstum unter strikt anaeroben Bedingungen in Gegenwart von H₂ und CO₂ sowie den Elektronenakzeptoren Schwefel oder Nitrat; Smith *et al.*, 2008 und Voordeckers *et al.*, 2005). Auch diese Aspekte können erheblichen Einfluss auf die Enzymaktivitäten eines Proteins haben.

Mit Hilfe der ermittelten Enzymaktivitäten und dem Nachweis der Ammonium-Produktion war es möglich eine Hypothese bezüglich der Funktion der ϵ Hao zu entkräften (Hanson *et al.*, 2013) und ein alternatives Modell zur Funktionalität der ϵ Hao-Proteine unter Einbeziehung möglicher Elektronentransferwege zu erstellen. In der Hypothese von Hanson *et al.* (2013) fungiert die ϵ Hao als revers interagierende Hao, welche die Nitritreduktion zu Hydroxylamin katalysiert. Das während dieser Reaktion gebildete, toxische Intermediat Hydroxylamin soll dann mit Hilfe eines Ammoniumtransporters (AmtB) ins Cytoplasma transportiert und anschließend mit Hilfe eines Hybrid Cluster Proteins (Hcp) zu Ammonium reduziert werden. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit biochemisch charakterisierten ϵ Hao-MBP Fusionsproteine widersprechen dieser Hypothese. Durch Substrat- und Endproduktbestimmungen konnte gezeigt werden, dass bei einer durch die ϵ Hao katalysierten Nitritreduktion kein Hydroxylamin als Intermediat nachweisbar ist (Tab. 13). Vielmehr konnte eindeutig belegt werden, dass das eingesetzte Nitrit innerhalb der Enzymaktivitätsmessungen teilweise zu Ammonium umgesetzt wurde. Der Umsatz des

eingesetzten Nitrits zu Ammonium betrug allerdings weder bei den ϵ Hao-Proteinen noch der mitgeführten Kontrolle *WsNrfA-MBP* 100 %. Dies kann auf die Störanfälligkeit des Ammoniumnachweises zurückgeführt werden, welcher durch das zugegebene Protein beeinflusst wird. Allerdings wäre auch die Bildung eines weiteren, möglicherweise gasförmigen Endprodukts (NO, N₂O) denkbar. Eine Gasbildung innerhalb der Nitritreduktion konnte sowohl mit der *CcuHao* als auch *CmHao* gezeigt werden (Abb. 14). Weiterhin wurde mit Hilfe der durchgeführten Enzymaktivitätsmessungen bewiesen, dass die ϵ Hao neben der Nitritreduktion auch eine effiziente Hydroxylamin-Reduktion katalysiert. Die Funktion des Hybrid Cluster Proteins als Hydroxylamin-Reduktase erscheint somit in der Hypothese von Hanson *et al.* fragwürdig. Auch in *Escherichia coli* wurde die Rolle des Hybrid Cluster Proteins lange Zeit kontrovers diskutiert. Mittlerweile wurde jedoch experimentell gezeigt, dass dieses Protein in *E. coli* die NO-Reduktion zu N₂O katalysiert (Wang *et al.*, 2016). Auch dieser Aspekt ist ein Widerspruch zur Hypothese von Hanson *et al.* (2013). Darüber hinaus ist der Transport des mutagenen Intermediats Hydroxylamin ins Cytoplasma, welches mit Hilfe eines Ammoniumtransporters gewährleistet werden soll, unwahrscheinlich. Einerseits würde dieser Transport vermutlich erhebliche Zell- und DNA-Schäden bedingen und andererseits konnte bisher kein Hydroxylamin-Transport mit Beteiligung des AmtB-Transporters experimentell nachgewiesen werden.

Tabelle 27: Fähigkeit der Nitrat-/Nitritreduktion sowie Vorhandensein Nitrat-/Nitritreduktase-kodierender Gene in Organismen, deren Genom ein *c*-Hao-Homolog kodiert

Organismus	Nitratreduktion		Nitritreduktion	Referenzen ²	Anwesenheit Nitratreduktase-kodierender Gene ³				Anwesenheit Nitritreduktase-kodierender Gene ⁵		
	+	-			Nar	NasA	NrA	NasB/NirBD	NiR/SiR/NirA		
Campylobacter fetus (ε)	+		+	Véron & Chatelain (1973), Payne <i>et al.</i> (1982)	+	-	-	-	+ ⁶	-	-
Campylobacter curvus (ε)	+		+	Tanner <i>et al.</i> (1984)	+	-	-	-	-	-	-
Campylobacter concisus (ε)	+		+	Tanner <i>et al.</i> (1981)	+	-	-	-	-	-	-
Campylobacter gracilis (ε)	+		+	Tanner <i>et al.</i> (1981)	+	-	-	-	-	-	-
Campylobacter iguaniorum (ε)	+		N/A	Gilbert <i>et al.</i> (2015)	+	-	-	-	-	-	-
Campylobacter mucosalis (ε)	+		+	Roop II <i>et al.</i> (1985)	+	-	-	-	-	-	-
Campylobacter hyointestinalis subsp. <i>lawsonii</i> (ε)	+		N/A	On <i>et al.</i> (1995)	+	-	-	-	-	-	-
Helicobacter allurogastricus (ε)	+		N/A	Joosten <i>et al.</i> (2015)	+	-	-	-	-	-	-
Helicobacter bizzozeronii (ε)	+		N/A	Hänninen <i>et al.</i> (1996)	+	-	-	-	-	-	-
Helicobacter cetorum (ε)	-		N/A	Harper <i>et al.</i> (2002)	+	-	-	-	-	-	-
Helicobacter felis (ε)	+		N/A	Paster <i>et al.</i> (1991)	+	-	-	-	-	-	-
Helicobacter heilmannii (ε)	+		N/A	Smet <i>et al.</i> (2012)	+	-	-	-	-	-	-
Helicobacter suis (ε)	-		N/A	Baete <i>et al.</i> (2008)	+	-	-	-	-	-	-
Arcobacter nitrofigilis (ε)	+		N/A	Sasi Jyothsna <i>et al.</i> (2013)	+	-	-	-	-	NirB	+
Arcobacter anaerophilus (ε)	+		N/A	Sasi Jyothsna <i>et al.</i> (2013)	+ ⁴	-	-	-	-	-	+ ⁷
Caminibacter mediantificus TB-2 (ε)	+		+	Voordeckers <i>et al.</i> (2005)	+ ⁴	-	-	-	-	-	+ ⁷
Nautilia profundicola AmH (ε)	+		+	Smith <i>et al.</i> (2008), Hanson <i>et al.</i> (2013)	+	-	-	-	-	-	-
Lebetimonas sp. JH292 (ε)	+		-	Takai <i>et al.</i> (2005)	+ ⁴	-	-	-	-	-	+ ⁷
Geopsychrobacter electrodiphilus (δ)	N/A		N/A	Holmes <i>et al.</i> (2004)	-	+	-	-	-	-	-
Desulfurella acetivorans (δ)	-		N/A	Bonch-Osmolovskaya <i>et al.</i> (1990)	-	+	-	-	-	-	-
Desulfovibrio frigidus (δ)	-		-	Vandieken <i>et al.</i> (2006)	-	-	-	-	-	-	+
Desulfovibrio piezophilus (δ)	-		-	Khelalifa <i>et al.</i> (2011)	-	-	-	-	-	-	-
Desulfovibrio hydrothermalis (δ)	-		N/A	Alazard <i>et al.</i> (2003)	-	-	-	-	-	-	+
Desulfobulbus japonicus (δ)	N/A		N/A	Suzuki <i>et al.</i> (2007)	+	-	-	-	-	-	-
Pelobacter selenigenes (δ)	+		-	Narasimgarao & Häggblom (2007)	-	+	-	-	-	-	-
Allagarivorans marinus (γ)	+		-	Jean <i>et al.</i> (2009)	+	-	-	-	-	+	-
Psychromonas aquimarina (γ)	+		-	Miyazaki <i>et al.</i> (2008)	+	-	-	-	-	+	-
Photobacterium ganghwense (γ)	+		N/A	Park <i>et al.</i> (2006)	+	-	-	-	+ ⁶	-	-
Alteromonadaceae bacterium Bs12 (γ)	N/A		N/A	Ivanova & Mikhailov (2001)	-	+	-	-	-	+	-
Oceanospirillum beijerinckii (γ)	-		-	Hylemon <i>et al.</i> (1973), Pot <i>et al.</i> (1989)	-	-	-	+	-	+	-
Marinobacterium litorale (γ)	-		N/A	Kim <i>et al.</i> (2007)	-	-	-	+	-	+	-
Marinobacterium stanieri (γ)	+		N/A	Satomi <i>et al.</i> (2002)	-	-	-	+	-	+	-
Neptuniibacter caesariensis (γ)	-		N/A	Arahal <i>et al.</i> (2007)	-	-	-	+	-	+	-
Thioflavivococcus mobilis (γ)	N/A		N/A	Imhoff & Pfennig (2001)	-	-	-	-	-	-	-

<i>Thermosulfibacter takaii</i> (Aquificae)	-	-	Nunoura et al. (2008)	+	-	-	-	-
<i>Thermodesulfator indicus</i> (Thermodesulfobacteria)	-	N/A	Moussard et al. (2004)	+	-	-	-	+
<i>Thermodesulfator</i> sp. S606 (Thermodesulfobacteria)	-	N/A	Lai et al. (2016)	+	-	-	-	-
<i>Thermodesulfator atlanticus</i> (Thermodesulfobacteria)	-	-	Alain et al. (2010)	+	-	-	-	+

¹ Proteobakterielle Klassen bzw. Phyla sind in Klammern angegeben. Die innerhalb dieser Arbeit untersuchten Organismen wurden fett markiert.

² Fähigkeit der Organismen zur Nitrat- und Nitritreduktion, welche durch Publikationen belegt wurde.

³ "+" bezeichnet das Vorhandensein eines *nap*-Genclusters (Blast-Templates: *Escherichia coli* NapA, Accessionnummer: CUU94404), der Gene *narGHI* (Membran-gebundene respiratorische Nitratreduktase; Blast-Templates *E. coli* NarG, CAA34303; *E. coli* NarH, ANK06841; *E. coli* NarI, EGT67759) oder des Gens *nasA*, welches für eine assimilatorische Nitratreduktase kodiert (Blast-Templates: *Klebsiella pneumoniae* NasA, CDO15079).

⁴ Benachbarte Lage des *nap*-Operons zum *haoA*-Gen (Abb. 35).

⁵ "+" bezeichnet die Präsenz von *nrfA*-Genen (Blast-Templates: *Escherichia coli* NrfA, CAA51048), NasB- oder NirBD-kodierenden Genen (NAD(P)H-abhängige assimilatorische Nitritreduktase; Blast-Templates *K. pneumoniae* NasB, CDO15080; *E. coli* NirB, ANK03849; *E. coli* NirD, ANK03850), NIR/SiR-kodierenden Genen (Nitrit-/Sulfit-Reduktase; Blast-Templates: *Desulfococcus multivorans* NIR/SiR, EPR42547) oder dem Gen *nirA*, welches für eine Ferredoxin-abhängige Nitritreduktase kodiert (Blast-Templates: *Thermosynechococcus* sp. NK55a, AHB87804).

⁶ Vorhandensein eines *nrfA*-Orthologs (Accessionnummern: *C. fetus*, WP_011732135; *P. ganghwense*, WP_047883466).

⁷ Präsenz der Ferredoxin-abhängigen Nitritreduktase NirA wurde in diesen Organismen bestätigt (Meyer & Huber, 2014).

N/A Keine Angabe in den dazugehörigen Referenzen.

5.3 Charakterisierung der ϵ Hao-MBP Varianten

5.3.1 Enzymatische Eigenschaften der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine *CmHao_W464Y*, *CcuHao_W428Y* und *CfHao_W434Y*

Mit Hilfe eines HaoA-Alignments (Kap. 7.1) sowie einer bisher unveröffentlichten Kristallstruktur der ϵ Hao aus *C. curvus* (Diplomarbeit Michael B. Braun, Universität Freiburg) konnten entscheidende Erkenntnisse hinsichtlich der distalen Häm *c*-Eisenliganden gewonnen werden. Die Häm *c*-Eisenliganden der ϵ Hao wurden nachfolgend mit denen der Hao aus *N. europaea* verglichen. Dadurch war es möglich die Position des speziellen *NeHao*-Tyrosins, welches für die Ausbildung des charakteristischen Tyrosin Cross-Links essentiell ist, innerhalb der HaoA-Sequenzen zu identifizieren. Die mit Hilfe des HaoA-Alignments erhaltenen Erkenntnisse wurden nachfolgend genutzt, um die Aminosäure Tyrosin an einer zur *NeHao* äquivalenten Position in ausgewählte ϵ Hao Sequenzen einzufügen. Der Tyrosin-Rest befindet sich innerhalb der Hao der Nitrifizierer acht Aminosäuren stromabwärts des Häm 7 Liganden Histidin (HX₇Y), der jedoch in allen untersuchten ϵ Hao-Proteinen fehlt. An dessen Position befindet sich in den ϵ Hao-Sequenzen der konservierte distale Häm 7 Ligand Methionin, der acht Aminosäuren stromabwärts (MX₇W) die konservierte Aminosäure Tryptophan (W428) aufweist. Dieses Tryptophan wurde nachfolgend gegen ein Tyrosin getauscht und die erstellten ϵ Hao-MBP Varianten biochemisch charakterisiert. Im direkten Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen wurden mit den ϵ Hao-MBP Varianten *CcuHao_W428Y* und *CfHao_W434Y* deutlich geringere Nitrit-Reduktase-Aktivitäten detektiert (Tab. 16). Eine Ausnahme bildete jedoch das Protein *CmHao_W464Y*, bei dem eine Erhöhung der Nitrit-Reduktase-Aktivität um den Faktor 2,9 beobachtet werden konnte. Im Hinblick auf die Hydroxylamin-Reduktion konnten bei allen drei erstellten ϵ Hao-MBP Varianten vergleichbare spezifische Aktivitäten ermittelt werden. Das Fusionsprotein *CcuHao_W428Y* wies im Vergleich zum Kontrollprotein *NeHao* eine sehr geringe Hydroxylamin-Oxidations-Aktivität auf, die jedoch mit dem Wildtyp-Enzym *CcuHao* vergleichbar war. Bei den Enzymen *CfHao_W434Y* und *CmHao_W464Y* konnte keine Hydroxylamin-Oxidations-Aktivität ermittelt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass alle drei untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen sowohl für die Hydroxylamin-/Nitritreduktion als auch die Hydroxylamin-Oxidation signifikant erhöhte K_M -Werte im Bereich von 2,39-16,9 mM aufweisen (Tab. 17). Ungeachtet dessen war bei den ϵ Hao-MBP Varianten ein Nitritumsatz zu Ammonium nachweisbar. Nach Zugabe der Enzyme zu den Messansätzen wurden Ammoniumkonzentrationen von 200-463 μ M detektiert (Tab. 18). Allerdings wurden erneut lediglich 6,9-14,2 % des Nitrits zu Ammonium reduziert. Im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen fiel auf, dass die Proteine *CcuHao_W428Y* und *CfHao_W434Y* 20-70 % weniger Nitritumsatz zu Ammonium katalysierten. Einzige Ausnahme bildete hierbei die

CmHao_W464Y, die nach Einfügen des Tyrosinrests einen nahezu unveränderten Nitritumsatz zu Ammonium aufwies. Bei der Bestimmung der Hydroxylamin-Oxidation wurde für das Enzym *CcuHao_W428Y* im Vergleich zur *CcuHao* eine 5-fach erhöhte Nitritkonzentration ($32,7 \mu\text{M}$) nach Zugabe von Hydroxylamin ermittelt (Tab. 19). Dieses Ergebnis war überraschend, da die ϵ Hao-MBP Variante *CcuHao_W428Y* nach Einfügen des Aminosäureaustausches eine unveränderte spezifische Hydroxylamin-Oxidase-Aktivität aufwies. Das Fusionsprotein *CcuHao_W428Y* wies jedoch noch eine weitere Besonderheit auf, die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese detektiert werden konnte. Neben den zu erwartenden Proteinbanden bei 57 kDa (MBP-freie Proteinspezies) und 100 kDa (MBP-Fusionsprotein) konnten im Fall der *CcuHao_W428Y* weitere mögliche Multimerisierungszustände bei über 245 kDa identifiziert werden (Abb. 24). Um zu prüfen, ob es sich bei diesen zusätzlichen Proteinbanden um Aggregate des Zielproteins handelt oder aber ein trimerer Multimerisierungszustand des Fusionsproteins *CcuHao_W428Y* vorliegt, wurde nachfolgend das Maltose-Binde-Protein unter Zugabe der TEV-Protease vom Zielprotein abgespalten. Anschließend wurde das Protein zusätzlich mit Mercaptoethanol versetzt und hitzebehandelt, um eine vollständige Reduktion und Denaturierung des Proteins zu gewährleisten. Nach Auftrennung der behandelten Proteinproben im SDS-Gel wurde ersichtlich, dass es sich bei den zusätzlich auftretenden Proteinbanden vermutlich nicht um Aggregate sondern um monomere, dimere und möglicherweise trimere Multimerisierungszustände des Zielproteins handelt (Abb. 25). Dieses Resultat kann auf das Einfügen eines Tyrosin-Restes im Protein *CcuHao_W428Y* zurückgeführt werden. Der durchgeführte Aminosäureaustausch könnte somit in diesem Fall entscheidenden Einfluss auf die Faltung oder Multimerisierung des Proteins genommen haben. Inwieweit diese mögliche Trimerisierung auf die kovalente Verknüpfung von monomeren ϵ Hao-Proteinen und somit möglicherweise auf die Ausbildung eines Tyrosin Cross-Links zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden. Jedoch führten eine erhöhte Zugabe des Reduktionsmittels Mercaptoethanol, eine 30 minütige Hitzebehandlung sowie erhöhte Salzkonzentrationen nicht zur Änderung des Ergebnisses. Überraschenderweise wurde neben dem Monomer und potenziellen Trimer auch der dimere Multimerisierungsgrad des Proteins im SDS-Gel nachgewiesen. Die Ausbildung eines Dimers wurde bei der Hao aus *N. europaea* nicht beobachtet (Abb. 41 C).

Zusammenfassend konnte somit nach Durchführung der biochemischen Charakterisierungen gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Tyrosin keine Verschiebung der Enzymaktivität in die oxidative Richtung zur Folge hatte. Dennoch wurde zumindest im Fall der *CcuHao_W428Y* eine erhöhte Menge des Reaktionsprodukts Nitrit reproduzierbar während der Hydroxylamin-Oxidation nachgewiesen. Ein Einfluss des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität war bei den ϵ Hao-MBP Varianten nur bedingt nachweisbar. Während die Proteine

CfHao_W434Y und *CcuHao_W428Y* verringerte Nitrit-Reduktase-Aktivitäten aufwiesen, wurde mit dem Enzym *CmHao_W464Y* eine 3-fach erhöhte Nitrit-Reduktase-Aktivität bestimmt. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Proteine *CmHao_W464Y* und *CfHao_W434Y* nach Einfügen des Aminosäureaustausches keine detektierbaren Hydroxylamin-Oxidase-Aktivitäten aufwiesen. Ursächlich für die variablen Unterschiede innerhalb der enzymatischen Eigenschaften ist vermutlich ein veränderter Raumbedarf innerhalb der Aminosäureseitenkette. Dieser kann je nach Faltung der Proteine unterschiedliche Effekte innerhalb der Reaktionskinetiken zur Folge haben.

Bezüglich der Cytochrom *c*-Spektren wurden keine Veränderungen detektiert. Der charakteristische Porphyrin-Tyrosin Cross-Link (P460) der *NeHao* besitzt unter reduzierten Bedingungen ein Absorptionsmaximum bei 460 nm (Abb. 28). Innerhalb der Proteinstruktur der *NeHao* führt dieser Tyrosin Cross-Link zur Verbindung mit einer weiteren Untereinheit und bedingt letztlich die kovalente Trimerisierung des Proteins. Im Vergleich zur *N. europaea* *Hao* oder *K. stuttgartiensis* Hydrazin-Dehydrogenase (Hdh) wurden jedoch bei keiner der untersuchten ϵ Hao-MBP Varianten Absorptionsmaxima bei 460 nm (*Hao*) oder 473 nm (Hdh) nachgewiesen. Im Hinblick auf die Multimerisierungszustände der ϵ Hao-MBP Variante *CcuHao_W428Y* konnten dennoch Effekte der eingefügten Mutation manifestiert werden.

5.3.2 Enzymatische Eigenschaften der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y*

Im Rahmen der zielgerichteten Modifikation erfolgte in den Aminosäuresequenzen der ϵ Hao-Proteine von *C. fetus*, *C. curvus* und *C. mediatlanticus* ein ortsspezifischer Aminosäureaustausch eines Valinrests gegen ein Tyrosin. Dafür wurden zunächst bioinformatische Analysen der C-Termini von *Hao*- und ϵ Hao-Proteinen genutzt, mit denen die Position des für die Hämbindung speziellen Tyrosin-Rests innerhalb der *Hao*-Struktur ermittelt werden konnte (Abb. 44; Campbell *et al.*, 2009; Klotz *et al.*, 2008). An dieser Position befand sich in den ϵ Hao-Proteinen nach früheren Erkenntnissen die Aminosäure Valin, die daraufhin in dieser Arbeit gegen ein Tyrosin ausgetauscht wurde. Innerhalb dieser Arbeit wurden jedoch die bioinformatischen Analysen erweitert und erneuert (Kap. 7.1). Mit Hilfe der neuen Datenlage wurde eindeutig belegt, dass die erstellten ϵ Hao-MBP Varianten *CmHao_V450Y*, *CcuHao_V414Y* und *CfHao_V422Y* Aminosäureveränderungen an den "falschen" Positionen aufweisen. Dennoch wurden die Proteinvarianten biochemisch charakterisiert, um mögliche Effekte des Aminosäureaustausches nachweisen zu können.

Innerhalb der Enzymaktivitätsmessungen wurden ähnliche spezifische Aktivitäten für die drei Proteine bestimmt. Im direkten Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen wurden jedoch deutlich geringere Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktase-Aktivitäten sowie Hydroxylamin-Oxidase-Aktivitäten detektiert (Tab. 20). Auffällig war, dass bei dem Enzym *CfHao_V422Y* sogar eine komplette Inaktivierung der Nitrit-Reduktase-Aktivität auftrat. Die ermittelten K_M -Werte für die Nitritreduktion und die Hydroxylamin-Oxidation (0,8-2,35 mM) waren mit denen der Wildtyp-Enzyme vergleichbar (Tab. 21). Hinsichtlich der Hydroxylamin-Reduktion wurden für die beiden Enzyme *CmHao_V450Y* und *CfHao_V422Y* im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen *CmHao* und *CfHao* signifikant erhöhte K_M -Werte im Bereich von 6,7-12,0 mM bestimmt. Lediglich im Fall der *CcuHao_V414Y* wurde ein geringerer K_M -Wert von 2,16 mM detektiert, der im Vergleich zur *CcuHao* um 67 % erniedrigt war. Interessanterweise wurde nach Durchführung der Substrat- und Endproduktbestimmungen lediglich bei der *CcuHao_V414Y* ein Nitritumsatz zu Ammonium nachgewiesen. Allerdings wurden auch bei diesem Protein nur 20 % des Nitrits zu Ammonium reduziert, im Vergleich zu 35,5 % beim unveränderten Protein (Tab. 13 u. 23). Weiterhin konnten mit den Enzymen *CmHao_V450Y* und *CfHao_V422Y* aufgrund geringer Hydroxylamin-Oxidase-Aktivitäten nur minimale Nitritkonzentrationen von 5,08-5,3 μ M detektiert werden. Diese Ergebnisse waren mit den Wildtyp-Enzymen *CmHao* und *CfHao* vergleichbar (Tab. 24).

Zusammenfassend konnte somit nach Durchführung der biochemischen Charakterisierungen gezeigt werden, dass ein Aminosäureaustausch von Valin zu Tyrosin erwartungsgemäß keine Verschiebung der Enzymaktivität in die oxidative Richtung bewirkt. Ein Einfluss des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität konnte dennoch anhand der verringerten Reduktase-Aktivitäten nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür ist möglicherweise ein veränderter Raumbedarf innerhalb der Aminosäureseitenkette. Der Austausch der aliphatischen Aminosäure Valin gegen die aromatische und im Vergleich wesentlich größere Aminosäure Tyrosin könnte mögliche Konformationsänderungen des Proteins bedingen oder aber zu einer Veränderung/Blockierung der Substratbindestelle führen. Im Hinblick auf die Multimerisierungszustände der ϵ Hao-MBP Varianten konnten keine eindeutigen Effekte der eingefügten Mutation beobachtet werden (Kap. 4.7.6).

5.4 Rolle der ϵ Hao innerhalb der Evolution von Multihäm Cytochromen *c* (MCC)

Aufgrund der Ergebnislage ist denkbar, dass es sich bei ϵ Hao-Proteinen um evolutionär alte oder möglicherweise sogar um die ursprünglichsten Vertreter der MCC Familie handelt. Somit könnten diese Proteine eine bedeutende Rolle als “missing link“ innerhalb der Evolution von NrfA- und Hao/Hdh-Enzymen einnehmen (Klotz *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2011). Vorstellbar wäre, dass sowohl NrfA- als auch Hao/Hdh-Proteine von der ϵ Hao (oder deren Vorläufer) abstammen (Abb. 45).

Die NrfA-Familie umfasst insgesamt drei verschiedene Arten von Multihäm Cytochromen *c*. Dazu gehören Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktasen, die fünf CX₂CH Häm *c*-Bindemotive aufweisen und vorrangig in Epsilonproteobakterien vorkommen. Ein weiterer Vertreter ist die Pentahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase, welche ein CX₂CK Häm *c*-Bindemotiv im aktiven Zentrum der Nitrit-Reduktion (Häm 1) beinhaltet. Der Lysinrest dieses CX₂CK Motivs fungiert innerhalb dieser Proteine als proximaler Häm 1 Eisenligand. Häm 1 von NrfA entspricht der Hämgruppe 4 von ϵ Hao- und Hao/Hdh-Proteinen (Klotz *et al.*, 2008; Kern *et al.*, 2011). Ebenfalls zur NrfA-Familie zugehörig ist die Oktahäm Cytochrom *c* Nitritreduktase (Onr), welche ebenfalls ein CX₂CK Motiv und eine zusätzliche N-terminale Trihäm Cytochrome *c* Domäne aufweist. Es ist denkbar, dass NrfA/Onr-Proteine im Vergleich zur ϵ Hao einige Vorteile im Hinblick auf eine effiziente Nitritreduktion aufweisen. Dies könnte erklären, warum NrfA/Onr-Proteine im Vergleich zur ϵ Hao deutlich häufiger in phylogenetisch jüngeren Klassen, wie z.B. den Gammaproteobakterien, verbreitet sind. Eine Gemeinsamkeit ist jedoch, dass sowohl NrfA- als auch ϵ Hao-Proteine in den betreffenden Organismen meist exklusiv vorkommen. Eine Ausnahme bildet hierbei jedoch das Epsilonproteobakterium *Campylobacter fetus*, welches sowohl eine Kopie des *haoA*- als auch des *nrfA*-Gens im Genom aufweist (Tab. 27). Welches dieser beiden Proteine allerdings im Metabolismus von *C. fetus* aktiv ist, blieb bisher unerforscht (Payne *et al.*, 1982).

Die Hao/Hdh-Familie beinhaltet lediglich Oktahäm Cytochrome *c*, die zum Teil einen kritischen Tyrosin Cross-Link aufweisen. Es wird angenommen, dass dieser Tyrosin Cross-Link die oxidativen Reaktionen dieser Proteine mit den Substraten Hydroxylamin und Hydrazin bedingt (Klotz *et al.*, 2008; Maalcke *et al.*, 2016). Sollte diese Hypothese zutreffend sein, dann sollten ϵ Hao-Proteine unter physiologischen Bedingungen als Reduktasen fungieren. Ursächlich wäre hierfür das Fehlen des Tyrosin Cross-Links in der ϵ Hao und folglich die Abwesenheit des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 460 nm (P460). Eine physiologische Funktion der ϵ Hao als Reduktase würde mit den innerhalb dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen übereinstimmen.

5.5 Modell zur Funktionalität der ϵ Hao

Abbildung 45 zeigt Modelle von respiratorischen Elektronentransportwegen zu Vertretern der MCC-Familie (ϵ Hao, NrfA, Hao). Jedes in Abbildung 45 dargestellte Modell beinhaltet interessanterweise einen Vertreter der NapC/NrfH-Familie (HaoB, NrfH, Cytochrom c_{m552}), welcher innerhalb des Elektronentransports als Chinol-Dehydrogenase oder aber Chinon-Reduktase fungiert. Die Identifikation von HaoB nimmt hierbei einen besonderen Stellenwert ein, da bisher innerhalb der bakteriellen Respiration nur wenige Chinon/Chinol-reaktive Systeme beschrieben sind (Simon and Kern, 2008; Simon and Klotz, 2013). Auch über die Interaktion der NapC/NrfH-Vertreter mit den dazugehörigen Redoxpartnern ist lediglich beim NrfHA-Komplex von *Desulfovibrio vulgaris* und CymA Protein von *Shewanella oneidensis* etwas bekannt (Rodrigues *et al.*, 2006; Marritt *et al.*, 2012). Das Gammaproteobakterium *S. oneidensis* besitzt einen atypischen Weg der Nitrat- und Nitritreduktion, bei dem die periplasmatische Nitratreduktase NapA und die Pentahäm Cytochrom c Nitritreduktase NrfA über eine andersartige Anbindung an den Chinon-Pool verfügen. Ursächlich hierfür ist das Fehlen der membran-assoziierten Proteine NapC, NrfH und NrfBCD. Deren Funktion wird in *S. oneidensis* von dem integralen Membranprotein CymA übernommen, welches die Elektronenübertragung vom Chinon-Pool auf die Reduktasen NapA und NrfA gewährleistet (Gao *et al.*, 2009).

Im Hinblick auf die Nitratrespiration katalysiert in Epsilonproteobakterien die periplasmatische Nitratreduktase (NapA) die Reduktion des Nitrats. Der membran-assoziierte Nitratreduktase-Komplex (NarGHI) wurde bisher nicht in Epsilonproteobakterien nachgewiesen (Simon *et al.*, 2003; Kern & Simon, 2009; Meyer & Huber, 2014; Vetriani *et al.*, 2014). Ein Charakteristikum innerhalb des epsilonproteobakteriellen *nap*-Clusters ist das Fehlen des Gens *napC*. Daher wird der Elektronentransport vom Chinon-Pool zur Nitratreduktase NapA durch Beteiligung des NapGH-Komplexes gewährleistet (Simon *et al.*, 2003; Simon and Klotz, 2013). In *W. succinogenes* wird die respiratorische Nitrat-Ammonifikation ebenfalls durch das Nap- und Nrf-System im Periplasma katalysiert. Ein ähnliches Modell wäre auch hinsichtlich der Funktionalität der ϵ Hao denkbar. Hierbei würde die Nitratammonifikation durch das Zusammenspiel des Nap-Systems mit der HaoA bzw. dem HaoBA-Komplex katalysiert werden. Somit würde der HaoBA-Komplex funktionell äquivalent zum NrfHA-Komplex innerhalb dieser Reaktion agieren. Interessanterweise wurden in den Genomen der Tiefseebakterien *C. mediatlanticus* TB-2 und *Lebetimonas* sp. JH292 einzelne *haoA*-Gene unmittelbar stromabwärts des *nap*-Operons (*napAGHBFLD*) identifiziert (Abb. 35 A und B). In *Arcobacter anaerophilus* sind die Gene *haoBA* ebenfalls unmittelbar stromabwärts des *nap*-Clusters lokalisiert (Abb. 35 D). Bedeutend ist hierbei, dass die beiden Tiefseebakterien *C. mediatlanticus* und *N. profundicola* als Nitrat-ammonifizierende Organismen beschrieben wurden, obwohl in deren Genomen keine für die Nitritreduktase NrfA kodierenden

Gene vorhanden sind. Somit ist der ammonifizierende Metabolismus dieser Bakterien durch das Vorhandensein von *haoA*- (und *haoB*-) Genen erklärbar. Aufgrund dessen besitzt die ϵ Hao in diesen Organismen vermutlich eine physiologische Rolle innerhalb der Nitrit-Respiration und/oder Nitrit-Assimilation. Weiterhin ist eine Funktion der Proteine im Rahmen der Hydroxylamin- und/oder NO-Detoxifizierung denkbar, was den vielseitigen metabolischen Charakter von Vertretern der MCC-Familie unterstreicht.

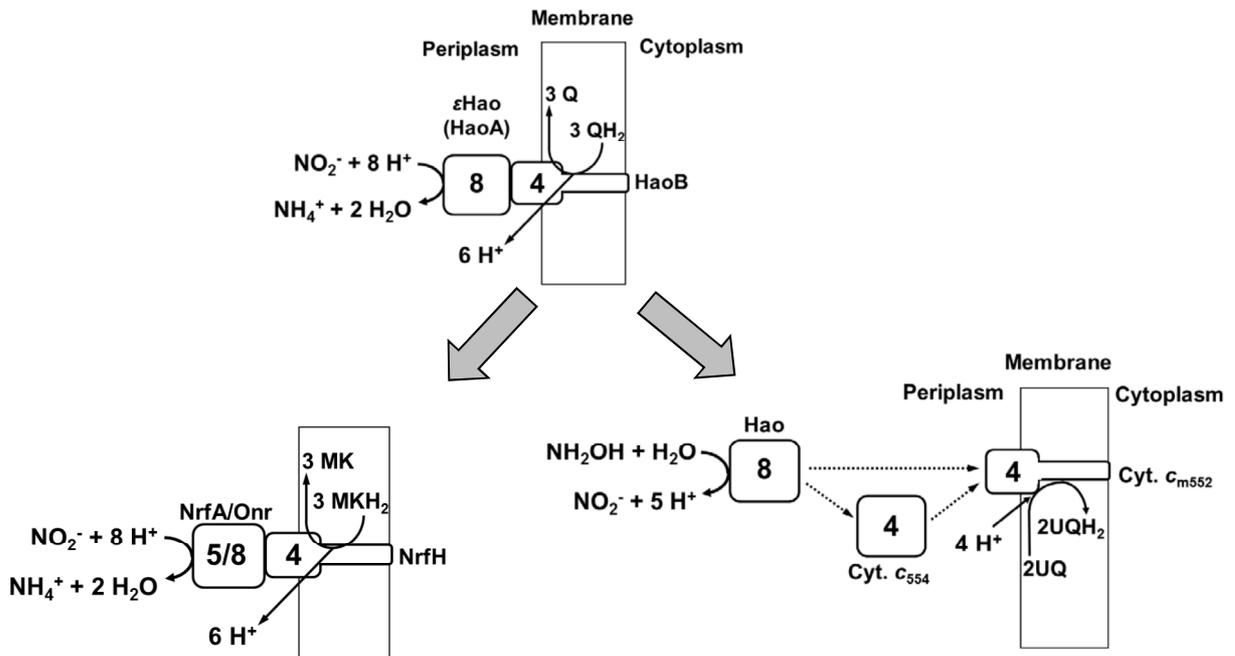


Abbildung 45: Modelle der respiratorischen Elektronentransportwege zu Vertretern der MCC-Familie (ϵ Hao, NrfA, Hao). Das obere Modell beschreibt hierbei die potenzielle physiologische Rolle der ϵ Hao (HaoBA-Komplex), welche möglicherweise als "missing link" innerhalb der Evolution von reduktiven NrfA- und oxidativen Hao-Proteinen fungiert. Die Proteine HaoB, NrfH und Cyt. c_{m552} sind der Familie der NapC/NrfH-Proteine zugehörig und katalysieren innerhalb der Respiration als Chinol-Dehydrogenasen oder Chinon-Reduktasen die Übertragung von Elektronen. Q/QH₂, Chinon/Chinol; MK/MKH₂, Menachinon/Menachinol; UQ/UQH₂, Ubichinon/Ubichinol (ergänzt nach Simon & Klotz, 2013).

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Alain, K., Postec, A., Grinsard, E., Lesongeur, F., Prieur, D., and Godfroy, A. (2010) *Thermodesulfatator atlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 33-38.
- Alazard, D., Dukan, S., Urios, A., Verhé, F., Bouabida, N, Morel, F., *et al.* (2003) *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 173-178.
- Arahal, D.R., Lekunberri, I., Gonzalez, J. M., Pascual, J., Pujalte, M. J., Pedros-Alio, C., and Pinhassi, J. (2007) *Neptuniibacter caesariensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine genome-sequenced gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1000-1006.
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P., and Thöny-Meyer, L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Com* **251**: 744-747.
- Baar, C., Eppinger, M., Raddatz, G., Simon, J., Lanz, C., Klimmek, O., *et al.* (2003). Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11690-11695.
- Baele, M., Decostere, A., Vandamme, P., Ceelen, L., Hellemans, A., Mast, J., *et al.* (2008) Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1350-1358.
- Bergmann, D. J., Zahn, J. A., Hooper, A. B., and DiSpirito, A. A. (1998) Cytochrome P460 Genes from the Methanotroph *Methylococcus capsulatus* Bath. *J Bacteriol* **180**: 6440-6445.
- Bergmann, D. J., Hooper, A. B., and Klotz, M. G. (2005) Structure and sequence conservation of *hao* cluster genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria: evidence for their evolutionary history. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5371-5382.
- Berks B.C., Ferguson S.J., Moir J.W.B., and Richardson D.J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim Biophys Acta* **1232**: 97-173.
- Bode, C., Goebell, H., and Stähler, E. (1968) Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethod. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* **6**: 418-422.

Bokranz, M., Katz, J., Schröder, I., Robertson, A. M., and Kröger, A. (1983) Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor. *Arch Microbiol* **135**: 36-41.

Bonch-Osmolovskaya, E.A., Sokolova, T.G., Kostrikina, N.A., and Zavarzin, G.A. (1990) *Desulfurella acetivorans* gen. nov. and sp. nov. - a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium. *Arch Microbiol* **153**: 151-155.

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.

Braun, M.B. (2012) Struktur und biochemische Charakterisierung des Cytochrom c Oktahämproteins Ccv aus *Campylobacter curvus*. Diplomarbeit, Universität Freiburg.

Campbell, B. J., Smith, J. L., Hanson, T. E., Klotz, M. G., Stein, L. Y., Lee, C. K., *et al.* (2009) Adaptations to submarine hydrothermal environments exemplified by the genome of *Nautilia profundicola*. *PLoS Genet* **5**: e1000362.

Cedervall, P., Hooper, A. B., and Wilmot, C. M. (2013) Structural studies of hydroxylamine oxidoreductase reveal a unique heme cofactor and a previously unidentified interaction partner. *Biochemistry* **52**: 6211-6218.

Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., *et al.* (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* **528**: 504-509.

de Almeida, N. M., Maalcke, W. J., Keltjens, J. T., Jetten, M. S., and Kartal, B. (2011) Proteins and protein complexes involved in the biochemical reactions of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Biochem Soc Trans* **39**: 303-308.

Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Kroneck, P. M. H. (1999) Structure of cytochrome c nitrite reductase. *Nature* **400**: 476-480.

Einsle, O., Stach, P., Messerschmidt, A., Simon, J., Kröger, A., Huber, R., and Kroneck, P.M.H. (2000) Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogenes*. Structure at 1.6 Å resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. *J Biol Chem* **275**: 39608-39616.

Einsle, O., Messerschmidt, A., Huber, R., Kroneck, P.M., and Neese, F. (2002) Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c nitrite reductase. *J Am Chem Soc* **124**: 11737-11745.

Einsle, O., and Kroneck, P.M.H. (2004) Structural basis of denitrification. *Biol Chem* **385**: 875-883.

Einsle, O. (2011) Structure and function of formate-dependent cytochrome c nitrite reductase, NrfA. *Methods Enzymol* **496**: 399-422.

Elmore, B. O., Bergmann, D. J., Klotz, M. G., and Hooper, A. B. (2007) Cytochromes P460 and c'-beta; a new family of high-spin cytochromes c. *FEBS Lett* **581**: 911-916.

Ferguson, S. J. (2012) New perspectives on assembling c-type cytochromes, particularly from sulphate reducing bacteria and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 1754-1758.

Francis, R. T., and Becker, R. R. (1984) Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Anal Biochem* **136**: 509-514.

Frear, D. S., and Burrell, R. C. (1955) Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. *Anal Chem* **27**: 1664-1665.

Gao, H., Yang, Z. K., Barua, S., Reed, S. B., Romine, M. F., Nealson, K. H., *et al.* (2009). Reduction of nitrate in *Shewanella oneidensis* depends on atypical NAP and NRF systems with NapB as a preferred electron transport protein from CymA to NapA. *ISME J* **3**: 966-976.

Gilbert, M.J., Kik, M., Miller, W.G., Duim, B., and Wagenaar, J.A. (2015) *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 975-982.

Greenwood N.N., and Earnshaw A., (1990) Chemie der Elemente, 1. korr. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Gross, R., Eichler, R., and Simon, J. (2005) Site-directed modifications indicate differences in axial haem c iron ligation between the related NrfH and NapC families of multihaem c-type cytochromes. *Biochem J* **390**: 689-693.

Hänninen, M.L., Happonen, I., Saari, S., and Jalava, K. (1996) Culture and characteristics of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int J Syst Evol Microbiol* **46**: 160-166.

Hanson, T. E., Campbell, B. J., Kalis, K. M., Campbell, M. A., and Klotz, M. G. (2013) Nitrate ammonification by *Nautilia profundicola* AmH: experimental evidence consistent with a free hydroxylamine intermediate. *Front Microbiol* **4**: 180.

Harper, C.G., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N.S., Kinsel, M., Dewhirst, F.E., *et al.* (2002) *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J Clin Microbiol* **40**: 4536-4543.

Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M., and Stetter, K. O. (1999) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbio Rev* **22**: 353-381.

Hermann, B., Kern, M., La Pietra, L., Simon, J., and Einsle, O. (2015) The octahaem MccA is a haem c-copper sulfite reductase. *Nature* **520**: 706-709.

-
- Holmes, D.E., Nicoll, J.S., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2004) Potential role of a novel psychrotolerant member of the family *Geobacteraceae*, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6023-6030.
- Hooper, A.B., and Nason, A. (1965) Characterization of hydroxylamine-cytochrome *c* reductase from the chemoautotrophs *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosocystis oceanus*. *J Biol Chem* **240**: 4044-4057.
- Hooper, A. B., and Terry, K. R. (1977) Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: inactivation by hydrogen peroxide. *Biochemistry* **16**: 455-459.
- Hooper, A. B., and Terry, K. R. (1979) Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*. Production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochim Biophys Acta* **571**: 12-20.
- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., and Arciero, D.M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 59.
- Hooper, A.B., Arciero, D., Bergmann, D., and Hendrich, M.P. (2004) The oxidation of ammonia as an energy source in bacteria. In *Respiration in Archaea and Bacteria*. Zannoni, D. (ed.). Dordrecht, Springer Netherlands, 121-147.
- Hylemon, P.B., Wells, J.S., Krieg, N.R., Jr., and Jannasch, H.W. (1973) The genus *Spirillum*: a taxonomic study. *Int J Syst Evol Microbiol* **23**: 340-380.
- Igarashi, N., Moriyama, H., Fujiwara, T., Fukumori, Y., and Tanaka, N. (1997) The 2.8 angstrom structure of hydroxylamine oxidoreductase from a nitrifying chemoautotrophic bacterium, *Nitrosomonas europaea*. *Nature Struct Biol* **4**: 276-284.
- Imhoff, J.F., and Pfennig, N. (2001) *Thioflavicoccus mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll *b*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 105-110.
- Ivanova, E.P., and Mikhailov, V.V. (2001) A new family, *Alteromonadaceae* fam. nov., including marine Proteobacteria of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, and *Colwellia*. *Mikrobiologiya* **70**: 15-23.
- Jean, W.D., Huang, S.P., Liu, T.Y., Chen, J.S., and Shieh, W.Y. (2009) *Aliagarivorans marinus* gen. nov., sp. nov. and *Aliagarivorans taiwanensis* sp. nov., facultatively anaerobic marine bacteria capable of agar degradation. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1880-1887.
- Joosten, M., Lindén, S., Rossi, M., Tay, A.C.Y., Skoog, E., Padra, M., et al. (2015) Divergence between the highly virulent zoonotic pathogen *Helicobacter heilmannii* and its closest relative, the low-virulence "*Helicobacter ailurogastricus*" sp. nov. *Infect Immun* **84**: 293-306.
- Kartal, B., and Keltjens, J.T. (2016) Anammox biochemistry: a tale of heme *c* proteins. *Trends Biochem Sci* **41**: 998-1011.

Kern, M., and Simon, J. (2008) Characterization of the NapGH quinol dehydrogenase complex involved in *Wolinella succinogenes* nitrate respiration. *Mol Microbiol* **69**: 1137-1152.

Kern, M., and Simon, J. (2009) Periplasmic nitrate reduction in *Wolinella succinogenes*: cytoplasmic NapF facilitates NapA maturation and requires the menaquinol dehydrogenase NapH for membrane attachment. *Microbiology* **155**: 2784-2794.

Kern, M., and Simon, J. (2009) Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 646-656.

Kern, M., Eisel, F., Scheithauer, J., Kranz, R. G., and Simon, J. (2010). Substrate specificity of three cytochrome *c* haem lyase isoenzymes from *Wolinella succinogenes*: unconventional haem *c* binding motifs are not sufficient for haem *c* attachment by Nrfl and CcsA1. *Mol Microbiol* **75**: 122-137.

Kern, M., and Simon, J. (2011) Production of recombinant multiheme cytochromes *c* in *Wolinella succinogenes*. *Methods Enzymol* **486**: 429-446.

Kern, M., Klotz, M. G., and Simon, J. (2011a) The *Wolinella succinogenes* *mcc* gene cluster encodes an unconventional respiratory sulphite reduction system. *Mol Microbiol* **82**: 1515-1530.

Kern, M., Volz, J., and Simon, J. (2011b) The oxidative and nitrosative stress defence network of *Wolinella succinogenes*: cytochrome *c* nitrite reductase mediates the stress response to nitrite, nitric oxide, hydroxylamine and hydrogen peroxide. *Environ Microbiol* **13**: 2478-2494.

Khelaifia, S., Fardeau, M.L., Pradel, N., Aassignargues, C., Garel, M., Tamburini, C., *et al.* (2011) *Desulfovibrio piezophilus* sp. nov., a piezophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from wood falls in the Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2706-2711.

Kim, H., Choo, Y.J., Song, J., Lee, J.S., Lee, K.C., and Cho, J.C. (2007) *Marinobacterium litorale* sp. nov. in the order Oceanospirillales. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1659-1662.

Klotz, M. G., Schmid, M. C., Strous, M., Op Den Camp, H. J., Jetten, M. S., and Hooper, A. B. (2008) Evolution of an octahaem cytochrome *c* protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria. *Environ Microbiol* **10**: 3150-3163.

Kostera, J., Youngblut, M. D., Slosarczyk, J. M., and Pacheco, A. A. (2008) Kinetic and product distribution analysis of NO[•] reductase activity in *Nitrosomonas europaea* hydroxylamine oxidoreductase. *J Biol Inorg Chem* **13**: 1073-1083.

Kostera, J., McGarry, J., and Pacheco, A. A. (2010) Enzymatic interconversion of ammonia and nitrite: the right tool for the job. *Biochemistry* **49**: 8546-8553.

Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G., and Lancaster, C. R. D. (2002) Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 23-38.

Lai, Q., Cao, J., Dupont, S., Shao, Z., Jebbar, M., and Alain, K. (2016) *Thermodesulfatator autotrophicus* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from the Indian Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 3978-3982.

Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lange, B., and Zdeněk, J.V. (1980) *Photometrische Analyse*. Weinheim, Germany: Verlag Chemie.

Lockwood, C.W.J., Burlat, B., Cheesman, M.R., Kern, M., Simon, J., Clarke, T.A., Richardson, D.J., and Butt, J.N. (2015) Resolution of key roles for the distal pocket histidine in cytochrome c nitrite reductases. *J Am Chem Soc* **137**: 3059-3068.

Lorenzen, J.P., Kröger, A., and Unden, G. (1993) Regulation of anaerobic respiratory pathways in *Wolinella succinogenes* by the presence of electron acceptors. *Arch Microbiol* **159**: 477-483.

Maalcke, W. J., Dietl, A., Marritt, S. J., Butt, J. N., Jetten, M. S., Keltjens, J. T., et al. (2014) Structural basis of biological NO generation by octaheme oxidoreductases. *J Biol Chem* **289**: 1228-1242.

Maalcke, W. J., Reimann, J., de Vries, S., Butt, J. N., Dietl, A., Kip, N., et al. (2016) Characterization of anammox hydrazine dehydrogenase, a key N₂-producing enzyme in the global nitrogen cycle. *J Biol Chem* **291**: 17077-17092.

Marritt, S.J., Lowe, T.G., Bye, J., McMillan, D.G., Shi, L., Fredrickson, J., et al. (2012) A functional description of CymA, an electron-transfer hub supporting anaerobic respiratory flexibility in *Shewanella*. *Biochem J* **444**: 465-474

Mehrotra, P.V., Brunson, K., Hooper, A., and Bergmann, D. (2012) Expression of two *Nitrosomonas europaea* proteins, hydroxylamine oxidoreductase and NE0961, in *Escherichia coli*. *Proceedings of the South Dakota Academy of Sciences* **91**: 145-157.

Meyer, J.L., and Huber, J.A. (2014) Strain-level genomic variation in natural populations of *Lebetimonas* from an erupting deep-sea volcano. *ISME J* **8**: 867-880.

Miyazaki, M., Nogi, Y., Fujiwara, Y., and Horikoshi, K. (2008) *Psychromonas japonica* sp. nov., *Psychromonas aquimarina* sp. nov., *Psychromonas macrocephali* sp. nov. and *Psychromonas ossibalaenae* sp. nov., psychrotrophic bacteria isolated from sediment adjacent to sperm whale carcasses off Kagoshima, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1709-1714.

-
- Moussard, H., L'haridon, S., Tindall, B.J., Banta, A., Schumann, P., Stackebrandt, E., *et al.* (2004) *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 227-233.
- Mowat, C. G., and Chapman, S. K. (2005) Multi-heme cytochromes - new structures, new chemistry. *Dalton Trans* **21**: 3381-3389.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Narasingarao, P., and Häggblom, M.M. (2007) *Pelobacter seleniigenes* sp. nov., a selenite-respiring bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1937-1942.
- Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, M., and Suzuki, Y. (2008) *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 659-665.
- O'Farrell, P.Z., H.M. Goodman, and O'Farrell, P.H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**: 1133-1141.
- On, S.L.W., Bloch, B., Holmes, B., Hoste, B., and Vandamme, P. (1995) *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii* subsp. nov., isolated from the porcine stomach, and an emended description of *Campylobacter hyointestinalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **45**: 767-774.
- Parey, K., Fielding, A. J., Sörgel, M., Rachel, R., Huber, H., Ziegler, C., and Rajendran, C. (2016). In meso crystal structure of a novel membrane-associated octaheme cytochrome c from the Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. *FEBS J* **283**: 3807-3820.
- Park, Y.D., Baik, K.S., Seong, C.N., Bae, K.S., Kim, S., and Chun, J. (2006) *Photobacterium ganghwense* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 745-749.
- Paster, B.J., Lee, A., Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Tordoff, L.A., Fraser, G.J., *et al.* (1991) Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **41**: 31-38.
- Payne, W.J., Grant, M.A., Shapleigh, J., and Hoffman, P. (1982) Nitrogen oxide reduction in *Wolinella succinogenes* and *Campylobacter* species. *J Bacteriol* **152**: 915-918.
- Pfennig, N., and Trüper, H.G. (1981) Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. In *The Prokaryotes*, 279-289. Springer Berlin Heidelberg.

Poock, S. R., Leach, E. R., Moir, J. W., Cole, J. A., and Richardson, D. J. (2002) Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome *c* nitrite reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 23664-23669.

Poret-Peterson, A. T., Graham, J. E., Gullede, J., and Klotz, M. G. (2008) Transcription of nitrification genes by the methane-oxidizing bacterium, *Methylococcus capsulatus* strain Bath. *ISME J* **2**: 1213-1220.

Pot, B., Gillis, M., Hoste, B., Van de Velde, A., Bekaert, F., Kersters, K., and De Ley, J. (1989) Intra- and intergeneric relationships of the genus *Oceanospirillum*. *Int J Syst Evol Microbiol* **39**: 23-34.

Rider, B. F., and Mellon, M. G. (1946) Colorimetric determination of nitrites. *Ind Eng Chem Anal Ed* **18**: 96-99.

Rodrigues, M. L., Oliveira, T. F., Pereira, I. A., and Archer, M. (2006) X-ray structure of the membrane-bound cytochrome *c* quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination. *EMBO J* **25**: 5951-5960.

Roop II, R.M., Smibert, R.M., Johnson, J.L., and Krieg, N.R. (1985) *Campylobacter mucosalis* (Lawson, Leaver, Pettigrew, and Rowland 1981) comb. nov.: emended description. *Int J Syst Evol Microbiol* **35**: 189-192.

Sasi Jyothsna, T.S., Rahul, K., Ramaprasad, E.V.V., Sasikala, C., and Ramana, C.V. (2013) *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 4619-4625.

Satomi, M., Kimura, B., Hamada, T., Harayama, S., and Fujii, T. (2002) Phylogenetic study of the genus *Oceanospirillum* based on 16S rRNA and *gyrB* genes: emended description of the genus *Oceanospirillum*, description of *Pseudospirillum* gen. nov., *Oceanobacter* gen. nov. and *Terasakiella* gen. nov. and transfer of *Oceanospirillum jannaschii* and *Pseudomonas stanieri* to *Marinobacterium* as *Marinobacterium jannaschii* comb. nov. and *Marinobacterium stanieri* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 739-747.

Schalk, J., de Vries, S., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. (2000) Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation. *Biochemistry* **39**: 5405-5412.

Shimamura, M., Nishiyama, T., Shinya, K., Kawahara, Y., Furukawa, K., and Fujii, T. (2008) Another multiheme protein, hydroxylamine oxidoreductase, abundantly produced in an anammox bacterium besides the hydrazine-oxidizing enzyme. *J Biosci Bioeng* **105**: 243-248.

Simon, J., Gross, R., Einsle, O., Kroneck, P. M., Kröger, A., and Klimmek, O. (2000) A NapC/NirT-type cytochrome *c* (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome *c* nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Microbiol* **35**: 686-696.

Simon, J. (2002) Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 285-309.

Simon, J., Sanger, M., Schuster, S.C., and Gross, R. (2003) Electron transport to periplasmic nitrate reductase (NapA) of *Wolinella succinogenes* is independent of a NapC protein. *Mol Microbiol* **49**: 69-79.

Simon, J., and Kern, M. (2008) Quinone-reactive proteins devoid of haem *b* form widespread membrane-bound electron transport modules in bacterial respiration. *Biochem Soc Trans* **36**: 1011-1016.

Simon, J., Kern, M., Hermann, B., Einsle, O., and Butt, J. N. (2011) Physiological function and catalytic versatility of bacterial multihaem cytochromes *c* involved in nitrogen and sulfur cycling. *Biochem Soc Trans* **39**: 1864-1870.

Simon, J., and Hederstedt, L. (2011) Composition and function of cytochrome *c* biogenesis System II. *FEBS J* **278**: 4179-4188.

Simon, J., and Klotz, M. G. (2013) Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim Biophys Acta* **1827**: 114-135.

Smet, A., Flahou, B., D'Herde, K., Vandamme, P., Cleenwerck, I., Ducatelle, R., *et al.* (2012) *Helicobacter heilmannii* sp. nov., isolated from feline gastric mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 299-306.

Smith, J.L., Campbell, B.J., Hanson, T.E., Zhang, C.L., and Cary, S.C. (2008) *Nautilia profundicola* sp. nov., a thermophilic, sulfur-reducing epsilonproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1598-1602.

Stach, P., Einsle, O., Schumacher, W., Kurun, E., and Kroneck, P. M. H. (2000) Bacterial cytochrome *c* nitrite reductase: new structural and functional aspects. *J Inorg Biochem* **79**: 381-385.

Stein, L.Y., and Klotz, M. G. (2016) The nitrogen cycle. *Curr Biol* **26**: R94-R98.

Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., *et al.* (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**: 790-794.

Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A., and Ueki, K. (2007) *Desulfobulbus japonicus* sp. nov., a novel Gram-negative propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 849-855.

Takai, K., Hirayama, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2005) *Lebetimonas acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 183-189.

Tanner, A.C.R., Badger, S., Lai, C.H., Listgarten, M.A., Visconti, R.A., and Socransky, S.S. (1981) *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **31**: 432-445.

Tanner, A.C.R., Listgarten, M.A., and Ebersole, J.L. (1984) *Wolinella curva* sp. nov.: "*Vibrio succinogenes*" of human origin. *Int J Syst Evol Microbiol* **34**: 275-282.

van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J. M., Kartal, B., et al. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* **528**: 555-559.

Vandieken, V., Knoblauch, C., and Jørgensen, B.B. (2006) *Desulfovibrio frigidus* sp. nov. and *Desulfovibrio ferrireducens* sp. nov., psychrotolerant bacteria isolated from Arctic fjord sediments (Svalbard) with the ability to reduce Fe(III). *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 681-685.

Véron, M., and Chatelain, R. (1973) Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int J Syst Evol Microbiol* **23**: 122-134.

Vetriani, C., Voordeckers, J. W., Crespo-Medina, M., O'Brien, C. E., Giovannelli, D., and Lutz, R. A. (2014) Deep-sea hydrothermal vent Epsilonproteobacteria encode a conserved and widespread nitrate reduction pathway (Nap). *ISME J* **8**: 1510-1521.

Voordeckers, J.W., Starovoytov, V., and Vetriani, C. (2005) *Caminibacter mediatlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 773-779.

Wang, J., Vine, C.E., Balasiny, B.K., Rizk, J., Bradley, C.L., Tinajero-Trejo, M., et al. (2016) The roles of the hybrid cluster protein, Hcp and its reductase, Hcr, in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. *Mol Microbiol* **100**: 877-892.

Wolin, M. J., Wolin, E. A., and Jacobs, N. J. (1961) Cytochrome-producing anaerobic *Vibrio*, *Vibrio succinogenes*, sp. n. *J Bacteriol* **81**: 911-917.

Yamanaka, T., and Shinra, M. (1974) Cytochrome c-552 and cytochrome c-554 derived from *Nitrosomonas europaea*. Purification, properties, and their function in hydroxylamine oxidation. *J Biochem* **75**: 1265-1273.

Zehnder, A.J.B., and Wuhrmann, K. (1976) Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**: 1165-1166.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ad.	zu
AMO	Ammoniummonooxygenase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHI	Brain Heart Infusion
bidest.	Bidestilliert
BN	Blau-Nativ
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Benzylviologen
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
C	Cystein (Einbuchstabencode)
ca.	circa
<i>cat</i>	Chloramphenicolresistenz-Gen
<i>Ccu</i>	<i>Campylobacter curvus</i>
<i>Ccm</i>	Cytochrom c Biogenese-System (Cytochrom <u>c</u> <u>M</u> aturation)
<i>Ccs</i>	Cytochrom c Biogenese-System (Cytochrom <u>c</u> <u>S</u> ynthese)
<i>Cf</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
cm	Zentimeter
<i>Cm</i>	<i>Caminibacter mediatlanticus</i>
Cm	Chloramphenicol
d	Küvetten-Schichtdicke
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNRA	Dissimilatory nitrate reduction to ammonium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol

ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
ϵ_{Hao}	epsilonproteobakterielle Hydroxylamin-Oxidoreduktase
E_{λ}	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgebundener Immunnachweis
<i>et al.</i>	und andere
F	Farad (Einheit der elektrischen Kapazität)
Fdh	Formiat-Dehydrogenase
g	Gramm
h	Stunde
H	Histidin (Einbuchstabencode)
Hao	Hydroxylamin-Oxidoreduktase
<i>haoA</i>	Hydroxylamin-Oxidoreduktase kodierendes Gen
<i>haoB</i>	HaoB-kodierendes Gen
HBM	Hämbindemotiv
Hcp	Hybrid Cluster Protein
Hdh	Hydrazin-Dehydrogenase
HP	High pressure
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
Hyd	Hydrogenase
i.d.R.	in der Regel
IEF	Isoelektrische Fokussierung
k	kilo-
K	Lysin (Einbuchstabencode)
<i>kan</i>	Kanamycinresistenz-Gen
Kap.	Kapitel
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Lysogeny broth
m	milli-
M	Methionin (Einbuchstabencode)
M	Molar
MBP	Maltose-Bindeprotein
MCC	Multihäm Cytochrom c

MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MK/MKH ₂	Menachinon/Menachinol
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid
MV	Methylviologen
n	nano-
N/A	Keine Angabe
Nap	Periplasmatische Nitratreduktase
NarGHI	membrangebundener respiratorischer Nitratreduktase-Komplex
NasA	assimilatorische Nitratreduktase
NasB/NirBD	NAD(P)H-abhängige assimilatorische Nitritreduktase
<i>Ne</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i>
NEPHGE	Nonequilibrium pH gel electrophoresis
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NirA	Ferredoxin-abhängige Nitritreduktase
NirK	Kupfer-beinhaltene Nitritreduktase
NirS	Cytochrom <i>cd</i> ₁ Nitritreduktase
NiR/SiR	Nitrit-/Sulfit-Reduktase
nm	Nanometer
<i>Np</i>	<i>Nautilia profundicola</i>
NrfA	periplasmatische Pentahäm Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase, katalytische Untereinheit
NrfH	membrangebundene Untereinheit des NrfHA-Komplexes
OD	optische Dichte
Onr	Oktahäm Cytochrome <i>c</i> Nitritreduktase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PMS	Phenazinmethosulfat
pTMH	Expressionplasmid für die heterologe Produktion von Multihäm Cytochromen <i>c</i> in <i>W. succinogenes</i> ; Plasmid kodiert <u>TEV</u> -Erkennungssequenz; <u>M</u> altose-Bindeprotein sowie einen C-terminalen <u>H</u> is-Tag

PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q/QH ₂	Chinon/Chinol
RBS	Ribosomenbindestelle
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TEV	Tobacco etch virus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UQ/UQH ₂	Ubichinon/Ubichinol
V	Valin (Einbuchstabencode)
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
W	Tryptophan (Einbuchstabencode)
Ws	<i>Wolinella succinogenes</i>
w/v	weight per volume (Gewichtseinheit pro Volumen)
Y	Tyrosin (Einbuchstabencode)
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro-

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einfache Darstellung des biogeochemischer Stickstoffkreislaufs.	4
Abbildung 2: Tyrosin Cross-Link innerhalb der Hao-Struktur (Cedervall <i>et al.</i> , 2013).	7
Abbildung 3: Strukturmodell der homotrimeren Hao von <i>Nitrosomonas europaea</i> .	8
Abbildung 4: Anordnung der Häm-Gruppen in <i>W. succinogenes</i> NrfA (grau) und <i>N. europaea</i> Hao (schwarz).	9
Abbildung 5: Strukturmodell der homodimeren NrfA von <i>Wolinella succinogenes</i> .	10
Abbildung 6: Nitrat-Ammonifikation im Modellorganismus <i>Wolinella succinogenes</i> .	14
Abbildung 7: Karten aller in Tabelle 4 aufgeführten Plasmide.	26
Abbildung 8: Strategie zur Erstellung der Stämme <i>W. succinogenes</i> ϵ Hao-MBP <i>kan</i> durch Transformation von <i>W. succinogenes</i> <i>napA::cat</i> mit verschiedenen pTMH-Derivaten.	41
Abbildung 9: Eichgerade des Ammoniumnachweises mittels Neblers Reagenz.	52
Abbildung 10: Eichgerade der Hydroxylaminbestimmung.	53
Abbildung 11: (A) Vektorkarte des Expressionsplasmids pTMH- <i>CmHao</i> mit dem Zielgen <i>haoA</i> aus <i>C. mediatlanticus</i> ; (B) Strategie zur Erstellung der Mutanten <i>W. succinogenes</i> ϵ Hao-MBP <i>kan</i> durch Transformation von <i>W. succinogenes</i> <i>napA::cat</i> mit verschiedenen pTMH-Derivaten, homologe Bereiche zwischen dem <i>W. succinogenes</i> Genom und dem Expressionsplasmid pTMH sind durch schwarze Balken gekennzeichnet.	59
Abbildung 12: (A) SDS-PAGE (10 %-iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von <i>W. succinogenes</i> Zellsuspensionen (200 μ g Probe pro Spur); M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Bild A und C, Thermo Scientific), Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Bild D, Thermo Scientific), Color Prestained Protein Standard Broad Range (Bild B, New England Biolabs); Spur 1, <i>CmHao</i> ; Spur 2, <i>CmHao_V450Y</i> ; Spur 3, <i>CfHao</i> ; Spur 4, <i>CfHao_V422Y</i> ; Spur 5, <i>CcuHao</i> ; Spur 6, <i>CcuHao_V414Y</i> ; Spur 7, <i>W. succinogenes</i> <i>napA::cat</i> (150 μ g); (B) Häm-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 30 μ g Probe in jeder Spur; (C) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 7,5 μ g Probe pro Spur, (D) Western Blot und ELISA zum Nachweis von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen unter Verwendung des primären Antikörpers Anti-His-HRP (Roth), 7,5 μ g gereinigtes Protein pro Spur.	60
Abbildung 13: (A) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Coomassie-Färbung des gereinigten Fusionsproteins <i>CmHao</i> -MBP vor und nach Zugabe der TEV-Protease, 7,5 μ g Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, <i>CmHao</i> -MBP Fusionsprotein vor Zugabe der TEV-Protease; Spur 2, <i>CmHao</i> -MBP Fusionsprotein nach Zugabe der TEV-Protease und 3-stündiger Inkubation bei 30 °C (Kap. 3.7.6.4); Spur 3, <i>CmHao</i> -MBP Fusionsprotein nach Zugabe der TEV-Protease und 4-stündiger Inkubation bei 30 °C. (B) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung des gereinigten Fusionsproteins <i>CmHao</i> -MBP vor und nach Zugabe der TEV-Protease, 50 μ g Probe in jeder Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); Spur 1, <i>CmHao</i> -MBP Fusionsprotein vor Zugabe der TEV-Protease; Spur 2, <i>CmHao</i> -MBP Fusionsprotein nach Zugabe der TEV-Protease und 3-stündiger Inkubation bei 30 °C.	61
Abbildung 14: Gasbildung bei der Durchführung des Nitrit-Reduktase-Enzymtests zwei Minuten nach Zugabe der <i>CmHao</i> .	63
Abbildung 15: Enzym-Kinetik von heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen bei der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion sowie der Hydroxylamin-Oxidation.	64
Abbildung 16: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen.	66
Abbildung 17: UV/Vis-Absorptionsspektren von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen.	70
Abbildung 18: (A) Analytische Gelfiltration mit den Kalibrierproteinen Blue Dextran, Ferritin, Katalase, Aldolase, BSA und Ovalbumin.	71
Abbildung 19: Analytische Gelfiltration von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen.	72

Abbildung 20: BN-PAGE der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine.	73
Abbildung 21: Isoelektrische Fokussierung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen.	75
Abbildung 22: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von <i>W. succinogenes</i> Zellsuspensionen, 200 μ g Probe pro Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1-4, <i>Np</i> Hao-Transformanden 1-4 ; Spur 5, <i>W. succinogenes napA::cat</i> (150 μ g); (B) Häm-Färbung des gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteins <i>Np</i> Hao, 30 μ g Probe pro Spur; (C) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao aus <i>N. profundicola</i> , 7,5 μ g Probe pro Spur; (D) Bandenmuster der gereinigten <i>Np</i> Hao- und <i>Cm</i> Hao-Präparationen im SDS-Gel (10 % ig) im Vergleich zu anderen ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen, 30 μ g Protein pro Spur; Spur 1, <i>Ccu</i> Hao_V414Y; Spur 2, <i>Cf</i> Hao_V422Y; Spur 3, <i>Cm</i> Hao_V450Y; Spur 4, <i>Np</i> Hao.	76
Abbildung 23: Partieller Sequenzvergleich von ausgewählten HaoA-Proteinen (Ausschnitt des Anhangs 7.1).	78
Abbildung 24: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 30 μ g Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, <i>Cm</i> Hao; Spur 2, <i>Cm</i> Hao_W464Y; Spur 3, <i>Cf</i> Hao; Spur 4, <i>Cf</i> Hao_W434Y; Spur 5, <i>Ccu</i> Hao; Spur 6, <i>Ccu</i> Hao_W428Y,(B) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Fusionsproteine, 7,5 μ g Probe pro Spur.	79
Abbildung 25: SDS-PAGE (7,5 % iges Polyacrylamid-Gel) des gereinigten Fusionsproteins <i>Ccu</i> Hao_W428Y vor und nach Zugabe der TEV-Protease, M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, <i>Ccu</i> Hao_W428Y vor Zugabe der TEV-Protease; Spur 2, <i>Ccu</i> Hao_W428Y nach Zugabe der TEV-Protease und dreistündiger Inkubation bei 30 °C, (A) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des gereinigten ϵ Hao-MBP Fusionsproteins <i>Ccu</i> Hao_W428Y, 7,5 μ g Probe in jeder Spur. (B) Häm-Färbung der ϵ Hao-MBP Variante <i>Ccu</i> Hao_W428Y vor und nach Proteolyse des Maltose-Binde-Proteins, 7,5 μ g Probe pro Spur.	80
Abbildung 26: SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von ganzen Zellen der Mutante <i>W. succinogenes Cf</i> Hao_W434Y-MBP <i>kan</i> , 200 μ g Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, <i>Cf</i> Hao_W434Y-Transformand 1; Spur 2, <i>Cf</i> Hao_W434Y-Transformand 2.	81
Abbildung 27: Enzym-Kinetik von heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Varianten bei der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion sowie der Hydroxylamin-Oxidation.	83
Abbildung 28: UV/Vis-Spektrum der ϵ Hao-MBP Varianten im Vergleich zur <i>Ne</i> Hao.	87
Abbildung 29: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Varianten, 30 μ g Protein pro Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, <i>Ccu</i> Hao_V414Y; Spur 2, <i>Cf</i> Hao_V422Y; Spur 3, <i>Cm</i> Hao_V450Y; (B) Coomassie-Färbung gereinigter ϵ Hao-MBP Varianten, 7,5 μ g Probe pro Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, <i>Ccu</i> Hao_V414Y; Spur 2, <i>Cf</i> Hao_V422Y; Spur 3, <i>Cm</i> Hao_V450Y.	88
Abbildung 30: Enzym-Kinetik von heterolog produzierten ϵ Hao-MBP Varianten bei der Nitrit- und Hydroxylamin-Reduktion sowie der Hydroxylamin-Oxidation.	91
Abbildung 31: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Varianten.	93
Abbildung 32: Temperatur-Optimum des Enzyms <i>Cm</i> Hao_V450Y während der Nitritreduktion.	94
Abbildung 33: UV/Vis-Spektrum der ϵ Hao-MBP Varianten.	97
Abbildung 34: Analytische Gelfiltration von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen.	98
Abbildung 35: Genomische Organisation des <i>nap</i> -Genclusters in den Tiefseebakterien <i>C. mediatlanticus</i> TB-2 (A), <i>Lebetimonas</i> sp. JH292 (B), <i>N. profundicola</i> (C) und <i>A. anaerophilus</i> (D).	105

Abbildung 36: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen, 300 µg Probe in jeder Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1-6, *W. succinogenes* MK1-*CmHao kan napA::cat* Transformanden; Spur 7, *W. succinogenes napA::cat* (150 µg); (B) Häm-Färbung der Elutionsfraktionen nach Reinigung der *CmHao*, 50 µl Probe in jeder Spur; M, ColorPlus™ Prestained Protein Ladder Broad Range; Spur 1-7, Eluate 1-7; (C) Coomassie-Färbung der Eluate nach Reinigung der *CmHao*, 5,0 µg Probe pro Spur; M, ColorPlus™ Prestained Protein Ladder Broad Range; Spur 1-7, Eluate 1-7; (D) Häm-Färbung der während der Reinigung gesammelten Fraktionen, 300 µg Probe pro Spur; M, ColorPlus™ Prestained Protein Ladder Broad Range; Spur 1, Homogenat; Spur 2, Lösliche Fraktion; Spur 3, Durchlauf; Spur 4-8, Waschfraktionen 1-5. 107

Abbildung 37:(A) Western Blot (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und ELISA einer Zellsuspension der Mutante *W. succinogenes* MK2-*CmHao kan napA::cat* zum Nachweis der *CmHao* unter Verwendung des Antikörpers *Strep-Tactin*®-HRP conjugate (IBA), 70 µg Probe pro Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (B) Häm-Färbung der Elutionsfraktionen nach Reinigung der *CmHao*, 50 µl Probe in jeder Spur; Spur 1-6, Eluate 1-6; (C) Coomassie-Färbung der Eluate nach Reinigung der *CmHao*, 50 µl Probe pro Spur; Spur 1-6, Eluate 1-6; (D) Häm-Färbung der im Rahmen der Reinigung aufgefangenen Fraktionen, 250 µg Probe pro Spur; Spur 1, Homogenat; Spur 2, Lösliche Fraktion; Spur 3, Durchlauf; Spur 4-6, Waschfraktionen 1-3. 108

Abbildung 38: (A) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung der Eluate nach Reinigung der *CmHao* mit einfachem C- und N-terminalem *Strep*-Tag, 50 µl Probe pro Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1-9, Eluate 1-9; (B) Coomassie-Färbung der Eluate, 50 µl Probe in jeder Spur; Spur 1-9, Eluate 1-9; (D) Häm-Färbung der restlichen aufgefangenen Fraktionen, 200 µg Protein pro Spur; Spur 1, Lösliche Fraktion; Spur 2, Durchlauf; Spur 3-4, Waschfraktion 1-2; Spur 5, Kontrollstamm *W. succinogenes napA::cat*, 150 µg Protein. 110

Abbildung 39: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen, 250 µg Probe in jeder Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1-3, *W. succinogenes* MK9-*CmHao kan napA::cat* Transformanden; Spur 4, *W. succinogenes napA::cat* (150 µg); (B) Western Blot (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und ELISA einer Zellsuspension des Stammes *W. succinogenes* MK9-*CmHao kan napA::cat* zum Nachweis der *CmHao* unter Verwendung des Antikörpers Anti-His-HRP (Roth), 70 µg Probe pro Spur; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Spur 1, Zellsuspension eines *W. succinogenes* MK9-*CmHao kan napA::cat* Transformanden; Spur 2, Positivkontrolle (Schwefeltransferase; bereitgestellt von Dr. Oliver Klimmek). 111

Abbildung 40: (A) Chromatogramm nach Reinigung des *W. succinogenes* Stammes MK9-*CmHao kan napA::cat* mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie. Für die Reinigung wurde ein Kaliumphosphat-Puffer verwendet (50 mM, pH 7,5, ermittelter pI der *CmHao*: 8,3). Das Zielprotein wurde innerhalb der Waschfraktionen 30-34 bei einem Prozessvolumen von 160 ml und einem maximalen UV-Signal von 200 mAU detektiert. (B) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung der *CmHao*, 50 µg Protein pro Spur; Z, Zellhomogenat; M, PageRuler™ Prestained Protein Ladder; L, Lösliche Fraktion; P, vereinigte und ankonzentrierte Cytochrom *c*-haltige Fraktionen; (C) Coomassie-Färbung der *CmHao* mittels DEAE-Anionenaustauschchromatographie, 20 µg Probe in jeder Spur. 113

Abbildung 41:(A) SDS-PAGE (10 %iges Polyacrylamid-Gel) und Coomassie-Färbung des gereinigten Hao-MBP Fusionsproteins *NeHao* , 7,5 µg Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1, *NeHao* nach Zugabe von Mercaptoethanol; Spur 2, *NeHao* ohne Zusatz reduzierender Detergenzien; (B) Häm-Färbung nach Reinigung der *NeHao* mittels MBP-Affinitätschromatographie, 90 µg Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1-3, Elutionsfraktionen 1-3; Spur 4, *W. succinogenes napA::cat* (150 µg); (C) SDS-PAGE (7,5 %iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung der gereinigten *NeHao* (bereitgestellt von Prof. Alan Hooper), 30 µg Probe pro Spur. 114

Abbildung 42: UV/Vis-Spektrum des in *W. succinogenes* heterolog produzierten Hao-MBP Fusionsproteins *NeHao*. 115

Abbildung 43: (A) SDS-PAGE (10 % iges Polyacrylamid-Gel) und Häm-Färbung von *W. succinogenes* Zellsuspensionen, 200 µg Probe in jeder Spur; M, Color Prestained Protein Standard Broad Range (New England Biolabs); Spur 1-6, *W. succinogenes NeHao_Y467V-MBP kan* Transformanden 1-6 ; Spur 7, *W. succinogenes napA::cat* (150 µg); (B) Coomassie-Färbung des gereinigten Hao-MBP Fusionsproteins *NeHao_Y467V* ohne Zusatz der Detergens β -Mercaptoethanol, 15 µg Probe pro Spur; (C) Häm-Färbung des gereinigten Hao-MBP Fusionsproteins *NeHao_Y467V* ohne Zusatz von β -Mercaptoethanol, 40 µg Probe pro Spur. 117

Abbildung 44: Sequenzvergleich der C-Termini von Hao- und ϵ Hao-Proteinen (modifiziert nach Igarashi *et al.*, 1997 und Bergmann *et al.*, 2005). 128

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gemeinsamkeiten und Unterschiede von ϵ Hao-Proteinen im Vergleich zur Nitritreduktase (NrfA), Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Hao) und Hydrazin-Dehydrogenase (Hdh)	11
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	16
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 4: Verwendete Mikroorganismen	19
Tabelle 5: Verwendete Plasmide	22
Tabelle 6: Primersequenzen	26
Tabelle 7: Konzentration der Antibiotika-Stammlösungen	32
Tabelle 8: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes	34
Tabelle 9: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes unter Verwendung der Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase	35
Tabelle 10: Spezifische Aktivitäten der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten.	62
Tabelle 11: K_M -Wert-Bestimmung der ϵ Hao-MBP Fusionsproteine nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten	65
Tabelle 12: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen nach Messung von jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten.	67
Tabelle 13: Ergebnisse der Substrat- und Endproduktbestimmung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen bei der Nitritreduktion nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten.	68
Tabelle 14: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Fusionsproteinen bei der Hydroxylamin-Oxidation nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten.	69
Tabelle 15: Spezifische Aktivitäten des ϵ Hao-MBP Fusionsproteins <i>NpHao</i> nach Messung von einem biologischen und drei technischen Replikaten.	77
Tabelle 16: Spezifische Aktivitäten der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten.	82
Tabelle 17: K_M -Wert-Bestimmung der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten.	84
Tabelle 18: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten.	84
Tabelle 19: Ergebnisse der Substrat- und Endproduktbestimmung der ϵ Hao-MBP Variante <i>CcuHao_W428Y</i> bei der Hydroxylamin-Oxidation.	85
Tabelle 20: Spezifische Aktivitäten der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten.	89
Tabelle 21: K_M -Wert-Bestimmung der ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten.	92
Tabelle 22: pH- und Temperatur-Optimum von ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils zwei biologischen und je drei technischen Replikaten.	93

Tabelle 23: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Varianten nach Messung von jeweils einem biologischen und je drei technischen Replikaten.	94
Tabelle 24: Ergebnisse der Substrat- und Produktbestimmung von ϵ Hao-MBP Varianten bei der Hydroxylamin-Oxidation.	95
Tabelle 25: Ausgewählte Organismen, deren Genom ein HaoA-Homolog kodiert.	102
Tabelle 26: Vorgehensweisen zur Produktion und Reinigung der ϵ Hao-Proteine <i>CmHao</i> und <i>CcuHao</i> sowie der <i>NeHao</i> .	106
Tabelle 27: Fähigkeit der Nitrat-/Nitritreduktion sowie Vorhandensein Nitrat-/Nitritreduktase-kodierender Gene in Organismen, deren Genom ein ϵ Hao-Homolog kodiert	123

7. Anhang

7.1 Alignment der HaoA-Proteinsequenzen

Sequenzvergleich von ausgewählten HaoA-Proteinen. Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal Omega (Version 1.2.3) erstellt und manuell bearbeitet, wobei die einzelnen Aminosäuren im Einbuchstabencode dargestellt wurden. Die Hämbindemotive 1-8 (CXXCH) sowie mögliche axiale Häm ϵ -Eisenliganden wurden innerhalb des Alignments hervorgehoben. Die Hämbindemotive (HBM1-8) wurden grau hinterlegt. Die distalen Häm ϵ -Eisenliganden der HaoA von *Campylobacter curvus* wurden mit dem Buchstaben "D" gekennzeichnet (rosa hinterlegt). Die dazugehörigen Nummerierungen bezeichnen die entsprechenden ligandierten Häm-Gruppen. Aminosäuren, welche mit dem Buchstaben "A" markiert wurden, befinden sich in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums (blau hinterlegt). Der Buchstabe "Y" (rot dargestellt) kennzeichnet innerhalb der ϵ Hao Sequenzen den Bereich, an dessen Position sich in der Hao der nitrifizierenden Bakterien die für die Trimerisierung essentielle Aminosäure Tyrosin befindet. C-terminale Verlängerungen wurden violett hinterlegt und Einschübe innerhalb der Aminosäuresequenzen türkis markiert. Organismen, deren HaoA-Proteine in dieser Arbeit untersucht wurden, sind gelb hervorgehoben.

<i>Psychromonas_aquimarina</i>	-----MFSSFFLVLSGN-----V	13
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	MDTFRRYNPLHTCMMGVASVLLLLLFTLLPAT-----A	32
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	-MKIKLLTPAR-WSQHLFVLLTALLFLPAT-----S	30
<i>Thermosulfidibacter_takaii_ABI70S6</i>	-----MRKGFV-----LLIGLFL-----PLTIYAQYY	22
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	-----MRVRSF----LS-LSFLL-ALIIGVLG-----SQVQAKQEQY	30
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	-----MRVGRV----FS-ICFLSMFFVLGSL-----VQAQAQKQY	31
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	-----MKVGRV----LG-ICLL-MEFFVFGLGL-----A--QAQRQY	28
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	-----MKCRLWAVGLAV-IGVVFMSVSP---V-----LAKEAADQY	31
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	-----MKKVF-GTIFV-AGFICCMTFMLAGP-----AQAAAELEG	33
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	-----MLKQMI-KLVIV-ATLIA---LSTAV-----AFAAAAEAPF	30
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	-----MLKQMI-KVMTV-TMLIA---LSAAL-----AYAA-TEPF	29
<i>Geopsychrobacter_electrodiphilus_DSM16401</i>	-----MKKVMKVLLG---FIAMGFTVACNAA-----SLKDN	29
<i>Lebetimonas</i>	-----MKKALSAGVS-----IAALTSVAFAPAN-----SLDSN	27
<i>Nautilia_profundicola</i>	-----MKKALTAGLS-----VAIASFAFAPAN-----SLDSN	27
<i>Caminibacter_meditatlanticus</i>	-----MKKVLSAGLS-----LAAISSLAFAPAN-----SLDSN	27
<i>Alteromonadaceae_bacterium_Bs12</i>	-----MIKRLG--LVF-----ALLCCSAG-----VYANV	22
<i>Thioflaviococcus_mobilis_8321</i>	-MKRS-LAIHLALA--LVV---PLATWFAGAAA-----SEPEPKQGRERL	38
<i>Oceanospirillum_beijerinchi_DSM7166</i>	-MANH-YQYIILVS--LIL---CIILGS---T-----S-TVLANDHSSS	34
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	-MLSE-EPVMMKRIL--LLI---GLIILPLSGFA-----DNHSDAAKPPQ	38
<i>Marinobacterium_litorale</i>	-----MFAAV---L---LLLSLPLQAQ-----NENV	20
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	-MNLRLPLLLLSCL--LTL---LIPSLGVSAT-----SEGI	29
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	-----MVSQNNNSNLRYAN	13
<i>Desulfobulbus_japonicus</i>	-MRLR-----TSGALTLS	12
<i>Helicobacter_cetorum</i>	-----MPKRLS--LVF-----LTLV-----SLHADTSKGGSNVNA	29
<i>Helicobacter_felis</i>	-MLAFKTKCCAFV--LVF-----GVA-----LGV--LNAHSQGGTID	34
<i>Helicobacter_suis</i>	-MRAS-S-KMHLA--LMF---MCLVGVASARSHTSNAHTSSAHTNSANTGGTID	49
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	-----MCAV-----IGSLSAHPKGGTID	21
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	-MRA-----SLAG--LLA-----FVFC-----LGWLGAPPK--GGTID	30
<i>Helicobacter_heilmannii</i>	-MRV-----SLAG--FLA-----FVLC-----LGWLSAHPPK--GGTID	30
<i>Arcobacter_nitrofigilis_DSM7299</i>	-----MLKRML--FIF-----LSFGVIAFAPAN-----V	21
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	-----MLKKLL--LSI-----FASSIMLFAAN-----V	21
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	-----MLKKLV--LAL-----TCFAAIAYADS-----V	21
<i>Campylobacter_fetus</i>	-----MLKKFI--LAL-----TCIAAIGFADS-----V	21
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	-----MLKKIV--LAL-----TCLVAFSFAES-----V	21
<i>Campylobacter_gracilis</i>	-----MLKKVA--ILI-----ACIASFAFAEMPAQHA-----NMSASDANVNS	37
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	-----MPKKVA--ILL-----ACITSFVFANA-----DTNKTSPP	28
<i>Campylobacter_concisus</i>	-----MPKKSLL--MLL-----ACLMSFGFAPAN-----MDANKSDA	28
<i>Campylobacter_curvus</i>	-----MPKKVA--ILL-----ACLVSPGFATG-----TDGNKTEA	28

HBM4

<i>Psychromonas_aquimarina</i>	NMLAEVVEGALTF-----HGESPAAVNGC	149
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	NFLAEVVEGALTM-----NGESPAAVNGC	168
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	NFLAEVVEGALTF-----HGKSSAAVNGC	166
<i>Thermosulfidibacter_takaii_ABI70S6</i>	IKLQEQYLEGGEFA-----GVPKGDPRTPVAPRRVAC	172
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	VKLRWRDLEGGVFA-----GMDPKSKLTTAPRQSGC	177
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	AKLMYHYEGGIFM-----GVPEGDPRTTASKRTGC	180
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	HKLMYHYEGGIFM-----GIPEGDPRTTASKRTGC	177
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	DKLIIHFEGEGEFI-----GIDRNDPQNRRASKEAGC	180
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	IGLMYHHEGAEFL-----GVEKGSAPNRRASRAGC	182
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	LKLMYYYEGAEFI-----GVKSGSPESMASRASGC	179
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	IKLMYYYEGAEFI-----GVKAGSGTSMASRASGC	178
<i>Geopsychrobacter_electrodiphilus_DSM16401</i>	TKLSYNYEGMGDDNPSLNHGT--DMGKGI--DPEFNLQDNPKLAAETVANTCVQCHGA	200
<i>Lebetimonas</i>	SKLAYNYENMKGKHPSLNNGYSAKKMAAGIRKDNSVFASQNNQNPQADLVANICVQCHGT	204
<i>Nautilia_profundicola</i>	TKLSYHYESLKGANQSYMV-NGKKMEKGIKIRTDGPFVQANEKSPRVADLVANICVQCHGT	202
<i>Caminibacter_meditlanticus</i>	TRLAYGYETLRGNHPKYLA-DGKTLTKGIRKDDKFFRANEKNRPLSDLSVANIICVQCHGT	202
<i>Alteromonadaceae_bacterium_Bs12</i>	HALTNIHEGRNHP-----ELQGAPEATGCMQCHGT	165
<i>Thioflaviococcus_mobilis_8321</i>	HALVHRHEGQAHP-----ELNNAPNETGCMQCHGT	181
<i>Oceanospirillum_beijerinchii_DSM7166</i>	HALVVRHEGRNHNK-----ELGNAPDEATGCMQCHGT	177
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	HALVKVHEGRNHNK-----EFGNAPDEATGCMQCHGT	181
<i>Marinobacterium_litorale</i>	HALVKFHEGRNNE-----ELGGAPGETGCMQCHGT	162
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	HALVRFHEGRNDP-----ELGNAPGETGCMQCHGT	172
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	Q-ALLAHEDMGMP-----QYKDAVLLTGCAQCHGS	156
<i>Desulfobulbus_japonicus</i>	KALMETHHEGGIE-----KFKNAADMTGCMQCHGS	161
<i>Helicobacter_cetorum</i>	RELMRMIEGRNHP-----DLQQAPEATGCIQCHGT	171
<i>Helicobacter_felis</i>	RDLMEMVEGRGHP-----DLKHAPPEATGCIQCHGS	176
<i>Helicobacter_suis</i>	RTLMIIEVEGRGHP-----DLGRAPSIITGCSQCHGT	191
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	RDLMLVEGRGHP-----DLGRAPPEATGCIQCHGS	163
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	RDLMLMVEGRNHP-----DLKHAPPAATGCIQCHGS	172
<i>Helicobacter_heilmannii</i>	RDLMMVMVEGRNHP-----DLKHAPPAATGCIQCHGS	172
<i>Arcobacter_nitrofigilis_DSM7299</i>	ISLMIEYFEGRNHP-----DLKHSPEATGCMQCHGS	165
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	QSLIHFHEGADNP-----HTKGSPEATGCMQCHGR	165
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	IDLMYHYEGRDHP-----DLKDSPAATGCIQCHGM	164
<i>Campylobacter_fetus</i>	VELMYHYEANGKP-----YENDAPFYAGNE---NLKDAPEATGCIQCHGM	176
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	VELMYHYEGNGKP-----YENDAPFHAGDE---NLKDAPEATGCIQCHGL	176
<i>Campylobacter_gracilis</i>	VDLMYHYEGRDIP-----DLKHAPDIITGCSQCHGS	180
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	VKLMYHYEGADHP-----EYKMSPEATGCMQCHGT	171
<i>Campylobacter_conciscus</i>	VKLMYHYEGMDHP-----EYKMAPDATGCIQCHGT	171
<i>Campylobacter_curvus</i>	VKLMYHYEGADHP-----DFKMAPDATGCIQCHGT	171

* * * * *

HBM5 D2 HBM6

<i>Psychromonas_aquimarina</i>	EVKVLPGNDLDP-TTWPNTGIGRINPDGSLGACTACHQRHEFSVEQARRPEACGKCHLGP	208
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	EVKVMENGDLLD-ATWPNTGIGRINPDGSGVACTACHQRHEFSVMQARRPEACGKCHLGP	227
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	EVKVLENGDDLD-TTWPNTGIGRINPDGSGVACTACHQRHEFSVMQARRPEACGKCHLGP	225
<i>Thermosulfidibacter_takaii_ABI70S6</i>	KVKLGPDPNKPLS-DGWPG-GIGTRYPDGSGVACTACHQRHEFSVEQARRPEACGKCHLGP	230
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	EVKLGPDNPKPTK-DSWPG-GIGHRYPDGGIGNCVVCHNRHKSVAEARKPEACGKCHLGP	235
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	KIELGPDNPKPLP-GTWPS-GIGQRYPDGSGAGNCAVCHTRHKFSVAEARKPTACDKCHIGP	238
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	KIELGPDNPKIR-GTWPS-GIGQRYPDGSGAGNCSACHTRHKFSVAEARKPTACDKCHIGP	235
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	KVELGVDHKKPIN-GTWP-AGVTRYPDGSGVGNCTVCHTRHQFVAEARKPEACASCHLGP	238
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	QVELGPDHKKPIN-DTWP-AGVTRYPDGSGVGNCTVCHTRHQFVAEARKPEACASCHLGP	240
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	QVELGPDNPKIN-NTWP-AGVTRYPDGSGVGNCTVCHTRHKFSIEEARKPEACASCHLGP	237
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	QVELGPDNPKIN-NTWP-AGVTRYPDGSGVGNCTVCHTRHMFSAEARKPEACASCHLGP	236
<i>Geopsychrobacter_electrodiphilus_DSM16401</i>	VITLQOQGVNS-EVWPNMGMSNYPDGGISNCTACHSRHKFSAAEARQPAACASCHLGP	259
<i>Lebetimonas</i>	TVKLDQGRPDA-ATWPSDGIATLYPDGGVGNCLACHSRHKFSAAEARQPAACASCHLGP	263
<i>Nautilia_profundicola</i>	TIKLDKNRPPDA-TTWPNDGIAALYPDGGVSNCLACHSRHKFSAAEARQPAACASCHLGP	261
<i>Caminibacter_meditlanticus</i>	IKLDKNGRPPDA-ATWPNNDGIAALYPDGGVGNCLACHSRHKFSAAEARQPAACASCHLGP	261
<i>Alteromonadaceae_bacterium_Bs12</i>	KLLLDENNRPTV-ETWPNNGMNVYPDGSGTACTACHSRHKFSIAEARKPSACASCHLGP	224
<i>Thioflaviococcus_mobilis_8321</i>	EIALDADGRPTA-ETWPNNSGIGNIYPDGSGTACTACHTRHRFSIAEARKPYACASCHLGP	240
<i>Oceanospirillum_beijerinchii_DSM7166</i>	KIKLDEKGLDLP-TTWPNMGMNIYPDGSGTACTACHTRHKFSIAEARKPAACASCHLGP	236
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	KIKLLADGTPDP-STWPNAGMNIYPDGSGTACTACHTRHKFSIAEARKPAACASCHLGP	240
<i>Marinobacterium_litorale</i>	ELALNEDGTPDP-TTWPNSGMNIYPDGSGTACTACHTRHKFSLEEARQPAACASCHLGP	221
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	EIKLLEGGKPPD-STWPNNSGMNIYPDGSGTACTACHTRHRFSIAEARKPAACASCHLGP	231
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	IKKMGPNHEPTQ-GTWPESHGIGNVYPDGSGVGNCAVCHTRHQSIAEARKPSACATCHLGP	215
<i>Desulfobulbus_japonicus</i>	VVTLGADNRPNK-EGWPAAGIGTYPDGSGVGNCTVCHTRHRFNLAEARKPAACASCHLGP	220
<i>Helicobacter_cetorum</i>	VIKLDPNRRPT-ETWPTYGIGTAFPDGSGVGNCAVCHSAHKFSVAEARKPAACASCHMGP	230
<i>Helicobacter_felis</i>	IKLDPNRRPT-ETWPTYGIGTAFPDGSGVGNCAVCHSAHKFSVAEARKPAACASCHLGP	235
<i>Helicobacter_suis</i>	IKLDPNRRPT-ETWPTYGIGTAFPDGSLGNCAVCHSAHKFSVAEARKPAACASCHLGP	250
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	IKLDPNRRPT-ETWPTYGIGTAFPDGSLGNCAVCHSAHKFSVAEARKPAACASCHLGP	222
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	IIQLNKNRPT-ETWPTYGIGTAFPDGSGVGNCAVCHSAHKFSVAEARKPAACASCHLGP	231
<i>Helicobacter_heilmannii</i>	IIQLNKNRPT-ETWPTYGIGTAFPDGSGVGNCAVCHSAHKFSVAEARKPAACASCHLGP	231
<i>Arcobacter_nitrofigilis_DSM7299</i>	IIKLDKGRPTA-ETWPNYIGNVYPDGSGVGNCAVCHSGHKFSIAEARKPAACASCHLGP	224
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	VVELDSNKRPT-ETWPAQMGTYPDGSGVGNCAVCHTRHKFSIEEARKPAACASCHLGP	224
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	EIKLDEKGYVPGKWPNYGIGNAYPDGSGVGNCAVCHSSHTFDMTEARKPTACASCHLGP	224
<i>Campylobacter_fetus</i>	EIKLDEKGYPLPGKWPNYGIGNAYPDGSGVGNCAVCHSSHKFSIAEARKPAACASCHLGP	236
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	EIKLDEKGYPLPGKWPNYGIGNAYPDGSGVGNCAVCHSSHTFDMTEARKPAACASCHLGP	236
<i>Campylobacter_gracilis</i>	VVKMDEHNKPTK-ETWPTYGIGTYPDGSGVGNCAVCHSGHKFSIAEARKPAACASCHLGP	239
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	IKLADADKPT-ETWPTYGIGTYPDGGIGGCKSCHSSHTFSIAEARKPAACASCHLGP	230
<i>Campylobacter_conciscus</i>	VIKLADADKPTK-ETWPNYIGNVYPDGSGVGNCAVCHSAHFSIAEARKPAACASCHLGP	230
<i>Campylobacter_curvus</i>	VIKLADADKPTK-ETWPNYIGNVYPDGGIGGCKSCHSSHTFNAEARKPAACASCHLGP	230

: : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *



	AA	D8	HBM7	
<i>Psychromonas_aquimarina</i>	DHPQKEVYEEESKH	GINFYANVD--RMNLD--SAKWI	PGEDYDAAPT	CATCHMS-ATRELAL 264
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	DHPQKEIYEEESKH	GINFFANVD--RMNLD--SGKWI	VGEDYDAAPT	CATCHMS-ATRELP 283
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	DHPQKEVYEEESKH	GINFFAHVD--KMNMD--SAKVVV	GEDYDAAPT	CATCHMS-ATRELPV 281
<i>Thermosulfidibacter_takaii</i> ABI70S6	DHPDIEIYLESAG	QGLYLAHGE--KWRWDSAPD	TWEPG--DYE--APTCAVCHMS-GIGDLKT 286	
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	DHPNIEIYYESAH	QQRYLTEGE--EWWKWDAPDAWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELAT 291		
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	DHPNVEIYLGSOH	GKRYHAEGN--KWKWDSAPDAWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELAT 294		
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	DHPNVEIYLGSOH	GKRYHAEGH--KWKWDSAPDAWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELAT 291		
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	DHPNIEIYMEESKH	QQIYQAQGE--DWEWDSAPDAWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELAT 294		
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	DHPQIEIYEEESKH	QQIYKAHSE--KWNFEAAPDTWEPG--DYD--APTCAVCHMS-GIGELTT 296		
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	DHPDIEIYLESKH	QQRYLTHGE--EWRWDSAPDAWEPG--DYD--APTCAVCHMS-GIGELST 293		
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	DHPQAEIYEEESKH	QQIFAAHGE--DWKWDAPDTPWEPG--DYD--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Geopsychrobacter_electrodiphilus</i> DSM16401	DHPDIEIYEEESKH	QQIYKAHSE--KWNFEAAPDTWEPG--DYD--APTCAVCHMS-GIGELTT 296		
<i>Lebetimonas</i>	DHPDKEIYEEESKH	GHIFDTNEK--DYNFE--TGKQIPGKTLR--AATCFTCHMS-GINGLKA 318		
<i>Nautilia_profundicola</i>	DHPMKEVFEESVH	GHIIFETNEE--DYKFD--TGEQIPGKTVR--AGTCFTCHQA-AIGGLKS 316		
<i>Caminibacter_meditatlanticus</i>	DHPDKEIYEEESKH	GHIFDTNEE--DYNFK--TGEQIPGKTLR--AATCFTCHMS-GINGLKA 316		
<i>Alteromonadaceae_bacterium</i> Bs12	DHPNIEIFNNSKH	GHIIFNTDSA--DWRWDTAPDAWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELTV 280		
<i>Thioflaviooccus_mobilis</i> 8321	DHPDIEIFENSKH	GQLYEAERH--AWTWDAPDAWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELTV 296		
<i>Oceanospirillum_beijerinchii</i> DSM7166	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Marinobacterium_litorale</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Desulfobulbus_japonicus</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Helicobacter_cetorum</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Helicobacter_felis</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Helicobacter_suis</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Helicobacter_heilmannii</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Arcobacter_nitrofigilis</i> DSM7299	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Campylobacter_fetus</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Campylobacter_gracilis</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Campylobacter_conciscus</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		
<i>Campylobacter_curvus</i>	DHPDIEIYNNSMH	GHIIFNADGY--NWKWDSAPDTPWEPG--DYS--APTCAVCHMS-GIGELST 292		

*** * : * * * : * * * * : .

	D5	
<i>Psychromonas_aquimarina</i>	THDVGDRI	SWTLRPAISEKIDAKSL-----AAGKEVKSWEA 300
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	THDVGDRI	SWTLRPAISEKIDAKAI-----ASGQETKSWQA 319
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	THDVGNRI	SWTLRPAISEKIDAKDK-----ASGKETKSWQD 317
<i>Thermosulfidibacter_takaii</i> ABI70S6	THNVGERL	LHLDLHMKKSEVRGTPEYL-----KKFPAGPERGNGVK 326
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	THNVTERL	KWDLVHKKSVIRS-----GERGDGER 320
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	THNVAERL	KWRLYSPISDIRK-----GARGDGMK 323
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	THNVAERL	KWRLYPPISDIRK-----GARGDGMK 320
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	THNINERL	KYDLVHKKSVIRS-----GERGDGK 323
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	THNVAERL	KWDLVHARSELRK-----NDRNGGME 325
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	THNVNERL	KWDLHMKKSVIRS-----GERGDGK 322
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	SHNVNERL	KWDLHMKKSVIRS-----GERGDGK 321
<i>Geopsychrobacter_electrodiphilus</i> DSM16401	THNISTKL	KWNLWAPKSFKRTEGDETAGWDWYKD-----KKLSRGNPKAGNPKG-PEA 366
<i>Lebetimonas</i>	THNVSLRL	KWNLWAPKFLRTKGAETAGWAFWSHGKIIIPGKTIILRGNPKAGNPQG-PEA 377
<i>Nautilia_profundicola</i>	THNVSLRL	KWNLWAPKSFRLRTGGYETAGWAFWKGKGINP-DTVIRGNKAGNPQG-PEA 374
<i>Caminibacter_meditatlanticus</i>	THNVSLRL	KWNLWAPKSFRLRTGGNETAGWAFWNGGKVTETNVTIRGNPKAGNPNG-PEA 374
<i>Alteromonadaceae_bacterium</i> Bs12	THNVSERL	YWNLWAKESKVRGSDVDL-----SPLLDGPA 315
<i>Thioflaviooccus_mobilis</i> 8321	THDVTERL	YWNLWAKESQVRNSNDVL-----SPLLDGPA 331
<i>Oceanospirillum_beijerinchii</i> DSM7166	THNINERL	YWNLWAKESKVRNSTDVM-----SPLLDGPE 327
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	THNITERL	FYNLWAKESKVRNSTDVM-----SPLLDGPE 331
<i>Marinobacterium_litorale</i>	THNVSERL	YWNLWAKRSEMRNSTDVL-----SPLLDGFP 312
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	THNISQRL	YWNLWAKRSEMRNSTDVL-----SPLLDGFP 322
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	THNIDMRL	KWNLWAPISKERTGGYETAAFEYMKT-----GKFTAGNPLAGNPKG-PQE 324
<i>Desulfobulbus_japonicus</i>	THNISERL	KWNLWAKRNSIRNSSDPL-----SMLTGDGK 311
<i>Helicobacter_cetorum</i>	THNVSRRL	KWNLWAPRSELRTGGLETAAKDWANG-----FKITKGNILAGNPKG-VEA 338
<i>Helicobacter_felis</i>	THNVSRRL	KWNLWAPLSQLRTGGYETASDAYRDN-----YQITKGNPLAGNPKG-PDA 343
<i>Helicobacter_suis</i>	THNVSRRL	KWNLWAPLSQLRTGGYETASDAFKYD-----NKITVGNPLAGNPKG-PEA 358
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	THNVSRRL	KWNLWAPLSELRRTGGYETASDAFKFE-----NKITVGNPLAGNPKG-PEA 330
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	THNVSRRL	KWNLWAPLSELRRTGGYETASDDYKYE-----NKITVGNPLAGNPKG-PEA 339
<i>Helicobacter_heilmannii</i>	THNVSRRL	KWNLWAPLSELRRTGGYETASDDYKYE-----NKITVGNPLAGNPKG-PEA 339
<i>Arcobacter_nitrofigilis</i> DSM7299	THNVSRRL	KWNLWAPLSELRRTGGYETAVKDF-EN-----GKISIGTPLAGNPKG-SAV 331
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	THNISRRL	KWNLWAPKSNLRDGGFDNAVKNVKEE-----GKFTKGNPLAGNPKG-HKA 332
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	THNVSLRL	KWNLWAPHSKQRTGGFETAAFEYAKS-----GKMTAGNPLAGNPKG-PEA 332
<i>Campylobacter_fetus</i>	THNVSLRL	KWNLWAPHSNLRRTGGYDTAAETYAKE-----GKISIGTPLAGNPKG-PEA 344
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	THNVSLRL	KWNLWAPHSNLRRTGGYETAADVYAKE-----GKIVTGNPLAGNPKG-PEA 345
<i>Campylobacter_gracilis</i>	THNVSRRL	KWNLWAPKSNLRRTGGNETAVSEFLNT-----GKLVNPLAGNPKG-PEA 348
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	THNVSRRL	KWNLWAPRNSVRTGGNDKAVDEYRKT-----GKISVGTPLAGNPKG-PGPEQ 339
<i>Campylobacter_conciscus</i>	THNVSRRL	KWNLWAPSSKLRRTAGDEQAVTIYEKT-----GKLVNPLAGNPKG-PGPEK 339
<i>Campylobacter_curvus</i>	THNVSRRL	KWNLWAPRSELRTKGYEQAAAYDYWKT-----GKLVNPLAGNPKG-PEA 338

: * : : : *

HBM8

Psychromonas_aquimarina 359
Aliagarivorans_marinus 378
Photobacterium_ganghwense 376
Thermosulfidibacter_takaii_ABI70S6 384
Thermodesulfatator_atlanticus 378
Thermodesulfatator_indicus 381
Thermodesulfatator_sp._S606 378
Pelobacter_seleniigenes 381
Desulfovibrio_piezophilus 383
Desulfovibrio_frigidus 381
Desulfovibrio_hydrothermalis 380
Geopsychrobacter_electrodiphilus_DSM16401 424
Lebetimonas 435
Nautilia_profundicola 432
Caminibacter_meditatlanticus 432
Alteromonadaceae_bacterium_Bs12 374
Thioflaviococcus_mobilis_8321 390
Oceanospirillum_beijerinchii_DSM7166 386
Neptuniibacter_caesariensis 390
Marinobacterium_litorale 371
Marinobacterium_stanieri 381
Desulfurella_acetivorans 382
Desulfobulbus_japonicus 370
Helicobacter_cetorum 396
Helicobacter_felis 401
Helicobacter_suis 416
Helicobacter_bizzozeronii 388
Helicobacter_ailurogastricus 397
Helicobacter_heilmannii 397
Arcobacter_nitrofigilis_DSM7299 389
Arcobacter_anaerophilus 391
Campylobacter_hyointestinalis 390
Campylobacter_fetus 402
Campylobacter_iguaniorum 403
Campylobacter_gracilis 406
Campylobacter_mucosalis 397
Campylobacter_conciscus 397
Campylobacter_curvus 396

* * * * * : * : * : * : *

A A D7 Y

Psychromonas_aquimarina 419
Aliagarivorans_marinus 438
Photobacterium_ganghwense 436
Thermosulfidibacter_takaii_ABI70S6 439
Thermodesulfatator_atlanticus 433
Thermodesulfatator_indicus 436
Thermodesulfatator_sp._S606 433
Pelobacter_seleniigenes 436
Desulfovibrio_piezophilus 438
Desulfovibrio_frigidus 436
Desulfovibrio_hydrothermalis 435
Geopsychrobacter_electrodiphilus_DSM16401 479
Lebetimonas 490
Nautilia_profundicola 487
Caminibacter_meditatlanticus 487
Alteromonadaceae_bacterium_Bs12 429
Thioflaviococcus_mobilis_8321 445
Oceanospirillum_beijerinchii_DSM7166 441
Neptuniibacter_caesariensis 445
Marinobacterium_litorale 426
Marinobacterium_stanieri 436
Desulfurella_acetivorans 437
Desulfobulbus_japonicus 425
Helicobacter_cetorum 451
Helicobacter_felis 456
Helicobacter_suis 471
Helicobacter_bizzozeronii 443
Helicobacter_ailurogastricus 452
Helicobacter_heilmannii 452
Arcobacter_nitrofigilis_DSM7299 444
Arcobacter_anaerophilus 446
Campylobacter_hyointestinalis 445
Campylobacter_fetus 457
Campylobacter_iguaniorum 458
Campylobacter_gracilis 461
Campylobacter_mucosalis 452
Campylobacter_conciscus 452
Campylobacter_curvus 451

: : * * * * * . * . * : * * : * : :

<i>Psychromonas_aquimarina</i>	GKKEQAEAGRKMLEEVL	RPEHAWFTGKEPEEVKAARKKAQKEFQRRYLQ----	469
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	GNVEGAERARAVLDEIL	ARPEHAWFSGNEPEEVKAARKEAQAQAFKARYVEDNKSH	493
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	GKTDSATRARAVLDEIL	NRPEHAWFTGNEPENVKARKEAQDAFKDRYLNSK--	489
<i>Thermosulfidibacter_takaii</i> ABI70S6	NKIEELSHVMS-SA-PY-	-----	454
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	GKIEELSPVMS-SA-PY-	-----	448
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	GKIEELSPVMS-TG-PY-	-----	451
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	GKIEELSPVMS-TA-PY-	-----	448
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	GKIEEISTVMS-TG-PI-	-----	451
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	GQIEELSTVMS-TA-PD-	-----	453
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	GKIEELSHVMS-TG-PL-	-----	451
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	GKIEELSHVMS-TG-PL-	-----	450
<i>Geopsychrobacter_electrodiphilus</i> DSM16401	LAKYKDPKKVFEEVPM	MAPHD-----	502
<i>Lebetimonas</i>	LKKYGNAKKVLENEPP	MPVVTHE-----	513
<i>Nautilia_profundicola</i>	LKKYGDPPKALANEV	MPVVTHE-----	510
<i>Caminibacter_meditlanticus</i>	LKKYKDPKKVLENEPP	MPVVTHE-----	510
Alteromonadaceae_bacterium_Bs12	NTIEE-----	-----	434
<i>Thioflaviococcus_mobilis</i> 8321	GTIE-----	-----	449
<i>Oceanospirillum_beijerinchii</i> DSM7166	GKIED-----	-----	446
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	GKIEE-----	-----	450
<i>Marinobacterium_litorale</i>	GEIELRE-----	-----	433
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	GEIED-----	-----	441
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	RKIDPNQIGVGMGE-	-----	452
<i>Desulfobulbus_japonicus</i>	GKIE-----	-----	429
<i>Helicobacter_cetorum</i>	GKIED-----	-----	456
<i>Helicobacter_felis</i>	NQIED-----	-----	461
<i>Helicobacter_suis</i>	NQIED-----	-----	476
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	NKIED-----	-----	448
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	NQIED-----	-----	457
<i>Helicobacter_heilmannii</i>	NKIED-----	-----	457
<i>Arcobacter_nitrofigilis</i> DSM7299	GKIEE-----	-----	449
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	GKID-----	-----	450
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	GKIE-----	-----	449
<i>Campylobacter_fetus</i>	GKIE-----	-----	461
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	GKIEE-----	-----	463
<i>Campylobacter_gracilis</i>	GKIEE-----	-----	466
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	GKIH-----	-----	456
<i>Campylobacter_concisus</i>	GKVE-----	-----	456
<i>Campylobacter_curvus</i>	GKAH-----	-----	455

7.2 Alignment der HaoB-Proteinsequenzen

Sequenzvergleich von *W. succinogenes* NrFH mit ausgewählten HaoB-Proteinen. Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal Omega (Version 1.2.3) erstellt und manuell bearbeitet, wobei die einzelnen Aminosäuren im Einbuchstabencode dargestellt wurden. Die Häm-bindemotive 1-4 (CXXCH) sowie mögliche axiale Häm ϵ -Eisenliganden wurden innerhalb des Alignments hervorgehoben. Die Häm-bindemotive (HBM1-4) wurden grau hinterlegt. Die Buchstaben "P" und "D" bezeichnen konservierte vermeintliche proximale und distale Liganden. Die dazugehörigen Nummerierungen bezeichnen die entsprechenden ligandierten Häm-Gruppen. Aminosäuren, welche mit dem Buchstaben "A" hervorgehoben wurden, sind in der Kristallstruktur von *Desulfovibrio vulgaris* NrFH im aktiven Zentrum gelegen. Die Funktion des distalen Häm ϵ -Eisenliganden "D4" wird im Fall *D. vulgaris* NrFH von einem Lysinrest des NrFA Proteins übernommen. Dieses Lysin ist in ϵ Hao/HaoA Proteinen jedoch nicht konserviert. An der Position "D1/A" befindet sich in *D. vulgaris* NrFH die Aminosäure Aspartat. Dieses Aspartat ist jedoch zu weit von Häm 1 entfernt, um als "richtiger" distaler Ligand zu fungieren. Organismen, deren HaoA-Proteine in dieser Arbeit untersucht wurden, sind gelb hervorgehoben.

<i>Psychromonas aquimarina</i>	-----MPKDALNRKQKLWRLKKPWLGLPVLGFLVLAAFMLVAGSFQVMM	46
<i>Aliagarivorans marinus</i>	----MGESQSKFKKLFKFKLWGWLKRPLLGIPIGIYCI----VLGASFGQAM	51
<i>Photobacterium ganghwense</i>	----MG-----EPRSRTKKFWRWLKPLLLGIPIGIVLV----VIGLVGFQGM	41
<i>Wolinella succinogenes NrFH</i>	-----MNMK--SKFLVYSSLVVFVFAIALGLFLV----YLVN-ASKALS	33
<i>Nautilia profundicola</i>	-----MCKATLG-ALIAGAIIGLGI----SYVA---AVLV	27
<i>Lebetimonas</i> sp. JH292	-----MCKTTLG-ALIIGAIIGLGI----SYFA---AVMV	27
<i>Caminiibacter mediatlanticus</i>	-----MCKATLG-ALIAGAVIGLGI----SYVT---AIMV	27
<i>Thermosulfidibacter takaii</i>	-----MKKTFV-GFVVGFIILAGIV----ALVS---ASKI	26
<i>Thermodesulfatator atlanticus</i>	-----MEKSGIIL-GLIVGIVVAGVF----SLIT---ASKI	28
<i>Thermodesulfatator indicus</i>	-----MNXSSLIL-GIIVGIVVAAFV----SLIA---ASKI	28
<i>Thermodesulfatator</i> sp. S606	-----MNXGGLIL-GIIVGIVVAGLV----SLVT---ASKM	28
<i>Desulfovibrio piezophilus</i>	-----MA-----DSEKRHSRKLKLP-GVLIGVVLAVSV----ILAS---GYMI	34
<i>Pelobacter seleniigenes</i>	----MSETP-G-----SRKSRWSSAWLV-GVLVGVAGVLA----VLAS---GYMI	38
<i>Desulfovibrio frigidus</i>	----MPDNPVK-----KGGSGFSRKRWRW-GVATGLLVAVVT----VLAS---GFMI	39
<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i>	----MPGNPKK-----TGKSGFSRKRWRW-GVVSGLLIAVIT----VLAS---GYMV	39
<i>Marinobacterium litorale</i>	-----MLKAVK-ILLIILGLLGLAT----VLAWGVTDKAL	29
<i>Marinobacterium stanieri</i>	-----MFWIK-ALLIILALLGGSS----LLAWALTDKAL	28
<i>Oceanospirillum beijerinckii</i>	-----MKW---TL-LLSTLALII----IAGWATTDYAL	25
<i>Neptuniibacter caesariensis</i>	-----MFRQ-----ERKKSRLRLRFW---LLIILGLVLAIA----TISWIVVDKAL	39
<i>Thioflaviococcus mobilis</i>	-----MRK--TALILLS-ILVAAPLV--A-----VAGWVAEHLF	30
<i>Campylobacter gracilis</i>	-----MK--KKTLL-VL-LVGACVLIGMIL----SLGI---AEMV	28
<i>Campylobacter mucosalis</i>	-----MSSSK--KKIFAWS-SVIGIIVGLIA----SMGV---ADVL	32
<i>Campylobacter curvus</i>	-----MANAK--KFFVWS-SVLIGIVIGLIA----SMGV---ADAL	32
<i>Campylobacter concisus</i>	-----MAEVK--KFFVWS-SVIGIIVIGLIA----SMGI---ADAL	32
<i>Alteromonadaceae bacterium Bs12</i>	-----MT---YQKLIK-FSIIIGSALGLFM----LSWALVDTVI	31
<i>Campylobacter iguaniorum</i>	-----MRK--TKLFTFI-ILVIGGIVGLVF----ALGI---AQFF	30
<i>Campylobacter fetus</i>	-----MRK--TKLFTIA-IFIIGGLVGLVF----ALGI---AQFM	30
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	-----MRK--TKLFTIV-IFVIGGLVGLGF----ALGI---AQFM	30
<i>Helicobacter cetorum</i>	-----MTLK---ELIRK--NRYLVLL-IFVLGGIVGMVF----SLIS---AEFI	36
<i>Helicobacter felis</i>	-----MGVV---ETLKN--KRHFLFW-IFLGGCVVGVFL----SVLT---VQAV	36
<i>Helicobacter bizzozeronii</i>	-----M-----M-DLCGGCVLGVVL----SILT---VQAV	21
<i>Helicobacter suis</i>	-----MGVL---LALKE--GRFFLFW-LFVGGCVLGVVL----SILT---VQAV	36
<i>Helicobacter ailurogastricus</i>	-----MGFL---RALQG--KRFVLFW-LFCAGCVLGVVL----TVFT---VQAV	36
<i>Helicobacter heilmanii</i>	-----MGFL---RALRE--KRFVLFW-LFCGGCVLGVVL----TVFT---VQAV	36
<i>Desulfurella acetivorans</i>	MIRCLKNCNFVVF---MQNQT--RPLKAIIV-IAIIGIVIGVLL----SFAT---YIGV	45
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	----MSCNTEKK-----IK--SLWFIIG-IFVLGGIIGLLF----SPGV---AVGV	37
<i>Arcobacter anaerophilus</i>	----ME-KIKKS-----KS--KVIVPLS-LVLVGLIVGLII----SPGS---SVGV	36

	HBM1	P1	D3	HBM2	A	
<i>Psychromonas_aquimarina</i>	KVTNANEFCYSCHIGMDTIVEEYQASVHFQKTENGEVRAGCADCHVPREFV-DKLVK				ITK	105
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	VASNHNFCFSCHLSMTIIVQEYKASPHFISD--DNVPATCADCHVPHDYV-AKLKVKIA					108
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	VASNMFACFSCHLKMOTIVQEYKASPHYVSD--DKVLATCADCHVPHEFT-DKMKVKIA					98
<i>Wolinella_succinogenes_NrfH</i>	YLSDDPKACINCHV-MNPQYATWQHSSHAE-----RA-SQVECHLPTGNMVQKYISKAR					85
<i>Nautilia_profundicola</i>	DVTGKPNFCASCHT-MKPMVESFHEVHGNNPQGFVAVHHTDCHLCPKNSLIGYLIARGI					86
<i>Lebetimonas_sp._JH292</i>	DVTGTPQFCASCH-MKPEVSSFEFVHGNNPHGFSAHHTDCHLHDSLSMLYLTIKGI					86
<i>Caminibacter_mediatlanticus</i>	DKTSTPEFCASCHT-MKPMVDSFKFVHGNNPQGFVAVHHTDCHLPHNSLIGYLIARGI					86
<i>Thermosulfidibacter_takaii</i>	IETNRVFCASCH-MKVFHETWANAAGHNLHNRGVIRA-KQSDCHLPHGLLKYLVTKK					84
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	VATNKPAFCASCHP-MKIFHETWQASVHGPAVKGAAGA-KQADCHLPHDGFMMNYLITKAK					86
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	VSSNEVFCASCHP-MKTFYETWEASVHGPAQKGAAGA-KQADCHLPHDGFMMNYLITKAK					86
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	VESNKVEFCASCHP-MKTFHETWKLVSHPGPNQKGAAGA-KQADCHLPHDGFMMNYLITKAK					86
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	QATNTDVFVCSCHV-MKPFRTAWRNETHGGNNDKGLEA-QQVDCCHLPHGGFVEYVATKAY					92
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	DATNTDKFCGCSCHM-MEFPKQSQWASVHGGMNPKGFAA-QQVDCCHLPHGSPVDYLTTKAR					96
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	DTNTDVFVFCQTCHE-MKPFRTASWQSVHGGMNPKGFAA-QQVDCCHLPHGSPVDYLTTKAR					97
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	DVTNTDIFCGTCHA-MKPFRTASWQSVHGGMNPKGFAA-QQVDCCHLPHGSPVDYLTTKAR					97
<i>Marinobacterium_litorale</i>	HITSDAFCGCSCHS-MVPMQISFLNSSHGGRRSTTGVEV-LQTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					87
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	HLTSGQAFVCSCHS-MKPMQASFLRDPHGGRRSTTGVEV-LQTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					86
<i>Oceanospirillum_beijeerinckii</i>	HKTSDAFCGCSCHS-MKPMQASFLRDPHGGRRSTTGVEV-LQTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					83
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	HVTSDHQFCGCSCHS-MKPMQASFLRDPHGGRRSTTGVEV-LQTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					97
<i>Thioflaviococcus_mobilis</i>	RATSGEAFCTTCHT-MEFPFAAAYRRDLHGGRRNPAGVAA-ROTDCHLPHSDPLGYLIARAK					88
<i>Campylobacter_gracilis</i>	HLTGTDFKFCVCSCHT-MQPMANAFHNDVHGNNPQGFVAVHHTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					86
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	HATGSGYCTCTMCHT-MQPMANAFHNDVHGNNPQGFVAVHHTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					90
<i>Campylobacter_curvus</i>	HATGSGYCTCTMCHT-MQPMANAFHNDVHGNNPQGFVAVHHTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					90
<i>Campylobacter_concisus</i>	HATGSGYCTCTMCHT-MQPMANAFHNDVHGNNPQGFVAVHHTDCHLPHDSTVNYLYMKAR					90
<i>Alteromonadaceae_bacterium_Bs12</i>	HTTGDFEFCGCSCHS-HKPIGTYSREDLHGGNNTTGWRA-SQSDCHLPHDSTVNYLYMKAR					89
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	YVTGGEKFCMCHV-MEPMGNAYKDDVHGNNKVGFKA-EQVSDCHLPHDSTVNYLYMKAR					88
<i>Campylobacter_fetus</i>	YVTGGEKFCMCHV-MEPMGNAYKDDVHGNNKVGFKA-EQVSDCHLPHDSTVNYLYMKAR					88
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	YVTGGEKFCMCHV-MEPMGNAYKDDVHGNNKVGFKA-EQVSDCHLPHDSTVNYLYMKAR					88
<i>Helicobacter_cetorum</i>	EKTADDKFCGCSCHI-MQPEVKAFQDSHGNNKVGFKA-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					94
<i>Helicobacter_felis</i>	EWTADDKFCGCSCHI-MQPEVKAFQDSHGNNKVGFKA-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					94
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	EWTGDDKFCGCSCHI-MQPEVKAFQDSHGNNKVGFKA-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					79
<i>Helicobacter_suis</i>	EWTGDDKFCGCSCHI-MQPEVKAFQDSHGNNKVGFKA-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					94
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	EWTGDDKFCGCSCHI-MQPEVKAFQDSHGNNKVGFKA-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					94
<i>Helicobacter_heilmanni</i>	EWTGDDKFCGCSCHI-MQPEVKAFQDSHGNNKVGFKA-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					94
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	EKTAGENFCASCHS-MQPMVQSYTLDVHGNNQFGFKV-QQTDCHLPHNSLANYLFTKAK					103
<i>Arcobacter_nitrofigilis</i>	EKTSDDKFCMCHT-MQPMANSYRDAHGNNINGVRA-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					95
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	KHTSDKNYCASCHT-MQPVVDSYKMDIHGGAGEHGIEV-KQVDCCHLPHDSTVNYLYMKAR					94

: * ** : * * ** :

	A D1/A	HBM3	
<i>Psychromonas_aquimarina</i>	A-TADIWYMITGKIN-MHNFEDER--PRMAEHVWDMVANDSRNCRYCHESSLLSEERP		161
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	A-TADIYHMLKGTIT-KENFEEHR--PRLAQEVWDMVADDSANCRHCHQGDNFDLATQP		164
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	A-TADIYHMMKGTIT-KENFEEHR--PRLARIVWEDMKASDSGTRCHCHSGENFDLSKQP		154
<i>Wolinella_succinogenes_NrfH</i>	DGWNHSAVFTLGTYS----DHSMKI--SEDGARRVQ-----ENCISCHASLSSTL-LEN		131
<i>Nautilia_profundicola</i>	SGTKDALSQFGIIS--RVDFKENF--WEMKHVYVD-----SACLOCHHMVKEPE--GIP		131
<i>Lebetimonas_sp._JH292</i>	SGTRDAMAHIGLIK--RVDFKENF--CEMDHYVVD-----NACLHCHKIGIEELK-DKN		134
<i>Caminibacter_mediatlanticus</i>	SGTRDALAEFGI IK--KVDFKDNF--WEMDKYVVD-----SGCLKCHKIGIKKL-DKN		134
<i>Thermosulfidibacter_takaii</i>	AGLSDYYAHMNTKASLKEWLEELKKNVRRPVAYE-----SGCRECHKELIGN--GIP		135
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	AGLNDYIANMQGKQEPQYWLDRWAKQGLNHVYE-----SSCRNCHKELVAP--GIP		137
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	AGLNDYLANMQGKSTPQYWLDRWAKQADKHVYE-----SSCRKCHKELVAP--GIP		137
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	AGLNDYLANMQGKSTPQYWLDRWAKQADKHVYE-----SSCRKCHKELVAP--GIP		137
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	TGTRDIIMNMIIDPS-TYDWAGRA--KRRRGTFTD-----NACRCKHVNLEPE--GMR		140
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	TGIYDVAQSVRI DAA-AFDWKGNAE-RHRLEFTFD-----NACHRCHKNLPP--GLP		145
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	TGTSDVIIHHTFNPS-EFDWAENAE-KNRLKFTYD-----SACRCHKVLEPE--GVK		146
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	TGTHDVMNLLI DPA-EFDWAENAE-KNRLKFTYD-----NACHRCHKVLEPE--GVK		146
<i>Marinobacterium_litorale</i>	NGAWDVWKEFVIGAD-DVDWHAKR--ERAHEVYVE-----SGCLKCHNGLERGS-ESN		136
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	NGAWDVWKEFVLGAE-DVDWHAKR--ARANEFVYD-----SGCLKCHNGLQGS-ELD		135
<i>Oceanospirillum_beijeerinckii</i>	NGAWDVWKEFVLGAG-DVDWHAKR--AEANRYTYD-----SGCLKCHNGLI SAS-ELN		132
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	NGAWDVYKEHILGAD-DVDWHAKR--LQADRYTYD-----SGCLKCHNGLQAS-EIS		146
<i>Thioflaviococcus_mobilis</i>	FGLHDLWAQLTHLDD-GIDWQSR--AAREDYVFD-----SGCLTCHSALAEV--RGD		136
<i>Campylobacter_gracilis</i>	TSANDVYKTFVTDAD-KIDWQEK--KERNHFVYE-----SGCLSCHRNLKEQN-NQV		135
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	VSINDGYKTFVTDAD-KIDWRKR--EHRSHVYVD-----SGCMTCHSNLKD--IQS		138
<i>Campylobacter_curvus</i>	VSINDGYKTFVTDAD-KIDWRKR--EHASHFVYD-----SGCLTCHSNLKNV--IQA		138
<i>Campylobacter_concisus</i>	VSINDGYKTFVTDAD-KIDWRKR--EHASHFVYD-----SGCLTCHSNLKNV--IQA		138
<i>Alteromonadaceae_bacterium_Bs12</i>	HGIVDPTMEILKDPD-DIDWHGNR--LNRERYVYD-----SGCLQCHKYLSSTTS-EAN		138
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	NGIVEGLTLFGNPE-KYDQARR--KEAKRYVYD-----DGCLHCHTLKKS-SDN		137
<i>Campylobacter_fetus</i>	NGMVEGATILFGSPE-KFDWETRR--KESKRYVYD-----SGCMHCHGDIKNVS-SQN		137
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	NGMVEGATILFGNPE-KYDWEARR--KESKRYVYD-----SGCMHCHGDIKNVS-SQN		137
<i>Helicobacter_cetorum</i>	SGLNDIIGNVFFNPKTHVWNEER--KKAKEYVFD-----SGCLHCHTLNRNAT--SSN		144
<i>Helicobacter_felis</i>	LGMEDVYGNVFKDPK-KLDWEKNR--RRAKEYVFD-----SGCLHCHTLNRNAT--SSN		143
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	LGIEDVYGNVFKDPK-KFDWEANR--KRATEYVFD-----SGCLRCHTLNRNAT--SSN		143
<i>Helicobacter_suis</i>	LGLNDVYGNVFKNYP-KFDWEENR--RRAKEYVFD-----SGCLRCHTLNRNAT--SSN		143
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	LGLNDVYGNVFKNYP-KFDWEMNR--REAKDYVFD-----SGCLRCHTLNRNAT--SSN		143
<i>Helicobacter_heilmanni</i>	LGMEDVYGNVFKNYP-KFDWEMNR--REAKDYVFD-----SGCLRCHTLNRNAT--SSN		143
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	TGLNDVYGNVFKNYP-KINWAQKL--KDPNKYVYD-----SGCLKCHTLNRNAT--LQN		152
<i>Arcobacter_nitrofigilis</i>	TGLHDVYGNVFKNYP-KINWAQKL--KDPNKYVYD-----SGCMNCHTLNRNAT--SSN		144
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	TGMHLDYVENFEDTS-KIDWHKMR--EHRESFTYD-----SACLNCHTLNRNAT--ESN		143

: * ** :

	D4	HBM4	D2			
<i>Psychromonas_aquimarina</i>	QR-----ARLNH	KRLNS----	H-GDTCIDCH-Y----	GIAHKRPEKAYTAEKKD--	200	
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	QR-----ARLNH	RQIEE----	R-GETCINCH-T----	GIAHKRIVIK-----	196	
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	QR-----ARLNH	EMIEQ----	R-GETCIDCH-A----	GIAHKRITIE-----	186	
<i>Wolinella_succinogenes_NrfH</i>	AD-----RNH	QFNDP-KG-ASERL	CWECH-K---	SVPHGKVRSLTATPD-NLG	172	
<i>Nautilia_profundicola</i>	--KAFGMSEES-	RYAHEQYWK	EKNAGKDIS	CVSCHNDHTMVNF	FAHPNLLERLNEGE----	184
<i>Lebetimonas_sp._JH292</i>	--HVVLDDNIQKI	HKMYYNV	KENGGKVS	CVKCHNDYTMPNF	FAHPNLLNLSSEKSE----	190
<i>Caminibacter_mediatlanticus</i>	VGEVIGLTLNS	QKVHKEFYWN	KKERGEKVS	CVACHNDNTMT	HFAHPNLETLQSE----	189
<i>Thermosulfidibacter_takaii</i>	IK-----ATLAH	RAYLL-KE-T-DRT	CVSCH-N----	MVGHGDIVAVIKDKIQEG	178	
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	IK-----AFLAHR	QYEL-GM-T-KET	CITCH-K---	TVGHGNLMLVMQKMAKQK	180	
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	LK-----AFSAH	RQYEL-GM-T-KET	CISCH-R----	NVGHGNLMMVMQEKAAKQK	180	
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	VK-----AFIAH	RQYEL-GM-T-KENC	ITCH-R----	QVGHGNLMMVMQEKAAAKK	180	
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	TS-----GILAH	RQYLI-GD-L-DKR	CVDCH-E----	HVGHKNMVSEINNYFKKSP	183	
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	RG-----GFLAH	RDYLN-GF-T-DKR	CTECH-A----	HVGHKDIWQTVNAHYQNAK	188	
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	PG-----ALLAH	RAYLY-GQ-T-DKK	CASCH-P----	HVGHKDMIEMANEFKFDL	189	
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	PG-----ALLAH	RAYLY-GQ-T-DKK	CASCH-P----	HVGHKNMIEMANEFKFDL	189	
<i>Marinobacterium_litorale</i>	SV-----QFVAH	KPYFQ-GA-V-DKT	CIDCH-----	NVGHRDLTQALLTHERLNR	178	
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	NA-----QFVAH	KPYFL-GT-I-DKT	CIDCH-----	RVGHTDLERNLPSSPLAAT	177	
<i>Oceanospirillum_beijerinckii</i>	NK-----QFVAH	KPYFQ-KR-T-EKT	CVDCH-----	KVGHKNLSLYLPQVANAPT	174	
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	NK-----QFVAH	KPYFQ-KT-S-QKT	CIACH-----	NVGHKNLERFLNAE----	183	
<i>Thioflaviococcus_mobilis</i>	SR-----AFLAHR	RPYFL-GE-T-ARQ	CVSCH-P----	RVGHHDLAATIAGITTAEG	179	
<i>Campylobacter_gracilis</i>	NK-----AWLAH	RDYFA--G-TIGKT	CVQCH-E----	NVGHKNMGIETIKYWDKYN	178	
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	GK-----SFLPH	RDYFVLGN-KNKNS	CVDCH-K----	HVGHKNLGFQIDKFEAIKN	183	
<i>Campylobacter_curvus</i>	GK-----SFLPH	RDYFVFGN-PDKKS	CVDCH-N----	HVGHKDLGLYIDKFEAMKN	183	
<i>Campylobacter_conciscus</i>	GK-----SFLPH	RDYFVLGN-PNKKS	CVDCH-E----	HVGHKNLGLQIDKFEAIKK	183	
<i>Alteromonadaceae_bacterium_Bs12</i>	RK-----SFLPH	RKYFN-EE-EEGLH	CVGCH-E----	NVGHSNLGIHLEKHGWCKN	182	
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	MK-----SFLPH	RDYFA-KN-I-NKT	CVECH-E----	HVGHKNLGFHLKAKFGDLN	180	
<i>Campylobacter_fetus</i>	MK-----SFLPH	RDYFA-KN-I-NKT	CVECH-E----	HVGHKNLGFHLKAKFGDFN	180	
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	MK-----SFLPH	RDYFA-KN-I-NKT	CVECH-E----	HVGHKNLGFHLKAKFGDLN	180	
<i>Helicobacter_cetorum</i>	LK-----SFLPH	RDYFE-KY-T-KKT	CVECHIN----	KVGHQNLSQHLKDYLLKDY	188	
<i>Helicobacter_felis</i>	MK-----SFLPH	RDYFE-GL-S-QKK	CVECHLD----	EVGHKNLGLHLKYLKENEY	187	
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	MK-----AFLPH	RDYFN-GL-S-QKK	CGVFR----	EVGHKNLGLHLKYLKENEY	153	
<i>Helicobacter_suis</i>	MK-----AFLPH	RDYFT-GL-S-HKK	CVECHLD----	QVGHKNLGLHFKAFLLKDY	187	
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	MK-----AFLPH	RDYFA-GL-T-KKH	CVECHLD----	EVGHKNLSIHLKFLKEDY	187	
<i>Helicobacter_heilmanni</i>	MK-----AFLPH	RDYFE-KL-T-KKH	CVECHLD----	EVGHKNLSIHLKFLKEDY	187	
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	QR-----AFLAHR	RAYFA-KT-T-TQS	CVDCH-S----	NVGHKDLKAFIKS-----	189	
<i>Arcobacter_nitrofigilis</i>	TK-----AFLAHR	KEYFE-KR-T-DKK	CVECH-K----	NVGHHLGDYIKK-----	181	
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	LK-----AFNAH	RKYFA-KT-T-DKT	CVGCH-E----	NVGHKDLGLYLPKN-----	181	

<i>Psychromonas_aquimarina</i>	-----				200
<i>Aliagarivorans_marinus</i>	-----				196
<i>Photobacterium_ganghwense</i>	-----				186
<i>Wolinella_succinogenes_NrfH</i>	VREVK-				177
<i>Nautilia_profundicola</i>	-----				184
<i>Lebetimonas_sp._JH292</i>	-----				190
<i>Caminibacter_mediatlanticus</i>	-----				189
<i>Thermosulfidibacter_takaii</i>	GEL-				181
<i>Thermodesulfatator_atlanticus</i>	LAKNEK-				186
<i>Thermodesulfatator_indicus</i>	LAKNEK-				186
<i>Thermodesulfatator_sp._S606</i>	LAKNEK-				186
<i>Desulfovibrio_piezophilus</i>	QVAGKE-				189
<i>Pelobacter_seleniigenes</i>	N-				189
<i>Desulfovibrio_frigidus</i>	-----				189
<i>Desulfovibrio_hydrothermalis</i>	-----				189
<i>Marinobacterium_litorale</i>	PPSVTANP-				186
<i>Marinobacterium_stanieri</i>	DG-				179
<i>Oceanospirillum_beijerinckii</i>	LPN-				177
<i>Neptuniibacter_caesariensis</i>	-----				183
<i>Thioflaviococcus_mobilis</i>	GQ-				181
<i>Campylobacter_gracilis</i>	RENNKTK-				185
<i>Campylobacter_mucosalis</i>	KENNKTK-				190
<i>Campylobacter_curvus</i>	QENNKTK-				190
<i>Campylobacter_conciscus</i>	QENNKTK-				190
<i>Alteromonadaceae_bacterium_Bs12</i>	NDD-				185
<i>Campylobacter_iguaniorum</i>	ITK-				183
<i>Campylobacter_fetus</i>	ITK-				183
<i>Campylobacter_hyointestinalis</i>	ITK-				183
<i>Helicobacter_cetorum</i>	RPYPENSLKQEALKTTHPNTKE-				210
<i>Helicobacter_felis</i>	KPYPRDFVIDGREVSINPST-----				224
<i>Helicobacter_bizzozeronii</i>	-----				153
<i>Helicobacter_suis</i>	KPYPRAFVLVQGSQKQLEELSEIKPASDSAMADRKIQTQTQKE				230
<i>Helicobacter_ailurogastricus</i>	KPTVRALIGTIQK-				200
<i>Helicobacter_heilmanni</i>	KPTVRALIGTIQK-				200
<i>Desulfurella_acetivorans</i>	-----				189
<i>Arcobacter_nitrofigilis</i>	-----				181
<i>Arcobacter_anaerophilus</i>	-----				181

7.4 Publikationen

Publikationen in wissenschaftlichen Journalen

Haase, D., Hermann, B., Einsle, O., and Simon, J. (eingereicht) Epsilonproteobacterial hydroxylamine oxidoreductase (ϵ Hao): characterization of a 'missing link' in the multiheme cytochrome *c* family.

Präsentationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden regelmäßig auf wissenschaftlichen Kongressen oder Symposien präsentiert:

- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Bremen, 10.-13. März 2013
- Vortrag auf dem 18th European Nitrogen Cycle Meeting in Darmstadt, 18.-20. September 2013
- Posterpräsentation auf dem 19th European Nitrogen Cycle Meeting in Gent, 10.-12. September 2014
- Posterpräsentation auf der Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Marburg, 01.-04. März 2015
- Vortrag auf dem Doktorandensymposium der Technischen Universität Darmstadt, 08. Oktober 2015

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Doreen Haase
Geburtsdatum: 22.10.1985
Geburtsort: Lauchhammer

Schulbildung

August 1998-Juni 2005 Allgemeine Hochschulreife; Elsterschloss-Gymnasium;
Elsterwerda

Akademische Ausbildung

Oktober 2006-März 2012 Studium der Diplom-Biologie an der Universität Rostock

2011-2012 Diplomarbeit im Bereich Mikrobiologie bei Prof. Dr. Bahl an der
Universität Rostock

Titel: »Charakterisierung von Elektronentransfer-Flavoproteinen
in *Clostridium acetobutylicum*.«

Juni 2012-Dezember 2016 Promotionsarbeit bei Prof. Dr. Simon an der Technischen
Universität Darmstadt

Titel: »Epsilonproteobakterielle Hydroxylamin-Oxidoreduktase
(ϵ Hao): Charakterisierung eines "missing links" innerhalb der
Multihäm Cytochrom c Familie.«

7.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Jörg Simon im Fachbereich Biologie, Fachgebiet Mikrobielle Energieumwandlung und Biotechnologie, der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Juni 2012 bis Dezember 2016 angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

Doreen Haase

8. Danksagung

Schreiben musste ich diese Arbeit zwar allein, doch an ihrem guten Gelingen waren viele mir nahestehende Menschen beteiligt. Daher möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich innerhalb meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Simon für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die zahlreichen, anregenden Diskussionen herzlich bedanken. Die Freiheit, die er mir während der gesamten experimentellen Arbeit gewährte, trug maßgeblich zur Weiterentwicklung des Forschungsprojektes und zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein außerordentlicher Dank gilt Tamara Heß, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und mir durch ihren liebevollen, moralischen Beistand Kraft und Mut zur Vollendung meiner Dissertation gegeben hat. Für die unvergessliche Zeit unserer Zusammenarbeit und der daraus entstandenen Verbundenheit danke ich ihr von ganzem Herzen.

Daneben möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die stets kollegiale Atmosphäre und gute langjährige Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Michael Brecht, der mir mit seinen wertvollen Anregungen und Ratschlägen jederzeit hilfreich zu Seite stand. Für seine Ehrlichkeit, außerordentliche Kollegialität und Hilfsbereitschaft in jeglicher Form bin ich ihm sehr dankbar.

Weiterhin möchte ich mich bei allen meinen Mitdoktoranden sowie allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Fachbereichs für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und den außergewöhnlich starken Zusammenhalt bedanken. Diese Arbeit wäre auch ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen. Insbesondere möchte ich Kerstin Winter und Johannes Born für die "Kick Off" - Kaffee-Meetings und der daraus erwachsenden Freundschaft danken.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, Barbara und Georg Haase, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung und Liebe meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.