

**Isolierung und funktionelle Charakterisierung  
neuartiger Hydrogenasen sowie synthetischer [FeS]  
Cluster Proteine**

**Inaugural Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Jana Riethausen**

aus Ludwigslust

Düsseldorf, April 2013



Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2009 bis April 2013 am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion (ehemals Bioanorganische Chemie) in Mülheim an der Ruhr unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Gärtner.

Gedruckt mit der Genehmigung  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2013

## **Teile der Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht:**

Riethausen, J., Gärtner, W., Lubitz, W. and Pandelia, M., Spectroscopic characterization of iron-sulfur cluster assemblies based on the proximal cluster-binding motif of Group 1 [NiFe] hydrogenases ***Biochimica and Biophysica Acta - Bioenergetics***, eingereicht.

Riethausen, J., Rüdiger, O., Gärtner, W. and Lubitz, W.\* and Shafaat, H.S.\* Spectroscopic and electrochemical characterization of the [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Reversible redox behavior and interactions between electron transfer centers ***ChemBioChem***, eingereicht.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
<i>A. vinosum</i>	<i>Allochromatium vinosum</i>
$B_0$	Induktion des äußeren Magnetfeldes
$\beta_e$	Bohrsches Magneton
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration (engl.: concentration)
cv	Säulenvolumen (engl.: column volume)
cw	engl.: continuous wave
d	Küvetten-Schichtdicke
<i>D. baculatus</i>	<i>Desulfovibrio baculatus</i>
<i>D. desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>Dm. baculatum</i>	<i>Desulfomicrobium baculatum</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNIC	Dinitrosyl-Komplex
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
(ds) DNA	(doppelsträngige) Desoxyribonukleinsäure
<i>DvMF</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F
<i>E</i>	Potential
$E^0$	Standardelektrodenpotential
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Cup	Eppendorf-Gefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENDOR	Elektron-Kern-Doppelresonanz (engl.: electron nuclear double resonance)
EPR	Elektronen-Paramagnetische Resonanz
ESEEM	engl.: Electron Spin Echo Envelope Modulation
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i> )

<i>F</i>	Faraday-Konstante
Fa.	Firma
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FTIR	Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie
fw/rev-Primer	Vorwärts- und Rückwärts-Primer (engl.: forward/reverse)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g-Wert	Gauß- (Einheit der magnetischen Flussdichte) Wert
h	Stunden
<i>h</i>	Plancksches Wirkungsquantum
HYSCORE	Hyperfine sublevel correlation
I	Intensität
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
kb	Kilobase
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ ionization – time of flight
mAU	Milli-absorbance units
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl.: multiple cloning site)
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MV	Methylviologen
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
<i>NHE</i>	Standardwasserstoffelektrode (engl.: <i>normal hydrogen electrode</i> )
NMR	Kernspinresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance)
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (engl.: open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PC-Medium	Postgate C-Medium

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PfsA	<u>P</u> roximales <u>F</u> errum- <u>S</u> chwefel Cluster aus <u>A. aeolicus</u>
PMS	Phenazinmethosulfat
R	molare Gaskonstante
<i>R. eutropha</i>	<i>Ralstonia eutropha</i>
RF	Radiofrequenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Elektronenspin
SB12	3-( <i>N</i> -dodecyl- <i>N,N</i> -dimethylammonio)-1-propansulfonat
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SpcD	<u>S</u> tandard <u>p</u> roximales <u>C</u> luster aus <u>D. vulgaris</u> Miyazaki F
T <sub>ann.</sub>	Anlagerungstemperatur (engl.: annealing temperature)
Tat	Twin-Arginin-Transport
<i>T. litoralis</i>	<i>Thermococcus litoralis</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (engl.: melting temperature)
<i>T. onnurineus</i>	<i>Thermococcus onnurineus</i>
ÜN	Über Nacht
UV/vis	Ultraviolett/sichtbar (engl.: visible)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen, engl.: weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-b-D-galactopyranosid

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Einführung in die Funktion von Hydrogenasen .....	3
1.2	Einordnung der Hydrogenasen .....	4
1.3	Sauerstofftoleranz verschiedener Hydrogenasen .....	10
1.4	Biosynthese der Hydrogenasen .....	14
1.5	Suche nach ungewöhnlichen Hydrogenasen .....	15
1.6	Motivation und Zielsetzung .....	17
2	Material und Methoden .....	19
2.1	Verwendete Organismen, Vektoren und Oligonukleotide .....	19
2.2	Medien und Zusätze .....	23
2.2.1	Medien .....	23
2.2.2	Antibiotika und Zusätze .....	25
2.3	Kultivierung und Stammhaltung der Bakterien .....	26
2.3.1	Zellanzucht von <i>E. coli</i> .....	26
2.3.2	Zellanzucht von <i>D. vulgaris</i> MF .....	26
2.3.3	Herstellung von Glycerin-Stammkulturen .....	27
2.4	Bestimmung der Zelldichte (OD <sub>600</sub> -Messung) .....	27
2.5	Molekularbiologische Techniken .....	28
2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	28
2.5.2	Blau-Weiß-Selektion von rekombinanten Klonen .....	29
2.5.3	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren .....	30
2.5.3.1	Phenol/Chloroform-Extraktion .....	30
2.5.3.2	Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol .....	30
2.5.3.3	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	31

2.5.4	Isolierung von DNA .....	31
2.5.4.1	Plasmid-DNA-Isolierung .....	31
2.5.4.2	DNA-Isolierung durch Extraktion aus Agarose-Gelen.....	33
2.5.4.3	Isolierung genomischer DNA .....	34
2.5.5	Fluoreszenzmarkierung von DNA .....	34
2.5.6	Enzymatische Modifikation von DNA.....	35
2.5.6.1	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	35
2.5.6.2	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase .....	36
2.5.6.3	Ligation von DNA in den pDrive-Vektor .....	37
2.5.6.4	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	38
2.5.7	Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)....	38
2.5.8	Transformationsverfahren .....	41
2.5.8.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> zur Transformation .....	41
2.5.8.2	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> XL1-Blue und BL21 (DE3) .....	42
2.6	Proteinchemische Methoden .....	42
2.6.1	Proteinreinigung .....	42
2.6.1.1	FPLC (Fast protein liquid chromatography) .....	42
2.6.1.2	Proteintag - Affinitätschromatographie.....	45
2.6.2	Quantitative Proteinbestimmung .....	46
2.6.3	SDS-PAGE.....	47
2.6.4	Enzymaktivitäts-Bestimmungen .....	49
2.6.4.1	Qualitativer Aktivitätstest wasserstoffoxidierender Hydrogenasen .....	49
2.6.4.2	Quantitativer Aktivitätstest wasserstoffoxidierender Hydrogenasen.....	50

2.6.4.3	Native PAGE mit Aktivitätsfärbung .....	51
2.7	MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	51
2.8	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz Spektroskopie.....	52
2.8.1	Gepulste EPR Techniken .....	55
2.8.1.1	Zwei-Puls Elektronenspin echo Spektroskopie .....	55
2.8.1.2	Elektron-Kern-Doppelresonanz Spektroskopie .....	55
2.9	Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie .....	57
2.10	Elektrochemie.....	59
2.10.1	Zyklovoltammetrie .....	61
2.10.2	Chronoamperometrie .....	64
2.11	DNA Microarray Verfahren .....	65
2.11.1	Herstellung der Microarray-Slides .....	65
2.11.2	Hybridisierung der markierten DNA mit Microarrayslides.....	66
2.11.3	Scannen der hybridisierten Slides.....	68
2.12	Bioinformatische Methoden .....	68
2.12.1	DNA Sequenzierung .....	68
2.12.2	Software.....	70
3	Ergebnisse und Diskussion.....	71
3.1	DNA-Microarray-Screening einer Metagenombank aus hyperthermophilen Mikroorganismen nach neuartigen Hydrogenase-Genen .71	
3.1.1	Herkunft der Metagenombank.....	71
3.1.2	PCR-Screening mit degenerierten Primern der Genombank der Hydrothermalquelle.....	74
3.1.3	Auswahl der Microarray-Zielsequenzen .....	75
3.1.4	Microarray-Screening .....	79
3.1.5	Identifizierung der Gene der Hydrothermalquelle mittels PCR .....	83

3.1.6	Subklonierung der beiden Hydrogenase-Operons aus dem Cosmidklon p38H7 der untersuchten Metagenombank .....	86
3.1.7	Diskussion.....	88
3.2	Gewinnung und Charakterisierung der [NiFeSe] Hydrogenase aus <i>DvMF</i> .....	93
3.2.1	Kultivierung von <i>DvMF</i> .....	93
3.2.2	Präparation der [NiFeSe] Hydrogenase aus <i>DvMF</i> .....	95
3.2.2.1	Zellaufschluss und Lösen des Proteins aus der Membran .....	95
3.2.2.2	Säulenchromatographie.....	97
3.2.3	Biochemische Charakterisierung.....	101
3.2.3.1	Überprüfung der Reinheit mittels SDS-PAGE.....	101
3.2.3.2	Qualitativer Aktivitätstest .....	102
3.2.3.3	Quantitativer Aktivitätstest .....	103
3.2.3.4	Native PAGE mit Aktivitätsfärbung .....	105
3.2.4	Spektroskopische Charakterisierung der [NiFeSe] Hydrogenase .	107
3.2.4.1	UV/vis Spektroskopie.....	107
3.2.4.2	EPR Spektroskopie.....	108
3.2.4.3	FTIR Spektroskopie .....	117
3.2.5	Elektrochemie .....	119
3.2.6	Diskussion.....	124
3.3	Untersuchung des proximalen Clusters der sauerstofftoleranten Hydrogenase 1 aus <i>Aquifex aeolicus</i> .....	132
3.3.1	Klonierung und Expression .....	135
3.3.2	Spektroskopische Charakterisierung von PfsA und SpcD.....	146
3.3.3	Diskussion.....	166
4	Zusammenfassung .....	176

5	Abstract .....	178
6	Ausblick .....	180
7	Literatur .....	182
8	Anhang .....	203
8.1	Vektorkarte des Klonierungsvektors pDrive .....	203
8.2	Vektorkarte des Klonierungsvektors pJET1.2 .....	204
8.3	Vektorkarte des Cosmidvektors pWE15 .....	205
8.4	Vektorkarte des Expressionsvektors pET-15b .....	206
8.5	Vektorkarte des Expressionsvektors pET-21a(+).....	207
8.6	Vektorkarte des Expressionsvektors pET-51b(+).....	208
8.7	Vektorkarten der Chaperon-Vektoren .....	209
8.8	Sequenzen der heterolog exprimierten Proteine.....	210
8.9	Übersicht der degenerierten Primer .....	212
9	Lebenslauf .....	213
10	Danksagung .....	215

## 1 Einleitung

Die Verwertung fossiler Brennstoffe wie Erdöl, Erdgas und Kohle zur Energiegewinnung brachte zwar in der Vergangenheit hohen Nutzen, allerdings ist die Verbrennung dieser begrenzten Rohstoffe nicht nachhaltig, so dass mittlerweile durch die Verknappung der Bestände ein globales Energieproblem besteht. Parallel steigt der Energiebedarf immer weiter an (laut Forbes-Report über ein Drittel bis 2035). Zusätzlich sind die bei der Verbrennung dieser Energieträger entstehenden Treibhausgase wie das langlebige Kohlendioxid verantwortlich für die globale Erwärmung (1-4) und sorgen so über kurz oder lang für Probleme wie Trinkwasserverknappung oder das Abschmelzen der Gletscher (5,6).

Um die Treibhausgasemission deutlich zu reduzieren (7), müssen in naher Zukunft erneuerbare Energieträger gefunden und nutzbar gemacht werden, was eine der größten Herausforderungen der wissenschaftlichen Welt darstellt. Bereits bekannte regenerative Energiequellen sind zum Beispiel Windkraft (8) und Sonnenlicht, welches mittels Kollektoren in Energie umgewandelt werden kann (9), allerdings sind diese alternativen Energieträger aufgrund des geringen Energiegewinnes kaum effizient.

Ein ökologisch freundlicher Brennstoff der Zukunft wird in Wasserstoff gesehen (10-12). Da Wasserstoff ein Brennstoff mit hoher Energiedichte ist, könnte man mit großem Ertrag Energie aus dessen Verwertung gewinnen. Dieser saubere Brennstoff reagiert mit Sauerstoff zu Wasser; dies geschieht bei industrieller Nutzung in sogenannten Brennstoffzellen, in denen die freigesetzte chemische Energie in elektrische Energie umgewandelt wird. Da bei dieser Art der Energiegewinnung nur Wasser entsteht, ist dieser Prozess im Vergleich zu herkömmlichen Techniken sehr umweltfreundlich. Um große Mengen Wasserstoff herzustellen, wird momentan allerdings auf fossile Brennstoffe wie Erdgas als Primärenergieträger zurückgegriffen, sodass auch auf diesem Weg

## Einleitung

Treibhausgase wie  $\text{CO}_2$  entstehen. Des Weiteren erfordert die Reaktion hohe Temperaturen und wertvolle Metallkatalysatoren (13,14). Im Verfahren des thermischen Crackens werden die langkettigen Kohlenwasserstoffe des Rohöls durch hohe Temperaturen gespalten, wobei unter anderem  $\text{H}^\cdot$  Radikale entstehen, aus denen sich dann molekularer Wasserstoff bilden kann. In Zukunft muss eine Alternative gefunden werden, bei der die Produktion von Wasserstoff nicht von fossilen Brennstoffen abhängt, da nur dann ein reeller Nutzen für die Umwelt gezogen werden kann.

Ein Ansatz, der wissenschaftlich verfolgt wird, ist der Versuch, mittels Biophotolyse Wasserstoff zu produzieren (15). Hierbei würde molekularer Wasserstoff aus Wasser und der Energie des Sonnenlichtes gewonnen werden, wobei mehrere Enzyme beteiligt wären. Hierfür geeignet wäre das Photosystem II, das in Algen, höheren Pflanzen und einigen Bakterienarten als essentieller Baustein der Photosynthese vorhanden ist. Dieser Proteinkomplex spaltet zwei Moleküle Wasser zu einem Molekül Sauerstoff und vier Protonen (16). Die so erzeugten Elektronen und Protonen würden dann unter Beteiligung des Photosystem I über eine Transferkette auf eine Hydrogenase übertragen, wo durch Reduktion der Protonen Wasserstoff entstehen würde. Dieses Verfahren liefert auf saubere Weise Wasserstoff, da keine umweltfeindlichen Nebenprodukte entstehen. Da dieses System aber in keinem bekannten Organismus in dieser Kombination vorkommt, sondern nur jeweils einer der beiden Teilbereiche pro Zelle / Kompartiment vorliegt, liegt der Gedanke nahe, einen Organismus biochemisch so zu verändern, dass beide Teilprozesse gemeinsam vorhanden sein können. Hierfür muss allerdings ein Problem überwunden werden: Viele Hydrogenasen werden durch Sauerstoff inaktiviert (17), der aber bei der Spaltung des Wassers im Photosystem II als Nebenprodukt entsteht.

Die detaillierte Untersuchung dieser Enzymklasse der Hydrogenasen, die in vielen unterschiedlichen Organismen vorkommen und dort in der Lage sind,

Wasserstoff zu produzieren bzw. energieerzeugend zu verbrauchen, ist essentiell für deren Anwendung als potentieller Energieerzeuger (18). Neben Untersuchungen an bereits bekannten Hydrogenasen ist es allerdings erforderlich, neuartige Organismen zu identifizieren und deren Wasserstoff-Metabolismus zu analysieren (für kürzlich erschienene Reviews und Veröffentlichungen zu spektroskopischen, elektrochemischen, biologischen und theoretischen Untersuchungen dieser Systeme siehe (19-21)). Bestimmender Faktor bei all diesen Ansätzen ist die Erforschung der Sauerstoffempfindlichkeit. Da diese Arbeit Untersuchungen an verschiedenen Hydrogenasen zum Inhalt hat, wird im Folgenden näher auf diese Enzymklasse eingegangen.

### 1.1 Einführung in die Funktion von Hydrogenasen

Hydrogenasen sind mikrobielle Enzyme, die sowohl die Bildung von molekularem Wasserstoff durch Protonen-Reduktion als auch die Oxidation von Wasserstoff zu Protonen und Elektronen katalysieren (22):



Die genannte Reaktion läuft, je nachdem, ob ein Elektronendonator oder -akzeptor vorhanden ist, in die entsprechende Richtung ab. Katalysiert die Hydrogenase die Oxidation von Wasserstoff, werden der Zelle hierdurch Reduktionsäquivalente in Form der freigesetzten Elektronen zur Verfügung gestellt, mit denen dann Substrate reduziert werden können. Mit den ebenfalls frei werdenden Protonen kann über einen Gradienten Adenosintriphosphat (ATP) gebildet werden, der wichtigste Energiespeicher der Zellen. Geschieht dieser Wasserstoffoxidaionsprozess direkt an der Membran (bei membrangebundenen Hydrogenasen, siehe 1.2), können die entstandenen Protonen direkt durch die in der Membran gebundene ATP-Synthase zur ATP-Gewinnung genutzt werden. Die gegenläufige Reaktion, die Bildung von molekularem Wasserstoff, wird von Bakterien unter anaeroben Bedingungen zum Beispiel in unserem Verdauungstrakt ausgeführt (10).

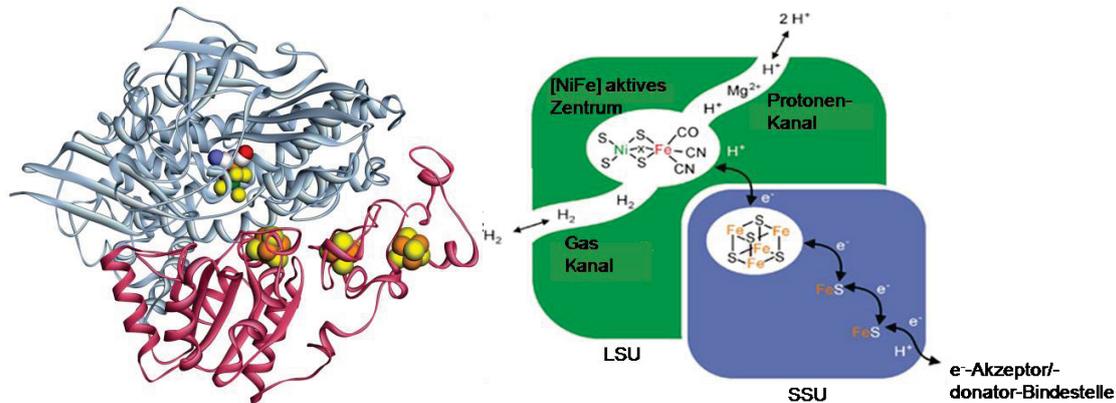
## 1.2 Einordnung der Hydrogenasen

Die Einordnung in Enzymklassen wird von der Organisation NC-IUBMB (engl.: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (23)) durchgeführt, indem Enzymen je nach der katalysierten Reaktion EC-Nummern (engl.: Enzyme Commission numbers) zugeschrieben werden. Die Oxidoreduktasen fallen unter die EC-Nummer 1, darunter befinden sich die Hydrogenasen mit der Klassifizierungsnummer EC 1.12. Innerhalb dieser Enzymklasse lassen sich die Hydrogenasen nach verschiedenen Kriterien in Gruppen einteilen. Hydrogenasen gehören mit ihren Übergangsmetallionen Nickel und/oder Eisen zu den Metalloproteinen (24). Aufgrund dieser im aktiven Zentrum des Enzyms vorhandenen Metallionen kann eine Unterteilung der verschiedenen Hydrogenasen in drei Gruppen vorgenommen werden (25-28): [NiFe], [FeFe] und sogenannte Hmd Hydrogenasen. Die letztgenannten, Eisen-Schwefel Cluster freien Enzyme einiger methanogener Archaeen wie *Methanothermobacter marburgensis* (29) oder *Methanocaldococcus jannaschii* (30), enthalten neben den Clustern auch kein Nickel und wurden ursprünglich als metallfreie Hydrogenasen bezeichnet (31). Nachfolgende Untersuchungen ergaben aber die Anwesenheit eines Eisenions im aktiven Zentrum. Ihre Aktivität ist von einem Eisen enthaltenden Kofaktor abhängig (32-34). Diese  $H_2$ -bildenden Methylentetrahydromethanopterin-dehydrogenasen (Hmd) (35) katalysieren nicht, wie die [NiFe] und [FeFe] Hydrogenasen, die oben genannte Reaktion der reversiblen Wasserstoffoxidation, sondern den intermediären Schritt in der Kohlendioxidreduktion mit Wasserstoff zu Methan (36).

Die zweite Gruppe von Hydrogenasen enthält ein bimetallisches Zentrum mit zwei Eisenatomen und wird aus diesem Grund als [FeFe] Hydrogenase bezeichnet (37). Die katalytische Einheit wird als H-Cluster bezeichnet, bei dem das [FeFe] Zentrum über einen Cystein-Brückenliganden mit einem [4Fe-4S] Cluster verbunden ist. Die beiden Eisenatome weisen Cyanid- und Carbonyl-Liganden auf (38,39).

Die dritte Gruppe der Hydrogenasen beinhaltet die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme. Die [NiFe] Hydrogenasen bilden die zahlenmäßig größte Gruppe (24)

und sind, im Gegensatz zu manchen [FeFe] Hydrogenasen, stets als Heterodimer, bestehend aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, ausgebildet.



**Abbildung 1.1:** Aufbau der [NiFe] Hydrogenasen. Links: Kristallstruktur der [NiFe] Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F (PDB: 1WUJ). Rechts: Schematische Darstellung der großen und kleinen Untereinheit (LSU und SSU) von [NiFe] Hydrogenasen, inklusive der Detailansicht des aktiven Zentrums und des proximalen [4Fe-4S] Clusters (Abbildung verändert nach (25)).

Die große Untereinheit enthält das aktive Zentrum und ist circa 60 kDa groß, die kleine Untereinheit schließt drei Eisen-Schwefel Cluster ein und hat eine Größe von circa 30 kDa (40). Das binukleare Zentrum mit einem Nickel- und einem Eisen-Atom (41,42) ist über vier Cysteinreste an das Protein gebunden (43). Das Eisenatom wird, wie in allen drei Gruppen der Hydrogenasen, von einem Kohlenmonoxidmolekül ligandiert, zusätzlich besitzt es zwei Cyanid-Liganden (44,45). Das aktive Zentrum wird mit der Proteinoberfläche über einen hydrophoben Gaskanal verbunden, der durch seine unpolaren Aminosäurereste den Protonenaustausch mit dem aktiven Zentrum ermöglicht (46). Die kleine Untereinheit trägt Eisen-Schwefel Cluster. Diese gehören zu den entwicklungsbiologisch ältesten prosthetischen Gruppen (47) und sind zumeist als [2Fe-2S], [3Fe-4S] oder [4Fe-4S] Cluster ausgebildet. In der kleinen Untereinheit der [NiFe] Hydrogenasen befinden sich proximal und distal zum aktiven Zentrum zwei [4Fe-4S] Cluster; der mediale Cluster ist bei den [NiFe]

## Einleitung

Hydrogenasen als [3Fe-4S] Cluster ausgebildet (48). Die Anbindung der Cluster an das Protein erfolgt über die Schwefelatome der Seitenketten der Cysteine, welche an die Eisenatome der [FeS] Cluster binden. Im Fall des Rieske-[2Fe-2S] Clusters findet sich allerdings eine andere Situation, bei der neben zwei Cysteinen zwei Histidine das Cluster koordinieren (49,50). Die Aufgabe der [FeS] Cluster besteht in der Elektronenweiterleitung zwischen dem aktiven Zentrum und dem Elektronendonator beziehungsweise –akzeptor (51). Dies ist durch die unterschiedlichen Oxidationsstufen des Eisens möglich (+2 und +3). Daher ist das Redoxpotential die wichtigste Eigenschaft dieser Kofaktoren.

Eine Subgruppe der [NiFe] Hydrogenasen sind die [NiFeSe] Hydrogenasen, bei denen im aktiven Zentrum einer der Cysteinreste, die das Nickelatom ligandieren, durch Selenocystein ausgetauscht ist (52,53). In der kleinen Untereinheit dieser [NiFeSe] Hydrogenasen zeigt sich ein weiterer wichtiger Unterschied: Das mediale Cluster ist hier ebenfalls, wie das proximale und distale Cluster, als [4Fe-4S] Cluster ausgebildet (54). Welchen Einfluss diese Änderung auf den Elektronentransfer oder die Aktivität des Enzyms hat, ist noch unklar. Bei Mutationen der [NiFe] Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans*, bei denen aus dem natürlicherweise vorkommenden medialen [3Fe-4S] Cluster ein [4Fe-4S] Cluster generiert wurde, konnte keine Abweichung in der Aktivität des Enzyms gefunden werden (55). [NiFeSe] Hydrogenasen wurden bisher in einer Reihe von Mikroorganismen entdeckt, unter anderem in den Sulfat-reduzierenden Bakterien *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough und *Desulfovibrio baculatus*, sowie im methanogenen Archaeobakterium *Methanococcus voltae*, welche alle unter anderem mittels spektroskopischer Methoden wie EPR und FTIR (siehe 2.8 und 2.9) charakterisiert wurden (53,56-60).

Innerhalb der [NiFe] Hydrogenasen lässt sich wiederum eine Unterteilung anhand ihrer Funktion bzw. anhand ihrer intrazellulären Lokalisation in vier Gruppen tätigen (61). Hydrogenasen der Gruppe 1 sind membrangebundene Enzyme, die im Periplasma vorhanden sind, Wasserstoff spalten und durch diese

Reaktion Elektronenakzeptoren wie Sulfat (z.B. in *Desulfovibrio vulgaris*) reduzieren. Der Transport dieser Hydrogenasen geschieht über ein am N-Terminus der kleinen Untereinheit befindliches Tat-Motif (62), welches von der Zelle erkannt wird und nach erfolgtem Transport ins Periplasma abgeschnitten wird. Die Gruppe 2 umfasst sensorische cytoplasmatische Hydrogenasen (63,64), welche Wasserstoff detektieren und die Expression von Hydrogenasen der Gruppe 1 steuern, sowie cyanobakterielle wasserstoffspaltende Hydrogenasen (65). Diese Hydrogenasen verbleiben im Cytoplasma und weisen entsprechend kein Tat-Motiv in der kleinen Untereinheit auf. Cytoplasmatische Hydrogenasen, die aus mehr als zwei Untereinheiten bestehen, werden in der Gruppe 3 zusammengefasst und gelten als bidirektional. Die letzte Gruppe (Gruppe 4) enthält Enzyme, die aus mindestens sechs Untereinheiten bestehen und Wasserstoff produzieren. Die bisher größte Anzahl dieser Hydrogenasen wurde in Archaeen gefunden, aber auch in *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F wurde eine solche Hydrogenase entdeckt (66).

## Einleitung

**Tabelle 1.1:** Überblick der drei Hydrogenase-Gruppen (inkl. der [NiFe] Subgruppen) und ihrer Funktion, nach (67).

Gruppe	Bezeichnung der [NiFe] Subgruppen	Funktion
<b>Hmd</b>		Wasserstoffspaltung bei der Methanogenese
<b>[FeFe] Hydrogenasen</b>		Verbrauch von Reduktionsäquivalenten, Energiekonservierung
<b>[NiFe] Hydrogenasen</b>		
<i>Gruppe 1</i>	Membrangebundene, wasserstoffspaltende Hydrogenasen	Energiekonservierung
<i>Gruppe 2</i>	Sensorische Hydrogenasen; cyanobakterielle Wasserstoffspalter	Wasserstoffsensoren; Energiekonservierung
<i>Gruppe 3</i>	Bidirektionale, cytoplasmatische Hydrogenasen	Bereitstellung oder Verbrauch von Reduktionsäquivalenten, Energiekonservierung
<i>Gruppe 4</i>	membrangebundene, wasserstoffproduzierende Hydrogenasen	Verbrauch von Reduktionsäquivalenten

Eine weitere Möglichkeit, die Hydrogenasen zu unterscheiden, ergibt sich aus der Lebensweise der Organismen, in denen sie vorkommen: Anaerobe Bakterien fermentieren organische Substrate und geben die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente an die Hydrogenase ab, welche daraus molekularen Wasserstoff bildet. Neben den fakultativ anaeroben Bakterien wie z.B. *E. coli* gibt es auch aerob lebende Bakterien, die Hydrogenasen aufweisen. Hierbei

unterscheidet man zwischen aeroben Stickstofffixierern, welche Stickstoff zu Ammoniak reduzieren, wodurch Elektronen frei werden, die von der Hydrogenase mit Protonen zu Wasserstoff umgesetzt werden, und den aeroben Wasserstoffoxidierern. Dies sind die sogenannten Knallgasbakterien wie *Ralstonia eutropha*, dessen Hydrogenasen (eine membrangebundene Hydrogenase = MBH aus der Gruppe 1 der [NiFe] Hydrogenasen, eine lösliche Hydrogenase = SH aus der Gruppe 3 und eine regulatorische Hydrogenase = aus der Gruppe 2) auch in Anwesenheit von Sauerstoff katalytisch aktiv sind (68,69).

Häufig befinden sich mehrere Hydrogenasen in einer Zelle, um auf unterschiedliche Umweltbedingungen reagieren zu können. Der in dieser Arbeit unter anderem untersuchte Organismus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F weist mindestens drei Hydrogenasen auf: Eine cytosolische, multimere [NiFe] Hydrogenase (ECH, engl.: energy converting hydrogenase), eine membrangebundene periplasmatische [NiFe] Hydrogenase (70) und eine ebenso membranassoziierte periplasmatische [NiFeSe] Hydrogenase. Die Gattung *Desulfovibrio* gehört zu den strikt anaeroben Sulfatreduzierern, welche Sulfat mit Hilfe der Hydrogenase, die durch Wasserstoffoxidation Elektronen zur Verfügung stellt, zu Sulfid oder Schwefelwasserstoff reduzieren (71). Dies wird durch die Übertragung von Elektronen über eine Cytochrom  $c_3$ /Ferredoxin-Kette auf Sulfat realisiert (72). Die dabei ebenfalls frei werdenden Protonen werden über die ATP-Synthase für die Bildung von ATP eingesetzt. Auch der ebenfalls untersuchte Organismus *Aquifex aeolicus* enthält drei verschiedene [NiFe] Hydrogenasen (73), wovon zwei membrangebundene Enzyme (Hydrogenase 1 und 2) für die Energiebereitstellung zuständig sind, während die cytoplasmatische Hydrogenase 3 an der CO<sub>2</sub> Fixierung beteiligt ist.

### 1.3 Sauerstofftoleranz verschiedener Hydrogenasen

Wie bereits erwähnt, steht der Nutzung der Hydrogenasen als regenerativer Energieträger deren Sauerstoffsensitivität im Weg (68). Es gibt jedoch Hydrogenasen, die eine gewisse Toleranz gegenüber Sauerstoff aufweisen (74). Innerhalb dieser in letzter Zeit immer häufiger entdeckten Enzyme findet sich eine Divergenz im Ausmaß der Toleranz: So lässt sich festhalten, dass Hydrogenasen, die durch die Anwesenheit von Sauerstoff inaktiviert werden, entweder irreversibel in ihrer Aktivität geschädigt sind oder eine Reaktivierung erfolgen kann (75). Diese reversible Inaktivierung kann zum Teil nur sehr langsam wieder aufgehoben werden, und in den meisten Fällen ist die danach erhaltene Aktivität deutlich geringer als die gemessene Aktivität vor der Sauerstoffexposition (76).

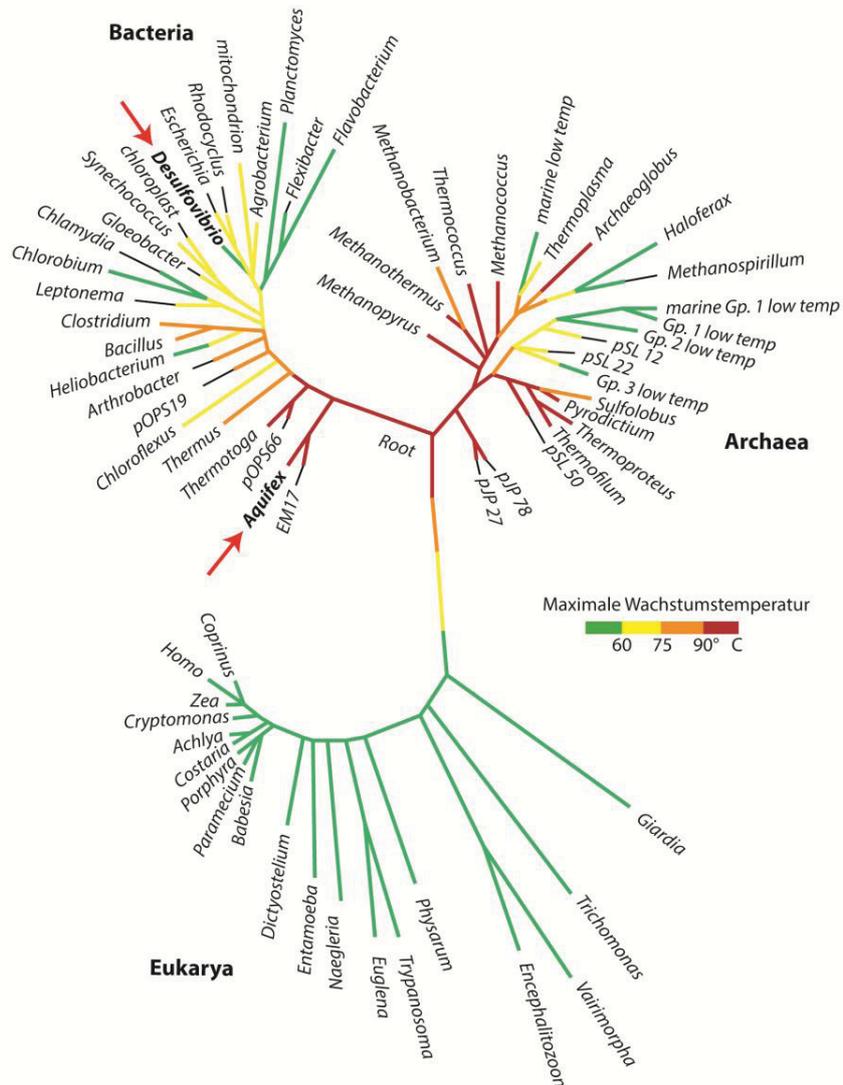
Die bereits beschriebenen [NiFeSe] Hydrogenasen gelten im Vergleich zu [NiFe] Hydrogenasen im Allgemeinen als sauerstofftoleranter (77). Sie werden nach Kontakt mit Sauerstoff schneller wieder reaktiviert und sind sogar in der Lage, in gewissem Ausmaß in Anwesenheit von Sauerstoff Protonen zu reduzieren (78). Dies spiegelt sich auch in den möglichen Redoxzuständen der Enzyme wider. Als Oxidoreduktasen sind die Hydrogenasen in der Lage, Reaktionen zu katalysieren, indem sie im Verlauf der Reaktion verschiedene charakteristische Redoxzustände annehmen, welche spektroskopisch identifiziert werden können. So weist die in dieser Arbeit untersuchte [NiFeSe] Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F im oxidierten Zustand keine detektierbaren Ni-A und Ni-B Zustände auf, welche bei [NiFe] Hydrogenasen paramagnetisch sind und somit mittels EPR untersucht werden können. In beiden Zuständen ist das Enzym katalytisch inaktiv. Sie unterscheiden sich in ihrer Reaktivierungsgeschwindigkeit: Der instabilere Ni-B Zustand kann durch die Zugabe von Wasserstoff sehr schnell wieder aktiviert werden, während der als „unready“ bezeichnete Ni-A Zustand mehrere Stunden dafür benötigt (79). Die Abwesenheit beider genannten Zustände im Fall der [NiFeSe] Hydrogenase deutet auf den Schutz des katalytischen Zentrums gegen Sauerstoff hin, der bei

sauerstoffempfindlichen Standardhydrogenasen beide Zustände hervorruft. Das aktive [NiFe] Zentrum weist bei sauerstoffsensitiven Hydrogenasen im oxidierten Zustand einen Sauerstoff-enthaltenden Brückenliganden zwischen dem Nickel- und dem Eisenatom auf, der bezüglich des Redoxzustands des Enzyms unterschieden wird (80,81). Im Gegensatz hierzu wurde in kristallographischen Studien der [NiFeSe] Hydrogenase aus *D. vulgaris* Hildenborough die Abwesenheit dieses Brückenliganden belegt (82).

Die [NiFeSe] Hydrogenasen sind nicht nur durch die erhöhte Sauerstofftoleranz von wissenschaftlicher Bedeutung, auch ihre erhöhte katalytische Aktivität und ihre Tendenz, vermehrt Wasserstoff zu produzieren, ist für eine spätere Anwendung, z.B. in biologischen Brennstoffzellen, sehr interessant. So wurde von Valente *et al.* (57) eine Wasserstoffproduktionsrate der [NiFeSe] Hydrogenase aus *D. vulgaris* Hildenborough von 6908 Units pro mg gemessen, während die [NiFe] Hydrogenase desselben Organismus nur 174 Units pro mg aufwies (83). Auch die Wasserstoffspaltungsrate war bei der [NiFeSe] mit 900 Units pro mg höher als bei der [NiFe] mit 89 Units pro mg. Aus diesem Grund wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Bedingungen für eine erfolgreiche Expression und Isolierung untersucht, da im Fall der [NiFeSe] Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough verschiedene Faktoren, wie die Zugabe von Selen zum Wachstumsmedium, eine erhöhte Expression hervorriefen und die Isolierung so erleichterten (84).

Auch unter den [NiFe] Hydrogenasen gibt es ungewöhnliche, sauerstofftolerante Exemplare, wie das in dieser Arbeit untersuchte Enzym aus *Aquifex aeolicus* (85) oder die membrangebundene Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* (86). Der hyperthermophile Organismus *A. aeolicus*, welcher die [NiFe] Hydrogenase, Hydrogenase 1 genannt, enthält, weist eine extrem hohe Wachstumstemperatur von 85 – 95 °C (87) auf und ist an heißen Quellen zu finden.

## Einleitung

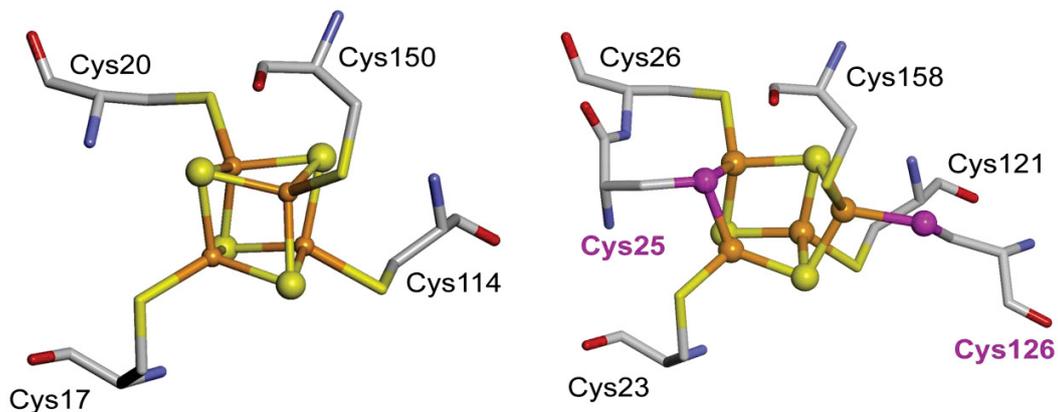


**Abbildung 1.2:** Phylogenetischer Stammbaum, verändert nach (88). Die Berechnung des Stammbaums erfolgte aufgrund von 16S rRNA Sequenzen. Die Positionen der in dieser Arbeit untersuchten Gattungen *Desulfovibrio* und *Aquifex* sind mit einem Pfeil markiert.

Die Bakterien der Gattung *Aquifex* oxidieren Wasserstoff in der sogenannten „Knallgasreaktion“, bei der in der aeroben Atmungskette Elektronen von der Hydrogenase 1 für die abschließende Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser genutzt werden (87). Sie sind zumeist mikroaerophil, da durch die hohe

Temperatur des Mediums in der Umgebung des Organismus nur geringe Mengen Sauerstoff gelöst sind.

Die Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus* gehört zur Gruppe 1 der [NiFe] Hydrogenasen, weist jedoch Unterschiede zu prototypischen membrangebundenen Hydrogenasen dieser Klasse auf. Während die Standardhydrogenasen in der kleinen Untereinheit proximal zum aktiven Zentrum der großen Untereinheit ein [4Fe-4S] Cluster tragen, enthält die Hydrogenase 1 (sowie weitere Vertreter sauerstofftoleranter Hydrogenasen der Gruppe 1 aus *Ralstonia eutropha* (86), *Hydrogenovibrio marinus* (89) oder *Escherichia coli* (90)) an dieser Stelle einen [4Fe-3S] Kofaktor. Darüber hinaus finden sich zwei zusätzliche Cysteine in direkter Nachbarschaft, die möglicherweise zur Ligandierung beitragen.



**Abbildung 1.3:** Links: Struktur des Standard [4Fe-4S] Clusters aus *D. vulgaris* Miyazaki F (PDB: 1WUJ) und (rechts) des [4Fe-3S] der sauerstofftoleranten Hydrogenase aus *Hydrogenovibrio marinus* (PDB: 3AYX). Die beiden zusätzlichen Cysteine des ungewöhnlichen Clusters sind in rosa dargestellt.

Diesem ungewöhnlichen Cluster wurde eine entscheidende Rolle bei der Sauerstofftoleranz der Organismen zugeschrieben (85,91,92). Dass das Cluster im Vergleich zu den Standardclustern zwei zusätzliche ligandierende Cysteine

## Einleitung

enthält, ist auch bei anderen Enzymen beobachtet worden: So wird das Eisenatom des [4Fe-4S] Clusters der Ferredoxin-Thioredoxin Reduktase je nach Redoxzustand des Proteins von einem zusätzlichen Cystein ligandiert (93). Die benachbarten Cysteine scheinen eine erhöhte Flexibilität zu verursachen, durch die sich das Cluster sterisch verändern kann und somit im Gegensatz zu Standardclustern in der Lage ist, zwei Redoxübergänge durchzuführen.

### 1.4 Biosynthese der Hydrogenasen

Die Biosynthese von [FeS] Clustern und deren Inkorporation in das Apoprotein ist auf die Anwesenheit von Hilfsproteinen angewiesen. Die kodierenden Gene dieser sogenannten Chaperone, welche auch für die Bildung und korrekte Faltung der restlichen [NiFe] Hydrogenase zuständig sind, lassen sich im Genom oft in der Nähe der Strukturgene finden. Diese sind in Operons organisiert, welche neben den Strukturgenen für die große und kleine Untereinheit auch die Promotoren und Operatoren zur Transkription enthalten. Die Chaperone, die z.T. auch innerhalb des Operons der Hydrogenase kodiert sind, sind an der Maturierung der großen Untereinheit beteiligt, so z.B. an der Inkorporation der Cyanid- und Carbonyl-Liganden. Darüber hinaus tragen sie zu der Integration von Nickel und Eisen in das aktive Zentrum und bei der Abspaltung einer C-terminalen Verlängerung nach Fertigstellung des aktiven Zentrums bei (94). Im Anschluss an diese Proteolyse kann die kleine Untereinheit gebunden werden. Die [FeS] Cluster Synthese der kleinen Untereinheit wird in vielen Bakterien durch die Produkte des *isc*-Operons (*isc* = iron sulfur cluster) unterstützt. Dieses setzt sich zusammen aus den Genen *iscS*, *iscU*, *iscA* und *iscR*. So wird in *E. coli* die Inkorporation von Schwefel zur Maturation von unterschiedlichsten Kofaktoren und Proteinen durch das IscS Protein erleichtert (95-98). Der Lieferant des Eisens zur Ausbildung der Cluster ist bisher jedoch unbekannt (40). Das Protein IscU stellt das Grundgerüst für den [FeS] Cluster Aufbau dar (99), indem es mit IscS einen Komplex bildet (100,101), von dem aus die gebildeten [FeS] Kofaktoren auf andere Proteine übertragen werden (102). Dem Protein IscA wird eine Vermittler-Rolle zugeschrieben, das die [FeS] Cluster von IscU auf

das Zielprotein überträgt (103). Eine Kontrolle über die Anzahl der gebildeten Cluster erfolgt mittels des IscR Proteins, das einen Repressor des *isc*-Operons darstellt (104,105). Ein weiterer Mechanismus der [FeS] Cluster Bildung involviert die Gene des *suf*-Operons (*suf* = sulfur mobilization) (106). Auch dieses System wurde in *E. coli* entdeckt und wird vermutlich bei oxidativem Stress oder Eisenmangel von der Zelle verwendet (während gleichzeitig der Repressor der *isc*-Maschinerie aktiviert wird) (107), wohingegen die Produkte des *isc*-Operons auch in Standardsituationen ihre Anwendung finden (108).

### 1.5 Suche nach ungewöhnlichen Hydrogenasen

Neben der Untersuchung der Sauerstofftoleranz verschiedener Hydrogenasen ist auch die Suche nach thermostabilen oder in anderer Weise beständigen Enzymen wichtig für eine denkbare Anwendung von Hydrogenasen als regenerierbare Energiequelle. Die Schwierigkeit hierbei besteht in der nahezu unendlichen Vielfalt an Mikroorganismen, so wird zum Beispiel die Anzahl verschiedener Mikroorganismen im Boden auf über eine Million geschätzt (109). Eine Möglichkeit, diese große Anzahl an Organismen zu untersuchen und auf diese Weise nach interessanten Enzymen zu suchen, findet sich in der Metagenomik. Als Metagenom bezeichnet man die Gesamtheit der genetischen Information aller Mikroorganismen in einem bestimmten Habitat und zu einem bestimmten Zeitpunkt. In der Metagenomik bzw. Metagenomanalyse wird genomische DNA aus einer Umweltprobe direkt isoliert und anschließend daraus eine DNA-Bibliothek, Metagenombank genannt, erstellt. Mittels verschiedener Screening-Verfahren kann man sowohl sequenzbasierte als auch funktions- oder aktivitätsbasierte Ziele verfolgen. Ein vielversprechendes Verfahren zur Suche nach bestimmten Proteinen aus Umweltproben stellt das Microarray dar (110,111), mit welchem durch DNA-Hybridisierung gegen immobilisierte Oligonukleotide vorgegebener Sequenz konservierte Bereiche der DNA aufgedeckt werden können. Diese Technologie hat gegenüber herkömmlichen Verfahren wie der Polymerasekettenreaktion den immensen Vorteil, dass eine Vielzahl von Klonen der Metagenombanken gleichzeitig untersucht werden kann

## Einleitung

(112). Auch eine langwierige Sequenzierung, um herauszufinden, in welchen Klonen einer Metagenombank sich die gesuchte Sequenz befindet, ist auf diesem Weg nicht nötig.

Mit dieser Technik können neuartige Enzyme isoliert werden, die zum Beispiel durch ihre Anpassung an extreme Habitats für die Forschung von großer Bedeutung sein können.

## 1.6 Motivation und Zielsetzung

Die Nutzung nicht nachwachsender Rohstoffe zur Energieerzeugung stellt ein großes Problem der modernen Welt dar. Eine umweltschonende Alternative zu fossilen Brennstoffen könnte die Energiegewinnung mittels Wasserstoff sein. Da jedoch die Produktion von Wasserstoff in großem Maßstab momentan noch vom Einsatz fossiler Brennstoffe als Primärenergieträger abhängt, muss nach einer Alternative geforscht werden, um nachhaltig und umweltfreundlich Energie erzeugen zu können. Hydrogenasen katalysieren sowohl die Oxidation von Wasserstoff als auch dessen Produktion und könnten daher als alternativer Energielieferant dienen. Für eine biotechnologische Anwendung dieses Energielieferanten ist ein umfassendes Verständnis des Wasserstoff-Metabolismus entscheidend. Aus diesem Grund sollen in der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Hydrogenasen untersucht werden. Mit Hilfe eines Screening-Verfahrens namens Microarray soll nach neuartigen Hydrogenasen aus einem Hochtemperatur-Habitat gesucht werden, um thermostabile Enzyme zu finden und deren Andersartigkeit gegenüber Enzymen aus mesophilen Organismen zu analysieren. Eine Möglichkeit, diese Informationen zu erhalten, ist die Isolierung der Ziel-DNA mittels Subklonierung nach erfolgter Detektion der Hydrogenase-Gene. Die zugehörigen Proteine könnten so nach einer heterologen Expression in einem ebenfalls thermostabilen Wirt gezielt aufgereinigt und charakterisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Sauerstoffsensitivität von Hydrogenasen, da eine Toleranz gegenüber dem ubiquitär vorkommenden Sauerstoff unabdingbar ist, wenn eine biologische Brennstoffzelle, z.B. bestehend aus dem Photosystem II der Pflanzen oder Algen und einer Hydrogenase, verwirklicht werden soll. Aus diesem Grund soll die sauerstofftolerante [NiFe] Hydrogenase aus *A. aeolicus* detaillierter erforscht werden. Es sind bereits zahlreiche Informationen über dieses Enzym vorhanden, unter anderem konnte die Sauerstofftoleranz bereits einem ungewöhnlichen proximalen Cluster in der kleinen Untereinheit zugeschrieben werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen Informationen über diesen neuartigen Kofaktor

## Einleitung

liefern, der zum ersten Mal separiert von den Einflüssen der anderen Cluster und der großen Untereinheit analysiert werden soll. Hierfür soll die Sequenz des [4Fe-3S] Clusters heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, das Protein anschließend aufgereinigt und spektroskopisch untersucht werden. Ein Vergleich zu einem Standard [4Fe-4S] Cluster, welcher nicht die in *A. aeolicus* enthaltenen zwei zusätzlichen clusterkoordinierenden Cysteine aufweist, soll erbracht werden.

Auch die sauerstofftolerantere [NiFeSe] Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F (im Vergleich zu [NiFe] Hydrogenasen) wird in der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert. Die selenhaltigen Hydrogenasen sind zum Teil bereits gut erforscht, so dass die hier vorgelegten Arbeiten das Verständnis erweitern sollen. Es ist wichtig, den Redox-Mechanismus des Enzyms zu verstehen, was hier auf spektroskopischem Weg mittels Techniken wie EPR und FTIR erfolgen wird. Der besagten Sauerstofftoleranz soll mit Hilfe von elektrochemischen Messungen nachgegangen werden. Die Ergebnisse hieraus werden mit denen anderer [NiFeSe] Hydrogenasen verglichen. Um diese Ergebnisse erbringen zu können, wird das Enzym in hoher Konzentration benötigt, weshalb ein wichtiger Aspekt dieses Kapitels die Optimierung der Anzucht von *D. vulgaris* Miyazaki F unter Bedingungen war, bei denen bevorzugt die [NiFeSe] Hydrogenase gegenüber der [NiFe] Hydrogenase exprimiert wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Organismen, Vektoren und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen, Vektoren und Oligonukleotide sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

**Tabelle 2.1:** Verwendete Bakterienstämme.

Stämme	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> λDE3	New England BioLabs, England
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1,</i> <i>hsdR17, supE44, relA1, lacF',</i> <i>proAB, lacIq, lacZ_M15, Tn10</i> TcR	New England BioLabs, England
<i>E. coli</i> VCS 257	DP50 <i>sup</i> F[ <i>supE44 supF58</i> <i>hsd53</i> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) <i>dapD8</i> <i>lacY1glnV44 Δ(gal-uvrB)47</i> <i>tyrT58 gyrA29 tonA53</i> Δ( <i>thyA57</i> )]	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Δ <i>iscR</i>	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> <i>iscR::kan</i> λDE3	(113)
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	IAM 12604; DSM 19637	Leibnitz Institut DSMZ, Braunschweig
<i>A. vinosum</i> (ATCC 17899)	Auch: <i>Chromatium vinosum</i> DSM 180 Oxidiert Sulfid und Thiosulfat; anaerobes Schwefelbakterium	Leibnitz Institut DSMZ, Braunschweig
<i>D. desulfuricans</i> (ATCC 7757)	Chromosom-Accession- Nummer: NC_007519.1	Leibnitz Institut DSMZ, Braunschweig

## Material und Methoden

<i>A. aeolicus</i> VF5	Chromosom-Accession- Nummer: NC_000918	
------------------------	---	--

**Tabelle 2.2:** Verwendete Plasmide und Konstrukte (Vektorkarten siehe Anhang 8.1).

Plasmide	Charakteristika	Größen [kb]	Referenz
pDrive	Ampicillin <sup>R</sup> , Kanamycin <sup>R</sup> , lacZ, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , PCR- Klonierungsvektor	3,85	Qiagen, Hilden
pDrive::9kb	pDrive enthält 9 kb-Gen der Metagenombank aus Hydrothermalquelle	13,13	Diese Arbeit
pJET1.2	Ampicillin <sup>R</sup> , Klonierungsvektor, linearisiert mit <i>EcoRV</i>	2,97	Thermo Scientific, Waltham, USA
pJET::5kb	pJET enthält 5kb-Gen der Metagenombank aus Hydrothermalquelle, blunt- end kloniert	8,2	Diese Arbeit
pWE15	Ampicillin <sup>R</sup> , Apr Neo <sup>R</sup> λcos <sup>+</sup> , Cosmid-Vektor	8,16	Stratagene, Heidelberg
pCR2.1	Ampicillin <sup>R</sup> , Kanamycin <sup>R</sup> , lacZ, Klonierungsvektor	3,9	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
pBluescript II SK+	Ampicillin <sup>R</sup> , lacPOZ', Klonierungsvektor	2,9	Stratagene, Heidelberg
pET-28a	Kanamycin <sup>R</sup> , His-Tag, Expressionsvektor	5,37	Novagen, Darmstadt
pET-15b::pfsA	Ampicillin <sup>R</sup> , <i>pfsA</i> kloniert über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in	6,35	Diese Arbeit

	Expressionsvektor pET15b		
pET-21a:: <i>pfsA</i>	Ampicillin <sup>R</sup> , <i>pfsA</i> kloniert über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> in Expressionsvektor pET21a	5,97	Diese Arbeit
pET-21a:: <i>spcD</i>	Ampicillin <sup>R</sup> , <i>spcD</i> kloniert über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> in Expressionsvektor pET21a	5,98	Diese Arbeit
pET-51b:: <i>pfsA</i>	Ampicillin <sup>R</sup> , <i>pfsA</i> kloniert über <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i> in high-copy Expressionsvektor pET51b	5,86	Diese Arbeit
pET-51b:: <i>spcD</i>	Ampicillin <sup>R</sup> , <i>spcD</i> kloniert über <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i> in high-copy Expressionsvektor pET51b	5,88	Diese Arbeit
pGro7	Chloramphenicol <sup>R</sup> , <i>araB</i> -Promotor, Expressionsvektor	5,4	Takara Bio Inc.
pG-KJE8	Chloramphenicol <sup>R</sup> , <i>araB</i> - und <i>Pzt-1</i> -Promotor, Expressionsvektor	11,1	Takara Bio Inc.

**Tabelle 2.3:** Verwendete Primer.

Primer	Sequenz (5'-3')	Länge [bp]	GC-Gehalt [%]	Tm [°C]
YP_002958 425A_fw	TTCATAGCCGAGAGAATATGCGG	23	48	63
YP_002958 425_rev	AACCCTCTCGGTACAGGAGTAG	22	55	64

## Material und Methoden

YP_002958 610A_fw	TTCCTCGCCGAGAGAATCTGCGGAATCTGT	30	53	73
YP_002958 610_rev	AACCCTCTCTGTACAGGAGTAGCACGGGT	29	55	73
YP_002306 658A_fw	TTCCAGCACTCGACGAGCTAC	21	57	63
6YP_00230 6658_rev	ATCTATGCTCGCTATGATGAGCG	23	48	63
YP_002307 956A_fw	TTCATAGCGGAGAGAATATGTGGA	24	42	62
YP_002307 956_rev	AACTCTCTCCGTACAGGAGTAG	22	50	62
DFKVPVYK	GAYTTYAARGTNCCNGTNTAYAA	23		
QVVDVES G	CNYTCNACRTCNACNACYTG	20		
381AA_HL_ for	GACTTYAARGTNCCNGTNTA	20		
555 AA_HL_rev	CTGNACNCKYTCNGTRCA	18		
9kb_fw_2	AAAGCACGTCCATCTCACACCACCAC	26	54	69
9kb_rev_3	AACCCGCCATCGAACTATAAATGAAC	27	44	67
Thermo_5k b_fw	ATGAGATACGTTAAGCTTCCCAAAG	25	40	63
Thermo_5k b_rev	ACTGTTCCGGCTGAGACTTTTTAGTTC	26	42	65

Alle Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

## 2.2 Medien und Zusätze

### 2.2.1 Medien

Alle Medien wurden vor Gebrauch für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung der Medien wurde Wasser aus einer Millipore-Anlage mit einer spezifischen Leitfähigkeit von ca.  $18,2 \text{ M}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet. Medienzusätze wurden sterilfiltriert (Minisart Injektionsfilter, 0,22  $\mu\text{m}$  PES, Firma Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) und zu den autoklavierten Kulturmedien gegeben.

#### Luria Bertani Hochsalz Medium (Miller's LB):

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Agar (nur für Agarplatten)	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 1000 ml

Die sterilfiltrierten Lösungen wurden erst direkt vor Anwendung des Mediums hinzugegeben.

Medien zur Anzucht anaerober Bakterien:

#### Stammkulturmedium (PB): pH 7,2

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
CaSO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	2 g
Natriumlactat 70 %	3,5 g
Hefeextrakt	1 g
Ascorbinsäure	0,1 g
Thioglycolat	0,1 g
chelex H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 1000 ml

## Material und Methoden

pH 7,2

### Postgate C Medium (114): pH 7,5

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,04 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,06 g
Hefeextrakt	1 g
Trinatriumcitrat-Dihydrat	0,3 g
Natriumlactat 70 %	6 g
chelex $\text{H}_2\text{O}_{\text{tridest}}$	ad 1000 ml
pH 7,5	

Nach dem Autoklavieren wurde dem Postgate C- (PC) Medium sterilfiltriertes 0,004 g/l Eisensulfat-Heptahydrat, 1  $\mu\text{M}$  Natriumselenid und 1  $\mu\text{M}$  Nickelchlorid zugefügt.

### 2.2.2 Antibiotika und Zusätze

Antibiotika und andere Medienzusätze, wie IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), wurden für die verschiedenen Bakterienstämme in unterschiedlichen Konzentrationen benötigt. Tabelle 2.4 gibt Auskunft über die Endkonzentration im Medium und das jeweilige Lösungsmittel. Die 1000-fach konzentrierten Stammlösungen wurden sterilfiltriert und aliquotiert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Abkühlen der autoklavierten Medien auf ca.  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zusätze hineingegeben.

**Tabelle 2.4:** Verwendete Medienzusätze.

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration im Medium [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Ampicillin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	100
Kanamycin	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	50
Chloramphenicol	Ethanol	50
Tetracyclin	Ethanol	Zur Induktion von pG-KJE8 Vektor 5 ng/ml
Arabinose	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	Zur Induktion 0,5 mg/ml
IPTG	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	100
X-Gal	Dimethylformamid	50

## 2.3 Kultivierung und Stammhaltung der Bakterien

### 2.3.1 Zellanzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* Kulturen erfolgte im LB-Flüssigmedium in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben unter Schütteln und eventueller Zugabe selektiver Antibiotika bei 37 °C. Das Animpfen der Kulturen erfolgte entweder mit Einzelkolonien einer Agarplatte oder einem Aliquot von Kulturmaterial einer Stammsammlung. Für die Anzucht größerer Volumina wurde zunächst eine Vorkultur erstellt, aus der anschließend die Hauptkultur überimpft wurde.

Für die Bakterienanzucht auf Agar-Platten wurde ein Volumen von je ca. 20 ml des warmen Mediums in Petrischalen gegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 2.3.2 Zellanzucht von *D. vulgaris* MF

Zur Kultivierung von DvMF in FM- oder PC-Medium wurden zunächst 7 x 50 ml Vorkulturen aus Stammkulturen angeimpft, welche in PB-Medium gelagert waren. Das Animpfen erfolgte immer in der anaeroben Atmosphäre einer Glove-box (Coy Lab Products, Grass Lake, USA) bei circa 98 % Stickstoff und 2 % Wasserstoff. In dieser wurde Sauerstoff, der von außen eingedrungen ist, durch Palladium-Katalysatoren zu Wasser umgesetzt. Der Sauerstoff- und Wasserstoffgehalt innerhalb der Glove-box wurde mittels eines Gasanalysiergerätes überprüft. Die Hartplastikdeckel der Flaschen wurden durch ein Septum ersetzt. Diese Vorkulturen ließ man für zwei Tage bei 37 °C wachsen. Dann wurden sie auf 3 x 1 l Kulturen überimpft, welche wiederum zwei Tage bei 37 °C wuchsen. Anschließend wurde der 10 l Fermenter, der mit 7 l Medium befüllt wurde, mit 3 l der Zwischenkultur angeimpft und für weitere drei Tage bei 37 °C inkubiert. Zur Sicherstellung der anaeroben Atmosphäre wurde konstant Stickstoff in den Fermenter eingeleitet. Der pH-Wert wurde mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zwischen 7,0 und 7,4 gepuffert. Während des Wachstums wurden an Tag zwei und drei je 100 ml sterilisiertes Natriumlactat (50 % w/v in chelex-

gereinigtem Wasser) zu den Kulturen gegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei  $10000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min geerntet; das erhaltene Pellet wurde bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Proteinaufreinigung weggefroren.



**Abbildung 2.1:** 10 | Glasfermenter mit Wasserbad, pH-Messgerät, Säurepumpen und Stickstoffbegasung.

### 2.3.3 Herstellung von Glycerin-Stammkulturen

Zur Langzeitlagerung wurden  $600 \mu\text{l}$  einer frischen ÜN (über Nacht)-Kultur mit  $400 \mu\text{l}$  86 %-igem Glycerin versetzt und in einem Schraubdeckel-Reaktionsgefäß bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.4 Bestimmung der Zelldichte ( $\text{OD}_{600}$ -Messung)

Zur photometrischen Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen bedient man sich der UV/vis Spektroskopie. Dies ist die Messung von Wellenlänge und Intensität der Absorption von nah-ultraviolettem und sichtbarem Licht einer Probe. Hierfür wurden Halbmikro-Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Brand) verwendet. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{600}$ ) in einem Zweistrahl-Absorptionsphotometer (Shimadzu). Als Referenz wurde reines Medium als Nullstandard kalibriert. Für die Berechnung

## Material und Methoden

der Zelldichte wurde für *E. coli* Zellen angenommen, dass eine OD<sub>600</sub> von 0,1 etwa einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml entspricht (115).

### 2.5 Molekularbiologische Techniken

Bei allen molekularbiologischen Arbeiten wurden zur Inaktivierung von Nukleasen hitzestabile Geräte und Lösungen bei 121 °C und 1,5 bar für 20 min autoklaviert. Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70 % Ethanol gespült und benötigte Lösungen sterilfiltriert.

#### 2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

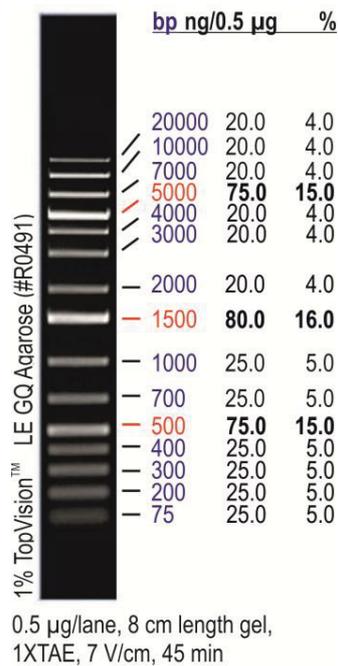
DNA-Lösungen, welche durch PCR, Restriktion oder Plasmidisolierung entstanden, wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Größe und Quantität hin untersucht und separiert. Dafür wurden 0,8-2 %-ige Agarose-Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 110 V für 30-50 min in 1-fach konzentriertem TAE-Puffer durchgeführt. Zuvor wurde die Probe mit Ladepuffer (0,2 Volumen) gemischt, um eine Visualisierung zu ermöglichen und die Probe im Gel zu beschweren. In der SYBR Green (GE Healthcare, Freiburg) basierten Färbemethode wurde die DNA vor der Elektrophorese mit dem Färbemittel in einem Verhältnis von 1:5000 vermischt. Die angefärbte DNA konnte dann unter UV-Belichtung detektiert werden. Als Referenz wurde ein Marker (GeneRuler™ 100bp/1kb Plus DNA Ladder, Fermentas, Abbildung 2.2) verwendet, mit dessen Hilfe die Größe und Intensität der Banden abgeschätzt werden konnte.

#### TAE-Puffer (50x): pH 8,1

Tris	2 M
EDTA pH 8,0	100 mM
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 1000 ml
pH 8,1	

#### Ladepuffer:

Glycerin	30 % (v/v)
EDTA pH 8,0	50 mM
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)



**Abbildung 2.2:** 1 kb-Marker (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) zur Größen- und Mengenbestimmung von DNA.

### 2.5.2 Blau-Weiß-Selektion von rekombinanten Klonen

Um nach *E. coli*-Klonen mit rekombinanten Plasmiden zu „screenen“, wurde die Methode der Blau-Weiß-Selektion angewandt. *E. coli* XL1-Blue- und DH5 $\alpha$ -Stämme besitzen auf ihrem Chromosom eine Mutation im lacZ-Gen, welches sich im lac-Operon befindet. Das lacZ-Gen besitzt die genetische Information für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase, welches normalerweise das Disaccharid Lactose an der  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindung in Galactose und Glucose hydrolytisch spaltet. Ohne entsprechendes Gen können diese Stämme keine  $\beta$ -Galactosidase exprimieren. Neben Lactose vermag die  $\beta$ -Galactosidase auch X-Gal als Substrat zu nutzen, das dann zu Galactose und einem Indoxylderivat hydrolysiert wird. Die Kolonien erscheinen durch die folgende Oxidation des Indoxylderivates auf den Agarplatten blau, ohne  $\beta$ -Galactosidase weiß. IPTG, als Lactoseanalogon, induziert die Synthese von  $\beta$ -Galactosidase, indem es als Induktor an den lac-Repressor bindet, diesen inaktiviert und den Weg für die RNA-Polymerase freigibt. Bei molekularbiologischen Arbeiten wird ein Plasmid in die Zellen transformiert, welches das lacZ-Gen mit einer integrierten multiplen

## Material und Methoden

Klonierungsstelle (MCS, multiple cloning site) besitzt. In diese MCS werden im Zuge der Klonierung heterologe Gene eingebracht. Nichtrekombinante Plasmide mit intaktem lacZ-Gen übernehmen die Funktion des defekten lacZ auf dem Chromosom, die Kolonien werden auf Platten mit X-Gal/IPTG blau. Rekombinante Plasmide erscheinen dagegen weiß, da die heterologe DNA das lacZ-Gen auf dem Plasmid inaktiviert. Um sicher zu gehen, dass weiße Kolonien auch rekombinante Plasmide enthalten, wurde zusätzlich mit Antibiotika selektiert.

### 2.5.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

#### 2.5.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Extraktion von Proteinen aus DNA-Lösungen, beispielsweise nach einem Restriktionsverdau, wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1 (v/v/v)) versetzt und gründlich durchmischt. Zur Phasentrennung wurden die Ansätze 20 min bei 18000 x g und 4 °C zentrifugiert und die wässrige, DNA-haltige Oberphase vorsichtig abgehoben. Zur Entfernung von Phenolresten wurde noch eine Extraktion mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA mit Ethanol (s.1.5.3.2).

#### 2.5.3.2 Fällung von DNA mit Ethanol oder Isopropanol

Zum Fällern von DNA wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (96 % (v/v)) oder 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Nach Durchmischung und Inkubation für 30 min auf Eis konnte die DNA durch Zentrifugation (18000 x g, 4 °C, 15-30 min) gefällt werden. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und dann in der Vakuumzentrifuge (Savant SPD111V SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific, Waltham, USA) für 5-10 min getrocknet. Die DNA wurde nun im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> resuspendiert.

Zur Konzentrierung von DNA wurde alternativ ein Christ Alpha 1-4 Laborgefrierdetrockner (Omnilab, Bremen) verwendet, an dem mittels einer Pumpe

das Lösemittel abgezogen wurde, so dass nur getrocknete DNA verblieb, welche anschließend in der gewünschten Menge Lösemittel wieder aufgenommen werden konnte.

### 2.5.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ . Durch die Bildung der Quotienten von Absorptionswerten verschiedener Wellenlängen kann die Reinheit der DNA ermittelt werden. Für reine DNA-Lösungen gilt als Richtwert  $OD_{260}:OD_{280} \geq 1,8$  (116), niedrigere Werte weisen auf Proteinverunreinigungen hin.

## 2.5.4 Isolierung von DNA

### 2.5.4.1 Plasmid-DNA-Isolierung

Die Plasmidisolierung wurde zum einen mittels des *QIAprep spin Miniprep Kits* (QIAGEN, Hilden) durchgeführt, zum anderen durch eine nicht-Kit-basierte Alkalische Lyse-Methode. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus 96-well Mikrotiterplatten wurde das *Favorprep 96-well plasmid-DNA extraction kit* (Favorgen Biotech Corporation, Pingtung, Taiwan, siehe 3.1.4) verwendet.

#### ***QIAprep spin Miniprep Kit***

Die Plasmidisolierung mit Hilfe des Kits beruht auf dem Prinzip der Alkalischen Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von der Adsorption der DNA an eine Silicamembran in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration.

Alle im Kit enthaltenen Puffer wurden nach den Angaben des Herstellerprotokolls verwendet. Eine Übernachtskultur von *E. coli* Zellen, welche das Plasmid trugen, wurde in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C angezogen. Zum Ernten der Zellen wurden 4 ml dieser Kultur bei 2370 x g für 10 min in der Universal 320R Zentrifuge (Hettich Lab Technology, Tuttlingen) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250  $\mu\text{l}$  P1-Puffer

## Material und Methoden

resuspendiert. Die Zellen wurden lysiert durch die Zugabe von 250 µl P2-Puffer und 4-6-maliges Invertieren. Zur Neutralisation wurden 350 µl N3-Puffer zugegeben und die Lösung wurde sofort 4- bis 6-mal invertiert, wodurch auch eine entsprechende Salzkonzentration zur Bindung an die Silicamembran eingestellt wurde. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 18000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf die *QIAprep*-Säule geladen und wiederum bei 18000 x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen. Bei *endA*<sup>+</sup> *E. coli* Stämmen wurde aufgrund ihrer hohen Nukleaseaktivität ein Waschschrift mit 500 µl PB-Puffer hinzugefügt. Die Entfernung der Salze erfolgte durch Waschen mit 750 µl ethanolhaltigem PE-Puffer und anschließendem Zentrifugieren bei 18000 x g für 1 min. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule zur Entfernung des restlichen Ethanols nochmals für eine Minute zentrifugiert und anschließend in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (E-Cup) überführt. Die Elution der DNA erfolgte durch die Zugabe von 50 µl Elutionspuffer EB. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 18000 x g für 1 min erhalten und bei -20 °C weggefroren.

### **Alkalische Lyse**

Die Methode der Alkalischen Lyse wurde für die Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA genutzt und von Birnboim und Doly (117) entwickelt. Mit den Puffern P1, P2, P3 (s.u.) wurden die Zellpellets resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wurde mit 500 µl eines Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v)-Gemisches vermischt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch 5 min zentrifugiert. Nachdem die obere Schicht in ein neues 1,5 ml E-Cup überführt wurde, konnte die DNA durch Zugabe von 500 µl kaltem Isopropanol präzipitiert werden. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert und für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zwei Mal mit je 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen, gefolgt von je einer Zentrifugation für 2 min bei 4 °C. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und die DNA in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> resuspendiert.

P1-Puffer: pH 8,0

Tris-HCl	1,21 g
EDTA	0,74 g
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 200 ml
pH 8,0	

P2-Puffer:

NaOH	4,0 g
SDS	5,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 500 ml

P3-Puffer: pH 5,5

Kaliumacetat	62,73 g
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 200 ml
pH 5,5 (einstellen mit Eisessig)	

Alle Puffer wurden vor der Verwendung sterilfiltriert.

#### 2.5.4.2 DNA-Isolierung durch Extraktion aus Agarose-Gelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen stand das QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN zur Verfügung. Das Prinzip beruht, wie beim Miniprep Kit, auf der Adsorption der DNA an eine Silicamembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.

DNA-Fragmente, die durch PCR oder Restriktion entstanden, wurden in 0,8 %-igen Agarose-Gelen durch Elektrophorese (siehe 2.5.1) aufgetrennt. Das Ziel-DNA-Fragment wurde aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles E-Cup überführt. Nach der Zugabe einer entsprechenden Menge QG-Puffer wurde die Agarose bei 50 °C und wiederholtem Vortexen vollständig aufgelöst. Zur Bindung der DNA an die Silicamembran wurde die Probe auf die QIAquick-Säule gegeben und für 1 min bei 18000 x g zentrifugiert. Ein Waschschrift mit 500 µl QG-Puffer diente der Entfernung aller Agarosereste. Durch einen weiteren Waschschrift mit 750 µl ethanolhaltigem PE-Puffer sollten alle Salze entfernt werden. Die DNA wurde in 30-50 µl EB-Puffer eluiert und bei - 20 °C gelagert.

#### 2.5.4.3 Isolierung genomischer DNA

Um genomische DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierzu wurden zunächst die entsprechenden Zellen über Nacht angezogen und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 200 µl PBS Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 20 µl Proteinase K und 200 µl AL Puffer (ohne Ethanol) wurde die Lösung nach Vortexen für 10 min bei 56 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100 %), wonach die Mischung in die DNeasy Mini Spin Säulen pipettiert wurde. Nach der Zentrifugation der Säulen bei 6000 x g für 1 min und dem Verwerfen des Durchflusses, wurden 500 µl AW1 Puffer zugegeben und für 3 min zentrifugiert. Der Schritt wiederholte sich mit der Zugabe von 500 µl AW2 Puffer. Anschließend wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und nach Zugabe von 100 µl AE Puffer und einer Inkubationszeit von einer Minute für eine weitere Minute bei 6000 x g zur Elution der DNA zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt, um die Menge an eluierter DNA zu maximieren.

#### 2.5.5 Fluoreszenzmarkierung von DNA

Zur Vorbereitung der Proben für die Microarray Analyse (2.11), wurde eine Cosmidbank, die Material aus einem Hydrothermalfeld im mittelatlantischen Rücken enthielt, abgestempelt. Hierfür wurde mittels eines Stempels die Kultur von der Mikrotiterplatte in eine Deep-Well-Platte überführt und in 1250 µl LB-Medium über Nacht bei 130 rpm in 37 °C inkubiert. Mittels des FavorPrep 96-Well-Plasmid Kits wurde die Cosmid-DNA isoliert (Elution mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub>). Der korrekte Inhalt der Cosmidbank wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese (2.5.1) überprüft. Die DNA wurde zum Erhalt von reproduzierbar gleichen Fragmenten mit *AluI* für 3 h bei 37 °C vollständig geschnitten. Der Verdau wurde bei 65 °C für 20 min thermisch inaktiviert und auf einem Agarose-Gel überprüft. Eine Aufreinigung erfolgte durch das QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden) und das Volumen der aufgereinigten DNA wurde anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> auf 30 µl eingestellt. Nach Zugabe von 5 µl einer 10-fach konzentrierten

Lösung zufälliger Hexamere als Primer und 5 µl Klenow Puffer wurde die Lösung für 5 min bei 96 °C erhitzt, um die DNA zu denaturieren. Es wurde sofort auf Eis gekühlt und 5 µl eines 10-fachen dNTP Mixes zugegeben (jeweils 1,2 mM dATP, dTTP, dGTP und 0,6 mM dCTP). Außerdem wurden 2,5 µl Cy5- oder Cy3-markiertes dCTP sowie 2,2 µl Klenow-Fragment (exo-, Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben. Alle folgenden Reaktionen und Lagerungen erfolgten möglichst lichtgeschützt, da die Farbstoffe lichtempfindlich sind. Die Mixtur wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die markierte DNA wurde mittels des illustra™ CyScribe™ GFX™ purification kits (GE Healthcare, Freiburg) aufgereinigt und in 35 µl H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> eluiert.

## 2.5.6 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.5.6.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Typ II Restriktionsendonukleasen erkennen (je nach Spezifität) eine meist palindromische Sequenz aus 4 – 8 Basenpaaren auf der DNA (118). An diese Erkennungssequenz können sie gezielt binden und die Phosphodiesterbindung zwischen zwei benachbarten Basen hydrolysieren, wobei, je nach Restriktionsenzym, entweder glatte (blunt ends) oder 3'- / 5'- überhängende Enden (sticky ends) entstehen.

Die DNA-Spaltung von Plasmiden und PCR-Produkten mit Restriktionsenzymen wurde sowohl für analytische als auch für präparative Anwendungen durchgeführt (Zusammensetzung der Ansätze siehe Tabelle 2.5).

## Material und Methoden

**Tabelle 2.5:** Ansätze für die analytische und präparative DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen.

	<b>10 µl-Ansatz</b>	<b>50 µl-Ansatz</b>
Verdau	analytisch	präparativ
10-fach Puffer	1 µl	5 µl
Restriktionsenzym	0,5 µl	1 µl
DNA	1 µg	5 µg
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 10 µl	ad 50 µl

Analytische Ansätze wurden mit FastDigest® Restriktionsenzymen der Fa. Fermentas durchgeführt, präparative Ansätze wurden meist mit herkömmlichen Restriktionsenzymen (Fa. Fermentas bzw. Fa. New England BioLabs Inc.) über Nacht inkubiert. Die Inkubations- und Inaktivierungsbedingungen wurden entsprechend der Herstellerangaben gewählt.

Bei der Durchführung von Doppel-Restriktionen wurde versucht, mit zwei Enzymen gleichzeitig zu verdauen, um einen Verlust der DNA durch mehrfaches Aufreinigen zu vermeiden. Hierbei war darauf zu achten, ob dies für die entsprechenden Enzyme aufgrund ihrer Aktivität in verschiedenen Puffern möglich war (s. hierzu auch Doubledigest auf [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)).

Im Anschluss an einen präparativen Restriktionsverdau konnte die geschnittene DNA aufgereinigt und für Ligationen eingesetzt werden.

### 2.5.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die Verknüpfung von Vektor- und Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) im entsprechenden 10x T4-Ligase Puffer. Zuvor geschnittene DNA-Fragmente wurden sowohl mittels *sticky-end*- als auch mittels *blunt-end*-Ligation miteinander verbunden. Dabei betrug das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA ungefähr 1:3. Der Ansatz (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.6) wurde 16 h bei 16 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 70 °C inaktiviert.

**Tabelle 2.6:** Ligationsansatz für *sticky-end*- und *blunt-end*-Ligationen.

	<b><i>Sticky-end</i>-Ligation</b>	<b><i>Blunt-end</i>-Ligation</b>
Vektor-DNA	20-100 ng	20-100 ng
Insert-DNA	3:1 zum Vektor	3:1 zum Vektor
10x T4-Ligase Puffer	2 µl	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 unit	5 units
PEG 4000	---	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 20 µl	ad 20 µl

Durch die Zugabe von PEG 4000 zum *blunt-end*-Ligationsansatz wurde die Zusammenlagerung von Vektor- und Insert-DNA verbessert.

Im Anschluss an die Ligation wurde der Ansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

### 2.5.6.3 Ligation von DNA in den pDrive-Vektor

Für restriktionsunabhängige Subklonierungen wurde mit Taq-Polymerase amplifizierte DNA (mit A-Überhängen) in den pDrive-Vektor ligiert. Mit dem QIAGEN PCR Cloning Kit (Fa. Qiagen, Hilden) war eine effiziente Ligation von PCR-Produkten mit hohen Transformationsraten in *E. coli* möglich. Der pDrive-Vektor liegt im Kit bereits linearisiert mit U-Überhängen vor und konnte nach folgendem Ansatz mit dem aufgereinigten PCR-Produkt ligiert werden:

**Tabelle 2.7:** Ligationsansatz für Ligationen von DNA in den pDrive-Vektor.

pDrive-Vektor	1 µl (50 ng/µl)
PCR-Produkt	1-4 µl
2x-Ligationsmix	5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 10 µl

Nach zweistündiger Inkubation bei 16 °C wurde der Ansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

#### 2.5.6.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Eigenligation von linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, wurde *Antarctic Phosphatase* (Fa. New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main) verwendet, welche die Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppe von der DNA katalysiert. Nach der Restriktion von 5 µg Vektor-DNA wurden zu 70 µl Reaktionsansatz 1 µl *Antarctic Phosphatase* und 7 µl 10x-Antarctic Phosphatase-Reaktionspuffer zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und für 5 min bei 65 °C inaktiviert.

#### 2.5.7 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) erlaubt die Amplifikation eines gewünschten DNA-Abschnittes. Das Ziel-Gen oder -Operon wird so um den Faktor  $10^6$  angereichert und kann für weitere Klonierungen eingesetzt werden (Saiki *et al.*, 1988). Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte mit zuvor definierten Temperaturen. Nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge erfolgt die Anlagerung (*Annealing*) der zuvor synthetisierten, die Ziel-DNA flankierenden Primer. Anschließend wird durch eine hitzestabile Polymerase (*Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase) der jeweils komplementäre DNA-Strang synthetisiert (*Elongation*).

Die Annealing-Temperatur ( $T_{ann.}$ ) hängt von der Schmelztemperatur der gewählten Primer ab. Die Schmelztemperatur  $T_m$  wird nach der Formel von Chester und Marshak (1993) berechnet:

$$T_m (\text{°C}) = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - (650 / \text{bp}_{\text{Primer}})$$

$T_{ann.} (\text{°C}) = T_m - 5 \text{ °C}$ , wobei der niedrigere  $T_m$ -Wert beider Primer genutzt wird.

% GC = prozentualer Gehalt der Basen Guanin und Cytosin in der Primersequenz.

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze sowohl für die PCR mit *Taq*-Polymerase im mi-Hot *Taq* Mix (Fa. Metabion, Martinsried), als auch für die PCR mit *PfuTurbo* DNA Polymerase (Fa. Stratagene, Waldbronn).

**Reaktionsansatz mit *Taq*-Polymerase:**

mi-Hot <i>Taq</i> Mix	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	29 µl
Primer <sub>forward</sub> (25 pmol/ml)	4 µl
Primer <sub>reverse</sub> (25 pmol/ml)	4 µl
DMSO*	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl

\* DMSO erlaubt, die DNA-Matrize für eine längere Zeit einzelsträngig zu halten und führt so zu einer verbesserten Anlagerung der Primer.

Der Ansatz wird gut vermischt und auf fünf Ansätze mit je 18 µl aufgeteilt. Anschließend werden je 2 µl Template-DNA zugegeben.

Durch die Inhibierung der Polymeraseaktivität bei Raumtemperatur durch anti *Taq* DNA Polymerase Antikörper kann der Ansatz der Reaktion bei Raumtemperatur erfolgen, ohne dass unspezifische Anlagerungen und Primerschäden auftreten.

**Reaktionsansatz mit *Pfu*-Polymerase:**

H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	32 µl
Template-DNA	2 µl
dNTP (10 mM)	3 µl
Primer <sub>forward</sub> (25 pmol/ml)	2 µl
Primer <sub>reverse</sub> (25 pmol/ml)	2 µl
10x Puffer	5 µl
DMSO	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl (entspricht 2,5 units)

## Material und Methoden

Die *Pfu*-DNA-Polymerase generiert möglichst Sequenz-exakte DNA-Amplifikate, da sie eine sog. 3' → 5'-Exonuklease (proofreading)-Aktivität besitzt.

Die Durchführung der PCR erfolgte in speziellen Thermocyclern (*Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> gradient*, Eppendorf AG, Hamburg). In Tabelle 2.8 ist ein Standard-PCR-Programm aufgeführt; die verwendeten Primer inklusive ihrer Schmelztemperatur sind in Tabelle 2.3 wiedergegeben.

**Tabelle 2.8:** Standard-PCR-Programm. Die Dauer des Elongationsschrittes richtet sich nach der DNA-Polymerase, wobei sowohl für die *Taq*-Polymerase als auch für die *PfuTurbo*-Polymerase von einer Elongationsgeschwindigkeit von 1 kb/min ausgegangen wurde.

	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
30-35 Zyklen	Denaturierung	95 °C	30 sec
	Annealing	47-58 °C	50 sec
	Elongation	72 °C	1 kb/min
	Finale Verlängerung	72 °C	15 min

Im Anschluss an die PCR wurde das Amplifikat entweder mittels Agarose-Gel-Extraktion (siehe 1.5.4.2) oder über das QIAquick<sup>®</sup> PCR purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, um für weitere Klonierungsschritte die verbliebenen Nukleotide, Primer und das Polymerase-Enzym zu entfernen.

Für den zweitgenannten Aufreinigungsschritt wurden 5 Volumen des Puffers PBI zu einem Volumen des PCR-Ansatzes gegeben und vermischt. Nachdem die DNA an eine im Kit vorhandene QIAquick Säule gebunden wurde, wurde diese für 1 min bei 17900 x *g* zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen der DNA wurden 750 µl PE Puffer auf die Säule pipettiert und es wurde erneut für 1 min zentrifugiert. Da dieser Puffer Ethanol enthält, wurde die Säule erneut für 1 min zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Schließlich wurde die DNA mit zwei Mal 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> von der Säule eluiert, indem jeweils 1 min inkubiert und anschließend 1 min zentrifugiert wurde.

### 2.5.8 Transformationsverfahren

Zur Vervielfältigung der nach Ligation von Plasmiden mit heterologen DNA-Fragmenten erhaltenen Konstrukte wurde die DNA in kompetente Zellen transformiert, auf geeignete Nährmedien ausplattiert und nach erfolgter Inkubation auf positive Klone hin überprüft.

#### 2.5.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli* zur Transformation

*E. coli* ist wie viele andere Bakterienarten nicht natürlich kompetent. Zur Herstellung kompetenter Zellen wird *E. coli* mit hohen Konzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen behandelt. Diese Zellen können tief gefroren (-80 °C) gelagert werden.

Dafür wurden zunächst 2,5 ml einer über Nacht angezogenen Vorkultur in 250 ml LB Medium geimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4-0,6 angezogen. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 30 min auf Eis gekühlt. Nach der Zellernte, welche bei 1920 x g für 10 min bei 4 °C (Universal 320R Zentrifuge, Hettich Lab Technology, Tuttlingen) erfolgte, wurde der Überstand dekantiert und das Zellsediment sorgfältig auf Eis in 50 ml eisgekühltem 0,1 M Calciumchlorid resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 4 °C und 1520 x g zentrifugiert, gefolgt von einem weiteren Resuspensionsschritt in eiskaltem 0,1 M Calciumchlorid. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde wiederum zentrifugiert und das Pellet in 15 % Glycerol [in 0,1 M Calciumchlorid] resuspendiert. An einen erneuten Zentrifugierschritt schloss sich eine Resuspension in 2 ml derselben Lösung an. Je 50 µl Aliquots der chemisch kompetenten Zellen wurden in sterile 1,5 ml E-Cups überführt und bei -80 °C gelagert.

### 2.5.8.2 Hitzeschocktransformation von *E. coli* XL1-Blue und BL21 (DE3)

Bei -80 °C aufbewahrte Aliquots kompetenter *E. coli* XL1-Blue oder BL21 (DE3) Zellen wurden zunächst für 5 min auf Eis aufgetaut. 5 µl der zu transformierenden DNA wurden zu den kompetenten Zellen pipettiert, vorsichtig gründlich gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzeschocktransformation für exakt 90 sec bei 42 °C im Thermoblock und sofort eine Inkubation auf Eis für 5 min. Nach Zugabe von 700 µl kaltem LB-Medium zu dem Transformationsansatz wurde dieser für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend folgte das Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika und eine über Nacht-Inkubation bei 37 °C im Brutschrank.

## 2.6 Proteinchemische Methoden

### 2.6.1 Proteinreinigung

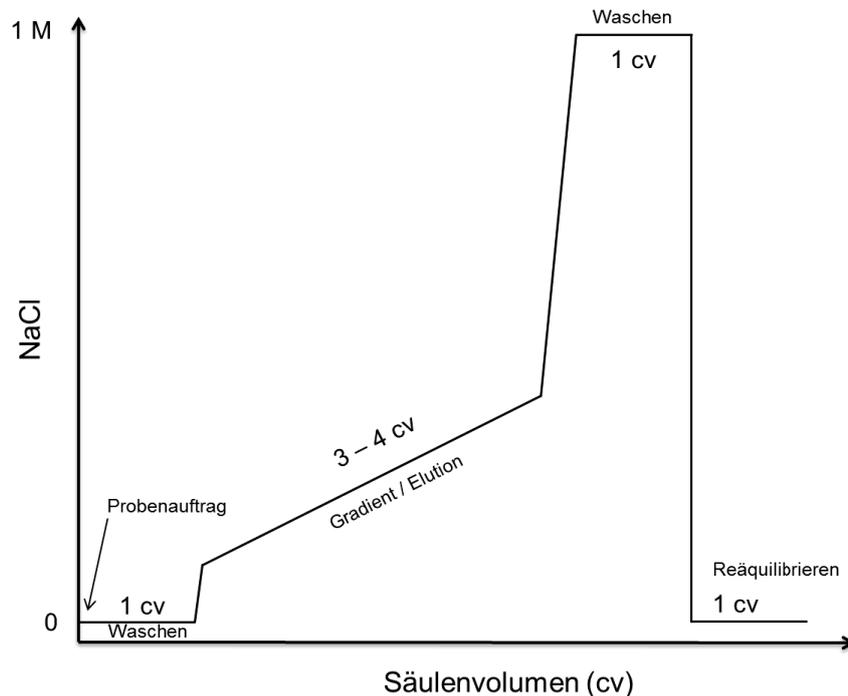
Alle Proteinreinigungsverfahren wurden bei 4 °C durchgeführt, um die Zielproteine vor Aktivitätsverlust zu schützen.

#### 2.6.1.1 FPLC (Fast protein liquid chromatography)

Zur Separation des Zielmoleküls wurde der Proteinextrakt (siehe 3.2.2.1) zunächst einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Trennung der Proteine bezüglich der Ladung der Seitenketten ihrer Aminosäuren. Diese können ungeladen, sauer oder basisch sein und beeinflussen somit die Gesamtladung des Proteins. Ein pH-Wert unter 7 bewirkt eine positive Gesamtladung des Proteins dank der Protonierung der geladenen Seitenketten, während ein positiverer pH-Wert aufgrund der Deprotonierung eine negative Gesamtladung des Proteins bewirkt. Sind positive und negative Ladungen ausgeglichen, befindet sich das Protein in seinem isoelektrischen Punkt, welcher für jedes Protein charakteristisch ist. Den pH-Wert des Puffers wählt man so, dass das Protein über elektrostatische

Wechselwirkungen an die Matrix der Säule bindet, das heißt bei einem Anionenaustauscher höher als den isoelektrischen Punkt des Zielproteins. Die Pufferkonzentration sollte mindestens 10 mM betragen, um eine ausreichende Pufferkapazität zu gewährleisten und um genügend Stabilität für das Protein zu garantieren. Als Puffer für die erste Säule bei der Aufreinigung der [NiFeSe] Hydrogenase wurde 20 mM Tris/HCl, pH 7,6, 10 mM NaCl verwendet. Allen Puffern wurde während der gesamten Reinigung zusätzlich 0,2 % SB12 (3-(*N*-dodecyl-*N,N*-dimethylammonio)-1-propansulfonat) zugegeben und alle Puffer wurden mit 0,22 µm Flaschenaufsatzfiltern gefiltert und entgast. Zunächst wurde die Matrix (Toyopearl DEAE Sepharose 650C, schwacher Austauscher, pH-Stabilität von 2-13, Partikelgröße ~ 100 µm, Säule XK 26/40) mit einem Säulenvolumen Laufpuffer (cv) äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurden ungebundene Proteine herausgewaschen, indem mit einem cv Laufpuffer gespült wurde. Anschließend wurde das Zielprotein mit steigendem Salzgehalt eluiert. Die Ionen des Salzes verdrängen die Proteine von der Matrix durch eine stärkere elektrostatische Interaktion zwischen Salz und Matrix. Für die hier durchgeführte Trennung wurde ein linearer Gradient von 100 – 500 mM NaCl verwendet, die eluierenden Fraktionen bei 280 nm, 415 nm und 305 nm detektiert und in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die gespeicherten Werte sind anschließend in einem Chromatogramm (siehe Abbildung 2.3) zu sehen. Abschließend wurde die Säule mit einem Volumen Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, 0,2 % SB12, pH 7,6) gewaschen und mit dem Laufpuffer reäquilibriert.

## Material und Methoden



**Abbildung 2.3:** Schematischer Ablauf des ersten FPLC-Laufes.

Im Anschluss an eine Überprüfung der Fraktionen auf Hydrogenaseaktivität (siehe 2.6.4.1 sowie 2.6.4.2) wurden die Hydrogenase-enthaltenden Fraktionen gepoolt, mit Amicon Ultra-15 Zentrifugalfiltern (Merck KGaA, Darmstadt) entsalzt und auf eine zweite, feinporigere Anionenaustauschsäule beladen (Q-Sepharose HP, starker Austauscher, pH-Stabilität von 2-12, Partikelgröße ~ 34  $\mu\text{m}$ ). Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,6, mit 10 mM NaCl und 0,2 % SB12 verwendet. Das Verfahren hierbei war ähnlich dem der ersten Säule.

Die aktiven Fraktionen wurden mittels Amicon Ultra-15 Zentrifugalfiltern aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule beladen. Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf der Trennung der Moleküle nach ihrem Molekulargewicht (Größenausschluss). Da die Elution isokratisch erfolgt und die Wahl des Puffers einzig von den Anforderungen des Proteins abhängig ist, eignet sich diese Methode auch zum Entsalzen von Lösungen oder für einen Pufferaustausch. In die kugelförmigen Polymere der Gelmatrix können kleinere Proteine je nach Größe unterschiedlich schnell diffundieren. Größere Proteine können nicht in die

Poren eindringen und eluieren somit schneller aus der Säule. Um eine ideale Trennung zu gewährleisten, werden maximal 5 % des Säulenvolumens an Probe aufgetragen (in diesem Fall 1 %, also bei einem Säulenvolumen von 371 ml ca. 3,5 ml). Der Laufpuffer setzt sich zusammen aus 100 mM Tris/HCl, pH 7,6 und 10 mM NaCl sowie 0,2 % SB12.

Zur Überprüfung der Reinheit der erhaltenen Probe wurden SDS-Gele angefertigt, außerdem wurde die Hydrogenase biochemisch, elektrochemisch und spektroskopisch untersucht.

### 2.6.1.2 Proteintag - Affinitätschromatographie

Zur rekombinanten Proteinreinigung wurde je nach Konstrukt mit dem Protino Ni-TED Kit oder dem IBA Strep-tag Aufreinigungskit gearbeitet. Um ein Protein mit His-Tag zu reinigen, wurden die geernteten Zellen in 2 ml/g LEW Puffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert. Nachdem 1 mg/ml Lysozym hinzugefügt wurde und die Lösung für 30 min auf Eis gerührt wurde, wurden die Zellen drei Mal mit einem transportablen Ultraschallgerät (Sonopuls, Brandelin, Berlin) für 5 min mit 50 % Leistung und 30 % Amplitude aufgebrochen. Falls das Lysat viskos war, wurden 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase zugegeben und für 15 min auf Eis gerührt. Der Rohextrakt wurde dann bei 10000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand auf eine zuvor mit LEW Puffer equilibrierte Protino Ni-TED Säule geladen. Das Zielprotein wurde nach Auswaschen ungebundener Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert.

Die Aufreinigung von Strep-tag Proteinen begann ebenfalls mit dem Resuspendieren des Zellpellets, in diesem Fall in 100 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0 und 150 mM NaCl, dem 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pefabloc zur Vermeidung des Abbaus des Zielproteins zugesetzt wurden. Der Zellaufbruch erfolgte durch dreimaliges Beschallen für jeweils 5 min mit 50 % Leistung und 30 % Amplitude. Das Lysat wurde anschließend auf eine Strep-tactin Säule aufgegeben, welche zuvor mit dem gleichen Puffer equilibriert wurde, in dem auch das Zellpellet aufgenommen wurde. Nachdem ungebundene Proteine mittels desselben Puffers entfernt

## Material und Methoden

wurden, konnte das Zielprotein mit circa 6 ml des Puffers, welcher zusätzlich 2,5 mM Desthiobiotin enthielt, eluiert werden.

Die Reinheit der eluierten Proteine wurde mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Brillant blue Färbung sowie überprüft. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels Amicon Ultra Zentrifugenfiltern für anschließende Messungen aufkonzentriert.

### 2.6.2 Quantitative Proteinbestimmung

Um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu bestimmen, wurde der Bradford Protein Test durchgeführt, bei dem die Absorptionsverschiebung des Farbstoffes Coomassie Brillant Blau G-250 verfolgt wird, wenn durch die Bindung von basischen Seitenketten der Proteine aus der roten Form die blaue Coomassie Form entsteht. Ungebundenes Coomassie absorbiert bei einer Wellenlänge von 465 nm, während das Absorptionsmaximum des gebundenen, blauen Coomassies 595 nm beträgt. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, werden zu 1 ml Bradford Lösung (siehe unten) 10 µl der aufgereinigten Proteinlösung pipettiert, die Lösung gemischt und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm mit einem UV/vis Spektralphotometer (Zweistrahl-UV/vis Spektrometer UV 2-300 von Unicam oder Cary 100 Scan UV/vis Spectrometer von Varian (Palo Alto, USA) gemessen, als Nullwert wurde 1,01 ml Bradford Lösung verwendet. Zuvor wurde eine Kalibrierungskurve angelegt, da eine Korrelation zwischen Extinktion und Proteinkonzentration nur gegeben ist, wenn die gemessenen Werte im linearen Bereich der Kalibrierungskurve liegen. Um eine Kalibrierungskurve aufzunehmen, wurden verschiedene BSA (Bovine Serum Albumin) -Konzentrationen vermessen (0,125 bis 1 mg/ml).

Bradford Lösung (sterilfiltriert):

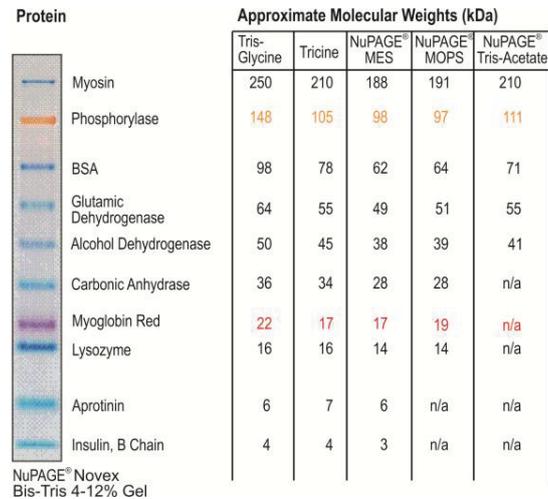
Coomassie Brillant Blau G-250	100 mg
Ethanol (95 % v/v)	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 % w/v)	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 1000 ml

### 2.6.3 SDS-PAGE

(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Proteine werden bei der SDS-PAGE in einem elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Hierbei werden die Proteine zunächst mit SDS (Natriumdodecylsulfat) versetzt, einem Detergenz, das durch hydrophobe Interaktion an Proteine bindet und intramolekulare, nicht-kovalente Bindungen löst. Es neutralisiert die Proteinladung und überlagert sie mit negativer Ladung. Die Gelelektrophorese wurde mit Novex NuPAGE BisTris-Gelen der Firma Life Technologies Corporation (Darmstadt) durchgeführt, welche in einer Gelelektrophoresekammer fixiert wurden, die mit MES Laufpuffer befüllt wurde. Die mit SDS-Puffer vermischten Proteinproben wurden für 5 min bei 99 °C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurden die Gele mit den Proben beladen und die Elektrophorese bei 65 mA durchgeführt, bis die Proben den unteren Rand der Gele erreichten. Zur Größenbestimmung wurden 6 µl eines Protein Markers (siehe Abbildung 2.4) mit aufgetragen.

## Material und Methoden



**Abbildung 2.4:** Protein Marker SeeBlue Plus2 prestained standard (Invitrogen).

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Gele zum Anfärben der Proteine mit Coomassie Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend mit Entfärbepuffer entfärbt, bis alle Banden deutlich sichtbar waren.

### SDS Ladepuffer:

Harnstoff	1 M
β-Mercaptoethanol	5 %
SDS	2,5 %
Bromphenolblau	0,01 %
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

### MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) Puffer:

MES	50 mM
Tris Base	50 mM
SDS	0,1 %
EDTA	1 mM
pH 7,3	

Coomassie Färbelösung

Coomassie Brillant Blau	0,2 %
Essigsäure	100 ml
Isopropanol	400 ml
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	500 ml

Entfärbepuffer

Ethanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	500 ml

**2.6.4 Enzymaktivitäts-Bestimmungen****2.6.4.1 Qualitativer Aktivitätstest wasserstoffoxidierender Hydrogenasen**

Hydrogenasen, wie die [NiFeSe] Hydrogenase, sind in der Lage, Wasserstoff zu oxidieren. Diese Katalyse lässt sich optisch durch die Reduktion von Methylviologen (MV) nachweisen (119). MV wird durch die Reduktion von Wasserstoff mittels der Hydrogenase ( $\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ ) vom oxidierten in den reduzierten Zustand überführt, indem es als Elektronenakzeptor dient ( $2\text{MV}^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{MV}^+$ ). Dieser Wechsel des Redoxzustandes bewirkt eine Farbänderung des Methylviologens von farblos zu tiefblau, welche sich optisch verfolgen lässt und Rückschluss auf die Hydrogenaseaktivität zulässt.

Zur Durchführung des Tests wurde ein anaerob verschließbares Probengefäß mit 2 ml 25 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,4 bis 7,6 befüllt und Methylviologen im Überschuss dazu gegeben. Von den bei der FPLC-Aufreinigung erhaltenen Fraktionen wurden je 200 µl Probe in die Lösung pipettiert und das Gefäß anschließend luftdicht verschlossen. Es folgte eine Begasung mit Wasserstoff bis ein Farbumschlag sichtbar wurde, jedoch für maximal 15 min. Anhand der Geschwindigkeit der Reaktion konnte auf die Aktivität der Hydrogenase rückgeschlossen werden.

#### 2.6.4.2 Quantitativer Aktivitätstest wasserstoffoxidierender Hydrogenasen

Dieser quantitative Test beruht auf demselben Prinzip wie der qualitative Test. Mit dieser Variante lässt sich jedoch zusätzlich die Wasserstoffoxidationsrate der Hydrogenase quantitativ bestimmen, es kann also festgestellt werden, wie viele Wasserstoffmoleküle in einer bestimmten Zeit pro Milligramm Hydrogenase umgesetzt werden, in dem die Anzahl der reduzierten Moleküle des Farbstoffes gemessen werden. Dies lässt sich mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz errechnen:  $\log I_0/I = A = c * \epsilon * d$ , wobei  $I_0$  der eingestrahlten Intensität,  $I$  der Intensität nach dem Durchgang durch die Probe,  $A$  der Absorption,  $c$  der Konzentration der Probe,  $\epsilon$  dem molaren Extinktionskoeffizienten des reduzierten Methylviologens, welcher  $12100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  beträgt (bei 605 nm und einem pH-Wert von 7,4) und  $d$  der Schichtdicke der Küvette entspricht.

Zur Durchführung werden in eine gasdicht verschließbare Küvette 1400  $\mu\text{l}$  einer 11,6 mM Methylviologenlösung sowie 100  $\mu\text{l}$  einer 1 M Glucoselösung gegeben, und die Küvette wird verschlossen. Die Lösung wird für 15 min mit Wasserstoff begast. Da bereits kleinste Mengen Sauerstoff das reduzierte Methylviologen wieder oxidieren würden, wird der nach der Wasserstoffbegasung noch gelöste Sauerstoff enzymatisch mit Hilfe einer Glucose Oxidase-/Katalase-Lösung abgebaut. Die zu Anfang zugegebene Glucose wird durch die Glucose Oxidase oxidiert und es entsteht neben D-Gluconolacton Wasserstoffperoxid, welches mit Hilfe der Katalase zu  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut wird. 100  $\mu\text{l}$  dieser Enzymlösung werden durch das Septum der Küvette zu der Methylviologenlösung gespritzt und der Ansatz wird für 45 min bei RT inkubiert. Direkt vor der Aufzeichnung des Absorptionsverlaufes von reduziertem Methylviologen bei 605 nm am Spektrophotometer werden 2  $\mu\text{l}$  der Hydrogenaseprobe dazu gespritzt. Aus dem Verlauf der Absorption des reduzierten Methylviologens lässt sich bei bekannter Proteinkonzentration die Wasserstoffoxidationsrate der Hydrogenase errechnen.

### 2.6.4.3 Native PAGE mit Aktivitätsfärbung

Ein ebenfalls auf der Oxidation von Wasserstoff basierender Assay war die „in-gel“ Färbemethode. Hierbei wurde ein 4-15 %-iges natives Gel mit Probe bekannter Proteinkonzentration beladen, welche zuvor mit 20 µl Ladepuffer versetzt wurde. Das Gel wurde für 15 h bei 200 V laufen gelassen und anschließend in eine Flasche mit Kaliumphosphatpuffer pH 5,5 überführt und 30 min mit Wasserstoff begast. Als Elektronentransporter dient Phenazinmethosulfat, welches die durch die Hydrogenase aus Wasserstoff freigesetzten Elektronen an Nitroblautetrazoliumchlorid weiterleitet. Durch die Reduktion des Nitroblautetrazoliumchlorids zum blauen Di-Formazanfarbstoff entsteht eine Blaufärbung der Banden, welche die Hydrogenaseaktivität anzeigt. Hierfür wurden je 40 mM Phenazinmethosulfat und Nitroblautetrazoliumchlorid zu dem Gel gegeben und für circa 3 h bei 37 °C inkubiert, bis die Blaufärbung sichtbar war.

#### Laufpuffer des nativen Gels

Tris/HCl	90 mM
Borsäure	80 mM
Na-EDTA	2,5 mM
pH 8,2	

## 2.7 MALDI-TOF Massenspektrometrie

(matrix-assisted laser desorption/ ionization – time of flight mass spectrometry)

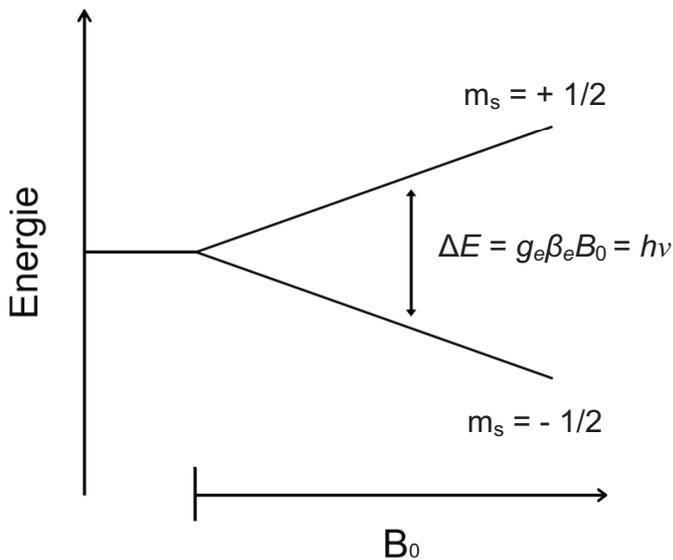
Um die Masse von Proteinen bestimmen zu können, wurde von aufgereinigten Proteinproben ein Massenspektrum aufgenommen. Dies geschieht mittels eines Voyager-DE PRO Workstation MALDI-TOF Systems (Applied Biosystems, Darmstadt) mit einem Stickstofflaser (338 nm, maximale Pulsenergie 32 µJ bei 10 Hz), indem die Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum bestimmt wird. Hierfür wird die Probe zunächst in eine Matrix (Dihydroxybenzoesäure oder Sinapinsäure) eingebracht und zusammen auf einem Träger kokristallisiert. Ein

## Material und Methoden

Laser schießt Photonen (Laserdesorption) auf Matrix und Probe, wodurch von der verdampfenden Matrix Protonen auf die Probe übertragen werden, so dass die Probe kationisch wird. Diese Ionen werden von einem elektrischen Feld beschleunigt und nach einer bestimmten Flugzeit, welche vom Masse/Ladungsverhältnis abhängt, detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die am Detektor registrierten Informationen über die Masse und entsprechende Intensität der aufgetrennten Probenbestandteile werden in einem Spektrum dargestellt.

### 2.8 Elektronen-Paramagnetische-Resonanz Spektroskopie

Die Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR) Spektroskopie, auch Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) Spektroskopie genannt, liefert Informationen über die Wechselwirkungen eines Elektronenspins mit seiner Umgebung. Die Methodik setzt die Anwesenheit permanenter magnetischer Momente der Probe voraus, es müssen also ungepaarte Elektronen vorhanden sein. Sie gibt Auskunft über die Art und die elektronische Struktur paramagnetischer Zentren sowie deren lokale Umgebung und liefert auch Informationen über die Dynamik der Zentren. Bei der EPR Spektroskopie induziert die Absorption von Mikrowellen Übergänge zwischen den unterschiedlichen magnetischen Zuständen eines Spins in einem äußeren Magnetfeld. Die Energieniveaus der Elektronenspins ( $S$ ) werden hierbei in dem von außen angelegten Magnetfeld aufgespalten, proportional zur Stärke des Feldes ( $B_0$ ) (Zeeman-Aufspaltung, siehe Abbildung 2.5 für einen Elektronenspin  $S = 1/2$ ). Die Untersuchung eines an sich diamagnetischen Systems, lässt sich mit Hilfe von kovalent gebundenen Spinlabeln realisieren (120,121).



**Abbildung 2.5:** Feldabhängigkeit der Energien der verschiedenen Zustände eines Elektronenspins  $S = 1/2$ .

Da ein Elektronenspin nur parallel oder antiparallel zum magnetischen Feld orientiert sein kann, werden die entarteten Energieniveaus des  $S = 1/2$  Spins in zwei Zustände mit den magnetischen Quantenzahlen  $m_s = + 1/2$  und  $- 1/2$  aufgespalten. Die in Abbildung 2.5 gezeigte Elektron-Zeeman-Aufspaltung beschreibt die Interaktion zwischen einem ungepaarten Elektronenspin und einem äußeren magnetischen Feld und lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$\Delta E = g_e \beta_e B_0 \quad (\text{Gleichung 2.1}),$$

wobei  $\beta_e$  das Bohrsche Magneton und  $B_0$  die Induktion des äußeren Magnetfeldes darstellt.  $g$  bezeichnet den  $g$ -Faktor des Spins, welcher bei einem freien Elektron  $g_e = 2,0023$  beträgt.

Die Anregung der Spins durch elektromagnetische Strahlung kann nur erfolgen, wenn die sogenannte Resonanzbedingung erfüllt ist, das heißt die Quantenenergie der Strahlung gleich der Zeemanaufspaltung ist.

$$h\nu = \Delta E = g_e \beta_e B_0 \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

## Material und Methoden

Geht man von einem freien Elektron aus, erfolgt Resonanzabsorption von Mikrowellenstrahlung bei 0,356 Tesla und einer Frequenz von 10 GHz, was einer Wellenlänge von  $\lambda = 30$  mm entspricht und im X-Band Bereich der Mikrowellenfrequenz liegt. Es wird in dieser Arbeit auch in anderen Bereichen der Mikrowellenfrequenz gemessen, nämlich dem Q-Band Bereich mit  $\lambda = 8$  mm; Messungen in diesem Frequenzbereich geben eine höhere Sensitivität und Auflösung, weisen aber größere Energieverluste im Resonator auf.

Die physikalischen Informationen der gemessenen Absorptionsresonanz wird durch den g-Wert ausgedrückt. In Atomen, Molekülen und Komplexen beobachtet man Abweichungen des g-Wertes vom g-Wert des freien Elektrons, was wiederum die chemische Information der Messung ausmacht, da die Abweichung von  $g=g_e$  von der Spin-Bahn-Kopplung und der Stärke und der Symmetrie der Liganden und der elektronischen Struktur der paramagnetischen Zentren abhängt. Der g-Wert ist eine anisotrope Größe, abhängig von der Orientierung des Magnetfeldes relativ zum molekularen Achsensystem und wird durch die drei Hauptwerte der g-Matrix ( $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$ ) charakterisiert.

Die erhaltenen Signale werden oft auf der Basis des Spin-Hamilton-Operators analysiert, welcher alle molekularen Wechselwirkungen zusammenfasst, die Einfluss auf das Spektrum nehmen. Hierzu zählt neben der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung, welche den Einfluss des Drehimpulses des Elektrons widerspiegelt auch die Hyperfeinwechselwirkung, die eine Interaktion zwischen dem magnetischen Moment des Elektronenspins und den magnetischen Momenten benachbarter Kernspins beschreibt. Weiterhin zählen die Nullfeldaufspaltung (Wechselwirkung zwischen ungepaarten Elektronenspins), die Kern-Zeeman-Wechselwirkung und die Kern-Quadrupol-Wechselwirkung zu diesem Operator.

Bei der cw (continuous wave) EPR werden Mikrowellen mit konstanter Frequenz kontinuierlich eingestrahlt und das Magnetfeld wird variiert. Hierbei wird die erste Ableitung des Absorptionsspektrums aufgezeichnet, weil aus mechanischen

Gründen das angelegte Magnetfeld  $B_0$  moduliert wird und das EPR Signal im Takt der Modulation detektiert wird.

Die cw EPR Experimente in dieser Arbeit wurden an einem Bruker ESP300 CW X-Band Spektrometer, welches bei circa 9,4 GHz arbeitet, durchgeführt. Es wurde eine Rechteck-Cavity (Typ  $TE_{102}$ ) und ein Kryostat (Oxford 910), der mit konstantem Heliumfluss betrieben wurde, verwendet. Die Temperatur wurde mit einem Temperaturregler (Oxford ITC 503) konstant gehalten.

## 2.8.1 Gepulste EPR Techniken (123)

### 2.8.1.1 Zwei-Puls Elektronenspinecho Spektroskopie

Mit der ESE (Elektronenspinecho) detektierten EPR Methode lassen sich ähnliche Informationen wie mit der kontinuierlichen EPR erhalten, im Unterschied dazu werden bei ESE Experimenten aber die Mikrowellen nicht konstant ausgestrahlt, sondern durch eine spezifische Mikrowellenpuls-Sequenz ein Spinecho generiert. Die Echo-Intensität lässt sich als Funktion des äußeren magnetischen Feldes beobachten. Für ein  $S = 1/2$  System entspricht das erhaltene Spektrum dem des integrierten cw Spektrums. Die begrenzte spektrale Auflösung und Zeitauflösung der cw EPR Spektroskopie wird in der ESE Spektroskopie verbessert. Besonders bei Metalloproteinen können in der cw Spektroskopie wegen verbreiteter Linien oft die Hyperfeinwechselwirkung nicht aufgelöst werden. Dieses Problem kann durch gepulste EPR Experimente umgangen werden.

### 2.8.1.2 Elektron-Kern-Doppelresonanz Spektroskopie

Mit der ENDOR Spektroskopie (engl.: electron nuclear double resonance, (124,125)) lassen sich Hyperfeinwechselwirkungen von Kernen mit einem Kernspin  $I > 0$  beobachten, die in der normalen EPR nicht aufgelöst sind. Die ENDOR Technik detektiert Kernspinübergänge (NMR-Übergänge) indirekt über EPR Übergänge. Dafür müssen sowohl die Resonanzbedingung für Elektronenspins als auch für Kernspins erfüllt sein, weshalb man von Doppelresonanz spricht. Genauer wird hierbei zusätzlich zu einer Mikrowelle

## Material und Methoden

eine variable Radiofrequenz (RF) eingestrahlt, womit Kernspinübergänge induziert werden. Die Änderung des EPR-Signals bildet dann das ENDOR-Signal.

Die ENDOR Methode kann sowohl als cw als auch als gepulste ENDOR Technik eingesetzt werden. Hierbei wird die Dauer der eingestrahlten elektromagnetischen Wellen variiert. Dies kann den Einfluss bestimmter Wechselwirkungen auf das Signal unterdrücken und somit den Spin-Hamilton Operator eines untersuchten Spins (anhand seiner Hyperfeinwechselwirkung und seiner spezifischen Relaxationszeit) variieren und in Bezug auf das vorhandene Problem einfacher interpretierbar machen. Relaxation eines angeregten Elektronenspins bedeutet, dass dieser nach einiger Zeit seine Energie entweder an energieniedrigere Elektronen (Spin-Spin Relaxation,  $T_1$ ) oder an das Atomgerüst abgibt (Spin-Gitter-Relaxation,  $T_2$ ) und aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückkehrt, so dass die Boltzmann-Verteilung gegeben ist. Man unterscheidet zwischen zwei gepulsten ENDOR Methoden: Davies und Mims ENDOR, welche beide auf die Observation eines Spin Echos zurückgreifen, allerdings mit unterschiedlichen Pulssequenzen. Man nutzt Davies ENDOR (126) bei größeren Hyperfeinwechselwirkungen; bei dieser Methode wird die Polarisation eines Spin-Überganges durch einen selektiven  $180^\circ$ -Mikrowellenpuls umgekehrt und nach einer gewissen Zeit  $T$  detektiert. In dieser Zeit wird ein Radiofrequenzpuls eingestrahlt und die Echoamplitude gemessen. Beim Mims ENDOR (127) wird der Radiofrequenzpuls nach zwei  $90^\circ$ -Mikrowellenpulsen eingestrahlt, wodurch sich kleinere Hyperfeinkopplungen sensitiver messen lassen.

Gepulste EPR Messungen im Q-Band Bereich ( $\sim 34$  GHz) wurden mit einem Bruker Elexsys E-580 FT EPR Q-Band Spektrometer mit einem selbstgebauten ENDOR Resonator (128) durchgeführt. Kryogene Temperaturen (7–10 K) wurden durch den Oxford CF935 Durchfluss-Kryostaten erreicht. Ein high-power Radiofrequenz Verstärker (2,5 kW, Amplifier Research 2500L, 10 kHz-220 MHz) erzeugte kurze Radiofrequenzpulse (8  $\mu$ s für  $^1\text{H}$ ) für die Davies ENDOR Experimente (129). Die EPR Spektren der ersten Ableitung der Signale wurden

mittels der auf MATLAB (Mathworks) basierten *EasySpin* Simulationssoftware (130) simuliert. Hierbei wurde auf *A*- und *g*-strain Effekte, welche zur inhomogenen Linienbreite der EPR Linien beitragen, geachtet.

## 2.9 Fourier-Transform Infrarot Spektroskopie

Die Absorption von infraroter Strahlung, also Strahlung im Wellenlängenbereich von 760 nm bis 1 mm (760 nm bis 3  $\mu\text{m}$  definiert nahes Infrarot, 3  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  mittleres Infrarot und 30  $\mu\text{m}$  bis 1 mm fernes Infrarot), ist die Grundlage der Infrarot (IR) Spektroskopie. Die Energie der infraroten Strahlung ist so gering, dass nicht, wie durch sichtbares Licht, elektronische Übergänge angeregt werden, sondern nur Molekülschwingungen ( $\Delta E \approx 40 \text{ kJ / mol}$ ) und Molekülrotationen ( $\Delta E \approx 4 \text{ kJ / mol}$ ) innerhalb des Grundzustandes induziert werden können (131). Für eine Bindung in einem Molekül, welche zu einer harmonischen Schwingung angeregt werden kann, gilt das Hooke's Gesetz für die Frequenz dieses harmonischen Oszillators (132,133):

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

mit  $k$  als Kraftkonstante der Bindung zwischen zwei Atomen in ihrem Gleichgewichtsabstand und  $\mu$  als reduzierte Masse, für die bei zwei Atomen der Massen  $m_1$  und  $m_2$  folgendes gilt:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

Der harmonische Oszillator kann nur äquidistante Energieniveaus annehmen,

$$E_\nu = \left( \nu + \frac{1}{2} \right) h \cdot \nu_{\text{vib}} \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

d.h., die Änderung der Schwingungsquantenzahl  $\Delta \nu = \pm 1$ .  $h$  stellt hierbei das Plancksche Wirkungsquantum dar. Durch diese Gleichung wird die Stärke der

## Material und Methoden

kovalenten Bindung zwischen zwei Atomen, die Masse der interagierenden Atome und die Frequenz der Vibration ( $\nu_{vib}$ ) miteinander verknüpft. In einem realen System allerdings würde es bei einer Verringerung des Abstandes der Atomkerne zueinander zur elektrostatischen Abstoßung kommen, wohingegen die Bindung bei zu großem Abstand brechen würde. Darum muss man in realen Systemen auf den anharmonischen Oszillator zurückgreifen (133). In diesem Fall werden die Energiedifferenzen immer kleiner, je größer die Schwingungsquantenzahl ist.

Man unterscheidet generell zwischen Streck- und Beugeschwingungen, wobei im ersten Fall die Bindungslänge verändert wird, während sich im zweiten Fall der Bindungswinkel ändert. Diese Schwingungen können nur detektiert werden in der Infrarot-Spektroskopie, wenn sich das Dipolmoment des Moleküls mit derselben Frequenz ändert wie die eingestrahlte elektromagnetische Strahlung. Über das dann infrarot-aktive Molekül lässt sich in Folge ein Spektrum der Absorption des Infrarotlichts bei Frequenzen, die mit der Vibration der chemischen Bindung des diatomaren Moleküls korrelieren, erzeugen (134).

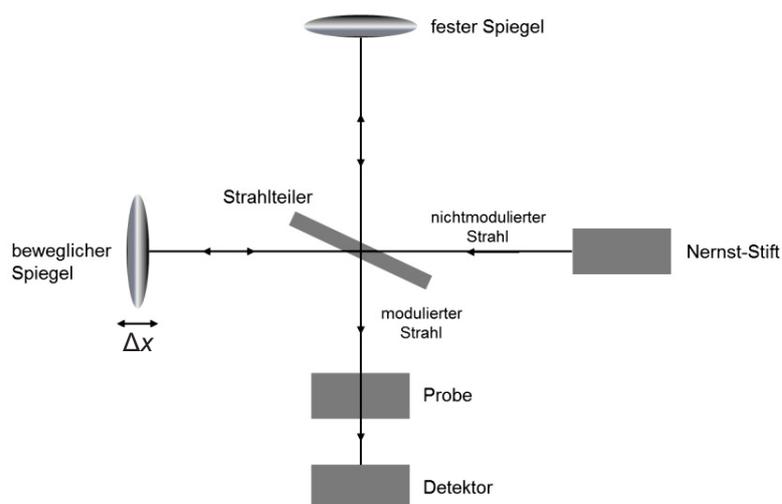
Für alle IR-Messungen müssen die verwendeten Küvetten aufgrund der starken Absorption von Wasser viel kleinere Schichtdicken aufweisen als bei der UV-Spektroskopie. Geringere Schichtdicken bedingen aber hohe Probenkonzentrationen aufgrund geringer IR-Absorptionskoeffizienten (welche selten über  $10^3$  liegen, bei elektronischen Übergängen kommen molare Absorptionskoeffizienten über  $10^5$  vor).

Bei der hier angewendeten FTIR (Fourier-Transform-IR) Spektroskopie wird mit einem Michelson-Interferometer gemessen (135). Dieses misst ein Interferogramm  $I(x)$ , welches die Intensität  $I$  am Detektor als Funktion der Position  $x$  eines beweglichen Spiegels im Interferometer darstellt. Aus  $I(x)$  wird durch eine Fourier-Transformation ein Spektrum  $I(\nu)$  erstellt.  $I(\nu)$  gibt die Intensität gegen die Wellenzahl (Anzahl der Wellenzüge pro cm,  $\lambda^{-1}$ , ist proportional zur Energie der Vibration) an.

Das durch den Nernst-Stift (Globar) eingestrahlte Infrarotlicht wird am Strahlteiler zu etwa gleichen Teilen aufgespalten. Ein Anteil wird von einem festen Spiegel

reflektiert und im Strahlteiler wieder mit dem Teil zusammengeführt, welcher von einem beweglichen Spiegel reflektiert wurde. Je nach Frequenz des Strahls und Position des beweglichen Spiegels interferieren die beiden Teilstrahlen. Dieser wieder zusammengesetzte Strahl durchdringt die Probe und wird am Detektor durch die Umwandlung von Strahlung in elektrisches Signal als Interferogramm dargestellt. Oft ist es ratsam, die erste, zweite oder dritte Ableitung der Infrarotbanden zu erzeugen, da man damit ein besser aufgelöstes Spektrum erhält.

Die Messungen erfolgten am Bruker IFS 66 v/s FTIR-Spektrometer mit MCT-Detektor und der zugehörigen Software Opus von Bruker Optic. Die Probenkammer wurde während der Messung mit  $N_2$  gespült, um Störungen durch  $CO_2$  und Wasserdampf zu vermeiden. Zum Kühlen wurde flüssiges Helium verwendet, wobei ein Oxford Optistat CF Kryostat benutzt wurde, welcher mit  $CaF_2$ - und Saphir-Fenstern ausgestattet ist.



**Abbildung 2.6:** Aufbau eines FTIR-Spektrometers.

## 2.10 Elektrochemie

Elektrochemie untersucht den Zusammenhang zwischen chemischen Vorgängen und elektrischem Strom und wird angewendet, um die Kinetik und Energetik von Elektronentransferprozessen zu verstehen, sowie um Reaktionen zu untersuchen, die an Redoxübergänge gekoppelt sind. Redoxreaktionen fassen

## Material und Methoden

die Einzelreaktionen Oxidation und Reduktion zusammen, wie sie zum Beispiel an den zwei Elektroden einer Galvanischen Zelle ablaufen (Oxidation an der Anode, Reduktion an der Kathode). Bei einem Stromfluss zwischen den Elektroden, welcher entsteht, wenn sich die Redoxreaktion nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, lässt sich das Elektrodenpotential  $E$  durch die Nernst-Gleichung (133) beschreiben:

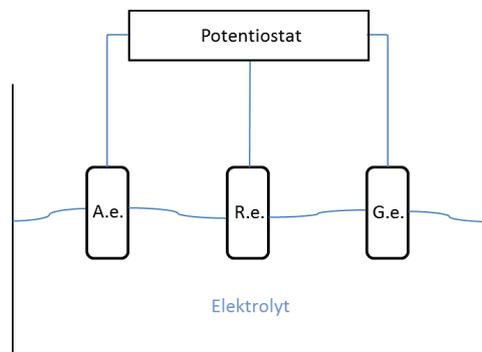
$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

Diese Gleichung beschreibt also die Konzentrationsabhängigkeit des Elektrodenpotentials eines Redox-Paares [Ox] und [Red]. Das Standardelektrodenpotential  $E^0$  der beobachteten Reaktion gibt jenes Potential wieder, das gegen die Normal-Wasserstoffelektrode gemessen wird. Zudem ist das Elektrodenpotential abhängig von der absoluten Temperatur  $T$  [Kelvin] und der Anzahl der übertragenden Elektronen  $n$ .  $R$  stellt die molare Gaskonstante mit  $8,31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  dar und  $F$  die Faraday-Konstante mit  $96485 \text{ J V}^{-1}$ . Misst man das Elektrodenpotential an beiden Elektroden, erhält man somit eine Aussage sowohl über die Oxidation als auch über die Reduktion des gemessenen Systems, wodurch anhand der Differenz der Potentiale eine Aussage über die spontane Reaktionsrichtung möglich wird. Man misst stets gegen eine Referenzelektrode, da es nicht möglich ist, ein Potential absolut zu ermitteln. Die Referenzelektrode kann z.B. eine Ag/AgCl-Elektrode oder eine Kalomelektrode sein. Die Standardwasserstoffelektrode (*NHE*, engl.: *normal hydrogen electrode*) dessen Potential definitionsgemäß  $E = 0 \text{ V}$  ist, dient als Bezugspunkt für die elektrochemische Potentialskala und wird von Wasserstoff umspült.

Die in dieser Arbeit untersuchte [NiFeSe]-Hydrogenase, welche ein redoxaktives metallisches Zentrum aufweist, an dem die Redoxreaktion  $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$  abläuft, wurde mittels Zyklovoltammetrie und Chronoamperometrie untersucht.

### 2.10.1 Zykovoltammetrie

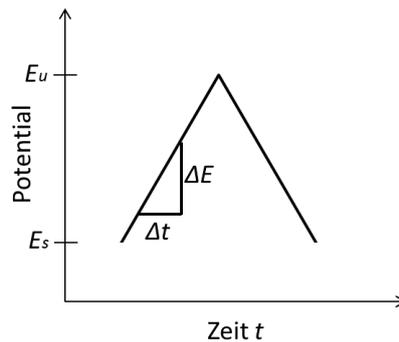
Mit der Zykovoltammetrie können elektrochemische Eigenschaften wie das elektrochemische Potential einer Probe analysiert werden. Hierbei werden Stromsignale als Funktion der angelegten Spannung aufgezeichnet. Dies geschieht an einer Arbeitselektrode, welche meist aus Platin, Gold oder Graphit besteht und einer Gegenelektrode. Das Potential der Arbeitselektrode, bezogen auf das Potential der Referenzelektrode, in Abhängigkeit vom elektrischen Strom, ergibt das Zykovoltammogramm. Der Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 2.7 dargestellt.



**Abbildung 2.7:** Aufbau einer Zykovoltammetrie-Apparatur. A.e. bedeutet Arbeitselektrode, R.e. steht für Referenzelektrode und G.e. steht für die Gegenelektrode.

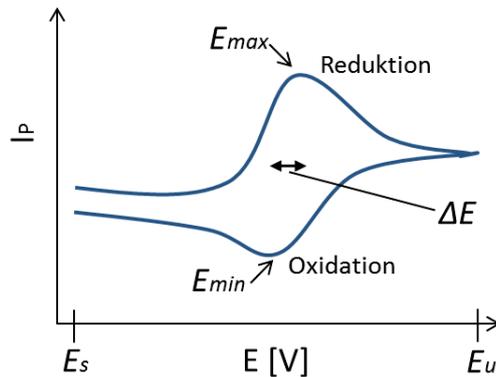
Bei dem Verfahren der *linear sweep voltammetry* wird durch einen Potentiostaten (hier: VersaStat 4-400, Princeton Applied Research, Oak Ridge, USA) das Potential durch Anlegen einer Dreiecksspannung an die Arbeitselektrode in einer Lösung mit der Zeit linear variiert. Beginnend mit einem Startpotential  $E_s$  steigt das Potential an und fällt nach Erreichen des Umkehrpotentials  $E_u$  wieder ab. Dieser dreieckförmige Spannungsverlauf ist in Abbildung 2.8 abgebildet.

## Material und Methoden



**Abbildung 2.8:** Schematische Zeichnung des dreieckförmigen Spannungsverlaufes.

Das Anfangs-Potential wird so gewählt, dass es deutlich positiver ist als das Standardelektrodenpotential  $E^0$  für die Reduktion der Probe. Nun wird das Potential linear verändert. Kommt es in den Bereich um  $E^0$ , ändert sich das Verhältnis der Teilchen nach der Nernst-Gleichung und die Probe wird reduziert, d.h., es fließt Strom. Je näher das Potential dem  $E^0$ -Wert kommt, desto mehr Probe wird reduziert, entsprechend nimmt die Konzentration der oxidierten Probe an der Elektrode ab und strebt gegen 0. Wenn das Potential nun  $E^0$  übersteigt, befindet sich kaum noch oxidierte Probe an der Elektrode. Die Diffusion der oxidierten Spezies aus der Lösung in Richtung der Elektrode erreicht sein Maximum und nimmt dann wegen zu geringer Konzentration an oxidierte Probe ab. Dieser Verarmungseffekt ist durch einen Peak im Voltammogramm (Abbildung 2.9) gekennzeichnet. Die Spannung wird anschließend umgekehrt, das Startpotential ist diesmal negativer als  $E^0$ , um die Probe wieder zu oxidieren. Zu diesem Zeitpunkt liegt eine hohe Konzentration an reduzierter Probe an der Elektrode vor. Nähert sich das Potential  $E^0$  an, wird die Bildung von oxidierte Probe bevorzugt, der Oxidationsprozess beginnt. Der Strom nimmt wieder so lange zu, bis die reduzierte Spezies verbraucht ist. Wieder entsteht ein Peak im Voltammogramm. Mit dieser Methode wird insgesamt jedes Potential zweimal angelegt, einmal aus oxidativer, einmal aus reduktiver Richtung, entsprechend nennt man diesen Prozess zyklische Voltammetrie oder Zyklovoltammetrie.



**Abbildung 2.9:** Übersicht der wichtigsten Größen in einem Zyklovoltammogramm eines reversiblen Redoxprozesses.

Aus dem Zyklovoltammogramm kann man die Spannung und die Peakströme, also die Ströme des Oxidationsmaximums und Reduktionsminimums, ablesen. Die Abhängigkeit der Peakströme  $I_p$  von der Konzentration der redoxaktiven Spezies  $C$  [mol/cm<sup>3</sup>] und der Elektrodenoberfläche  $A$  [cm<sup>2</sup>] sowie dem Diffusionskoeffizienten  $D$  [cm<sup>2</sup>/s] der Probe ist in der Randles-Ševčík-Gleichung gegeben:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot \omega^{1/2} \quad (\text{Gleichung 2.7})$$

Die Gleichung gilt bei Raumtemperatur ( $T = 298$  K) und nur dann, wenn die Reaktion vollständig reversibel ist, der Peakstrom ist entsprechend diffusionskontrolliert. In diesem Fall sind die Peaks der Oxidation und der Reduktion gleich hoch. Das Redoxpotential ergibt sich aus dem Mittelwert beider gemessener Potentiale für das Oxidationsmaximum und das Reduktionsminimum:

$$E_0 \approx \frac{E_{max} + E_{min}}{2} \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

Die Potentialdifferenz  $\Delta E = E_{max} - E_{min}$  gibt Aufschluss über die Reversibilität einer Reaktion. Ist die Reaktion nicht vollständig reversibel, sondern

## Material und Methoden

quasireversibel, so ist die Potentialdifferenz  $\Delta E$  eine Funktion der Aufnahmegeschwindigkeit  $\omega$  [V/sec].

Es besteht neben den Messungen in Lösungen auch die Möglichkeit, die Probe an eine beschichtete Arbeitselektrode zu binden. So ist die Abnahme des Stromes nicht mehr diffusionsbezogen, sondern beruht auf der vollständigen Oxidation oder Reduktion der Probe.

Die Zyklovoltammetrie-Experimente wurden in der anaeroben Atmosphäre einer Glove-box bei pH 6,5, 35 °C und 2500 rpm (Elektrodenrotator Princeton Applied Research model 636A) durchgeführt, als Arbeitselektrode wurde eine Goldelektrode verwendet (5 mm Durchmesser, Pine Instruments, Grove City, USA), welche mit 4-Aminothiophenol SAM (self-assembled monolayer) modifiziert wurde, um eine geordnete Oberfläche zur Verbesserung der Bindung der Probe an die Elektrode zu schaffen. Bei der Referenzelektrode handelte es sich um eine Kalomelektrode, die Gegenelektrode war eine Platinelektrode. Die Zelle wurde mit einem Wassermantel versehen, um die Temperatur konstant halten zu können.

### 2.10.2 Chronoamperometrie

Bei der Chronoamperometrie misst man den Elektrolysestrom in Abhängigkeit von der Zeit. Hierbei wird nicht, wie bei der Zyklovoltammetrie, das Potential linear verändert und so die Strom-Potential-Abhängigkeit gemessen, sondern es werden Strom-Zeit-Kurven aufgenommen, indem das Potential an der Arbeitselektrode entweder konstant gehalten oder sprunghaft nach einer bestimmten Zeitspanne verändert wird. Diese Sollspannungssprünge können nun z.B. von einem im Vergleich zum Standardpotential der beobachteten Reaktion negativeren Potential zu einem positiveren Potential durchgeführt werden. Hierbei werden die elektrodennahen reduzierten Moleküle oxidiert, ein elektrochemischer Strom beginnt zu fließen. Diese Oxidation läuft so lange, bis sich ein durch die Nernst-Gleichung beschriebenes Konzentrationsverhältnis  $[Ox]/[Red]$  einstellt. Da Elektronentransferprozesse jedoch nur über eine

Entfernung von wenigen Ångström erfolgen können, entsteht ein Konzentrationsgradient, bei dem an der Elektrode nur oxidierte Probe und weit entfernt von der Elektrode nur reduzierte Probe aufzufinden ist. Entsprechend dem Fick'schen Diffusionsgesetz diffundieren aufgrund dieses Konzentrationsunterschiedes in der Lösung die reduzierten Moleküle zur Elektrode und die oxidierten Moleküle breiten sich aus, bewegen sich also von der Elektrode weg. Der Konzentrationsgradient wird weniger steil. Somit ist der gemessene Strom diffusionskontrolliert und wird durch die Cottrell-Gleichung gegeben:

$$I(t) = \frac{nFA\sqrt{D}[Red]}{\sqrt{\pi t}} \quad (\text{Gleichung 2.9})$$

Die in dieser Arbeit durchgeführten Chronoamperometrieexperimente wurden bei -460 mV, 35 °C und 2500 rpm in einem pH 6,5 Puffer durchgeführt mit einem Stickstofffluss von 1500 ml/min (1 bar Gegendruck).

## 2.11 DNA Microarray Verfahren

### 2.11.1 Herstellung der Microarray-Slides

Um DNA-Proben auf das Vorhandensein bestimmter Gene zu untersuchen, wurden mittels des Microarray Verfahrens die Proben aus dem Logatchev Hydrothermalfeld des mittellatlantischen Rückens (siehe 3.1.1) an Glas-Slides gebunden und später detektiert. Auf diese Glas-Slides wurden zuvor Oligonukleotide gespottet, welche die komplementären Sequenzen konservierter Bereiche der großen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen darstellten. Diese Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies (Köln) synthetisiert. Diese enthielten zusätzlich eine 5' Aminomodifikation und einen sechs Methylengruppen langen (C6) aliphatischen Linker. Das Spotting der Slides mit diesen Oligonukleotiden und der Nachweis des erfolgreichen Spottings erfolgten im Institut für genomische und angewandte Mikrobiologie der Universität Göttingen. Die CodeLink™ aktivierten Slides (GE Healthcare, Freiburg), bei denen eine kovalente Bindung der Probe über 5'Aminogruppen erfolgt, wurden

## Material und Methoden

hierfür mittels eines MicroGrid solid pin Microarrays (Zinsser Analytic, Frankfurt) gespottet. Es wurden Reihen zu je 8 Spots auf jeden Slide aufgetragen, jeder Spot wurde in vierfacher Ausfertigung aufgebracht. Im Anschluss wurden die aufgebrachten Oligonukleotide mittels UV-Strahlung kovalent auf den Slides immobilisiert.

Die gespotteten Slides wurden bei Raumtemperatur bei Unterdruck im Exsikkator gelagert, da sie feuchtigkeitsempfindlich sind.

### 2.11.2 Hybridisierung der markierten DNA mit Microarrayslides

Die mit den Farbstoffen Cy-5-dCTP markierte DNA wurde bei 95 °C für 6 min denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und mit 3 Volumen des Tom Freeman Hybridisierungspuffers (40 % Formamid, 5 x Denhardt's Lösung, 5 x SSC, 1 mM Natriumpyrophosphat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris/HCl pH 7,4) gemischt. Der Ansatz wurde bis zur Hybridisierung bei 65 °C (anfängliche Hybridisierungstemperatur) warm gehalten. Die Hybridisierung der markierten DNA mit den Microarrayslides erfolgte in einer GeneMachines<sup>®</sup> Hyb4 Station (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA) unter Kontrolle der programmierbaren Software Hyb4 editor. Die Microarray-Slides wurden nach Anleitung des Herstellers in die Kammer eingesetzt, wobei darauf zu achten war, dass kein Staub in die Station dringt, der den Fluss der Lösungen durch die engen Kapillaren verhindern würde. Auch alle die Station passierenden Lösungen wurden sterilfiltriert, um sie von Partikeln zu befreien. Die Slides wurden in der Station bei 75 °C für 2 min vorgewärmt und die Proben wurden bei 65 °C in die Hybridisierungskammer injiziert. Das 16,5 h dauernde Hybridisierungsprogramm „step down“ wurde verwendet, bei dem in fünf-Grad-Schritten die Hybridisierungstemperatur herabgesetzt wurde. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Slides in 3 Reinigungsschritten gewaschen: es wurde jeweils für 10 Sekunden die entsprechende Lösung (Lösung 1 bis 3, siehe unten) eingespült, dann für 20 Sekunden gehalten und der Zyklus wurde erneut durchgeführt. Abschließend wurden die Slides für 40 Sekunden getrocknet.

Detailliertes Hybridisierungsprogramm:

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Dauer
• Schritt 1	„O-ring conditioning“	75 °C	2 min
• Schritt 2	„Introduce sample“	65 °C – Probe war manuell zu injizieren	
• Schritt 3	„Hybridization 1“	65 °C	4 Stunden
• Schritt 4	„Hybridization 2“	60 °C	4 Stunden
• Schritt 5	„Hybridization 3“	55 °C	4 Stunden
• Schritt 6	„Hybridization 4“	50 °C	4,5 Stunden
• Schritt 7	„Wash Slides 1“	45 °C	2 x Flow 10 s, 20 s halten
• Schritt 8	„Wash Slides 2“	42 °C	2 x Flow 10 s, 20 s halten
• Schritt 9	„Wash Slides 3“	42 °C	2 x Flow 10 s, 20 s halten
• Schritt 10	„Drain Slides“		40 sek

Durch den ersten Schritt wurde die Kammer mit Hilfe der Dichtungsringe luftdicht verschlossen. Bei den Schritten 3 bis 6 wurde die Probe gemischt, indem ein leichter Unterdruck intervallartig erzeugt wurde.

Nach der Trocknung wurden die Slides sofort entnommen und bei 600 rpm für 10 min in 50 ml-Falcon-Röhrchen in einer Hettich-Kühlzentrifuge (Universal 320R) zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu beseitigen. In die Hybridisierungskammer wurden alte Slides als Platzhalter eingesetzt und alle Schlauchenden wurden in ein Becherglas mit H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> gelegt. Durch das Programm „Wash machine“ wurden die Kammer und die Schläuche gespült.

Reagenzien und Lösungen:

Denhardt's Lösung (sterilfiltriert):

PVP-40	2 % (w/v)
Ficoll	2 % (w/v)
BSA (fraction V)	2 % (w/v)

## Material und Methoden

### 20-fache Stocklösung SSC, pH 7,0:

NaCl	3 M
Natriumzitat	0,3 M

Lösungen zum Waschen der Slides:

	<u>Waschlösung 1</u>	<u>Waschlösung 2</u>	<u>Waschlösung 3</u>
SSC	1 x	0,1 x	0,1 x
SDS	0,2 % (w/v)	0,2 % (w/v)	-

### 2.11.3 Scannen der hybridisierten Slides

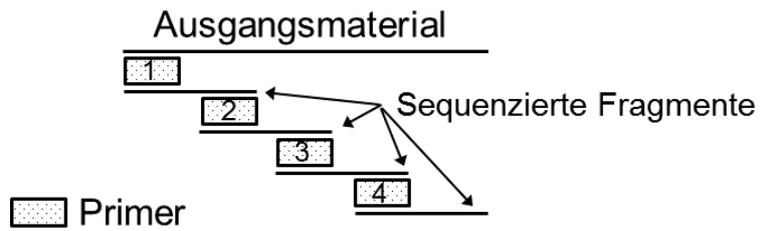
Die getrockneten Slides wurden direkt in einen GenePix 4100A Scanner (Axon Instruments, Union City, USA) eingelesen, um die hybridisierten Proben sichtbar zu machen. Die Auswertung erfolgte mit der Software GenePix Pro 6.0. Zunächst wurde ein Vorscan durchgeführt, um die zu lesende Fläche festzulegen. In einem anschließenden Hauptscan wurde bei den beiden Wellenlängen 532 nm und 635 nm gescannt. Die Photomultiplier-Scanstärke wurde hierbei auf 540 V für den 532 nm Laser bzw. 600 V für den 635 nm Laser eingestellt. Mit einer Schablone, welche über die Bereiche der Spots gelegt wurde, konnte die Signalintensität ermittelt werden. Dafür wurde der Wert „F635Median minus B635“ für Cy5 gelabelte DNA und „F532Median minus B532“ für Cy3 gelabelte DNA verwendet. Diese Werte sind die Mittelwerte der Signalintensitäten abzüglich der Hintergrundfluoreszenz außerhalb der Schablone.

## 2.12 Bioinformatische Methoden

### 2.12.1 DNA Sequenzierung

DNA Sequenzierung wurde entweder am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln bei ADIS (engl.: Automatic DNA Isolation and Sequencing Unit) oder bei der Firma LGC Genomics in Berlin durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung basiert auf der Sanger-Technik (136). Es wurden sowohl Standardprimer als auch selbst entworfene Primer verwendet. Sollten DNA-Sequenzen länger als 1 kb sequenziert werden, wurde sogenanntes

Primer-walking durchgeführt, womit Sequenzen bis 6 kb analysiert werden konnten. Nach jeder erfolgreichen Sequenzierung wurden neue Primer hergestellt, die mit dem Ende der identifizierten Sequenz binden (Abbildung 2.10). Vor einer Sequenzierung wurde die Konzentration der DNA-Probe (Plasmid-DNA oder PCR-Produkt) gemessen und auf die von den Firmen gewünschte Konzentration eingestellt.



**Abbildung 2.10:** Primer-walking bei einer DNA-Sequenz länger als 1 kb.

## Material und Methoden

### 2.12.2 Software

Die Analyse von Sequenzen erfolgte mittels der Programme BLASTN für einen Abgleich von Nukleotidsequenzen mit in der Datenbank vorhandenen Nukleotidsequenzen sowie mit BLASTX für den Abgleich einer übersetzten Nukleotidsequenz mit einer Proteinsequenzdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Biochemische Sequenzvergleiche wurden durchgeführt mit BioEdit 7.0 (Freeware, Tom Hall, Carlsbad, CA, USA, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Für den Abgleich mehrerer Proteinsequenzen wurde der ClustalW2 Algorithmus der EMBL-EBI Sammlung (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) verwendet. Für die Vorhersage von theoretischen molekularen Massen und molaren Extinktionskoeffizienten von Proteinen wurde der Internetbasierte Server [www.expasy.org](http://www.expasy.org) verwendet.

### **3 Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1 DNA-Microarray-Screening einer Metagenombank aus hyperthermophilen Mikroorganismen nach neuartigen Hydrogenase-Genen**

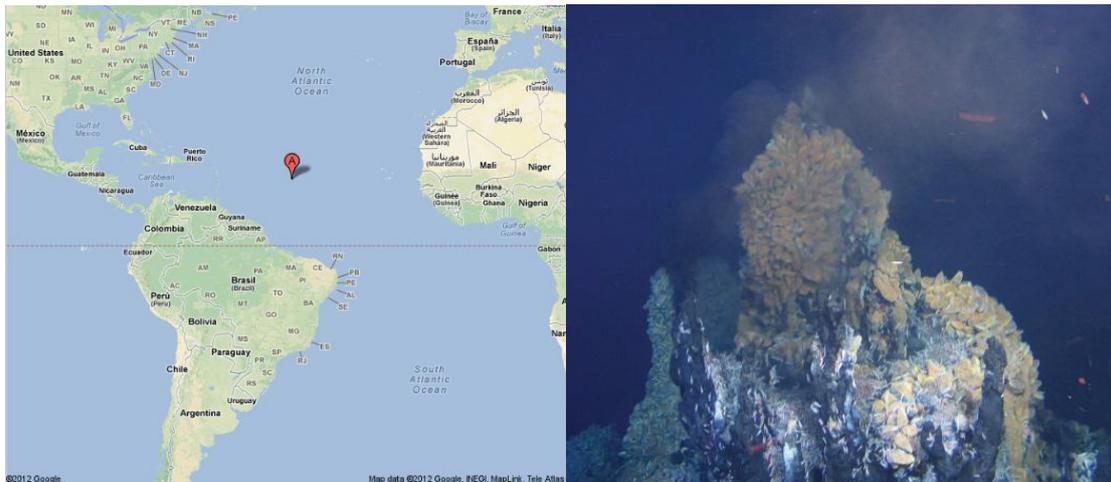
Metagenome gelten als Reservoir für neuartige Gene von biotechnologischer Bedeutung (137). Bis zum jetzigen Zeitpunkt fehlt jedoch ein Hochdurchsatz-Tool, um den komplexen Pool an unbekanntem Nukleinsäurematerial zu screenen (138), da aufgrund der großen Menge an verschiedenen Organismen z.B. ein Aktivitätsassay kaum durchführbar ist. Der Ansatz eines Microarray erlaubt bei geringem Einsatz von Probenmaterial die sequenzbasierte Analyse von vielen Klonen gleichzeitig (111). In vielen natürlichen Habitaten leben Bakterien, die biotechnologisch interessante Enzyme beinhalten, welche durch die Microarray Technologie auch ohne das Wissen über die enthaltenen Sequenzen untersucht werden können, um für die Forschung interessante Enzymklassen zu identifizieren (139). Eine solche interessante Enzymklasse sind z.B. die energieliefernden Hydrogenasen, welche bereits in einem großen Anteil sequenzierter Genome gefunden wurden (40).

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels Microarray in einer unbekanntem Probe, einem Metagenom aus einem hydrothermalen Schlot, nach neuartigen, möglicherweise in hohem Maße thermostabilen Hydrogenasen zu suchen.

##### **3.1.1 Herkunft der Metagenombank**

Die Probenentnahme erfolgte am nördlichen mittelatlantischen Rücken im Logatchev Hydrothermalfeld am Standort „Quest“ (14° 45.175'N 44° 58.831'W, siehe „A“ in Abbildung 3.1) aus 3045 m Tiefe.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.1:** Lage des Standortes „Quest“ im Logatchev Hydrothermalfeld des mittelatlantischen Rückens (links) und Foto des „black smokers“, von dem die Probe entnommen wurde (rechts).

Die Probenentnahme wurde von Dr. Mirjam Perner (Universität Hamburg) am 19.12.2007 auf der Forschungsfahrt Hydromar V mit dem Forschungsschiff RV L'Atalante (Ifremer, Toulon, Frankreich) im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms 1144 (SPP 1144) „Vom Mantel zum Ozean“ mit dem Tauchroboter ROV Kiel 6000 (IFM Geomar) durchgeführt.

Es wurde Probe aus den diffusen, moderat temperierten Fluiden (5-10 °C) an einem „black smoker“ entnommen (Abbildung 3.1, rechts).

Das Zustandekommen eines „black smokers“ ist bedingt dadurch, dass das Untergrundwasser viele gelöste Sulfide und andere Salze von Eisen, Mangan, Kupfer und Zink beinhaltet. Wenn dieses bis 400 °C heiße Wasser aus den thermalen Quellen austritt und auf das 2 °C kalte Wasser über dem Meeresboden trifft, kühlt es ab und die Mineralien präzipitieren, was den schwarzen Rauch hervorruft. Die Mineralien lagern sich ab und bilden somit den Schlot. Interessant ist das Habitat schwarzer Raucher in diesem Zusammenhang vor allem deshalb, weil dort Organismen leben, welche hyperthermophil sind und einen anaeroben Stoffwechsel aufweisen und somit an Extreme angepasste Enzyme beinhalten sollten.

Im Anschluss an die Probenentnahme wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Perner heterotrophe Anreicherungskulturen (70 °C Wachstumstemperatur) erstellt, aus denen im Anschluss eine 8500 Cosmidklone umfassende Cosmidbank in *E. coli* vcs 257 generiert wurde. Die Inserts wurden hierfür mit *Bsp143I* geschnitten und über die *Bam*HI Schnittstelle in den Cosmidvektor pWE15 integriert. Die Insettrate betrug 95 % und die mittlere Insertgröße lag bei 29 kb. Eine 16S rRNA Genanalyse zeigte, dass die Cosmidbank Genomsequenzen von 10 Spezies enthält: 8 *Eubacteria* und 2 *Archaea*. Die Archaeen können alle der Familie der *Thermococcaceae* zugeordnet werden, bei den Eubakterien handelt es sich um Vertreter der Phylen *Bacteroidetes*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacteria* und *Deltaproteobacteria* sowie *Firmicutes*. Die Genombank deckt das Genom der ermittelten Spezies mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,93 % ab. Die phylogenetische Einordnung der verschiedenen *Eubacteria* und *Archaea*, die in der Anreicherungskultur enthalten sind, ist im von T. Meier berechneten Stammbaum (Abbildung 3.2) dargestellt.



Banden bei der erwarteten Größe (je nach Primer-Paar 525 bp bzw. 255 bp) ergaben. Diese erhaltenen PCR-Produkte wurden gereinigt, in den pDrive Klonierungsvektor integriert und mit *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Nach der Selektion von Insert-enthaltenen Klonen mittels Blau-Weiß-Screening (2.5.2) wurde von 6 Klonen die Plasmid-DNA isoliert und zur Überprüfung der korrekten Insert-Größe mit *EcoRI*, einem Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenzen das Insert im pDrive-Vektor flankieren, geschnitten. Die Inserts wurden sequenziert. Ein Sequenzabgleich zeigte hohe Ähnlichkeiten zu der Atmungsketten-NADH-Dehydrogenase von *Thermococcus barophilus* MP (140) und zur [NiFe] Hydrogenase von *Thermococcus sibiricus* MM739 (141). Darüber hinaus konnten auch Ähnlichkeiten zu den Hydrogenasen der Organismen *Thermococcus onnurineus* NA1 und *Thermococcus gammatolerans* gefunden werden. Mit diesen Informationen konnten die Sequenzen für die Oligonukleotide der Microarray-Slides (3.1.3) gezielter ausgewählt werden.

### 3.1.3 Auswahl der Microarray-Zielsequenzen

Die Microarray Technologie basiert auf einer Homologie-Suche mittels DNA-Hybridisierung von nicht charakterisiertem Material gegen immobilisierte Oligonukleotide vorgegebener Sequenz. Üblicherweise verwendet man Glas-Slides, auf die in einem bestimmten „Muster“ Oligonukleotide so aufgetragen werden, dass jede Probe mehrfach pro Slide vorhanden ist, um eine zufällige oder fehlerhafte Hybridisierung auszuschließen. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden komplementär zu konservierten Bereichen der Hydrogenasen gewählt. Es wurden 54-mer Oligonukleotide auf die Slides gespottet, welche zum hoch konservierten C-terminalen Nickelbinde-Motiv der großen Untereinheit der [NiFe] Hydrogenasen (Aminosäuresequenz: DPCxxC) (63) sowie zu den nickelbindenden Resten im proximalen Motiv (ICGICQVSH) komplementär sind. Es wurden 106 verschiedene Gensequenzen verwendet, wovon 8 von Bakterien (*Desulfovibrio*, *Allochromatium*, *E. coli*), 7 von zuvor entdeckten Hydrogenasesequenzen aus Hydrothermalfeldern (mit CAL bezeichnet) und der Rest von Archaeen stammen. *E. coli*-Sequenzen wurden mit

## Ergebnisse

aufgebracht, um etwaige Cross-Hybridisierungen durch die *E. coli* vcs 257 Wirts-DNA der Metagenombank detektieren zu können, welche häufig bei der Cosmidisolierung mit aufgereinigt wird, was zu unerwünschten Zielsequenzen führen könnte.

```

D. kamchatkensis KGKP-YRWRVRAPTYNNIPALRIMLRDQSLADAPLTIASIDPCFSCDTRI
T. onnurineus ENMI-YRWHPRAAATYNNLPAVPIMLRGNDVADAPLIIASIDPCFSCDTHV
T. onnurineus NNKV-YRYRARAATYNNLPAVPDMMRGYTIADAPLIVASIDPCYSCTERV
S. marinus F1 HGRP-YRWRVRAPTYQNI PALKIMLRDAPLADAPLTIASIDPCFSCDTRI
T. gammatolerans GNRL-YRWRIRASTYNNFPALPDAMRGNSVADAVLIIASMDPCYSCTERV
    
```

\* \*

**Abbildung 3.3:** Sequenzabgleich der Nickelbinde-Region exemplarisch für 5 Hydrogenasen. Die grau hinterlegte, konservierte Sequenz war Grundlage für das Design der Oligonukleotide für den Microarray. Die fett gedruckten Cysteinreste (mit Sternchen versehen) koordinieren Nickel und Eisen am katalytischen Zentrum.

**Tabelle 3.1:** Sequenzen der 106 Oligonukleotide, welche auf die Microarray-Slides gespottet wurden. TmB: an die Salzkonzentration angepasste Schmelztemperatur. In Schwarz sind die Sequenzen homolog zum C-terminalen Nickelbinde-Motiv dargestellt, in Rot die homologen Sequenzen zum proximalen Motiv.

ID	Sequenz	GC [%]	TmB [°C]
11498976	accctgatggctgcagaagcttcgaccctgcattgcctgcgctgtccacgtg	61	89
20090008	atcctcatattgtaggtcctatgacccctcgcttcatgcgcagttcacacc	50	84
73669352	atcttccatatgggcaggtcctatgatccttgcatttcatgtgcagtccatacc	46	83
146303703	gtagctcatattgtcaggtcacatgatgatgatggtatgcaacgttcatgtc	43	81
156938154	tacgtgagggcgataaggagcttcgaccctgcatagcttgtgccgctcacata	56	87
124028218	ttcgtgagatcgataaggagcttcgaccatgcctggcatgcgctgtccaccta	56	87
Tphrk5	ttcgtacgcgctatcaggagcttggacccttgcattgcgtgcgcggttcacata	54	86
MetaN3	atggaaatggaatagagcttatgaccctgtttatcttgtgccacacatgtt	39	80
45358386	atggaaatggaatcagacatacgcatttcatgtgcaacgcacaca	44	82
MetTHDH	gggccacacgcatcacgcgcttacgaccctgtctctcatgcgcaacacacgtg	61	89
MetMrM2	atggaaatggaatcgggcatacgcatttcatgtgcaacgcacaca	46	83
MetVanSB	atggaaatggaatagggcatacgcatttcatgtgcaaccacataca	43	81
MetAcetC2A	gccgagatggtgtccggcctatgaccctgcgttgcgtgcgcaaccacatg	65	90
163800084	atggaaatggttatcagagcatacgcaccctgtttatcctgtgcaacgcacaat	43	81
MetSmi2374	ggtgcagatgttatcagagcttacgaccatgtttatcatgtgcaactcacgta	44	82
MetMmazGo1	gcagagatggtgtccgtgcctatgaccctgtgtatcatgtgcaaccacatg	54	86
45358383	gcagaacacggtgtaagagcatacgcatttcatgcgcaactcacgta	48	83
MetMaripC5	gcagaacacggtgtaagagcatacgcatttcatgtgcaaccacgta	48	83
MetJan2661	ggagcaaatgtccaagtgaggagttccatgtagaggttcttcggtaaaaca	44	82

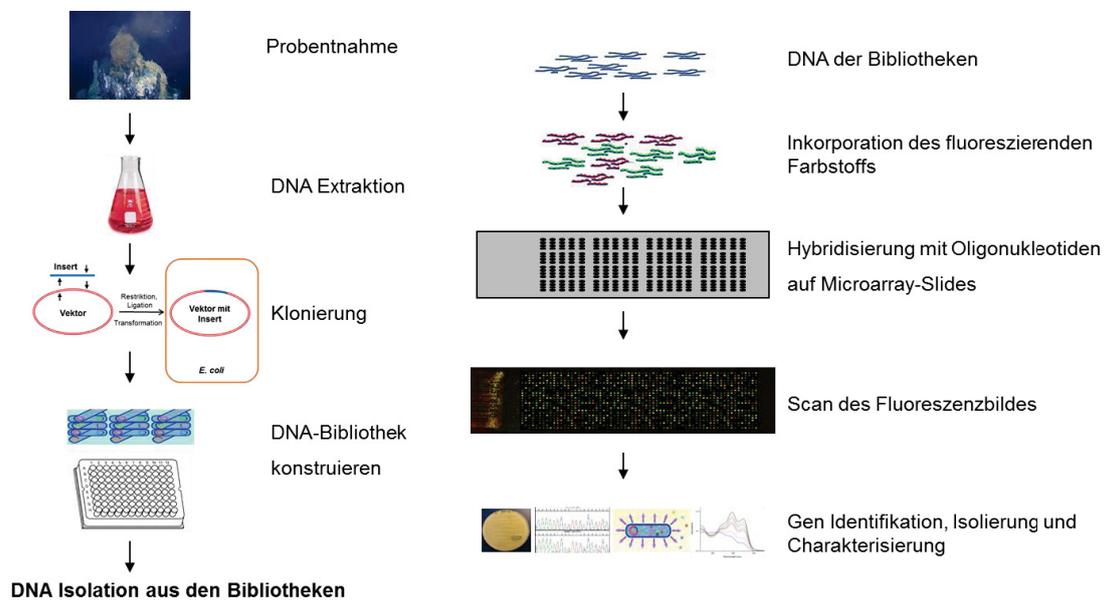
Ergebnisse

126460184	ctcgtgaaggctatcaggagctttgacccatgtctagcatgtgcagtgcacttt	50	84
YP_002307408	gtccccctaataatagccagcatagacccatgcttctcctgtacagaccacgtc	52	85
YP_002307956	gccccgctcatagtggcgagcatagacccctgctactcctgtacggagagagtt	59	88
YP_002428714	gcaccgctcacaatagccagtatagacccatgcttctcatgtactgatagaatc	46	83
YP_001041067	gcaccattaactatagctagcattgatccgtgttctcatgtacggatcgaata	41	81
YP_919596	ctcccggtgataattgggagcattgacccctgtatagttgtacggagagagtg	50	84
6YP_002306658	gccccgctcatcatagcggagcatagatccgtgctactcctgtacggagaggggtt	57	87
7YP_002958425	gccgttctgataatagcctccatggaccctgtactcctgtaccgagaggggtt	56	87
8YP_002958610	gcaccgctcatcatagcggagcattgacccctgtactcctgtacagagaggggtt	56	87
9NP_127148	gtcccgctgataatcgctagcatagatccatgttattctgcaccgagaggggtt	50	84
10YP_920473	ttcccagtcgtcgtcacgagcatagacccctgctcagctgtatggacaggggtg	57	87
11YP_001030396	atcccggtcatcgtggcctcggtcgatccgtgtcttctgcaccgacggggtc	65	90
12ZP_03872083	acgccgatcgtcgtcggcgatcaccctgtatcagctgtacctccggatc	65	90
13YP_504006	atcccgatcattgttgcattccatccatccctgcattgcattgcaccgacggggtg	56	87
14YP_002307980	ttcgtgctggcagtgccctcgatagatccgtgcctgagctgtacagacaggggtt	57	87
15NP_579163	ttagttgtccatagcttcaatagatccatgtctaagctgtacagacagagta	39	80
16YP_002467714	gatgtgccgatcatcgtctctcgatcaccctgcattcggctgcgagagcggg	65	90
17NP_143306	gtcgtcgtgcaatagcctctatagatccatgcctaagctgtaccgatagggta	48	83
18YP_002958402	ttcgtcgttctgtcgcctcgatagacccatgcctgagctgtacggacaggggtt	57	87
19NP_126404	gttgttgttctatagcatcaatagatccatgcttaagctgtacagacaggggtg	43	81
20YP_184504	tttgggttgcgggttgcctcaatagacccctgcctgagctgtaccgacaggggtt	54	86
73669346	atcctgcacacagctcgtctttagatccctgtctggatgtgcagttcataca	52	85
20090013	attttacatacgggtcgtcctatgacccctgcctggcctgtgcggtccataca	56	87
21228278	atcctgcatactgcccgtctttagatccctgcctgtcatgtgctattcataca	48	83
21228272	atattccacatgggcaggtcatacaccctgcatttcatgcgcagtcacacaca	52	85
21228415	atattccacatgggcaggtcatacaccctgcatttcatgcgcagtcacacacg	54	86
119871715	caagtgagggcgatcaggagcttcaccctgtctggcgtgtgtgtacatttt	56	87
171184882	caggtgagggcaatcaggagcttcgaccatgtctcgcctgtgagggtgcacttc	61	89
145591511	ctcgtgcgcgccattcgtagcttcgatccctgtctagcgtgcgcgggtgcacttt	61	89
20093706	atggagatggtgatccgggcttacgaccctgcctgtcttgtgcgaccacgta	59	88
84490090	gtccacatgtaataagagcatacaccatgtttatcatgtgtacacatatg	41	81
154151562	cttgccgagttgttatccggggtacgaccctgcatactctgtgctgcgcac	59	88
126178957	atcgagatgatcatcaggcgctatgaccctgtatttcgtgcgcgacgcacgcg	57	87
15679145	atggagatggtcataagggcatacaccatgtctcctgcgcaacacacacc	54	86
163800087	gctgaacacgttgaagagcttacgaccctgtgttctgtgtacacacatg	48	83
225015075	atggaaatggttatcagagcatacaccatgtttatcctgtgcaactcacact	43	81
148643059	atggaaatggttatcagagcatalgaccatgtttatcctgtgcaactcacact	41	81
84489137	atggaaatggttatcgtgcttacgatccatgtctatcctgtgctactcatcaa	41	81
14521157	cttgaggaggtagttagggcctttgatccatgtatctcatgtctgttcacgtg	48	83
88603577	gccgaggtcatcatgcgtgcatatgaccctgtgtgtcctgcgctaccacatg	59	88
126180114	gcggaagtcatcatgcgtgcatacaccctgtgtctcctgtgcgacgcacatg	59	88
146303725	tttcccaaaccctacgatcatttgatccatgtttgtatgaggagtgcatatg	43	81

## Ergebnisse

AllochromVin	atcctgcgacgctgcacagcttgcattccctgtctggcctgctcgacgcacatc	63	90
DvM	atcctgcgacggtgcattcgttcgaccggtgcacgcctgcggcgtgcacgtc	67	91
DVHYP_011139	attctgcgacccgtccactccttcgaccggtgcacgcctgtggcgtacacgtc	61	89
BL_ZP_04650095	attcactccttcgaccggtgcattggcctgtgcggtagacgtagtgatgccgac	59	88
536_YP_670964	attcactccttcgaccggtgcattggcctgtgcggtagacgtagtgatgctgac	57	87
FI_johnYP_001196237	attattagaaccatacattcctttgatccctgcattgcctgtgccgtgcatttg	43	81
DvMDeg	atcctgcgacggtgcayctgtygayccgtgyatcgctgygngtgcacgtc		92
YP_002307956A	ttcatagcggagagaatatgtggaatctgcggctgcacacactccacagcctac	52	85
YP_002307408A	ttcctcgcggagaggatgtggaatctgtggttcacccattccgcccatac	56	87
YP_002306658A	ttcatagccgagagaatatgtggaatctgtggtccagcactcgacgagctac	50	84
YP_002958610A	ttcctcgcggagagaatatgcggaatctgtggtaccagcactccgtcagctac	57	87
NP_127148A	ttcctcgcggaaggatgtgcggaatctgcggttatcagcactccgtttcttat	48	83
YP_002958425A	ttcatagccgagagaatatgcggaatctgcggcagggcccacgcctcgctac	61	89
YP_001191019A	gttataaccccagagaatatgtggtatagtataaccccagagaatatgtggtata	37	79
73669346A	cttctgtcccagaggatttgggtgttctctgttagccacgggatagctgca	52	85
20090013A	ctaaccagaggatctgcggggtctgccggtctgcatagcatagctgcagca	61	89
21228278A	atgacaatgaggatgtggtgctgtctgtatgccacagtatagctgctct	46	83
21228272A	ttcttacacagaggatttgggagtgtcccgtttctatgggttaacagca	44	82
119871715A	cacatagttctcgtacatgtggagtctgtggcgcagctcatgtaacgcctct	52	85
145591511A	gccataacctcgcgcagttgcggcgtctgcggggcggcccacgccaacgcctca	72	93
134045693A	tttaccccaagaatttgggaatttgcaggtttccacacaatttagcaagtgc	39	80
20093706A	atactgacgccgaggatctgtgggatgtcagggtggccatcacctcgccagc	59	88
150400535A	atattgaccccagagaatctgcggtatgtcaagtttctaccatttagcaagt	49	81
126460184A	gccattactcgcgcacgtgtggcgtctgcggcgtgcacatgtaacgcgtcg	65	90
119719505A	cacataactcagaggatttgcggcgtctgcggagcctcccacggaacgcctct	59	88
150398829A	gtatttacgccaagaatttgggaatttgcaggtttccacacaatttagcaagt	37	79
15679302A	gtcatcgtccagaggatgtggtgtagtccctataccacacaccctggcttcc	54	86
84490090A	gtactgttcaagaatatgtggagtgtccagtaacacatacattagcatca	35	78
154151562A	aagattgctcccggacctgcggtatctgcccggtgccccatgtctcgcgggc	69	92
126178957A	cgataacgccccgatctgcgggatgtccctcggcacaccacctggccgca	65	90
ThcoccusAM4	ttcctcgcggagagaatatgcggaatctgcggctaccagcactccgtcagctat	57	87
Th_barophiA	ttcttagccgagagaatatgcggaatctgtggttacaccacaactgtgctat	48	83
Th_barophiB	tatttagcggagaggatttgggaatatgttcatttccacacaaccacacttat	35	78
ThermocoAM4A	ttctggccgagagaatatgcggcatctgcggctgcacgcactcgactgcttac	57	87
ThermocoAM4B	tatctggccgagagaatatgtcgggatgtcagtttctcccacaaccacacctac	52	85
ThermocoAM4C	ctcgaggcagaggatgtgccatctgtacctctcccacagcgttgcctccgtt	59	88
MetMarGPRG1	ggagaagggttggatgctcgaagctccaagaggaacgctggtacaccacttc	56	87
DvHYP_011139A	cacttactcagcgcacctgcggcgtgtgcacclacacgcacatgcctggcttcc	65	90
CAL47083	atggctatcttgggtgtaaaaaccctcatcctcaatctttagcagttggtgt	41	81
CAL47086	atggctatcttggagggaaaaaccctcatcctcaatcttgggtgtgggaggg	48	83
CAL47120	atggcaatatttgggtgggaagaaccacatcctcaatcattggtgttaggtggc	46	83
CAL47110	cacaccatcttgggtgggaaaaaccctcatccaaactatctggtggcgggatg	52	85
CAL47108	catgccatcttggcggcaaaaaccctcatccgaattacctgtggcggagtt	52	85
CAL47089	cgagctatcttgggtgggaaaaaccacatccacaatctatctgtgtaggtggt	48	83
CAL47088	cacgcacttttgggtggaaaaatctccacaccctcagtctatcgttgggtggg	50	84

### 3.1.4 Microarray-Screening



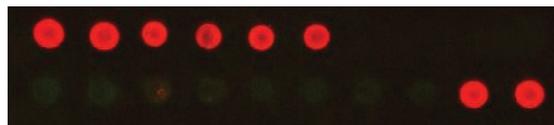
**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung des Vorgehens zur Herstellung und zum Screenen einer Metagenombank.

Zur Suche nach neuartigen Hydrogenasen in der Metagenombank wurde, wie im rechten Teil der Übersicht über das Vorgehen des Microarray-Screenings (Abbildung 3.4) ersichtlich, zunächst die DNA der Klone isoliert. Hierzu wurden jeweils 8 Mikrotiterplatten in mit 1250 µl LB-Medium befüllte Deep-Well-Platten abgestempelt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 130 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Anschließend wurde die DNA aus den einzelnen Wells isoliert. Hierzu wurden die Zellpellets der zentrifugierten Deep-Well-Platten (nach kompletter Trocknung, um das restliche Medium zu entfernen) in 250 µl FAPD1 Puffer resuspendiert. Zur Zellyse wurde 250 µl FAPD2 Puffer zugegeben und nach sofortigem Schütteln für 2 min inkubiert. Zur Neutralisation wurden 350 µl FAPD3 Puffer zugegeben und geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde das Lysat (Überstand) in eine 96-well Plasmid Platte transferiert und die DNA durch Zentrifugation an die Membran gebunden. Nach dem Waschen mit 650 µl Waschpuffer wurde die Membran getrocknet und die DNA nach 2-minütiger

## Ergebnisse

Inkubation durch 5-minütige Zentrifugation mit 50 µl Elutionspuffer eluiert. Die DNA von 4 Mikrotiterplatten wurde für einen ersten Microarray-Scan vereint und mittels eines Laborgefrietrockners aufkonzentriert. Parallel wurde die genomische DNA von *D. vulgaris* Miyazaki F, *D. desulfuricans* und *Allochromatium vinosum*, die alle die hier untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen aufweisen, als Positivkontrolle isoliert. Die isolierte DNA wurde nun mit dem Restriktionsenzym *AluI* geschnitten, da dieses Enzym mit einer Erkennungssequenz von nur 4 Basen (AGCT) sehr oft in DNA schneidet und sich somit relativ kurze, DNA-Abschnitte von vergleichbarer Länge produzieren lassen. Der Restriktionsverdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend wurde die DNA aufgereinigt. Die Probe wurde über Nacht mit Hilfe des Klenow Fragments mit Cy-5-dCTP markiert. Für einen Pool von mehreren Hundert Klonen wurden 2,5 µl Cy-5-dCTP verwendet, wurden nur 50 Klone untersucht, verwendete man 1,8 µl dieses Farbstoffes. Nach dem Beenden der Reaktion mit EDTA und anschließendem Denaturieren der Probe wurde das Hybridisierungsprogramm „step down“ in einer GeneMachines® Hyb4 Station gestartet (2.11.2) und die Probe zum Binden der Probe an den Microarray-Slide manuell in die Hybridisierungskammer injiziert. Am nächsten Tag wurde der Slide nach dem Trocknen gescannt. Da Cy-5 ein Absorptionsmaximum von ca. 635 nm aufweist, wurde bei dieser Wellenlänge detektiert.

Abbildung 3.5 zeigt beispielhaft das Ergebnis des Screening-Tests, bei dem der Microarray-Slide mit den Proben aus den Mikrotiterplatten der Nummern 37, 38, 54 und 58 hybridisiert wurde. Zu sehen sind 8 Spots, die die positiven Signale der Hybridisierung der Proben mit den Oligonukleotiden YP\_002307956 (6 Spots auf der linken Seite) und 6YP\_002306658 (2 Spots rechts unten) repräsentieren.



**Abbildung 3.5:** Positive Signale nach der Hybridisierung mit Cy-5 markierten Proben aus dem Metagenom einer hydrothermalen Quelle mittels Hydrogenase-Microarray.



## Ergebnisse

der Oligonukleotide YP\_002307956, 6YP\_002306658, 8YP\_002958610 und YP\_002306658A. Beim Screening der Platten 8, 12, 15, 16, 17 sowie 26 konnten keine positiven Signale detektiert werden. Die Platten 10, 19, 43 und 57 lieferte zusätzlich zu den bereits erhaltenen Signale der Oligonukleotide YP\_002307956, 6YP\_002306658, 8YP\_002958610 und YP\_002306658A noch ein Signal für die Sequenz ThcoccusAM4, während die Platten 41, 42, 55 und 56 nur Signale für 8YP\_002958610 und YP\_002307956 zeigten.

Anschließend wurden die Platten 37, 38, 54 und 58 geprüft. Bei diesem Pool ließen sich Hybridisierungen mit folgenden Oligonukleotiden entdecken: YP\_002307956, 6YP\_002306658, 8YP\_002958610, YP\_002306658A, YP\_002958610A, YP\_002958425A, 18YP\_002958402, ThcoccusAM4 sowie ThermocoAM4C. Diese 384 Cosmidklone (4 Mikrotiterplatten à 96 Cosmidklone) beinhalteten demnach aufgrund der 9 detektierten Signale 6 verschiedene Gene, welche von 3 unterschiedlichen Organismen stammen. So stammen die Sequenzen ThcoccusAM4 und ThermocoAM4C von *Thermococcus onnurineus* AM4, die Sequenzen YP\_002958425A, 18YP\_002958402, 8YP\_002958610 sowie YP\_002958610 von *Thermococcus gammatolerans* EJ3 und die Sequenzen von YP\_002307956, 6YP\_002306658 sowie YP\_002306658A von *Thermococcus onnurineus* NA1. Aufgrund der Tatsache, dass in diesem Pool neben erstmals detektierten Signalen auch alle Gene vertreten sind, die auch bei anderen Cosmidklonen gescreent wurden, wurde die weitere Analyse mit diesen 384 Klonen fortgeführt. Um die einzelnen Hydrogenase-beihaltenden Klone isolieren zu können, wurde zunächst ein Screening der DNA aus 2 Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Hybridisierung der DNA der Platten 54 und 58 lieferte die Signale YP\_002307956, ThcoccusAM4 und ThermocoAM4C. Die beiden letztgenannten Signale waren jedoch bei jedem durchgeführten Scan so schwach, dass nicht mit Sicherheit gesagt werden konnte, ob es sich um echte oder um falsch positive Signale handelte. Für das Signal YP\_002307956 wurde stets nur das Signal des forward-Primers detektiert, weshalb es für eine detailliertere Untersuchung ungeeignet zu sein schien.

Die Platten 37 und 38 wurden ebenfalls als Pool gescreent, wobei die DNA zusätzlich zu den 3 Signalen der Platten 54/58 mit den folgenden Oligonukleotiden hybridisierten: 6YP\_002306658, YP\_002306658A, 8YP\_002958610, YP\_002958610A und 7YP\_002958425. Auch bei einem anschließenden Screening der DNA der 96 Cosmidklone von Platte 38 wurden alle 8 Signale wieder gefunden. Aus diesem Grund wurde mit Platte 38 weiter gearbeitet. Ein Microarray-Screening der Reihen 7-12 der Platte 38 (48 Cosmidklone) lieferte neben den Thermococcus-Sequenz-Signalen auch Signale der Spots mit 7YP\_002958425, YP\_002958425A, 8YP\_002958610 sowie YP\_002307956A. Da der Farbstoff zum Markieren der DNA kostspielig ist, wurde anschließend, um die einzelnen Klone mit Hydrogenase-Genen zu identifizieren, ein PCR-Screening einzelner Cosmidklone durchgeführt.

### 3.1.5 Identifizierung der Gene der Hydrothermalquelle mittels PCR

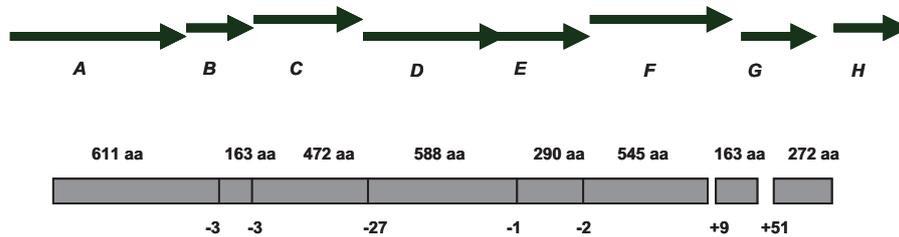
Die für das PCR-Screening verwendeten Primer basieren auf den Sequenzen der auf den Microarray Slides gespotteten Oligonukleotide. Die Primer wurden, abgeleitet von den Namen im Microarray-Screening, YP\_002958610A\_fw/YP\_002958610\_rev, YP\_002307956A\_fw/YP\_002307956\_rev, YP\_002958425A\_fw/7YP\_002958425\_rev und YP\_002306658A\_fw/6YP\_002306658\_rev genannt. Ein Sequenzabgleich der Oligonukleotidsequenzen aus dem Microarray-Screening mit der großen Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase aus *E. coli* ergab je eine Vorwärts- und Rückwärts-Sequenz für einen Primer, welcher in allen verglichenen Sequenzen konserviert ist, mit Ausnahme der *E. coli* Sequenz. Aus diesem Grund sind diese Primer für das PCR-Screening geeignet, um keine ungewollten, von der Wirts-DNA hervorgerufenen PCR-Amplifikate zu erhalten. Diese Primer wurden mit DFKVPVYK für den Vorwärts-Primer und mit QVVDVESG für den Rückwärts-Primer benannt.

## Ergebnisse

Zunächst wurde die DNA jeder der 8 Spalten der Platte 38 vereint und die erhaltenen 12 Ansätze wurden in einer PCR mit allen genannten Primern amplifiziert. Da ein Agarose-Gel zwar Banden zeigte, diese aber aufgrund der großen Menge an gepoolter DNA nicht aussagekräftig genug waren, wurde anschließend eine PCR der Reihen 7, 8 und 9 der Platte 38 durchgeführt. Hierbei wurden sowohl die Primer-Paare YP\_002307956, YP\_002958425 als auch das Primer-Paar DFKVPVYK/QVVDVESG verwendet. Von der DNA der Reihe 7 wurde für die beiden erstgenannten Primer-Paare ein Amplifikat der erwarteten Größe bei circa 900 bp erhalten, von der DNA der Reihe 8 konnte bei den Primer-Paaren DFKVPVYK/QVVDVESG und YP\_002958425 ebenfalls eine Bande entsprechender Größe beobachtet werden. Allerdings traten hier auch Banden anderer Größen auf, weshalb im Folgenden mit der Reihe 7 der Platte 38 weiter gearbeitet wurde. Von diesen 8 Cosmidklonen wurden jeweils 2 vereint und eine PCR mit beiden oben genannten Primer-Paaren durchgeführt. Mit dem Primer-Paar YP\_002307956, welches ein PCR-Produkt einer Größe von 800 bp generieren soll, wurde bei 7G/H und 7E/F ein entsprechendes Produkt erhalten. Diese 4 Cosmidklone wurden anschließend separat mit dem Primer-Paar YP\_002307956 amplifiziert. Hierbei wurde festgestellt, dass bei p38H7 die stärkste Bande bei 800 bp entstand, während p38G7 ein Amplifikat mit leicht größerer Bande lieferte.

Beide Amplifikate wurden gereinigt und sequenziert. Während die erhaltene Sequenz von p38G7 keine Ähnlichkeit zu einer Hydrogenase aufwies, zeigte das Amplifikat von p38H7 nach einem Blast die höchste Ähnlichkeit zum *hydA* Gen der Formhydrogenlyase von *Thermococcus litoralis* DSM 5473 aufweist. Der Sequenzvergleich beider Aminosäure-Sequenzen ergab eine Ähnlichkeit von 65 %. Nach der Sequenzierung des gesamten Cosmids konnte mittels Blast festgestellt werden, dass sich 2 neuartige Hydrogenase-Gene im 36 kb großen Insert befinden. Zum einen eine Sequenz, welche die größte Homologie zum *fdh-mhy* Operon von *T. litoralis* DSM 5473 aufweist. Hierbei handelt es sich um eine Format-Dehydrogenase, welche mit einer membrangebundenen Hydrogenase

gekoppelt ist (142). In diesem Fall erfolgt die Bildung von Wasserstoff durch die Oxidation von Format.

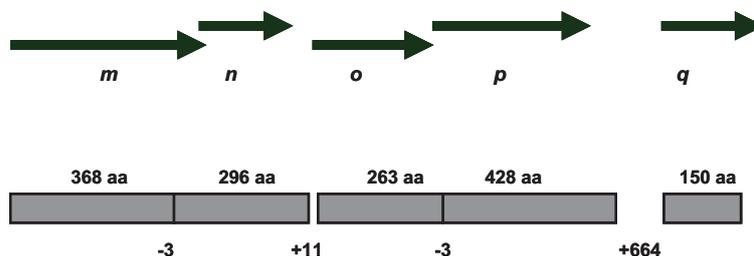


**Abbildung 3.7:** Organisation des 9 kb großen Operons mit der höchsten Homologie zum *fdh-mhy* Operon des multi-Untereinheit Komplexes der Formathydrogenlyase, einer Format-Dehydrogenase, gekoppelt mit einer membrangebundenen [NiFe] Hydrogenase III aus *T. litoralis* DSM 5473. Die Untereinheit F stellt die große Untereinheit der [NiFe] Hydrogenase dar. Die Aminosäureanzahl (aa) gibt die Größe des in den Genen codierten Proteins wieder.

Die Ähnlichkeiten der einzelnen Untereinheiten zu der sequenzierten DNA aus p38H7 der Metagenombank reichen von 36 % (Untereinheit A) bis 75 % (Untereinheit G):

Untereinheit	A	B	C	D	E	F	G	H
Ähnlichkeit zu <i>T. litoralis</i> DSM 5473 [%]	36	68	72	49	57	72	75	74

Zusätzlich wurde auf dem Insert des Cosmidklons p38H7 eine Sequenz entdeckt, die die größte Ähnlichkeit zur [NiFe] Hydrogenase von *T. onnurineus* NA1 aufweist.



**Abbildung 3.8:** Organisation des 5 kb großen Operons mit größter Homologie zu der cytosolischen [NiFe] Hydrogenase von *T. onnurineus* NA1. Die Untereinheit m stellt die  $\beta$ -Untereinheit dar (85 % Ähnlichkeit), n weist die größte Ähnlichkeit zur Cytochrom  $c_3$  Hydrogenase  $\gamma$ -Untereinheit aus *T. kodakarensis* KOD1 auf (91 % Ähnlichkeit), o und p bilden die  $\delta$ - und  $\alpha$ -

## Ergebnisse

Untereinheiten (86 % Ähnlichkeit bzw. Untereinheit p 85 % Ähnlichkeit mit *T. kodakarensis* KOD1) und q kodiert für eine Maturations-Endopeptidase (81 % Ähnlichkeit).

Diese [NiFe] Hydrogenase besitzt demnach Cytochrom  $c_3$  als Elektronenakzeptor.

Ein Aminosäure-Sequenzvergleich des Cosmidklons p38H7 mit den entsprechenden ORFs aus den Genomen von *T. litoralis* DSM 5473 und *T. onnurineus* NA1 (Abbildung 3.9) dokumentiert die Homologie des Cosmidklons zu beiden gefundenen Hydrogenase-Operons, zeigt aber auch, dass die Proteine nicht identisch sind, dass es sich demnach bei den mittels Microarray und PCR-Screening detektierten Genen um zwei neuartige Hydrogenase-Gene handelt.

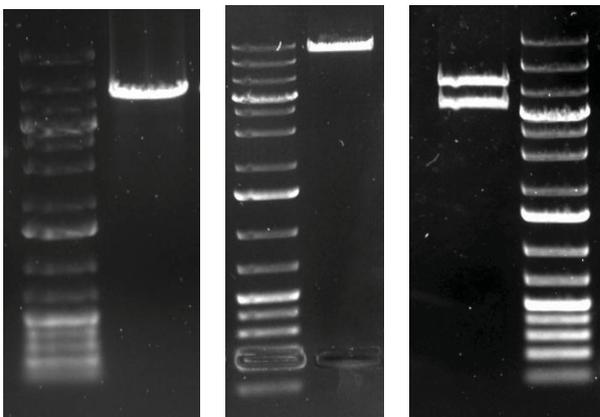
p38H7	QLLAVGIAAHLTGFDTGFMETRTWELREKVMETFLAERLTGNRKTYGLIAGVRRDLLD
T. onnurineus	HLLWLGIAAHLTGFDTAFMRS--WEIREKVMET--LAERLTGNRKTYGLVLVGGVRRDLLD
T. litoralis	HLLNFGIVSHLVGYDYGFMKA--WRIREHVMW--LAERLTGNRKTYGMLLVGGVRRDLLE
	:** .**.:**.*:* .**.: *.:***:** *****:..:*****:
p38H7	YRKELVERTMETRELKEGVEKLSKFLSSGSFVNRLKKGVLTKKLAREWDVCGPMETAR
T. onnurineus	YRKSILETLKN--LKKDFDEFVDMLISTKSFVRRCEGIGVLPKEKAREWDTAGP--LAR
T. litoralis	YRKSIEDVLKK--IKTEFSELVDEAISTSTFVKRLEGVGLPYKVAKEWDVVGDP--LGR
	***.*: .:.: .* .:.: . :*: :**.* :* ****. : :****. ** *
p38H7	GSGIDYDVRDFPYAAYDEVSFDPVYTEGDALARTLVRLEEVRESVGIIEQILDGMETP
T. onnurineus	ASGIDYDTRKSLSYAAYDELSFDVPVYKEGDVLARALVRIDEVRESISLLEQAID--AIP
T. litoralis	GSGRDFDVRDHPYAAYKYLDKVPVYKEGDVLARALVRIEEVFESIWIIEQALD--QMP
	.** *:*.*:. *****. :*.*****.***.***:***:*** ** ::* :*
p38H7	SGPLVAEFDEIPAGREGISAVEAPRGENVHYVMETDDDRDMETIYRWRIKAATYNNLQAA
T. onnurineus	GGPVMGEFNEIPSWREGISAVEAPRGENTHYVMTGEVNR----IYRWRVKAPTYYNNLQAV
T. litoralis	GGDILAEYKEIPPYSEAIMTEAPRGENIHYVMTGENNK----VYRYRARAATYNNLPVAV
	.* :.*:*.*.***. *.*. ***** **** :* :*:*:* :*.***** *

**Abbildung 3.9:** Aminosäure-Sequenzvergleich des sequenzierten Cosmidklons p38H7 mit den Hydrogenase-Sequenzen von *T. litoralis* DSM 5473 und *T. onnurineus* NA1. Identische Aminosäuren sind mit Sternchen dargestellt, Punkte zeigen ähnliche Aminosäuren (Doppelpunkte: Konservierte Aminosäuren, Punkte: Semi-konservierte Aminosäuren).

### 3.1.6 Subklonierung der beiden Hydrogenase-Operons aus dem Cosmidklon p38H7 der untersuchten Metagenombank

Um die beiden auf dem Cosmidklon p38H7 kodierten neuartigen Hydrogenasen genauer untersuchen zu können, sollten beide Operons aus dem Cosmidvektor pWE15 herausgeschnitten werden, um die Proteine in einem geeigneten Wirt

heterolog exprimieren und anschließend charakterisieren zu können. Hierzu mussten die Gene zunächst in Klonierungsvektoren eingebracht werden. Es wurde versucht, beide Operons in den TA-Vektor pCR2.1 sowie den Vektor pBluescript II SK+ zu ligieren, was jedoch scheiterte. Das circa 5,2 kb große Operon mit der größten Ähnlichkeit zur [NiFe] Hydrogenase aus *T. onnurineus* NA1 konnte nach mehreren erfolglosen PCR-Versuchen mit der *Taq*-Polymerase letztendlich über eine Amplifikation mit der *Pfu*-Polymerase erfolgreich „blunt-end“ in das Plasmid pJET1.2 ligiert werden. Das 9,2 kb große Operon mit der größten Homologie zum *fdh-mhy* Operon aus *T. litoralis* DSM 5473 wurde mit dem Klonierungsvektor pDrive ligiert. Dies geschah über die A-Überhänge des Vektors durch die Erzeugung von T-Überhängen, die bei Verwendung der *Taq*-Polymerase bei der Amplifikation der DNA entstehen. Hierfür wurden die Primer 9kb\_fw\_2 und 9kb\_rev\_3 verwendet. Die Klonierung wurde nach der Transformation der Konstrukte pJET::5kb und pDrive::9kb mittels Restriktionsverdauen (siehe Abbildung 3.10) und einer Sequenzierung überprüft.



**Abbildung 3.10:** Restriktionsverdau zur Überprüfung der korrekten Klonierung der Konstrukte pJET::5kb und pDrive::9kb. Links: Restriktionsverdau des Konstrukts pJET::5kb (8,2 kb) mit *NdeI*; das Konstrukt wird linearisiert. Mitte: Restriktionsverdau mit *NotI* zum Linearisieren des Konstrukts pDrive::9kb (13,1 kb). Rechts: Restriktionsverdau des Konstrukts pDrive::9kb mit *AvrII*. Dieses Enzym schneidet zweimal im Konstrukt und liefert damit Fragmente der Größen 7,6 kb und 5,5 kb. Zum Vergleich der Markergrößen siehe 2.5.1.

Ein geeigneter Wirt zur heterologen Expression der beiden neuartigen Hydrogenasen schien der hyperthermophile, ursprünglich aerobe Organismus

## Ergebnisse

*Thermus thermophilus* HB27 zu sein. Dank einer von der Arbeitsgruppe um Prof. Liebl (TU München) durchgeführten Klonierung kann dieses Eubakterium mittels Nitratreduktion anaerob wachsen (143). Seine optimale Wachstumstemperatur beträgt ca. 72 °C, was der Wachstumstemperatur der in der Genombank gefundenen *Thermococcus*-Spezies von ca. 85 °C relativ nahe kommt (144). Dieser Organismus besitzt keine eigene Hydrogenase, wodurch nicht erst eine Knock-out Mutante erstellt werden muss, um die Expression der wirtseigenen Hydrogenase zu verhindern. In einer Kooperation mit Herrn Prof. Liebl wird aktuell versucht, einerseits das Cosmid p38H7, welches beide Hydrogenase-Operons enthält, zu mobilisieren und es in das Chromosom von *Thermus thermophilus* zu integrieren. Andererseits sollen die Operons einzeln in Expressionsvektoren kloniert werden und anschließend in die *T. thermophilus* Zellen eingeschleust werden, um die Hydrogenase jeweils direkt vom Plasmid aus zu exprimieren.

### 3.1.7 Diskussion

Das relativ neue Verfahren der Metagenomik wurde aufgrund der Tatsache, dass die meisten Mikroorganismen bis heute als nicht kultivierbar gelten (145), entwickelt. Hierdurch konnten bereits viele neuartige und für uns nutzbare Enzyme gewonnen werden, wie z.B. eine thermostabile  $\beta$ -Glucosidase aus einer Metagenombank aus dem Darm der Termiten *Globitermes sulphureus* (146). Es existieren zwei grundsätzliche Arten, nach neuartigen Genen in einer Metagenombank zu suchen: Funktionelles Screening und sequenzbasierte Analyse (147-149). Bei einem funktionellen Assay könnte man zum Beispiel ganze 96-Well Platten einer Metagenombank mit Methylviologen versetzen und anschließend die verschlossene Platte mit Wasserstoff begasen. Diese Art der Suche nach neuen Hydrogenasen wirft jedoch viele Probleme auf. Die Tatsache, dass [NiFe] Hydrogenasen nur dann aktiv sind und Methylviologen zu einem sichtbar blauen Farbstoff reduzieren können, wenn sie vollständig maturiert sind, bedingt die Anwesenheit und Expression von Maturasen auf demselben Cosmidklon, auf dem auch die Hydrogenase kodiert ist (150,151). Zudem sucht

man in diesem Fall nur nach sogenannten „uptake“ Hydrogenasen und vernachlässigt die Tatsache, dass [NiFe] Hydrogenasen auch Wasserstoff produzieren können (152). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Ansatz des sequenzbasierten Screenings verfolgt. Es existiert hierbei die Möglichkeit eines PCR-Screenings mit degenerierten Primern, um in einer unbekannt Probe nach neuartigen Hydrogenase-Genen zu suchen. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings die Eingeschränktheit der Variationen. So kann man stets nur mit einem Primer-Paar arbeiten, welches nur einen geringen Teil der verschiedenen Sequenzen abdeckt. Auch muss die Konzentration an Magnesiumchlorid und DMSO je nach PCR-Ansatz neu variiert werden, was sehr zeitintensiv sein kann. Darüber hinaus sind positive Treffer immer Gene, die zu den gewählten Oligonukleotidsequenzen eine relativ hohe Homologie haben. Eine andere, hier angewendete Methode zur Untersuchung von Metagenomen ist das 1995 erstmals angewendete Microarray-Screening (153), bei dem gleichzeitig Hunderte von Klonen einer unbekannt Probe analysiert werden können (112,154-156). Diese Methode basiert auf dem Vorhandensein von konservierten Motiven in der Sequenz der Gene. Neben den immensen Vorteilen eines schnellen Screenings Tausender Klone mit geringem Probeneinsatz und der Unabhängigkeit von heterologer Expression der kodierten Proteine gibt es jedoch auch Nachteile bei der Microarray-Technologie. So können nur zu den bereits bekannten Hydrogenasen ähnliche Enzyme entdeckt werden (157). Hydrogenasen, welche nicht die konservierten Bereiche in ihrer Sequenz aufweisen, werden mit diesem Screening nicht detektiert. Ein weiteres mögliches Problem bei der sequenzbasierten Suche ist die anschließende heterologe Expression, die insbesondere im Fall der Hydrogenasen ein vollständiges Maturationspaket benötigt. So werden oft spezifische Maturasen (150,158) für die Insertion von Eisen in das aktive Zentrum und die Eisen-Schwefel Cluster der kleinen Untereinheit von [NiFe] Hydrogenasen sowie Peptidasen benötigt. Im Falle der [NiFe] Hydrogenase aus *Thermococcus litoralis* (159) sind bereits die beiden ersten Hilfsproteine für die Maturierung, HypC und HypD, erforscht (160). Diese Proteine besitzen eine Ähnlichkeit von nur 30-40 % zu analogen

## Ergebnisse

mesophilen Hilfsproteinen. In der Tat konnte die mesophile *E. coli* Hydrogenase durch die beiden hyperthermophilen Proteine nicht korrekt gefaltet werden (160).

Die Anwesenheit von Genen, die für derartige Hilfsproteine kodieren, wird beim Microarray-Screening nicht detektiert und somit führen auch positive Signale nicht zwingend zu einer funktionellen Charakterisierung der Enzyme. Auch werden viele [NiFe] Hydrogenasen nach ihrer Bildung durch die Zellmembran in das Periplasma transportiert (161). Die dafür vorhandenen Tat- oder Sec-Erkennungsmotive werden nicht notwendigerweise vom heterologen Wirt erkannt, so dass eine Maturierung bzw. Aktivierung der Hydrogenase verhindert wird. Auch fehlende Erkennung der Promotoren und damit verbundene fehlende Transkription der Gene im heterologen Wirt können zu Problemen führen. Aus diesem Grund sollen die in dieser Arbeit gefundenen putativen Hydrogenasen anstatt im mesophilen Wirt *E. coli* in einem ähnlich thermophilen Wirt exprimiert werden. *E. coli* ist zwar im Labor einfach handhabbar, jedoch unterscheidet sich sein Metabolismus stark von dem thermophiler Organismen (wie die unterschiedliche Codon-Nutzung mesophiler und thermophiler Prokaryoten bereits ausdrückt (162)). Man geht davon aus, dass *E. coli* im Durchschnitt nur 40 % aller eingeschleusten Gene exprimiert (abhängig vom Ursprungsorganismus) (163). Deshalb erscheint der Wirt *Thermus thermophilus* HB27 (164) für die heterologe Expression der beiden neuartigen Hydrogenasen deutlich besser geeignet.

Das durchgeführte Screening basiert auf den Sequenzen der konservierten Bereiche des C-terminalen Nickelbinde-Motivs der großen Untereinheit sowie den nickelbindenden Resten im proximalen Motiv der [NiFe] Hydrogenasen. Es wurden 54 Basen lange Oligonukleotide generiert. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden bereits Oligonukleotid-Microarrays durchgeführt (165). Die Länge der Oligonukleotide wies hierbei eine große Variabilität auf: Es wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 13-30 Basen (166), über 25 Basen (167) bis zu 50 Basen pro Spot (168-170) verwendet. Auch ein Screening mit 70 Basen

langen Oligonukleotiden wurde bereits erfolgreich für die Genotypisierung von zweier *Campylobacter* Stämme ausgeführt (171). Aufgrund der positiven Erfahrungen von G. Pathak mit einem LOV Domänen Microarray, bei dem 54-mer Oligonukleotide verwendet wurden (172), wurde auch für die Konstruktion des Hydrogenase-Microarrays die Länge von solchen 18 Aminosäuren umfassenden Primern verwendet. Dafür wurden manuell Datenbanken nach geeigneten Sequenzen durchsucht. Die generierten 106 verschiedenen Gensequenzen wurden auf Glas-Slides gespottet und mit der DNA der Umweltprobe aus dem hydrothermalen Schlot des mittelatlantischen Rückens hybridisiert. Hierbei wurden aufgrund der unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide ( $T_m$  von 78 °C bis 93 °C) verschiedene Hybridisierungstemperaturen verwendet, insgesamt wurden vier Zyklen von je 4 bis 4,5 Stunden mit geringer werdenden Temperaturen (2.11.2) angewendet.

Beim Scannen der hybridisierten Slides konnte festgestellt werden, dass häufig dieselben Signale zu beobachten waren. Dies spricht nicht zwingend dafür, dass auch nur diese wenigen *Thermococcus*-Hydrogenasen in der Metagenombank vorhanden sind, sondern es deutet vielmehr darauf hin, dass in einer Mischung unkultivierter Bakterien primär die Gene detektiert werden, die reichlich vorhanden sind (vgl. auch (173)).

Das anfängliche Screening von DNA-Pools aus 400 Cosmidklonen lieferte Signale, die in späteren Screenings nicht mehr aufgetaucht sind. So wurde beim Screening der Platten 37/38/54/58 ein Signal des Oligonukleotids 18YP\_002958402 erhalten, bei weiteren Screenings wurde dieses Signal jedoch nicht erneut detektiert. Dieses einmalig auftretende Signal kann auf eine Cross-Hybridisierung des Oligonukleotids mit nicht homologen Bereichen der untersuchten DNA zurückzuführen sein (154), welche bereits ab 15 identischen Basen auftreten können (174).

## Ergebnisse

Im Anschluss an das Microarray-Screening, bei dem in 48 gepoolten Klonen der Platte 38 Signale von 6 Oligonukleotiden (siehe 3.1.4) beobachtet wurden, wurde mittels eines PCR-Screenings der Klon p38H7 entdeckt, welcher laut eines Sequenzabgleiches zwei Hydrogenase-Gene enthält. Von Genen aus der Metagenombank einer Umweltprobe kann selbstverständlich nicht mit Gewissheit der Ursprungsorganismus bestimmt werden. Da jedoch beide Gene eine sehr hohe Homologie zur Gattung *Thermococcus* aufweisen, kann man davon ausgehen, dass diese Gene der Familie der *Thermococcaceae* zugeordnet werden können. Auch die 16S rRNA Analyse der Anreicherungskultur der Probe aus dem Hydrothermalfeld zeigte eine Dominanz der Gattung *Thermococcus*. Dies ist nicht ungewöhnlich, denn diese Archaeen werden unter den in Tiefseequellen lebenden thermophilen Mikroorganismen mit am häufigsten isoliert (175,176). *Thermococcus* weist einen heterotrophen Stoffwechsel auf (177), in dem es elementaren Schwefel mit Hilfe von Wasserstoff, welcher aus organischen Quellen stammt, reduziert; hierbei entsteht Sulfid (178). Die bei dieser Reaktion anfallenden, für den Organismus überschüssigen Reduktionsäquivalente werden von Hydrogenasen zu Wasserstoff aufgebaut (10). Trotz ihrer hyperthermophilen und obligat anaeroben Lebensweise sind diese Mikroorganismen sehr flexibel und können auch kurzfristig in Anwesenheit von Sauerstoff und bei niedrigen Temperaturen überleben (179), was ihr häufiges Auftreten an extremen Standorten erklärt. Diese starke Anpassungsfähigkeit macht die im Metagenom detektierten Enzyme zu sehr interessanten Forschungsobjekten. Im Anschluss an eine erfolgreiche heterologe Expression in *Thermus thermophilus* HB27 sollen beide Hydrogenasen biochemisch und spektroskopisch untersucht werden, um einen Nutzen in Bezug auf alternative Energiequellen aus den Informationen ziehen zu können.

## 3.2 Gewinnung und Charakterisierung der [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF*

Zur biochemischen, spektroskopischen und elektrochemischen Charakterisierung der [NiFeSe] Hydrogenase des sulfatreduzierenden Bakteriums *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F wurde die Anzucht der Zellen auf die Expression der [NiFeSe] Hydrogenase hin optimiert. Im Anschluss an die Akkumulation des Proteins in der Zelle erfolgte die Isolierung des Enzyms durch Säulenchromatographie, gefolgt von Analysen der Eluate mittels Aktivitätstests, UV/vis-, EPR- und FTIR-Spektroskopie sowie elektrochemischen Messungen.

### 3.2.1 Kultivierung von *DvMF*

*DvMF* besitzt mindestens drei Hydrogenasen: Eine periplasmatische [NiFe] Hydrogenase, die in dieser Arbeit untersuchte [NiFeSe] Hydrogenase, die ebenfalls im Periplasma lokalisiert ist, sowie eine aus sechs Untereinheiten bestehende energiekonservierende Hydrogenase (Ech Hydrogenase) (66). Diese membrangebundenen Multi-subunit Hydrogenasen (180), die formal zur [NiFe] Gruppe zu zählen sind (61), sind häufig in anaeroben oder fakultativ anaeroben Mikroorganismen zu finden, wie z.B. die Hydrogenase 3 aus *E. coli* (181) oder die Ech-Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* (182,183). Gene, die für eine [FeFe] Hydrogenase kodieren, lassen sich im Genom von *DvMF* nicht finden.

Bei der membrangebundenen [NiFeSe] Hydrogenase ist in der großen Untereinheit ein Cystein-Ligand des Nickels gegen ein Selenocystein ausgetauscht. Es ist bekannt, dass die Zugabe von Selen zum Wachstumsmedium die Expression von [NiFeSe] Hydrogenasen fördert (84). Dies konnte auch im untersuchten Organismus beobachtet werden: Wird dem Wachstumsmedium 1  $\mu\text{M}$  Nickel (in Form von Nickelchlorid) zugesetzt, wird die Expression der [NiFe] Hydrogenase gesteigert (dies wurde auch für die [NiFe] Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough berichtet). Wird zusätzlich zum Nickel oder ausschließlich 1  $\mu\text{M}$  Selen (als Natriumselenid) zugegeben, reduziert sich die Expression der [NiFe] Hydrogenase unter das

## Ergebnisse

basale Level der Expression ohne Nickel-Zugabe, während die [NiFeSe] Hydrogenase leicht verstärkt exprimiert wird und somit die dominierende Hydrogenase im Organismus ausmacht. Zwar wurde auch ohne die Zugabe von Nickel und Selen, wenn Wasserstoff der einzige Elektronendonator ist, eine leicht erhöhte Expression von [NiFeSe] Hydrogenasen festgestellt (184), jedoch ist der Effekt deutlicher und der Prozess besser zu kontrollieren durch die spezifische Zugabe der Spurenelemente.

Um spezifisch die Expression der Hydrogenase der Wahl zu fördern, wurde das Medium in chelex-gereinigtem Wasser mit der kontrollierten Zugabe von Eisen ( $14 \mu\text{M FeSO}_4$ ) sowie Selen und Nickel angefertigt. Im Anschluss an die Anzucht der 50 ml- und 1 l-Kulturen in Flaschen wurden jeweils 3 l der Vorkultur anaerob über Animpfschläuche zu 7 l PC-Medium, welches zuvor durch die Begasung mit Stickstoff von Sauerstoff befreit wurde, in einen Fermenter gegeben. Um ein Schäumen der Kulturen zu verhindern, wurde bei Bedarf automatisch durch einen Sensor Antischaum über eine Pumpe direkt in den Fermenter gepumpt, ebenso wurde die Zugabe von 2 M Schwefelsäure zur Regulierung des pH-Wertes zwischen 7,0 und 7,4 automatisch gesteuert. Die Temperatur wurde durch einen Wasserfluss innerhalb der Doppelwand des Glasgefäßes bei konstant  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  gehalten. Von den Bakterien produziertes  $\text{H}_2\text{S}$  wurde über einen Abluftfilter entsorgt. Zur Verteilung der zugegebenen Nährstoffe und des eingeströmten Stickstoffs wurden die Zellen mit 100 rpm gerührt. Es war darauf zu achten, dass zwar ein konstanter Stickstoffstrom herrschte, jedoch nicht mehr als eine Gasblase pro Sekunde zu sehen war, da die Zellen eine höhere Stickstoffzufuhr nicht überlebten. Am zweiten und dritten Tag wurden jeweils insgesamt 100 ml sterilisiertes Natriumlactat (50 % w/v in chelex-gereinigtem Wasser) als Kohlenstoffquelle zu den Kulturen gegeben; dies konnte über die Software des Fermenters gesteuert werden, so dass je nach Wachstumssituation der Zellen häufiger kleinere Mengen zugefüttert werden konnten. Die Ernte der Zellen (es wurden 80% der Zellkultur abgeerntet) erfolgte nach 3 Tagen Wachstum über einen Ernteschlauch, um den Fermenter weiterhin anaerob zu

halten. Dies war nötig, da in dieser Arbeit eine Dauerkultur etabliert wurde, bei der nach der ersten Fermenter-Ernte neues Medium zu den im Fermenter verbliebenen 2 l Kultur gegeben wurde und somit eine erneute Anzucht direkt im Anschluss stattfinden konnte. Auf diese Weise konnte nicht nur effizienter gearbeitet werden, auch die Zellausbeute und somit die Menge an erhaltener Hydrogenase erhöhte sich bei der zweiten und dritten Kultur; nach dem dritten Zyklus starben jedoch zu viele Zellen ab, so dass keine effiziente Anhäufung des Enzyms mehr gewährleistet werden konnte.

Die Ausbeute aus drei Fermentationsrunden (52 l Medium) betrug im Durchschnitt 60 g nasses Zellpellet, aus denen 5 mg Gesamtprotein gewonnen werden konnten. Wurde keine Dauerkultur angesetzt, konnten aus drei Fermentationsdurchgängen (60 l) nur 30 g nasses Zellpellet erhalten werden.

### **3.2.2 Präparation der [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF***

Zur Isolierung der [NiFeSe] Hydrogenase aus den geernteten *DvMF* Zellen erfolgte im Anschluss an einen Zellaufbruch der gewaschenen Zellen die Separierung der löslichen Proteine durch hochtourige Zentrifugation, gefolgt vom Lösen des Zielproteins von der Membran und dessen Abtrennung durch Zentrifugation. Der dadurch erhaltene Überstand wurde dann mittels Säulenchromatographie in mehreren Schritten in seine einzelnen Proteinbestandteile aufgetrennt.

#### **3.2.2.1 Zellaufschluss und Lösen des Proteins aus der Membran**

Die geernteten, bei -80 °C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 ml/g 10 mM Tris/HCl Puffer pH 7,6 resuspendiert. Zum Waschen der Zellen wurde die Lösung für 30 min bei 4 °C und 12000 x g im Rotor JA25.5 zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in derselben Menge des Puffers resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 mg/ml DNase-I wurde die Suspension mit dem Homogenisator der Firma Heidolph Elektro KG (Kelheim) homogenisiert. Die Membran wurde mittels einer EmulsiFlex-05 (Avestin Inc.,

## Ergebnisse

Ottawa, Kanada) oder einem Ultraschall-Gerät der Firma Branson (Emerson Industrial Automation, St. Louis, USA) lysiert. Für den Zellaufschluss mittels Ultraschall wurden 50 ml Aliquots jeweils in 3 Runden für 2,5 sec cycles bei 70 % Leistung beschallt, wobei zwischen den Runden jeweils eine Pause von 5 Minuten zum Abkühlen der Proben eingehalten wurde. Beim Zellaufschluss mittels EmulsiFlex wurde die Probe zweimal mit hohem Druck durch einen Schlitz befördert. Um die Membranfraktion zu pelletieren und so lösliche Proteine abzutrennen, wurde in der Ultrazentrifuge im Ti-60 Rotor bei 252000 x g und 4 °C für 90 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in der vierfachen Menge an 20 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,6, welcher 2 Proteaseinhibitor-Tabletten (cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Applied Science, Indianapolis, USA), 100 µg/ml Pefabloc sowie 2 % 3-(N-dodecyl-N,N-dimethylammonio)-1-propansulfonat („SB12“; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) enthielt, resuspendiert. Das Detergenz SB12 wurde hinzugegeben, um das Protein zunächst von der Membran zu lösen und im Folgenden die Membranbindestelle zu schützen (185). Nach 2-stündiger Inkubation auf einem Magnetrührer bei 4 °C unter Argon-Begasung zur vollständigen Ablösung der Hydrogenase aus der Membran wurde wiederum in der Ultrazentrifuge für 90 min und 4 °C bei 252000 x g zentrifugiert und der das Protein enthaltende Überstand zur Aufreinigung auf eine Ionenaustauscher-Säule geladen.

Dieses Protokoll beruht im Wesentlichen auf dem Protokoll von Valente *et al.* (57), jedoch wurden im Verlauf der Arbeit einige Änderungen zur Optimierung vorgenommen, wie das Waschen der Zellen vor dem Zellaufbruch, veränderte Puffermengen sowie unterschiedliche Zentrifugations- und Inkubationszeiten.

Es wurde auch ein Protokoll verwendet, bei dem die Isolierung des Proteins aus der Membran mittels Triton X-100 erfolgte. Hierbei wurden die geernteten Zellen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen, der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls per EmulsiFlex. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0, dem 400 mM Ammoniumsulfat zur Fällung und 0,5 % Triton X-100 zur Lösung des Proteins aus der Membran zugegeben wurden. Im Anschluss an eine

einstündige Inkubation unter Argon-Atmosphäre und Zentrifugation der Lösung wurde der Überstand über Nacht in 20 mM Tris/HCl Puffer pH 7,6 dialysiert. Dieser Puffer enthielt 0,05 % Triton X-100. Die Dialyse, deren Prinzip auf der Bewegung der Moleküle durch Diffusion von hohen zu niedrigen Konzentrationen durch eine permeable Membran mit Molekulargewichts-Ausschluss beruht, wurde angewendet, um die große Menge an Triton X-100 zu entfernen und einen Pufferwechsel von Kaliumphosphatpuffer zu Tris-Puffer durchzuführen. Hierfür wurde die Proteinlösung in einer Dialysemembran (Serva, Heidelberg) unter Rühren in 2 l Puffer gelegt, wobei nach circa 2 Stunden gegen 5 l des neuen Puffers ausgetauscht wurde, um eine vollständige Dialyse zu gewährleisten.

Dieses Protokoll ist angelehnt an das Verfahren, welches von Nonaka *et al.* (186) verwendet wurde. Allerdings konnte hierbei deutlich weniger [NiFeSe] Hydrogenase erhalten werden als mit dem oben beschriebenen Verfahren. Aus diesem Grund wird im Folgenden nicht weiter auf die säulenchromatographische Reinigung des Enzyms durch die von Nonaka verwendeten Säulen eingegangen.

### 3.2.2.2 Säulenchromatographie

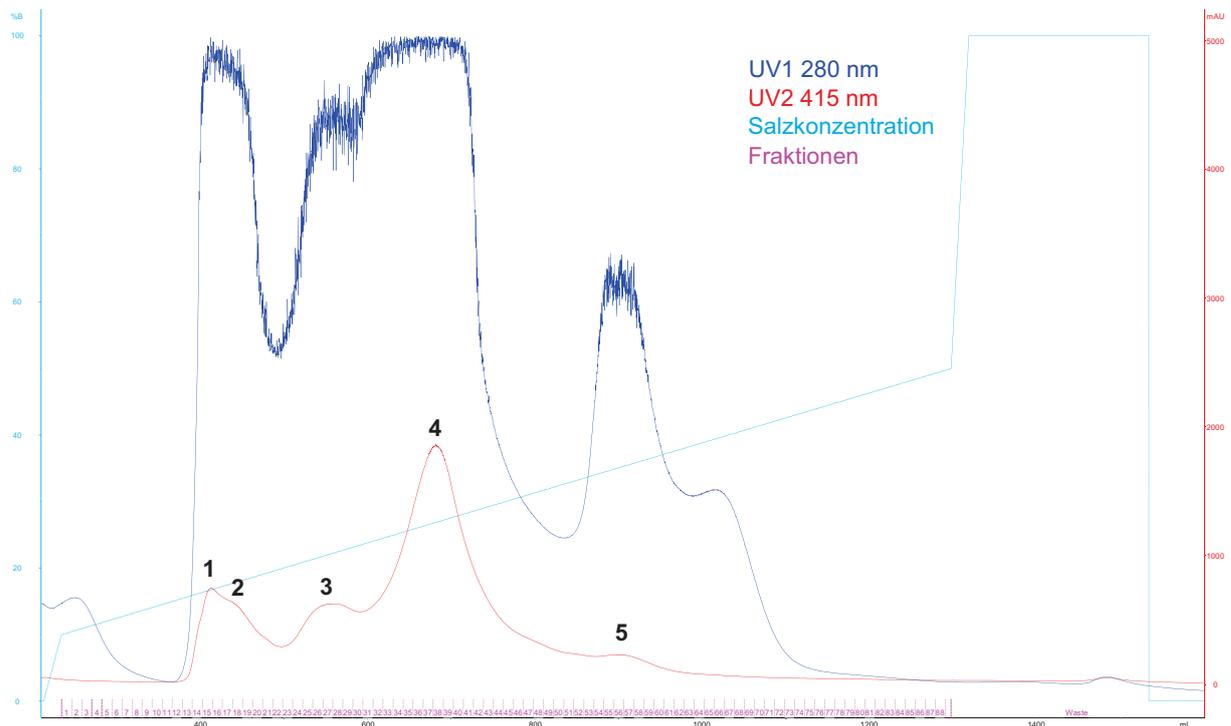
Die [NiFeSe] Hydrogenase wurde chromatographisch mit Hilfe einer Äkta basic-10 (GE Healthcare, Freiburg) von anderen in der Lösung befindlichen Proteinen getrennt. Hierfür wurde wie in 2.6.1.1 beschrieben verfahren. Um die Bedingungen für die Reinigung zu optimieren, wurden HiScreen Säulen (GE Healthcare, Freiburg) verwendet, wodurch nur 10 g Zellpellet benötigt wurden. Für die Präparation der Proben für EPR- oder FTIR-Messungen sowie für die elektrochemischen Methoden wurden 50 – 60 g Zellpellet pro Aufreinigung verwendet. Mit den kleineren Säulen wurde unter anderem der optimale pH-Wert ermittelt: Getestet wurden Aufreinigungen bei pH 7,2, 7,4 und 7,6, wobei letztere die besten Ergebnisse lieferte (ersichtlich am besseren Verhältnis der Absorptionen von 415 nm zu 280 nm, was auf ein höheres Vorhandensein des Eisen-Schwefel Cluster Proteins im Vergleich zu anderen Proteinen des Eluates schließen lässt). Auch die optimale Flussgeschwindigkeit wurde in diesen Tests

## Ergebnisse

herausgefunden und beträgt für alle Säulen 1 ml/min, um eine bestmögliche Auftrennung der Proteine auf die einzelnen Fraktionen zu erhalten.

Im ersten Teil der Reinigung wurde der Überstand, welcher bei der Ultrazentrifugation im Anschluss an die Solubilisierung des Proteins entstanden ist (siehe 3.2.2.1), auf eine DEAE Sepharose Fast Flow Säule (XK 26/40, GE Healthcare, Durchmesser 2,6 cm, Höhe 40 cm, Volumen 212 ml) aufgetragen. Die Säule war mit 20 mM Tris/HCl Puffer (alle Reinigungs-Puffer wiesen einen pH-Wert von 7,6 auf und enthielten 0,2 % (w/v) SB12, um die Hydrogenase in ihrer aktiven Konformation zu erhalten) mit einem Fluss von 2 ml/min equilibriert worden. Bei einem linearen Gradienten von 100 – 500 mM NaCl wurden, wie im Chromatogramm ersichtlich (Abbildung 3.11), 5 Eisen-Schwefel Cluster Peaks erhalten (Absorptionen bei einer Wellenlänge von 415 nm), von denen alle Fraktionen aufkonzentriert und weiter aufgereinigt wurden. Das Vorhandensein von Eisen-Schwefel Clustern lässt allerdings nicht spezifisch auf Hydrogenasen schließen, da sehr wahrscheinlich im Proteingemisch auch andere Cluster enthaltende Proteine vorhanden sind. Entsprechend wurden weitere Analysen durchgeführt. Die Fraktionen, die bei 180 mM und 220 mM NaCl eluierten (Peaks 2 und 3), waren im Funktionstest für Wasserstoffspaltungsaktivität (siehe 2.6.4.1 und 2.6.4.2) am aktivsten. Ein weiterer Peak, der im Chromatogramm der UV/vis Detektion der Äkta am stärksten war (Peak 4, Absorption bei 415 nm 1870 mAU), zeigte keine Hydrogenase-Aktivität, genau wie die zwei anderen Fraktionen (Peaks 1 und 5).

Weitere Analysen (siehe folgende Kapitel) bestätigten, dass es sich bei der Fraktion des Peaks 3 um die [NiFeSe] Hydrogenase und bei Peak 2 um die [NiFe] Hydrogenase handelt.



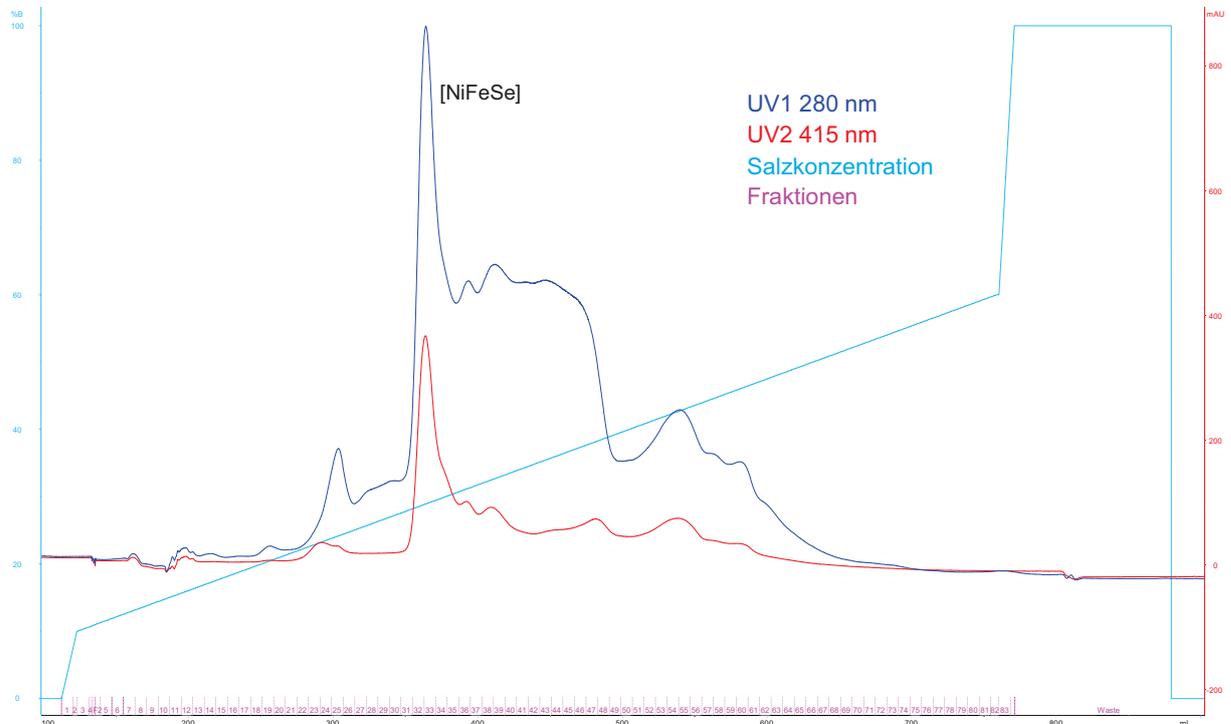
**Abbildung 3.11:** Chromatogramm (Unicorn Software, GE Healthcare) der UV/vis Detektion beim Lauf der ersten Anionenaustauscher-Säule.

Die weiter zu untersuchenden Fraktionen wurden vereint, mittels Amicon Ultra-15 Zentrifugalfiltern im gleichen Puffer ohne Natriumchlorid entsalzt und gegebenenfalls aufkonzentriert.

Diese Proben wurden dann auf eine zweite, feinporigere Anionenaustauscher-Säule geladen. Mit den kleinen Test-Säulen konnte festgestellt werden, dass hierfür die Q-Sepharose fast flow Säule die beste Trennung hervorbringt. Diese High performance Säule (GE Healthcare, XK 26/20, Durchmesser 2,6 cm, Höhe 20 cm, Säulenvolumen 107 ml) wurde mit den entsalzten und konzentrierten Eluaten der ersten Säule beladen und ebenfalls einem Laufprogramm unterzogen, bei dem durch steigenden NaCl Gehalt (100 – 600 mM) die Proteine je nach ihrer äußeren Beschaffenheit eluierten. Der Laufpuffer hierfür war 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,6 mit 10 mM NaCl und 0,2 % SB12, die Fraktionsgröße betrug 8 ml. Der Fluss betrug maximal 2 ml/min, die besten Ergebnisse wurden

## Ergebnisse

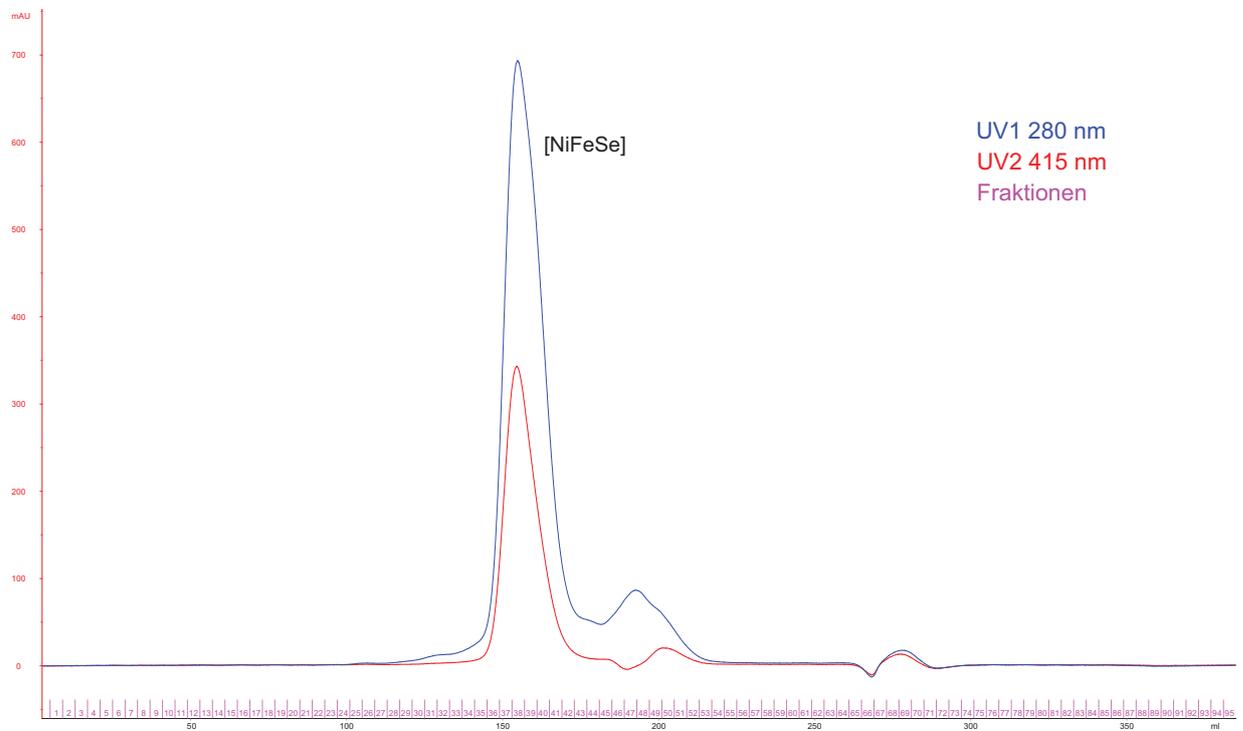
jedoch mit 1 ml/min erzielt. Wie im Chromatogramm ersichtlich, eluierte bei 280 mM NaCl eine Fraktion, die nach Aktivitätsanalysen der [NiFeSe] Hydrogenase zugeordnet werden konnte.



**Abbildung 3.12:** Chromatogramm der UV/vis Detektion des Peaks Nr. 2 (Abbildung 3.11) beim zweiten Lauf der [NiFeSe] Aufreinigung.

Die Fraktionen aus der zweiten Säule wurden zur abschließenden Reinigung auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex200, GE Healthcare, Durchmesser 2,6 cm, Höhe 70 cm, Säulenvolumen 371 ml, Flussrate 1 ml/min) aufgetragen, bei der die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierbei wandern die Proteine mit dem Puffer (100 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl und 0,2 % SB12) durch die Säule, wobei größere Proteine zuerst eluieren, da sie nicht in die Poren der Säulenmatrix eindringen. Zuvor mussten die Proben aufkonzentriert werden, da nur circa 1 % des Säulenvolumens aufgetragen werden durften. Die Elutionslänge betrug ein Säulenvolumen, es konnte im Chromatogramm (Abbildung 3.13) nur ein Peak größer als 20 mAU nach circa 150 ml Puffer festgestellt werden. Im hier gezeigten Beispiel wurden die Fraktionen 36-41,

welche je 4 ml Proteinlösung enthielten, vereint, aufkonzentriert und zur Überprüfung der Reinheit auf ein SDS-Gel aufgetragen.



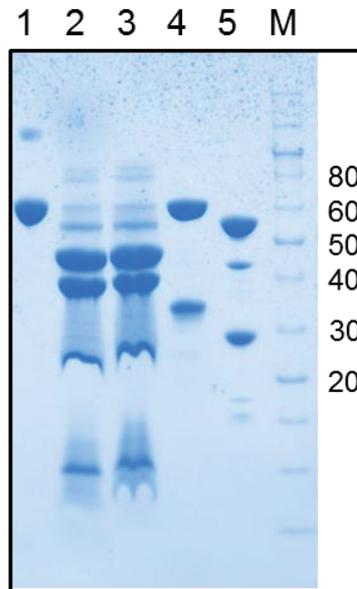
**Abbildung 3.13:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie (3. Aufreinigungsschritt der [NiFeSe] Hydrogenase).

### 3.2.3 Biochemische Charakterisierung

#### 3.2.3.1 Überprüfung der Reinheit mittels SDS-PAGE

Um die Reinheit des Proteins zu überprüfen, wurden SDS-Gele angefertigt. Hierfür ist es notwendig, die Detergenz-enthaltende Proteinlösung gegen Puffer mit Triton X-100 umzupuffern, da Proben mit SB12 nicht als definierte Bande, sondern nur „verschmiert“ auf dem Gel zu sehen sind.

## Ergebnisse



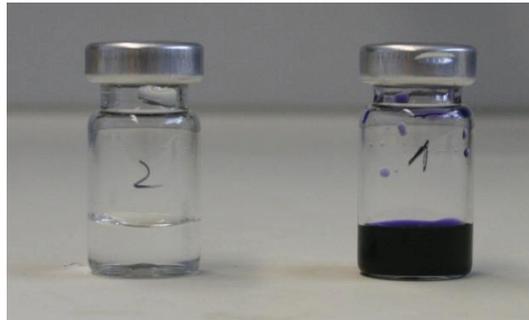
**Abbildung 3.14:** SDS-Gel der Aufreinigung der [NiFeSe]-Hydrogenase aus *DvMF*. Spur 2, 3: Proben des erhaltenen Peaks nach der Gelfiltrationssäule. Spur 1: BSA, Spur 4: Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus*, Spur 5: [NiFe]-Hydrogenase aus *DvMF*, Spur M: Marker Novex Sharp Unstained Protein Standard (Fa. Novagen).

Die [NiFeSe] Hydrogenase wird durch das SDS denaturiert und zerfällt in ihre beiden Untereinheiten, so dass im SDS-Gel zwei Banden erwartet werden. Die große Untereinheit ist 56,3 kDa groß, die kleine Untereinheit ist laut Sequenzanalyse 34,9 kDa groß. Da jedoch die N-terminale Tat-Sequenz (3,74 kDa) nach erfolgtem Transport ins Periplasma abgespalten wird, entsteht eine erwartete Größe von circa 31,1 kDa. Wie in Abbildung 3.14 zu sehen, entsprechen die dominierenden Banden der aufgereinigten Proteinlösung nicht denen der Hydrogenase, der Anteil der in der Lösung enthaltenen [NiFeSe]-Hydrogenase liegt entsprechend wohl bei wenigen Prozent.

### 3.2.3.2 Qualitativer Aktivitätstest

Zur Überprüfung der Fraktionen auf das Vorhandensein von Hydrogenase wurde ein qualitativer Aktivitäts-Assay mit Methylviologen durchgeführt. Hierbei wurde die  $H_2$ -Oxidations-Tätigkeit der Hydrogenase durch einen Farbumschlag gemessen (119). Wird das oxidierte, farblose Methylviologen durch die

freigesetzten Elektronen (entstanden durch die Reduktion von Wasserstoff durch die [NiFeSe] Hydrogenase) reduziert, entsteht ein blauer Farbstoff (siehe 2.6.4.1). Gemessen wird die Zeit, die für diesen Farbumschlag benötigt wird. Hieraus lässt sich eine Aussage über die Hydrogenase-Aktivität in der untersuchten Probe treffen.



**Abbildung 3.15:** Ergebnis des optisch ausgewerteten Aktivitäts-Assays mit Methylviologen. In Probengefäß Nummer 1 wurden 200  $\mu$ l der o.g. Fraktion zugegeben (Abbildung 3.13, erhalten aus Peak Nummer 3 in Abbildung 3.11). In Probengefäß Nummer 2 wurden 200  $\mu$ l der Fraktion Nummer 5 in Abbildung 3.11 zugegeben.

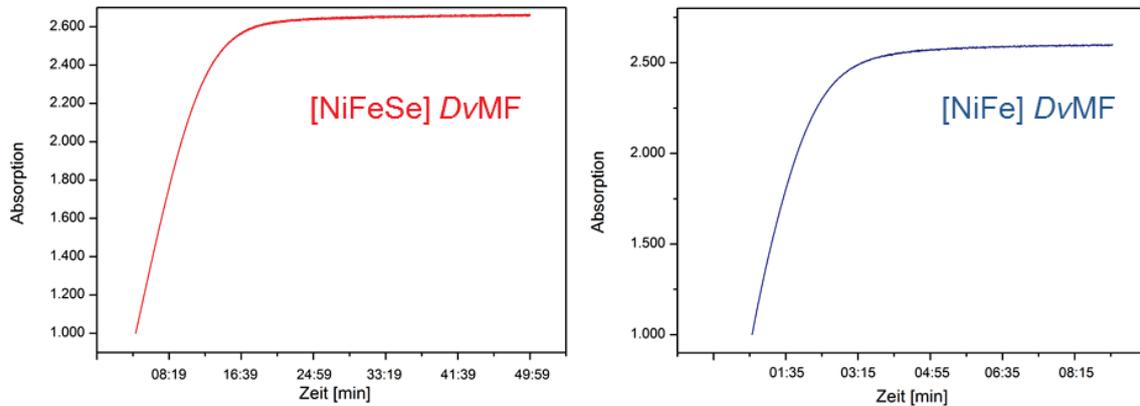
Der in Abbildung 3.15 sichtbare Farbumschlag im Probengefäß mit der Fraktion, welche in der ersten Anionenaustauschersäule bei 220 mM NaCl eluierte, erfolgte 5 min nach Beginn der Begasung mit Wasserstoff. Die o.g. Fraktion Nummer 2 zeigte einen Farbumschlag nach 3 min. Wie in Abbildung 3.15 links zu sehen, erfolgte kein Farbumschlag bei der Fraktion Nummer 5. Es wurde für 15 min mit Wasserstoff begast, jedoch war offensichtlich keine Hydrogenase in der Lösung, die den Wasserstoff hätte reduzieren können und so die Elektronen für die Reduktion des Methylviologens hätte liefern können.

### 3.2.3.3 Quantitativer Aktivitätstest

Da der qualitative Test nur eine prinzipielle Anwesenheit von Hydrogenasen aufzeigt, jedoch die Wasserstoffoxiderate der Hydrogenase auf diesem Weg nicht quantitativ bestimmbar ist, wurde zudem ein Assay durchgeführt, der auf demselben Prinzip beruht wie der eben beschriebene Test, jedoch durch die Messung der Absorption des reduzierten Methylviologens pro Zeit die Anzahl der

## Ergebnisse

Wasserstoffmoleküle, welche pro Milligramm Hydrogenase umgesetzt werden, bestimmbar macht (siehe 2.6.4.2).



**Abbildung 3.16:** Wasserstoff-Oxidations-Assay der teilaufgereinigten [NiFeSe] Hydrogenase aus DvMF nach dem dritten säulenchromatographischen Trennschritt (links, 2µl Probe wurden wie unter 2.6.4.2 beschrieben mit Wasserstoff begast) sowie der aufgereinigten [NiFe] Hydrogenase (rechts, aufgereinigt und bereitgestellt von P. Malkowski, MPI Mülheim; 2 µl einer reinen Probe mit einer Konzentration von 850 µM). Die Absorption des reduzierten Methylviologens erfolgte bei 605 nm.

Man erkennt deutlich die Aktivität der in dieser Arbeit teilaufgereinigten [NiFeSe] Hydrogenase: Nach einem steilen Anstieg ist nach 15 min das Maximum erreicht. Dieses Plateau kommt wahrscheinlich deswegen zustande, da die Wasserstoffmoleküle bei hoher Enzymkonzentration zu diesem Zeitpunkt verbraucht sind und somit der Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Deswegen bleibt ab diesem Zeitpunkt die Menge an reduziertem Methylviologen konstant.

Der Vergleich mit der [NiFe] Hydrogenase desselben Organismus zeigt, dass diese Probe deutlich aktiver ist, da sie bereits nach circa 3 min das Maximum erreicht hat. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich in diesem Fall um eine reine Probe handelt, während die [NiFeSe] Hydrogenase nicht vollständig aufgereinigt werden konnte (vgl. Abbildung 3.14). Die Berechnung der spezifischen Aktivität der [NiFeSe] Hydrogenase konnte aus diesem Grund nicht erfolgen, da hierfür neben der Steigung der Absorption in einem bestimmten Zeitintervall und dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  des reduzierten

Methylviologens auch die Konzentration des eingesetzten Enzyms E entscheidend ist:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Steigung [cm}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]}{E \left[ \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] \cdot 2 \cdot \varepsilon \left[ \text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \right]} \quad (\text{Gleichung 2.11})$$

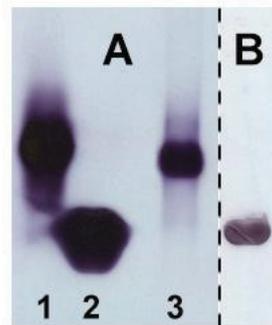
Die Zahl 2 im Nenner ergibt sich aus der Redoxreaktion, bei der 2 Moleküle Methylviologen durch die Reduktion von einem Molekül Wasserstoff reduziert werden.

Ohne die Möglichkeit, die Konzentration an Hydrogenase im Eluat der chromatographischen Reinigung zu bestimmen, ist diese Berechnung nicht aussagekräftig. Was jedoch neben einer groben Abschätzung der spezifischen Aktivität getestet werden konnte, war die Notwendigkeit der Anwesenheit des Detergenz SB12. Wurde dieses durch Umpuffern aus der Proteinlösung entfernt, wurde eine deutlich geringere Aktivität gemessen als bei der gleichen Probe in Anwesenheit von SB12, was die schützende und stabilisierende Wirkung des Detergenz verdeutlicht.

#### 3.2.3.4 Native PAGE mit Aktivitätsfärbung

Ein weiterer Beweis, dass sich in der teilaufgereinigten Probe eine aktive Hydrogenase befindet, konnte mittels einer nativen PAGE (siehe 2.6.4.3) erbracht werden. Zusätzlich war so die Möglichkeit der Unterscheidung zu anderen Hydrogenasen anhand ihrer Größe möglich. Hierbei wurde nach dem Lauf eines nativen Gels dieses in Kaliumphosphatpuffer pH 5,5 für 30 min mit Wasserstoff begast. Die durch die Hydrogenase-Aktivität freigesetzten Elektronen werden durch zugegebenes Phenazinmethosulfat (PMS) an Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) weitergeleitet, welches durch die Reduktion zu einem blauen Farbstoff (Di-Formazanfarbstoff) umgewandelt wird. Somit ist die Hydrogenase-Aktivität anhand der blau gefärbten Gelbanden sichtbar.

## Ergebnisse

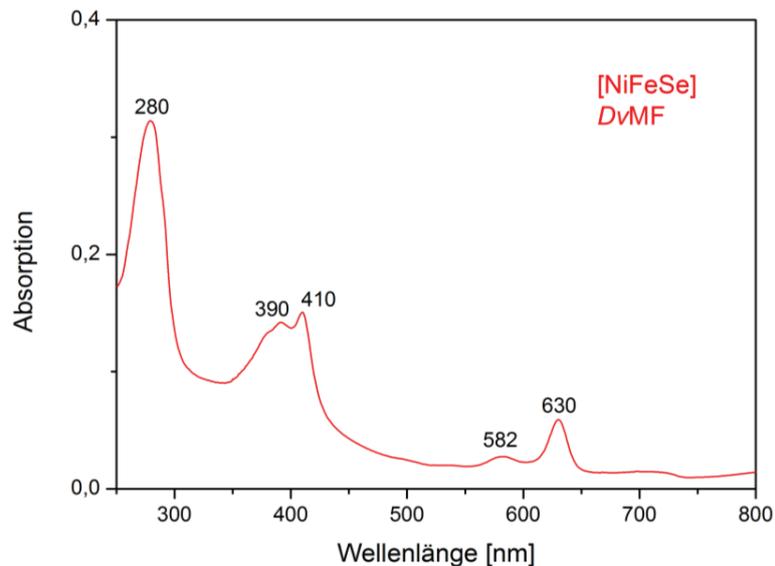


**Abbildung 3.17:** Aktivitäts-gefärbtes Gel einer nativen Gelelektrophorese. Die Aktivitätsfärbung erfolgte mit PMS/NBT. Die Banden in A) enthalten die folgenden Proben: 1) 5 µg der membrangebundenen [NiFe] Hydrogenase (MBH) aus *Ralstonia eutropha* H16 (bereitgestellt von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Lenz, HU Berlin), 2) 20 µg [NiFe] Hydrogenase aus *DvMF* (bereitgestellt von P. Malkowski, MPI Mülheim), 3) 20 µg der [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF*. B) 5 µg Probe der [NiFe] Hydrogenase aus *DvMF*, aktivitätsgefärbt mit Benzylviologen (auf einem separaten Gel), dargestellt zum besseren Vergleich mit Bande 3.

In diesem Assay zeigt sich eine Blaufärbung der Bande bei der [NiFeSe] Probe, die sich auf einer anderen Höhe befindet als die Bande der [NiFe] Hydrogenase desselben Organismus. Dies zeigt deutlich, dass es sich bei der getesteten Probe nicht um eine fälschlicherweise aufgereinigte [NiFe] Hydrogenase handelt, sondern um die [NiFeSe]-Hydrogenase. Auch in diesem Test erkennt man anhand der Größe der gefärbten Banden und einer geringeren Probenzugabe im Fall der MBH aus *Ralstonia eutropha*, dass die Aktivität der in dieser Arbeit erstellten Probe geringer ist als die der vollständig aufgereinigten Proben der anderen Hydrogenasen, was jedoch nicht auf die spezifische Aktivität der Hydrogenasen schließen lässt, sondern daher zustande kommt, dass im eingesetzten Eluat im Vergleich zu mitaufgereinigten Verunreinigungen nur eine geringe Menge an Hydrogenase vorhanden ist.

### 3.2.4 Spektroskopische Charakterisierung der [NiFeSe] Hydrogenase

#### 3.2.4.1 UV/vis Spektroskopie



**Abbildung 3.18:** UV/vis Absorptionsspektrum der teilaufgereinigten [NiFeSe] Hydrogenase aus DvMF bei Raumtemperatur.

Das UV/vis Spektrum zeigt neben dem Tryptophan-Peak bei 280 nm einen Peak bei 410 nm, der für die Anwesenheit eines [FeS] Cluster Proteins wie der Hydrogenase sprechen könnte. Allerdings sind zusätzlich auch andere Peaks bei 582 nm und 630 nm zu sehen, welche in Verbindung mit dem Peak bei 410 nm eher auf eine Kontamination der Probe mit Häm-Proteinen schließen lassen. Es liegt nahe, dass es sich bei dieser Kontamination um ein Cytochrom handelt, da bei Hydrogenasen der Austausch der Elektronen zum oder vom Enzym typischerweise über ein Cytochrom verläuft, so dass die Möglichkeit besteht, dass die [NiFeSe] Hydrogenase gemeinsam mit dem Cytochrom aufgereinigt wurde. Cytochrome lassen sich im UV/vis Spektrum wie folgt abbilden: Eine Bande befindet sich zwischen 390 nm und 410 nm (Soret-Bande), außerdem befinden sich A- und B-Banden zwischen 450 nm und 700 nm, wobei diese eine weniger starke Absorption aufweisen als die Soret-Bande. Diese Banden lassen

## Ergebnisse

sich im Spektrum in Abbildung 3.18 erkennen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich der für die [FeS] Cluster der Hydrogenase typisch breite Peak bei circa 400 nm (187) unterhalb der Absorption der Soret-Bande des Cytochroms befindet.

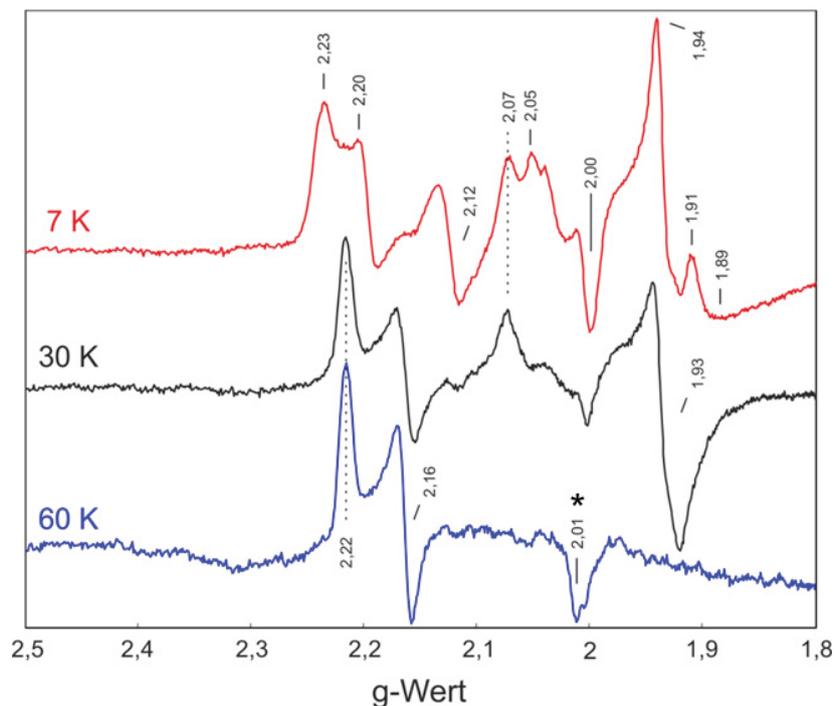
### 3.2.4.2 EPR Spektroskopie

Da die nach der Chromatographie noch kontaminierte Probe biochemisch nicht leicht zu untersuchen war, wurde zusätzlich EPR Spektroskopie durchgeführt. Hierfür wurde die durch drei Säulen gereinigte Probe zunächst reduziert, denn wie alle zuvor untersuchten [NiFeSe] Hydrogenasen ist auch diese im oxidierten Zustand nicht EPR aktiv (siehe Abbildung 3.23) (57,58,188). Die Reduktion erfolgte in der anaeroben Atmosphäre einer Glove-box durch Inkubation mit Wasserstoff für 90 min. Die Probe wurde während dieser Reduktionszeit gerührt und möglichst kühl gehalten. Anschließend wurde die Probe unter Lichtausschluss in flüssigem Stickstoff bis zur EPR Messung gelagert.

Im reduzierten Zustand weisen [NiFe] und [NiFeSe] Hydrogenasen paramagnetische Zustände auf, in denen das Nickelion als  $\text{Ni}^{3+}$  oder  $\text{Ni}^+$  vorliegt und somit mittels EPR untersucht werden kann (da diese Ionen ein einzelnes ungepaartes Elektron mit Spin  $S = 1/2$  aufweisen). Das Eisenion des aktiven Zentrums hingegen ist in jedem bekannten Redoxzustand der [NiFe]-Hydrogenasen diamagnetisch mit „low-spin“  $\text{Fe}^{2+}$  (189). Beim „low-spin“ Zustand werden energetisch tiefliegende Orbitale unter Spinpaarung doppelt besetzt, der Gesamtspin ist kleiner als für ein freies Ion. Auch die diamagnetischen  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$  Cluster der kleinen Untereinheit (Elektronenspin  $S = 0$ ) werden erst durch Reduktion in einen paramagnetischen Zustand versetzt. Die g-Werte des EPR Spektrums sind von den Liganden des Metallions im bimetallicen Zentrum abhängig: Das Nickelion wird durch vier Cysteinreste (und einen Brückenliganden zwischen Nickel und Eisen in bestimmten Redoxzuständen der Hydrogenase) koordiniert. Somit können für die einzelnen Redoxzustände des Enzyms Rückschlüsse auf die elektronische Struktur und Umgebung des aktiven Zentrums geschlossen werden. Jeder dieser Redoxzustände ist von den anderen

separat identifizierbar, da er ein typisches Absorptionsmuster mit typischen g-Werten aufweist.

Das cw EPR Spektrum (Abbildung 3.19) zeigt die reduzierte [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF* nach der Aufreinigung mittels FPLC, gemessen im Dunkeln bei verschiedenen Temperaturen.



**Abbildung 3.19:** cw X-Band EPR Dunkelspektrum der [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF* bei verschiedenen Temperaturen im Wasserstoff-aktivierten Ni-C Zustand. Der Stern zeigt eine Verunreinigung im EPR-Resonator, welche bei höherer Mikrowellenleistung sichtbar wird. Messparameter: Mikrowellenfrequenz 9,47 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT, Mikrowellenleistung 2 mW (7 K), 6,4 mW (30 K) und 20 mW (60 K).

Bei 7 K erkennt man durch die Aufspaltung der Absorptionen die magnetische Kupplung des aktiven Zentrums mit dem proximalen [4Fe-4S] Cluster, der reduziert vorliegt (Elektronenspin  $S = 1/2$ ). Damit ist gezeigt, dass 90 min Wasserstoffbegasung ausreichend sind, um die Hydrogenase zu reduzieren. Ein Vergleich dieser Probe mit der [NiFeSe] Hydrogenase von *D. vulgaris* Hildenborough zeigt hohe Ähnlichkeiten der g-Werte (57) (siehe Tabelle 3.2). Die g-Werte der [FeS] Cluster ( $g_x = g_y = 1,93$ ;  $g_z = 2,07$ ) befinden sich im typischen Rahmen für [4Fe-4S]<sup>1+</sup> Cluster und sind vergleichbar mit denen der [NiFeSe]

## Ergebnisse

Hydrogenase von *D. baculatus* (188). Die komplexen Signale des Spektrums im Bereich von  $g \sim 2$  deuten darauf hin, dass mindestens zwei paramagnetische Spezies im reduzierten Enzym vorliegen und sprechen für eine Spin-Spin Kopplung zwischen verschiedenen  $S = 1/2$   $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Clustern und dem Nickelatom.

**Tabelle 3.2:** Vergleich der g-Werte des Ni-C Zustandes der  $[\text{NiFeSe}]$  Hydrogenasen aus *D. vulgaris* Hildenborough (57), *D. baculatus* membrangebundene Hydrogenase (MBH) (188) und DvMF (diese Arbeit).

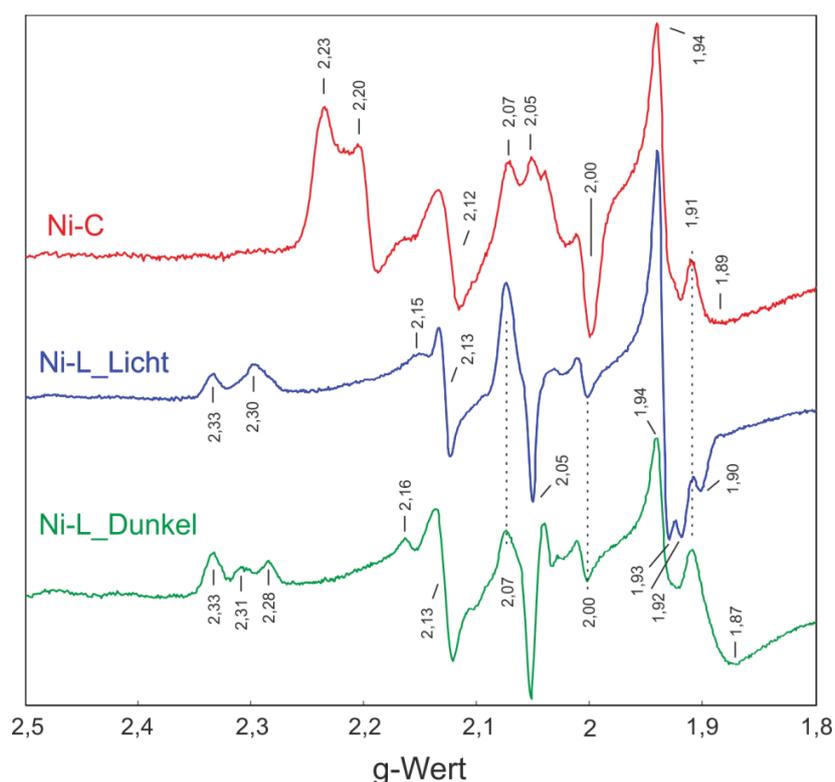
Organismus	Ni-C Signale bei 30/60 K	Kopplung Ni-C / Cluster bei 7K	g-Werte der $[\text{FeS}]$ Cluster
DvMF	2,22; 2,16; 2,01	2,22; 2,20; 2,13	1,93; 2,07
<i>D. baculatus</i> MBH	2,20; 2,16; 2,00		1,88; 1,95; 2,06 (15 K)
<i>D.v.</i> Hildenborough	2,22; 2,16; 2,00	2,22; 2,20; 2,13	1,88; 2,04

Bei höheren Temperaturen ist eine Spezies mit g-Werten von 2,22; 2,16 und 2,01 zu sehen. Dieses Spektrum ist ähnlich denen aus zuvor durchgeführten EPR Studien der  $[\text{NiFeSe}]$  Hydrogenase aus *D.vulgaris* Hildenborough und  $[\text{NiFe}]$  Hydrogenasen im Ni-C Zustand (57,188). Dieser Ni-C Zustand enthält ein low-spin  $\text{Ni}^{3+}$  Zentrum mit einem Hydridion, das sich zwischen dem Nickel- und Eisenatom befindet (190).

Bereits das 30 K Spektrum zeigt, dass die Signale der  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Cluster bei höheren Temperaturen durch die schnelle Relaxation dieser Spezies geringer ausgeprägt sind, bei 60 K sind diese Signale gar nicht mehr detektierbar.

Wie bei Standard  $[\text{NiFe}]$  Hydrogenasen und anderen  $[\text{NiFeSe}]$  Hydrogenasen ist der Ni-C Zustand der  $[\text{NiFeSe}]$  Hydrogenase aus DvMF lichtempfindlich (58). Eine Illumination der Probe an sichtbarem Licht bei kryogenen Temperaturen resultierte in der Bildung des Ni-L Zustandes. Dieser Zustand entsteht durch den photoinduzierten Protonentransfer von der Hydridbrücke zu einem

Thiolatliganden und repräsentiert ein Intermediat in einem formalen  $\text{Ni}^{1+}$  Redoxzustand mit einer Nickel-Eisen Bindung (191). Für die Belichtung wurde eine Weißlicht-Halogenlampe mit 50 Watt verwendet, mit der die Probe direkt im Resonator beleuchtet wurde. Bei 7 K wurden zum einen Spektren während der Belichtung aufgenommen (Ni-L\_Licht), zum anderen wurden nach erfolgter Belichtung Spektren im Dunkeln aufgenommen (Ni-L\_Dunkel) (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** cw EPR Spektren des lichtinduzierten Zustandes Ni-L der wasserstoffreduzierten  $[\text{NiFeSe}]$  Hydrogenase aus  $Dv\text{MF}$ , gemessen unter konstanter Illumination (blaues Spektrum) und im Dunkeln (grünes Spektrum) bei 7K. Zum Vergleich ist das Dunkelspektrum der reduzierten  $[\text{NiFeSe}]$  Hydrogenase im Ni-C Zustand abgebildet (rotes Spektrum, ebenfalls 7 K). Weitere Mess-Parameter: Mikrowellenfrequenz 9,47 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT, Mikrowellenleistung 2 mW.

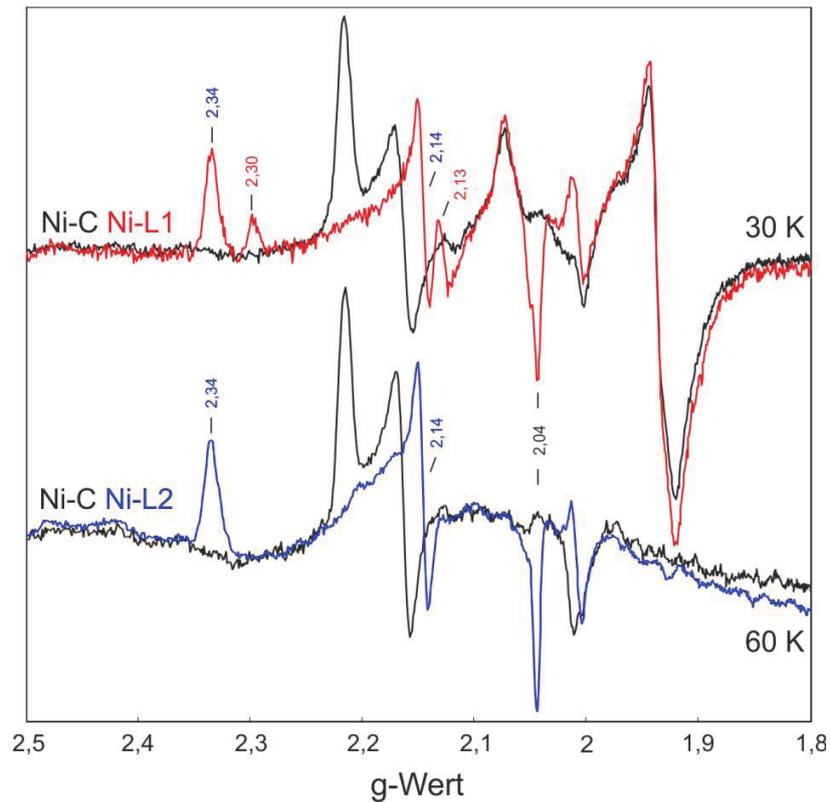
Im Vergleich der Spektren lässt sich ein Unterschied zwischen dem im Dunkeln aufgenommenen Ni-L Spektrum und dem mit konstanter Belichtung erkennen, besonders im Bereich der  $[\text{FeS}]$  Cluster Signale (so sind im Ni-L\_Licht Zustand

## Ergebnisse

die Charakteristika bei  $g \sim 1,9$  besser aufgelöst als beim Ni-L\_Dunkel und Ni-C Zustand). Dies zeigt die Lichtempfindlichkeit des Ni-L Zustandes und weist darauf hin, dass die  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Cluster der beiden Ni-L Spektren unterschiedlich mit dem aktiven Zentrum interagieren. Dieses Phänomen könnte durch photoinduzierte Änderungen im g-Tensor, photoinduzierten Elektronentransfer von einem reduzierten zu einem oxidierten Cluster oder durch Mischung verschiedener Spins innerhalb eines durch Licht angeregten Zustandes zu erklären sein.

Das Spektrum des Ni-C Zustandes ist bereits nach wenigen Minuten in das jeweilige Ni-L Spektrum konvertiert.

Misst man die belichtete Probe bei höheren Temperaturen (30 K und 60 K, siehe Abbildung 3.21), beobachtet man die Bildung von zwei verschiedenen Ni-L Zuständen. Ni-L2, mit g-Werten von 2,34; 2,14 und 2,04, ist dominant bei höheren Temperaturen, während Ni-L1 vorzugsweise bei niedrigeren Temperaturen gebildet wird mit g-Werten von 2,30; 2,13 und 2,04. Die Zustände wurden nach der Nomenklatur in (58) benannt. Diese spektralen Eigenschaften ähneln denen von Standard [NiFe] Hydrogenasen.



**Abbildung 3.21:** cw EPR Spektrum der Ni-C- und Ni-L Zustände bei höheren Temperaturen. Mess-Parameter: Mikrowellenfrequenz 9,47 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT, Mikrowellenleistung 6,4 mW (30 K) und 20 mW (60 K).

Die g-Werte von Ni-L1 und Ni-L2 sind denen in der Literatur beschriebenen Werten der [NiFeSe]-Hydrogenase von *Dm. baculatum* sehr ähnlich (58):

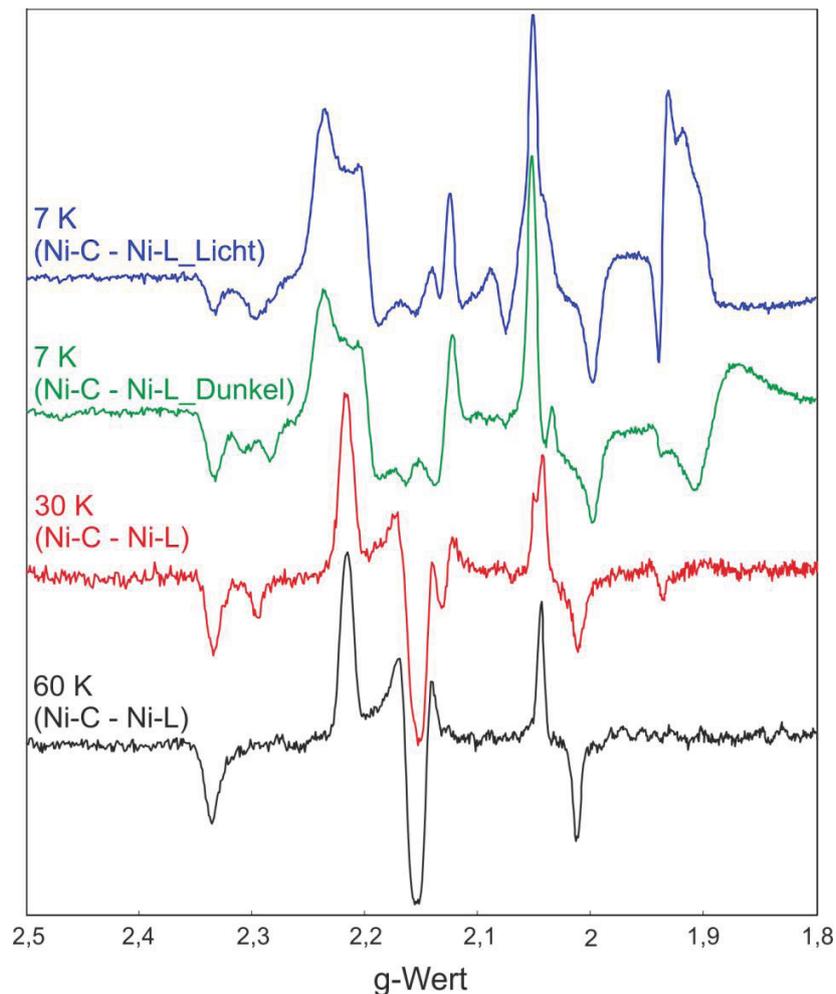
**Tabelle 3.3:** Vergleich der g-Werte der Ni-L Zustände der [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF* mit denen der [NiFeSe] Hydrogenase aus *Dm. baculatum*.

Zustände	$g_x$	$g_y$	$g_z$
<i>DvMF</i> Ni-L1 (30 K)	2,30	2,13	2,04
<i>DvMF</i> Ni-L2 (60 K)	2,34	2,14	2,04
<i>Dm. baculatum</i> Ni-L1	2,300	2,124	2,047
<i>Dm. baculatum</i> Ni-L2	2,337	2,145	2,041
<i>Dm. baculatum</i> Ni-L3	2,478	2,163	2,029

## Ergebnisse

Die belichtete Probe wurde nach den lichtinduzierten Messungen für 60 Minuten bei 77 K im Dunkeln belassen und anschließend im Dunkeln erneut vermessen. Das dabei entstandene Spektrum ist dem Original-Spektrum des Ni-C Zustandes (vor der Belichtung der Probe) absolut identisch, was eine komplette Wiederherstellung des Ni-C Zustandes nach nur 60 Minuten im Dunkeln beweist. Diese Rückreaktion ist im Vergleich zu anderen [NiFeSe]-Hydrogenasen sehr schnell (die *Dm. baculatum* Hydrogenase kehrt erst bei Temperaturen über 100 K in den Ni-C Zustand zurück (58)).

Für eine deutlichere Darstellung der Unterschiede zwischen den lichtinduzierten Ni-L Zuständen und dem Dunkelzustand Ni-C der reduzierten Probe ist im Folgenden ein Differenzspektrum dargestellt:



**Abbildung 3.22:** Differenz- EPR Spektren der Dunkel- und Lichtzustände bei verschiedenen Temperaturen (Ni-C minus Ni-L1/2).

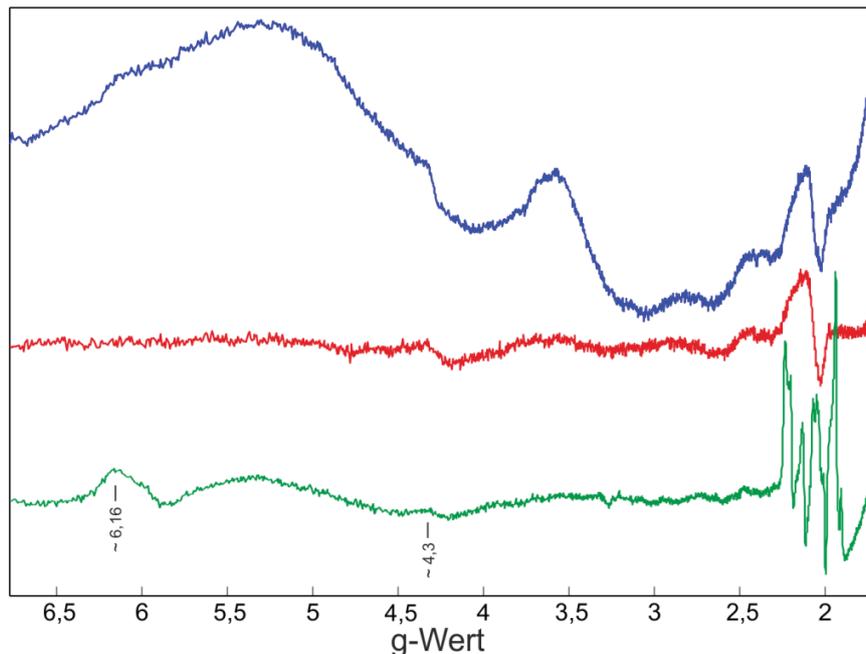
Im Differenzspektrum bei 7 K zeigt sich der Unterschied zwischen dem konstant illuminierten Ni-L Spektrum und dem im Dunkeln aufgenommenen Spektrum der belichteten Probe, besonders im Bereich der [FeS] Cluster, noch deutlicher.

Auch die zu schnelle Relaxation der Werte der  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Cluster, die eine Messung bei höheren Temperaturen unmöglich machen, ist hier gut sichtbar, da bei 7 K die Clustersignale hervorragend dargestellt werden können, während bei 60 K keine Signale in diesem Bereich mehr sichtbar sind.

Nachfolgend ist in Abbildung 3.23 das Spektrum der isolierten [NiFeSe] Hydrogenase ohne vorherige Reduktion mit Wasserstoff abgebildet sowie ein

## Ergebnisse

Spektrum der reduzierten Hydrogenase über einen weiten Feldbereich. Dies wurde durchgeführt, um das Vorhandensein von ungebundenem Eisen zu überprüfen. Dieses würde für die Unreinheit der Probe sprechen oder eine Degradation der Hydrogenase andeuten.



**Abbildung 3.23:** Über einen großen Feldbereich aufgenommene cw EPR Spektren der oxidierten [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF* (blaue Linie) im Vergleich mit dem Probenpuffer (rote Linie, 100 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 0,2 % SB12), sowie ein Langfeld Spektrum der mit Wasserstoff reduzierten Probe (grünes Spektrum). Mess-Parameter: Mikrowellenfrequenz 9,47 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT, Mikrowellenleistung 2 mW (bei reduzierter Probe) und 20 mW (bei oxidiertes Probe), Temperatur 7 K.

Das Spektrum der oxidierten Probe liefert keine detektierbaren hydrogenasespezifischen Signale. Dies resultiert aus dem diamagnetischen Zustand, in dem sich die oxidierte Hydrogenase befindet. Das Vorhandensein der in fast allen anderen [NiFe] Hydrogenasen enthaltenen inaktiven Ni-A oder Ni-B Zustände (25) kann somit ausgeschlossen werden.

Im reduzierten Spektrum lässt sich nur ein minimales Signal bei  $g \sim 4,3$  ausmachen, was für eine geringe Menge an ungebundenem Eisen spricht. Somit

befindet sich fast ausschließlich intakte, nicht degradierte Hydrogenase in der Probe. Man erkennt zusätzlich ein Signal einer Kontamination bei  $g = 6,16$ . Dies könnte vom eventuell mit aufgereinigten Häm-Protein (möglicherweise dem finalen Elektronen-Transferpartner der Hydrogenase, einem Cytochrom) stammen. Dieses Ergebnis unterstützt die aus dem UV/vis Spektrum (Abbildung 3.18) abgeleitete Information einer Kontamination der Probe.

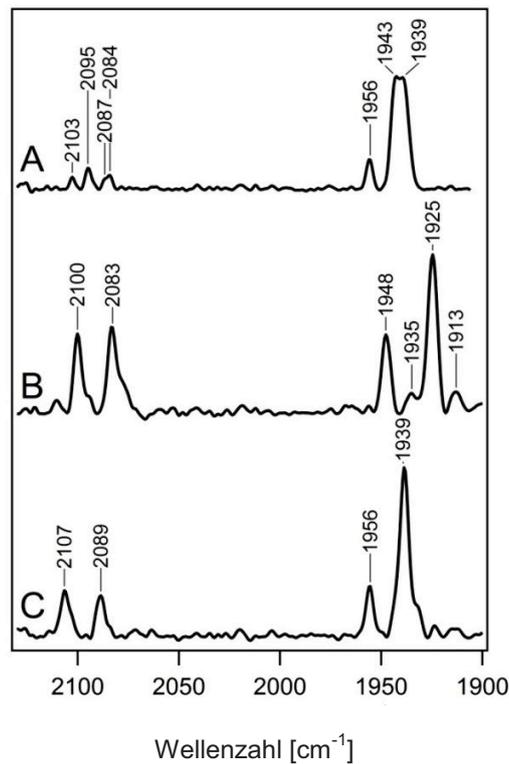
### 3.2.4.3 FTIR Spektroskopie

FTIR an Proteinen birgt Schwierigkeiten, da die Peptidgruppen (CO- und NH-Gruppe) des Proteinerückgrates intensive Schwingungen aufweisen (NH-Streckschwingungen bei  $3300\text{ cm}^{-1}$ , CO-Streckschwingungen bei  $1650\text{ cm}^{-1}$ ) und somit im Spektrum hohe Amplituden besitzen (131). Dies erschwert die Detektion anderer Signale. Im Fall von Hydrogenasen ist dies jedoch kein Problem, da die CO- und CN-Streckschwingungen der zweiatomigen Liganden im aktiven Zentrum der Hydrogenasen (44,45) bei  $2100\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  für Carbonyle und  $2200\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$  für Cyanide liegen und somit nicht durch andere Vibrationen überlagert werden. Entsprechend lässt sich mit der FTIR jeder bisher bekannte Redoxzustand der Hydrogenasen untersuchen.

Die Frequenzen der Cyanid- und Carbonylschwingungen sind empfindliche Sonden für die Elektronendichte am Eisenatom, welches als Indikator für die gesamte Elektronendichte des aktiven Zentrums fungiert. Frühere spektroelektrochemische Studien der [NiFeSe] Hydrogenase aus *D. vulgaris* Hildenborough haben demonstriert, dass das Enzym nicht durch sukzessive Reduktions-/ Oxidationszyklen regeneriert werden kann (60). In dieser Arbeit konnte jedoch mittels FTIR Spektroskopie beobachtet werden, dass die [NiFeSe] Hydrogenase aus DvMF in einem inaktiven Zustand isoliert wurde, welcher nach der Reduktion der Probe durch anschließende Re-Oxidation wieder erhalten werden kann. Das aktive Zentrum liefert andere Frequenzen der Liganden als im Fall der *D. vulgaris* Hildenborough [NiFeSe] Hydrogenase (Abbildung 3.24, vgl. (60)).

## Ergebnisse

Wie bei dem *D. vulgaris* Hildenborough Protein, wird auch die Hydrogenase aus DvMF in zwei unterschiedlichen Formen isoliert. Diese wurden zuvor Unterschieden in den Wasserstoffbrückenbindungen rund um das aktive Zentrum zugeschrieben (60), könnten aber auch die Anwesenheit von verschiedenen Konformeren wiedergeben (82). Im oxidierten Zustand erscheinen die CO-Banden bei  $1939\text{ cm}^{-1}$ ,  $1943\text{ cm}^{-1}$  und  $1956\text{ cm}^{-1}$  und die CN-Banden bei  $2085\text{ cm}^{-1}$ ,  $2094\text{ cm}^{-1}$  und  $2103\text{ cm}^{-1}$ . Durch eine Reduktion mit Wasserstoff verschieben sich die CO-Banden nach  $1925\text{ cm}^{-1}$  und  $1948\text{ cm}^{-1}$  und die CN-Banden nach  $2084\text{ cm}^{-1}$  und  $2100\text{ cm}^{-1}$ . Mit einem Fehler von  $\sim \pm 1\text{ cm}^{-1}$  erscheinen die Peaks der oxidierten Probe erneut durch die Re-Oxidation der Probe mit Luftsauerstoff. Die Abwesenheit eines irreversiblen Ni-IS Zustandes (unter Sauerstoff isolierter Zustand) wie in der *D. vulgaris* Hildenborough [NiFeSe] Hydrogenase (60) zeigt vermutlich, dass die teilaufgereinigte Hydrogenase in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten eine lokale Umgebung aufweist, die mehr den *in vivo* Konditionen entspricht. Der in *D. vulgaris* Hildenborough beobachtete irreversible oxidierte Zustand könnte ein Artefakt der Aufreinigungstechnik sein.

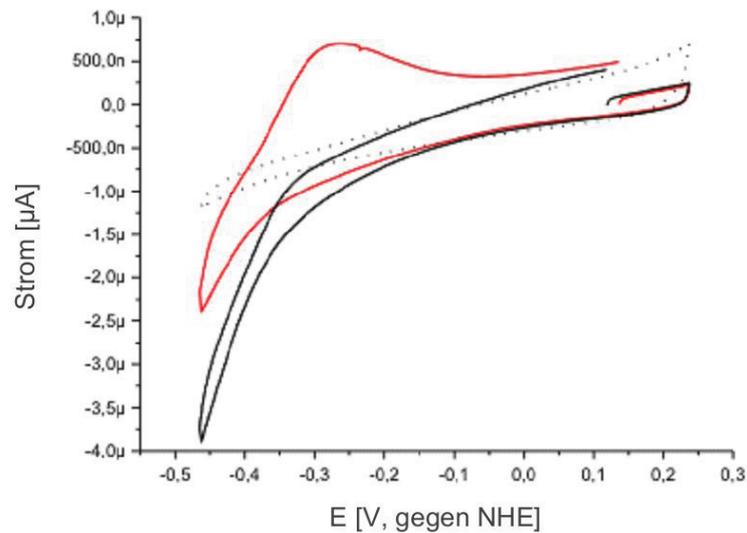


**Abbildung 3.24:** FTIR Spektrum der teilaufgereinigten [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF*. A) isoliertes (oxidiertes) Protein, B) mit Wasserstoff reduzierte Probe, C) an Luftsauerstoff re-oxidiertes Protein.

### 3.2.5 Elektrochemie

Elektrochemische Untersuchungen sind eine leistungsstarke Technik zur Charakterisierung von Hydrogenasen. Ist das Protein richtig orientiert und auf einer Elektrode immobilisiert, liefern die gemessenen elektrischen Ströme eine direkte Angabe der katalytischen Aktivität des Proteins als Funktion des angelegten Potentials (192). Um die korrekte Orientierung des Proteins auf der Elektrode zu erhalten, die einen direkten Elektronentransfer gewährleistet, wurde eine zuvor beschriebene Strategie verwendet, basierend auf den elektrostatischen Interaktionen zwischen dem Enzym und der Elektrode (193,194). Abbildung 3.25 zeigt Zyklovoltammetrie-Experimente der [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF*, die kovalent an eine modifizierte Goldelektrode gebunden ist (194).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.25:** Zyklische Voltammetrie bei 20 mV/s mit einer Goldelektrode, welche mit einem 4-Aminothiophenol selbstassemblierten Monolayer (SAM) modifiziert wurde, und der [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF*, die kovalent an die Kopfgruppe des SAM gebunden wurde (gemessen von Dr. O. Rüdiger). Die schwarze Linie stellt die Aufnahme unter Stickstoffatmosphäre dar, die rote Linie die Aufnahme nach dem Austausch des Stickstoffs gegen Wasserstoff. Die gepunktete Linie gehört zu einem Kontroll-Experiment, bei dem keine Hydrogenase auf der Elektrode immobilisiert wurde. Weitere Messbedingungen: Messtemperatur 35 °C, pH 6,5 und Elektrodenrotationsrate 2500 Runden pro Minute.

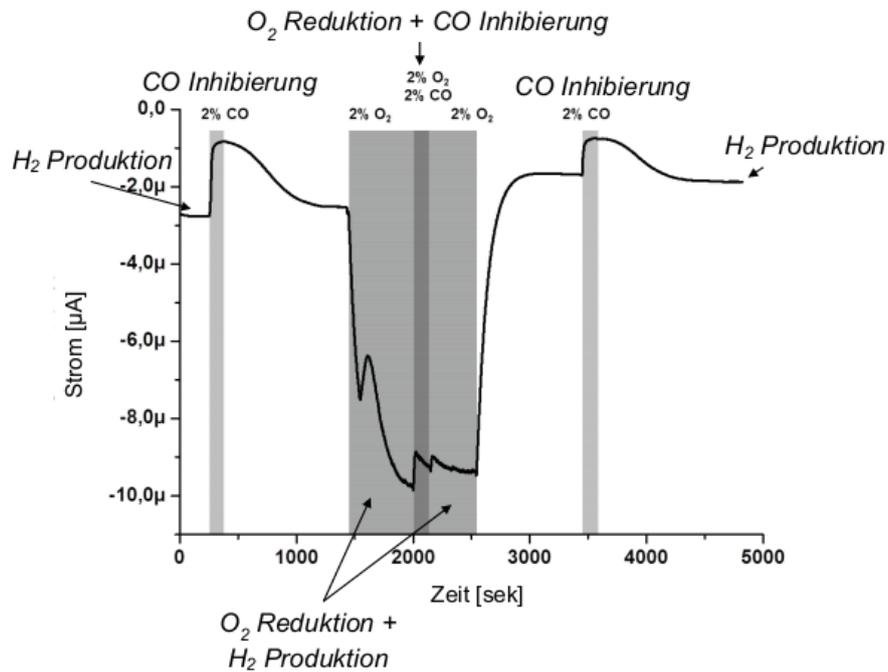
Die positiven Stromsignale gehören zur Wasserstoffoxidation durch das Enzym (rote Linie), die negativen Stromsignale entsprechen der Protonenreduktion unter Stickstoffatmosphäre (schwarze Linie). Die gepunktete Linie stellt ein Kontrollexperiment dar, bei dem keine Hydrogenase auf der Elektrode immobilisiert wurde. In diesem Fall ist kein Unterschied im Zyklovoltammogramm bei Änderung des Gasgemisches sichtbar, es findet also keine Wasserstoffproduktion oder Wasserstoffoxidation statt.

Wie auch bereits bei anderen [NiFeSe] Hydrogenasen beobachtet (78,194), ist der Peakstrom der Protonenreduktion durch die Produktinhibierung in Anwesenheit von Wasserstoff vermindert. Im Gegensatz zu der [NiFeSe] Hydrogenase aus *Dm. baculatum* (78) zeigt das hier untersuchte Enzym höhere

katalytische Ströme für die Wasserstoffproduktion als für die Wasserstoffoxidation; in diesem Fall ähnelt das *DvMF* [NiFeSe] Protein der [NiFeSe] Hydrogenase aus *D. vulgaris* Hildenborough (194). Das unter Wasserstoffzufuhr gemessene Zykelvoltammogramm demonstriert, dass der Strom der katalytischen Wasserstoffoxidation bei Potentialen positiver als -250 mV abnimmt (die angegebenen Potentiale sind gegen die Standard-Wasserstoffelektrode mit einer Korrektur von  $E_{\text{NHE}} = E_{\text{Referenzelektrode}} + 241 \text{ mV}$  bei Raumtemperatur gerechnet). Diese Abnahme der Stromsignale ist vermutlich nicht durch diffusionslimitierte Katalyse zu erklären, da die Elektrode stets rotiert wurde, sondern vermutlich durch einen Inaktivierungsprozess. Ein ähnlicher Inaktivierungsprozess wurde auch für die [NiFeSe] Hydrogenase aus *Dm. baculatum* beschrieben, allerdings wurden bei diesem Protein höhere Temperaturen und niedrigere Wasserstoffkonzentrationen benötigt (78).

Im folgenden Experiment wurde die Sauerstofftoleranz der Hydrogenase während der Wasserstoffproduktion analysiert. Dieses Chronoamperometrie-Experiment wurde wie von Armstrong *et al.* (78) für die *Dm. baculatum* [NiFeSe] Hydrogenase vorgeschlagen durchgeführt.

## Ergebnisse



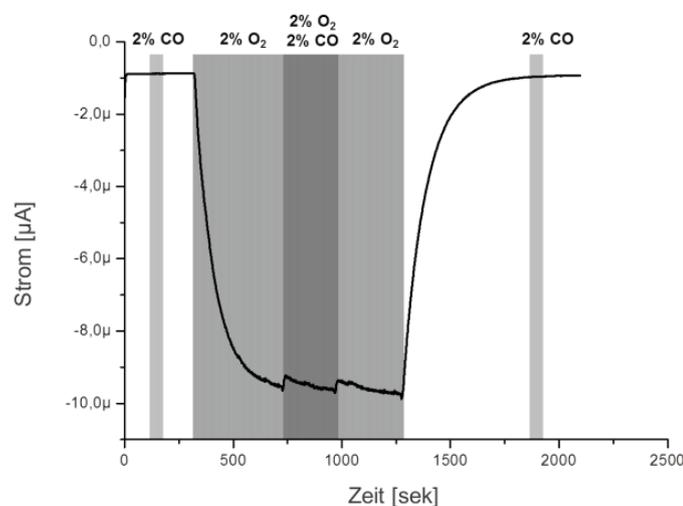
**Abbildung 3.26:** Chronoamperometrie-Experiment auf einer Goldelektrode, modifiziert mit 4-Aminothiophenol-SAM, bei -460 mV, 35 °C und 2500 rpm in einem pH 6,5 Puffer unter 1 Bar Stickstofffluss bei 1500 ml/min. Die grau eingefärbten Flächen zeigen an, wann das Gasgemisch von purem Stickstoff abweicht (hellgrau: 2 % O<sub>2</sub> oder CO; dunkelgrau: je 2 % O<sub>2</sub> und CO).

Für diesen Versuch wurde zunächst das Enzym durch 2 % Kohlenstoffmonoxid inaktiviert, wodurch der Strom um 30 % des Ausgangswertes vermindert wurde (um 1,9  $\mu\text{A}$ ). Der katalytische Stromfluss wurde zu 92 % des Ausgangswertes wiedererhalten, nachdem das Kohlenstoffmonoxid durch die Zugabe von Stickstoff aus der Zelle entfernt wurde. Im Anschluss wurde das Gasgemisch zu 2 % Sauerstoff in Stickstoff geändert. Der Reduktionsstromfluss stieg an, da bei diesem Potential Sauerstoff direkt an der Elektrode reduziert wird. Wurde 2 % Kohlenstoffmonoxid zum vorhandenen Gasgemisch gegeben, reduzierte sich der Reduktionsstromfluss um 1  $\mu\text{A}$ . Diese Abnahme zeigt die Inaktivierung der Protonenreduktion der Hydrogenase-Aktivität, was beweist, dass das Enzym sogar in der Anwesenheit von 2 % Sauerstoff noch Protonen reduziert hat. Vergleicht man die Abnahme des Stromflusses in diesem Fall (1  $\mu\text{A}$ ) mit der Abnahme zu Beginn des Versuches durch die Kohlenstoffmonoxid-Zugabe (1,9

$\mu\text{A}$ ), zeigt sich, dass die Enzymaktivität auch in Anwesenheit von Sauerstoff noch erhalten bleibt; es besitzt noch 52 % seiner ursprünglichen (in Stickstoffatmosphäre gezeigten) Aktivität.

Wurden Sauerstoff und Kohlenstoffmonoxid entfernt, konnten 62 % des ursprünglichen Stromflusses wiedererhalten werden. Ein finaler Kohlenstoffmonoxid-Inhibierungsschritt bestätigte die katalytische Aktivität am Ende des Experimentes, wo noch 67 % der Ausgangs-Aktivität des Enzyms vorhanden waren. Die restlichen 33 % sind vermutlich einer teilweisen, irreversiblen Inaktivierung der Hydrogenase während der Chronoamperometrie zuzuschreiben.

Ein Kontrollexperiment, bei dem keine Hydrogenase zugegeben wurde, zeigte keine Änderungen des Stromflusses bei der Zugabe von Kohlenstoffmonoxid zu 100 % Stickstoff oder dem 2 % Sauerstoff-/ 98 % Stickstoff-Gemisch.



**Abbildung 3.27:** Chronoamperometrie-Experiment zur Kontrolle des zuvor durchgeführten Experimentes, mit denselben Bedingungen wie in Abbildung 3.26.

### 3.2.6 Diskussion

[NiFeSe] Hydrogenasen sind interessante Forschungsobjekte, da sie möglicherweise im Vergleich zu [NiFe] Hydrogenasen eine höhere Sauerstofftoleranz aufweisen (78). Diese Behauptung findet ihren Ursprung in verschiedenen Beobachtungen:

1.) Wird das Protein aerob isoliert, fehlen die in [NiFe] Hydrogenasen auftretenden EPR-aktiven Zustände Ni-A und/oder Ni-B, was darauf hindeutet, dass Sauerstoff nicht in der Lage ist, das Nickelatom im aktiven Zentrum zu oxidieren (58,188).

2.) Des Weiteren ist die Reaktivierung des aerob isolierten Enzyms schnell, und kristallographische Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Sauerstoff nicht, wie bei [NiFe] Hydrogenasen üblich, mit dem aktiven Zentrum der Hydrogenase interagiert, um einen Brückenliganden zwischen den beiden Metallionen zu bilden (82).

3.) Zudem zeigten elektrochemische Versuche, dass diese Enzyme eher Wasserstoff produzierend als Wasserstoff oxidierend sind und dass sie in der Lage sind, Protonen in der Anwesenheit von Sauerstoff zu reduzieren (78).

Dieses Verhalten wurde allerdings kürzlich auch bei der sauerstoffsensitiven Standard [NiFe] Hydrogenase aus *DvMF* gefunden (195) und ist somit nicht auf [NiFeSe] Hydrogenasen beschränkt.

Die Toleranz gegenüber Sauerstoff könnte durch Unterschiede zwischen den [NiFeSe] und [NiFe] Hydrogenasen in der Struktur der großen und/oder kleinen Untereinheit zu erklären sein (Kristallstruktur der *DvMF* [NiFe] Hydrogenase: PDB 1H2R (41)). Die große Untereinheit der [NiFeSe] Hydrogenasen weist neben einem Cystein-Rest ein Selenocystein als terminalen Liganden zum Nickelatom auf (196), während in [NiFe] Hydrogenasen beide Positionen durch Cysteine besetzt sind. Selenocystein, ein Analogon des Cysteins, bei dem das Schwefelatom gegen ein Selenatom ausgetauscht ist, wird über einen besonderen Mechanismus kotranslational in die Peptidkette eingebaut (197). Hierbei wird die Aminosäure Serin an das Codon UCA der tRNA gebunden,

welche anschließend selenyliert wird und sich dank einer besonderen Haarnadelstruktur (SECIS Element, (198)) in der mRNA mit dem Codon UGA (ohne die Haarnadelstruktur als Stop-Codon gelesen) paart, wodurch Selenocystein in die Aminosäuresequenz eingebaut wird (199). Den eukaryotischen Glutathionperoxidasen, welche im aktiven Zentrum ebenfalls ein Selenocystein-Rest tragen, wird eine entscheidende Rolle bei der zellulären Abwehr gegen die Folgen von oxidativem Stress zugeschrieben (200).

Des Weiteren sollten die Unterschiede in der kleinen Untereinheit der [NiFeSe] und [NiFe] Hydrogenasen beachtet werden. Bei den bekannten, ebenfalls in dieser Arbeit diskutierten sauerstofftoleranten [NiFe] Hydrogenasen, z.B. aus *A. aeolicus*, wurde die Toleranz gegenüber Sauerstoff dem ungewöhnlichen proximalen [FeS] Cluster der kleinen Untereinheit zugeschrieben, welches in diesen Enzymen nicht ein Standard [4Fe-4S] Cluster bildet, sondern als [4Fe-3S] Cluster vorliegt (85,92). Das proximale Cluster der [NiFeSe] Hydrogenase unterscheidet sich bei *DvMF* nicht von der [NiFe] Hydrogenase desselben Organismus, es wird in beiden Fällen ein [4Fe-4S] Cluster gebildet. Ein gravierender Unterschied besteht allerdings im medialen [FeS] Cluster. In Standard [NiFe] Hydrogenasen ist dieses als [3Fe-4S] Cluster zwischen zwei [4Fe-4S] Clustern ausgebildet (54,201,202), während bei [NiFeSe] Hydrogenasen an dieser Stelle ebenfalls ein [4Fe-4S] Cluster formiert wird. Dies wurde für das [NiFeSe] Enzym aus *D. baculatus* beschrieben (203), und auch in dieser Arbeit konnten mittels EPR Spektroskopie keine Signale für die Kopplung des aktiven Zentrums mit einem [3Fe-4S] Cluster detektiert werden.

Ferner zeigt ein Aminosäuren-Sequenzvergleich der kleinen Untereinheiten der [NiFeSe] und [NiFe] Hydrogenasen aus *DvMF* die Unterschiede im Bereich der medialen Cluster:

## Ergebnisse

[NiFeSe]	-----MSLNRRDFVKLCTGTVAGFGISQMFHPAVCEAISGSLNGERP	42
[NiFe]	MKISIGLGKEGVEERLAERGVSRRDFLKFCTAIAVTMGMPAFAPFAVARALMGPR---RP	57
[NiFeSe]	PVLWLQGGCTGCSVSLNNSVHPTIADVLLKVISLEFHPTVMAWEGEPAMEHMMKIAEQY	102
[NiFe]	SVVYLHNAECTGCSESVLRAFEPYIDTLILDTLSDLYHETIMAAAGDAEEAALEQAVNSP	117
[NiFeSe]	KGKYFVVVEGAVPTEADGKYCIIGEAAHKEISMVDAMKSVAAANAAVLAVGTCAAYGGIP	162
[NiFe]	HG-FIAVVEGGIPTAANGIYKVV--ANH---TMLDICSRLPKAQAVIAYGTCAATFGGVQ	171
[NiFeSe]	AAQGSETGAKSVSQFFKDNGIATPVVNIPTGPPHPDWIVGTVVVALNAIKAKGLAAGLGD	222
[NiFe]	AAKPNPTGAKGVNDALKHLGVK--AINIAGCPPNPYNLVGTIVYYLKNKAAP-----	221
[NiFeSe]	VVKLLDADGRPTPFYGRNVHENCPLYEAYDAGKMCETFTKKEG----CRYDLGCKGPMSM	278
[NiFe]	---ELDSLNRPTMFFGQTVHEQCPRLPHPDAGEFAPSESEEARKGWCLYELGCKGPVTM	278
[NiFeSe]	CDSEFERKWNNGGVNWSISN-AVCIIGVEPDPFDGKSPFFYSA	317
[NiFe]	NNCPKIKFN-QTNWPVDAGHPCIGSEPDWDAMTFFYQN	317

**Abbildung 3.28:** Sequenzvergleich der kleinen Untereinheiten der [NiFeSe] und [NiFe] Hydrogenasen aus *DvMF*. Die das proximale und distale Cluster koordinierenden Aminosäuren sind gelb hinterlegt, die Cysteine des medialen Clusters sind grün hinterlegt, wobei die außergewöhnliche Situation des Cys279/Ser281 (siehe unten) durch eine graue Markierung der Aminosäuren verdeutlicht wird. Das in der [NiFeSe] Hydrogenase zusätzlich vorhandene Cys293 (pink markiert) scheint für die Formierung zu einem medialen [4Fe-4S] Cluster verantwortlich zu sein.

Wie im Sequenzvergleich zu sehen, weist die [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF* eine weitere Besonderheit auf, die sie von der [NiFe] Hydrogenase desselben Organismus sowie auch von anderen [NiFeSe] Hydrogenasen z.B. aus *D. vulgaris* Hildenborough, *D. baculatus* und *D. desulfuricans* unterscheidet. In den letztgenannten Enzymen koordiniert ein Cystein (Cys281 bei *DvMF*, siehe Abbildung 3.28) das mediale Cluster. An dieser Position befindet sich in der [NiFeSe] Hydrogenase ein Serin-Rest, ein Cystein-Rest findet sich zwei Aminosäuren davor (Cys279). Es ist bisher unklar, welche dieser beiden Aminosäuren das mediale Cluster koordiniert.

### Auswirkung auf die Hydrogenase-Expression durch Zugabe von Selen und Nickel

Durch die Zugabe von Nickel und Selen zum Wachstumsmedium konnte die Expression der [NiFeSe] Hydrogenase gefördert werden, während die

Expression der im Normalfall primär gebildeten [NiFe] Hydrogenase herunter geregelt wurde. Dieser Effekt der Regulation der Expression wurde bereits zuvor für andere Selenoproteine beschrieben: Die Arbeitsgruppe um Prof. Klein belegte, dass die [NiFe] Hydrogenasen in *Methanococcus voltae* nur exprimiert werden, wenn Selen nicht zum Medium zugegeben wurde (204). Dies gilt auch für den Organismus *D. vulgaris* Hildenborough, bei dem durch die Zugabe von Selen zum Medium die Expression der [NiFe] und [FeFe] Hydrogenasen drastisch abnahm, während die Expression der [NiFeSe] Hydrogenase verstärkt wurde (84).

#### Aufreinigung der [NiFeSe] Hydrogenase aus DvMF

Das in dieser Arbeit durch Säulenchromatographie isolierte Protein wurde ähnlich dem Reinigungsprotokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Pereira aufgereinigt (57). Aus dem dort untersuchten Organismus *D. vulgaris* Hildenborough wurde die [NiFe] Hydrogenase in der ersten Anionenaustausch-Chromatographie bei einem Salzgehalt von 200 mM NaCl eluiert, während die [NiFeSe] Hydrogenase bei 300 mM NaCl von der Säule gelöst wurde. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass der in Abbildung 3.11 dargestellte Peak mit der Nummer 2, welcher bei 180 mM NaCl eluierte, die [NiFe] Hydrogenase von DvMF enthält, während der dritte Peak (bei 220 mM NaCl) die gesuchte [NiFeSe] Hydrogenase enthalten könnte. Durch EPR- und IR-Messungen konnte dann zweifelsfrei die Isolierung der [NiFeSe] Hydrogenase belegt werden, welche demnach bei 220 mM NaCl (80 mM NaCl früher als bei *D. vulgaris* Hildenborough) von der ersten Säule verdrängt wird.

Die Aufreinigung der [NiFeSe] Hydrogenase aus DvMF wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe Ogo *et al.* publiziert (186), hierbei wurden Elutionswerte von 250 mM NaCl bei der ersten Säule beobachtet. Die geringe Abweichung kann sich aufgrund der unterschiedlichen Protokolle zur Isolierung des Enzyms aus den Zellen ergeben (es wurden als Detergenzien zum Herauslösen des Proteins aus der Membran Triton X-100 und Natriumcholat verwendet, statt wie in dieser Arbeit SB12).

## Ergebnisse

Die Isolierung und teilweise Aufreinigung der membrangebundenen Hydrogenase in Anwesenheit eines milden Detergenz wie SB12 (welches einer prokaryotischen Membran ähnlicher ist als das nicht-ionische Triton X-100 (205)) und die Anwesenheit des vermutlich mit aufgereinigten Cytochroms könnte die Hydrogenase in einer Konfiguration bewahren, die der Situation im nativen Organismus ähnlicher ist und somit von Vorteil für die weitere Charakterisierung dieses Enzyms sein (206).

Die in 3.2.4.1 vorgestellte Möglichkeit der Ko-Aufreinigung mit einem Cytochrom, welches vermutlich den finalen Redoxpartner der Hydrogenase darstellt, wurde anhand des UV/vis Spektrums (Abbildung 3.18) verdeutlicht. Eine Aussage über die Art des Cytochroms lässt sich anhand dieser Daten nicht mit Gewissheit treffen, es liegt jedoch aufgrund der Wellenlängen der Absorption die Vermutung nahe, dass es sich um ein Cytochrom *d* handelt, da dieses typischerweise eine Bande bei 636 nm aufweist (207,208) (im Spektrum ist eine Absorption bei 630 nm zu sehen), während die anderen bekannten Cytochrome eher bei niedrigeren Wellenlängen absorbieren (Cytochrom *c* bei 550 nm, Cytochrom *b* bei 560 nm, Cytochrom *a* bei 605 nm). Allerdings handelt es sich im Fall der [NiFeSe] Hydrogenasen aus *D. vulgaris* Hildenborough und *Dm. baculatum* beim Elektronen-Transferpartner um ein Typ I Cytochrom *c*<sub>3</sub> (209,210), während die meisten periplasmatischen [NiFe] Hydrogenasen als Elektronengeber oder – akzeptor ein Cytochrom *b* aufweisen (24).

In der näheren genomischen Umgebung der [NiFeSe] Hydrogenase-kodierenden Gene (die große Untereinheit ist zwischen den Basen 311959 und 313425 im Genom lokalisiert) befindet sich kein Cytochrom *d*; das einzige im Organismus vorhandene Cytochrom *d* liegt zwischen den Positionen 3117336 und 3118361. Allerdings ist dies kein Gegenbeweis für die Möglichkeit, dass das Cytochrom *d* den Redoxpartner für die [NiFeSe] Hydrogenase darstellt, denn auch im Fall der *Dm. baculatum* Hydrogenase, welche etwa bei Position 2262578 kodiert ist, liegen die zwei im Genom vorhandenen Cytochrome *c*<sub>3</sub> nicht in der näheren Umgebung, sondern bei circa 6642284 und 1161052.

Auch im SDS-Gel (Abbildung 3.14) lässt sich aufgrund der Bandenvielfalt keine eindeutige Zuweisung des Cytochroms tätigen. Ebenso ist die [NiFeSe] Hydrogenase auf dem SDS-Gel nicht eindeutig zu identifizieren. Neben der Tatsache, dass zu viele Banden auf dem Gel zu sehen sind, wird eine Identifizierung der Untereinheiten auch dadurch erschwert, dass vermutlich eine posttranslationale Modifizierung der großen Untereinheit stattfindet. Dies lässt sich an Hand der Sequenz des N-Terminus der großen Untereinheit verschiedener [NiFeSe] Hydrogenasen (Abbildung 3.29) erklären.

```
DvMF      MSGCTPKAAPAGATGKATIAIDPVSRIEGHLKAEVTVENGVVVDARLSGGMYRGFETILR 60
DvH      MSGCTPKAAPAGATGRTTIAIDPVTRIEGHLKAEVVVENGKVVDARLSGGMYRGFETILR 60
DdG20    MSGCTNKMAAGGVSGKTKIAIDPVTRIEGHLKAEVVVEGKVVDAHISGGMFRGFENILR 60
```

**Abbildung 3.29:** Sequenzvergleich des N-Terminus der großen Untereinheiten von *DvMF*, *D. vulgaris* Hildenborough (*DvH*) und *D. desulfuricans* G20 (*DdG20*). Die konservierten Aminosäuren, die an eine „Lipobox“ erinnern, sind gelb hinterlegt.

Das nur in membrangebundenen Hydrogenasen konservierte MSGC-Motiv am N-Terminus der großen Untereinheit erinnert an eine „Lipobox“, an die kovalent Lipide gebunden sein könnten. Diese posttranslationale Interaktion mit Lipiden könnte für die Bindung der [NiFeSe] Hydrogenasen an die Membran verantwortlich sein und die Notwendigkeit eines Detergenz zum Herauslösen des Proteins aus der Membran und dem anschließenden Schutz der Membranbindestelle erklären.

Die membrangebundene Form der [NiFeSe] Hydrogenase aus *D. vulgaris* Hildenborough, die wie in Abbildung 3.29 ersichtlich, dieses Motiv ebenfalls trägt, weist eine um 418 Dalton höhere Masse auf als errechnet (57). Der Grund wird laut Valente *et al.* in der posttranslationalen Anlagerung von Diacyl-Glyceriden gesehen, wie sie in der Biosynthese von Lipoproteinen beobachtet wurden (211). Hierbei wird das Diglycerid an das konservierte Cystein des MSGC-Motivs angelagert (212). Auch eine parallele Entfernung von Aminosäuren am N-Terminus wird in der Gruppe von Prof. Pereira in Betracht gezogen.

Die errechneten Größen der großen und kleinen Untereinheit der [NiFeSe] Hydrogenase in *D. vulgaris* Hildenborough ergeben sich zu 54,4 kDa und 31,4 kDa. Die den beiden Untereinheiten zugeordneten Banden im SDS-Gel befinden

## Ergebnisse

sich jedoch bei 63 kDa und 35 kDa. Entsprechend befindet sich auch die in dieser Arbeit isolierte Hydrogenase im SDS-Gel möglicherweise an anderen Positionen als erwartet.

### Charakterisierung mittels FTIR, EPR und Elektrochemie

Die durchgeführten spektroskopischen und elektrochemischen Methoden offenbarten unterschiedliche Eigenschaften im Vergleich zu zuvor charakterisierten [NiFeSe] Hydrogenasen. Die höheren Wellenzahlen der CO- und CN-Frequenzen im FTIR Spektrum der *DvMF* [NiFeSe] Hydrogenase im Vergleich zum *D. vulgaris* Hildenborough Protein zeigen Unterschiede zwischen beiden Spezies und sprechen für eine verringerte Elektronendichte am Eisenatom (213). Eine verminderte Elektronendichte am Eisenatom impliziert eine erhöhte Elektronendichte am Nickelatom, also an den Cystein- oder am Selenocystein-Liganden. Diese kleinen Änderungen in der elektronischen Struktur des aktiven Zentrums könnten einen signifikanten Einfluss auf die Reaktivität oder katalytischen Eigenschaften des Proteins haben.

Die gemessenen EPR aktiven Ni-C und Ni-L1/L2 Zustände der reduzierten [NiFeSe] Hydrogenase scheinen denen von reduzierten Standard [NiFe] Hydrogenasen ähnlich zu sein, allerdings legen die bei niedrigen Temperaturen auftretenden umfangreichen Spin-Spin Kopplungen zwischen dem Nickelatom des aktiven Zentrums und den [FeS] Clustern komplexere magnetische und elektronische Interaktionen offen. Diese Ergebnisse könnten für die Erklärung der Abwesenheit von Ni-A und Ni-B Zuständen in [NiFeSe] Hydrogenasen hilfreich sein, da die Art der [FeS] Cluster entscheidend zur Sauerstofftoleranz von Hydrogenasen beiträgt (85).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Chronoamperometrie-Messung zeigte, dass die [NiFeSe] Hydrogenase sogar in Anwesenheit von 2 % Sauerstoff noch Wasserstoff produzieren kann.

### Zusammenfassung und Ausblick

Sowohl das aktivitätsgefärbte native Gel als auch FTIR und EPR Spektroskopie zeigten eindeutig, dass die untersuchten Proben ausschließlich die in dieser Arbeit isolierte und teilaufgereinigte [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF* enthielten und nicht mit der [NiFe] Hydrogenase desselben Organismus kontaminiert waren. In künftigen Versuchen sollte eine Etablierung der Aufreinigung erfolgen, um reine [NiFeSe] Proben für weiterführende Charakterisierungs-Techniken zu erhalten. Ein Verständnis des molekularen Mechanismus dieser besonderen Hydrogenase würde für die Anwendbarkeit von Hydrogenasen im Bereich der „grünen“ Energie von großem Vorteil sein, da eines der größten Probleme in diesem Bereich die Sauerstoffempfindlichkeit vieler Hydrogenasen ist.

### 3.3 Untersuchung des proximalen Clusters der sauerstofftoleranten Hydrogenase 1 aus *Aquifex aeolicus*

Membrangebundene Hydrogenasen der Gruppe 1 weisen in ihrer kleinen Untereinheit ein [4Fe-4S] Cluster proximal zum katalytischen [NiFe] Zentrum auf, während Enzyme wie die Hydrogenase 1 von *A. aeolicus* an dieser Position ein [4Fe-3S] Cluster tragen.

Es konnte gezeigt werden, dass dieses ungewöhnliche proximale Cluster entscheidend zur Sauerstofftoleranz dieser Klasse von Enzymen beiträgt (85,89,91,92). Da die bei den meisten Hydrogenasen vorhandene Sensitivität gegenüber Sauerstoff eine Nutzung der Enzyme zur Generierung von Wasserstoff als Energieträger beeinträchtigt oder sogar verhindert (68), ist die Untersuchung sauerstofftoleranter Hydrogenasen ein wichtiges Forschungsziel. Hierzu zählen z.B. die membrangebundenen Hydrogenasen von *A. aeolicus* (214), *R. eutropha* (86), *Hydrogenovibrio marinus* (89) sowie die *E. coli* Hydrogenase 1 (90).

Die Hydrogenase 1 von *A. aeolicus* verdient hierbei besondere Beachtung, da sie nicht nur aufgrund ihrer Sauerstofftoleranz, sondern auch dank ihrer Thermostabilität (der native Organismus weist eine optimale Wachstumstemperatur zwischen 85 – 95 °C auf (87)) und den dokumentierten biochemischen und biophysikalischen spektroskopischen Informationen (92,214-216) interessant ist.

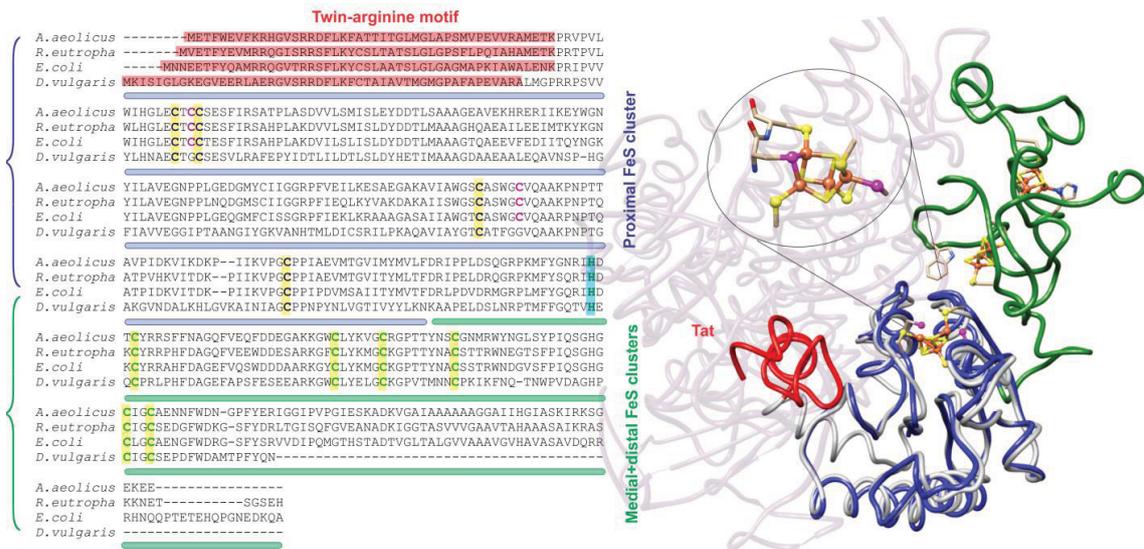
Das neuartige [4Fe-3S] Cluster dieser Hydrogenase zeigt im Vergleich zu Standard [4Fe-4S] Clustern zwei zusätzliche Cystein-Liganden (Abbildung 3.30), welche für die Sauerstofftoleranz des Enzyms verantwortlich sind. Dies wurde durch Mutagenese-Experimente, bei denen diese zwei Aminosäuren gegen im Standardcluster vorhandene Glycine getauscht wurden, bewiesen, da nach Mutagenese die Möglichkeit, die Wasserstoffoxidation aerob zu katalysieren, stark herabgesetzt war (69).

In dieser Arbeit sollte das proximale Cluster der Hydrogenase 1 detailliert untersucht und mit einem „Standardcluster“ einer sauerstoffsensitiven Hydrogenase verglichen werden. Als Vergleich wurde der proximale Cluster der

[NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F gewählt, da diese Hydrogenase bereits sehr detailliert charakterisiert wurde. Um diese Cluster unabhängig von den Einflüssen der beiden übrigen [FeS] Cluster und des aktiven [NiFe] Zentrums untersuchen zu können, wurden synthetische Gene, welche das Bindemotiv der proximalen Cluster der [NiFe] Hydrogenasen von *A. aeolicus* (*pfsA*) und *DvMF* (*spcD*) enthalten, konstruiert und in dem *E. coli* Stamm  $\Delta$ iscR überexprimiert. In dieser *E. coli* Deletionsmutante ist der Eisen-Schwefel Cluster (*isc*, engl.: iron sulfur cluster) Repressor entfernt worden. So konnten die Eigenschaften des Clusters ohne die Interaktion der nahe gelegenen Metallzentren, welche überlappende Signale in der Spektroskopie zur Folge hätten, analysiert werden.

Neben den speziell konstruierten Peptiden wurden Vollängenproteine der kleinen Untereinheiten hergestellt, bei denen die Cystein-Reste des medialen und des distalen Clusters gegen Serin-Reste ausgetauscht wurden, um wiederum das proximale Cluster selektiv erzeugen und störungsfrei untersuchen zu können. Mit diesem Ansatz wurde zudem die ursprüngliche Konformation des Proteins beibehalten, so dass eventuell notwendige Stabilisierungen des proximalen Clusters durch andere Aminosäuren des Proteins überprüft werden könnten.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.30:** Links: Sequenzvergleich der kleinen Untereinheiten sauerstofftoleranter Hydrogenasen aus *A. aeolicus*, *R. eutropha* und *E. coli* sowie der sauerstoffsensitiven Hydrogenase aus *DvMF* (PDB IDs: 3RGW für *R. eutropha*, 3UQY für *E. coli* und 1WUJ für *DvMF*). Die das proximale Eisen-Schwefel Cluster beinhaltenden Sequenzbereiche sind blau unterstrichen, die Sequenzen für das mediale und distale Cluster sind grün unterstrichen. Die gelb und blau hinterlegten Bereiche zeigen die Cluster- koordinierenden Cystein- (gelb) bzw. Histidin-Reste (blau). Die beiden zusätzlichen Cysteine des proximalen [FeS] Clusters der drei sauerstofftoleranten Hydrogenasen sind in pink dargestellt. Rechts: Homologie-Modell der kleinen Untereinheit (entsprechend dem Protein PfsA) in weiß, inklusive des Tat-Motivs (in rot); im Vergleich dazu wird die Kristallstruktur der kleinen Untereinheit der membrangebundenen Hydrogenase aus *R. eutropha* (PDB: 3RGW) in blau und grün (entsprechend der Bereiche im Sequenzvergleich links) gezeigt. Die große Untereinheit der Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus* ist in schwachem Grau dargestellt. Gezeigt wird auch der Tryptophan-Rest (W258) an der Grenzfläche zwischen den grünen und blauen Bereichen der kleinen Untereinheit.

### 3.3.1 Klonierung und Expression

Die Gene für verschiedene Konstrukte der kleinen Untereinheiten der Hydrogenasen aus *A. aeolicus* und *DvMF* wurden von GenScript USA Inc. (Piscataway, USA) synthetisiert und in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert. Eine Auflistung der hergestellten Konstrukte findet sich in Tabelle 3.4.

Die zu synthetisierenden Sequenzen mussten aus der Sequenz der kleinen Untereinheit der beiden Hydrogenasen (*A. aeolicus* und *DvMF*) so ausgewählt werden, dass das proximale Cluster in einer stabilen Konformation gehalten wird. Die Sequenz, welche das proximale Cluster in *A. aeolicus* umfasst, lautet CxCCx94Cx4Cx28C (die zwei zusätzlichen Cysteine der sauerstofftoleranten Hydrogenase sind unterstrichen) und umfasst nahezu 200 Aminosäuren. Diese Vielzahl an zu exprimierenden und zu faltenden Aminosäuren könnte die Assemblierung von PfsA erschweren. Zusätzlich ist die Tatsache zu berücksichtigen, dass das proximale Cluster im nativen Enzym nahe der Grenzfläche zur großen Untereinheit liegt (siehe Abbildung 3.30), welche zu dessen Stabilität durch hydrophobe Interaktionen beitragen könnte. Auch eventuell notwendige Wechselwirkungen innerhalb der kleinen Untereinheit könnten im Fall der verkürzten Konstrukte (Konstrukte 1-6, siehe Tabelle 3.4) zu fehlender Stabilität führen.

Das im nativen Organismus am N-Terminus vorhandene Tat-Motiv (Abbildung 3.30, (217,218)), welches nach der Maturierung der Hydrogenase für den Transport in das Periplasma notwendig ist und anschließend abgetrennt wird, wurde in einigen der Konstrukte mit eingebracht, da zu vermuten ist, dass es für die Stabilität des Proteins verantwortlich ist. Ausserdem war zu Beginn dieser Experimente nicht absehbar, ob ein Export des Proteins in das Periplasma durch die *E. coli* Maschinerie nötig ist. Das Tat-Motiv wurde mittels des Programms SignalP vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>).

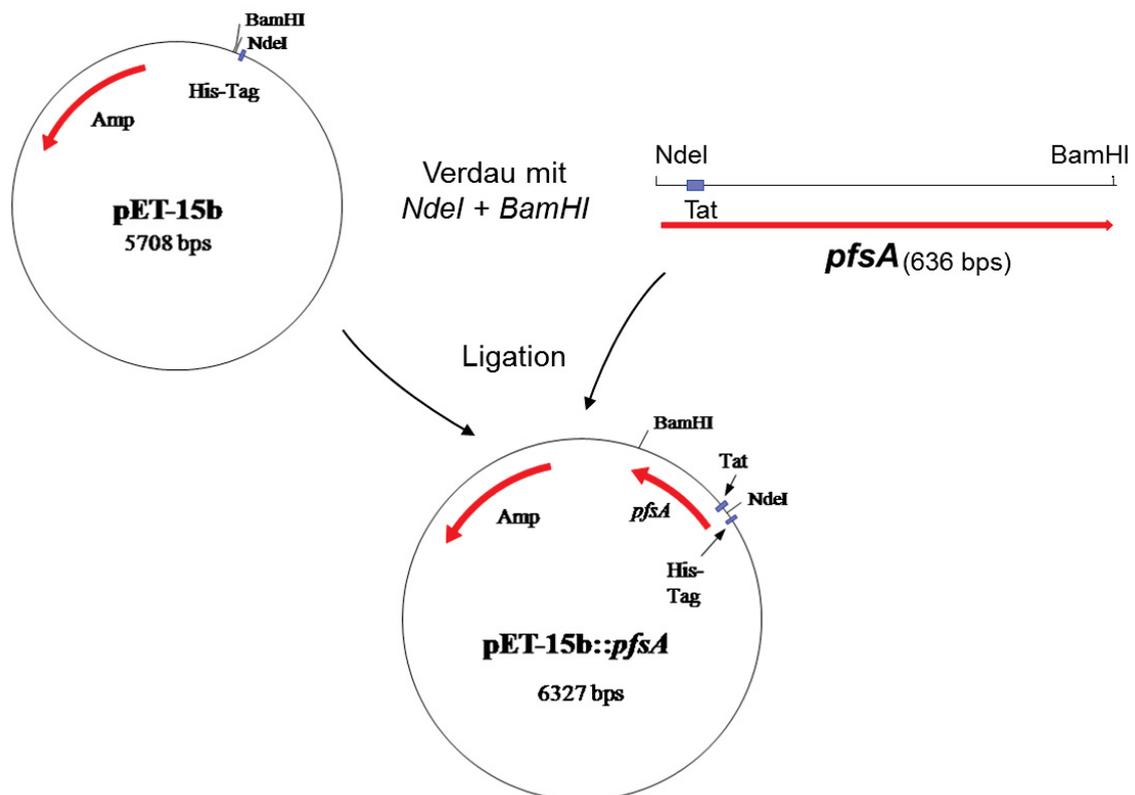
## Ergebnisse

**Tabelle 3.4:** Konstrukte für die Expression verschiedener Teilbereiche der Hydrogenasen aus *A. aeolicus* und *DvMF*.

1	pET-15b:: <i>pfsA</i>	N-terminaler His-Tag vor Tat-Motiv
2	pET-51b:: <i>pfsA</i>	N-terminaler Strep-Tag vor Tat-Motiv
3	pET-51b:: <i>spcD</i>	N-terminaler Strep-Tag vor Tat-Motiv
4	pET-21a:: <i>pfsA</i>	C-terminaler Strep-Tag; ohne Tat-Motiv am N-Terminus
5	pET-21a:: <i>aq-mut</i>	Siehe Konstrukt 4, jedoch mit Mutationen der beiden zusätzlichen Cysteine zu Glycinen
6	pET-21a:: <i>spcD</i>	C-terminaler Strep-Tag; ohne Tat-Motiv am N-Terminus
7	pET-21a:: <i>aq-SSU</i>	Enthält die gesamte kleine Untereinheit der <i>A. aeolicus</i> Hydrogenase 1; C-terminaler Strep-Tag. Cystein-Reste des medialen und distalen Clusters zu Serinen mutiert.
8	pET-21a:: <i>dvMF-SSU</i>	Enthält die gesamte kleine Hydrogenase-Untereinheit von <i>DvMF</i> ; C-terminaler Strep-Tag. Cystein-Reste des medialen und distalen Clusters zu Serinen mutiert.

Die Sequenzen aller exprimierten Proteine aus den unterschiedlichen Konstrukten sind im Anhang (8.2) dargestellt.

Die Klonierung des ersten Konstrukts, bei dem *pfsA* über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pET-15b eingebracht wurde, ist in Abbildung 3.31 dargestellt.



**Abbildung 3.31:** Klonierungsstrategie für das pET-15b::pfsA Konstrukt. Die gewählten 624 Basenpaare von *pfsA* und die 12 Basenpaare für die eingefügten Restriktionsschnittstellen ergeben zusammen ein Insert von 636 Basenpaaren.

Für diese Klonierung wurden die ersten 624 Basenpaare der kleinen Untereinheit der Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus* verwendet, das entsprechende Gen wurde *pfsA* (proximales [FeS] Cluster aus *Aquifex aeolicus*) genannt. Zur Klonierung wurden die jeweils 6 Basen umfassenden Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* angefügt, was zu einer Gengröße von 636 Basenpaaren führt. Dieses Gen enthält die gesamte Sequenz, welche für die Expression des proximalen [FeS] Clusters benötigt wird. Außerdem schließt diese Sequenz eine  $\alpha$ -Helix aus 16 Aminosäuren ein, welche das proximale mit den medialen/distalen Clustern verbindet (Abbildung 3.30). Diese Helix wurde mit eingefügt, da sie für die Stabilität des synthetischen Proteins von Bedeutung sein könnte. Nach der erfolgten Translation von PfsA, abgelesen vom Vektor pET-15b, ist zusätzlich folgende Sequenz am N-Terminus des Proteins vorhanden:

## Ergebnisse

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH. Diese Sequenz stammt aus dem Vektor und trägt den 6 Aminosäuren umfassenden Histidin-Tag (unterstrichen) für die rekombinante Proteinreinigung. Auch das bereits erwähnte Twin-Arginin-Motiv, welches natürlicherweise am N-Terminus der Sequenz der kleinen Untereinheit der Hydrogenase 1 vorkommt, ist in diesem Konstrukt vorhanden und befindet sich zwischen dem His-Tag und der Sequenz des proximalen Clusters.

Der das Insert *pfsA* enthaltende Vektor pET-15b wurde zunächst in *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Nach einer Überexpression des Proteins ließ sich durch Gelelektrophorese zwar eine schwache Expression erkennen, der Vergleich mit einer Expression in *E. coli*  $\Delta$ iscR Zellen zeigte jedoch, dass das Eisen-Schwefel Cluster Protein in diesem Deletionsstamm in deutlich höherem Maße exprimiert wird (219). Dieser Stamm fördert die Synthese/Assemblierung von [FeS] Clustern, da das Repressor-Gen des *isc*-Operons deletiert ist (113). Dies zeigt, dass die Proteinexpression und anschließende Assemblierung dieses [FeS] Clusters von der *isc*-Maturierungs-Maschinerie abhängig und somit unerlässlich für die Faltung von PfsA ist.

Das Wachstum der transformierten Zellen erfolgte aerob bei 37 °C in gepuffertem LB Medium (pH 7,4) mit entsprechenden Antibiotika bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5. Die Expression wurde mit IPTG (optimale Konzentration 0,2 mM) induziert. Es wurden bei der Überexpression verschiedene Wachstumstemperaturen (von 15 – 37 °C) ausprobiert, wobei sich eine Expressionstemperatur von 15 - 17 °C als optimal herausstellte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei tieferen Expressionstemperaturen der Metabolismus von *E. coli* verlangsamt wird, was die korrekte Faltung von Proteinen fördert (220). Nach 20 Stunden Expression wurden die Zellen für 30 min bei 4 °C und 8000 x g geerntet. Das aus Konstrukt 1 heraus exprimierte 25 kDa große Protein PfsA trägt einen N-terminalen Histidin-Tag und kann daher über eine Affinitäts-Chromatographie (siehe 2.6.1.2) aufgereinigt werden. Die Proteine mit N- und C-terminalem Strep-Tag wurden entsprechend über eine Strep-Tactin Säule

aufgereinigt. Für die anschließenden spektroskopischen Messungen wurden die aufgereinigten Proteine mittels Amicon Ultra Zentrifugensfiltern aufkonzentriert.

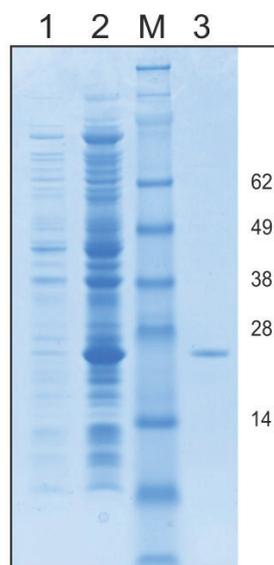
PfsA, erstellt aus dem Plasmid pET-15b, konnte an die Ni-TED Säule gebunden werden. Diese aus einer Silika-Matrix bestehende Säule bindet das rekombinante Protein über die Interaktion des His-Tags mit den  $\text{Ni}^{2+}$  Ionen der Säule. Die Bindung von PfsA war jedoch sehr unspezifisch, stets wurden auch andere Proteine, trotz des Fehlens eines His-Tags, mit aufgereinigt. Diese Tatsache ist bedingt durch das relativ häufige Auftreten von Histidin-Seitenketten in anderen Proteinen der *E. coli* Zellen, wodurch auch andere Proteine an die Säule binden können. Die eluierten Proben wiesen eine schwache braune Färbung auf und zeigten auch im UV Spektrum Banden, welche für Schwefel-zu-Eisen Ladungstransfer Übergänge von Eisen-Schwefel Kofaktoren typisch sind. Allerdings konnten mit diesen Proben nur sehr schwache EPR-Signale erhalten werden. Es war in der Tat mit dieser Aufreinigungsmethode nicht möglich, eine Probe zu generieren, die im Vergleich zu Verunreinigungen genug Zielprotein enthielt, um aussagekräftige EPR-Messungen durchführen zu können. Um die Art der Aufreinigung zu verbessern und so eine reinere Probe zu erhalten, wurde ein neues Konstrukt mit einem StrepII-Tag entworfen (Konstrukt 2). Der Strep-Tag besteht aus einer acht Aminosäure langen Sequenz (WSHPQFEK) und bindet spezifisch an eine mit dem Streptavidin Strep-Tactin beladene Säule. In diesem Fall wird mit 2,5 mM Desthiobiotin unter physiologischen Bedingungen eluiert und nicht mit 250 mM Imidazol bei pH 8,0, wie im Fall der His-Tag Aufreinigung. Die His-Tag Aufreinigung kann einen destabilisierenden Effekt auf das Protein ausüben (Oxidation von Methionin und Cystein durch  $\text{Ni}^{2+}$ ). Aus diesem Grund wurde am N-Terminus der Proteinsequenz ein Strep-Tag vor dem Tat-Motiv angebracht; dies resultierte mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III in dem Konstrukt pET-51b::*pfsA*. Nach erfolgreicher Überexpression des 25 kDa großen Proteins PfsA wurde eine Affinitätschromatografie versucht, jedoch konnte dieses Konstrukt nie an die Säule gebunden werden, so dass geschlossen werden musste, dass der Strep-

## Ergebnisse

Tag im gefalteten Protein nicht zugänglich war. Zur teilweisen Reinigung bzw. Anreicherung des Proteins wurde der Überstand nach der Ultrazentrifugation (siehe 2.6.1.2) mit Amicon Zentrifugalfiltern über Größenausschluss-Zentrifugation von deutlich größeren und kleineren Proteinen getrennt.

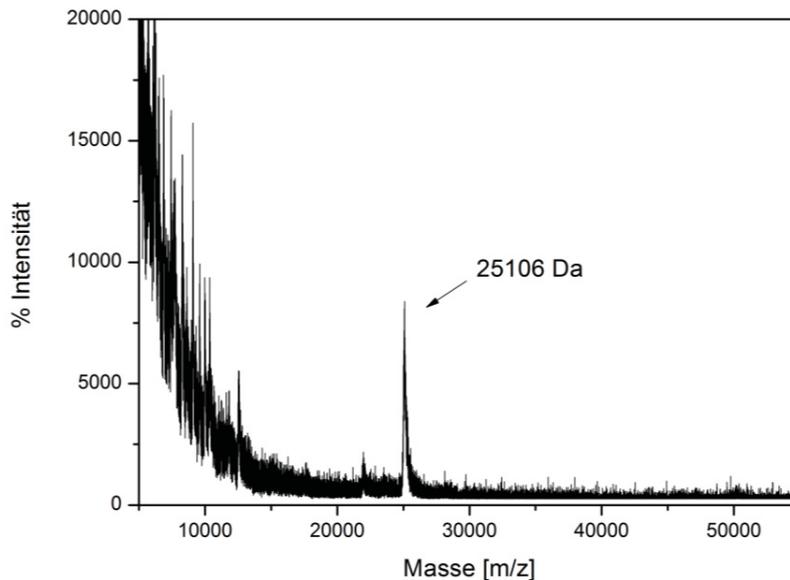
Die nicht erfolgreiche Verwendung des Strep-Tags läßt darauf schließen, dass das Protein mittels des Tat-Motivs ins Periplasma transportiert wurde, woraufhin das Tat-Motiv abgeschnitten und somit auch der Tag vom Protein entfernt wurde.

Zur Überprüfung, ob ein Standard [4Fe-4S] Cluster mit vier Cystein-Liganden mit dieser Methode korrekt gefaltet werden kann, wurde das proximale Cluster der sauerstoffsensitiven [NiFe] Hydrogenase aus *DvMF* auf dieselbe Weise kloniert (Konstrukt 3: pET-51b::*spcD*). Das auf diese Weise exprimierte Protein SpcD (Standard proximal Cluster aus Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F) konnte erfolgreich mit Hilfe des Strep-Tags aufgereinigt werden (Abbildung 3.32).



**Abbildung 3.32:** SDS-PAGE des überexprimierten und aufgereinigten SpcD Proteins. M: Molekulargewichts-„Standard Marker Protein“ (SeeBlue Plus2 pre-stained standard, Invitrogen), Reihe 1: *E. coli* Zellkultur mit pET-51b::*spcD* vor der Induktion; Reihe 2: Überexpression von pET-51b::*spcD* 20 Stunden nach der Induktion mit IPTG; Reihe 3: Eluat der Aufreinigung von SpcD.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Aufreinigung und der Sauberkeit des Proteins wurde außerdem eine MALDI-TOF Massenspektrometrie durchgeführt (Abbildung 3.33), bei der ein Peak bei circa 25 kDa entsprechend der Größe von SpcD detektiert wurde.



**Abbildung 3.33:** MALDI-TOF Analyse des aufgereinigten Proteins SpcD.

Der Grund für die erfolgreiche Bindung des Zielproteins an die Strep-Tactin Säule im Vergleich zu PfsA wurde zunächst in der engeren Verwandtschaft von *A. aeolicus* mit *E. coli* gesehen, da das Deltaproteobakterium *D. vulgaris* phylogenetisch weiter entfernt ist. Es wurde vermutet, dass im Fall von PfsA das Tat-Motiv von der *E. coli* Transport-Maschinerie erkannt wurde und der Strep-Tag auf diese Weise nach erfolgtem Transport ins Periplasma abgeschnitten wurde, während dies bei *Desulfovibrio* nicht der Fall ist. Aus diesem Grund wurde ein neues Konstrukt erstellt, bei dem das Tat-Motiv nicht mit kloniert wurde, so dass das exprimierte Protein im Cytoplasma verbleiben sollte. Dieses Konstrukt (Konstrukt 4), das den Strep-Tag durch die Klonierung in den Expressionsvektor pET-21a(+) am C-Terminus des Proteins aufweist, exprimiert ein um 6,3 kDa kleineres Protein als die PfsA-Proteine aus pET-15b und pET-

## Ergebnisse

51b(+). Zum besseren Vergleich wurde auch *spcD* ohne das Tat-Motiv in pET-21a(+) kloniert, woraus ein um 6,6 kDa kleineres Protein resultierte.

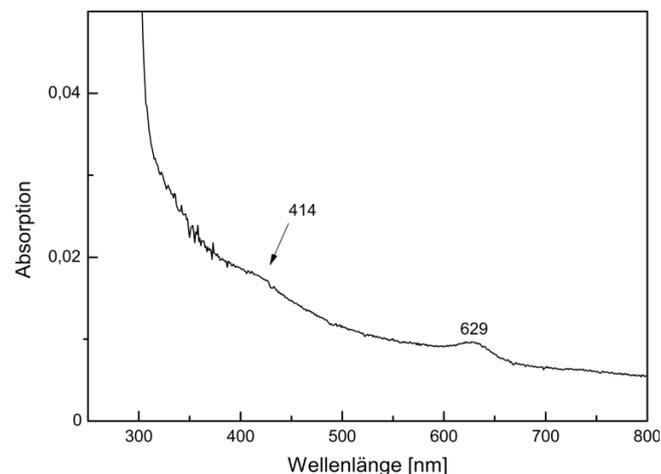
Die Expression der beiden Proteine PfsA und SpcD führte jedoch stets zur Bildung von Einschlusskörpern aufgrund der Unlöslichkeit der gebildeten Proteine. Dies ist bei heterologer Expression in Wirten wie *E. coli* nicht untypisch (221) und verhindert natürlich die Reinigung der Proteine mittels des Tags. Aufgrund dieses Ergebnisses wird vermutet, dass das Tat-Motiv entscheidend zur Stabilisierung des gebildeten Proteins beiträgt und eine korrekte Faltung ohne diese Sequenz nicht erfolgen kann.

Auch eine Mutante, genannt Aq-mut, in der die beiden zusätzlichen Cysteine aus PfsA gegen im Standardcluster vorkommende Glycine getauscht wurden (Konstrukt 5), konnte nicht zur Löslichkeit der Proteine beitragen (86,91). Dass ein Standardcluster, welches ein Tat-Motiv aufwies (Konstrukt 3), bereits erfolgreich exprimiert und gereinigt werden konnte, unterstützt die Tatsache, dass dieses nachgeahmte Standardcluster aufgrund des fehlenden Tat-Motivs nicht richtig stabilisiert werden kann und deshalb in Einschlusskörper verpackt wird.

Da auch die fehlende hydrophobe Interaktion mit dem Rest der kleinen Untereinheit ein Grund für die inkorrekte Faltung sein könnte, wurden die gesamten kleinen Untereinheiten von *A. aeolicus* und DvMF in den Vektor pET-21a(+) kloniert (Konstrukte 7 und 8). Das Homologie-Modell zeigt, dass eines der beiden zusätzlichen Cysteine des proximalen Clusters (C120) so nah an einem Tryptophan-Rest (W258) liegt, dass eine Wasserstoffbrückenbildung möglich ist. Diese möglicherweise notwendige Bindung sollte mit diesem Klonierungsansatz gewährleistet werden. Hierbei wurden die Cystein-Liganden der beiden anderen Cluster gegen Serine ausgetauscht, um eine Bildung von medialem und distalem Cluster zu verhindern. Somit sollte eine von den anderen Clustern getrennte Untersuchung des proximalen Clusters gewährleistet werden. Serin wurde ausgewählt, da diese Aminosäure in ihrer Struktur und Größe Cystein sehr

ähnlich ist, lediglich die Sulfhydrylgruppe ist durch eine Hydroxylgruppe ausgetauscht. Jedoch führten auch diese Expressionen von PfsA und SpcD stets zu Proteinaggregation.

Die Unlöslichkeit vieler oben genannter Konstrukte stand natürlich weiteren Untersuchungen im Weg. Entsprechend wurde PfsA zusammen mit Faltungshelferproteinen, sogenannten Chaperonen, exprimiert. Hierbei wurden die Chaperon-Vektoren pG-KJE8 und pGro7 von Takara Bio Inc., Japan, verwendet (im Anhang 8.1). Das erstgenannte Plasmid trägt die Chaperon-Gene *groEL*, *groES*, *grpE*, *dnaJ* und *dnaK*, deren Expression zu Beginn der Zellanzucht mit Tetracyclin und Arabinose induziert wird. Das Plasmid pGro7 trägt die Chaperon-Gene *groEL* und *groES* und wird nur mit Arabinose induziert. Das Wachstum der Zellen erfolgt wie gewohnt bis zu einer  $OD_{600} = 0,5$  bei 37 °C, anschließend wird die Expression von PfsA wie gewohnt mit IPTG induziert. Allerdings ist die Dauer der Überexpression im Fall der Ko-Expression mit Chaperonen auf 4 Stunden reduziert. Zunächst wurde das Plasmid pET-21a(+), welches das Gen *pfsA* enthält, mit dem Chaperon-Vektor pG-KJE8 exprimiert. Dies führte nach der Aufreinigung durch den Strep-Tag zu sehr unsauberem Eluat, welches nur in geringen Mengen PfsA enthielt (Abbildung 3.34).



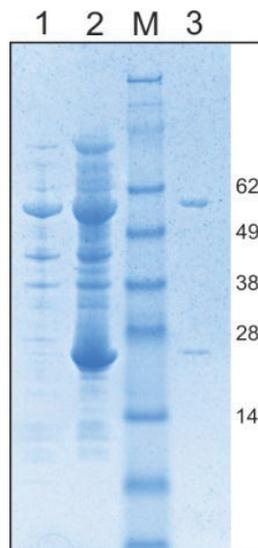
**Abbildung 3.34:** UV/vis Spektrum von pET-21a::*pfsA*, ko-exprimiert mit pG-KJE8.

## Ergebnisse

Das Chaperon-Plasmid pGro7 wurde mit folgenden Konstrukten zusammen exprimiert:

pET-15b::*pfsA*, pET-21a::*pfsA*, pET-21a::*aq-mut*, pET-21a::*aq-SSU*, pET-21a::*dvMF-SSU* und pET-51b::*pfsA*.

Die gemeinsame Expression von den Chaperonen auf pGro7 mit PfsA von pET-15b führte nach der Reinigung des Zielproteins mit Hilfe einer His-Tag Säule, wie bereits bei der Aufreinigung nach der Expression ohne Chaperone, zu sehr unsauberem Eluat. Die Expression aus den Konstrukten pET-21a::*pfsA*, pET-21a::*aq-mut*, pET-21a::*aq-SSU* und pET-21a::*dvMF-SSU* zusammen mit den Chaperonen GroEL und GroES von pGro7 resultierte wieder in einer Proteinaggregation und der Bildung von Einschlusskörpern, wodurch eine Aufreinigung dieser Konstrukte nicht möglich war. Dies zeigt, dass alle Proteine, die aus dem Expressionsvektor pET-21a(+) heraus exprimiert werden, zu unlöslichen Proteinaggregationen führen. Entsprechend wurden nun Konstrukte verwendet, die in den Vektor pET51b(+) kloniert wurden. Nach einer Ko-Expression von GroEL und GroES zusammen mit PfsA (auf pET-51b(+)) ließ sich das nun lösliche Eisen-Schwefel Cluster Protein über eine Strep-Tactin Säule erfolgreich aufreinigen (Abbildung 3.35). Es wurden ausreichende Mengen erhalten, um hiermit spektroskopische Untersuchungen durchführen zu können.



**Abbildung 3.35:** SDS-PAGE des überexprimierten und aufgereinigten PfsA Proteins. Reihe M: Standard Marker Protein (SeeBlue Plus2 pre-stained standard, Invitrogen), Reihe 1: *E. coli* Zellkultur mit pGro7 und pET-51b::*pfsA* vor der Induktion; Reihe 2: Überexpression von pGro7 und pET-51b::*pfsA* 4 Stunden nach der Induktion mit IPTG; Reihe 3: Eluat nach der Aufreinigung von PfsA (ko-aufgereinigt mit dem GroEL Chaperon).

Wie im Gelbild in Reihe 3 ersichtlich, erschienen nach der Aufreinigung zwei Banden, welche zum einen PfsA bei circa 25 kDa und zum anderen GroEL bei circa 60 kDa zuzuschreiben sind. Die Bindung von GroEL an die Strep-Tactin Säule und somit die gleichzeitige Aufreinigung dieses Chaperons wird vom Hersteller des Chaperon-Plasmid-Kits als typisch beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Proteine, die von Interesse waren, in *E. coli* überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden konnten, was beweist, dass es möglich ist, synthetisch hergestellte Gene mittels der Transkriptionsmaschinerie von *E. coli* zu falten.

Die Tatsache, dass alle Konstrukte aus pET-21a(+), also alle diejenigen, denen das Tat-Motiv fehlte, Proteinaggregate bildeten, zeigt, dass das Tat-Motiv unerlässlich für die Stabilität der Proteine ist und bei der Faltung hilft. Der Grund dafür, dass PfsA aus dem Konstrukt pET-51b::*pfsA* nicht aufgereinigt werden

## Ergebnisse

konnte, könnte sein, dass der Loop am N-Terminus der Sequenz, welche den Strep-Tag trägt, sehr flexibel ist (Abbildung 3.30) und somit den Tag innerhalb des Proteins einschließt, so dass eine Bindung an die Strep-Tactin Säule und eine damit verbundene Aufreinigung verhindert wird. Die erfolgreiche Aufreinigung des Proteins, nachdem man eine korrekte Faltung durch die Chaperone unterstützt hat, zeigt, dass der Tag nun verfügbar ist. Aus diesem Grund ist der oben genannte Vorschlag, dass das Protein durch die *E. coli* Transport-Maschinerie ins Periplasma gelangt und das Tat-Motiv samt des Tags abgeschnitten wird, nicht haltbar, da in diesem Fall der Tag auch bei einer Ko-Expression mit Chaperonen nicht verfügbar wäre. Das Tat-Motiv wird also nicht von *E. coli* als solches erkannt, ist jedoch entscheidend für die korrekte Faltung und Stabilität des Proteins.

### 3.3.2 Spektroskopische Charakterisierung von PfsA und SpcD

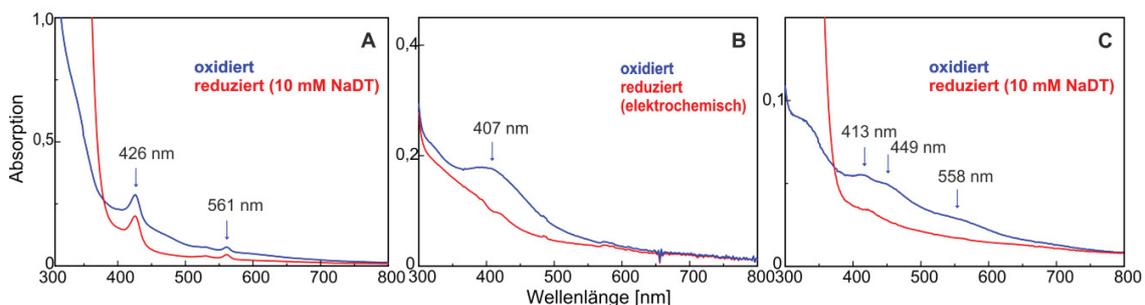
Beide isolierten Proteine wurden mittels optischer und EPR Spektroskopie analysiert. EPR detektiert und misst selektiv paramagnetische Spezies und liefert so Informationen über die Komposition und konformelle Struktur der synthetischen [FeS] Cluster (222). Die verschiedenen diamagnetischen und paramagnetischen Zustände der Cluster wurden mittels UV/vis Spektroskopie untersucht.

#### UV/vis Spektroskopie

UV/vis Messungen von anaeroben Proteinen wurden in einem Cary50 Spektralphotometer der Firma Varian durchgeführt, bei dem sich die Messzelle innerhalb einer Glove-box befand.

Die UV/vis Messungen von PfsA zeigten die typischen Peaks eines Eisen-Schwefel Clusters (Abbildung 3.36A). Dies war unabhängig davon, ob das Zellwachstum oder die Aufreinigung aerob oder anaerob durchgeführt wurde, die Art des geformten Clusters war stets identisch. Auch die UV/vis Spektren, generiert aus den Konstrukten pET-15b::*pfsA*, pET-51b::*pfsA* (Aufreinigung ohne

Strep-Tag, nur über Größenausschluss-Zentrifugation) und pGro7/pET-51b::*pfsA* nach vollständiger Aufreinigung, waren identisch. Dies zeigt, dass der Grad der Aufreinigung nicht die Qualität der optischen (und EPR-) Spektren beeinflusst. Es waren stets scharfe Peaks bei 426 nm sowie bei ungefähr 560 nm zu sehen, was typisch für die Formation von [FeS] Clustern ist (223). Das Spektrum ist allerdings typischer für [2Fe-2S] Cluster (224) als für die erwarteten [4Fe-4S] Cluster. Die UV/vis Spektren von klassischen [2Fe-2S] Ferredoxinen in ihrem oxidierten Zustand sind jedoch mit den hier gemessenen Spektren nicht zu vergleichen, es fehlen einige der signifikanten Peaks für dinukleare [FeS] Cluster, so z.B. ein intensiver Peak bei circa 320-330 nm und ein Doppelpeak bei 420-460 nm. Das optische Spektrum von PfsA ist primär durch einen einzelnen, intensiven *S-zu-Fe* Ladungstransfer-Peak bei 426 nm charakterisiert.



**Abbildung 3.36:** Optische Spektren der artifiziellen Proteine PfsA und SpcD. A) UV/vis Spektren von anaerob gewachsenem und anaerob aufgereinigtem PfsA im oxidierten Zustand (blau) sowie im durch Natriumdithionit (NaDT) reduzierten Zustand (rot). B) Optische Spektren von SpcD nach anaerobem Wachstum und anaerober Aufreinigung im oxidierten (+220 mV in blau) und elektrochemisch reduzierten (-480 mV gegen NHE, in rot) Zustand. C) UV/vis Spektren des aerob gewachsenen und aufgereinigten Proteins SpcD (oxidiert in blau, NaDT-reduziert in rot). Der in den durch NaDT reduzierten Zuständen vorhandene Peak unterhalb 360 nm stammt von der im Überschuss zugegebenen Menge an NaDT.

In Abbildung 3.36B wurde eine Redox-Titration durchgeführt, bei der ein OTTLE Zelle (Optically Transparent Thin-Layer Electrochemical Cell (25,225)) verwendet wurde. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur ohne die Anwesenheit von Mediatoren ausgeführt. Eine 166 mM KCl Lösung wurde als leitender Elektrolyt

## Ergebnisse

verwendet. Als Arbeitselektrode wurde eine Goldelektrode verwendet und die Referenzelektrode bestand aus Ag/AgCl in 1 M KCl-Lösung. Der über eine gasdichte Spritze anaerob eingespritzte Puffer wurde zunächst als Referenz vermessen und anschließend wurde die Probe anaerob in die Zelle gegeben und vermessen.

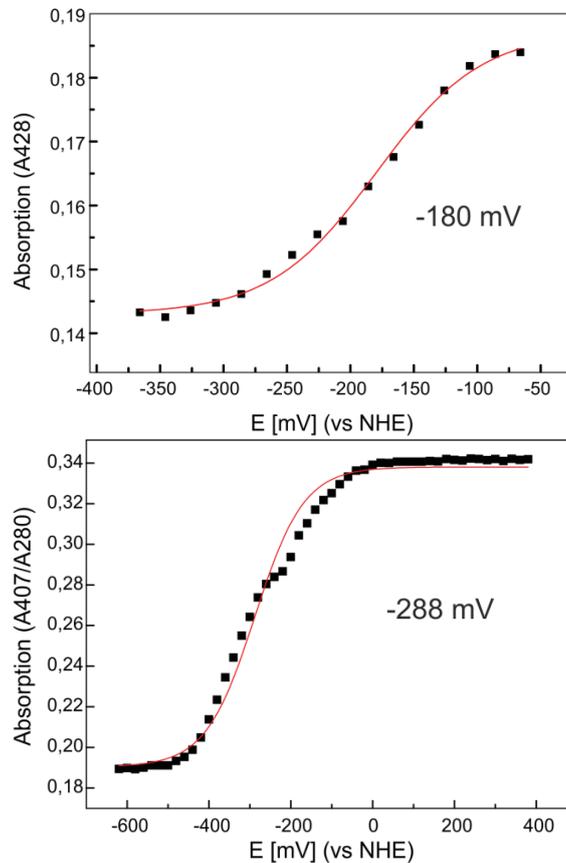
In Abbildung 3.36A erkennt man im roten Spektrum nach der Reduktion mit einem Überschuss an Natriumdithionit (10 mM) einen Rückgang der Absorption bei 426 nm um circa 30 %. Auch durch eine noch höhere Zugabe an NaDT oder durch längere Inkubationszeiten von über einer Stunde ging dieser Peak nicht weiter zurück. Ebenso konnte die elektrochemische Reduktion mit sehr negativen Potentialen von bis zu -600 mV nichts mehr an der Absorptionsgröße dieses Peaks verändern. Diesen Verlust der Absorption vom oxidierten zum reduzierten Zustand um bis zu maximal 50 % beobachtet man typischerweise bei [2Fe-2S] Clustern (226,227).

Das in blau gehaltene Spektrum der Abbildung 3.36B zeigt das oxidierte, anaerob exprimierte und aufgereinigte Protein SpcD, welches sich von dem in A) gezeigten Spektrum deutlich unterscheidet. In diesem Fall ist ein breiter Peak mit einem Maximum bei circa 407 nm zu erkennen. Wird dieses Protein mit Natriumdithionit oder durch elektrochemische Reduktion in den reduzierten Zustand überführt, erkennt man einen nahezu vollständigen Verlust des genannten Peaks (Abbildung 3.36B, rotes Spektrum). Diese breite Absorptionsbande (226) und auch die Tatsache, dass dieses Merkmal durch Reduktion verschwindet, ist typisch für die Anwesenheit von [4Fe-4S] Clustern (226,228). Dies deutet darauf hin, dass SpcD bei heterologer Expression in *E. coli* durch die Maturierungsmaschinerie dieses Wirtes vollständig gefaltet werden kann und in der Lage ist, einen [4Fe-4S] Cluster zu assemblieren. In diesem Fall ist die hydrophobe Interaktion mit dem Rest der kleinen Untereinheit bzw. der großen Untereinheit offensichtlich nicht entscheidend für die Stabilität des Clusters.

Von diesen beiden mit UV/vis charakterisierten Clustern ([2Fe-2S] Cluster in PfsA und [4Fe-4S] Cluster in SpcD) wurde das Mittelpunktspotential bestimmt (Abbildung 3.37). Dies beträgt bei PfsA -180 mV, gemessen bei pH 7 und Raumtemperatur. Mit diesem Protein, das auch noch den Strep-Tag trägt, wurde eine vorläufige EPR-Redoxtitration durchgeführt. Diese Titration lieferte ein Mittelpunkts-Potential von ca. - 330 mV bei pH 8,3 bei 15 °C. Der Unterschied in ihren Redoxpotentialen könnte eine pH-Abhängigkeit von zwei Protonen (- 120 mV/pH) widerspiegeln. Es muss herausgefunden werden, ob diese Unterschiede aufgrund einer unterschiedlichen Faltung der Proteine bestehen. Der Vergleich mit den erstellten Homologiemodellen zeigt, dass das Cluster an der Proteinoberfläche exponiert ist, was diese starke pH-Abhängigkeit erklären könnte.

Das [4Fe-4S] Cluster in SpcD weist ein Mittelpunktspotential von - 288 mV bei pH 7,0 an Raumtemperatur auf. Dieser Wert stimmt mit dem Mittelpunktspotential des [4Fe-4S] Ferredoxins aus *Bacillus proteolyticus* von - 280 mV überein (229).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.37:** Mittelpunktspotentialbestimmung von PfsA (aus pET-15b, links) und SpcD (rechts), jeweils anaerob exprimiert und aufgereinigt, gemessen bei pH 7 an Raumtemperatur.

Bei einer aeroben Expression und Aufreinigung von SpcD ergab sich im Gegensatz zu der anaeroben Probe ein verändertes UV/vis Spektrum (Abbildung 3.36C). In diesem Fall wurde kein [4Fe-4S] Cluster gebildet, man erkennt vier Peaks mit den Maxima bei 330 nm, 413-449 nm und 558 nm. Dies ist typisch für [2Fe-2S]<sup>2+</sup> Cluster enthaltende Ferredoxine. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Anwesenheit von Sauerstoff die Art des gebildeten Clusters stark beeinflusst. Eine Reduktion dieses Clusters mit Natriumdithionit (rotes Spektrum) zu einem [2Fe-2S]<sup>1+</sup> Cluster sollte wie im Fall von PfsA nicht zu einem kompletten Verlust der Absorptionen führen, sondern nur deren Absorption um maximal 50 % verringern. In diesem Fall jedoch führte eine Reduktion zu einem Shift der Peaks und dem Verlust der für [2Fe-2S] Cluster typischen Merkmale sowie einer drastischen Abnahme der Absorptionen (Abbildung 3.36C, rotes Spektrum).

Demnach wurde das  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  Cluster nicht in einen 1+ Status überführt, sondern es erfolgte anscheinend eine Degradierung des Clusters oder eine strukturelle Umlagerung.

### EPR Spektroskopie

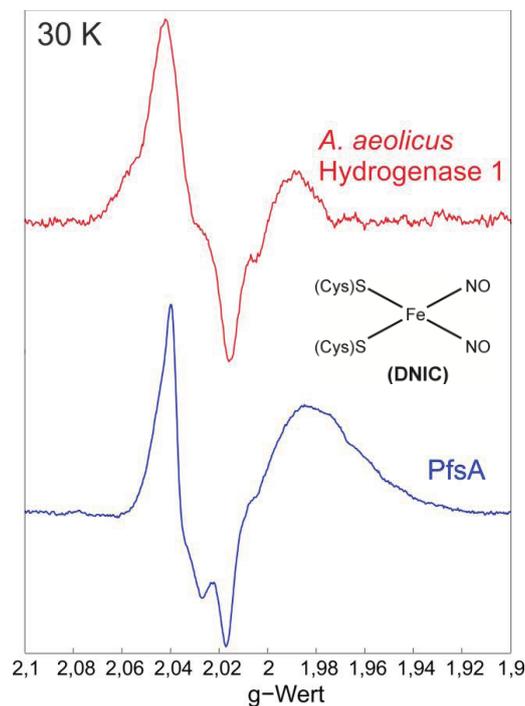
Die im Folgenden gezeigten EPR Spektren von PfsA wurden vom nur teilweise aufgereinigten Protein, erhalten aus einer pET-51b(+) Expression, aufgenommen. Zur Probenvorbereitung wurde nach der Ultrazentrifugation der aufgeschlossenen Zellen der das Protein enthaltene Überstand verwendet, von dem mittels eines 10 kDa Ausschlussfilters kleinere Proteine und andere niedermolekulare Komponenten abgetrennt wurden. Es wurde zusätzlich versucht, mittels eines 50 kDa Ausschlussfilter höhermolekulare Verunreinigungen abzutrennen, jedoch lieferten diese doppelt gefilterten Proben keine Unterschiede im EPR Spektrum und verringerten nur die Menge an PfsA in der Lösung, da zum Teil Protein an den Filtermembranen haften bleibt. Da die größeren in der Lösung enthaltenen Proteine offensichtlich keine EPR-aktiven Spezies aufwiesen, wurde im Folgenden auf eine zweite Filterung verzichtet.

Um neben den UV/vis Spektren einen ersten EPR-Beweis für das Vorhandensein eines  $[\text{FeS}]$  Clusters in PfsA zu erhalten, wurde die Proteinprobe mit Stickstoff-Monoxid (NO) begast.  $[\text{FeS}]$  Cluster werden durch NO zu Dinitrosyl-Komplexen (DNICs) degradiert (230-232). Die im EPR-Spektrum sichtbare Degradierung von PfsA ist denen anderer  $[\text{FeS}]$  Cluster Proteine sehr ähnlich (siehe Tabelle 3.5). So gilt der  $g_{\text{av}}$ -Wert von 2,03 als typischer Marker für die Anwesenheit der Dinitrosyl-Eisen-Komplexe (233,234), während der Durchschnitts-g-Wert von nicht mit NO behandelten  $[\text{FeS}]$  Clustern bei 1,94 – 1,96 liegt. X-Band EPR Spektren dieser niedermolekularen DNICs, welche zwei Cystein-Liganden aufweisen (siehe Abbildung 3.38,  $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{S-Rest})_2]$ -Komplexe) liefern einen  $g_z$  Wert von 2,04 und ein nahezu axiales Signal bei 2,015 (230).

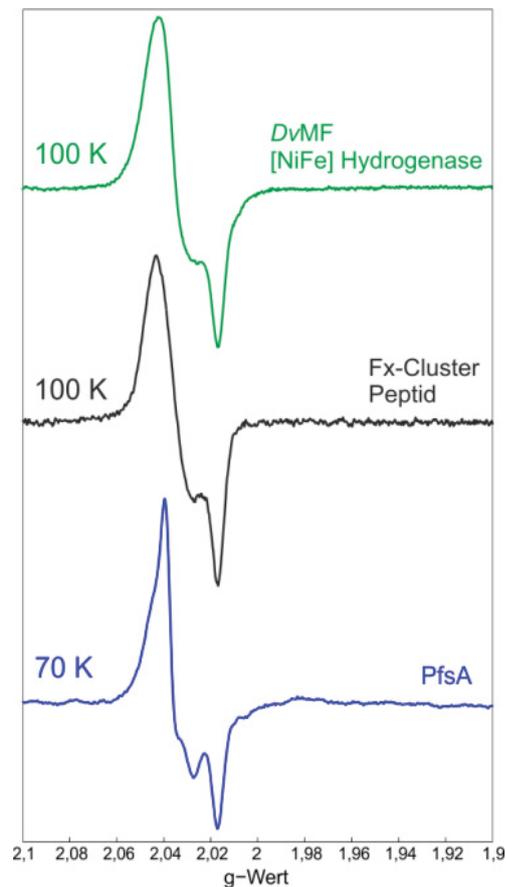
## Ergebnisse

**Tabelle 3.5:** g-Werte der Dinitrosyl-Komplexe (DNIC), entstanden durch die Degradierung des [FeS] Clusters. In der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* MF und der [NiFe]-Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus* stammen die DNIC Signale von der Degradierung des [4Fe-4S]-clusters. Das in synthetisierten Peptiden rekonstituierte [FeS] F<sub>x</sub> Cluster (235) gehört ebenfalls zum [4Fe-4S] Typ. g<sub>av</sub> zeigt den Durchschnittswert der g-Werte an. Die Daten der Cluster, abgesehen von PfsA, stammen von Dr. Maria Pandelia.

	<b>g<sub>z</sub></b>	<b>g<sub>y</sub></b>	<b>g<sub>x</sub></b>	<b>g<sub>av</sub></b>
PfsA-NO (30 K / 70K)	2.040	2.035	2.017	2.031
Hydrogenase 1- NO (30K)	2.042	2.030	2.016	2.029
DvMF-NO (100K)	2.042	2.034	2.017	2.031
F <sub>x</sub> -NO (100 K)	2.043	2.034	2.017	2.031



**Abbildung 3.38:** cw EPR Spektren von PfsA und der [NiFe]-Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus*, jeweils begast mit NO. Experimentelle Bedingungen: Temperatur 30 K, Mikrowellenleistung 6,3 mW, Modulationsamplitude 0,6 mT. Die EPR Spektren sind charakteristisch für niedermolekulare Dinitrosyl Eisenkomplexe (DNIC) (233).



**Abbildung 3.39:** cw EPR Spektren von PfsA sowie vom  $F_x$  Cluster im synthetisierten Peptid und der [NiFe]-Hydrogenase aus *DvMF*, jeweils begast mit NO. Experimentelle Bedingungen: Temperatur 100 K, Mikrowellenleistung 0,2 mW, Modulationsamplitude 1,0 mT (*DvMF*-NO), Temperatur 100 K, Mikrowellenleistung 0,02 mW, Modulationsamplitude 1,0 mT ( $F_x$ -NO), Temperatur 70 K, Mikrowellenleistung 6,3 mW, Modulationsamplitude 0,6 mT (PfsA-NO).

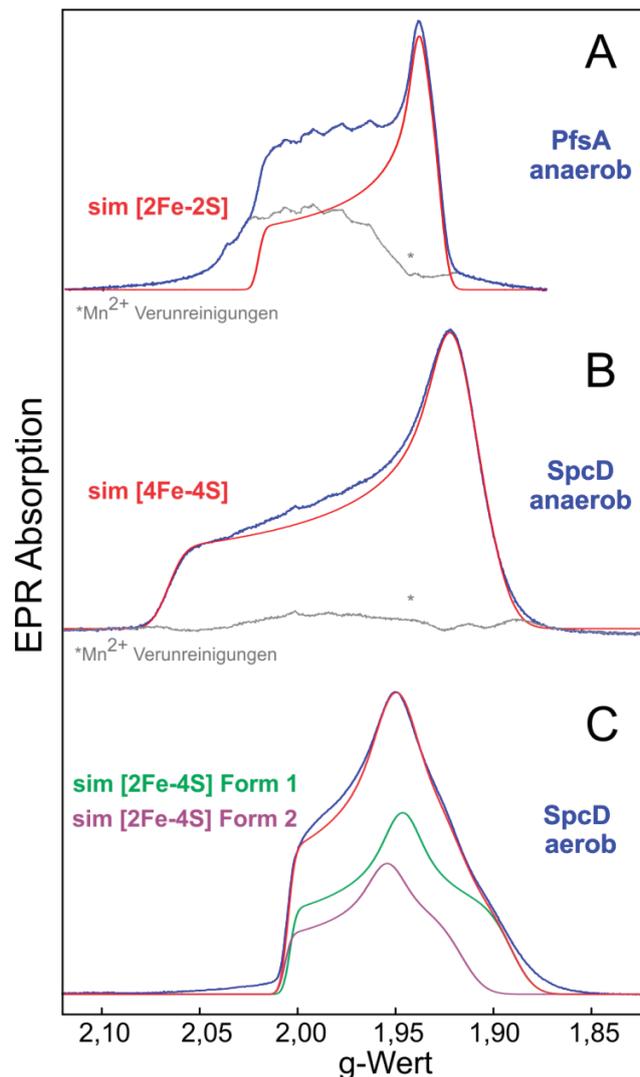
In der Tabelle 3.5 sowie in Abbildung 3.38 und Abbildung 3.39 erkennt man die große Ähnlichkeit der g-Werte von PfsA zu anderen biologisch relevanten [FeS] Cluster Proteinen. Dies ist neben dem typischen UV/vis Spektrum der unbehandelten Proteinprobe ein weiterer Hinweis darauf, dass es gelungen ist, das Protein mit einem gefalteten FeS-cluster zu erhalten.

Cw und gepulst-detektierte EPR Spektren vom *A. aeolicus* PfsA Protein zeigen ein axiales Signal mit einem mittleren g-Wert  $g_{av}$  von 1,96, welches bis zu

## Ergebnisse

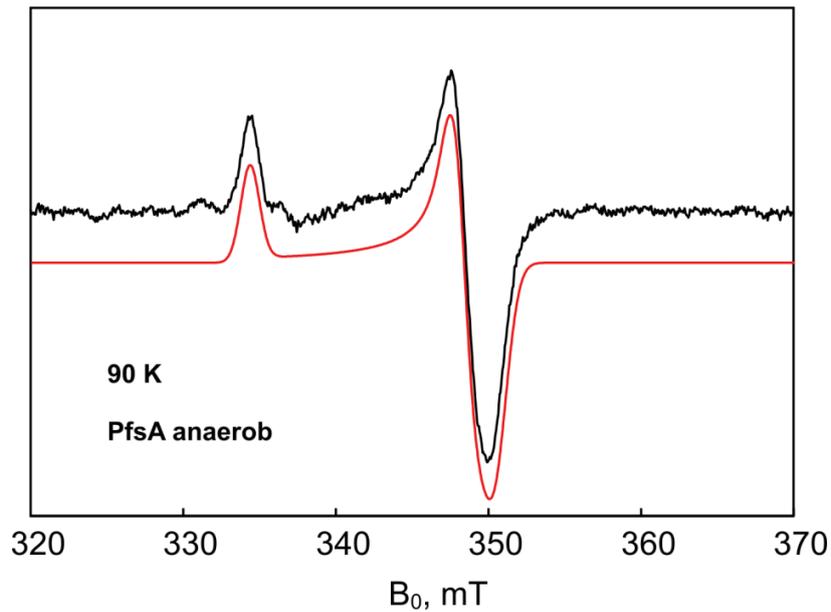
Temperaturen von 100 K detektiert werden kann (Abbildung 3.40A und Abbildung 3.41).

Die relativ kleine g-Anisotropie und die Relaxationseigenschaften dieses Signals stimmen mit den Werten für [2Fe-2S] Cluster im 1+ Oxidationszustand überein (Tabelle 3.6), bei denen die Eisenatome in einem gemischt-valenten Zustand vorliegen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). Die g-Werte des Clusters (2,02 / 1,94 / 1,93) sind denen von dinuklearen Eisen-Schwefel Clustern des Ferredoxin-Typs ähnlich ( $g_{av} \approx 1,96$ ;  $g_z \neq g_y \approx g_x$ ), sind aber klar von den mehr rhombischen Spektren von dinuklearen [FeS] Clustern des Rieske-Typs zu unterscheiden ( $g_{av} \approx 1,88 - 1,91$ ;  $g_z \neq g_y \neq g_x$ ). Das assemblierte [2Fe-2S] Cluster in PfsA wird vermutlich ausschließlich von Cysteinen ligandiert, da keine starke  $^{14}\text{N}$  Resonanz, abgesehen von den Stickstoffen des Proteinrückgrates, in Messungen wie ESEEM (electron spin echo envelope modulation) und HYSCORE (hyperfine sublevel correlation) detektiert werden konnte. Es kann zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass andere Aminosäuren wie Aspartat das Cluster ligandieren, da die EPR Spektren von [2Fe-2S] Clustern empfindlich auf die Art des Liganden am lokalisierten  $\text{Fe}^{2+}$  reagieren und relativ unempfindlich auf die Art des Liganden am lokalisierten  $\text{Fe}^{3+}$  (236). Durch die überzählige Cystein-Koordination und die Ähnlichkeit der PfsA EPR Spektren mit denen von dinuklearen Clustern, die komplett durch Cysteine ligandiert sind (237), ist es jedoch wahrscheinlicher, dass das Cluster über vier oder mehr der konservierten Cystein-Liganden an das Protein gebunden ist. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht mit Gewissheit gesagt werden, wie viele der insgesamt 6 Cystein-Reste an der Cluster-Koordinierung involviert sind.



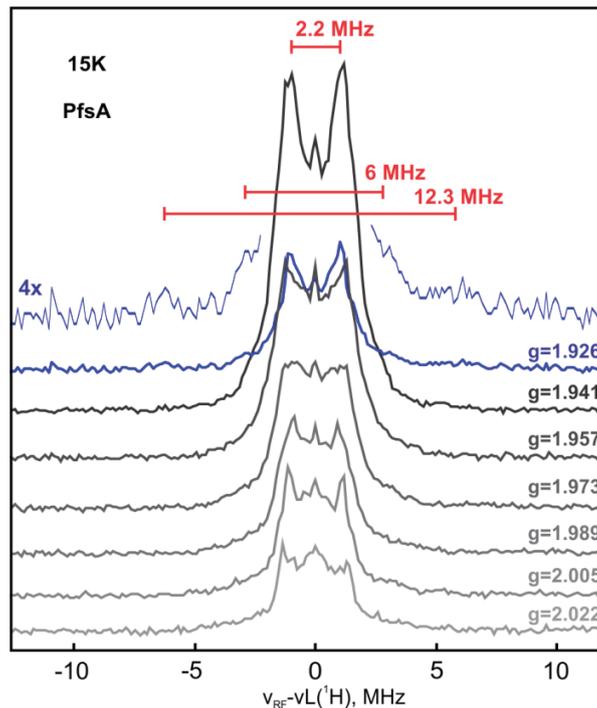
**Abbildung 3.40:** Zusammenstellung der 2-Puls Echo-detektierten Absorptions-Q-Band- EPR Spektren der unterschiedlichen Eisen-Schwefel Kofaktoren, assembliert in *A. aeolicus* PfsA und *DvMF* SpcD, welche jeweils das proximale Cluster der kleinen Untereinheiten der [NiFe] Hydrogenasen beinhalten. Die blauen Linien zeigen die Natriumdithionit-reduzierten Spektren, aufgenommen bei 15 K mit einer Mikrowellenfrequenz von 34,01 GHz. Die simulierten Spektren sind in rot dargestellt, die in A und B abgebildeten grauen Linien bilden die Differenzen zwischen den experimentellen Spektren und den Simulationen ab und zeigen geringe  $\text{Mn}^{2+}$  Unreinheiten in der Probe. Die hier dargestellten Spektren wurden im Q-Band Bereich gemessen, um eine bessere Auflösung der g-Tensor Komponenten zu erhalten. Die Werte aller Spektren stimmen komplett mit denen der im X-Band Bereich gemessenen cw-Spektren überein (vgl. Abbildung 3.41 und Abbildung 3.43).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.41:** Cw EPR Spektrum von anaerob gewachsenem und anaerob aufgereinigtem Protein PfsA, gemessen im X-Band Bereich bei 90 K. Die schwarze Linie stellt das gemessene Spektrum dar, die rote Linie zeigt das simulierte EPR Spektrum. Weitere Messbedingungen: Modulationsamplitude 0,7 mT, Mikrowellenleistung 6,32 mW, Mikrowellenfrequenz 9,473 GHz.

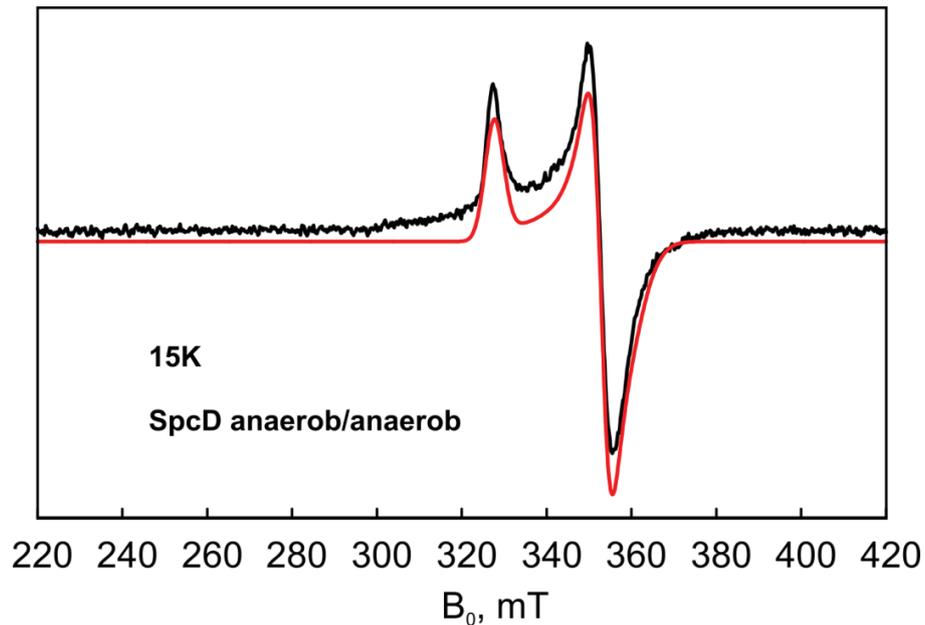
Die in Abbildung 3.42 dargestellte orientierungs-selektive ENDOR-Messung zeigt die für [2Fe-2S] Cluster charakteristischen  $^1\text{H}$  Resonanzen (238), welche von den  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Cysteine stammen.



**Abbildung 3.42:**  $^1\text{H}$  Davies ENDOR Spektren von PfsA, gemessen bei 15 K. Die größten detektierten  $^1\text{H}$  Resonanzen betragen ungefähr 12 MHz, was repräsentativ für [2Fe-2S] Cluster ist (238).

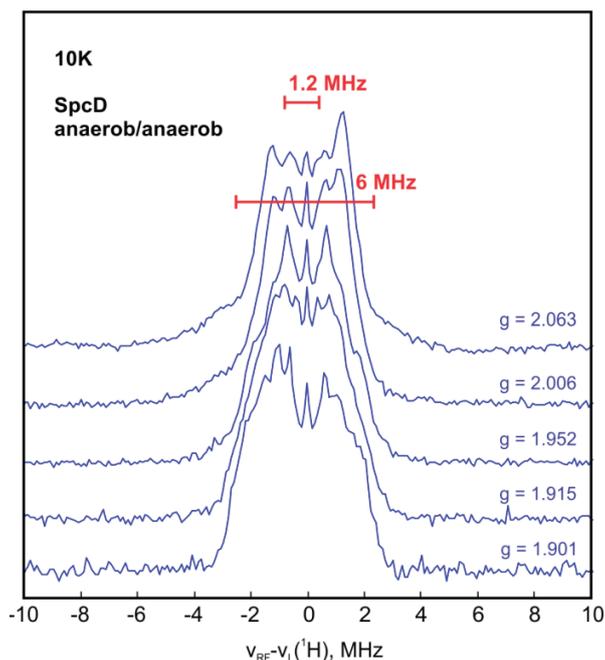
Im Fall des anaerob gewachsenen und anaerob gereinigten Proteins SpcD weist das optische Spektrum der oxidierten Probe auf das Vorhandensein eines  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$  Clusters hin (Abbildung 3.36). Reduktion mit Natriumdithionit führt zum Verschwinden der Absorption bei  $\approx 407$  nm, während das EPR Spektrum dieser Probe charakteristische Resonanzen eines  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$  Clusters zeigt (Abbildung 3.40B). Das  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$  Cluster in SpcD weist eine schnellere Relaxation auf als das [2Fe-2S] Cluster in PfsA und kann am besten bei niedrigen Temperaturen von 10 – 15 K detektiert werden. Das EPR Spektrum ist nahezu axial mit einem Durchschnitts-g-Wert  $g_{\text{av}}$  von circa 1,96. Das in Abbildung 3.40B in rot dargestellte simulierte Spektrum stimmt mit dem entsprechenden cw EPR Spektrum, welches im X-Band Bereich gemessen wurde (Abbildung 3.43), gut überein.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.43:** Cw EPR Spektrum vom anaerob gewachsenen und anaerob aufgereinigten Protein SpcD, gemessen im X-Band Bereich bei 15 K. Die rote Linie zeigt das simulierte EPR Spektrum, die schwarze Linie stellt das gemessene Spektrum dar. Weitere Messbedingungen: Modulationsamplitude 0,2 mT, Mikrowellenleistung 2,0 mW, Mikrowellenfrequenz 9,461 GHz.

Feldabhängige ENDOR Spektren (Abbildung 3.44) weisen einen Bereich der  $^1\text{H}$  Resonanzen auf (bis zu 6 MHz), welcher charakteristisch für [4Fe-4S] Cluster ist. Entsprechend liefern alle drei EPR-Messungen (Abbildung 3.40, Abbildung 3.43 und Abbildung 3.44) das Ergebnis, dass es sich bei dem konstant anaerob gehaltenen Cluster im Protein SpcD um ein [4Fe-4S] Cluster handelt.

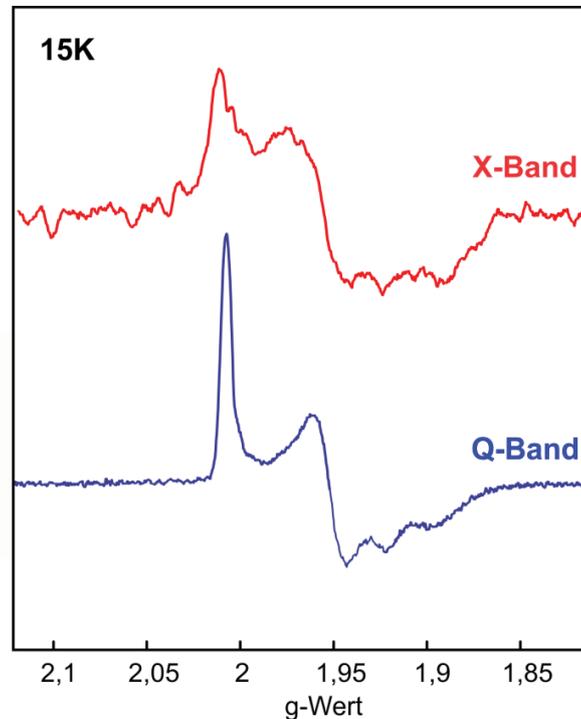


**Abbildung 3.44:**  $^1\text{H}$  Davies ENDOR Spektren des  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$  Clusters im anaerob gewachsenen und anaerob aufgereinigten SpcD, gemessen bei 10 K. Der Bereich und die Orientierungsabhängigkeit der  $^1\text{H}$  Resonanzen stehen im Einklang mit früher gemessenen  $[\text{4Fe-4S}]$  Clustern (239,240).

Wird hingegen SpcD aerob exprimiert und auch aerob aufgereinigt, zeigt das UV/vis Spektrum das Vorhandensein eines  $[\text{2Fe-2S}]$  Clusters und nicht, wie im Fall der anaeroben Anzucht und Aufreinigung, die eines  $[\text{4Fe-4S}]$  Clusters (Abbildung 3.36). Dies wird auch im Q-Band Bereich gemessenen EPR Spektrum dieser Probe gefunden (Abbildung 3.40C), da die EPR Signale bis zu einer Temperatur von 90 K durch die langsamere Relaxation der  $[\text{2Fe-2S}]$  Cluster im Vergleich zu  $[\text{4Fe-4S}]$  Clustern gut sichtbar waren. Jedoch ist das Spektrum komplexer als das des  $[\text{2Fe-2S}]^{1+}$  Clusters von PfsA. Um herauszufinden, ob es sich in diesem Fall bei den zwei entdeckten Formen (Form 1 und Form 2 in Abbildung 3.40C) um gekoppelte Cluster handelt, wurden sowohl X-Band als auch Q-Band Spektren aufgenommen. Die Temperatur- und Frequenzabhängigkeit der Resonanzen bei Q- und X-Band Frequenzen weist darauf hin, dass es sich bei diesen Spektren um eine Überlagerung zweier

## Ergebnisse

individueller Isoformen der [2Fe-2S] Cluster in einem relativen Verhältnis von 1 zu 1,4 handelt, welche schwach miteinander interagieren (Abbildung 3.45).



**Abbildung 3.45:** Oben: cw X-Band EPR Spektrum des aerob erhaltenen Proteins SpcD. Experimentelle Bedingungen: Temperatur 15 K, Modulationsamplitude 0,6 mT, Mikrowellenleistung 20 mW, Mikrowellenfrequenz 9,459 GHz. Unten: Pseudomoduliertes Q-Band Absorptionsspektrum des aerob erhaltenen Proteins SpcD, aufgenommen mit einer 2-Puls Echo Hahn Sequenz bei 15 K.

Die Unterschiede beider Spektren in der Linienbreite und in den relativen Intensitäten der spektralen Komponenten sowie die leichten Verschiebungen der g-Werte deuten auf eine schwache Interaktion zwischen zwei verschiedenen Isoformen der [2Fe-2S] Cluster hin (241).

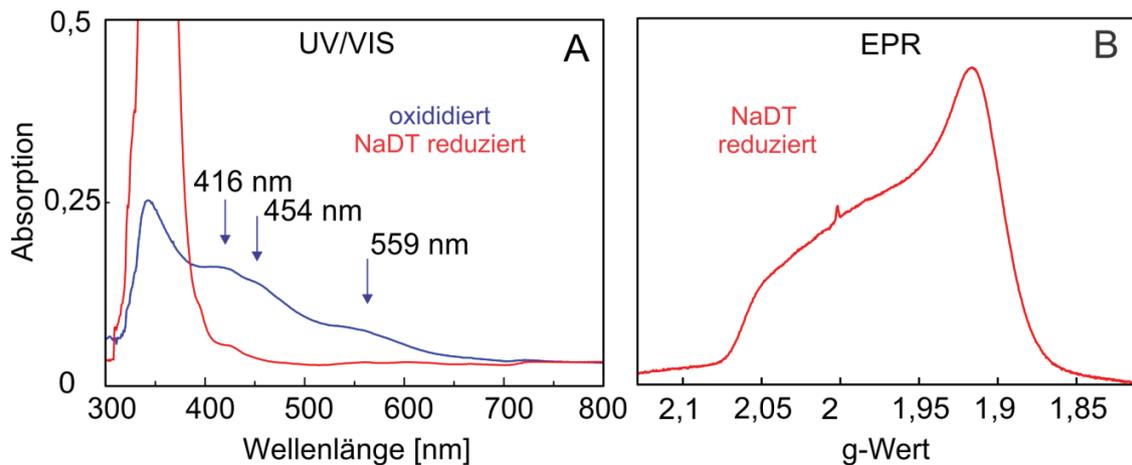
Diese Heterogenität der [2Fe-2S] Cluster Assemblierung könnte für eine leicht unterschiedliche lokale Umgebung der beiden gebildeten Cluster sprechen, die in Zusammenhang mit der Verformbarkeit der synthetischen Konstrukte stehen könnte, wohingegen die schwache Interaktion (Abbildung 3.45) der an der

Proteinoberfläche exponierten Cluster zeigt, dass sie sich in naher Umgebung zueinander befinden ( $< 14$  Ångström). Eine andere Umgebung und dadurch veränderte Koordinationen könnten auch die Erklärung für die sehr verschiedenen Spektren der [2Fe-2S] Cluster von PfsA und SpcD sein (Abbildung 3.40A und C).

Die Beobachtungen, dass unter aeroben Bedingungen ein anderes Eisen-Schwefel Cluster gebildet wird als unter anaeroben Bedingungen, zeigt die Empfindlichkeit des Kofaktors gegenüber molekularem Sauerstoff und demonstriert, dass eine sauerstoffinduzierte Konversion von [4Fe-4S] Clustern zu [2Fe-2S] Clustern existiert. Solch ein Prozess wurde zuvor bereits im FNR (Fumarat- und Nitrat-Reduktion) Protein beobachtet, allerdings ist der Mechanismus der Konversion nicht vollständig geklärt. In der Literatur wird sowohl eine sauerstoffinduzierte Oxidation des Schwefels (242) als auch eine Eisenoxidation (243) vorgeschlagen.

Um detaillierter untersuchen zu können, in welchem Ausmaß die Anwesenheit von molekularem Sauerstoff für die Form des gebildeten Clusters verantwortlich ist, wurde SpcD aerob exprimiert und anschließend anaerob aufgereinigt. Hiermit sollte herausgefunden werden, ob aerobes Wachstum zu einer veränderten Faltung des Clusters führt oder ob aerobe Aufreinigung den oxidativen Abbau des Clusters verursacht.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.46:** A: UV/vis Spektren von SpcD, erhalten nach aerobem Wachstum und anaerober Aufreinigung im oxidierten (blau) und NaDT-reduzierten (rot) Zustand. Das Spektrum des Proteins im oxidierten Zustand zeigt Ladungs-Transfer-Banden, die für binukleare [FeS] Cluster in ihrem 2+ Zustand charakteristisch sind, während im reduzierten Zustand kaum Absorptionen sichtbar sind (abgesehen vom Peak bei circa 314 nm auf Grund des im Überschuss zugegebenen NaDT).

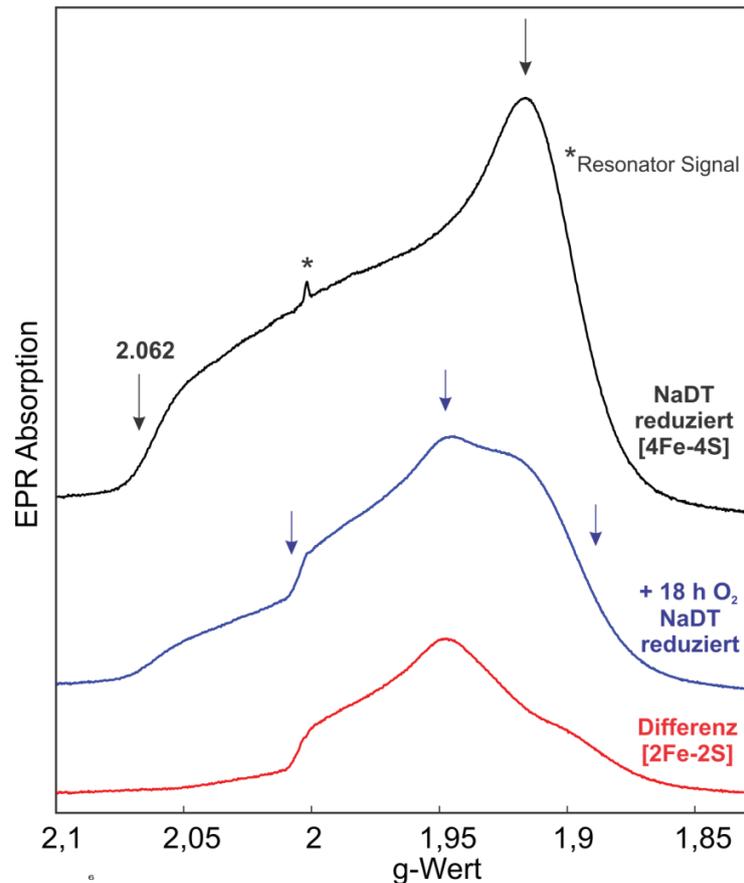
B: Das 2-Puls Echo-detektierte Absorptions-EPR-Spektrum des reduzierten SpcD Proteins, aerob exprimiert und anaerob aufgereinigt, weist g-Werte auf, welche für  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Cluster charakteristisch sind. Messparameter: 10 K, Mikrowellenfrequenz 33,98 GHz. Der kleine scharfe Peak bei  $g = 2$  ist ein Signal vom Resonator.

Das UV/vis Spektrum des aerob exprimierten und anaerob aufgereinigten Proteins SpcD zeigt im oxidierten Zustand drei Absorptionsbanden bei 416/454/559 nm, die eindeutig von S-zu-Fe Ladungstransferbanden von  $[2\text{Fe-2S}]$  Clustern stammen (227). Auch der Peak bei circa 340 nm ist sehr wahrscheinlich  $[2\text{Fe-2S}]$  Clustern zuzuordnen. Dieses Spektrum ist nahezu identisch mit dem des aerob exprimierten und aerob aufgereinigten Proteins SpcD (Abbildung 3.36C), was darauf schließen lässt, dass das gebildete  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  Cluster kein Produkt einer Degradierung eines assemblierten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  Clusters durch Sauerstoffzufuhr ist, sondern vielmehr dafür spricht, dass die Art des assemblierten Eisen-Schwefel Clusters von der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff während der Zellanzucht abhängt. Dieses  $[2\text{Fe-2S}]$  Cluster ist für mehrere Tage an Luftsauerstoff stabil, was mit UV/vis

Spektroskopie verifiziert wurde. Wird diese Probe mit NaDT reduziert, lassen sich so gut wie keine der charakteristischen optischen Merkmale des  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  Clusters mehr erkennen. Zusätzlich zeigt das EPR Spektrum des reduzierten Proteins ein axiales EPR Absorptionsspektrum (Abbildung 3.46, rechts) mit g-Werten, die nahezu identisch zu denen des anaerob exprimierten und anaerob aufgereinigten  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  SpcD Proteins sind.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass nur durch die Anwesenheit eines reduzierenden Systems, wie in diesem Fall Natriumdithionit, ohne die Beifügung von zusätzlichen Eisen- oder Sulfid-Quellen, ein gebildetes  $[2\text{Fe-2S}]$  Cluster zu einem  $[4\text{Fe-4S}]$  Cluster konvertiert werden kann. Dieser Prozess der Konversion erfolgt sehr schnell, bereits nach der minimal benötigten Zeit der Inkubation mit NaDT bei Raumtemperatur (circa 5 min) ist die Konversion beendet. EPR-Messungen bei höheren Temperaturen, wo  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$  Cluster am besten detektiert werden können und somit gut von  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Cluster Signalen unterschieden werden können, zeigten keine detektierbaren restlichen  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$  Cluster Signale. Dies beweist, dass die Konversion von  $[2\text{Fe-2S}]$  Clustern zu  $[4\text{Fe-4S}]$  Clustern bereits nach 5 min Inkubation mit dem Reduktionsmittel vollständig war. Diese Beobachtungen können erklärt werden, wenn man beachtet, dass sich die gebildeten  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  Cluster sehr nah an der Proteinoberfläche befinden (vgl. Abbildung 3.30) und somit in einer Lösung leicht mit Clustern anderer SpcD Proteine interagieren können, was in der Anwesenheit eines Reduktionsmittels zur Rekombination mit der Ausbildung eines  $[4\text{Fe-4S}]$  Clusters führen kann.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.47:** 2-Puls Echo-detektierte Absorptions-EPR-Spektren des aerob exprimierten und anaerob gereinigten Proteins SpcD, aufgenommen im Q-Band Bereich bei 10 K und einer Mikrowellenfrequenz von 33,98 GHz. Die schwarze Linie stellt das Spektrum des NaDT-reduzierten aerob exprimierten und anaerob aufgereinigten SpcD Proteins dar, welches Resonanzen zeigt, die typisch für  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Cluster sind. Das blaue Spektrum zeigt eine anaerob aufgereinigte Probe (nach aerobem Wachstum), die für 18 h dem Luftsauerstoff ausgesetzt wurde und anschließend mit NaDT reduziert wurde. In rot dargestellt ist das Differenzspektrum beider obiger Spektren, welches charakteristisch für ein  $[2\text{Fe-2S}]$  Cluster ist.

Um die Voraussetzungen für die Umwandlung von  $[2\text{Fe-2S}]$  Clustern zu  $[4\text{Fe-4S}]$  Clustern herausfinden zu können und so aufzuzeigen, in welchem Ausmaß die Exposition des Clusters an Luftsauerstoff kritisch für die Umwandlung zu einem  $[2\text{Fe-2S}]$  Cluster ist, wurde das aerob exprimierte und anaerob aufgereinigte Protein SpcD, welches ein  $[2\text{Fe-2S}]$  Cluster inkorporiert, für 18 h bei 5 °C dem Luftsauerstoff ausgesetzt und anschließend anaerob mit Natriumdithionit reduziert. Die Reduktion mit Natriumdithionit führte in diesem Fall nicht

vollständig zur Rekombination zu [4Fe-4S] Clustern (blaues Spektrum in Abbildung 3.47). Dies zeigt, dass durch die Exposition des [4Fe-4S]<sup>2+</sup> Clusters an Sauerstoff eine teilweise Oxidation zu [2Fe-2S]<sup>2+</sup> Clustern, welche irreversibel ist, hervorgerufen wird. Diese Oxidation verhindert die Konvertierung zu einem tetranuklearen Cluster ohne die zusätzliche Beifügung von Eisen oder Sulfid. Dies war beim aerob gewachsenen und anaerob aufgereinigten Protein SpcD, welches anschließend nicht dem Luftsauerstoff ausgesetzt wurde, der Fall. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den bei der aerob exprimierten und aerob gereinigten SpcD Probe erhaltenen Ergebnissen. Auch hier kann die Reduktion mit NaDT nicht die Ausbildung eines tetranuklearen Clusters hervorrufen, was für eine irreversible Oxidation durch eine Reaktion mit O<sub>2</sub> spricht. Eine Übersicht über die Art der gebildeten Cluster und deren Reaktionen mit O<sub>2</sub> und / oder NaDT ist in Abbildung 3.48 dargestellt.

## Ergebnisse

**Tabelle 3.6:** g-Werte der proximalen Eisen-Schwefel Kofaktoren der [NiFe] Hydrogenasen aus *A. aeolicus* und DvMF, welche entsprechend in den Protein PfsA und SpcD assembliert wurden. Die g-Werte wurden durch Simulationen aus X-Band und Q-Band Spektren erhalten. Der Fehler der g-Werte liegt bei  $\pm 0,003$ . In SpcD zeigen die [2Fe-2S] Cluster, die in aerob gewachsenen und aerob aufgereinigten Proben assembliert wurden, zwei unterschiedliche Isoformen der [2Fe-2S] Cluster in einem Verhältnis von etwa 1 zu 1,4.

	<b>Aufbereitung</b>	<b>FeS Typ</b>	<b><math>g_x</math></b>	<b><math>g_y</math></b>	<b><math>g_z</math></b>	<b><math>g_{av}</math></b>	<b><math>\lambda_{max}</math> [nm]</b>
PfsA	anaerob/anaerob (reduziert)	[2Fe-2S] <sup>1+</sup>	1,927	1,939	2,021	1,962	426/ 561
	aerob/aerob (reduziert)	[2Fe-2S] <sup>1+</sup>	1,927	1,939	2,021	1,962	426/ 561
SpcD	anaerob/anaerob (reduziert)	[4Fe-4S] <sup>1+</sup>	1,904	1,923	2,066	1,965	407
	aerob/aerob* (reduziert) *sichtbare g-Werte	[2Fe-2S]	1,890/ 1,915	1,946/ 1,954	2,004/ 2,006	1,947/ 1,958	413/ 449/ 558
	aerob/anaerob (oxidiert)	[2Fe-2S] <sup>2+</sup>	nd	nd	nd	nd	416/ 454/ 559
	aerob/anaerob (Dithionit reduziert)	[4Fe-4S] <sup>1+</sup>	1,905	1,926	2,065	1,965	-
	aerob/anaerob (O <sub>2</sub> exponiert/Dithionit reduziert)	[2Fe-2S] <sup>1+</sup> / [4Fe-4S] <sup>1+</sup>	1,886/ 1,895	1,945/ 1,916	2,003/ 2,062	1,945/ 1,956	

### 3.3.3 Diskussion

Die Sauerstoffsensitivität von Hydrogenasen ist ein kritischer Punkt in der Untersuchung dieser Enzyme zur Nutzung als alternative Energiequelle. Im Vergleich zu [FeFe] Hydrogenasen, welche meist durch die Exposition an Sauerstoff irreversibel deaktiviert werden (244,245), sind Eisen-Schwefel Cluster freie Hydrogenasen in der Regel sauerstofftolerant (246,247), weisen jedoch andere Probleme in Bezug auf ihre Forschungsanwendung auf, wie z.B. den Bedarf an zusätzlichen Substraten für die Katalyse (248). Der Vorteil von [NiFe] Hydrogenasen ist ihre meist nur reversible Inaktivierung durch Sauerstoff, sie sind je nach Protein unter bestimmten Bedingungen in wenigen Minuten bis

Stunden wieder aktivierbar (213). Einige [NiFe] Hydrogenasen können sogar unter einem gewissen Sauerstoffpartialdruck noch katalytisch aktiv bleiben (68,215). Das proximale [4Fe-3S] Cluster in sauerstofftoleranten membrangebundenen [NiFe] Hydrogenasen hat offensichtlich eine entscheidende Bedeutung im Schutz dieser Enzyme vor oxidativer Inaktivierung. Diese wichtige Rolle des proximalen Clusters für die Sauerstofftoleranz der Hydrogenasen ist bedingt durch die erweiterten Redox Eigenschaften, gefördert durch die strukturellen Änderungen der einzigartigen Koordination des Clusters (69,85,89,90,92). Detailliertere Studien des proximalen Clusters wurden in der Vergangenheit durch die Anwesenheit von anderen Metallokokofaktoren in den [NiFe] Hydrogenasen verhindert (d.h., das [NiFe] aktive Zentrum, mediale [3Fe-4S] Cluster und das distale [4Fe-4S] Cluster), da diese die elektronischen- und Redox-Eigenschaften des ungewöhnlichen proximalen Clusters durch eine Kopplung der Signale verdecken. Darüber hinaus war es wahrscheinlich, dass die ungewöhnliche Struktur des [4Fe-3S] Kofaktors zusätzliche Maturierungsfaktoren neben den existierenden Eisen-Schwefel Maturierungsproteinen für die Assemblierung benötigt. Aus diesem Grund gibt die hier durchgeführte Expression und Isolierung der verkürzten Proteine aus synthetisch erstellten Genen, deren Sequenzen aus den kleinen Untereinheiten der [NiFe] Hydrogenasen aus *A. aeolicus* und DvMF stammen und nur das Bindemotiv der proximalen Cluster beinhalten, einen neuartigen und detaillierteren Einblick in die Faltung und Assemblierung dieses Kofaktortyps. Zusätzlich können mit diesem Ansatz die thermodynamischen und elektronischen Eigenschaften der Cluster genauer untersucht werden. Es ist bekannt, dass die Überexpression von Eisen-Schwefel Cluster Proteinen auf die Ko-Expression einer verwandten Maturierungsmaschinerie oder die Verwendung von Mutanten, in denen der entsprechende Repressor deletiert wurde, angewiesen ist (113). Dies zeigte sich auch hier: Die Qualität der Überexpression der das proximale Cluster enthaltenden Proteine PfsA und SpcD war abhängig vom Isc Assemblierungsweg, welcher im *E. coli* Mutationsstamm  $\Delta$ iscR genutzt werden konnte. Dieser Ansatz wurde bereits zuvor erfolgreich im Fall der

## Ergebnisse

heterologen Expression der [FeFe] Hydrogenase HydA1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* und HydA aus *Clostridium pasteurianum* durchgeführt (91).

### Cluster Assemblierung

Abbildung 3.48 liefert einen Überblick über die untersuchten Proteine und den daraus resultierenden unterschiedlichen Ergebnissen der Cluster-Assemblierung. Im Folgenden werden die einzelnen Konstrukte diskutiert.

Protein	Wachstum/ Aufreinigung	Cluster Formation
SpcD	aerob/ anaerob	$[2Fe_2S]^{2+} \xrightarrow{+NaDT} [4Fe_4S]^{1+}$ <small>(vollständige Konversion)</small> $\downarrow +O_2 + NaDT$ $[2Fe_2S]^{1+} / [4Fe_4S]^{1+}$
SpcD	anaerob/ anaerob	$[4Fe_4S]^{2+} \xrightarrow{+NaDT} [4Fe_4S]^{1+}$
SpcD	aerob/ aerob	$[2Fe_2S]^{2+} \xrightarrow{+NaDT} [2Fe_2S]^{1+}$
PfsA	jede Kombination	$[2Fe_2S]^{2+} \xrightarrow{+NaDT} [2Fe_2S]^{1+}$

**Abbildung 3.48:** Überblick der unterschiedlichen exprimierten Proteine und deren Abhängigkeit auf die Art des assemblierten Clusters von der Anwesenheit von Sauerstoff und dem reduzierenden Reagenz Natriumdithionit.

Das aus der Sequenz von *DvMF* stammende Protein SpcD, welches ein Bindemotiv für ein klassisches, durch vier Cysteine koordiniertes [4Fe-4S] Cluster aufweist, wurde zunächst als Kontrolle genutzt, um die Möglichkeit der verkürzten Proteine zum Einbau eines [4Fe-4S] Clusters zu überprüfen. In der Tat wurde nach einer anaeroben Proteinexpression und anaerober Aufreinigung von SpcD ein [4Fe-4S] Cluster erhalten. Dies beweist, dass trotz der großen

Peptidlänge, die benötigt wird, um das proximale Cluster vollständig einzubeziehen, ein Cluster erfolgreich assembliert werden kann. Die Abwesenheit jeglicher „high-spin“ Signale im Niedrigfeldbereich deutet darauf hin, dass das Cluster ausschließlich durch Cysteine ligandiert wird (249). Die Faltung und Assemblierung von [FeS] Clustern durch einen natürlichen Wirt (in diesem Fall *E. coli*) ist demnach nachweislich eine nutzbare Alternative im Vergleich zur Eisen-Schwefel Cluster Rekonstitution, wie sie in Modellsystemen wie Maquettes (250) genutzt wurde und liefert somit Einblicke in die Assemblierung der in Hydrogenasen vorkommenden Elektronentransfer-Kofaktoren.

Die Assemblierung des proximalen Eisen-Schwefel Clusters im Fall des *A. aeolicus* Proteins erwies sich als komplexer Fall: Durch die große Anzahl der Aminosäuren, die das proximale Motiv umspannen, die Abwesenheit hydrophober Interaktionen innerhalb der kleinen Untereinheit, aber auch zwischen kleiner und großer Untereinheit, die Anwesenheit des Tat-Motivs und die möglicherweise entscheidende Notwendigkeit Spezies-spezifischer Maturierungskomponenten ergaben sich Schwierigkeiten, die einer „einfachen“ Darstellung entgegen standen. In jedem erstellten Konstrukt konnte nur ein [2Fe-2S] Cluster im Protein gebildet werden. Die Einflussnahme von molekularem Sauerstoff auf die Art des gebildeten Clusters, die in SpcD zu einer Änderung der Koordination führte, wurde ebenfalls untersucht, es wurde aber in allen Fällen ein [2Fe-2S] Cluster assembliert. Es erscheint unwahrscheinlich, dass nicht genügend Liganden zur Koordination eines [4Fe-4S] Clusters vorhanden sind, vor allem, wenn man bedenkt, dass die Bildung von tetranuklearen Clustern in synthetischen Peptiden thermodynamisch favorisiert ist (251). Ein möglicher Grund für die Assemblierung eines [2Fe-2S] Clusters ist die Bildung von Disulfiden, welche die Bindung von Eisen zur Formation des Clusters verhindern. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der Einbau dieses neuartigen Kofaktors von zusätzlichen Proteinen abhängt. Es gibt zwar keinen Beweis für die Existenz solcher akzessorischen Hilfsproteine in sauerstofftoleranten Hydrogenasen,

## Ergebnisse

allerdings wurde dem Thioredoxin-ähnlichen Protein aus *R. eutropha*, HoxR, eine solche Funktion zugeschrieben (252). Bei der Maturierung von HoxK, der kleinen Untereinheit der membrangebundenen Hydrogenase aus *R. eutropha*, scheint HoxR an der Assemblierung des proximalen [4Fe-3S] Clusters beteiligt zu sein, zumindest wurde dies bei hohen Sauerstoffkonzentrationen gefunden. Andererseits weist die Abwesenheit des *hoxR* Gens bei einigen Organismen, die das ungewöhnliche proximale [4Fe-3S] Cluster in ihren Hydrogenasen tragen (161), darauf hin, dass die *isc*- oder *suf* (sulfur)-Maschinerien der Zellen allein für die Maturierung der Cluster ausreicht. In *E. coli* ist die Maturierung der Hydrogenasen 1 und 2 nicht von der *suf*-Maschinerie abhängig: Eine Deletion von SufA führte trotzdem zur Bildung aktiver Hydrogenasen, während Mutanten, denen die *isc*-Maschinerie fehlte, hingegen die Möglichkeit verloren, aktive Hydrogenasen zu produzieren (253), was die Bedeutung dieser Maschinerie zur Eisen-Schwefel Cluster Assemblierung verdeutlicht. Die Anwesenheit bestimmter Gene ausschließlich in sauerstofftoleranten membrangebundenen Hydrogenasen, wie *hoxOQ*, welche in fast allen Hydrogenasen nachzuweisen sind, die zusätzliche Cysteine am proximalen Cluster tragen, spricht hingegen für eine spezielle Anforderung an die Maturierung dieser ungewöhnlichen Cluster (254).

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen die Bedeutung der inter- und intramolekularen Interaktion für die Assemblierung der ungewöhnlichen proximalen [FeS] Cluster aus sauerstofftoleranten Hydrogenasen. Sie weisen aber auch auf die Notwendigkeit zusätzlicher Maturierungsfaktoren hin, wie sie bei der Hydrogenase aus *Rhizobium leguminosarum* und ihren potentiellen Maturierungsproteinen HupGIJ vorgeschlagen wurde (255). Die Maturierungsmaschinerie von *E. coli* ist demnach in der Lage, ein Eisen-Schwefel Cluster in seinen initialen Bildungsschritten zu unterstützen, es sind aber vermutlich Spezies-spezifische Chaperone für die vollständige Maturierung zu einem [4Fe-4S] Cluster dieses besonderen Typs notwendig.

Die über optische Spektroskopie ermittelten Redoxpotentiale der beiden anaerob exprimierten und anaerob aufgereinigten Cluster von  $-180$  mV und  $-288$  mV (entsprechend PfsA und SpcD) bei pH 7,0 und Raumtemperatur entsprechen den Erwartungen, da sauerstofftolerante Hydrogenasen stets ein positiveres Redoxpotential aufweisen als sauerstoffsensitive Hydrogenasen. Im Organismus *A. aeolicus* könnte dieses positive Potential des proximalen Clusters mit für die Toleranz der Hydrogenase gegenüber Sauerstoff verantwortlich sein. Für einen von Goris (68,256) postulierten Mechanismus ist das positive Potential der [FeS] Cluster unabdingbar für einen reversen Elektronentransport vom Chinonpool zum aktiven Zentrum, um eine schnelle Elektronenbereitstellung im Falle eines deaktivierenden Sauerstoff-Brückenliganden zu gewährleisten, so dass Sauerstoff durch Reduktion schnell wieder entfernt werden kann.

#### Einfluss des Tat-Motivs

Das Tat-Motiv, welches sich in beiden untersuchten Hydrogenasen am N-Terminus der Enzyme befindet, trägt offensichtlich entscheidend zur Stabilität der synthetisierten Proteine bei, da aus jedem Konstrukt, in dem das Tat-Motiv nicht mit kloniert wurde, nur unlösliche Proteine erhalten wurden, welche als falsch gefaltete Proteine von der Wirtszelle *E. coli* in Einschlusskörper verpackt wurden. Da das pET-51b::pfsA Konstrukt, welches einen N-terminalen Strep-Tag, gefolgt vom Tat-Motiv aufweist, nicht aufgereinigt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die Transportmaschinerie von *E. coli* das Tat-Motiv des exprimierten Proteins PfsA erkennt und somit das Enzym ins Periplasma transportiert. Hierbei würde das Tat-Motiv samt des Affinitäts-Tags abgeschnitten werden, so dass das Protein nicht mehr über die Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Da aber das gleiche Konstrukt, wenn es gemeinsam mit dem Chaperon-Plasmid pGro7 exprimiert wurde, als lösliches Protein vorlag und aufgereinigt werden konnte, lässt sich folgern, dass *E. coli* das Tat-Motiv nicht erkennt und PfsA demnach nicht ins „aerobe“ Periplasma transportiert wird. Vielmehr könnten im Fall der Expression ohne Chaperone die Unterschiede in elektrostatischer und lokaler Umgebung in PfsA dazu führen, dass der N-Terminus aufgrund von

## Ergebnisse

fehlerhafter Faltung relativ tief in der Struktur verankert ist und somit der Tag nicht für eine Aufreinigung zur Verfügung steht. Die Nähe des Tat-Motivs zu den ersten Cysteinresten des proximalen Clusters könnte darüber hinaus auf die Notwendigkeit der Signalsequenz zur Stabilisierung des Kofaktors hindeuten (siehe Abbildung 3.30).

Eine Zusammenfassung der verschiedenen Klonierungs-Strategien und ihrer Auswirkung auf die erfolgreiche Expression und Aufreinigung ist im Folgenden dargestellt:

pET-15b::*pfsA* weist einen N-terminalen His-Tag vor dem Tat-Motiv auf. Mit diesem Konstrukt konnte zwar lösliches Protein exprimiert werden, das jedoch in nur sehr geringen Mengen und stets unsauber aufgereinigt werden konnte.

pET51b::*pfsA* weist einen N-terminalen Strep-Tag vor dem Tat-Motiv auf. Dieses Protein war nach der Expression zwar löslich, konnte jedoch nicht an die Strep-Tactin Säule gebunden werden. Eine Charakterisierung konnte mittels teilweiser Aufreinigung über Größenausschluss-Zentrifugalfilter erfolgen.

pET-51b::*spcD* weist einen N-terminalen Strep-Tag vor dem Tat-Motiv auf. SpcD konnte auf diese Weise erfolgreich als lösliches Protein überexprimiert werden und ließ sich über die Strep-Tactin Säule aufreinigen.

pET-21a::*pfsA*, pET-21a::*spcD*, pET-21a::*aq-mut*, pET-21a::*aq-SSU*, pET-21a::*dvMF-SSU* tragen alle einen C-terminalen Strep-Tag und enthalten kein Tat-Motiv. Alle aus dem Vektor pET-21a(+) exprimierten Proteine wurden als unlösliche Proteine in Einschlusskörper verpackt.

pGro7/pET-51b::*pfsA* führte durch die Hilfe der Chaperone zu löslichem PfsA, welches mittels des Strep-Tags aufgereinigt werden konnte.

### EPR-Charakterisierung von PfsA

PfsA zeigte in jedem Fall den Einbau eines [2Fe-2S] Clusters mit den spektroskopischen Eigenschaften eines ausschließlich durch Cysteine ligandierten Clusters. Die optischen Eigenschaften zeigten aber auch, dass hier kein klassisches [2Fe-2S] Cluster vorliegt, das Spektrum wird durch eine einzelne intensive Ladungstransferbande dominiert. Auf Basis der gemessenen EPR Spektren kann PfsA als ein Adrenodoxin/Putidaredoxin- artiges Cluster kategorisiert werden, da ein axialer g-Tensor vorliegt (238). Die  $^1\text{H}$  ENDOR Messungen zeigten Werte für Proton-Hyperfein-Kopplungen, die für bekannte [2Fe-2S] Ferredoxine charakteristisch sind (238).

### Cluster Konversion unter reduzierenden Bedingungen

Beim Protein SpcD führten verschiedene Wachstumsbedingungen zu unterschiedlich geformten Clustern. Anaerobes Wachstum und anaerobe Aufreinigung resultierten in der Bildung eines [4Fe-4S] Clusters, während aerobes Wachstum zur Ausbildung eines [2Fe-2S] Clusters führte. Ließ man die Zellen aerob wachsen, führte aber die Aufreinigung anaerob durch, so bildete sich ein [2Fe-2S] Cluster. Dieses konnte allein durch die Reduktion mit NaDT zur Bildung eines [4Fe-4S] Clusters konvertiert werden. Offensichtlich wurden in diesem Prozess zwei dinukleare Cluster reduktiv gekoppelt, ohne dass die Zugabe von Eisen oder Schwefel notwendig war. Diese Cluster-Konversion während der Reduktion mit Dithionit wurde auch bei dem menschlichen Protein MOCS1A beobachtet (257), welches heterolog in *E. coli* exprimiert wurde. Der Verlust der Absorption im UV/vis Spektrum sowie die neu hinzugekommenen g-Werte im EPR Spektrum, welche zu [4Fe-4S] $^{1+}$  Clustern ( $S = 1/2$ ) passen, demonstrieren diese Konversion von [2Fe-2S] Clustern zu [4Fe-4S] Clustern durch Reduktion. Johnson *et al.*, die diese Art der Cluster Konversion auch bei der Biotinsynthese aus *E. coli* gefunden haben (258), schlugen vor, dass diese Kopplung durch die Dimerisierung zweier [2Fe-2S] $^{2+}$  Cluster an der Oberfläche der Proteinuntereinheit zustande kommt. Dies könnte auch bei den Proteinen der Fall sein, die das proximale [FeS] Cluster enthalten, da sich auch hier die

## Ergebnisse

Kofaktoren sehr nahe an der Proteinoberfläche befinden (Abbildung 3.30). Bei der Biotinsynthese aus *E. coli* befindet sich in jeder Untereinheit des Homodimers ein  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  Cluster ( $S = 0$ ), wenn die Probe aerob aufgereinigt wird. Anaerobe Reduktion mit Dithionit resultiert dann in der Bildung eines  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  Clusters. Dieser Prozess wird von Jarrett als „schnelle Eisen-Dissoziation vom Protein, gefolgt von einer die Reaktionsgeschwindigkeit limitierenden Reassoziaton“ beschrieben (259). Auch im Fall des IscU Proteins aus *Azotobacter vinelandii* existiert das Protein als ein Homodimer, welches durch Reduktion zu einem  $[4\text{Fe-4S}]$  Cluster konvertiert. Es wurde vorgeschlagen, dass die reduktive Kopplung von zwei  $[2\text{Fe-2S}]$  Clustern ein genereller Mechanismus für den finalen Schritt in der Biosynthese von  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  Clustern in IscU ist (260).

Diese Beispiele legen nahe, dass in SpcD bei der Bildung eines  $[4\text{Fe-4S}]$  Clusters, wenn es an der Proteinoberfläche exponiert ist, eine Kopplung zweier  $[2\text{Fe-2S}]$  Cluster durchlaufen wird. Das Unvermögen der in PfsA geformten  $[2\text{Fe-2S}]$  Cluster, durch Reduktion mit Natriumdithionit zu einem  $[4\text{Fe-4S}]$  Cluster kombiniert zu werden, weist auf eine unterschiedliche lokale Umgebung der Cluster im Vergleich zu SpcD hin, weist aber auch auf eine abweichende Assemblierung hin, welche die Bildung eines  $[4\text{Fe-4S}]$  Clusters sogar unter strikt anaeroben Bedingungen verhindert.

Diese Arbeit liefert außerdem Hinweise darauf, dass inter- und intramolekulare Interaktionen für die Faltung von komplexeren Eisen-Schwefel Zentren entscheidend sind und dass die Umgebung eines solchen Clusters während der Assemblierung ausschlaggebend für die Reaktion des Clusters mit molekularem Sauerstoff ist. Trotz der Tatsache, dass diese synthetisch hergestellten Konstrukte nur kleinere Kopien der kleinen Untereinheit der  $[\text{NiFe}]$  Hydrogenasen sind, konnten sie erfolgreich Eisen-Schwefel Kofaktoren assemblieren. Dies zeigt die thermodynamische Variabilität von tetranuklearen Clustern, welche vor allem durch die reduktive Konversion von dinuklearen Clustern zu tetranuklearen

Clustern ohne zusätzliche Zugabe von Eisen oder Schwefel verdeutlicht wird. Die Tatsache, dass bei PfsA kein tetranukleares Cluster assembliert werden konnte, deutet darauf hin, dass die überzählige Cysteinkoordination die Bindung selbst eines klassischen [4Fe-4S] Clusters verhindert. Dies liegt wahrscheinlich an elektrostatischen Interaktionen, welche zu Unterschieden in der Faltung der Cluster führen könnten. Das spezielle [4Fe-3S] Cluster der Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus* könnte aus diesem Grund in PfsA auch nicht gebildet werden, welches andererseits auch noch von der Anwesenheit zusätzlicher Hilfsproteine abhängig sein könnte, die die Clusterbildung und Stabilisierung unterstützen. Zur Bestätigung dieser Vermutungen sollten weitere Experimente folgen, die vor allem die Identifizierung der koordinierenden Liganden des Clusters aus PfsA und die mögliche Beteiligung zusätzlicher Proteine an der Assemblierung dieses neuartigen, aber nicht so seltenen Clusters (161) zum Ziel haben sollten.

## 4 Zusammenfassung

[NiFe] Hydrogenasen sind mikrobielle Enzyme, welche sowohl die Generation von molekularem Wasserstoff durch  $H^+$ -Reduktion als auch die Oxidation von  $H_2$  zu Protonen und Elektronen katalysieren. Somit spielen sie eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung der Zelle. Forschungen zur Aufklärung dieser Katalyse-Mechanismen bezwecken die Verwendung von Hydrogenasen als biotechnologischen Erzeuger von Wasserstoff, welcher als alternativer Energieträger dienen könnte. [NiFe] Hydrogenasen sind heterodimere Enzyme, bestehend aus einer das aktive Zentrum enthaltenden großen Untereinheit und einer kleinen Untereinheit, welche typischerweise drei [FeS] Cluster aufweist. Eines der größten Probleme in der Nutzung der Hydrogenasen im Bereich der „grünen Energie“ ist ihre Sauerstoffempfindlichkeit, zumindest bei vielen ihrer Vertreter.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Teilbereiche verfolgt:

Es wurde ein Screening nach neuartigen Hydrogenasen aus einer Umweltprobe durchgeführt, die aus einem hydrothermalen Schlot im mittellatlantischen Rücken isoliert wurde. Hierbei wurden mittels Microarray-Technik zwei neue Hydrogenasen entdeckt und aus einer Metagenombank heraus subkloniert.

Des Weiteren wurde die [NiFeSe] Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F isoliert und biochemisch sowie spektroskopisch untersucht. Diese Hydrogenase ist von besonderer Bedeutung, da sie verglichen mit anderen [NiFe] Hydrogenasen als sauerstofftoleranter beschrieben wurde und zudem eine hohe Umsatzrate aufweist.

Im Hauptteil der Arbeit wurde die sauerstofftolerante [NiFe] Hydrogenase 1 aus dem hyperthermophilen Organismus *Aquifex aeolicus* bearbeitet. Die Sauerstofftoleranz dieses Enzyms wurde der Anwesenheit eines neuartigen Kofaktors zugeschrieben, welcher das zum aktiven Zentrum proximale [FeS] Cluster in der kleinen Untereinheit ersetzt. In den meisten Hydrogenasen findet sich hier ein [4Fe-4S] Cluster, während in *A. aeolicus* und –nachgewiesen- auch

in anderen sauerstofftoleranten Hydrogenasen an dieser Stelle ein [4Fe-3S] Cluster mit zwei zusätzlichen Cysteinliganden vorhanden ist. Um diesen Cluster näher zu untersuchen, wurde der Bereich der kleinen Untereinheit, der das proximale Cluster trägt, als diskretes Protein heterolog in *E. coli* überexprimiert und affinitäts-chromatographisch isoliert. Zum Vergleich der Eigenschaften dieses ungewöhnlichen Clusters wurden alle Versuche auch mit einem Standardcluster einer sauerstoffempfindlichen Hydrogenase ([NiFe] Hydrogenase aus *D.vulgaris* Miyazaki F) durchgeführt. Unter anaeroben Bedingungen wurde der [4Fe-4S] Cluster aus DvMF erfolgreich assembliert, während aerobes Wachstum zur Ausbildung eines [2Fe-2S] Clusters führte. Wurden diese [2Fe-2S] Cluster nicht Sauerstoff ausgesetzt, konnten sie durch die Zugabe von Natriumdithionit zu [4Fe-4S] Clustern umgewandelt werden. Im Falle von *A. aeolicus* konnte auch mit verschiedenartig modifizierten Proteinen stets nur ein [2Fe-2S] Cluster gebildet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Maturierungsmaschinerie von *E. coli* zwar den Großteil der Clustersynthese übernehmen kann, dass jedoch für den letzten Schritt Spezies-spezifische Chaperone benötigt werden. Die Ergebnisse der spektroskopischen Analysen wie z.B. EPR Spektroskopie erlaubten Rückschlüsse auf die Faltung und Assemblierung der Cluster.

## 5 Abstract

[NiFe] hydrogenases are microbial enzymes, catalyzing either the generation of molecular hydrogen via reduction of  $H^+$  or the oxidation of hydrogen with the release of protons and electrons. Therefore they play an important role in the energy generation of the cell. Research on the elucidation of these catalytic mechanisms aims at the use of hydrogenases as biotechnological producers of hydrogen, which could serve as an alternative energy carrier. [NiFe] hydrogenases are heterodimeric enzymes, consisting of a large subunit carrying the active center, and a small subunit, which typically harbors three [FeS] clusters. One of the biggest problems in employment of hydrogenases for application in “green energy” is the oxygen sensitivity of most of their representatives.

The following topics were addressed in this dissertation:

A screening for novel hydrogenases from an environmental sample, isolated from a hydrothermal “black smoker” in the mid-atlantic ridge, was carried out. With the use of a microarray technology, two novel hydrogenases were discovered and subcloned out of the metagenome bank.

Furthermore, the [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F was isolated and biochemically as well as spectroscopically analyzed. This hydrogenase is of particular importance, as it was described as oxygen tolerant compared with other [NiFe] hydrogenases and in addition, a high turnover rate was determined for this enzyme.

In the main part of this thesis, the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase 1 from the hyperthermophilic organism *Aquifex aeolicus* was investigated. The oxygen tolerance of this enzyme was attributed to the presence of a novel cofactor, which replaces the [FeS] cluster in the small subunit, proximal to the active site. In most hydrogenases a [4Fe-4S] clusters is found at this position, while in *A. aeolicus* and also in other oxygen tolerant hydrogenases a [4Fe-3S] cluster with two additional cysteines occupies this site. To investigate this cluster, that protein

part in the small subunit, which bears the proximal cluster, was overexpressed heterologously in *E. coli* as a discrete protein and isolated via affinity chromatography. All experiments were carried out also with a standard cluster of an oxygen sensitive hydrogenase ([NiFe] hydrogenase from *D. vulgaris* Miyazaki F) to allow for a comparison of the characteristics of this unusual cluster. Under anaerobic conditions, the DvMF [4Fe-4S] cluster was successfully assembled, while aerobic growth resulted in the formation of a [2Fe-2S] cluster. If these [2Fe-2S] clusters were not exposed to oxygen, they could be converted to [4Fe-4S] clusters by the addition of sodium dithionite. In the case of *Aquifex aeolicus*, only a [2Fe-2S] cluster could be formed, even if the expressed proteins were modified in a wide range. This suggests that the maturation machinery of *E. coli* can take over most of the maturation of the *A. aeolicus* [FeS] cluster except for the final step, for which apparently, species-specific chaperones are required. The results of spectroscopic analyses such as EPR spectroscopy allowed inferences on the folding and assembly of the clusters.

## 6 Ausblick

Um in Zukunft aus Hydrogenasen einen biotechnologischen Nutzen ziehen zu können, ist es essentiell, die molekularen Eigenschaften und der Mechanismus der Enzymaktivität im Detail zu verstehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern bezüglich dieser Grundlagen wichtige Informationen, so lassen zum Beispiel die spektroskopischen Eigenschaften der untersuchten [NiFeSe] Hydrogenase aus *DvMF* auf die veränderten Redox-Eigenschaften im Vergleich zu [NiFe] Hydrogenasen schließen, da die selenhaltige Hydrogenase keine inaktiven Ni-A und Ni-B Zustände aufweist. Dieses Resultat erklärt die Tatsache, dass das hier analysierte Enzym nach einer Exposition an Sauerstoff schneller wieder aktiv wird und entsprechend sauerstofftoleranter ist.

Eine weiterführende Charakterisierung ist nötig, um die besagte Hydrogenase detailliert zu verstehen und die erhaltenen Informationen für eine Anwendung in der regenerativen Energieerzeugung nutzen zu können. Hierfür muss zunächst das Protokoll für die Aufreinigung des Ziel-Proteins so verändert werden, dass eine hochangereicherte oder reine Hydrogenase erhalten wird. Für viele Analysemethoden wie Kristallisation ist eine saubere Probe unerlässlich. Dafür könnte die Anwendung von vier oder mehr Säulen von Nutzen sein. Auch eine Aufreinigung in anaerober Atmosphäre könnte nützlich sein, da die Hydrogenase auf diesem Weg bis zur Untersuchung nie dem Luftsauerstoff ausgesetzt sein würde, wodurch das Protein möglicherweise in einer stabileren Konformation erzeugt werden könnte. Es ist hierbei aber zu berücksichtigen, dass die Ausbeute des Zielproteins bei der Zellanzucht von *DvMF* relativ gering ist und somit nur bedingt Untersuchungen an diesem Enzym vorgenommen werden können, so dass als endgültiges Ziel eine homologe oder heterologe (Über-) Expression anzustreben wäre.

Auch die Arbeiten an den beiden in dieser Arbeit detektierten neuartigen Hydrogenasen aus dem Metagenom der Umweltprobe vom „black smoker“

setzen zur Charakterisierung beider Enzyme deren Aufreinigung voraus. Zunächst muss hierfür jedoch die heterologe Expression im thermophilen Wirt *Thermus thermophilus* HB27 erfolgen, so dass die Proteine gezielt isoliert werden können. Eine spätere biochemische und spektroskopische Charakterisierung beider [NiFe] Hydrogenasen könnte wichtige Informationen für das Verständnis von Enzymen liefern, die an extreme Standorte angepasst sind und somit vermutlich molekulare und mechanistische Unterschiede (und eventuell Vorteile) gegenüber Enzymen aus mesophilen Mikroorganismen aufweisen.

Bei der Untersuchung des neuartigen [4Fe-3S] Clusters aus *A. aeolicus* wurde festgestellt, dass nach heterologer Expression ausschließlich eine Assemblierung zu einem [2Fe-2S] Cluster erfolgte. Da im Fall des Standardclusters (aus DvMF) erfolgreich ein [4Fe-4S] Cluster geformt werden konnte, ist davon auszugehen, dass eine unterschiedliche lokale Umgebung des Clusters eine vollständige Assemblierung, selbst unter vollständigem Sauerstoffausschluss, verhindert. Dieses Phänomen sollte in weiterführenden Experimenten an diesem Cluster näher betrachtet werden. So sollte untersucht werden, welche der das Cluster im nativen Organismus ligandierenden Cysteine an der Bildung des in dieser Arbeit erzeugten Clusters beteiligt sind. Auch der Einfluss von Hilfsproteinen, die im nativen Organismus für eine korrekte Faltung sorgen, muss analysiert werden. Mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit und weiterführenden Charakterisierungen der Sauerstofftoleranz des proximalen Clusters, könnte die Hydrogenase 1 aus *A. aeolicus* einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis des Mechanismus dieser Enzymklasse liefern.

## 7 Literatur

1. Huber, M. and Knutti, R. (2012) Anthropogenic and natural warming inferred from changes in Earth's energy balance ***Nature Geoscience* 5**, 31-36
2. Allen, M. R., Frame, D. J., Huntingford, C., Jones, C. D., Lowe, J. A., Meinshausen, M., and Meinshausen, N. (2009) Warming caused by cumulative carbon emissions towards the trillionth tonne ***Nature* 458**, 1163-1166
3. Matthews, H. D., Gillett, N. P., Stott, P. A., and Zickfeld, K. (2009) The proportionality of global warming to cumulative carbon emissions ***Nature* 459**, 829-833
4. Solomon, S., Daniel, J. S., Sanford, T. J., Murphy, D. M., Plattner, G. K., Knutti, R., and Friedlingstein, P. (2010) Persistence of climate changes due to a range of greenhouse gases ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107**, 18354-18359
5. Knight, J. and Harrison, S. (2013) The impacts of climate change on terrestrial Earth surface systems ***Nature Climate Change* 3**, 24-29
6. Knight, J. and Harrison, S. (2012) Evaluating the Impacts of Global Warming on Geomorphological Systems ***Ambio* 41**, 206-210
7. Matthews, H. D. and Caldeira, K. (2008) Stabilizing climate requires near-zero emissions ***Geophysical Research Letters* 35**, L04705, 1-5
8. Geissler, G., Koppel, J., and Gunther, P. (2013) Wind energy and environmental assessments - A hard look at two forerunners' approaches: Germany and the United States ***Renewable Energy* 51**, 71-78
9. Hazami, M., Kooli, S., Lazaar, M., Farhat, A., and Belghith, A. (2005) Performance of a solar storage collector ***Desalination* 183**, 167-172
10. Cammack, R., Frey, M., and Robson R. (2001) ***Hydrogen as a Fuel: Learning from Nature***, Taylor & Francis, London, UK
11. Rifkin, J. (2002) ***The hydrogen economy***, Tarcher/Putnam, New York, USA
12. Service, R. F. (2004) The hydrogen backlash ***Science* 305**, 958-961
13. Turner, J. A. (2004) Sustainable hydrogen production ***Science* 305**, 972-974
14. Coontz, R. and Hanson, B. (2004) Not so simple ***Science* 305**, 957
15. Friedrich, B., Fritsch, J., and Lenz, O. (2011) Oxygen-tolerant hydrogenases in hydrogen-based technologies ***Current Opinion in Biotechnology* 22**, 358-364
16. Renger, G. (2012) Mechanism of light induced water splitting in Photosystem II of oxygen evolving photosynthetic organisms ***Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1817**, 1164-1176
17. Cracknell, J. A., Wait, A. F., Lenz, O., Friedrich, B., and Armstrong, F. A. (2009) A kinetic and thermodynamic understanding of O<sub>2</sub> tolerance in

- [NiFe]-hydrogenases *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20681-20686
18. Kim, D. H. and Kim, M. S. (2011) Hydrogenases for biological hydrogen production *Bioresource Technology* **102**, 8423-8431
  19. Kamali, S., Wang, H. X., Mitra, D., Ogata, H., Lubitz, W., Manor, B. C., Rauchfuss, T. B., Byrne, D., Bonnefoy, V., Jenney, F. E., Adams, M. W. W., Yoda, Y., Alp, E., Zhao, J. Y., and Cramer, S. P. (2013) Observation of the Fe-CN and Fe-CO Vibrations in the Active Site of [NiFe] Hydrogenase by Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy *Angewandte Chemie-International Edition* **52**, 724-728
  20. Ogata, H., Lubitz, W., and Higuchi, Y. (2009) [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism *Dalton Transactions* 7577-7587
  21. Lubitz, W., Reijerse, E. J., and Messinger, J. (2008) Solar water-splitting into H-2 and O-2: design principles of photosystem II and hydrogenases *Energy & Environmental Science* **1**, 15-31
  22. Stephenson, M. and Stickland, L. H. (1931) Hydrogenase: A bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of the enzyme *Biochemical Journal* **25**, 205-214
  23. <http://www.iubmb.org/>. (2013)
  24. Vignais, P. M. and Colbeau, A. (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases *Current Issues in Molecular Biology* **6**, 159-188
  25. Lubitz, W., van Gestel, M., and Gaertner, W. (2007) *Nickel iron hydrogenases*. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
  26. Volbeda, A. and Fontecilla-Camps, J. C. (2005) Structure-function relationships of nickel-iron sites in hydrogenase and a comparison with the active sites of other nickel-iron enzymes *Coordination Chemistry Reviews* **249**, 1609-1619
  27. Liu, X. M., Ibrahim, S. K., Tard, C., and Pickett, C. J. (2005) Iron-only hydrogenase: Synthetic, structural and reactivity studies of model compounds *Coordination Chemistry Reviews* **249**, 1641-1652
  28. Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2008) The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site *Science* **321**, 572-575
  29. Zirngibl, C., Vandongen, W., Schworer, B., Vonbunau, R., Richter, M., Klein, A., and Thauer, R. K. (1992) H-2-Forming Methylene-tetrahydromethanopterin Dehydrogenase, A Novel Type of Hydrogenase Without Iron-Sulfur Clusters in Methanogenic Archaea *European Journal of Biochemistry* **208**, 511-520
  30. Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Clark, J. R., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., and Armstrong, F. A. (2006) Electricity from low-level H-2 in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase *Chemical Communications* 5033-5035

## Literatur

31. Berkessel, A. and Thauer, R. K. (1995) On the Mechanism of Catalysis by A Metal-Free Hydrogenase from Methanogenic Archaea - Enzymatic Transformation of H<sub>2</sub> Without A Metal and Its Analogy to the Chemistry of Alkanes in Superacidic Solution **Angewandte Chemie-International Edition in English** **34**, 2247-2250
32. Lyon, E. J., Shima, S., Boecher, R., Thauer, R. K., Grevels, F. W., Bill, E., Roseboom, W., and Albracht, S. P. J. (2004) Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H<sub>2</sub>-Forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy **Journal of the American Chemical Society** **126**, 14239-14248
33. Korbas, M., Vogt, S., Meyer-Klaucke, W., Bill, E., Lyon, E. J., Thauer, R. K., and Shima, S. (2006) The iron-sulfur cluster-free hydrogenase (Hmd) is a metalloenzyme with a novel iron binding motif **Journal of Biological Chemistry** **281**, 30804-30813
34. Shima, S., Lyon, E. J., Sordel-Klippert, M. S., Kauss, M., Kahnt, J., Thauer, R. K., Steinbach, K., Xie, X. L., Verdier, L., and Griesinger, C. (2004) The cofactor of the iron-sulfur cluster free hydrogenase Hmd: Structure of the light-inactivation product **Angewandte Chemie-International Edition** **43**, 2547-2551
35. Thauer, R. K., Klein, A. R., and Hartmann, G. C. (1996) Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst **Chemical Reviews** **96**, 3031-3042
36. Thauer, R. K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson **Microbiology-Uk** **144**, 2377-2406
37. Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center **Structure with Folding & Design** **7**, 13-23
38. Nicolet, Y., Lemon, B. J., Fontecilla-Camps, J. C., and Peters, J. W. (2000) A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases **Trends in Biochemical Sciences** **25**, 138-143
39. Peters, J. W. (1999) Structure and mechanism of iron-only hydrogenases **Current Opinion in Structural Biology** **9**, 670-676
40. Vignais, P. M. and Billoud, B. (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview **Chemical Reviews** **107**, 4206-4272
41. Higuchi, Y., Yagi, T., and Yasuoka, N. (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis **Structure** **5**, 1671-1680
42. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1995) Crystal-Structure of the Nickel-Iron Hydrogenase from Desulfovibrio-Gigas **Nature** **373**, 580-587
43. Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., deLacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1996) Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon

- Fe ligands *Journal of the American Chemical Society* **118**, 12989-12996
44. Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P. J., and Bagley, K. A. (1997) Biological activation of hydrogen *Nature* **385**, 126
  45. Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A., and Albracht, S. P. J. (1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases - NiFe(CN)<sub>2</sub>CO, biology's way to activate H<sub>2</sub> *Journal of Biological Chemistry* **274**, 3331-3337
  46. Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Field, M. J., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1997) Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics *Nature Structural Biology* **4**, 523-526
  47. Beinert, H. (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **5**, 2-15
  48. Higuchi, Y., Ogata, H., Miki, K., Yasuoka, N., and Yagi, T. (1999) Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H<sub>2</sub>, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 angstrom resolution *Structure with Folding & Design* **7**, 549-556
  49. Rieske, J. S., Maclennan, D. H., and Coleman, R. (1964) Isolation + Properties of Iron-Protein from (Reduced Coenzyme Q) -Cytochrome C Reductase Complex of Respiratory Chain *Biochemical and Biophysical Research Communications* **15**, 338-344
  50. Rieske, J. S., Hansen, R. E., and Zaugg, W. S. (1964) Studies on Electron Transfer System .58. Properties of New Oxidation-Reduction Component of Respiratory Chain As Studied by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy *Journal of Biological Chemistry* **239**, 3017-3022
  51. Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C., and Nicolet, Y. (2007) Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases *Chemical Reviews* **107**, 4273-4303
  52. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A. V., Moura, J. J. G., LeGall, J., Dervartanian, D. V., Peck, H. D., and Huynh, B. H. (1989) Redox Intermediates of Desulfovibrio-Gigas [Nife] Hydrogenase Generated Under Hydrogen - Mossbauer and Epr Characterization of the Metal Centers *Journal of Biological Chemistry* **264**, 16435-16450
  53. Sorgenfrei, O., Linder, D., Karas, M., and Klein, A. (1993) A Novel Very Small Subunit of A Selenium-Containing [Nife] Hydrogenase of Methanococcus-Voltae Is Posttranslationally Processed by Cleavage at A Defined Position *European Journal of Biochemistry* **213**, 1355-1358
  54. Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center *Structure* **7**, 557-566
  55. Rousset, M., Montet, Y., Guigliarelli, B., Forget, N., Asso, M., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J. C., and Hatchikian, E. C. (1998) [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in Desulfovibrio fructosovorans [NiFe] hydrogenase by

- site-directed mutagenesis ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95**, 11625-11630
56. Wang, C. P., Franco, R., Moura, J. J. G., Moura, I., and Day, E. P. (1992) The Nickel Site in Active Desulfovibrio-Baculatus [Nifese] Hydrogenase Is Diamagnetic - Multifield Saturation Magnetization Measurement of the Spin State of Ni(li) ***Journal of Biological Chemistry* 267**, 7378-7380
  57. Valente, F. M. A., Oliveira, A. S. F., Gnadl, N., Pacheco, I., Coelho, A. V., Xavier, A. V., Teixeira, M., Soares, C. M., and Pereira, I. A. C. (2005) Hydrogenases in Desulfovibrio vulgaris Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase ***Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10**, 667-682
  58. Medina, M., Hatchikian, E. C., and Cammack, R. (1996) Studies of light-induced nickel EPR signals in hydrogenase: Comparison of enzymes with and without selenium ***Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1275**, 227-236
  59. Eidsness, M. K., Scott, R. A., Prickril, B. C., Dervartanian, D. V., LeGall, J., Moura, I., Moura, J. J. G., and Peck, H. D. (1989) Evidence for Selenocysteine Coordination to the Active-Site Nickel in the [Nifese]Hydrogenases from Desulfovibrio-Baculatus ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86**, 147-151
  60. De Lacey, A. L., Gutierrez-Sanchez, C., Fernandez, V. M., Pacheco, I., and Pereira, I. A. C. (2008) FTIR spectroelectrochemical characterization of the Ni-Fe-Se hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Hildenborough ***Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13**, 1315-1320
  61. Vignais, P. M., Billoud, B., and Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases ***Fems Microbiology Reviews* 25**, 455-501
  62. Sargent, F., Bogsch, E. G., Stanley, N. R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B. C., and Palmer, T. (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway ***Embo Journal* 17**, 3640-3650
  63. Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., and Friedrich, B. (2000) The H-2 sensor of Ralstonia eutropha is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases ***Journal of Bacteriology* 182**, 2716-2724
  64. Pierik, A. J., Schmelz, M., Lenz, O., Friedrich, B., and Albracht, S. P. J. (1998) Characterization of the active site of a hydrogen sensor from Alcaligenes eutrophus ***Febs Letters* 438**, 231-235
  65. Happe, R. P., Roseboom, W., Egert, G., Friedrich, C. G., Massanz, C., Friedrich, B., and Albracht, S. P. J. (2000) Unusual FTIR and EPR properties of the H-2-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from Ralstonia eutropha ***Febs Letters* 466**, 259-263
  66. Kaur, A. (2009) Genetic and Molecular Characterizations of Hydrogenases and Sulfate Metabolism Proteins of Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

67. Barz, M., Beimgraben, C., Staller, T., Germer, F., Opitz, F., Marquardt, C., Schwarz, C., Gutekunst, K., Vanselow, K. H., Schmitz, R., LaRoche, J., Schulz, R., and Appel, J. (2010) Distribution Analysis of Hydrogenases in Surface Waters of Marine and Freshwater Environments ***PLoS ONE*** 5(11): e13846
68. Buhrke, T., Lenz, O., Krauss, N., and Friedrich, B. (2005) Oxygen tolerance of the H<sub>2</sub>-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site ***Journal of Biological Chemistry*** 280, 23791-23796
69. Lenz, O., Ludwig, M., Schubert, T., Burstel, I., Ganskow, S., Goris, T., Schwarze, A., and Friedrich, B. (2010) H<sub>2</sub> Conversion in the Presence of O<sub>2</sub> as Performed by the Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha* ***Chemphyschem*** 11, 1107-1119
70. Deckers, H. M., Wilson, F. R., and Voordouw, G. (1990) Cloning and Sequencing of A [NiFe] Hydrogenase Operon from *Desulfovibrio-Vulgaris* Miyazaki-F ***Journal of General Microbiology*** 136, 2021-2028
71. Schlegel, H. G. and Zaborosch, C. (1992) ***Allgemeine Mikrobiologie***, 7. Ed., Thieme, Stuttgart, Germany
72. Wood, P. M. (1978) Chemiosmotic Model for Sulfate Respiration ***Febs Letters*** 95, 12-18
73. Brugna-Guiral, M., Tron, P., Nitschke, W., Stetter, K. O., Burlat, B., Guigliarelli, B., Bruschi, M., and Giudici-Ortoni, M. T. (2003) [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics ***Extremophiles*** 7, 145-157
74. Fritsch, J., Lenz, O., and Friedrich, B. (2013) Structure, function and biosynthesis of O<sub>2</sub>-tolerant hydrogenases ***Nature reviews. Microbiology*** 11, 106-114
75. Stiebritz, M. T. and Reiher, M. (2012) Hydrogenases and oxygen ***Chemical Science*** 3, 1739-1751
76. Lamle, S. E., Albracht, S. P. J., and Armstrong, F. A. (2004) Electrochemical potential-step investigations of the aerobic interconversions of [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*: Insights into the puzzling difference between unready and ready oxidized inactive states ***Journal of the American Chemical Society*** 126, 14899-14909
77. Baltazar, C. S. A., Teixeira, V. H., and Soares, C. M. (2012) Structural features of [NiFeSe] and [NiFe] hydrogenases determining their different properties: a computational approach ***Journal of Biological Inorganic Chemistry*** 17, 543-555
78. Parkin, A., Goldet, G., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J. C., and Armstrong, F. A. (2008) The difference a Se makes? Oxygen-tolerant hydrogen production by the [NiFeSe]-hydrogenase from *Desulfomicrobium baculatum* ***Journal of the American Chemical Society*** 130, 13410-13416

## Literatur

79. Lissolo, T., Pulvin, S., and Thomas, D. (1984) Reactivation of the Hydrogenase from *Desulfovibrio-Gigas* by Hydrogen - Influence of Redox Potential ***Journal of Biological Chemistry* 259**, 1725-1729
80. Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., Kano, K., and Higuchi, Y. (2005) Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: Conversion of the ready to the unready state ***Structure* 13**, 1635-1642
81. Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B. W., Roseboom, W., Albracht, S. P. J., Garcin, E., Rousset, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (2005) Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases ***Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10**, 239-249
82. Marques, M. C., Coelho, R., De Lacey, A. L., Pereira, I. A. C., and Matias, P. M. (2010) The Three-Dimensional Structure of [NiFeSe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: A Hydrogenase without a Bridging Ligand in the Active Site in Its Oxidised, "as-Isolated" State ***Journal of Molecular Biology* 396**, 893-907
83. Romao, C. V., Pereira, I. A. C., Xavier, A. V., LeGall, J., and Teixeira, M. (1997) Characterization of the [NiFe] hydrogenase from the sulfate reducer *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough ***Biochemical and Biophysical Research Communications* 240**, 75-79
84. Valente, F. A. A., Almeida, C. C., Pacheco, I., Carita, J., Saraiva, L. M., and Pereira, I. A. C. (2006) Selenium is involved in regulation of periplasmic hydrogenase gene expression in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough ***Journal of Bacteriology* 188**, 3228-3235
85. Pandelia, M. E., Nitschke, W., Infossi, P., Giudici-Orticoni, M. T., Bill, E., and Lubitz, W. (2011) Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus* ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108**, 6097-6102
86. Goris, T., Wait, A. F., Saggiu, M., Fritsch, J., Heidary, N., Stein, M., Zebger, I., Lendzian, F., Armstrong, F. A., Friedrich, B., and Lenz, O. (2011) A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase ***Nature Chemical Biology* 7**, 310-318
87. Guiral, M., Prunetti, L., Lignon, S., Lebrun, R., Moinier, D., and Giudici-Orticoni, M. T. (2009) New Insights into the Respiratory Chains of the Chemolithoautotrophic and Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus* ***Journal of Proteome Research* 8**, 1717-1730
88. Lineweaver, C. (2005) Biocosmology: a New Science of the Big Picture ***Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales* 138**, 93-98
89. Shomura, Y., Yoon, K. S., Nishihara, H., and Higuchi, Y. (2011) Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase ***Nature* 479**, 253-256
90. Volbeda, A., Amara, P., Darnault, C., Mouesca, J. M., Parkin, A., Roessler, M. M., Armstrong, F. A., and Fontecilla-Camps, J. C. (2012) X-

- ray crystallographic and computational studies of the O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli* ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109**, 5305-5310
91. Lukey, M. J., Roessler, M. M., Parkin, A., Evans, R. M., Davies, R. A., Lenz, O., Friedrich, B., Sargent, F., and Armstrong, F. A. (2011) Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenases: The Individual and Collective Importance of Supernumerary Cysteines at the Proximal Fe-S Cluster ***Journal of the American Chemical Society* 133**, 16881-16892
  92. Pandelia, M. E., Bykov, D., Izsak, R., Infossi, P., Giudici-Ortoni, M. T., Bill, E., Neese, F., and Lubitz, W. (2013) Electronic structure of the unique [4Fe-3S] cluster in O<sub>2</sub>-tolerant hydrogenases characterized by <sup>57</sup>Fe Mossbauer and EPR spectroscopy ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110**, 483-488
  93. Dai, S. D., Friemann, R., Glauser, D. A., Bourquin, F., Manieri, W., Schurmann, P., and Eklund, H. (2007) Structural snapshots along the reaction pathway of ferredoxin-thioredoxin reductase ***Nature* 448**, 92-102
  94. Theodoratou, E., Huber, R., and Böck, A. (2005) [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function ***Biochemical Society Transactions* 33**, 108-111
  95. Takahashi, Y. and Nakamura, M. (1999) Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli* ***Journal of Biochemistry* 126**, 917-926
  96. Tokumoto, U., Nomura, S., Minami, Y., Mihara, H., Kato, S., Kurihara, T., Esaki, N., Kanazawa, H., Matsubara, H., and Takahashi, Y. (2002) Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli* ***Journal of Biochemistry* 131**, 713-719
  97. Schwartz, C. J., Djaman, O., Imlay, J. A., and Kiley, P. J. (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli* ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97**, 9009-9014
  98. Lauhon, C. T. (2002) Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli* ***Journal of Bacteriology* 184**, 6820-6829
  99. Agar, J. N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B. H., Dean, D. R., and Johnson, M. K. (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: Sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU ***Biochemistry* 39**, 7856-7862
  100. Urbina, H. D., Silberg, J. J., Hoff, K. G., and Vickery, L. E. (2001) Transfer of sulfur from IscS to IscU during Fe/S cluster assembly ***Journal of Biological Chemistry* 276**, 44521-44526
  101. Smith, A. D., Agar, J. N., Johnson, K. A., Frazzon, J., Amster, I. J., Dean, D. R., and Johnson, M. K. (2001) Sulfur transfer from IscS to IscU: The first step in iron-sulfur cluster biosynthesis ***Journal of the American Chemical Society* 123**, 11103-11104

## Literatur

102. Wu, G., Mansy, S. S., Wu, S. P., Surerus, K. K., Foster, M. W., and Cowan, J. A. (2002) Characterization of an iron-sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe* ***Biochemistry* 41**, 5024-5032
103. Ollagnier-De-Choudens, S., Sanakis, Y., and Fontecave, M. (2004) SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly ***Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9**, 828-838
104. Zeng, J., Zhang, K., Liu, J. S., and Qiu, G. Z. (2008) Expression, Purification, and Characterization of Iron-Sulfur Cluster Assembly Regulator IscR from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ***Journal of Microbiology and Biotechnology* 18**, 1672-1677
105. Schwartz, C. J., Giel, J. L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F. J., Beinert, H., and Kiley, P. J. (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98**, 14895-14900
106. Fontecave, M., de Choudens, S. O., Py, B., and Barras, F. (2005) Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery ***Journal of Biological Inorganic Chemistry* 10**, 713-721
107. Barras, F., Loiseau, L., and Py, B. (2005) How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe/S proteins ***Advances in Microbial Physiology* 50**, 41-101
108. Outten, F. W., Djaman, O., and Storz, G. (2004) A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli* ***Molecular Microbiology* 52**, 861-872
109. Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil ***Science* 309**, 1387-1390
110. Loy, A., Schulz, C., Lucker, S., Schopfer-Wendels, A., Stoecker, K., Baranyi, C., Lehner, A., and Wagner, M. (2005) 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales" ***Applied and Environmental Microbiology* 71**, 1373-1386
111. Small, J., Call, D. R., Brockman, F. J., Straub, T. M., and Chandler, D. P. (2001) Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays ***Applied and Environmental Microbiology* 67**, 4708-4716
112. Gentry, T. J., Wickham, G. S., Schadt, C. W., He, Z., and Zhou, J. (2006) Microarray applications in microbial ecology research ***Microbial Ecology* 52**, 159-175
113. Akhtar, M. K. and Jones, P. R. (2008) Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H<sub>2</sub>-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3) ***Applied Microbiology and Biotechnology* 78**, 853-862

114. Postgate, J. R. (1984) ***The Sulfate-Reducing Bacteria***, Cambridge Univ. Press, New York, USA
115. Aigner, A., Bangsow, T., Czubayko, F., and Dechert, U. (2006) ***Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor***, 4th Ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany
116. Joseph Sambrook, E.F.Fritsch, and Tom Maniatis (1989) ***Molecular Cloning: A Laboratory Manual***, second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
117. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid Dna ***Nucleic Acids Research* 7**, 1513-1523
118. Szybalski, W., Kim, S. C., Hasan, N., and Podhajska, A. J. (1991) Classis Restriction Enzymes - A Review ***Gene* 100**, 13-26
119. Peck, H. D. and Gest, H. (1956) A New Procedure for Assay of Bacterial Hydrogenases ***Journal of Bacteriology* 71**, 70-80
120. Hubbell, W. L. and Altenbach, C. (1994) Investigation of Structure and Dynamics in Membrane-Proteins Using Site-Directed Spin-Labeling ***Current Opinion in Structural Biology* 4**, 566-573
121. Berliner, L. J. (1998) ***Spin Labeling: The Next Millennium***, Plenum Press, New York, USA
122. Schweiger, A. and Jeschke, G. (2001) ***Principle of pulse electron paramagnetic resonance***, Oxford University Press: New York, USA
123. Hoff, A. J. (1989) ***Advanced EPR - Applications in biology and biochemistry***, Elsevier, München, Germany
124. Schweiger, A. (1991) Pulsed Electron-Spin-Resonance Spectroscopy - Basic Principles, Techniques, and Examples of Applications ***Angewandte Chemie-International Edition in English* 30**, 265-292
125. Gemperle, C. and Schweiger, A. (1991) Pulsed Electron Nuclear Double-Resonance Methodology ***Chemical Reviews* 91**, 1481-1505
126. Davies, E. R. (1974) New Pulse Endor Technique ***Physics Letters A* 47**, 1-2
127. Mims, W. B. (1965) Pulsed Endor Experiments ***Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences* 283**, 452-457
128. Reijerse, E., Lendzian, F., Isaacson, R., and Lubitz, W. (2012) A tunable general purpose Q-band resonator for CW and pulse EPR/ENDOR experiments with large sample access and optical excitation ***Journal of Magnetic Resonance* 214**, 237-243
129. Niklas, J., Schulte, T., Prakash, S., van Gestel, M., Hofmann, E., and Lubitz, W. (2007) Spin-density distribution of the carotenoid triplet state in the peridinin-chlorophyll-protein antenna. A Q-band pulse electron-nuclear double resonance and density functional theory study ***Journal of the American Chemical Society* 129**, 15442-15443

## Literatur

130. Stoll, S. and Schweiger, A. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR ***Journal of Magnetic Resonance* 178**, 42-55
131. Galla, H. J. (1988) ***Spektroskopische Methoden in der Biochemie***, Thieme Verlag, Stuttgart, Germany
132. Nakamoto, K. (1997) ***Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination compounds***, 5th Ed., John Wiley & Sons, Chichester, UK
133. Atkins, P. W. (1996) ***Physikalische Chemie***, Wiley-VCH, Weinheim, Germany
134. Braterman, P. S. (1975) ***Metal carbonyl spectra***, Academic Press Inc. London, UK
135. Griffiths, P. R. and de Haseth, J. A. (1986) ***Fourier Transform Infrared Spectrometry***, John Wiley & Sons, Chichester, UK
136. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74**, 5463-5467
137. Steele, H. L. and Streit, W. R. (2005) Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology ***Fems Microbiology Letters* 247**, 105-111
138. Schmeisser, C., Steele, H., and Streit, W. R. (2007) Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes ***Applied Microbiology and Biotechnology* 75**, 955-962
139. Zhou, J. H. (2003) Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis ***Current Opinion in Microbiology* 6**, 288-294
140. Vannier, P., Marteinsson, V. T., Fridjonsson, O. H., Oger, P., and Jebbar, M. (2011) Complete Genome Sequence of the Hyperthermophilic, Piezophilic, Heterotrophic, and Carboxydrotrophic Archaeon *Thermococcus barophilus* MP ***Journal of Bacteriology* 193**, 1481-1482
141. Mardanov, A. V., Ravin, N. V., Svetlitchnyi, V. A., Beletsky, A. V., Miroshnichenko, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., and Skryabin, K. G. (2009) Metabolic Versatility and Indigenous Origin of the Archaeon *Thermococcus sibiricus*, Isolated from a Siberian Oil Reservoir, as Revealed by Genome Analysis ***Applied and Environmental Microbiology* 75**, 4580-4588
142. Takacs, M., Toth, A., Bogos, B., Varga, A., Rakhely, G., and Kovacs, K. L. (2008) Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* ***BiomedCentral Microbiology* 8**
143. Ramirez-Arcos, S., Fernandez-Herrero, L. A., Marin, I., and Berenguer, J. (1998) Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an Hfr-like mechanism among extreme thermophiles ***Journal of Bacteriology* 180**, 3137-3143
144. Canganella, F., Jones, W. J., Gambacorta, A., and Antranikian, G. (1997) Biochemical and phylogenetic characterization of two novel deep-sea *Thermococcus* isolates with potentially biotechnological applications ***Archives of Microbiology* 167**, 233-238

145. Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic Identification and In-Situ Detection of Individual Microbial-Cells Without Cultivation ***Microbiological Reviews* 59**, 143-169
146. Wang, Q. F., Qian, C. L., Zhang, X. Z., Liu, N., Yan, X., and Zhou, Z. H. (2012) Characterization of a novel thermostable beta-glucosidase from a metagenomic library of termite gut ***Enzyme and Microbial Technology* 51**, 319-324
147. Streit, W. R. and Schmitz, R. A. (2004) Metagenomics - the key to the uncultured microbes ***Current Opinion in Microbiology* 7**, 492-498
148. Steele, H. L., Jaeger, K. E., Daniel, R., and Streit, W. R. (2009) Advances in Recovery of Novel Biocatalysts from Metagenomes ***Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16**, 25-37
149. Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., and Handelsman, J. (2004) Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities ***Annual Review of Genetics* 38**, 525-552
150. Böck, A., King, P. W., and Blokesch, M. (2006) ***Maturation of hydrogenases***. In *Advances in Microbial Physiology*, ACADEMIC PRESS LTD-ELSEVIER SCIENCE LTD, München, Germany
151. Paschos, A. (2002) Biosynthese des Metallzentrums von [NiFe]-Hydrogenasen aus *E. coli*: Analyse zweier Reifungsenzyme. **Dissertation**, Ludwig-Maximilians-Universität München
152. Kanai, T., Matsuoka, R., Beppu, H., Nakajima, A., Okada, Y., Atomi, H., and Imanaka, T. (2011) Distinct Physiological Roles of the Three [NiFe]-Hydrogenase Orthologs in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis* ***Journal of Bacteriology* 193**, 3109-3116
153. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995) Quantitative Monitoring of Gene-Expression Patterns with A Complementary-Dna Microarray ***Science* 270**, 467-470
154. Cook, K. L. and Sayler, G. S. (2003) Environmental application of array technology: promise, problems and practicalities ***Current Opinion in Biotechnology* 14**, 311-318
155. Xu, J. P. (2006) Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances ***Molecular Ecology* 15**, 1713-1731
156. Cho, J. C. and Tiedje, J. M. (2001) Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays ***Applied and Environmental Microbiology* 67**, 3677-3682
157. Dong, Y. M., Glasner, J. D., Blattner, F. R., and Triplett, E. W. (2001) Genomic interspecies microarray hybridization: Rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 open reading frames ***Applied and Environmental Microbiology* 67**, 1911-1921
158. Watanabe, S., Matsumi, R., Arai, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2007) Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: Insights into cyanation reaction by thiol redox signaling ***Molecular Cell* 27**, 29-40

## Literatur

159. Rakhely, G., Zhou, Z. H., Adams, M. W. W., and Kovacs, K. L. (1999) Biochemical and molecular characterization of the [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* ***European Journal of Biochemistry* 266**, 1158-1165
160. Takacs, M., Rakhely, G., and Kovacs, K. L. (2001) Molecular characterization and heterologous expression of hypCD, the first two [NiFe] hydrogenase accessory genes of *Thermococcus litoralis* ***Archives of Microbiology* 176**, 231-235
161. Pandelia, M. E., Lubitz, W., and Nitschke, W. (2012) Evolution and diversification of Group 1 [NiFe] hydrogenases. Is there a phylogenetic marker for O<sub>2</sub>-tolerance? ***Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1817**, 1565-1575
162. Lynn, D. J., Singer, G. A. C., and Hickey, D. A. (2002) Synonymous codon usage is subject to selection in thermophilic bacteria ***Nucleic Acids Research* 30**, 4272-4277
163. Gabor, E. M., Alkema, W. B. L., and Janssen, D. B. (2004) Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques ***Environmental Microbiology* 6**, 879-886
164. Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H. P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., and Fritz, H. J. (2004) The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* ***Nature Biotechnology* 22**, 547-553
165. Guschin, D., Yershov, G., Zaslavsky, A., Gemmell, A., Shick, V., Proudnikov, D., Arenkov, P., and Mirzabekov, A. (1997) Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips ***Analytical Biochemistry* 250**, 203-211
166. Dong, Y. Y., Sheng, H. H., Zeng, X. T., Yan, J. F., Li, H. Y., Xiao, H. S., Li, X. K., and Yang, S. L. (2012) Investigation of Genetic Diversity of the bla(SHV) Gene and Development of an Oligonucleotide Microarray to Detect Mutations in the bla(SHV) Gene ***Microbial Drug Resistance* 18**, 539-545
167. Settles, M. L., Coram, T., Soule, T., and Robison, B. D. (2012) An improved algorithm for the detection of genomic variation using short oligonucleotide expression microarrays ***Molecular Ecology Resources* 12**, 1079-1089
168. Tiquia, S. M., Wu, L. Y., Chong, S. C., Passovets, S., Xu, D., Xu, Y., and Zhou, J. Z. (2004) Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples ***Biotechniques* 36**, 664-670
169. Rhee, S. K., Liu, X. D., Wu, L. Y., Chong, S. C., Wan, X. F., and Zhou, J. Z. (2004) Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays ***Applied and Environmental Microbiology* 70**, 4303-4317

170. He, Z. L., Gentry, T. J., Schadt, C. W., Wu, L. Y., Liebich, J., Chong, S. C., Huang, Z. J., Wu, W. M., Gu, B. H., Jardine, P., Criddle, C., and Zhou, J. (2007) GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes *Isme Journal* **1**, 67-77
171. Quinones, B., Parker, C. T., Janda, J. M., Miller, W. G., and Mandrell, R. E. (2007) Detection and genotyping of Arcobacter and Campylobacter isolates from retail chicken samples by use of DNA oligonucleotide arrays *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3645-3655
172. Pathak, G. P. and Gaertner, W. (2010) **Detection and Isolation of Selected Genes of Interest from Metagenomic Libraries by a DNA Microarray Approach**. In *Metagenomics: Methods and Protocols*, HUMANA PRESS INC, New York, USA
173. Sebat, J. L., Colwell, F. S., and Crawford, R. L. (2003) Metagenomic profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4927-4934
174. Kane, M. D., Jatkoa, T. A., Stumpf, C. R., Lu, J., Thomas, J. D., and Madore, S. J. (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays *Nucleic Acids Research* **28**, 4552-4557
175. Reysenbach, A. L. and Shock, E. (2002) Merging genomes with geochemistry in hydrothermal ecosystems *Science* **296**, 1077-1082
176. Lee, H. S., Kang, S. G., Bae, S. S., Lim, J. K., Cho, Y., Kim, Y. J., Jeon, J. H., Cha, S. S., Kwon, K. K., Kim, H. T., Park, C. J., Lee, H. W., Kim, S. I., Chun, J., Colwell, R. R., Kim, S. J., and Lee, J. H. (2008) The Complete Genome Sequence of Thermococcus onnurineus NA1 Reveals a Mixed Heterotrophic and Carboxydrotrophic Metabolism *Journal of Bacteriology* **190**, 7491-7499
177. Amend, J. P. and Shock, E. L. (2001) Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria *Fems Microbiology Reviews* **25**, 175-243
178. Belkin, S. and Jannasch, H. W. (1985) A New Extremely Thermophilic, Sulfur-Reducing Heterotrophic, Marine Bacterium *Archives of Microbiology* **141**, 181-186
179. Kelley, D. S., Baross, J. A., and Delaney, J. R. (2002) Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **30**, 385-491
180. Hedderich, R. (2004) Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: Ancestors of complex I *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **36**, 65-75
181. Sauter, M., Böhm, R., and Böck, A. (1992) Mutational Analysis of the Operon (Hyc) Determining Hydrogenase-3 Formation in Escherichia-coli *Molecular Microbiology* **6**, 1523-1532
182. Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Kunkel, A., and Hedderich, R. (1999) Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from

## Literatur

- Methanosarcina barkeri *European Journal of Biochemistry* **265**, 325-335
183. Kunkel, A., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1998) An Escherichia coli hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea *European Journal of Biochemistry* **252**, 467-476
184. Caffrey, S. A., Park, H. S., Voordouw, J. K., He, Z., Zhou, J., and Voordouw, G. (2007) Function of periplasmic hydrogenases in the sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio vulgaris Hildenborough *Journal of Bacteriology* **189**, 6159-6167
185. Gutierrez-Sanchez, C., Rüdiger, O., Fernandez, V. M., De Lacey, A. L., Marques, M., and Pereira, I. A. C. (2010) Interaction of the active site of the Ni-Fe-Se hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Hildenborough with carbon monoxide and oxygen inhibitors *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **15**, 1285-1292
186. Nonaka, K., Nguyen, N. T., Yoon, K., and Ogo, S. (2012) Novel "H<sub>2</sub>-oxidizing" [NiFeSe]hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F *Journal of Bioscience and Bioengineering*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.10.011>
187. Baltazar, C. S. A., Marques, M. C., Soares, C. M., DeLacey, A. M., Pereira, I. A. C., and Matias, P. M. (2011) Nickel-Iron-Selenium Hydrogenases - An Overview *European Journal of Inorganic Chemistry* 948-962
188. Teixeira, M., Fauque, G., Moura, I., Lespinat, P. A., Berlier, Y., Prickril, B., Peck, H. D., Xavier, A. V., LeGall, J., and Moura, J. J. G. (1987) Nickel-[Iron-Sulfur]-Selenium-Containing Hydrogenases from Desulfovibrio-Baculatus (Dsm-1743) - Redox Centers and Catalytic Properties *European Journal of Biochemistry* **167**, 47-58
189. Surerus, K. K., Chen, M., Vanderzwaan, J. W., Rusnak, F. M., Kolk, M., Duin, E. C., Albracht, S. P. J., and Munck, E. (1994) Further Characterization of the Spin Coupling Observed in Oxidized Hydrogenase from Chromatium-Vinosum - A Mossbauer and Multifrequency Epr Study *Biochemistry* **33**, 4980-4993
190. Brecht, M., van Gastel, M., Buhrke, T., Friedrich, B., and Lubitz, W. (2003) Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H<sub>2</sub>-sensing hydrogenase from Ralstonia eutropha in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy *Journal of the American Chemical Society* **125**, 13075-13083
191. Kampa, M., Pandelia, M. E., Lubitz, W., van Gastel, M., and Neese, F. (2013) A metal-metal bond in the light-induced state of [NiFe] hydrogenases with relevance to hydrogen evolution *Journal of the American Chemical Society* **135**, 3915-3925
192. Vincent, K. A., Parkin, A., and Armstrong, F. A. (2007) Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases *Chemical Reviews* **107**, 4366-4413
193. Rüdiger, O., Abad, J. M., Hatchikian, E. C., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2005) Oriented immobilization of Desulfovibrio gigas

- hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H<sub>2</sub> **Journal of the American Chemical Society** **127**, 16008-16009
194. Rüdiger, O., Gutierrez-Sanchez, C., Olea, D., Pereira, I. A. C., Velez, M., Fernandez, V. M., and De Lacey, A. L. (2010) Enzymatic Anodes for Hydrogen Fuel Cells based on Covalent Attachment of Ni-Fe Hydrogenases and Direct Electron Transfer to SAM-Modified Gold Electrodes **Electroanalysis** **22**, 776-783
  195. Shafaat, H. S., Rüdiger, O., Ogata, H., and Lubitz, W. (2013) [NiFe] hydrogenases: a common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics** in press
  196. He, S. H., Teixeira, M., LeGall, J., Patil, D. S., Moura, I., Moura, J. J. G., Dervartanian, D. V., Huynh, B. H., and Peck, H. D. (1989) Epr Studies with Se-77-Enriched (Nifese) Hydrogenase of *Desulfovibrio-Baculatus* - Evidence for A Selenium Ligand to the Active-Site Nickel **Journal of Biological Chemistry** **264**, 2678-2682
  197. Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., and Baron, C. (1991) Selenoprotein Synthesis - An Expansion of the Genetic-Code **Trends in Biochemical Sciences** **16**, 463-467
  198. Berry, M. J., Banu, L., Chen, Y., Mandel, S. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W., and Larsen, P. R. (1991) Recognition of Uga As A Selenocysteine Codon in Type-I Deiodinase Requires Sequences in the 3' Untranslated Region **Nature** **353**, 273-276
  199. Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code **Molecular and Cellular Biology** **22**, 3565-3576
  200. Aoyama, K., Matsubara, K., and Kobayashi, S. (2006) Aging and oxidative stress in progressive supranuclear palsy **European Journal of Neurology** **13**, 89-92
  201. Cammack, R., Patil, D. S., Hatchikian, E. C., and Fernandez, V. M. (1987) Nickel and Iron-Sulfur Centers in *Desulfovibrio-Gigas* Hydrogenase - Electron-Spin-Resonance Spectra, Redox Properties and Interactions **Biochimica et Biophysica Acta** **912**, 98-109
  202. Teixeira, M., Moura, I., Xavier, A. V., Huynh, B. H., Dervartanian, D. V., Peck, H. D., LeGall, J., and Moura, J. J. G. (1985) Electron-Paramagnetic Resonance Studies on the Mechanism of Activation and the Catalytic Cycle of the Nickel-Containing Hydrogenase from *Desulfovibrio-Gigas* **Journal of Biological Chemistry** **260**, 8942-8950
  203. Teixeira, M., Moura, I., Fauque, G., Dervartanian, D. V., LeGall, J., Peck, H. D., Moura, J. J. G., and Huynh, B. H. (1990) The Iron-Sulfur Centers of the Soluble [Nifese] Hydrogenase, from *Desulfovibrio-Baculatus* (Dsm 1743) - Epr and Mossbauer Characterization **European Journal of Biochemistry** **189**, 381-386

## Literatur

204. Sorgenfrei, O., Muller, S., Pfeiffer, M., Snieszko, I., and Klein, A. (1997) The [NiFe] hydrogenases of *Methanococcus voltae*: Genes, enzymes and regulation ***Archives of Microbiology* 167**, 189-195
205. Arachea, B. T., Sun, Z., Potente, N., Malik, R., Isailovic, D., and Viola, R. E. (2012) Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins ***Protein Expression and Purification* 86**, 12-20
206. Horch, M., Lauterbach, L., Saggiu, M., Hildebrandt, P., Lendzian, F., Bittl, R., Lenz, O., and Zebger, I. (2010) Probing the Active Site of an O-2-Tolerant NAD(+)-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by In Situ EPR and FTIR Spectroscopy ***Angewandte Chemie-International Edition* 49**, 8026-8029
207. Lamrabet, O., Pieulle, L., Aubert, C., Mouhamar, F., Stocker, P., Dolla, A., and Brasseur, G. (2011) Oxygen reduction in the strict anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: characterization of two membrane-bound oxygen reductases ***Microbiology-Sgm* 157**, 2720-2732
208. Junemann, S. (1997) Cytochrome bd terminal oxidase ***Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1321**, 107-127
209. Correia, I. J., Paquete, C. M., Coelho, A., Almeida, C. C., Catarino, T., Louro, R. O., Frazao, C., Saraiva, L. M., Carrondo, M. A., Turner, D. L., and Xavier, A. V. (2004) Proton-assisted two-electron transfer in natural variants of tetraheme cytochromes from *Desulfomicrobium* Sp ***Journal of Biological Chemistry* 279**, 52227-52237
210. Valente, F. M. A., Pereira, P. M., Venceslau, S. S., Regalla, M., Coelho, A. V., and Pereira, I. A. C. (2007) The [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is a bacterial lipoprotein lacking a typical lipoprotein signal peptide ***Febs Letters* 581**, 3341-3344
211. Hayashi, S. and Wu, H. C. (1990) Lipoproteins in Bacteria ***Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 22**, 451-471
212. Babu, M. M., Priya, M. L., Selvan, A. T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L., and Sankaran, K. (2006) A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins ***Journal of Bacteriology* 188**, 2761-2773
213. De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Rousset, M., and Cammack, R. (2007) Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: Spectroelectrochemical studies ***Chemical Reviews* 107**, 4304-4330
214. Pandelia, M. E., Fourmond, V., Tron-Infossi, P., Lojou, E., Bertrand, P., Leger, C., Giudici-Orticoni, M. T., and Lubitz, W. (2010) Membrane-Bound Hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: Enzyme Activation, Redox Intermediates and Oxygen Tolerance ***Journal of the American Chemical Society* 132**, 6991-7004
215. Guiral, M., Tron, P., Belle, V., Aubert, C., Leger, C., Guigliarelli, B., and Giudici-Orticoni, M. T. (2006) Hyperthermostable and oxygen resistant hydrogenases from a hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: Physicochemical properties ***International Journal of Hydrogen Energy* 31**, 1424-1431

216. Pandelia, M. E., Infossi, P., Stein, M., Giudici-Orticoni, M. T., and Lubitz, W. (2012) Spectroscopic characterization of the key catalytic intermediate Ni-C in the O<sub>2</sub>-tolerant [NiFe] hydrogenase I from *Aquifex aeolicus*: evidence of a weakly bound hydride ***Chemical Communications* 48**, 823-825
217. de Souza, E. M., Pedrosa, F. D. O., Wassem, R., Ford, C. M., and Yates, M. G. (2007) Genes involved in Sec-independent membrane targeting of hydrogenase in *Azotobacter chroococcum* ***Research in Microbiology* 158**, 272-278
218. Palmer, T. and Berks, B. C. (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway ***Nature Reviews Microbiology* 10**, 483-496
219. Kuchenreuther, J. M., Grady-Smith, C. S., Bingham, A. S., George, S. J., Cramer, S. P., and Swartz, J. R. (2010) High-Yield Expression of Heterologous [FeFe] Hydrogenases in *Escherichia coli* ***PloS ONE* 5** (11): e15491
220. de Marco, A., Vigh, L., Diamant, S., and Goloubinoff, P. (2005) Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones ***Cell Stress & Chaperones* 10**, 329-339
221. Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli* ***Nature Biotechnology* 22**, 1399-1408
222. Cammack, R. and MacMillan, F. (2010) ***Electron Magnetic Resonance of Iron-Sulfur Proteins In Electron-Transfer Chains: Resolving Complexity***. In *Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes*, Springer, New York, USA
223. Nakamaru-Ogiso, E., Yano, T., Ohnishi, T., and Yagi, T. (2002) Characterization of the iron-sulfur cluster coordinated by a cysteine cluster motif (CXXCXXCX<sub>2</sub>7C) in the Nqo3 subunit in the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Thermus thermophilus* HB-8 ***Journal of Biological Chemistry* 277**, 1680-1688
224. Kondapalli, K. C. (2008) Structure-function Studies of Frataxin: An Iron Chaperone in the Mitochondrial Iron-sulfur Cluster and Heme Biosynthetic Pathways. Graduate School of Wayne State University, Detroit, USA
225. Moss, D., Navedryk, E., Breton, J., and Mantele, W. (1990) Redox-Linked Conformational-Changes in Proteins Detected by A Combination of Infrared-Spectroscopy and Protein Electrochemistry - Evaluation of the Technique with Cytochrome-C ***European Journal of Biochemistry* 187**, 565-572
226. Lippard, S. J. and Berg, J. M. (1994) ***Principles of Bioinorganic Chemistry***, 1st Ed., University Science Books, Mill Valley, USA
227. Hidalgo, E., Bollinger, J. M., Bradley, T. M., Walsh, C. T., and Demple, B. (1995) Binuclear [2Fe-2S] Clusters in the *Escherichia-Coli* SoxR Protein and Role of the Metal Centers in Transcription ***Journal of Biological Chemistry* 270**, 20908-20914
228. Gibney, B. R., Mulholland, S. E., Rabanal, F., and Dutton, P. L. (1996) Ferredoxin and ferredoxin-heme maquettes ***Proceedings of the National***

- Academy of Sciences of the United States of America** **93**, 15041-15046
229. Capozzi, F., Ciurli, S., and Luchinat, C. (1998) Coordination sphere versus protein environment as determinants of electronic and functional properties of iron-sulfur proteins ***Metal Sites in Proteins and Models* 90**, 127-160
230. Drapier, J. C. (1997) Interplay between NO and [Fe-S] clusters: Relevance to biological systems ***Methods-A Companion to Methods in Enzymology* 11**, 319-329
231. Butler, A. R., Glidewell, C., and Li, M. H. (1988) Nitrosyl Complexes of Iron Sulfur Clusters ***Advances in Inorganic Chemistry* 32**, 335-393
232. Henry, Y., Ducrocq, C., Drapier, J. C., Servent, D., Pellat, C., and Guissani, A. (1991) Nitric-Oxide, A Biological Effector - Electron-Paramagnetic Resonance Detection of Nitrosyl-Iron-Protein Complexes in Whole Cells ***European Biophysics Journal* 20**, 1-15
233. Foster, H. W. and Cowan, J. A. (1999) Chemistry of nitric oxide with protein-bound iron sulfur centers. Insights on physiological reactivity ***Journal of the American Chemical Society* 121**, 4093-4100
234. McDonald, C. C., Phillips, W. D., and Mower, H. F. (1965) An Electron Spin Resonance Study of Some Complexes of Iron Nitric Oxide and Anionic Ligands ***Journal of the American Chemical Society* 87**, 3319-3326
235. Koay, M. S., Antonkine, M. L., Gärtner, W., and Lubitz, W. (2008) Modelling low-potential [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] clusters in proteins ***Chemistry & Biodiversity* 5**, 1571-1587
236. Werth, M. T., Cecchini, G., Manodori, A., Ackrell, B. A. C., Schroder, I., Gunsalus, R. P., and Johnson, M. K. (1990) Site-Directed Mutagenesis of Conserved Cysteine Residues in Escherichia-Coli Fumarate Reductase - Modification of the Spectroscopic and Electrochemical Properties of the [2Fe-2S] Cluster ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87**, 8965-8969
237. Rosche, B., Fetzner, S., Lingens, F., Nitschke, W., and Riedel, A. (1995) The 2Fe2S Centers of the 2-Oxo-1,2-Dihydroquinoline 8-Monooxygenase from Pseudomonas-Putida-86 Studied by Epr Spectroscopy ***Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1252**, 177-179
238. Cammack, R., Gay, E., and Shergill, J. K. (1999) Studies of hyperfine interactions in [2Fe-2S] proteins by EPR and double resonance spectroscopy ***Coordination Chemistry Reviews* 192**, 1003-1022
239. Werst, M. M., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Hoffman, B. M. (1990) O-17, H-1, and H-2 Electron Nuclear Double-Resonance Characterization of Solvent, Substrate, and Inhibitor Binding to the [4Fe-4S]<sup>+</sup> Cluster of Aconitase ***Biochemistry* 29**, 10526-10532
240. Houseman, A. L. P., Oh, B. H., Kennedy, M. C., Fan, C. L., Werst, M. M., Beinert, H., Markley, J. L., and Hoffman, B. M. (1992) N-14, N-15, C-13,

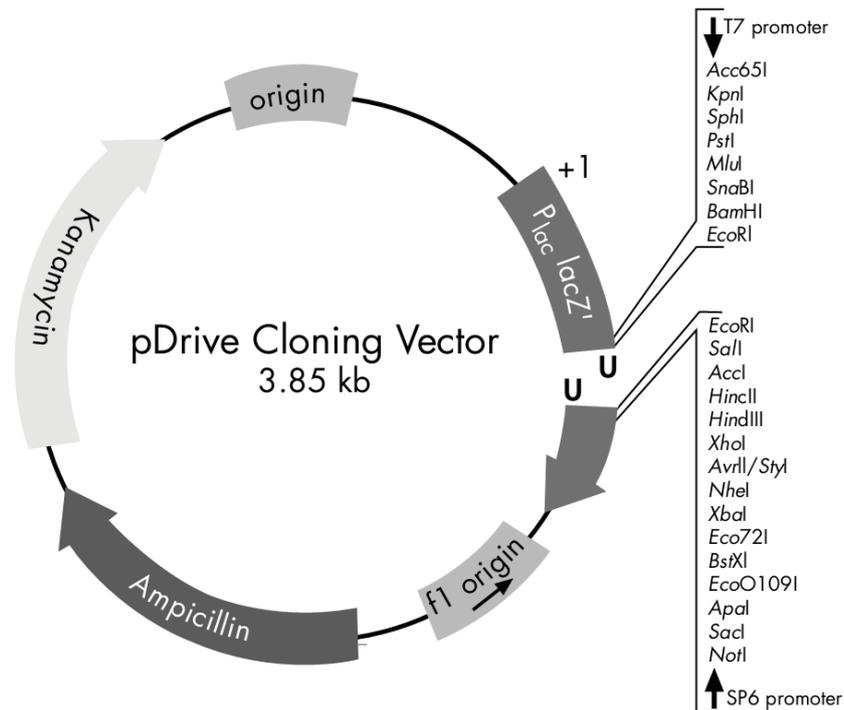
- Fe-57 and H-1, H-2 Q-Band Endor Study of Fe-S Proteins with Clusters That Have Endogenous Sulfur Ligands *Biochemistry* **31**, 2073-2080
241. Bencini, A. and Gatteschi, D. (1990) *Electron paramagnetic resonance of exchange coupled systems*, Springer-Verlag New York, inc., Secaucus, USA
242. Zhang, B., Crack, J. C., Subramanian, S., Green, J., Thomson, A. J., Le Brun, N. E., and Johnson, M. K. (2012) Reversible cycling between cysteine persulfide-ligated [2Fe-2S] and cysteine-ligated [4Fe-4S] clusters in the FNR regulatory protein *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 15734-15739
243. Crack, J. C., Jervis, A. J., Gaskell, A. A., White, G. F., Green, J., Thomson, A. J., and Le Brun, N. E. (2008) Signal perception by FNR: the role of the iron-sulfur cluster *Biochemical Society Transactions* **36**, 1144-1148
244. Adams, M. W. W. (1990) The Structure and Mechanism of Iron-Hydrogenases *Biochimica et Biophysica Acta* **1020**, 115-145
245. King, P. W., Posewitz, M. C., Ghirardi, M. L., and Seibert, M. (2006) Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an Escherichia coli biosynthetic system *Journal of Bacteriology* **188**, 2163-2172
246. Lyon, E. J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K., and Thauer, R. K. (2004) UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea - The enzyme contains functional iron after all *European Journal of Biochemistry* **271**, 195-204
247. Shima, S. and Thauer, R. K. (2007) A third type of hydrogenase catalyzing H-2 activation *Chemical Record* **7**, 37-46
248. Zirngibl, C., Hedderich, R., and Thauer, R. K. (1990) N5,N10-Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase from Methanobacterium-Thermoautotrophicum Has Hydrogenase Activity *Febs Letters* **261**, 112-116
249. Brereton, P. S., Duderstadt, R. E., Staples, C. R., Johnson, M. K., and Adams, M. W. W. (1999) Effect of serinate ligation at each of the iron sites of the [Fe4S4] cluster of Pyrococcus furiosus ferredoxin on the redox, spectroscopic, and biological properties *Biochemistry* **38**, 10594-10605
250. Hoppe, A., Pandelia, M. E., Gärtner, W., and Lubitz, W. (2011) [Fe4S4]- and [Fe3S4]-cluster formation in synthetic peptides *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1807**, 1414-1422
251. Mulholland, S. E., Gibney, B. R., Rabanal, F., and Dutton, P. L. (1998) Characterization of the fundamental protein ligand requirements of [4Fe-4S](2+/+) clusters with sixteen amino acid maquettes *Journal of the American Chemical Society* **120**, 10296-10302
252. Fritsch, J., Lenz, O., and Friedrich, B. (2011) The Maturation Factors HoxR and HoxT Contribute to Oxygen Tolerance of Membrane-Bound [NiFe] Hydrogenase in Ralstonia eutropha H16 *Journal of Bacteriology* **193**, 2487-2497

## Literatur

253. Pinske, C. and Sawers, R. G. (2012) Delivery of Iron-Sulfur Clusters to the Hydrogen-Oxidizing [NiFe]-Hydrogenases in *Escherichia coli* Requires the A-Type Carrier Proteins ErpA and IscA ***Plos One* 7** (2): e31755
254. Schubert, T., Lenz, O., Krause, E., Volkmer, R., and Friedrich, B. (2007) Chaperones specific for the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase interact with the Tat signal peptide of the small subunit precursor in *Ralstonia eutropha* H16 ***Molecular Microbiology* 66**, 453-467
255. Manyani, H., Rey, L., Palacios, J. M., Imperial, J., and Ruiz-Argueso, T. (2005) Gene products of the hupGHIJ Operon are involved in maturation of the iron-sulfur subunit of the [NiFe] hydrogenase from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ***Journal of Bacteriology* 187**, 7018-7026
256. Goris, T. (2011) Der Einfluss eines neuartigen Fe-S Clusters auf die O<sub>2</sub>-Toleranz der membrangebundenen Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha*. **Dissertation**, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin
257. Hanzelmann, P., Hernandez, H. L., Menzel, C., Garcia-Serres, R., Huynh, B. H., Johnson, M. K., Mendel, R. R., and Schindelin, H. (2004) Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis ***Journal of Biological Chemistry* 279**, 34721-34732
258. Duin, E. C., Lafferty, M. E., Crouse, B. R., Allen, R. M., Sanyal, I., Flint, D. H., and Johnson, M. K. (1997) [2Fe-2S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* biotin synthase ***Biochemistry* 36**, 11811-11820
259. Ugulava, N. B., Gibney, B. R., and Jarrett, J. T. (2000) Iron-sulfur cluster interconversions in biotin synthase: Dissociation and reassociation of iron during conversion of [2Fe-2S] to [4Fe-4S] clusters ***Biochemistry* 39**, 5206-5214
260. Chandramouli, K., Unciuleac, M. C., Naik, S., Dean, D. R., Huynh, B. H., and Johnson, M. K. (2007) Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein ***Biochemistry* 46**, 6804-6811

## 8 Anhang

### 8.1 Vektorkarte des Klonierungsvektors pDrive

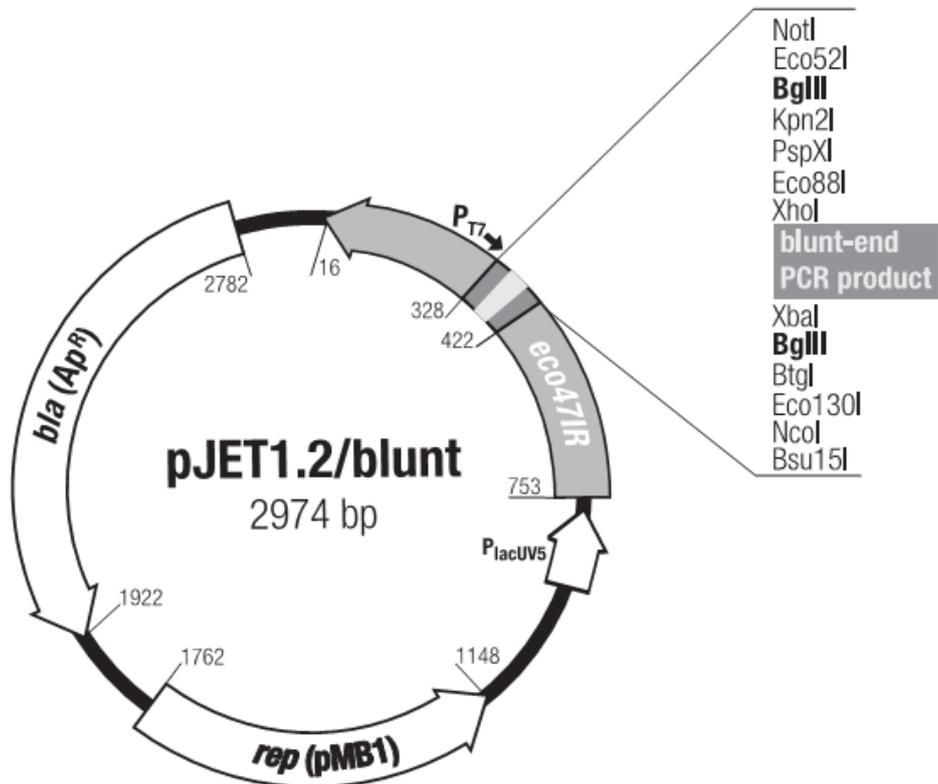


Positionen verschiedener Elemente:

Vektorgröße	3851
MCS	266-393
LacZ $\alpha$ -Peptid	216-593
Ampicillin Resistenzgen	1175-2032
Kanamycin Resistenzgen	2181-2993
pUC origin	3668
Phage f1 origin	588-1043

Quelle und weitere Informationen: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

## 8.2 Vektorkarte des Klonierungsvektors pJET1.2

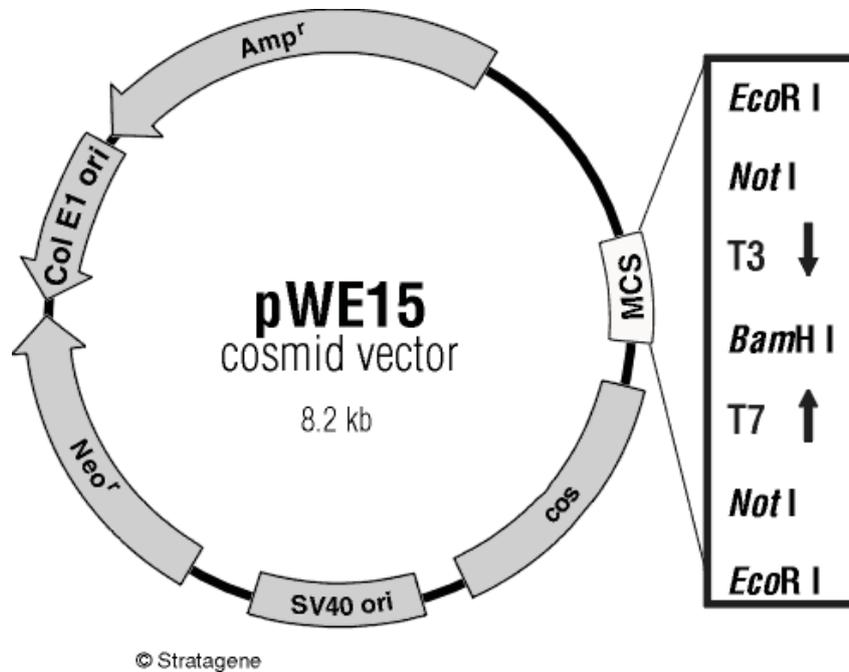


Positionen verschiedener Elemente:

MCS	422-328
Ampicillin Resistenzgen	2782-1922
Insertionsstellen	371-372
Replikon (pMB1)	1762-1148
Replikationsstart	1162±1

Quelle und weitere Informationen: <http://www.thermoscientificbio.com/molecular-cloning/clonejet-pcr-cloning-kit/>

### 8.3 Vektorkarte des Cosmidvektors pWE15

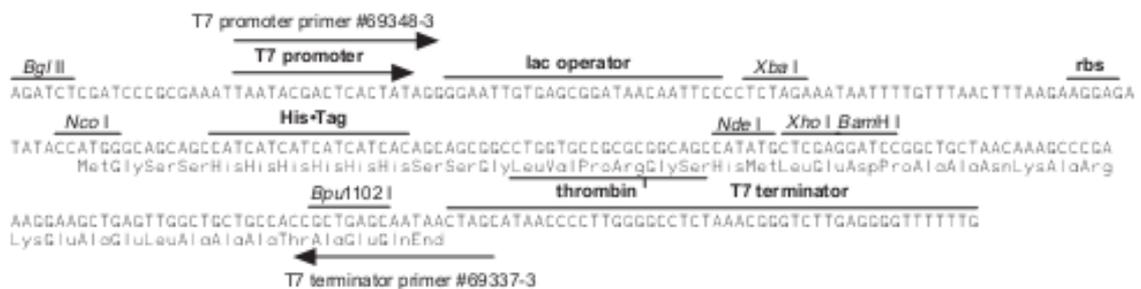
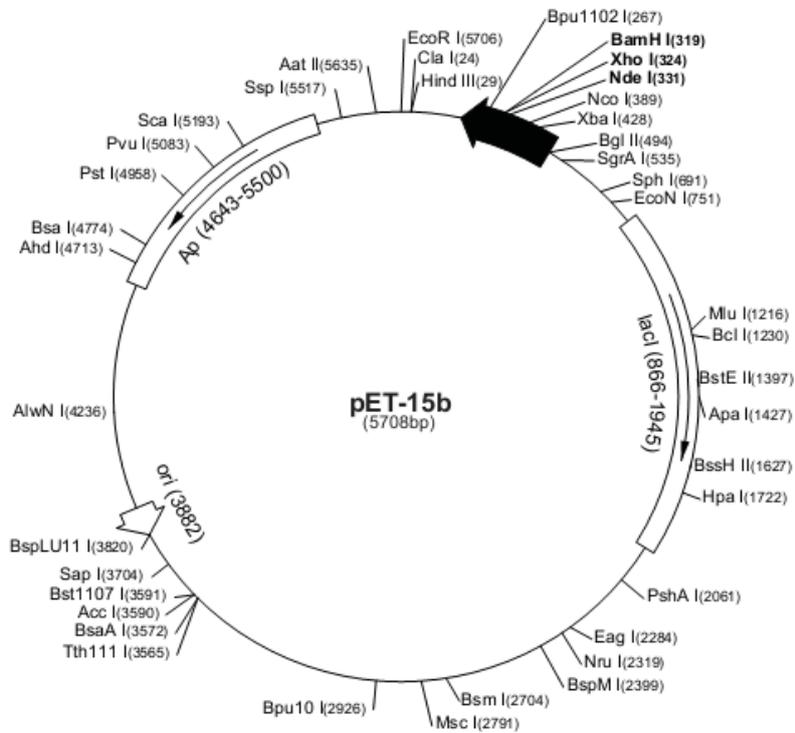


Positionen verschiedener Elemente:

Vektorgröße	8136
Ampicillin Resistenzgen	239-1098
Neomycin Resistenzgen	4216-3438
Col E1 origin	1253-1872
SV40 origin	4723-4658

Quelle und weitere Informationen: <http://genome-www.stanford.edu/vectordb/>

### 8.4 Vektorkarte des Expressionsvektors pET-15b



pET-15b Klonierungs-/Expressions-Region

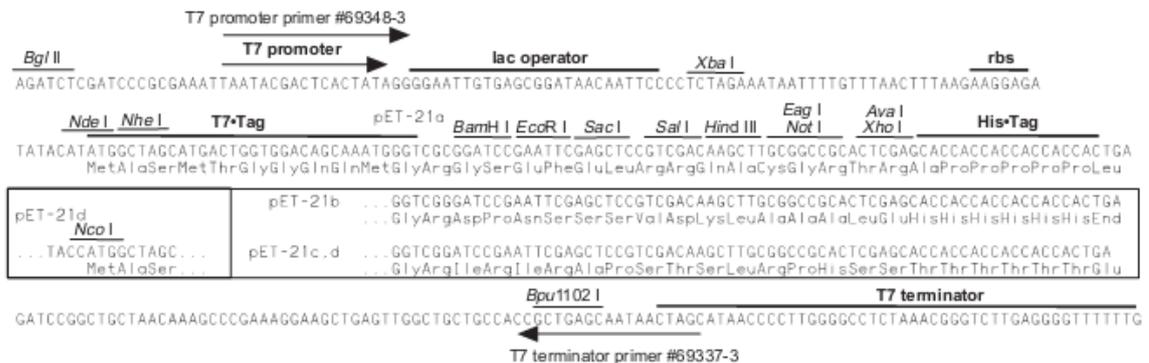
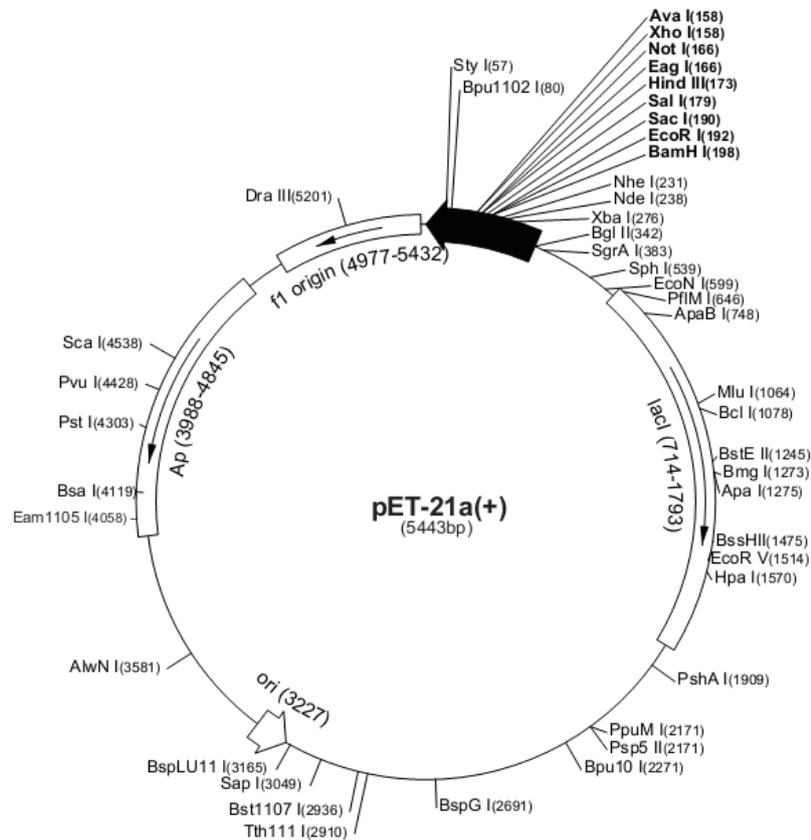
Positionen verschiedener Elemente:

MCS	319-335
His-Tag	362-380
T7 Promotor	463-479
T7 Terminator	213-259
T7 Transkriptionsstart	452

Quelle:

www.merckmillipore.de

### 8.5 Vektorkarte des Expressionsvektors pET-21a(+)



pET-21a(+) Klonierungs-/Expressions-Region

Positionen verschiedener Elemente:

MCS 158-203

His-Tag 140-157

T7 Promotor / Terminator 311-327 / 26-72

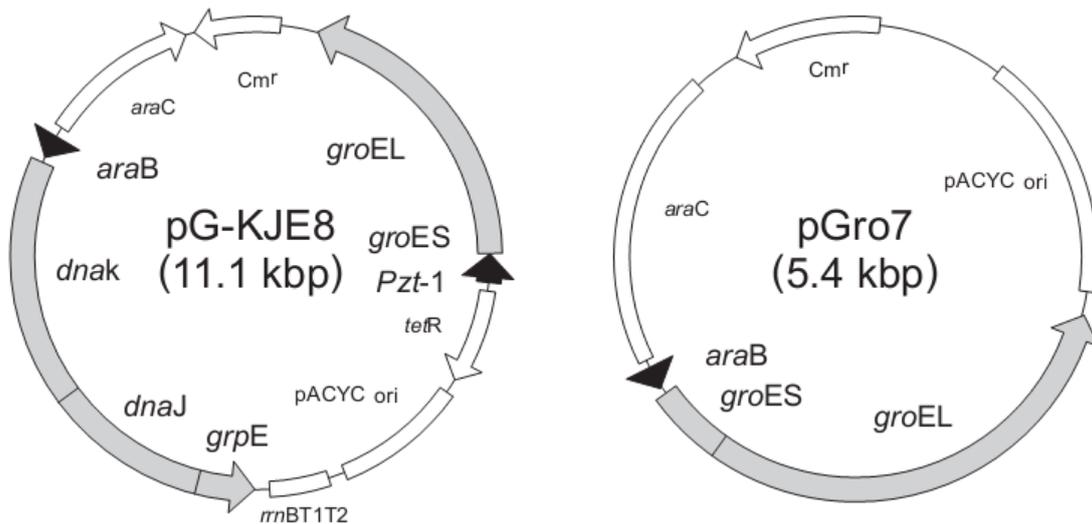
T7 Transkriptionsstart 310

Quelle:

www.merckmillipore.de



## 8.7 Vektorkarten der Chaperon-Vektoren



Plasmid	Chaperone	Promotoren	Induzierer	Resistenzgen
pG-KJE8	dnaK, dnaJ, grpE, groES, groEL	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Chloramphenicol
pGro7	groES, groEL	<i>araB</i>	L-Arabinose	Chloramphenicol

Quelle und weitere Informationen:

[http://www.clontech.com/takara/DE/Products/Protein\\_Research/Protein\\_Folding\\_and\\_Expression/Chaperone\\_Plasmid\\_Set?sitex=10035:22372:US](http://www.clontech.com/takara/DE/Products/Protein_Research/Protein_Folding_and_Expression/Chaperone_Plasmid_Set?sitex=10035:22372:US)

## 8.8 Sequenzen der heterolog exprimierten Proteine

Dargestellt sind die Sequenzen der exprimierten Proteine (aus Kapitel 3.3) aus den unterschiedlich klonierten Konstrukten. Die fett gedruckten Aminosäuren zeigen die Motive der Affinitäts-tags (6 x Histidin für den His-tag, die 8 Aminosäuren WSHPQFEK für den Strep-tag). Die von den Vektoren stammenden Sequenzen sind in rot dargestellt; die Gensequenzen, welche in die Vektoren kloniert wurden, sind schwarz. Die unterstrichenen Sequenzen repräsentieren das Twin-Arginin-Motiv. Die gelb hinterlegten Aminosäuren zeigen die mutierten Stellen, bei denen die Cysteine des medialen und distalen Eisen-Schwefel Clusters gegen Serine ausgetauscht wurden, während die magentafarbenen Kästchen die zwei zusätzlichen Cysteine identifiziert, die gegen Glycine ausgetauscht wurden.

- a) Sequenz des aus pET15b exprimierten Proteins PfsA

**MGSSHHHHHSSGLVPRGSH**METFWEVFKRHGVSRRDFLKFFATTITGLMGLAPS  
MVPEVVRAMETKPRVPVLWIHLECTCCSESFIRSATPLASDVVLSMISLEYDDTLS  
AAAGEAVEKHRERIIKEYWGNYLAVEGNPPLGEDGMYCIIGRPFVEILKESAEGA  
KAVIAWGSCASWGCVQAAKPNPTTAVPIDKVIKDKPIIKVPGCPPIAEVMTGVIMYM  
VLF

- b) Sequenz des aus pET51b(+) exprimierten Proteins SpcD

**MASWSHPQFEKGADDDDKVPDP**MKISIGLGKEGVEERLAERGVSRRDFLKFFCTAIA  
VTMGMGPAFAPEVARALMGP RRPSVVYLHNAECTGCSESVLRAFEPYIDTLIDTL  
SLDYHETIMAAAGDAAEALEQAVNSPHGFIAVVEGGIPTAANGIYGKVANHTMLDI  
CSRILPKAQAVIAYGTCATFGGVQAAKPNPTGAKGVNDALKHLGVKAINIAGCPPNP  
YNLVGTIVYYLK

- c) Sequenz des aus pET51b(+) exprimierten Proteins PfsA

**MASWSHPQFEKGADDDDKVPDP**METFWEVFKRHGVSRRDFLKFFATTITGLMGLA  
PSMVPEVVRAMETKPRVPVLWIHLECTCCSESFIRSATPLASDVVLSMISLEYDDT  
LSAAAGEAVEKHRERIIKEYWGNYLAVEGNPPLGEDGMYCIIGRPFVEILKESAEG  
AKAVIAWGSCASWGCVQAAKPNPTTAVPIDKVIKDKPIIKVPGCPPIAEVMTGVIMY  
MVL

- d) Sequenz des aus pET21a(+) exprimierten Proteins PfsA  
 METKPRVPVLWIHGLECTCCSESFIRSATPLASDVVLSMISLEYDDTLSAAAGEAVE  
 KHRERIIKEYWGNYLAVEGNPPLGEDGMYCIIGGRPFVEILKESAEGAKAVIAWGSC  
 ASWGCVQAAKPNPTTAVPIDKVIKDKPIIKVPGCPPIAEVMTGVIMYMLV**WSHPQFE**  
**K**
- e) Sequenz des aus pET21a(+) exprimierten Proteins SpcD  
 MLMGPRRPSVVYLHNAECTGCSESVLRAFEPYIDTLILDLSLDYHETIMAAAGDAA  
 EAALQAVNSPHGFIAVVEGGIPTAANGIYGKVANHTMLDICSRLPKAQAVIAYGTC  
 ATFGGVQAAKPNPTGAKGVNDALKHLGVKAINIAGCPPNPYNLVGTIVYYLK**WSHP**  
**QFEK**
- f) Sequenz des aus pET21a(+) exprimierten Proteins Aq-SSU  
 METKPRVPVLWIHGLECTCCSESFIRSATPLASDVVLSMISLEYDDTLSAAAGEAVE  
 KHRERIIKEYWGNYLAVEGNPPLGEDGMYCIIGGRPFVEILKESAEGAKAVIAWGSC  
 ASWGCVQAAKPNPTTAVPIDKVIKDKPIIKVPGCPPIAEVMTGVIMYMLVFDRIPLD  
 SQGRPVMFYGNRIHDT**S**YRRSFFNAGQFVEQFDDEGAKKGW**S**LYKVG**S**RGPTTY  
 N**S**GNMRWYNGLSYPIQSGHG**S**IG**S**SAENNFWDNGPFYER**WSHPQFEK**
- g) Sequenz des aus pET21a(+) exprimierten Proteins DvMF-SSU  
 MLMGPRRPSVVYLHNAECTGCSESVLRAFEPYIDTLILDLSLDYHETIMAAAGDAA  
 EAALQAVNSPHGFIAVVEGGIPTAANGIYGKVANHTMLDICSRLPKAQAVIAYGTC  
 ATFGGVQAAKPNPTGAKGVNDALKHLGVKAINIAGCPPNPYNLVGTIVYYLKNKAAP  
 ELDSLNRPTMFFGQTVHEQ**S**PRLPHFDAGEFAPSFEESEARKGW**S**LYELG**S**SKGPV  
 TMNN**S**PKIKFNQTNWPVDAGHP**S**IG**S**SEPFDWAMTPFYQN**WSHPQFEK**
- h) Sequenz des aus pET21a(+) exprimierten Proteins Aq-mut  
 METKPRVPVLWIHGLE**CTG**CSESFIRSATPLASDVVLSMISLEYDDTLSAAAGEAVE  
 KHRERIIKEYWGNYLAVEGNPPLGEDGMYCIIGGRPFVEILKESAEGAKAVIAWGSC  
 ASWG**G**VQAAKPNPTTAVPIDKVIKDKPIIKVPGCPPIAEVMTGVIMYMLV**WSHPQFE**  
**K**

## 8.9 Übersicht der degenerierten Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten degenerierten Primer setzen sich aus mehreren ähnlichen Primer-Sequenzen zusammen, welche im degenerierten Code zusammengefasst werden. Die entsprechenden Basentriplets der Aminosäuren sind in der folgenden Übersicht dargestellt:

Aminosäure      Degenerierte Basen

F	TTY
W	TGG
Q	CAR
T	ACN
A	GCN
S	YSN, TCN, AGY
L	TTR, CTN, YTN
R	AGR, CGN, MGN
N	AAV
D	GAY
Y	TAY
P	CCN
I	ATH
K	AAR
E	GAR
C	TGY
H	CAY
M	ATG
V	GTN
G	GGN

<b>IUB Code</b>	N	V	B	H	D	K	S	W	M	Y	R
<b>Basen</b>	ACGT	GAC	GTC	ATC	GAT	GT	GC	AT	AC	CT	AG
<b>komplementär</b>	N	B	V	D	H	M	S	W	K	R	Y

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Jana Riethausen
Geburtstag	11.09.1983
Geburtsort	Ludwigslust
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1990 – 1991	Fritz-Reuter-Grundschule, Ludwigslust
1991 – 1992	Peter-Joseph-Lenné Grundschule, Ludwigslust
1992 – 1994	Grundschule Kellinghusen
1994 – 2001	Realschule Kellinghusen
2001 – 2004	Fachgymnasium Ernährung, Neumünster Abschluss: Abitur

### Hochschulausbildung

2004 – 2009	Diplomstudiengang Biologie an der Universität Hamburg
-------------	--

## Lebenslauf

06/2008 – 03/2009

Diplomarbeit in der Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Hamburg bei Herrn Prof. W. Streit  
„Biochemische Charakterisierung von N-Acyl-Homoserinlacton-Hydrolasen aus Bodenbakterien“

seit 04/2009

Doktorarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt am Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion (ehemals Max-Planck-Institut für bioanorganische Chemie) unter der Leitung von Herrn Prof. W. Gärtner  
„Isolierung und funktionelle Charakterisierung neuartiger Hydrogenasen sowie synthetischer [FeS]Cluster Proteine“

## 10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Gärtner und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Lubitz für die Möglichkeit, in diesem Institut meine Doktorarbeit durchführen zu können und für die Überlassung des interessanten Themas sowie die stete Diskussionsbereitschaft.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger dankbar.

Den Kooperationspartnern Herrn Prof. W. Liebl und Herrn Prof. W. Streit sowie Dr. M. Perner danke ich für ihr Interesse. Herrn Dr. O. Lenz und Herrn C. Schäfer bin ich für die freundliche Unterstützung beim Aktivitätstest in nativen Gelen dankbar.

Frau Dr. M.-E. Pandelia gilt mein besonderer Dank für ihre Hilfe bei den EPR-Messungen und der großartigen Unterstützung beim gesamten Aquifex-Thema.

Bei Herrn N. Dickmann möchte ich mich für die MALDI-TOF MS Messungen bedanken. Herrn M. Podleska bin ich für die Unterstützung im Labor, besonders bei der Zellanzucht, dankbar.

Herrn Dr. O. Rüdiger und Frau Dr. H. Shafaat gilt mein Dank für die elektrochemischen bzw. spektroskopischen Messungen an der [NiFeSe] Hydrogenase.

Bei Frau J. Siebel möchte ich mich herzlich für die ständige Hilfsbereitschaft und Anteilnahme sowie die schönen Mittagspausen bedanken.

## Danksagung

Ich danke allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts, die auf unterschiedlichste Art und Weise am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die immer für mich da waren und oft mehr an mich geglaubt haben als ich selbst!

## Danksagung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Mülheim an der Ruhr, den 02.04.2013

Jana Riethausen