

**Eisen-Schwefel-Cluster als
multifunktionelle Redoxcofaktoren –
Synthese von artifiziellen
Co-S-Biohybriden, Charakterisierung der
Metallbindung an AlkG und Untersuchung
der [FeFe]-Hydrogenase in einem
sauerstoffstabilen Zustand**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Lisa Marie Galle

aus Remscheid

Düsseldorf, Dezember 2019

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller

1. Jun.-Prof. Dr. Ingrid Span

2. Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung:

03.03.2020

Zusammenfassung

Wasserstoff gilt als der ideale Energieträger der Zukunft, da er eine sehr hohe Energiedichte besitzt und emissionsfrei verbrennt. Da H_2 in der Natur jedoch nur in geringen Mengen vorkommt ist es von zentraler Bedeutung neue Katalysatoren für die effiziente Gewinnung von Wasserstoff aus Wasser zu entwickeln. In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Dissertation die Biosynthese artifizieller, kubischer [4Co-4S]-Biohybride realisiert, die als potentielle Katalysatoren für die Wasserspaltung gelten. Da in der Natur bislang keine Co-S-Proteine bekannt sind, wurden Methoden zur Biosynthese und spektroskopischen Charakterisierung anhand von Modellproteinen aus der Familie der Rubredoxine etabliert. Nachdem die Apoproteine produziert wurden, konnte *in vitro* über chemische Rekonstitution Co an die Gerüstproteine gebunden werden. Auch wurde Co *in vivo* gezielt, unter Nutzung der *E. coli* Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierungsmaschinerie, an den Gerüstproteinen komplexiert. Dies ermöglicht neue Wege zur Herstellung artifizieller Biohybride für anspruchsvolle Elektronentransferreaktionen.

Der Abbau gesättigter Kohlenwasserstoffen ist, besonders im Fall einer Ölkatastrophe, von großem Interesse. Ein Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit dem *Pseudomonas putida* GPo1 [2Fe]-Rubredoxin AlkG, einem Elektronentransportprotein, welches an der Hydroxylierung der schwer zu funktionalisierenden Alkane zu lineare Alkohole beteiligt ist. Es ist das einzige bekannte Rubredoxin, welches aus zwei Rubredoxindomänen besteht, wobei die Funktion der N-terminalen Domäne noch nicht abschließend geklärt ist. Es konnte gezeigt werden, dass diese zweiwertige Metallionen, wie Fe(II) und Co(II), im Vergleich zur C-terminalen Domäne, weniger stark komplexiert, wodurch das Metallion leicht durch Sauerstoff oxidiert werden kann. Des Weiteren wird die Sekundärstruktur des N-Terminus über die Bindung an die C-terminale Domäne stabilisiert. Die neuen Erkenntnisse können helfen, die Katalyse der Alkanhydroxylierung nutzbar zu machen.

In der Natur sind [FeFe]-Hydrogenase die aktivsten Katalysatoren in der Wasserstoffproduktion. Sie sind jedoch extrem sauerstoffempfindlich und daher für biotechnologische Anwendungen ungeeignet. In dieser Arbeit wurde ein sauerstoffstabiler Zustand der [FeFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans* strukturell untersucht und Einblicke in den Mechanismus gewonnen, wie sich dieses Protein vor sauerstoffbedingter Degradation schützt. Dabei wird ein HS^- -Liganden an die freie Koordinationsstelle des H-Clusters gebunden.

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in Fe-S-Proteinen möglich ist, Fe durch Co zu ersetzen und so potentielle Katalysatoren für die Wasserspaltung zu generieren. Zudem wurden neue Einblicke in die Rolle des ungewöhnlichen Rubredoxins AlkG bei der Alkanhydroxylierung gewonnen. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Schwefel das aktive Zentrum der [FeFe]-Hydrogenase vor Zersetzung durch Sauerstoff schützt.

Summary

Hydrogen gas is thought to be an ideal energy carrier due to its high energy density and its emission-free combustion. Because it cannot be found in great quantities in nature, it is necessary to develop new catalysts for the efficient production of hydrogen gas from water. During this work the biosynthesis of artificial, cubic [4Co-4S]-biohybrids have been established, which are potential catalysts for water splitting. No cobalt-sulfur-catalysts are known in nature. Thus, techniques for the biosynthesis and the spectroscopic characterization have been developed using the rubredoxin-family as model proteins. After protein production, cobalt-proteins have been produced *in vitro* using the chemical reconstitution method. Furthermore, the *E. coli* iron-sulfur assembly machinery has been used to transfer the cobalt cluster specifically *in vivo*. These techniques enable new possibilities of producing artificial biohybrids for challenging electron transfer reactions.

Especially in case of an oil disaster, methods for the degradation of saturated hydrocarbons are highly relevant. The *Pseudomonas putida* GPo1 [2Fe]-rubredoxin AlkG, which is the only known rubredoxin with two rubredoxin-like domains, transfers electrons for the hydroxylation of alkanes to linear alcohols. During this work it has been shown, that the N-terminal domain complexes divalent metal ions less strong compared to the C-terminal domain. Thus leads to an easy oxidation of the metal ion. Further, the C-terminal domain stabilizes the secondary structure of the N-terminal domain. The new finding could help to utilize the alkane hydroxylation catalysis for biotechnical approaches.

In nature the [FeFe]-hydrogenases are the most active catalysts in hydrogen production. But they are very sensitive to oxygen and thus less usable in industry. In this work, the structure of the *Desulfovibrio desulfuricans* [FeFe]-hydrogenase in an oxygen stable state has been investigated. That gives new insight into the mechanism of protection against degradation through oxygen. In this state an HS⁻ ligand is bound at the free coordination site of the H-cluster.

To sum up, it has been demonstrated, that it is possible to replace iron by cobalt in iron-sulfur proteins to produce potential catalysts for water splitting. Further new insights into the role of the unusual rubredoxin AlkG in alkane hydroxylation has been given. Finally, it has been shown that a sulfur ligand protects the active site of the [FeFe]-hydrogenase from degradation through oxygen.

Abkürzungsverzeichnis

<i>AaAcn</i>	<i>Aquifex aeolicus</i> Aconitat-Hydratase
Acn	Acetonitril
AcnA	Aconitat-Hydratase A
AcnB	Aconitat-Hydratase B
ADT	Azapropan-1,3-dithiolat
AEC	Anionenaustauschchromatografie
AlkG-CT	C-terminale Domäne und Linker von AlkG
AlkG-NT	N-terminale Domäne von AlkG
AlkT	Rubredoxinreduktase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Zirkulardichroismus
CIA	„cytosolic iron sulfur protein assembly“
<i>CmRxn</i>	<i>Cupriavidus metallidurans</i> Rubredoxin
CN	Cyanid
CO	Carbonyl
CV	Säulenvolumen
<i>DdHydAb</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> [FeFe]-Hydrogenase
<i>DgRxn</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i> Rubredoxin
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EAS	Elektronenabsorptionsspektrometrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronenspinresonanz
eq.	Äquivalente
ESI-MS	Massenspektrometrie mit Elektronenspray-Ionisation
Fe _d	distales Eisen
Fe _p	proximales Eisen
GSH	Gluthathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HAR	Hexaaminruthenium(III)-Chlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe-Interaktions-Chromatografie
H _{inact}	sauerstoffstabiles, inaktives H-Cluster
H _{OX}	oxidiertes H-Cluster
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
IRE-BP	„iron-response element binding protein“
ISC	„iron-sulfur cluster“
IspH	4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatreduktase
Kan	Kanamycin
LB	„lysogeny broth“
LF	d-d-Ligandenfeld
LMCT	Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NadA	Quinolinsäuresynthase
NadA	L-Aspartatoxidase
NIF	„nitrogen fixation“
NMR	Kernspinresonanz
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SEC	Größenausschlusschromatografie
ROS	reaktive Sauerstoffspezien
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUF	„sulfur fixation“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	„terrific broth“
TBS	„tris buffered saline“
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
<i>TtAcn</i>	<i>Thermus thermophilus</i> Aconitat-Hydratase
Ulp1	„ubiquitin-like-specific“ Proteas 1
UV/VIS	ultraviolett/sichtbar
YT	„yeast trypton“
z.b.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wasserstoff als Energieträger	2
1.2	Das Übergangsmetall Kobalt in biologischen Systemen	2
1.2.1	Kobaltstress	3
1.2.2	Einfluss von Kobaltstress auf Eisen-Schwefel-Proteine	4
1.2.3	Kobalt als artifizieller Katalysator	5
1.3	Eisen-Schwefel-Proteine	6
1.3.1	Struktur von Eisen-Schwefel-Clustern	7
1.3.2	[1Fe]-Cluster der Rubredoxine	10
1.3.3	[4Fe-4S]-Proteine	16
1.3.4	Hydrogenasen	21
1.3.5	Anpassung des Redoxpotentials von Eisen-Schwefel-Proteinen	27
1.4	Zielsetzung	28
2	Material und Methoden	31
2.1	Material	32
2.1.1	Chemikalien	32
2.1.2	Primer	32
2.1.3	Plasmide	34
2.1.4	<i>E. coli</i> Stämme	34
2.1.5	Proteine	35
2.1.6	Nährmedien	35
2.1.7	Puffer und Lösungen	38
2.1.8	Größenstandards	45

2.1.9	Säulen	45
2.1.10	Laborgeräte	46
2.1.11	Software	47
2.2	Methoden	47
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	47
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	51
2.2.3	Biochemische Methoden	56
2.2.4	Physikalische Methoden	60
3	Ergebnisse	69
3.1	Artifizielle Cobalt-Schwefel-Proteine	70
3.1.1	<i>In vitro</i> Assemblierung von Kobalt-Schwefel-Proteinen . .	70
3.1.2	<i>In vivo</i> -Synthese artifizieller Kobalt-Schwefel-Proteine . . .	82
3.2	Die Eisen-Bindestellen des <i>P. putida</i> AlkG	85
3.2.1	Charakterisierung der Metallbindestelle mit Kobalt	85
3.2.2	Charakterisierung der Metallbindestelle mit Eisen	91
3.3	Strukturelle Charakterisierung einer sauerstoffstabilen Variante der <i>DdHydAB</i>	101
3.3.1	<i>DdHydAB</i> nach drei Tagen unter Luftsauerstoff	101
3.3.2	Wechsel der Liganden unter aeroben Bedingungen	104
4	Diskussion	107
4.1	Assemblierung von Kobalt-Schwefel-Biohybriden	108
4.1.1	Chemische Rekonstitution von artifiziellen Kobalt- Schwefel-Clustern	109
4.1.2	Biologische Inkorporation von artifiziellen Kobalt- Schwefel-Clustern	113
4.2	Die N-terminale Eisenbindestelle des AlkG	115
4.2.1	Komplexierung von Co(II) durch die Domänen des AlkG .	115
4.2.2	Komplexierung von Eisen in den Domänen des AlkG . . .	118
4.3	Die sauerstoffstabile <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Hydrogenase . . .	122
4.4	Ausblick	125

5	Anhang	127
5.1	Charakterisierung des AlkG	128
5.2	Kristallstruktur der <i>DdHydAB</i>	128
5.3	Plasmidkarten	131
6	Danksagung	139
	Tabellenverzeichnis	141
	Abbildungsverzeichnis	143
	Literaturverzeichnis	145

1 Einleitung

Inhaltsangabe

1.1	Wasserstoff als Energieträger	2
1.2	Das Übergangsmetall Kobalt in biologischen Systemen . . .	2
1.3	Eisen-Schwefel-Proteine	6
1.4	Zielsetzung	28

1.1 Wasserstoff als Energieträger

In der modernen Welt gewinnt die Suche nach einer erneuerbaren Energiequelle immer mehr an Bedeutung. Dabei rückt auch die Nutzung von Wasserstoff mit seiner hohen Energiedichte als emissionsfreier Energieträger, mit welchem in einer Brennstoffzelle als Nebenprodukt nur Wasser entsteht, immer mehr in den Fokus. Dabei kann elementarer Wasserstoff allerdings nur in geringen Menge aus der Natur gewonnen werden.^[1, 2] Eine Alternative dazu bietet die artifizielle Wasserstoffproduktion. Diese ist ein Protonen-gekoppelter Transfer von vier Elektronen, welcher in eine Wasseroxidation und eine Wasserstoffentwicklung geteilt werden kann. In der Natur können Nickel-, Mangan- und Eisen-haltige Enzyme Wasserstoff effektiv und reversibel in Protonen und Elektronen spalten oder diese zu Wasserstoff umsetzen. Zu diesen Enzymen gehören Hydrogenasen, Nitrogenasen oder das Photosystem II (PSII).^[2--4] Im 20 Untereinheiten-großen PSII an der Thylakoidmembran findet die Umsetzung mit dem einzigartigen, komplexen [Ca-4Mn-5O]-Cluster statt. Dort ist ein Mangan mit einem kubischen [Ca-3Mn-4O]-Konstrukt verlinkt.^[5, 6]

Für die artifizielle Wasserstoffproduktion ist bisher kein effizienter, kostengünstiger Katalysator bekannt. Es werden hauptsächlich teure Edelmetallkatalysatoren mit geringen Ausbeuten eingesetzt.^[3] Aber auch Kobalt hat sich als ein vielseitiges nicht-Edelmetall in der Entwicklung von synthetischen Katalysatoren für die Wasserspaltung bewiesen.^[2] Dabei wurden auch synthetische Kobalt-Cluster-Proteine synthetisiert, welche allerdings nur in organischen Lösungsmitteln oder in einer Mischung aus Wasser und organischen Lösungsmitteln Stabilität und Aktivität zeigten.^[2, 7, 8]

1.2 Das Übergangsmetall Kobalt in biologischen Systemen

Kobalt ist als Spurenelement in Böden, auf der Erdoberfläche und im Grundwasser enthalten, wobei es hauptsächlich in der Co(II)- oder Co(III)-Form vorliegt.^[9]

Das seltene Metall ist relativ unreaktiv, lässt sich bei natürlichen Umgebungstemperaturen nicht leicht von Luftsauerstoff oxidieren und ist in sowohl als Co(II), als auch als Co(III) wasserlöslich. In seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften ähnelt es seinen Nachbarn im Periodensystem, Eisen und Nickel.^[10]

In allen Pro- und Eukaryotischen Zellen ist Kobalt enthalten, wo es ein essentieller Cofaktor einer Vielzahl von Proteinen^[11], vor allem von Vitamin B12-abhängigen Enzymen^[12] oder Cobaluminen^[13], ist. Allerdings wirkt sich eine Erhöhung der Co(II)-Konzentration toxisch sowohl auf prokaryotische^[14], als auch auf eukaryotische Zellen^[15] aus.

1.2.1 Kobaltstress

Die Stressreaktion auf Kobalt ist in *Escherichia coli* (*E. coli*) abhängig von der Kobaltkonzentration im Medium. Während Kobaltkonzentrationen bis zu 500 μM keinen sichtbaren Effekt auf *E. coli*-Zellen zeigen, ist deren Wachstum bei über 1 mM Kobalt komplett blockiert.^[16] Für andere Organismen, wie *Salmonella enterica*, genügt eine Kobaltkonzentration von 160 μM , um das Zellwachstum komplett zu inhibieren.^[17] Bei Verwendung von Vollmedien, welche Hefeextrakt oder Trypton enthalten, muss allerdings beachtet werden, dass die reale Kobaltkonzentration von der Bioverfügbarkeit abweichen kann. Dies ist vermutlich auf die Bildung von Kobaltchelaten zurückzuführen.^[18]

Zur Vermeidung von Kobaltstress existieren verschiedenen Mechanismen zum Binden und zum Export des Co(II). So wird in *E. coli* das *rcnA*-Gen bei Kobalt- oder Nickelstress exprimiert. Es kodiert für ein in der Zellmembran verankertes Polypeptid, welches Kobalt und Nickel aus der Zelle transportiert.^[19] In *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine Induktion des Eisenregulons bei Kobaltstress beobachtet, vergleichbar mit der Reaktion auf Eisenmangel. Dabei wird, durch die erhöhte Aufnahme von Eisen und die damit verbundene hohe intrazelluläre Eisenkonzentration, die Toxizität von Kobalt reduziert.^[14, 20] Insgesamt zeigen Transkriptomanalysen, dass sich die Zellen an hohe Kobaltkonzentrationen adaptieren und gestörte Reaktionswege umgehen können.^[21]

Der Mechanismus, welcher hinter der Toxizität von Kobalt steht, ist noch nicht abschließend geklärt. Aufgrund seiner Redoxeigenschaften ist Kobalt an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt und induziert somit oxidativen Stress.^[22] Auch eine Reduktion der Aufnahme von Schwefel in die Zelle wird diskutiert.^[17] Weiter konnten Ranquet *et al.* zeigen, dass ein Hauptaspekt des Kobaltstress in *E. coli* die Interaktion von Co^{2+} -Ionen mit Eisen-Schwefel-Proteinen ist.^[14]

1.2.2 Einfluss von Kobaltstress auf Eisen-Schwefel-Proteine

Wie Eisen liegt Kobalt hauptsächlich im Co(II)- oder Co(III)-Redox-Zustand vor und zeigt eine hohe Affinität gegenüber Schwefel.^[21] Daher ist es nicht überraschend, dass dieses mit Eisen um die selben Bindestellen in Proteinen konkurriert. Es kommt unter anderem zu einem Einbau eines [4Co-4S]-Clusters in die *E. coli* Aconitat Hydratase B (AcnB) und damit zu einem Verlust an AcnB-Aktivität. Hohe intrazelluläre Kobaltkonzentrationen in *E. coli* führen demnach zu einer Inhibierung von Eisen-Schwefel-Proteinen.^[14]

Das Kobalt kompetitiert ebenfalls mit dem Eisen um die Bindestellen der Proteine der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthesemaschinerie. Daher wird es bei hohen Kobaltchlorid-Konzentrationen anstelle des Eisens in Eisen-Schwefel-Proteine eingebaut. Dabei konnte gezeigt werden, dass die „iron-sulfur cluster“ (ISC)-Assemblierungsmaschinerie sensitiver auf Kobaltchlorid reagiert, als das „sulfur fixation“ (SUF)-System.^[14] Auch *in vitro* sind die Gerüstproteine IscU aus *E. coli* und SufU aus *Streptococcus mutans* in der Lage, Co^{2+} -Ionen im aktiven Zentrum zu binden.^[23] Dies führt dann zu einem signifikanten Verlust an Katalyseaktivität von bis zu 80 % bei verschiedenen Eisen-Schwefel-Proteinen.^[14, 17] Zu den betroffenen Proteinen gehören Enzyme des Citratzyklus, wie die AcnB, oder die tRNA-modifizierende Methylthiotransferase MiaB.^[14]

1.2.3 Kobalt als artifizieller Katalysator

Neben den natürlich vorkommenden Kobalt-haltigen Enzymen existiert auch eine Vielzahl von artifiziellen katalytischen Kobaltkomplexen. Für die Wasseroxidation wurde Co(II) an der Oberfläche der metalloorganischen Struktur NU-1000 gebunden, welches dann eine elektrokatalytische Aktivität zeigt.^[24] Auch der mononuklearen Kobaltkomplex $[\text{Co(III)(DPK OH)}_2]\text{Cl}$ zeigte eine robuste Oxidationsaktivität an Wasser.^[25]

Die Forschung an strukturellen und elektrochemischen Analoga zu $[\text{4Fe-4S}]$ -Proteinen in Form von $[\text{4Fe-4S-}S_{\text{Cys}})_3\text{-L}]$ (L=Aminosäure oder Hydroxid/Wasser)^[26], führte Deng *et al.* auch zur Synthese von Co-substituierten Varianten. Die Kobalt-Cluster sind löslich und aktiv in organischen Lösungsmitteln und dabei beinahe isostrukturell zu den Eisen-Clustern. Allerdings zeigten die Kobalt-Cluster größere Potentialdifferenzen, wobei diese allerdings auch vom Liganden abhängig waren.^[27] Kubische $[\text{4Co-4O}]$ -Cluster wurden ausgehend vom komplexen Cofactor des PSII entwickelt. Diese konnten die Wasseroxidation katalysieren, was anhand von Sauerstoffproduktion nachgewiesen wurde.^[28]

Eine weitere Möglichkeit, artifizielle Kobalt-Katalysatoren zu generieren, ist der Austausch von Metallionen in bekannten Gerüstproteinen *in vitro*. So konnte beim Zink-Protein Carboxypeptidases A die Aktivität um 100 % gesteigert werden, indem das Zink- durch ein Kobaltion ersetzt wurde.^[29] Auch das Eisen im Porphyrin von Hämproteinen kann durch andere Metallionen, wie Kobalt ausgetauscht werden, um neue, nicht-biologische Katalysatoren zu erhalten.^[30] Dabei ist es auch möglich, dieses *in vivo* während der rekombinanten Genexpression in *E. coli* zu inkorporieren. Dazu wurden die Zellen an ein spezielles M9-Minimalmedium mit $150 \mu\text{M CoCl}_2$ adaptiert und im Anschluss die Genexpression induziert. Dies führte zu einer Ausbeute von 92 % Co- und 8 % Fe-Porphyrin bei weiterhin bestehender Katalyseaktivität.^[31]

Auch das Eisen-Rubredoxin AlkG aus *Pseudomonas putida* (*P. putida*) GPo1 (früher *Pseudomonas oleovorans*) kann *in vitro* in eine Kobaltform umgewandelt werden. Dazu wurden harsche Bedingungen mit mehrmaliger Fällung mit Trichloressigsäure, Solubilisierung in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer

mit 60 mM β -Mercaptoethanol und Rekonstitution von etwa 250 μ M AlkG mit Co(II) gewählt. Dies führte zu einem Aktivitätsverlust von etwa 30 % im Vergleich zum Wildtyp.^[32] Eisen-Schwefel-Proteine, auch im Bezug auf den Austausch des Eisens mit Kobalt, stehen im Fokus dieser Arbeit.

1.3 Eisen-Schwefel-Proteine

Eisen-Schwefel-Proteine gehören zu den ersten Katalysatoren, welche sich in der Natur entwickelt haben. Bei den hohen Temperaturen der Vulkanschlote während der Frühgeschichte der Erde war die Verfügbarkeit von Eisen und Schwefel sehr hoch, was die Entstehung von Eisen-Schwefel-Clustern förderte. Auch heute noch ist Eisen das vierthäufigste Element auf der Erde, wobei es meistens als Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Ion vorliegt. Schwefel findet man mit Wertigkeiten zwischen 2- und 6+, wobei es klein genug ist, dass seine nukleare Ladung keinen allzu großen Effekt auf den Cofaktor ausübt, und groß genug, um 3d-Orbitale zu besetzen.^[33]

In fast allen lebenden Organismen wurden Eisen-Schwefel-Proteine identifiziert, wobei Größe und Aufbau des Clusters in den Proteinen variieren können.^[33] Das erste isolierte Eisen-Schwefel-Protein war 1960 ein mitochondriales Membranprotein.^[34] In den darauffolgenden Jahren wurden eine Vielzahl von kleinen, löslichen Eisen-Schwefel-Proteinen, z.B. Ferredoxine^[35] entdeckt. In diesen wurden Eisen und anorganisches Schwefel als Bestandteil des Cofaktors identifiziert.^[36]

Die Funktion vieler Proteine ist abhängig von der Anwesenheit eines Cofaktors. Dabei sind, aufgrund ihrer großen strukturellen Flexibilität und chemischen Reaktivität, Eisen-Schwefel-Cluster eine der häufigsten Cofaktoren in Proteinen. Sie sind an unzähligen Redox- und nicht-Redoxreaktionen beteiligt. Dabei transportieren sie Elektronen oder katalysieren eine Vielzahl von essentiellen zellulären Prozessen, wie der Regulation der Genexpression, der DNA-Replikation oder der Atmungskette.^[33, 37–39] In anderen Eisen-Schwefel-Proteinen stabilisiert das Cluster die katalytisch aktive dreidimensionale Struktur^[40] oder schützt

es vor Degradation durch intrazelluläre Proteasen^[41]. Eisen-Schwefel-Cluster haben eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff^[42], doch kann das Proteingerüst, besonders in thermostabilen Proteinen, ihre Stabilität erhöhen.^[43] Charakterisiert wurden Eisen-Schwefel-Proteine mittels verschiedener Methoden, wie spektroskopischer Techniken, Studien der chemischen und magnetischen Eigenschaften oder der Röntgenstrukturanalyse.^[36, 44–46] Dabei unterscheiden sich die Proteine auch in Aufbau und Struktur des Eisen-Schwefel-Clusters.

1.3.1 Struktur von Eisen-Schwefel-Clustern

Eisen-Schwefel-Cluster existieren in vielen verschiedenen Geometrien (vgl. Abb. 1.1). Die [1Fe]-Cluster sind die einfachste Variante der Eisen-Schwefel-Proteine.^[47] Am häufigsten aber kommen die rhombischen [2Fe-2S]- und die kubischen [4Fe-4S]-Cluster vor, welche, auch über synthetischen Analoga, gut untersucht sind.^[48] Weniger häufig findet man die [3Fe-4S]-Cluster, deren biologische Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Allerdings haben Studien gezeigt, dass diese Elektronen transportieren und andere zweiwertige Metallionen, wie Mn-, Ni-, Cd-, Cu-, Tl- oder Co-Ionen binden können.^[33]

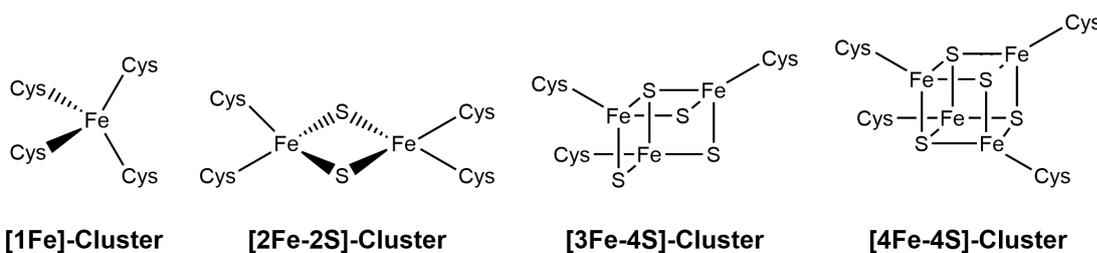


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern. Das einfachste Cluster ist das [1Fe]-Cluster der Rubredoxine, während die häufigsten Cluster rhombische [2Fe-2S]-Cluster und kubische [4Fe-4S]-Cluster sind. Das [3Fe-4S]-Cluster entsteht häufig durch den Zerfall des [4Fe-4S]-Clusters. Gebunden werden die Eisen-Schwefel-Cluster meist über Cysteinreste. (nach [33, 47])

Es existieren auch komplexere Cluster mit höherer Nuklearität, wobei diese meist Kombinationen oder Modifikationen der rhombischen und kubischen Cluster

sind.^[49] Auch andere Metalle als Eisen, wie Nickel oder Molybdän, können Teil der natürlichen Cluster sein.^[50, 51]

Im Holoprotein wird das Eisen-Schwefel-Cluster über das Eisen meist an Schwefelatome von Cysteinresten, aber in manchen Fällen auch an Stickstoffatome von Histidinen und Argininen oder über Sauerstoffatome an Serinen und Aspartaten gebunden.^[52] Auch eine Koordination über exogene Liganden wie Wasser, diverse Substrate und andere Cofaktoren wurde beobachtet.^[37] Die Eisen-Schwefel-Cluster werden meist nicht in den Zielproteinen, sondern über spezielle Assemblierungsmaschinerien in Gerüstproteinen gebildet.

1.3.1.1 Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster

Zur Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster werden Eisenionen (je nach Clustertyp Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Ionen) und anorganischem Sulfid-Anionen (S^{2-}) zusammengesetzt. Dabei entsteht zunächst ein rhombisches $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster. Zwei dieser Cluster können zu einem kubischen $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster zusammengesetzt werden, welches im Anschluss modifiziert werden kann.^[33]

Die *in vivo*-Biosynthese dieser Cluster und deren Transport in das Apoprotein sind streng reguliert. In Pro- und Eukaryoten existieren verschiedene Assemblierungsmaschinerien, welche jeweils in einem Operon organisiert sind (vgl. Abb. 1.2[A]) und sich in ihren Akteuren und im Funktionsprinzip ähneln (vgl. Abb. 1.2[B]).^[53] Die Anzahl und Zusammenstellung der verschiedenen Systeme variiert zwischen verschiedenen Organismen.^[54–56] In Bakterien sind drei verschiedene Assemblierungsmaschinerien bekannt.^[57] Dabei ist das ISC-Assemblierungssystem der am häufigsten genutzte Biosyntheseweg. Das SUF-System ist hauptsächlich unter Stressbedingungen, wie oxidativem Stress oder Eisenmangel, aktiv.^[54, 56, 58]

Bei diazotrophen Bakterien findet man zusätzlich die „nitrogen fixation“ (NIF)-Maschinerie. Diese ist an der Reifung des Cofaktors von Nitrogenasen beteiligt, welche es dem Bakterium ermöglichen, Stickstoff aus der Umgebung zu fixieren.^[57, 59] Eukaryoten besitzen neben der ISC-Maschinerie in den Mitochondrien noch die „cytosolic iron sulfur protein assembly“ (CIA)-Maschinerie.^[58]

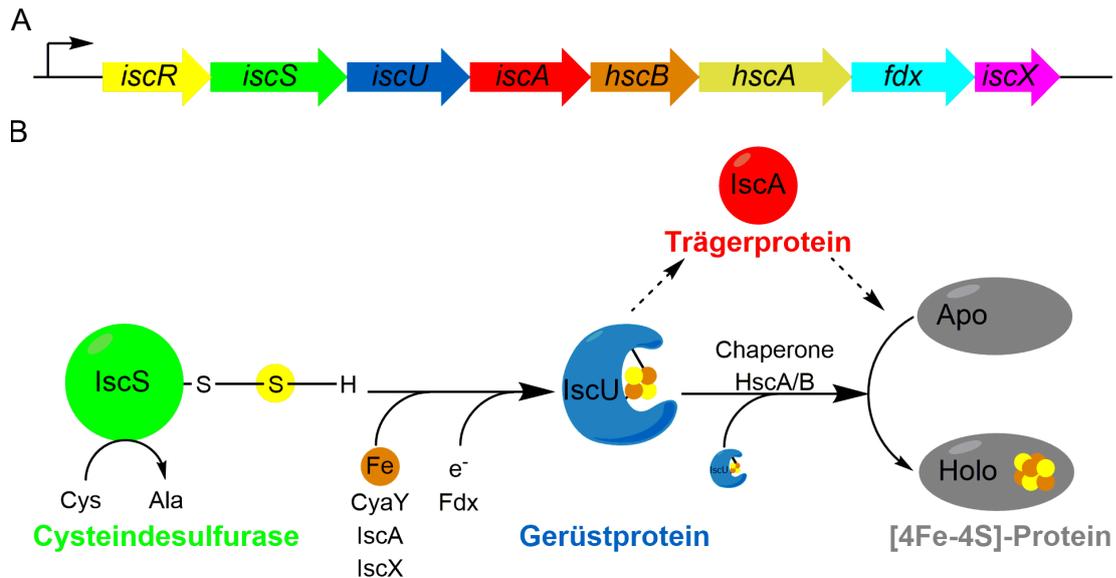


Abbildung 1.2: Die ISC-Assemblierungs Maschinerie für Eisen-Schwefel Cluster. Die Biosynthese der Cluster funktionieren in allen Organismen nach dem selben Prinzip. [A]: Wie im ISC-Operon sind die beteiligten Proteine in einer Funktionseinheit organisiert. Dazu gehören die Gene des Regulators IscR, der Cysteindesulfurase IscS, des Gerüstproteins IscU, des Trägerproteins potentiellen Eisenlieferanten IscA, d34 Chaperone HscA und HscB und des Eisentransportproteins Fdx. [B]: Im Gerüstprotein wird ein Schwefel von einer Cysteindesulfurase und Eisen zu einem [2Fe-2S]-Cluster kombiniert. Aus Kombination von zwei [2Fe-2S]-Clustern kann ein [4Fe-4S]-Cluster entstehen, welches auf ein Apoprotein übertragen werden kann. Die Eisenquelle und die Rolle weiterer Transferproteine ist noch nicht abschließend geklärt. (nach [53])

Als Schwefelquelle dient L-Cystein, von welchem eine Cysteindesulferase (IscS, SufSE bzw. NifS) ein Schwefel isoliert. Am Cofaktor Pyridoxalphosphat wird das L-Cystein dazu in Cysteinyl-Persulfat umgewandelt und das Schwefel auf ein Gerüstprotein (IscU, SufB bzw. NifS) transferiert. Zusätzlich wird Eisen von einer Eisenquelle auf das Gerüstprotein übertragen. Der Mechanismus der Addition des Eisens ist bisher nicht eindeutig geklärt. Da freies Eisen toxisch auf die Zelle wirkt, ist ein Eisendonator nötig, als welcher CyaY, IscX oder IscA diskutiert werden.^[60, 61]

Zur Bildung eines Eisen-Schwefel-Clusters aus S(0) und Fe(II) muss das Schwefel reduziert werden. Dazu stellt vermutlich Ferredoxin Elektronen zur Verfügung.^[62] Nach der Reduktion wird ein [2Fe-2S]-Cluster gebildet. Für ein [4Fe-4S]-Cluster werden im Anschluss zwei Gerüstproteine mit jeweils einem [2Fe-2S]-Cluster kombiniert.^[53, 63] Im finalen Schritt wird das Cluster auf eine Apoprotein übertragen, wobei Energie-abhängige Proteine (HscAB, SufCD) und Eisen-Schwefel-Trägerproteine (z.B. IscA oder SufA) beteiligt sein können. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass eine Vielzahl verschiedener Apoproteine mit Eisen-Schwefel-Clustern beladen werden können.^[53]

Für diese Arbeit sind [1Fe]-Rubredoxinen, kubischen [4Fe-4S]-Proteinen und Hydrogenasen von Bedeutung. Daher werden diese im folgenden genauer beschrieben. Da Rubredoxine kein Schwefelatom enthalten, gehören diese eigentlich nicht zur Gruppe der Eisen-Schwefel-Proteine. Aufgrund der identischen Koordination und Geometrie der Cluster werden Rubredoxin häufig dennoch den Eisen-Schwefel-Proteinen zugeordnet und dienen als Modellprotein.^[33] Im Rahmen dieser Arbeit soll ein besseres Verständnis für die Rolle der Rubredoxine aus *P. putida* gewonnen werden.

1.3.2 [1Fe]-Cluster der Rubredoxine

Mit einem [1Fe]-Cluster als Cofaktor sind die Rubredoxine die einfachste Variante der Eisen-Schwefel-Proteine. Sie wurden zum ersten mal 1965 von Lovenberg beschrieben.^[47] Charakterisiert werden diese durch eine mononukleare Eisenbindestelle, in welcher das Metallion über die Thiolgruppen von vier Cysteinresten

in einer tetraedrischen Geometrie koordiniert ist.^[64]

Mit 45 bis 54 Aminosäureresten haben Rubredoxine meist ein Molekulargewicht von 5 bis 6 kDa. In der Aminosäuresequenz ist zweimal die Konsensussequenz C-x-y-C-G enthalten, wobei die beiden Cysteinreste Liganden des Eisenions sind.^[65] Rubredoxine dienen als Elektronentransporter in der Zelle.^[47] So ist das *P. putida* GPo1 Rubredoxin AlkG als Elektronentransporter an der Hydroxylierung von Alkanen beteiligt.^[66]

1.3.2.1 Rubredoxine von *P. putida* GPo1

Die an der Alkandegradation beteiligten sogenannten *alk*-Gene sind in *P. putida* GPo1 in zwei Clustern (*alkBFGHJKL* und *alkST*) hintereinander auf dem OCT-Plasmid codiert. Da der G/C-Gehalt dieser Gene geringer ist, als der des Stammes wird angenommen, dass die Cluster ein 55 kb langes, mobiles Element bilden.^[67, 68]

Teil diesen Operons sind die Gene der Rubredoxine AlkG und AlkF. Das AlkG ist das einzige bekannte Rubredoxin mit zwei Eisenbindestellen. Es besteht aus einer N- (AlkG-NT) und einer C-terminalen Rubredoxindomäne mit einem etwa 70 Aminosäure-langem Linker zwischen den Domänen.^[69] Mit 19 kDa ist es mehr als dreimal so groß wie andere Rubredoxine.^[70] Analysen mittels Kernspinresonanzspektroskopie und Röntgenstreuung haben gezeigt, dass beide Domänen eine globuläre Form aufweisen und der Linker diese getrennt in Lösung hält. Da die Linkerregion nicht komplett mobil ist, können sich die beiden Domänen allerdings nicht unabhängig voneinander bewegen.^[70] Das zweite Rubredoxin aus *P. putida* AlkF ist 5,7 kDa groß und besteht nur aus einer Rubredoxindomäne. Seine Funktion ist noch nicht abschließend geklärt.^[71]

Die Struktur der Rubredoxine wurde intensiv mittels Röntgenstrukturanalyse (z.B. von *Desulfovibrio desulfuricans*^[72] (*D. desulfuricans*) und *Pyrococcus furiosus*^[73]) und Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie (z.B. von *Desulfovibrio vulgaris*^[74] und *Clostridium pasteurianum*^[75]) untersucht. Auch von der Cd-substituierten C-terminalen Domäne des AlkG wurde die Struktur mittel NMR aufgeklärt. (vgl. Abb. 1.3).^[70]

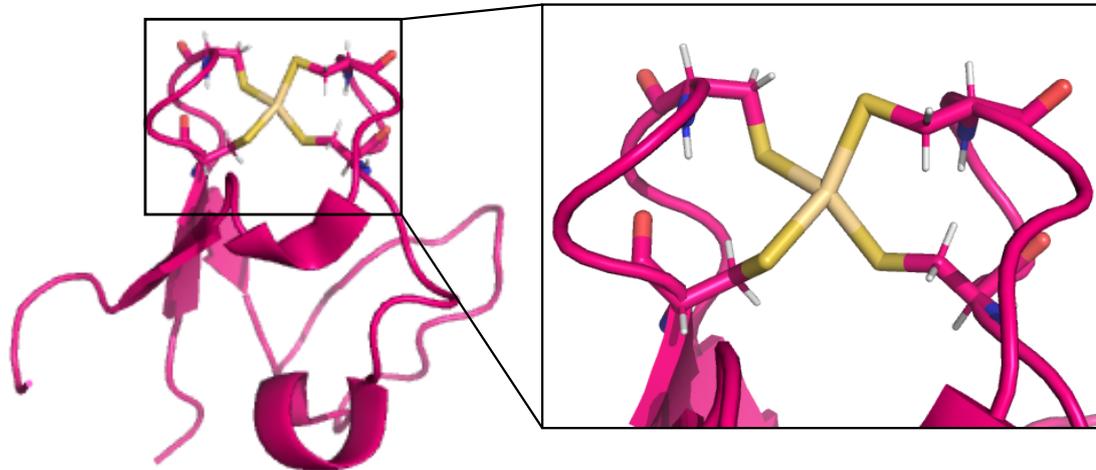


Abbildung 1.3: Strukturmodell des C-terminalen Domäne des *P. putida* Rubredoxins AlkG. Die Struktur der Cadmium-substituierten Domäne wurde mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie bestimmt (PDB-ID: 1S24). Das AlkG-CT ist insgesamt relativ ungeordnet und besteht aus drei β -Strängen, einer kurzen α -Helix und engen Turns. In der Metallbindestelle ist ein Cd^{2+} -Ion an vier Cysteinresten gebunden. (nach [70])

Dieses nimmt dieselbe Konformation ein, unabhängig davon, ob es als freie Domäne oder gebunden an den N-Terminus vorliegt.^[76] Das Strukturmodell enthält eine kurze α -Helix und ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt mit engen Turns, was einer großen Homologie zu anderen publizierten Rubredoxinstrukturen entspricht. Ein Teil des Aminosäurelinkers ist nur gering strukturiert. Wie die meisten Rubredoxine bindet der C-Terminus des AlkG das Eisen über die für Rubredoxine typischen Bindemotive Cys-X-X-Cys-Gly. Im Gegensatz dazu ist beim AlkG-NT das Glycin im ersten Motiv durch ein Asparagin und im zweiten Motiv durch ein Alanin ausgetauscht.^[76]

Zunächst wurde angenommen, dass die zweite Domäne des AlkG durch eine Genduplikation entstanden ist^[71] und kein Unterschied zwischen den beiden Domänen besteht^[32]. Doch haben funktionelle und Sequenzanalysen gezeigt, dass beide Domänen zu unterschiedlichen Rubredoxintypen gehören.^[77] Während die AlkG1-Typ Rubredoxine, zu denen die N-terminale Domäne des AlkG gehört, einen hohen Konservierungsgrad zeigen, gibt es signifikante

Unterschiede zu den AlkG2-Typ Rubredoxinen, wie dem AlkG-CT. Daher kann angenommen werden, dass das komplette Konstrukt des AlkG kein Produkt einer Genduplikation ist.^[77]

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die beiden Domänen nicht äquivalent sind, ist, dass die native Form des AlkG mit nur einem Eisen gebunden isoliert wird^[71] und die N-terminale Domäne nach der Isolierung farblos ist^[76]. Auch bei Untersuchungen mittel NMR an Cd-substituierten AlkG zeigte sich ein Unterschied in den Bindungsstärken der beiden Domänen anhand verschiedener Cd-Resonanzen.^[71] So findet beim AlkG-NT ein schnellerer Austausch des Metallions in der Bindestelle statt, was für eine weniger feste Bindung des Metallions spricht.^[76]

Studien haben gezeigt, dass sowohl die [1Fe]-, als auch die [2Fe]-Form des AlkG in der Lage sind, Elektronen von einer Ferredoxinreduktase auf Cytochrom C zu übertragen. Die [2Fe]-Form zeigte eine doppelt so hohe Aktivität.^[71] Auch der Elektronentransport von der *P. putida* GPO1 Rubredoxinreduktase AlkT zu AlkG, sowohl in der [1Fe]- also auch in der [2Fe]-Form, konnte von Lee et al. (1998) nachgewiesen und die Kinetik untersucht werden. An der Bindung des AlkG an das AlkT ist die N-terminale Domäne des AlkG nicht beteiligt. Aufgrund von kleinen strukturellen Veränderungen oder lokalen Effekten am Flavin des AlkT kommt es zu einer Verschiebung im Elektronenabsorptionsspektrum, worauf eine einschrittige Katalyse folgt. Dabei wird das AlkT zu einem AlkT-Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)⁺-Konstrukt reduziert und ein Elektron auf die C-terminale Domäne des AlkG übertragen. Dieses kann daraufhin vermutlich auf die N-terminale Domäne übertragen werden, woraufhin eine weitere Reduktion des AlkG erfolgen kann.^[78]

Auch die N-terminale Domäne alleine ist in der Lage, Elektronen vom AlkT auf Cytochrom C zu übertragen.^[76] Allerdings blieb bei der Bindung des AlkG-NT, im Gegensatz zur Bindung die C-terminale Domäne, ein Quenchen der FAD-Fluoreszenz im AlkT aus. Weiter gibt es Hinweise darauf, dass das AlkG-NT das AlkT destabilisiert. Auch die ermittelten kinetischen Parameter deuten auf einen Unterschied in der Bindung der beiden Domänen an die Reduktase hin.^[70] Das hierbei verwendeten Konstrukt, welches durch gezielter Proteolyse des Volllängenkonstrukt entstand, zeigte eine Halbwertszeit von nur

5 h bei 20 °C^[76], welche durch Zugabe von Glycerin nur auf 17 h verlängert werden konnte^[70].

Ein weiterer sequenzbezogener Unterschied zwischen den beiden Domänen des AlkG ist ein Arginin nach dem zweiten Bindemotiv des AlkG-NT. In Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass dieses den *in vivo*-Transfer von Elektronen auf Alkanhydroxylasen inhibiert, was eventuell auf einer sterischen Inhibierung beruht.^[77] Insgesamt bleibt die Rolle der beiden Rubredoxin-Domänen in der Alkanhydroxylierung allerdings unklar.

1.3.2.2 Alkanhydroxylierung

Gesättigte Kohlenwasserstoffe gehören zu den häufigsten natürlich vorkommenden organischen Molekülen.^[79] Sie machen bis zu 50 % des Rohöls aus.^[80] Allerdings gehören Alkane zu den am schwierigsten zu funktionalisierenden Molekülen, speziell wenn diese Funktionalisierung kontrolliert und bei niedrigen Temperaturen stattfinden soll.^[79] Dagegen haben lineare Alkohole und Säuren ein hohes Potential in der chemischen Industrie. Daher wäre es erstrebenswert, Alkane in diese höherwertige Komponenten umzuwandeln, um diese als reaktive Chemikalien oder als synthetischen Kraftstoff einsetzen zu können. Das Einfügen von molekularem Sauerstoff an wenig reaktive terminale Methylgruppen ist allerdings eine schwierig zu katalysierende Reaktion. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von neuen selektiven Katalysatoren für die Oxidierung von terminalen Methylgruppen von großem Interesse.^[79, 81]

Viele Bakterienstämme, wie zum Beispiel *P. putida* GPo1, sind in der Lage, die Alkane im Rohöl als Kohlenstoffquelle zu verwerten.^[77, 82] Je nach Organismus verwerten diese kurzkettige (C₂-C₄), mittelkettige (C₅-C₁₁) und langkettige (> C₁₂) Alkane, welche sie durch aerobe oder anaerobe Oxidation umsetzen. Bei der aeroben Oxidation überwinden die Enzyme das geringe Reaktionspotential der Alkane über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.^[80, 83] Am weitesten verbreitet sind dabei die nicht-Häm-Eisen-Monooxygenasen^[80], wie die Alkan-

monooxygenase AlkB, ein integrale [2Fe]-Membranprotein aus *P. putida*. Dieses katalysiert die Hydroxylierung nach folgender Reaktionsgleichung^[66, 84]:



Der primäre Alkohol kann dann zu einem Aldehyd oxidiert werden, welcher im Anschluss in eine Fettsäure umgewandelt wird. Im weiteren Stoffwechsel wird dieses dann zu Acetyl-CoA verwertet.^[80]

An der Alkanhydroxylierung ist ein Dreikomponentensystem beteiligt (vgl. Abb. 1.4).^[84] Elektronen werden von der NADH-abhängigen, cytoplasmatischen Reduktase (AlkT bei *P. putida* GPO1) auf das Rubredoxin (AlkG oder AlkF bei *P. putida* GPO1) übertragen. Dieses transferiert die Elektronen zum aktiven Zentrum der Alkanmonooxygenase (AlkB bei *P. putida* GPO1).^[66] In manchen Organismen liegen die Alkanmonooxygenase und das Rubredoxin als Fusionsprotein vor.^[85]

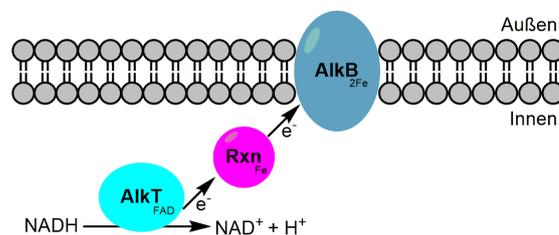


Abbildung 1.4: Die Elektronentransportkette der Alkanhydroxylierung. Die Elektronen werden von der NADH-abhängigen Reduktase AlkT auf ein Fe-Rubredoxin (Rxn) übertragen, welches diese zur Alkanmonooxygenase AlkB transportiert. (nach [67, 84])

Den Elektronentransportprozess von AlkT über ein Rubredoxin zum AlkB zu verstehen, wäre ein großer Schritt zur Anwendung dieses Systems für potentielle biotechnologische Anwendungen. Zur Charakterisierung des daran beteiligten Rubredoxins ist die Substitution des Metall-Cofaktors ein vielfach eingesetztes Mittel.

1.3.2.3 Substitution des Metall-Cofaktors

Aufgrund ihrer geringen Größe, ihrer Löslichkeit und ihrer einfachen Expression werden Rubredoxine häufig als Modellprotein genutzt. Besonders gut eignen sie sich, um Studien zum Austausch des natürlichen Metallions in Eisen-Schwefel-Proteinen durchzuführen. So wurde das Eisen in verschiedenen Rubredoxinen schon durch Co, Ni, Zn, Ga, Cd und Hg ersetzt.^[32, 45, 64, 71, 86, 87]

Eine der ersten berichteten Metallsubstitutionen in Eisen-Schwefel-Proteinen mittels chemischer Rekonstitution war das AlkG aus *P. putida* GPO1. Dort wurde das Eisen durch Co(II) substituiert, wobei die Autoren keine Hinweise dafür feststellen konnten, dass die beiden Eisenbindestellen nicht äquivalent sind.^[32]

Durch Bindung von Nickel in das aktive Zentrum des *D. desulfuricans* Rubredoxins entstand so ein minimalistisches Modellprotein für [Ni-Fe]-Hydrogenasen. Dieses war, im Gegensatz zu den Hydrogenasen, chemisch und thermisch stabil, einfach zu exprimieren und leichter zu modulieren.^[88] Demnach ist der Austausch des Metallcofaktors in Rubredoxinen möglich und kann auch zum Synthetisieren von Modellproteinen und zur Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Proteine eingesetzt werden.

1.3.3 [4Fe-4S]-Proteine

Proteine mit einem kubischen [4Fe-4S]-Cluster weisen meist ein CxxCxxC_nC-Bindemotiv auf, bei welchem drei der Cysteinreste nur durch ein bis drei Aminosäuren getrennt sind. Das vierte Cystein liegt weiter davon entfernt in der Sequenz. Ansonsten unterscheiden sie sich stark in ihrer dreidimensionalen Struktur.^[89]

Abweichend dazu ist bei einem Teil der [4Fe-4S]-Proteine das Cluster nur über drei Cysteinreste an das Protein gebunden. Das vierte Eisen steht als freie Koordinationsstelle für die enzymatische Katalyse zur Verfügung. Diese Variante der [4Fe-4S]-Proteine wird in dieser Arbeit als Gerüstproteine eingesetzt. Dazu gehören unter anderem die *E. coli* Chinolinsäuresynthase A (NadA), die *E. coli*

4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatreduktase (IspH, früher: LytB) und die Aconiat-Hydratasen (Aconitasen).^[90--92]

1.3.3.1 Aconitat-Hydratase

Die Aconitase ist ein monomeres Eisen-Schwefel-Protein des Citratzyklus. Es katalysiert die reversible nicht-redox Isomerisierung von Citrat und Isocitrat (vgl. Abb. 1.5). Im aktiven Zentrum ist ein [4Fe-4S]-Cluster an drei Cysteinreste gebunden, wobei die Katalyse an einem spezifischen Eisen mit einer freier Koordinationsstelle stattfindet.^[93]

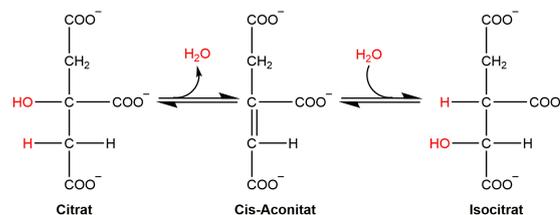


Abbildung 1.5: Katalyse der Aconitat-Hydratasen. Im Citratzyklus wird die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat über Cis-Aconitat von der Aconitat-Hydratase katalysiert.

In *E. coli* gibt es zwei verschiedene Aconitasen. Die Aconitase A (AcnA) wird durch Stress induziert, während die AcnB das Hauptenzym des Citratzyklus ist.^[94] Durch die oxidative Abspaltung eines Eisens kann die AcnB in seine inaktive [3Fe-4S]-Form umgewandelt werden.^[93] Die Struktur dieses Enzyms wurde von Williams *et al.* (2002) mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst^[91] (vgl. Abb. 1.6).

Die AcnB besteht aus fünf Domänen.^[91, 95] Vier davon sind analog zu den Domänen der mitochondrialen Aconitasen, wobei diese in der Reihenfolge 5-4-1-2-3 im Vergleich zu 1-2-3-Linker-4 neu arrangiert wurden.^[96] Die fünfte Domäne kann als „HEAT-like“-Domäne charakterisiert werden.^[91, 95] Diese dienen der Interaktion mit anderen Proteinen, indem sie den Interaktionspartner direkt vor dem Tunnel positionieren, welcher zum aktiven Zentrum führt. So könnte das Substrat Citrat direkt von der Citratsynthase zum aktiven Zentrum der AcnB

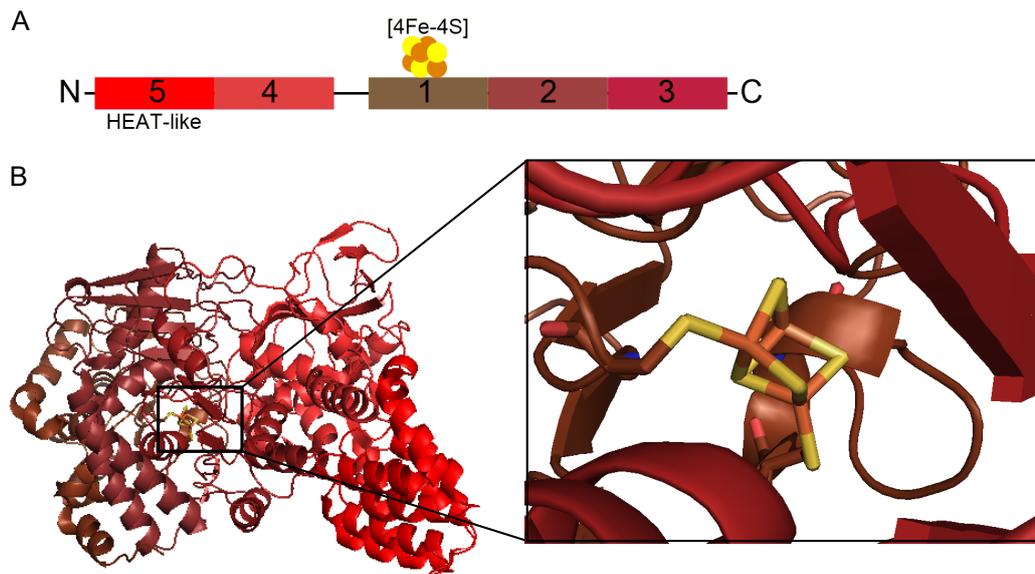


Abbildung 1.6: Die Aconitase B (AcnB) aus *E. coli*. [A] Schematische Aufbau der AcnB. Sie besteht aus fünf Domänen, wobei das [4Fe-4S]-Cluster über Aminosäuren der Domäne 1 gebunden ist. [B] Dreidimensionale Struktur der AcnB mit einem [3Fe-4S]-Cluster und einem Aconitium im aktiven Zentrum. Ein hydrophiler Tunnel führt von der Enzymoberfläche zum Cluster. Die Struktur wurde mittels Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 2,4 Å gelöst. (nach [91])

transportiert werden. Auch die Bildung von großen Proteinkomplexen für eine effizientere Katalyse wäre darüber möglich.^[91]

Der Substrattunnel ist etwa 26 Å lang, 5 Å bis 10 Å breit und hydrophil. Das Citrat wird an dessen Ende von Argininen und Serinen am [4Fe-4S]-Cluster komplexiert, wo es zu Isocitrat umgewandelt wird.^[91, 93]

Die Bildung der katalytisch aktiven Homodimere findet über die N-terminale Region der AcnB statt und ist abhängig von der Eisenverfügbarkeit.^[97] Bei Verfügbarkeit von Eisen liegt das AcnB hauptsächlich in der Holoform vor und nimmt an der Katalyse des Citratzyklus teil. Unter Eisenmangel oder unter oxidativem Stress übernimmt das Apoprotein eine weitere Funktion. Es fungiert als Regulator für die Genexpression, indem es an die mRNA bindet, um deren Stabilität zu erhöhen oder deren Translation zu verhindern. Daher gehören die Aconitasen zur Gruppe der „iron-responsive element binding proteins“ (IRE-BP).^[98–100]

Wie auch bei der Dimerisierung findet die Interaktion mit der mRNA über die Domänen 4 und 5 statt. Auch der regulatorische Eisensensor liegt in der N-terminale Region der AcnB.^[97] In den Aconitasen sind für die Interaktionen verschiedene Aminosäurereste in den Domänen konserviert.^[91] Dies lässt auf eine mögliche weitere Bindestelle für Fe(II) im Protein schließen.^[97]

1.3.3.2 Chinolinsäuresynthase

Auch an der Biosynthese des ubiquitären Cofaktors NAD ist ein Eisen-Schwefel-Protein, die *E. coli* NadA beteiligt. NadA katalysiert, gemeinsam mit der L-Aspartatoxidase (NadB), die Synthese von Chinolinsäure aus L-Aspartat und Dihydroxyacetonphosphat (vgl. Abb. 1.7).^[101, 102]

NadA enthält ein sauerstoffsensitives [4Fe-4S]-Cluster, welches essentiell für seine Funktion ist.^[103, 104] Vergleichbar zur AcnB ist das [4Fe-4S]-Cluster an nur drei Cysteinresten im aktiven Zentrum komplexiert.^[105] Das Cluster dient als Lewissäure und katalysiert die Dehydrierung des Substrats.^[90]

Die Struktur verschiedener Chinolinsäuresynthasen wurde mittels Röntgenstrukturanalyse (z.B. aus *Pyrococcus horikoshii*^[106] oder *Thermotoga maritima*^[107])

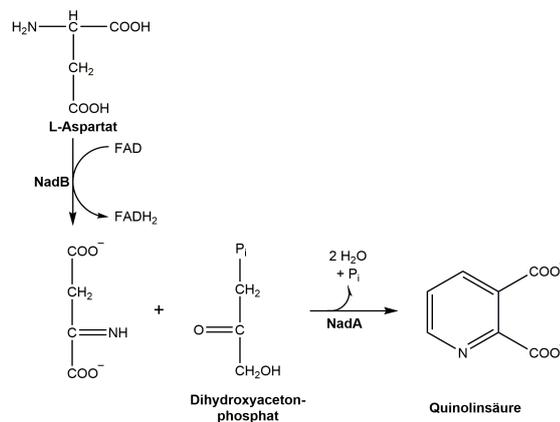


Abbildung 1.7: Katalyse der Chinolinsäuresynthese A. Zur Synthese von Chinolinsäure wird zunächst L-Aspartat durch NadB oxidiert, woraufhin das Produkt durch NadA mit Dihydroxyacetonphosphat zu Chinolinsäure umgesetzt wird.

aufgeklärt. Diese bestehen aus drei Domänen, zwischen welchen ein langer Tunnel von der Proteinoberfläche zum [4Fe-4S]-Cluster liegt. Dieser kann durch Bindung eines Substrats in seiner Größe verändert oder auch ganz verschlossen werden.^[106, 107]

1.3.3.3 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphatreduktase

Die IspH katalysiert im Rahmen der Isoprenoid-Biosynthese die Umwandlung von (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat zu Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat (vgl. Abb. 1.8). Dies geschieht mittels Protonengekoppelten Transfer von zwei Elektronen mit gleichzeitigem Entzug eines Sauerstoffs.^[108, 109] Eine weitere 2H₂/2e⁻-Reduktion, welche von der IspH katalysiert werden kann, ist die Biosynthese von Aldehyden und Ketonen durch die Addition von Wasser an Acetylengruppen.^[92]

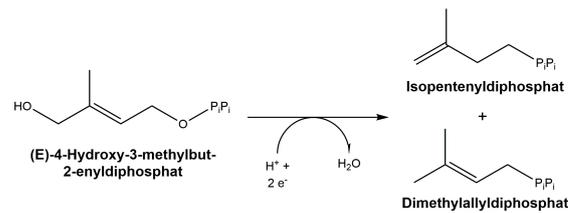


Abbildung 1.8: Katalyse der IspH. Die IspH katalysiert die Umsetzung von zwei Molekülen (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat zu Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat.

Der Aufbau der *E. coli* IspH wurde bereits im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren mittels Röntgenstrukturanalyse und Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie charakterisiert.^[92, 110–113] Auch die IspH gehört zu den Eisen-Schwefel-Proteinen, bei welchem das tetraedrische Cluster über drei Cysteinreste an das Protein gebunden ist. Die freie Koordinationsstelle dient zur Bindung des Substrats oder der entsprechenden Inhibitoren. Das Enzym besteht aus drei Domänen, in deren Zentrum das Eisen-Schwefel-Cluster gebunden ist. Das aktive Zentrum kann vermutlich durch Bewegung der Domänen D1 und D2 geöffnet oder geschlossen werden.^[110]

1.3.4 Hydrogenasen

Eine weitere Klasse der Eisen-Schwefel-Proteine ist die der Hydrogenasen. Sie katalysieren hoch effizient die reversible Umwandlung von molekularem Wasserstoff in zwei Protonen und zwei Elektronen nach folgender Reaktionsgleichung^[114]:



Anhand der Zusammensetzung des Metall-Cofaktors können die Hydrogenasen in drei Klassen eingeteilt werden, die [Fe]-, die [NiFe] und die [FeFe]-Hydrogenasen. Sie katalysieren die Wasserstoff-basierte Atmung in Archaea, Bakterien und wenigen Eukaryoten.^[114]

1.3.4.1 Cofaktoren in Hydrogenasen

Die Cofaktoren der Hydrogenasen setzen sich aus in der Erdkruste häufig vorkommenden Metallionen zusammen. Anhand dieser können sie in drei Gruppen eingeteilt werden (vgl. Abb. 1.9): Die [Fe]-Hydrogenasen enthalten neben Carbonyl (CO)-Liganden ein Eisenatom in einer ungewöhnlichen Koordination. Die [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenase besitzen neben kubischen [4Fe-4S]- Clustern ein zweikerniges Metallzentrum. Dieses ist über kleine anorganische CO- und Cyanid (CN)-, sowie Schwefel-haltige Liganden komplexiert, wobei die Koordinationsstelle an einem der Metallionen frei bleibt.^[114]

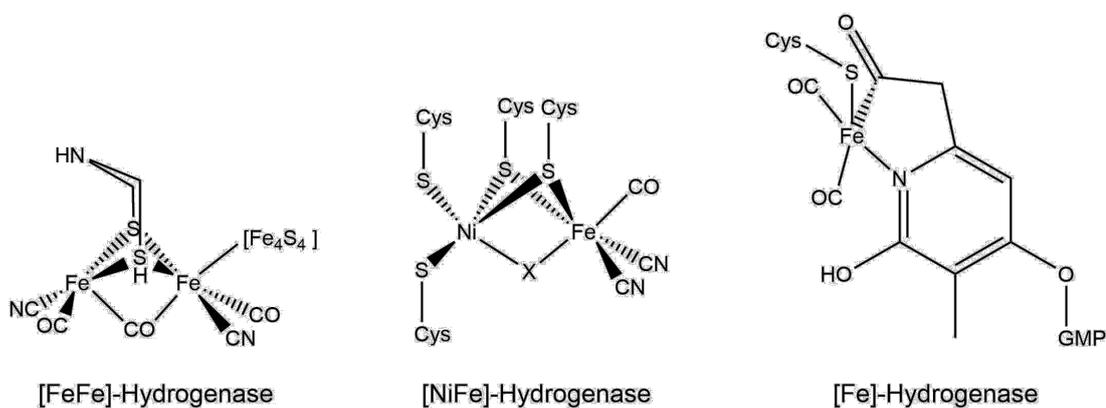


Abbildung 1.9: Schematischer Aufbau der aktiven Zentren der Hydrogenasen. Der Cofaktor der [FeFe]-Hydrogenasen besteht aus einem zweikernigen Fe-Zentrum mit organischen Liganden und einem kubischen Eisen-Schwefel-Cluster. Bei den [NiFe]-Hydrogenasen setzt sich das zweiwertige Metallzentrum aus Nickel, Eisen und organischen Liganden zusammen. Im aktiven Zentrum der [Fe]-Hydrogenasen wiederum ist das Eisen in einer seltenen Koordination an Carbonyl-Liganden komplexiert. (nach [114])

Die [FeFe]-Hydrogenasen, welche als einziges Übergangsmetall Eisen enthalten, zeigen die höchste katalytische Aktivität aller Hydrogenasen, aber auch die größte Sauerstoff-Sensitivität.^[115, 116] Der Cofaktor im aktiven Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen wird auch H-Cluster genannt.^[115, 117] Er setzt sich zusammen aus einem kubischen [4Fe-4S]-Cluster, welches an drei Cysteinreste des Proteins gebunden wird, während es über ein viertes Cystein mit einem speziellen [2Fe]-Cluster verbunden ist. Der Abstand der beiden Cluster beträgt

etwa 4 Å, was einen Elektronentransport vom [4Fe-4S]-Cluster zum [2Fe]-Cluster ermöglicht, an welchem die katalytische Reaktion stattfindet (vgl. Abb. 1.9).

Das [2Fe]-Cluster besteht aus einem proximalen (Fe_p) und distalen Eisen (Fe_d) in Bezug auf das [4Fe-4S]-Cluster. Daran koordiniert sind jeweils ein terminaler CN- und ein terminaler CO-Ligand. Weiter enthält das Cluster einen überbrückenden Azapropen-1,3-dithiolat (ADT)- und einem überbrückendem CO-Liganden zwischen den beiden Eisen. Diese stabilisieren das Cluster. Während das Fe_p kovalent über den Cysteinanker an das [4Fe-4S]-Cluster gebunden ist, befindet sich am Fe_d eine freie Koordinationsstelle.^[114, 117, 118]

Die Effekte und Eigenschaften der hoch konservierten, koordinierenden Aminosäurereste im aktiven Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen zu entschlüsseln, ist ein wichtiger Schritt zur industriellen Nutzung der katalytischen Eigenschaften zur Wasserstoffproduktion. Die Liganden im Bereich des aktiven Zentrums spielen eine große Rolle in der strukturellen Stabilität und der katalytischen Aktivität des Clusters. So wurde für die [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* und aus *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen, dass beteiligte Aminosäurereste über Wasserstoffbrückenbindungen in CN-Gruppen in der trans-Konfiguration halten und die Bildung der freien Koordinationsstelle am Fe_d fördern.^[119–121] Mit einem Umsatz von bis zu 5000-8000 $\mu\text{mol H}_2$ pro Minute und mg Protein^[122] zeigen die [FeFe]-Hydrogenasen die höchste Aktivität aller Hydrogenasen. Dies ist auf die Struktur des Cofaktors und der daran stattfindenden Katalyse zurückzuführen.

1.3.4.2 Katalytischer Zyklus der [FeFe]-Hydrogenasen

Pro Katalysezyklus der [FeFe]-Hydrogenasen werden zwei Protonen mit zwei Elektronen reversibel zu molekularem Wasserstoff umgesetzt (vgl. Abb. 1.10).^[114]

Ein Modell der Katalyse beginnt an der oxidierten Spezies H_{OX} . Diese wird charakterisiert durch ein oxidiertes $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster und ein $[\text{2Fe}]^{3+}$ im H-Cluster, wobei beide Eisen einen niedrigen Spin vorweisen.^[124] Im ersten Schritt wird dieses durch einen Protonen-gekoppelten Transfers eines Elektrons auf das

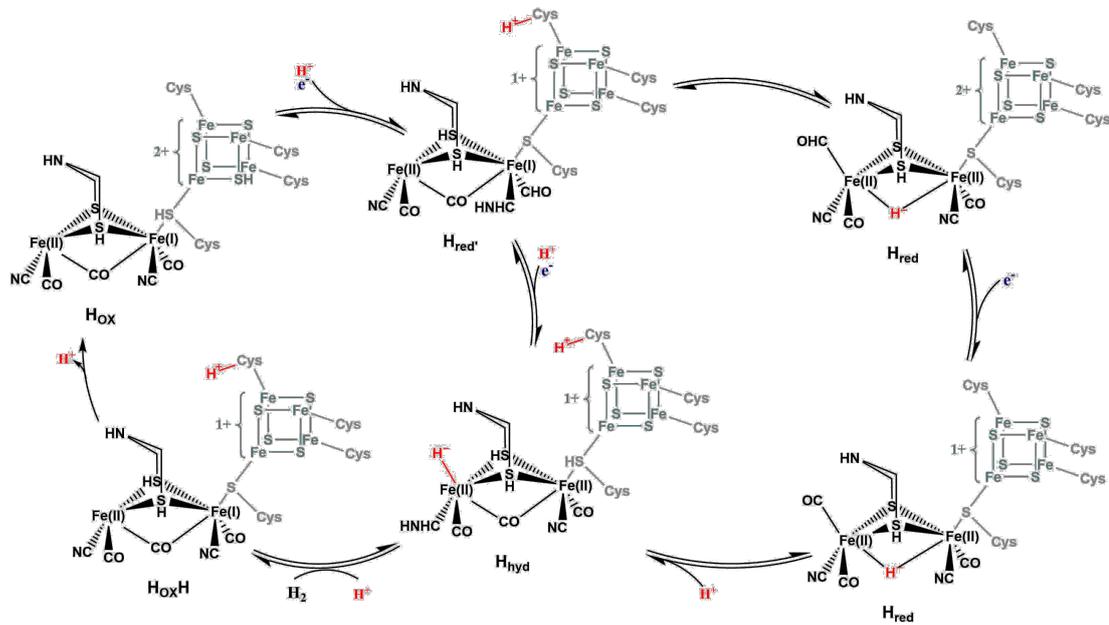


Abbildung 1.10: Modell der Katalyse der [FeFe]-Hydrogenasen. Die Umsetzung von Protonen und Elektronen zu molekularem Wasserstoff in [FeFe]-Hydrogenasen finden am H-Cluster statt. Die Katalyse könnte in einem schnellen Zyklus ohne Reorientierung des Liganden oder in einem langsamen Zyklus mit Reorientierung des Liganden erfolgen. (nach [123])

[4Fe-4S]-Cluster in den $H_{red'}$ -Zustand überführt.^[125]

Als folgender Schritt in der Katalyse werden zwei Wege diskutiert. In einem langsamen Zyklus erfolgt eine Reorientierung des Liganden, welches zum H_{red} -Zustand führt. Dabei entsteht ein überbrückendes Hydrid zwischen den beiden Eisen und das überbrückende CO verschiebt sich an die zuvor freie Koordinationsstelle des Fe_d .^[126] Nach einer Reduktion des Clusters zum H_{sred} -Zustand^[127], folgt eine Protonierung des [4Fe-4S]-Clusters in Kombination mit einer weiteren Reorientierung des H-Clusters.^[118] Aufgrund der mehrmaligen Reorientierung des Clusters ist dieser Reaktionsweg langsam und wird als regulierender Prozess in manchen [FeFe]-Hydrogenasen diskutiert.^[128, 129]

Bei einem alternativen Reaktionsweg entsteht durch eine direkte Protonierung und Reduktion des $H_{red'}$ der H_{hyd} -Status, dessen terminales Hydrid schnell mit einem weiteren Proton zu H_2 reagiert.^[128] Die Abgabe dieses Wasserstoffmoleküls führt daraufhin zum protonierten Ruhezustand $H_{OX}H$, welcher sich vom H_{OX} -Zustand nur durch ein Proton am [4Fe-4S]-Cluster unterscheidet.^[125]

Demnach ist die effiziente Katalyse der [FeFe]-Hydrogenasen nur durch den Protonen-gekoppelte Transfer von Elektronen sowohl am [4Fe-4S]- als auch am [2Fe]-Zentrum des H-Clusters möglich ist. Die Reaktion setzt sich zusammen aus eine Protonenreduktion zu einem terminalen Hydrid und einer folgenden Säure-Base-Reaktion mit einem weiteren Proton zu H_2 .

Für die Katalyse der [FeFe]-Hydrogenasen dient die ADT-Gruppe als Proton-Relais, wobei die Protonen vermutlich über hoch konservierten Protonentransportweg zwischen dem ADT und der Proteinoberfläche geleitet werden. Dieser setzt sich zusammen aus einem Cystein nahe des ADT, zwei Glutaminsäurereste, mindestens einem Serin und einem oder zwei Wassermolekülen. Bisher konnte dieser allerdings nicht experimentell nachgewiesen werden.^[130–132]

Außerdem verbindet ein hydrophober Gaskanal das aktive Zentrum mit der Oberfläche des Proteins^[117], wobei dieser allerdings nicht selektiv H_2 , sondern auch CO und O_2 zum H-Cluster vordringen lässt.^[133] Während das irreversible Binden von O_2 an das H-Cluster zu einer Degradation des Clusters führt, wird durch eine CO-Bindung das Enzym reversibel inhibiert.^[127, 134]

Um die effektive Katalyse der [FeFe]-Hydrogenasen nachahmen zu können, ist ein gutes Verständnis der vorliegenden Prozesse notwendig. Dabei spielen vor

allem Zustände eine Rolle, welche das Enzym unempfindlich gegen Sauerstoff machen. Dies wurde intensiv an der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* (*DdHydAB*) untersucht.

1.3.4.3 Die Hydrogenase von *Desulfovibrio desulfuricans*

Die katalytisch aktive *DdHydAB* ist ein 53,5 kDa großes Heterodimer, bestehend aus einer 11 kDa großen und einer 42,5 kDa großen Untereinheit mit zwei [4Fe-4S]-Clustern und einem H-Cluster. Die Struktur der *DdHydAB* im H_{OX} -Zustand wurde mittels Röntgenstrukturanalyse von Nicolet et al. (1999) gelöst und in der Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics an der Rutgers University (PDB ID: 1HFE) deponiert.^[117, 135]

Schon bei kurzer Exposition mit Sauerstoff verliert die *DdHydAB* schnell ihre Aktivität^[42, 136], welche nur im geringen Maße wiederhergestellt werden kann, indem das inaktive Enzym geringen Mengen O_2 ausgesetzt wird^[137, 138]. Allerdings kann die *DdHydAB* unter Luftsauerstoff in einer Sauerstoff-stabilen, aber inaktiven Form (H_{inact} oder H_{ox}^{air}) isoliert werden, bei welcher das H-Cluster in der Fe(II)Fe(II)-Form vorliegen und ein weiterer Ligand am Fe_d gebunden sein soll.^[116, 139, 140]

Für die Umwandlung von [NiFe]-Hydrogenase in einen inaktiven Zustand wurde gezeigt, dass die Zugabe von Sulfid nötig ist.^[141, 142] Daher kann angenommen werden, dass der Ligand an der freien Koordinationsstellen des Fe_d ein SH^- ist. 2006 wurde durch Roseboom et al. gezeigt, dass durch die Zugabe von 10 mM des Oxidationsmittels Hexaaminruthenium(III)-chlorid (HAR) und 10 mM Na_2S das *DdHydAB* von der H_{OX} -Form in die H_{inact} -Form umgewandelt wird^[140] Dabei kann angenommen werden, dass das HAR einerseits das H-Cluster oxidiert hält und gleichzeitig verhindert, dass dieses durch das H_2S oxidiert wird. Durch eine anschließende Deprotonierung des H_2S durch ein Amin wird ein HS^- am Fe_d gebunden. Mittels Oxidation durch Luftsauerstoff oder eines anderen Oxidationsmittels, wie z.B. HAR, in den H_{inact} -Zustand versetzt^[46], welcher eine Halbwertszeit von etwa drei Tagen besitzt, sobald er Luftsauerstoff ausgesetzt war^[140]. Der ursprüngliche H_{OX} -Zustand lässt sich

durch Reduktion mit Natriumdithionit und einer anschließenden Reoxidation mit HAR beinahe vollständig wieder herstellen.^[46]

1.3.5 Anpassung des Redoxpotentials von Eisen-Schwefel-Proteinen

Das Redoxpotential von Eisen-Schwefel-Proteinen lässt sich durch eine Vielzahl interner und externer Faktoren des Cluster variieren. So sollte ein Enzym für eine effektive Redoxkatalyse einem Elektronentransportprotein ermöglichen, an die Proteinoberfläche zu binden. Dann sollten die Elektronen schnell mittels eines Elektronentransportwegs zum Cluster geleitet werden. Ein weiterer Tunnel muss einen Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum und ein Entlassen des Produktes der Katalyse ermöglichen.^[143] Dies könnte durch gezielte Mutagenese der Proteine verbessert werden.

Auch eine alternative Bindung des Clusters an das Protein, kann einen Einfluss auf die Stabilität, Reaktivität und das Reduktionspotential haben. So können die Eigenschaften eines kubisches Eisen-Schwefel-Clusters durch Variation eines der bindenden Aminosäurereste moduliert werden. Während der Wildtyp des *Pyrococcus furiosus* Ferredoxins mit einem Aspartat der beste Elektronenakzeptor ist, zeigen Serin/Cystein-Mutanten eine höhere pH-Abhängigkeit bzw. geringere Redoxpotentiale. Histidin und Aspartat-Mutanten boten eine weitere Protonierungsposition im Aktiven Zentrum.^[144]

Beim *Sulfolobus solfataricus* Ferredoxin, bei welchem das [2Fe-2S]-Cluster an zwei Cysteine und zwei Histidine gebunden ist, führt der Austausch eines Histidins durch ein Cystein zu einem Verlust an Stabilität und eine Erhöhung des Reduktionspotentials um etwa 300 eV.^[145] Auch der Austausch der Metallionen kann einen Einfluss auf die Redoxaktivität haben. So konnte beim Zink-Protein Carboxypeptidase A die Aktivität um 100 % gesteigert werden, indem dieses durch ein Kobaltion ersetzt wurde.^[29]

1.4 Zielsetzung

Für eine effiziente Wasserstoffproduktion auf industriellem Niveau stehen bisher keine effizienten und robusten Katalysatoren zur Verfügung. Daher sollen neue sauerstoffstabile Katalysatoren, sowohl für Wasserspaltung, als auch für die Wasserstoffentwicklung, synthetisiert werden.

Um neue Elektronentransferkatalysatoren für die Wasserspaltung zu generieren, sollen [4Co-4S]-Biohybride synthetisiert werden, indem die anorganischen, kubischen [4Co-4S]-Cluster in biologischen Gerüstproteinen stabilisiert werden. Als Proteingerüst sollen [4Fe-4S]-Proteine dienen, deren kubische [4Fe-4S]-Cluster eine freie Koordinationsstelle aufweist, an welchem die Substratbindung stattfinden kann. Zunächst soll nachgewiesen werden, dass die Differenzierung zwischen den Metallionen durch Chaperone und nicht über die Eisen-Schwefel-Proteine reguliert wird und somit Kobalt anstelle von Eisen gebunden werden kann. Als Modellproteine für die Kobaltbindung und die Charakterisierung sollen hierbei Proteine aus der Familie der Rubredoxine dienen. Nachdem die Gerüstproteine synthetisiert wurden, soll das Cluster *in vitro* über chemische Rekonstitution und *in vivo* unter Nutzung der *E. coli* ISC-Assemblierungsmaschinerie eingebaut werden. Die Charakterisierung soll spektroskopisch über Zirkulardichroismus- und Elektronenabsorptionsspektroskopie oder quantitativ mittels Massenspektrometrie erfolgen.

Weiter soll die N-terminale Domäne des *P. putida* GPo1 Rubredoxins AlkG charakterisiert werden. Da in bisherigen Studien ein instabiles Konstrukt der N-terminale Domäne verwendet wurde, soll diese in dieser Arbeit durch das SUMO-Protein stabilisiert werden. In dieser Form sollen beide AlkG-Domänen produziert und über die Bindung von Kobalt und Eisen charakterisiert werden. Die dabei synthetisierten Eisen- und Kobalt-Rubredoxine sollen spektroskopisch analysiert und der Metallgehalt ermittelt werden.

Zur sauerstoffstabilen Wasserstoffentwicklung soll der sauerstoffstabile Zustand der *DdHydAB* H_{inact} im Rahmen dieser Arbeit strukturell charakterisiert werden. Dafür soll diese kristallisiert werden und die dreidimensionale Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden. Nach der erfolgreichen Kristallisation

der *DdHydAB* soll zunächst die native Elektronendichte bestimmt und ein Strukturmodell erstellt werden. Anhand der anomalen Streuung der Schwefelatome sollen anschließend deren Positionen bestimmt werden.

2 Material und Methoden

Inhaltsangabe

2.1 Material	32
2.2 Methoden	47

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland

LB-Medium-Pulver, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kit, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Rotiphorese Gel 40 (19:1), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

TB-Medium-Pulver, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

ThermoPol Reaction Buffer, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

YT-Medium-Pulver, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

10x CutSmart-Puffer, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

10x Tris/Glycin-Puffer, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA

10x Tris/Glycin/SDS-Puffer, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA

5x In-Fusion HD Enzyme Premix, Takara Bio INC., Kusatsu, Shiga Prefecture, Japan

5x Phusion HF Buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Die weiteren verwendeten Chemikalien gehören zur Standardausrüstung eines biologischen Labors und entsprechen mindestens dem p.a. Standard.

2.1.2 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA synthetisiert und sind in Tabelle 2.1 mit ihren Edukt und Produkt zusammengefasst.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Template/Produkt	Primer
pGEX-6P-2/ pGEX-6P-2-lin	TGACTGACGATCGCCTCG GGGCCCTGGAACAGAAC
pETSUMOadapt/ pETSUMOadapt-lin	TGAGATCCGGCTGTAACAAAGCC ACCACCAATCTGTCTCTGTGAGC
pET16bTEV/ pET16bTEV-lin	TAACTAGCATAACCCCTGGGGC CATATGTCCTGAAAATACAGGTTTTCATGGC
pET16bTEV/ pET16b-lin	TAACTAGCATAACCCCTGGGGC ATGGCCCATGGTATATCTCCTTCT
pET16bTEV/ pET16b-lin für AaAcn	AGAAGGAGATATACCATGGCAAAGGCACCGTT GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTCTAGAGG
pET16bTEV/ pET16b-lin für TtAcn	AGAAGGAGATATACCATGAAGAACAGCTTTCAGACCTT GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTCTAGAGG
Genstrang/ acnB für pET16bTEV	TTTCAGGGACATATGCTAGAAGAATACCGTAAGCACG GGGTTATGCTAGTTAAACCGCAGTCTGGAAAATCACCC
pET16bTEV-acnB/ acnB für pET16b	TTTCAGGGACATATGCTAGAAGAATACCGTAAGCACG GGGTTATGCTAGTTAAACCGCAGTCTGGAAAATCACCC
pET16bTEV-acnB/ acnB für pGEX-6P-2	CTGTTCCAGGGCCCGTCTAGAAGAATACCGTAAGCACG GCAGATCGTCAGTCAAACCGCAGTCTGGAAAATCACC
pET16bTEV-ispH/ ispH für pQE-30	GAAAACCTGTATTTTCAGGGAATGCAGATCCTGTTGGCCAAC TCCCTGAAAATACAGGTTTTCGGATCCGTGATGGTGATGGTG
Genstrang/ nadA für pET16bTEV	TTTCAGGGACATATGAGCGTAATGTTTGATCCAGACA GGGTTATGCTAGTTATCCACGTAGTGTAGCCGAAA
pET16bTEV-nadA/ nadA für pET47 Ek/LIC	GAAAACCTGTATTTTCAGGGAATGAGCGTAATGTTTGATCCAGACAC TCCCTGAAAATACAGGTTTTCACCGTATGGTGGTGGTAT
pET16b-alkG alkG-CT G	CTGTTCCAGGGCCCGTCTAGAAGAATACCGTAAGCAC AGCAGCCGGATCTCATTTTTCTCGTACAGAACGTAATCTTCTTIG
pET16b-alkG/ alkG-NT	GAACAGATTGGTGGTATGGCCAGCTATAAATGTCC AGCAGCCGGATCTCAAATAATCCAGTTTATCACGAACTG

2.1.3 Plasmide

Alle für die PCR eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit eingesetzte Plasmide.

Plasmid	Quelle
pACYC184 <i>iscS-fdx</i>	Prof. Dr. Michael Groll
pQE30-ispH	Prof. Dr. Michael Groll
pGEX-6P-2	GE Healthcare Life Sciences
pET16b-TEV	Dr. Manuel Etzkorn
pET-46 Ek/LIC	Novagen
pET-SUMOadapt	Invitrogen

Alle in dieser Arbeit klonierten und verwendeten Expressionsplasmide sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst (vgl. Abb. 5.2-5.14).

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit klonierte Plasmide.

Plasmid	Protein
pET16b-TEV- <i>alkG</i>	<i>P. putida</i> Rubredoxin AlkG
pET-SUMOadapt- <i>alkG-CT</i>	C-terminale Domäne und Linker von AlkG
pET-SUMOadapt- <i>alkG-NT</i>	N-terminale Domäne von AlkG
pGEX-6P-2- <i>rubA</i>	<i>C. metallidurans</i> Rubredoxin CmRxn
pGEX-6P-2- <i>rxn</i>	<i>D. gigas</i> Rubredoxin DgRxn
pGEX-6P-2- <i>acnB</i>	<i>E. coli</i> Aconitase B
pET16b- <i>acnB</i>	<i>E. coli</i> Aconitase B
pET16b- <i>aco</i>	<i>A. aeolicus</i> Aconitase
pET16b- <i>acoA</i>	<i>T. thermophilus</i> Aconitase A
pET-46 Ek/LIC- <i>nadA</i>	<i>E. coli</i> NadA
pQE30-TEV- <i>ispH</i>	<i>E. coli</i> IspH
pET16b-TEV-SUMO-DSD-4C	artifizielles SUMO-DSD-4C
pACYC184 <i>iscS-fdx</i>	<i>E. coli</i> IscS, IscU, IscA, HscB, HscA, Fdx

2.1.4 *E. coli* Stämme

E. coli BL21(DE3)

B⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)(λ(DE3[*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*])[*malB*⁺]_{K-12}λ^S*

***E. coli* OverExpress C41(DE3)**

$F^- ompT gal dcm hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ (DE3)

***E. coli* OverExpress C43(DE3)**

$F^- ompT gal dcm hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ (DE3)

***E. coli* XL1 Blue**

endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB⁺ laqI^q
Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ r_K⁺)

2.1.5 Proteine

Desulfovibrio desulfuricans Hydrogenase: Heterolog in *E. coli* exprimiert^[46]

Enterokinase light chain P8070S, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

Tabacco edge virus (TEV)-Protease, laboreigen

Taq DNA Polymerase, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

Ubiquitin-like-specific protease 1 (Ulp1)-Protease, laboreigen

PreScission Protease (human rhinovirus 3C protease and GST-Tag), laboreigen

Phusion DNA Polymerase, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

2.1.6 Nährmedien**Lysogeny Broth (LB)-Platten**

25 g/l AppliChem LB-Medium-Pulver nach Miller

15 g/l Agar

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

Lysogeny Broth (LB)-Medium

25 g/l AppliChem LB-Medium-Pulver nach Miller

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

Super Optimal Broth (SOC)-Medium

20 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

20 mM Glukose

10 mM MgSO₄

10 mM NaCl

10 mM MgCl₂

2,5 mM KCl

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

Terrific Broth (TB)-Medium

36 g Applichem TB-Medium-Pulver

ad 900 ml ddH₂O

Nach dem Autoklavieren für 20 min bei 121 °C werden 100 ml steriler

10 x Phosphatpuffer (s.u.) hinzugefügt.

10x Phosphatpuffer für TB-Medium

23,1 g/l KH₂PO₄

125,4 g/l K₂HPO₄

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

2x Yeast Trypton (2YT)-Medium

31 g/l AppliChem YT-Medium-Pulver

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

2.1.6.1 Lösungen für M9-Minimalmedium**10x M9-Salz**

85 g/l Na₂HPO₄ × 2 H₂O

30 g/l KH₂PO₄

5 g/l NaCl

10 g/l NH₄Cl

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

M9-Medium

100 ml/l M9-Salz
2 ml 1 M MgSO₄
2 ml 50 mM CaCl₂
12,5 ml 40 Gew.-% Glukose (s.u.)
20 ml 20 % (w/v) Casaminosäuren
2 ml 0,5 % (w/v) Thiamin/HCl
1,5 ml 0,1 M L-Cystein
1,5 ml 0,1 M CoCl₂
ad 1 l mit sterilem ddH₂O

MgSO₄-Stocklösung

1 M MgSO₄ × 7 H₂O
Mit einem 2 μm-Filter steril filtriert

CaCl₂-Stocklösung

50 mM CaCl × 2 H₂O
Mit einem 2 μm-Filter steril filtriert

Glukose-Stocklösung

40 % (w/v) Glukose
Mit einem 2 μm-Filter steril filtriert

Casaminosäuren-Stocklösung

20 % (w/v) Casaminosäuren
Mit einem 2 μm-Filter steril filtriert

Thiamin-Stocklösung

0,5 % (w/v) Thiamin/HCl
Mit einem 2 μm-Filter steril filtriert
Lagerung bei -20 °C

L-Cystein-Stocklösung

0,1 M L-Cystein
Mit einem 2 μm-Filter steril filtriert
Frisch gelöst

CoCl₂-Stocklösung

0,1 M CoCl₂ × 6 H₂O

2.1.7 Puffer und Lösungen**2.1.7.1 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE****SDS-Stocklösung**

10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
in H₂O

APS-Stocklösung

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
in H₂O
Gelagert bei -20 °C

Glycin-Sammelgelpuffer

0,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)/HCl
pH 6,8 mit HCl

Glycin-Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl
pH 8,8 mit HCl

2 %-Glycin-Sammelgel (2 Gele)

3 ml H₂O

1,25 ml Glycin-Sammelgelpuffer

650 µl Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)

50 µl 10 % SDS

50 µl 10 % APS

5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

10 %-Glycin-Trenngel

4,1 ml H₂O
2,5 ml Glycin-Trenngelpuffer
3,3 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)
100 µl 10 % SDS
50 µl 10 % APS
5 µl TEMED

15 %-Glycin-Trenngel

2,2 ml H₂O
2,6 ml Glycin-Trenngelpuffer
5 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)
100 µl 10 % SDS
100 µl 10 % APS
10 µl TEMED

20 %-Glycin-Trenngel

1,5 ml H₂O
6 ml Glycin-Trenngelpuffer
16 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)
240 µl 10 % SDS
240 µl 10 % APS
24 µl TEMED

Glycin-Laufpuffer

100 ml Tris/Glycin/SDS-Puffer
900 ml ddH₂O

5x Glycin-Auftragspuffer

0,2 M Tris/HCl, pH 6,7
10 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Glycerol
10 mM β-Mercaptoethanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

3x Tricin-Gelpuffer

3 M Tris/HCl

0,3 % (w/v) SDS

pH 8,45 mit HCl

4 %-Tricin-Sammelgel2,5 ml ddH₂O

1 ml 3x Tricin-Gelpuffer

530 μ l Rotiphorese Gel 40 (19:1)3,2 μ l TEMED32 μ l 10 % APS**15 %-Tricin-Trenngel**750 μ l ddH₂O

2,66 ml 3x Tricin-Gelpuffer

4 ml Rotiphorese Gel 40 (19:1)

4 μ l TEMED4 μ l 10 % APS**Tricin-Anodenpuffer**

0,2 M Tris/HCl

pH 8,3 mit HCl

Tricin-Kathodenpuffer

0,1 M Tris/HCl

0,1 M Tricin

0,1 % (w/v) SDS

pH 8,25 mit HCl

4x Tricin-Probenpuffer

12 % (w/v) SDS

6 % (v/v) β -Mercaptoethanol

30 % (v/v) Glycerol

0,05 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R-250

150 mM Tris/HCl; pH 7,0 mit HCl

SDS-Färbelösung

0,05 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R-250

25 % (v/v) Isopropanol

10 % (v/v) Eisessig

in H₂O

SDS-Entfärbelösung

10 % (v/v) Eisessig

in H₂O

2.1.7.2 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese**50x TAE-Puffer**

2 M Tris/HCl

0,1 M EDTA

pH 8,2 mit Essigsäure

Agarosegel

0,5 g Agarose

50 ml 1x TAE-Puffer

Agarose durch Erwärmen lösen, Abkühlen auf 60 °C.

3,5 µl Nukleinsäure-Gel-Färbemittel GelRed

10x TE-Puffer

100 mM Tris/HCl

10 mM EDTA

pH 8,2 mit HCl

6x Agarosegel-Auftragspuffer

50 % (v/v) Glycerol

0,25 % (w/v) Xylencyanol

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

in 1x TE-Puffer

2.1.7.3 Puffer für die Präparation chemokompetenter Zellen

TFB1-Puffer

100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
15 % (v/v) Glycerol

TFB2-Puffer

10 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % (w/v) Glycerol

2.1.7.4 Puffer und Lösungen für den Western-Blot

Towbin-Transfer-Puffer

100 ml 10x Tris/Glycin-Puffer
200 ml Methanol
700 ml ddH₂O

TBS-T-Puffer

50 mM Tris/HCl
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween-20
pH 8,0 mit HCl

Blockpuffer

5 % (w/v) Milchpulver
in TBS-T-Puffer

2.1.7.5 Puffer für die Chromatografie

50 mM HEPES-Puffer

50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)

150 mM NaCl

pH 7,6 mit NaOH

20 mM MES-Puffer

20 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)

pH 5,0 mit HCl

50 mM Natriumacetat-Puffer

50 mM Natriumacetat

150 mM NaCl

pH 4,0 mit Essigsäure

10 mM Natriumphosphat-Puffer

10 mM Na₂HPO₄

pH 7,5 mit 10 mM NaH₂PO₄

TBS-Puffer

50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)/HCl

150 mM NaCl

pH 7,6 mit HCl

TBS-GSH-Puffer

50 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

10 mM reduziertes Gluthathion (GSH)

pH 7,6 mit HCl

TBS-I-Puffer

50 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 7,6 mit HCl

Tris-Niedrigsalz-Puffer

50 mM Tris/HCl

10 mM NaCl

pH 7,6 mit HCl

Tris-Hochsalz-Puffer

50 mM Tris/HCl

1 M NaCl

pH 7,6 mit HCl

2.1.7.6 Stocklösungen**Ampicillin (Amp)**

100 mg/ml Amp

in ddH₂OMit einem 0,2 μ m Filter steril filtriert.**Dithiothreitol (DTT)**

1 M DTT

in ddH₂O**CoCl₂-Stocklösung für Eisenbindestudien**100 μ M CoCl₂in H₂O**Eisen-Stocklösung für Eisenbindestudien**50 μ M Ammoniumeisen(III)-citrat50 μ M Ammoniumeisen(II)-sulfatin H₂O**Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)**

0,5 M EDTA

in ddH₂O

pH 8,3 mit NaOH

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

0,5 M IPTG

in ddH₂O

Mit einem 0,2 μ m Filter steril filtriert.

Kanamycin (Kan)

50 mg/ml Kan

in ddH₂O

Mit einem 0,2 μ m Filter steril filtriert.

Trichloressigsäure (TCA)

10 % (w/v) TCA

in ddH₂O

Tetracyclin (Tet)

20 mg/ml Tet

in Ethanol

Mit einem 0,2 μ m Filter steril filtriert.

2.1.8 Größenstandards

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific

Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific

GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific

2.1.9 Säulen

HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
(für SEC)

HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
(für SEC)

HisTrap excel 5 ml, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA (für IMAC)

HiTrap Phenyl HP, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA (für SEC)

HiTrap Q HP 5 ml, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA (für SEC)
HiTrap TALON 5 ml, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA (für SEC)
Protino GST/4b 5 ml, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland (für IMAC)
Protino Ni-NTA 5 ml, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland (für IMAC)
Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA (für SEC)

2.1.10 Laborgeräte

ÄKTAprime plus, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
ÄKTA start, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Cell Disruptor One Shot Model, Constant Systems Ltd., Low March, Vereinigtes
Königreich
ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien,
USA
Direct Detect Infrarot-Spektrometer, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt,
Deutschland
Mini PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Mini Trans-Blot Cell,, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massa-
chusetts, USA
PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Sicherheitswerkbank Herasafe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachu-
setts, USA
Spectropolarimeter J-815, Jasco Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
Sonotrode VS70/T, Reichmann Industrieservice, Hagen, Deutschland
Spectrophotometer V-650, JascoDeutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland
Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tecan Spark Plattenlesegerät, Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Techne Dri-Block DB-3, Agilent, Kawasaki, Präfektur Kanagawa, Japan
T100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA

Zentrifuge Avanti J-20, Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
mit den Rotoren: JLA10.500 JA-20, Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Vinyl Anaerobic Chamber, Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, Vereinigte Staaten

2.1.11 Software

CCP4i, International Union of Crystallography
CCP4i2, International Union of Crystallography
OriginPro 9.0G, OriginLab
PyMOL, DeLano Scientific
Image Lab 5.0, Bio-Rad
SnapGene, GSL Biotech LLC
ChemSketch, ACD Labs
Adobe Illustrator CS5, Adobe Systems
Microsoft Office 2013, Microsoft
Phenix Graphical User Interface
PrimeView, GE Healthcare Life Sciences
PrimeView Evaluation, GE Healthcare
XDS Package, MPI for Medical Research, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen für die Transformation (2.2.1.3) wurden 5 ml LB-Medium in einem sterilen Glasröhrchen mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm innokuliert. Bei einer bestehenden Antibiotikaresis-

tenz wurden zusätzlich 5 μl der Antibiotika-Stammlösung hinzugegeben. Die Zellen wurden 16 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium in einem sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikane angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4 bis 0,5 bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 2000 xg geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml eiskaltem TFB1-Puffer suspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut für 5 min bei 4 °C und 2000 xg geerntet und nach Abnahme des Überstands in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer suspendiert. Die Suspension wurde nach 30-minütiger Inkubation auf Eis in 50 μl -Aliquots in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Präparation elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen für die Transformation (2.2.1.3) wurden 5 ml LB-Medium in einem sterilen Glasröhrchen mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm innokuliert. Bei einer bestehenden Antibiotikaresistenz wurden zusätzlich 5 μl der Antibiotika-Stammlösung hinzugegeben. Die Zellen wurden 16 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium in einem sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikane angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,4 bis 0,5 bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 2000 xg geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 30 ml sterilem ddH₂O und einmal mit sterilem 10 % Glycerol gewaschen. Das Zellpellet wurde im Anschluss in 1 ml sterilem 10 % Glycerol aufgenommen und in 50 μl -Aliquots in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zum Einbringen eines klonierten Plasmids (2.2.2.2) in *E. coli*-Zellen, wurden 50 μl chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (2.2.1.1) auf Eis aufgetaut und direkt mit 1 μl 10 ng/ μl Plasmid-DNA bzw. 2,5 μl In-Fusion-Produkt (2.2.2.4) versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis und einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden auf Eis 800 μl SOC-Medium zugegeben. Nach 45 min bei 37 °C wurden 100 μl Kultur auf einer LB/Antibiotikum-Agar-Platte ausplattiert und diese für 16 h bei 37 °C inkubiert. Aus den entstandenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA mittels NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kit isoliert und mittels Colony-PCR (2.2.2.2) analysiert.

2.2.1.4 Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Zum Einbringen von zwei Plasmiden (2.2.2.2) in *E. coli*-Zellen, wurden 50 μl elektrokompenter *E. coli*-Zellen (2.2.1.2) auf Eis aufgetaut und direkt mit jeweils 1 μl 10 ng/ μl Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1 cm überführt und mit einem Elektroporator dessen Kondensator bei einer Kapazität von 50 μF und einem Ladewiderstand von 150 Ω eine Spannung von 1.500 V entladen. mit 500 μl LB-Medium wurden die Zellen in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Davon wurden 100 μl auf einer LB/Antibiotikum-Agar-Platte ausplattiert und diese für 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.5 Stammhaltung von *E. coli*

Zur Stammhaltung der positiv sequenzierten *E. coli*-Stämme (2.2.2.6) nach der Transformation (2.2.1.3), wurden Glycerolstocks aus Übernachtskulturen hergestellt. Dazu wurden in einem sterilen Glasröhrchen 5 ml 2YT-Medium mit 5 μl Antibiotikum-Stocklösung mit einer Kolonie des *E. coli*-Stamms angeimpft. Nach einer Inkubation für 16 h bei 37 °C und 180 rpm wurden 500 μl Kultur in einem

sterilen 1,5 ml-Schraubreagiergefäß mit 500 μ l sterilem 70 % Glycerol versetzt. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Glycerolstocks bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.1.6 Kultivierung von *E. coli* zur Expression in Vollmedium

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte (vgl. Plasmidkarten unter 2.1.3) wurden in verschiedenen Vollmedien unter Zugabe von Antibiotika exprimiert (vgl. Tab. 2.4).

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Expressionsstämme und -vollmedien.

Medium	Expressionsstamm	Antibiotikum
2YT-Medium	<i>E. coli</i> BL21 pET16b-TEV-alkF	Ampicillin
	<i>E. coli</i> BL21 pGEX-6P-2-rubA	Ampicillin
	<i>E. coli</i> C41 pGEX-6P-2-rxn	Ampicillin
	<i>E. coli</i> BL21 pET16b-aco	Ampicillin
	<i>E. coli</i> pET16b-acoA	Ampicillin
TB-Medium	<i>E. coli</i> BL21 pET16b-TEV-alkG	Ampicillin
	<i>E. coli</i> C41 pET-SUMOadapt-alkG-CT	Kanamycin
	<i>E. coli</i> C41 pET-SUMOadapt-alkG-NT	Kanamycin
	<i>E. coli</i> BL21 pGEX-6P-2-acnB	Ampicillin

Zur Genexpression wurden aus dem entsprechenden Glycerolstock (2.2.1.5) 50 ml Medium mit 50 μ l Antibiotikumstocklösung in einem sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane innokuliert. Nach 16 h Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 160 rpm wurden 10 ml der Vorkultur in 1 l Medium mit 1 ml des Antibiotikums in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,8 bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 120 rpm geschüttelt. Nach Induktion mit 0,5 mM IPTG wird das Zielgen für 20 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ exprimiert. Die Zellen wurden mittels J-LITE JLA-10.500 Fixed-Angle Aluminum Rotor für 10 min bei $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5000 xg geerntet, mit 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und bis zum Zellaufschluss (2.2.3.2) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.1.7 Kultivierung von *E. coli* zur Expression in M9-Minimalmedium

Kobalt-substituierte Varianten der Fe-S-Proteine sollten auch *in vivo* in *E. coli*-Zellen produziert werden. Dazu wurde eine Vorkultur des Expressionsstamms in 5 ml 2YT-Medium mit 5 μ l des Antibiotikums (vgl. Tab. 2.4) in einem sterilen Glasröhrchen aus dem Glycerolstock (2.2.1.5) innokuliert. Nach 16 h bei 37 °C und 180 rpm wurde die Kultur passagiert^[31]. Dazu wurden die Zellen für 15 min bei 5000 xg und 21 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 ml eines speziellen M9-Minimalmediums (2.1.6.1) mit 50 μ l Antibiotikumstocklösung resuspendiert, in einen sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt und bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Das Passagieren wurde alle 8 h bis 16 h wiederholt. Im sechsten Passagierschritt wurden die Zellen in 1 l M9-Minimalmedium mit 1 ml Antibiotikumstocklösung in einen sterilen 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 140 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 inkubiert, bevor die Expression mit 0,5 mM IPTG induziert wurde. Nach 4 h Expression bei 37 °C und 140 rpm wurden die Zellen mittels J-LITE JLA-10.500 Fixed-Angle Aluminum Rotor (Beckman Coulters) für 10 min bei 10 °C und 5000 xg geerntet, mit 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und bis zum Zellaufschluss (2.2.3.2) bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Plasmidisolierung

Zur Isolierung eines Plasmids aus *E. coli*-Zellen wurden 5 ml LB-Medium in einem sterilen Glasröhrchen mit 5 μ l Antibiotikumstocklösung versetzt und mit *E. coli*-Zellen aus einem Glycerolstock (2.2.1.5) oder von einer LB-Agar-Platte nach der Transformation (2.2.1.3) innokuliert. Nach 16 h bei 37 °C und 180 rpm wurden die Zellen in drei Zentrifugationsschritten für 1 min bei 16.000 xg und

21 °C in einem 2 ml-Reaktionsgefäß geerntet. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung mittels „NucleoSpin Plasmid EasyPure“-Kit, wobei abweichend von den Herstellerangaben die Elution des Plasmids von der Säule mit 50 µl 70 °C H₂O durchgeführt wurde. Das isolierte Plasmid wurde in der Polymerase-Kettenreaktion (2.2.2.2), zur Transformation mit chemisch kompetenten Zellen (2.2.1.3) oder zur Sequenzierung (2.2.2.6) eingesetzt.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifizierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten mittels PCR für die In-Fusion-Klonierung (2.2.2.4) mussten Primer gewählt werden, welche eine 15 Basenpaare (bp) lange Überlappung von Vektor und Gen ergeben (vgl. 2.1). Zur Durchführung der PCR wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß folgende Reaktionsansätze vorbereitet:

1X Phusion HF Buffer
10 mM dNTP-Mix
0,2 µM Forward Primer
0,2 µM Reverse Primer
25 ng Template (Vektor bzw. Gen)
2 Vol.-% Phusion DNA Polymerase
ad 50 µl mit ddH₂O

Die PCR vor der In-Fusion-Klonierung wurde nach folgendem Programm im T100 Thermal Cycler durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 30 s bei 98 °C
35 Zyklen: 10 s bei 98 °C, 30 s bei 72 °C, 30 s pro Kilobase bei 72 °C

Finale Elongation: 5 min bei 72 °C

Abkühlung bei 10 °C

Das Template wurde mittels DpnI-Verdau entfernt (2.2.2.3).

Mutationen in Plasmiden

Zum Einfügen einer Mutation, wie zum Beispiel einer Punktmutation oder einer Schnittstelle für die TEV-Protease, in ein Plasmid wurde in einer QickChange-PCR [146] folgender Reaktionsansatz in einem PCR-Reaktionsgefäß vorbereitet:

1X Phusion HF Buffer

200 ng Plasmid

5 mM dNTP-Mix

5 μ M Primer mit Mutation

2 Vol.-% Phusion DNA-Polymerase

ad 25 μ l mit ddH₂O

Die QickChange-PCR wurde im T100 Thermal Cycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 3 min bei 95 °C

18 Zyklen: 15 s bei 95 °C; 1 min bei 44 °C; 12 min bei 68 °C

Finale Elongation: 7 min bei 68 °C

Abkühlung bei 4 °C

Anschließend wurde mittels DpnI-Verdau das Template entfernt (2.2.2.3).

Kolonie-PCR

In einer Kolonie-PCR wurde das Plasmid nach der Transformation in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Blue-Zellen (2.2.1.3) auf das Insert überprüft. Dazu wurden mehrere Klone mittels steriler Pipettenspitze gepickt und in jeweils 50 μ l H₂O überführt. Die Suspension wurde 10 min bei 95 °C inkubiert und für 5 min bei 21 °C und 16000 xg zentrifugiert. Für die PCR wurden 2 μ l des Überstands mit 8 μ l Mastermix in einem PCR-Reaktionsgefäß vermischt. Der Mastermix für die Kolonie-PCR setzt sich folgendermaßen zusammen:

1X ThermoPol Reaction Buffer
0,25 mM dNTP-Mix
0,625 μ M Primer mit Mutation
0,625 Vol.-% Taq DNA Polymerase
ad 80 μ l mit dd H₂O

Die Kolonie-PCR wurde im T100 Thermal Cycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung: 30 s bei 95 °C
25 Zyklen: 15 s bei 95 °C; 30 s bei 55 °C; 2,5 min bei 68 °C
Finale Elongation: 5 min bei 68 °C
Abkühlung bei 10 °C

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (2.2.2.5).

2.2.2.3 DpnI-Verdau

Wenn für die PCR (2.2.2.2) ein aus *E. coli* gewonnenes Plasmid als Template eingesetzt wurde, dann konnte dieses nach der PCR mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut werden. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit 1x „CutSmart buffer“ und 1 μ l DpnI-Restriktionsendonuklease versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer Hitzedeaktivierung für 20 min bei 80 °C wurde das PCR-Produkt mittels „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“-Kit isoliert, mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.5) überprüft und für die Transformation (2.2.1.3) oder die In-Fusion-Klonierung (2.2.2.4) eingesetzt.

2.2.2.4 In-Fusion-Klonierung

Nachdem der Vektor und das Gen per PCR mit überlappenden Enden amplifiziert wurden (2.2.2.2) und das Template mittels DpnI-Verdau entfernt wurde (2.2.2.3), wurden die PCR-Produkte für die In-Fusion-Reaktion eingesetzt. Dazu

wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß folgender Reaktionsansatz zusammengesetzt:

25 ng/ μ l Vektor

50 ng/ μ l Gen

1X In-Fusion HD Enzyme Premix

ad 10 μ l mit ddH₂O

Der Ansatz wurde 30 min bei 50 °C inkubiert, auf 10 °C abgekühlt und mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Blue-Zellen eingebracht.

2.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe eines DNA-Fragments nach einer PCR (2.2.2.2) oder einer Plasmid-Isolierung (2.2.2.1) wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 5 μ l DNA-Probe mit 1 μ l 6x Agarosegel-Probenpuffer versetzt. 3,5 μ l GeneRuler 1 kb DNA Ladder bzw. 6 μ l DNA-Probe wurden in die Taschen eines 1%-igen Agarosegels in TAE-Puffer überführt und für 1 h eine Spannung von 120 V angelegt. Anschließend wurde das Agarosegel in einer Geldokumentationskammer dokumentiert.

2.2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden nach der Isolierung (2.2.2.1) erfolgte durch die Firmen GATC Biotech, Konstanz bzw. Microsynth SeqLab, Göttingen. Dazu wurde das Plasmid nach Firmenangaben verdünnt und mit einem Sequenzierprimer versetzt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Über die Extinktion bei 280 nm

Die Proteinkonzentration wurde über die Extinktion bei 280 nm unter Einbeziehen des über das Programm ProtParam des ExPASy-Servers^[147] berechneten Extinktionskoeffizienten (vgl. Tab. 2.5) ermittelt. Die Konzentration c in M ergibt sich über

$$c = E_{280nm} \div (\epsilon \times d), \quad (2.1)$$

wobei E_{280nm} die Extinktion bei 280 nm, ϵ der Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm Wellenlänge in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und d die Schichtdicke der Küvette in cm sind. Der Extinktionskoeffizient wurde über die Software ProtParam des ExPASy-Servers^[148] aus der Aminosäuresequenz errechnet (vgl. Tab 2.5).

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete berechnete Extinktionskoeffizienten ϵ .

Protein	ϵ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	ϵ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
	nach Verdau	vor Verdau
<i>P. putida</i> AlkF	15600	17100
<i>P. putida</i> AlkG	34200	35600
<i>P. putida</i> AlkG-CT	13200	20100
<i>P. putida</i> AlkG-NT	15600	17100
<i>C. metallidurans</i> CmRxn	25100	68100
<i>D. gigas</i> DgRxn	10100	53100
<i>E. coli</i> AcnB	75600	120100
<i>A. aeolicus</i> AaAcn	-	54500
<i>T. thermophilus</i> TtAcn	-	99200
<i>E. coli</i> NadA	35600	35660
<i>E. coli</i> IspH	20100	21600
artifizielles SUMO-DSD-4C	7100	8600

Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford^[149]

Für quantitative Bindestudien (2.2.3.5 und 2.2.4.4) wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode ermittelt. Dazu wurde die Proteinkonzentration zunächst mittels Extinktion bestimmt und das Protein dann auf Konzentrationen zwischen 20 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. In Dreifachbestimmung wurden 50 μl dieser Verdünnung und 50 μl einer BSA-Standardreihe mit den Konzentrationen 0 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurden 2 Teile Roti-Quant 5x Konzentrat mit 5,5 Teilen Wasser vermischt und davon 200 μl luftblasenfrei zu dem Protein gegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm in einem Tecan Spark-Plattenlesegerät dokumentiert. Die Proteinkonzentration ergab sich aus einer linearen Regression der BSA-Standardreihe.

Infrarot-Spektroskopie

Die Bestimmung der Proteinkonzentration über Infrarot-Spektroskopie wurde mittels einem „Direct Detect“ Infrarot-Spektrometer^[150] durchgeführt.

2.2.3.2 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurden die *E. coli*-Zellen nach der Genexpression (2.2.1.6 und 2.2.1.7) bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 100 ml TBS-Puffer pro 10 g Zellen resuspendiert und mit 10 μg DNase pro 1 g Zellen und einer cOmplete Protease Inhibitor Cocktail-Tablette versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation unter Rühren bei 4 °C wurden die Zellen mittels Ultraschall mit der Sonotrode VS70/T für 10 min bei einer Amplitude von 50 % und 1 s Puls alle 4 s aufgeschlossen. Über eine Zentrifugation im JA20-Fixed Angle Rotor für 1 h bei 10 °C und 40000 xg wurden die festen Zellbestandteile vom Zellysats getrennt. Anschließend konnte das Protein aus dem Überstand isoliert werden (2.2.4.3).

2.2.3.3 Protease-Verdau

Da der Affinitätstag einen negativen Einfluss auf die Ergebnisse von Bindestudien haben kann, wurde dieser bei einem Teil der verwendeten Konstrukte mittels Protease-Verdau nach der Affinitätschromatografie (2.2.4.3) entfernt. Protease und Tag ließen sich im Anschluss chromatografisch (2.2.4.3) vom Zielprotein trennen.

Tabacco Etch Virus (TEV)-Protease-Verdau

Zum Abtrennen des Polyhistidintags von Konstrukten des pET16b-TEV-Plasmids und des pQE30-TEV-Plasmids wurde das isolierte His-getaggte Protein auf eine Konzentration von 1 mg/ml in TBS-Puffer verdünnt, mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA versetzt und die Proteolyse durch Zugabe von 10 µg/ml TEV-Protease gestartet. Nach 16 h unter leichtem Rühren bei 4 °C wurden DTT und EDTA mittels Dialyse in TBS-Puffer entfernt und ungeschnittenes Protein, der His-Tag und die His-getaggte Protease mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC) (2.2.4.3) entfernt.

PreScission-Protease-Verdau

Die PreScission-Protease wurde genutzt, um den GST-Tag von Zielproteinen aus dem Plasmid pGEX-6P-2 abzutrennen. Dazu wurde zu 1 mg/ml Protein in TBS-Puffer mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA 10 µg/ml PreScission-Protease gegeben. Nach 16 h unter leichtem Rühren bei 4 °C konnte ungeschnittenes Protein, der GST-Tag und die Protease chromatografisch (2.2.4.3) vom Zielprotein abgetrennt werden.

Ubiquitin-like-specific Protease (Ulp1)-Verdau

Um den Polyhistidintag von Konstrukten des Plasmids pET-SUMO-adapt abzutrennen, wurde das isolierte Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 1 mM DTT, 0,02 % (v/v) IGEPAL und 1 µg/ml Ulp1-Protease versetzt. Nach 16 h bei 4 °C oder 2 h bei RT wurde nicht geschnittenes Protein und der Polyhistidintag mittels IMAC entfernt, das Volumen des geschnittenen Proteins reduziert und die Protease über eine Größenausschlusschromatografie (SEC) (2.2.4.3) entfernt.

Enterokinase-Verdau

Mittels Enterokinase-Verdau wurde der Polyhistidintag von Konstrukten des Plasmids pET46 EK/Lic entfernt. Dazu wurde 1 mg/ml Protein in TBS-Puffer mit 2 mM CaCl₂ und 160 U/ml Enterokinase versetzt. Nach 24 h unter leichtem Rühren bei 4 °C wurde die Enterokinase chromatografisch (2.2.4.3) vom Zielprotein entfernt.

2.2.3.4 Entfernen des natürlichen Cofaktors

Trichloressigsäure-Fällung

Um die Rubredoxine in der Apoform zu erhalten, wurden, nach der Isolierung der Holoproteine (2.2.4.3), die Metallionen mittels TCA-Fällung aus der Metallbindestelle entfernt. Dazu wurden 100 µM bis 200 µM Protein in 10 % TCA für 1 h auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 16000 xg und 10 °C wurde der Überstand entfernt. In drei Schritten wurde das Pellet mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen, für 5-15 min bei 16000 xg und 10 °C zentrifugiert und der Überstand restlos entfernt. Anschließend wurde das Pellet bei RT für 1 h getrocknet und danach unter leichtem Rühren bei 4 °C in 50 mM HEPES-Puffer gelöst. Ungelöstes Protein wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 16000 xg und 10 °C abgetrennt und der Überstand in ein frisches Reagiergefäß überführt und die Proteinkonzentration ermittelt (2.2.3.1).

Entfernung des [4Fe-4S]-Clusters

Zur Entfernung von höhermolekularen Clustern wurde das Protein nach der Isolierung auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt und mit 100 mM EDTA und einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt. Nach 24 h unter leichtem Rühren wurde das Protein mittels Dialyse in 50 mM HEPES-Puffer versetzt, ausgefallenes Protein für 15 min bei 7000 xg und 4 °C abgetrennt und die Konzentration im Überstand bestimmt (2.2.3.1).

2.2.3.5 Rekonstitution von Metalloproteinen

Nach dem Entfernen des natürlichen Cofaktors aus dem Protein (2.2.3.4) wurde das Apoprotein zur Rekonstitution eines Metallcofaktors eingesetzt. Zur Rekonstitution eines Fe-Cofaktors wurde das Protein mindestens 24 h vorher in eine anaerobe Kammer eingeschleust und unter Sauerstoffausschluss das Cluster assembliert. Zu 10-200 μM Apoprotein wurden 10 eq. TCEP pro Metallbindestelle und 1 eq. bis 20 eq. des Metallions gegeben. Zur Gewinnung von Kobalt-substituierten Proteinen wurde 100 μM Kobaltchlorid und für Eisen-Proteine eine 1:1-Mischung von Ammoniumeisen(II)-sulfat und Ammoniumeisen(III)-citrat eingesetzt. Bei [4Fe-4S]-Proteinen erfolgte nun die Zugabe von 10 eq. Lithiumsulfid in sechs Aliquots von jeweils 1,67 eq. Kobalt mit einer Inkubationszeit von je 30 min. Nach 16 h Inkubation bei 4 °C wurde das Volumen der Proben reduziert und Reduktionsmittel, nicht gebundene Metall- und Sulfidionen mittels einer PD10 (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)-, einer SEC- oder einer HiTrap Desalting-Säule (2.2.4.3) entfernt.

2.2.4 Physikalische Methoden

2.2.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Genexpression (2.2.1.6) und die Isolierung der Proteine (2.2.4.3) wurden über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verfolgt. In diesen Gelen wurden Proteine entweder unspezifisch über Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau oder immunologisch mittels Western-Blot (2.2.4.2) nachgewiesen.

Probenvorbereitung

Für Ganzzellproben wurden die Zellen aus 1 ml Medium mit einer OD_{600} von 1 durch Zentrifugation bei 13000 $\times g$ und 21 °C geerntet und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in 100 μl 1x Glycin- bzw. Tricin-Auftragspuffer suspendiert

und 10 min bei 95 °C gekocht. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13.000 xg und 10 °C wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und erneut für 30 min bei 10 °C und 13.000 xg zentrifugiert. Pro Geltasche wurden 10 µl des Überstands für die SDS-PAGE eingesetzt.

Die Proben des isolierten Proteins wurden bei Bedarf verdünnt. Für die Glycin-SDS-PAGE wurde 16 µl Protein mit 4 µl 5x Glycin-Auftragspuffer und für die Tricin-SDS-PAGE wurden 15 µl Protein mit 5 µl 4x Tricin-Gelpuffer versetzt. Nach 5 min bei 95 °C wurden 10 µl Probe pro Geltasche eingesetzt.

Glycin-SDS-PAGE

Für Zielproteine mit einer Größe von mehr als 15 kDa wurde eine Glycin-SDS-PAGE zur Analyse genutzt. Dazu wurden Glycin-Gele gegossen und TGS-Puffer als Laufpuffer genutzt. Neben den Proben wurden 3,5 µl des „PageRuler Plus Prestained Protein Ladder“ aufgetragen und die PAGE für etwa 1,5 h bei 25 mA bis 30 mA pro Gel durchgeführt.

Tricin-SDS-PAGE

Bei Zielproteinen unter 15 kDa wurde eine Tricin-SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden Tricin-Gele gegossen und Tricinkathoden- und Tricinanodenpuffer verwendet. Als Größenstandard wurden 3,5 µl „Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder“ in eine Geltasche aufgetragen. Die Tricin-SDS-PAGE lief für etwa 4 h bei 40 mA pro Gel.

Färbung des SDS-Gels

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel in SDS-Färbelösung überführt, leicht erwärmt und 1 h bei RT geschüttelt. Danach wurde die Färbelösung mit ddH₂O abgewaschen und durch Entfärbelösung ersetzt. Nach mindestens 3 h unter Schütteln bei RT wurde das Gel in der Geldokumentationskammer dokumentiert.

2.2.4.2 Western-Blot-Analyse

Zum immunologischen Nachweis des Polyhistidintags in SDS-Gelen (2.2.4.1) wurde ein Western-Blot im Wet-Blot-Verfahren angewendet. Hierfür wurde eine

Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran in Methanol aktiviert, mit ddH₂O gewaschen und mit sechs Filterpapieren und dem SDS-Gel für 10 min in Towbin-Puffer inkubiert. Der Blot wurde in der folgenden Reihenfolge aufgebaut: Schwamm, drei Filterpapiere, SDS-Gel, PVDF-Membran, drei Filterpapiere, Schwamm. Nach 1 h bei 350 mA in der Blotting-Apparatur wurde die Membran für eine Stunde in 25 ml Blockpuffer inkubiert und dreimal für 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h in 10 ml 1:10000 Anti-His-HRP-Konjugatlösung in TBS-Puffer mit 1 % (w/v) Milchpulver inkubiert. Vor der Dokumentation in der Dokumentationskammer wurde die Membran dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Dokumentation erfolgte mit 1 ml SuperSignal West Pico Plus (Thermo Fisher Scientific).

2.2.4.3 Chromatografie

Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatografie

Für die IMAC wurde eine 5 ml-HisTrap excel-Säule, eine 5 ml-Ni-NTA-Säule oder eine HiTrap TALON-Säule an einem ÄKTA Prime-FPLC-System mit 10 Säulenvolumen (CV) TBS-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinprobe mit einer Flussrate von 1,5 ml/min bis 3 ml/min auf die Säule aufgetragen, bevor mit einer Flussrate von 2,5 ml/min bis 5 ml/min nicht gebundenes Protein mit TBS-Puffer abgewaschen wurde. Anschließend wurde bei einer Flussrate von 1,5 ml/min bis 3 ml/min gebundenes Protein mit einem Stufengradienten bei einer Imidazolkonzentration von 2,5 mM bis 250 mM eluiert. Für das Abtrennen des Tags (2.2.3.3) wurde anschließend das eluierte Protein mittels Dialyse in TBS-Puffer überführt und einer weiteren IMAC durchgeführt. Dabei befand sich das Protein im Durchfluss, während der Polyhistidintag und die His-getaggte Protease an der Säule gebunden wurden. Im Anschluss wurde das Protein mittels einer Dialyse bei 4 °C in 50 mM HEPES-Puffer überführt.

Glutathion-S-Transferase-Affinitätschromatografie

Zum Isolieren von Proteinen mit einem Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag wurde eine Protino GST/4B-Säule mit 10 CV TBS-Puffer bei 5 ml/min äquilibriert. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/min wurde die Proteinlösung

in TBS-Puffer auf die Säule aufgetragen. Nicht gebundenes Protein wurde im Anschluss bei 5 ml/min mit TBS-Puffer abgewaschen. Anschließend wurde gebundenes Protein mit TBS-GSH-Puffer bei einer Flussrate von 2,5 ml/min eluiert. Mittels ausgiebiger Dialyse bei 4 °C in TBS-Puffer wurde GSH aus dem Eluat entfernt. Nach dem Abtrennen des GST-Tags (2.2.3.3) wurde das Zielprotein mittels GST-Affinitätschromatografie vom GST-Tag getrennt.

Anionenaustauschchromatografie

Zur Vorbereitung der Anionenaustauschchromatografie (AEC) wurde das Protein mittels Dialyse in Tris-Niedrigsalzpuffer überführt und eine HiTrap Q HP-Säule mit 10 CV Tris-Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min wurde das Protein auf die Säule aufgetragen und nicht gebundenes Protein mit Tris-Niedrigsalzpuffer abgewaschen. Anschließend wurde das Zielprotein über einen Gradienten von 10 mM NaCl bis 500 mM NaCl eluiert und restliches Protein mit Tris-Hochsalzpuffer von der Säule entfernt.

Hydrophobe-Interaktions-Chromatografie Für die Hydrophobe-Interaktions-Chromatografie (HIC) wurde das Protein in TBS-Puffer dialysiert und 40 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung hinzugegeben. Ausgefallenes Protein wurde nach 1 h Inkubation bei 4 °C durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 8.000 xg entfernt. Eine HiTrap Phenyl HP-Säule wurde mit 10 CV TBS-Puffer mit 40 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung äquilibriert und das Protein bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/min aufgetragen. Über einen Gradienten von 40-0 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurde das Protein eluiert.

Größenausschlusschromatografie

Für die präparative SEC wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg- beziehungsweise eine HiLoad 16/600 Superdex 75 pg-Säule mit 3 CV 50 mM HEPES-Puffer bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Das Volumen der Proteinprobe wurde auf 2,5 ml in 50 mM HEPES-Puffer reduziert und anschließend über einen 5 ml-Loop bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule injiziert. Die Chromatografie erfolgte bei einer Flussrate von 0,3 ml/min bis 0,8 ml/min. Zur Durchführung einer analytischen SEC wurde eine Superdex 75 10/300 GL-Säule mit 50 mM HEPES-Puffer äquilibriert. Über einen 1 ml-Loop wurden 500 µl

Proteinprobe in 50 mM HEPES-Puffer bei einer Flussrate von 0,8 ml/min über die Säule gegeben. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm, 254 nm und 215 nm dokumentiert.

2.2.4.4 Elektronenabsorptionsspektroskopie

Die Elektronenabsorptionsspektroskopie (EAS) wurde in einem Cary-60 Spektralphotometer unter Abzug der Basislinie des eingesetzten Puffers von 800 nm bis 250 nm in Quarzküvetten mit einer Länge von 1 cm aufgenommen. Dazu wurde eine Messzeit pro Datenpunkt („Average time“) von 0,5 s, ein Datenintervall von 1 nm und eine Scanrate von 120 nm/min gewählt.

2.2.4.5 Metallbindestudie

Metallbindestudien an Eisen-Schwefelproteinen wurden aerob mit Kobaltchlorid bzw. anaerob mit einer 1:1-Mischung aus Ammoniumeisen(II)-sulfat und Ammoniumeisen(III)-citrat durchgeführt. Die Bindung wurde mittels Elektronenabsorptionsspektroskopie (EAS) und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) verfolgt.

Bindestudie über EAS

Zur Verfolgung der Bindung von Metallionen in die Metallbindestelle von Eisen-Schwefel-Proteinen wurde das Protein auf 50 μM bzw. 100 μM in 50 mM HEPES-Puffer mit 10 eq. TCEP verdünnt. 500 μl wurden in eine 500 μl Quarz-Küvette überführt und ein Elektronenabsorptionsspektrum (2.2.4.4) aufgenommen. Anschließend wurde in Schritten von 0,5 eq. des Metallions aus einer hochkonzentrierten Stocklösung im Verhältnis zu den Metallbindestellen des Proteins zur Proteinlösung titriert, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und weitere Spektren aufgenommen.

Bindestudie über ICP-MS

Zur quantitativen Ermittlung der Metallbindung an isoliertes Protein wurden zu

10-100 μM Apoprotein in 50 mM HEPES-Puffer mit 10 eq. TCEP bis zu 20 eq. des Metallions für die Rekonstitution (2.2.3.5) gegeben. Nach Inkubation bei 4 °C für 16 h wurden nicht gebundene Metallionen mittels PD-10-Säule entfernt und die Metallkonzentration mittels ICP-MS (2.2.4.6) bestimmt.

2.2.4.6 Massenspektrometrie

ICP-MS

Zur quantitativen Ermittlung der Metallbindung an isoliertem (2.2.1.7) oder rekonstituiertem Protein (2.2.3.5) wurde der Metallgehalt mittels ICP-MS bestimmt. Dazu wurden 2,5 ml $\sim 10 \mu\text{M}$ Protein mit 2,5 ml 6 % HNO_3 in einem metallfreien 15 ml-Reaktionsröhrchen versetzt und das ausgefallene Protein mittels Zentrifugation für 15 min bei 7000 xg entfernt. Der Überstand wurde als ICP-MS-Probe in einem Agilent 7500ce ICP-MS Instrument (Agilent Technologies, Ratingen, Deutschland) im Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik (ZEA-3) im Forschungszentrum Jülich untersucht. Die Proteinkonzentration wird mittels Bradford-Assay (2.2.3.1) bestimmt.

ESI-MS

Für die Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS) wurden 0,5 mg/ml Protein mittels Dialyse in 20 mM HEPES, pH 7,7, 100 mM NaCl überführt. Davon wurden 100 μl in einer „reversed phase high performance liquid chromatography“ (RP-HPLC) eingesetzt. Diese wurde auf einer analytischen Zorbax 300SB C8 4,6x250 mm Säule (Agilent Technologies, Ratingen, Germany) durchgeführt, die angeschlossen an ein Agilent 1260 infinity System mit einer UV Detektion bei 214,2 nm and 276,2 nm bei 20 °C war. Als mobile Phase diente 28 % (v/v) Acetonitril (Acn) und 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Wasser. Für die Elution wurde ein 30-minütiger Gradient auf 48 % Acn angelegt und Fraktionen gesammelt. Diese wurden in der Lyophilie getrocknet und in 10 μl 60 % (v/v) Methanol und 5 % (v/v) Ameisensäure in Wasser gelöst. Die ESI-MS Messungen wurden von Dr. Sabine Metzger am Leibniz Forschungsinstitut für Umweltmedizinische Forschung an einem ESI QqTOF

Instrument (Q-STAR XL, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) ausgerüstet mit einer offline-Nanospray Quelle (Proxeon, Dänemark) durchgeführt. Die MS-Messungen von 700-2000 m/z wurden mittels Analyst QS version 1.1 (Applied Biosystems, Deutschland) aufgenommen und die ESI-MS-Spektren über die Analysesoftware (Applied Biosystems) unter Nutzung des enthaltenen Dekonvolutionsalgorithmus rekonstituiert.

2.2.4.7 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Zirkulardichroismus(CD)-Spektren wurden in einem Jasco J-815 Circular dichroism Spektrometer aufgenommen.

CD-Spektroskopie im fernen UV-Bereich

Zur Messung eines CD-Spektrums im fernen ultravioletten Bereich wurde das Protein auf 0,1 mg/ml bis 0,2 mg/ml in 10 mM Natriumphosphat-Puffer verdünnt und ein Spektrum bei 20 °C in einer Quartzküvette mit einem 1 mm Lichtweg mit folgenden Parametern aufgenommen: Start: 260 nm, Ende: 190 nm, Scangeschwindigkeit: 100 nm/min, Bandbreite: 5 nm, Wiederholungen: 20

CD-Spektroskopie im UV/VIS-Bereich

CD-Spektren im ultravioletten (UV)/sichtbaren (VIS)-Bereich wurden bei 20 °C in einer Quartzküvette mit einem 1 mm Path von 800 nm bis 300 nm Wellenlänge aufgenommen. Dabei wird die Empfindlichkeit auf Standard, die Bandbreite auf 5 nm, der Datenintervall auf 0,5 nm und die Scanrate auf 100 nm/min gesetzt. Das Protein wurde in einer Konzentration von mindestens 300 μ M eingesetzt und drei bis 20 Messungen zu einem Spektrum akkumuliert.

2.2.4.8 Röntgenstrukturanalyse der *D. desulfuricans*

Hydrogenase

Zur Kristallisation wurde die inaktive *Desulfovibrio desulfuricans* [FeFe]-Hydrogenase (*DdHydAB*) im H_{inact} -Zustand in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,6

überführt. Im Dampfdiffusionsverfahren mittels „sitting drop“-Methode mit einer 1:1-Verdünnung von 15 mg/ml H_{inact} mit der Reservoirlösung aus 0,9 M Lithiumchlorid, 26 % Polyethyleneglycol 6000 (PEG600) und 0,1 M Natriumacetat wuchsen nach zwei bis drei Tagen bei 12 °C braune Kristalle. Nach drei bis acht Tagen wurden diese für 60 s in cryokonservierender Lösung (50 % PEG6000 in H_2O) inkubiert und anschließend in MiTeGen MicroMounts bzw. MicroLoops mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg, Deutschland) an der Beamline P11, PETRA III wurden Datensets der Wellenlängen 6 keV und 12,4 keV bei 100 K aufgenommen. Diese wurden über das Programmpaket XDS^[151] prozessiert. Mittels des Softwarepakets CCP4^[152] wurde das Molekulare Ersatz und die Verfeinerung der Struktur ausgehend von der *D. desulfuricans* Hydrogenase (PDB ID: 1HFE) durchgeführt. Dazu wurden für die Datenreduzierung AIMLESS^[152], für die Phasierung PHASER^[153], für die Modellbildung und die Validierung Coot^[154] und für die Verfeinerung der Struktur REFMAC5^[155] verwendet. Mittels FFT, CMAPCUEFF und PHENIX^[156] wurden Elektronendichtekarten berechnet. Die Abbildungen wurden mittels PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) erstellt. Eine Struktur wurde in der Protein Data Bank (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) an der Rutgers University (PDB ID: 6SG2) deponiert.

3 Ergebnisse

Inhaltsangabe

3.1	Artifizielle Cobalt-Schwefel-Proteine	70
3.2	Die Eisen-Bindestellen des <i>P. putida</i> AlkG	85
3.3	Strukturelle Charakterisierung einer sauerstoffstabilen Variante der <i>DdHydAB</i>	101

3.1 Artificielle Cobalt-Schwefel-Proteine

Eisen-Schwefel-Proteine katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen^[33, 37–39], werden allerdings auch schnell von Luftsauerstoff oxidiert und dadurch inaktiviert^[42]. Dieser Effekt könnte durch den Austausch des Metallions in den Clustern mit anderen andere zweiwertige Metallionen umgangen werden. Anbieten würde sich dazu z.B. Kobalt, welches vergleichbare physikalische Eigenschaften wie Eisen besitzt und dabei nicht sensitiv auf Luftsauerstoff reagiert^[10]. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit artificielle [4Co-4S]-Biohybride synthetisiert und charakterisiert werden.

3.1.1 *In vitro* Assemblierung von Kobalt-Schwefel-Proteinen

Eine Möglichkeit zur Beladung von Proteinen mit Kobalt-Schwefel-Cofaktoren ist die chemische Rekonstitution, wie sie auch für Eisen-Schwefel-Proteine etabliert ist. Dazu müssen die Gerüstproteine der Metall-Schwefel-Cluster zunächst in ihre Apoform überführt und im Anschluss durch Zugabe einer Kobalt- und einer Schwefelquelle *in vitro* zu Kobalt-Schwefel-Proteinen umgesetzt werden. Die Apoproteine wurden vor der Rekonstitution in (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer überführt. Zwar wurden die Gerüstproteine in einem Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Puffer isoliert, doch können die Amine des Tris Co(II) komplexieren und so eine Kobalt-Cystein-Bindung verhindern. Da eine Bindung von Metallionen an Cysteinreste nur an reduzierten Sulfhydrylgruppen stattfindet, ist auch die Zugabe eines passenden Reduktionsmittels nötig. Dieses sollte im Folgenden ermittelt werden.

3.1.1.1 Reduktionsmittel in Kobaltbindestudien

Ein geeignetes Reduktionsmittel für die *in vitro*-Assemblierung von Kobalt-Schwefel-Clustern sollte möglichst keine Interaktion mit dem HEPES-Puffer oder

mit Kobaltchlorid zeigen. Es sollte keinen Einfluss auf die chemische Rekonstitution und somit auch nicht auf die Extinktionseigenschaften der Lösung haben. Um die Auswirkungen verschiedener Reduktionsmittel auf die Extinktion zu ermitteln wurden bis zu 1 mM CoCl_2 zu 1 mM der Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT), β -Mercaptoethanol und Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in HEPES-Puffer titriert und die Veränderungen mittels Elektronenabsorptionsspektroskopie (EAS) verfolgt (vgl. Abb. 3.1).

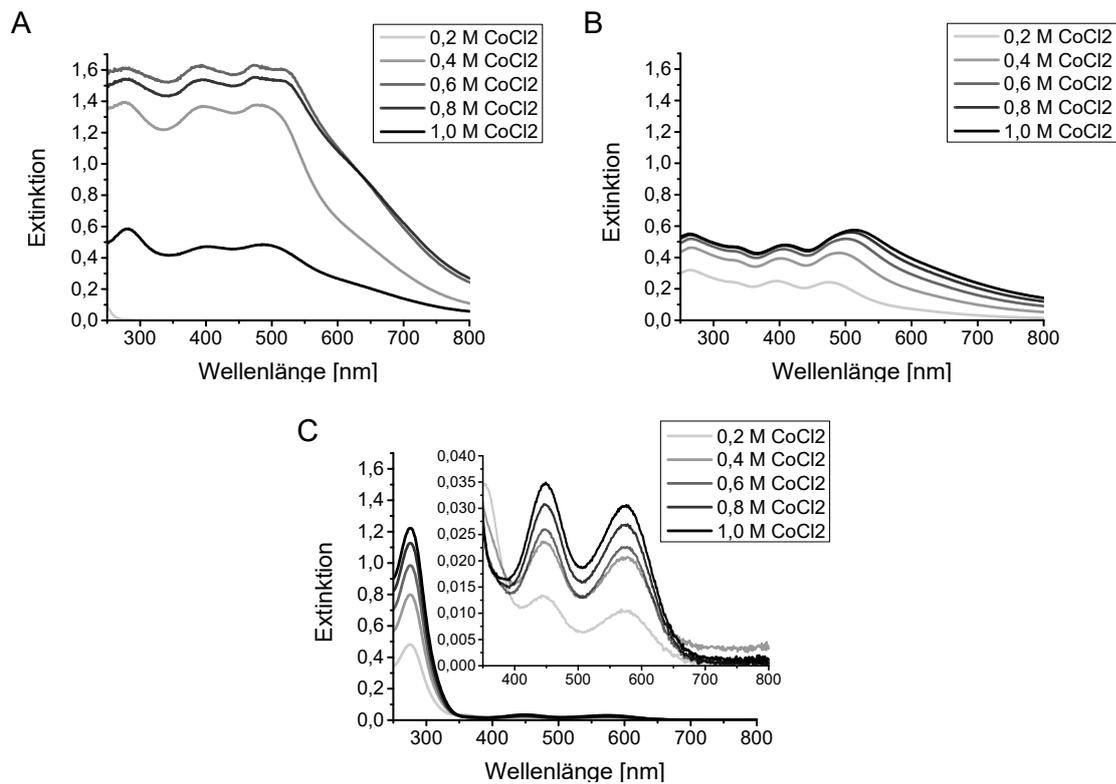


Abbildung 3.1: Interaktion von CoCl_2 mit verschiedenen Reduktionsmitteln. Elektronenabsorptionsspektren von 250-800 nm von 1 mM [A] DTT, [B] β -Mercaptoethanol und [C] TCEP mit bis zu 1 mM CoCl_2 in 50 mM HEPES, pH 7,6, 150 mM NaCl. Als Basislinie diente der HEPES-Puffer mit dem Reduktionsmittel. Bei DTT und β -Mercaptoethanol zeigt sich eine starke Extinktion und ein dunkler Niederschlag bei hohen CoCl_2 -Konzentrationen, während bei TCEP kein Präzipitat und wenige Absorptionsbanden zu beobachten sind.

Dabei fällt auf, dass alle Reduktionsmittel mit dem Kobaltchlorid interagieren. Allerdings unterscheiden sich die Spektren des DTT, des β -Mercaptoethanol und des TCEP in ihren Extinktionsbanden und in der Löslichkeit des Kobaltchlorid-

rids. Bei Addition von über 0,2 mM CoCl_2 zu 1 mM DTT erscheinen zunächst Extinktionsbanden bei 280 nm, 400 nm, 425 nm und 525 nm mit Extinktion bis zu 1,6 (vgl. Abb. 3.1[A]). Wird die Kobaltkonzentration weiter erhöht, fällt ein schwarzer Niederschlag aus und die Extinktion sinkt auf unter 0,6. Aufgrund der vielen Maxima mit hoher Extinktion und der starken Interaktion des DTT mit Kobaltchlorid bis hin zur Bildung großer Aggregate, ist DTT nicht als Reduktionsmittel für die chemische Rekonstitution von Kobalt-Schwefel-Proteinen geeignet.

Auch bei der Titration von Kobaltchlorid zu β -Mercaptoethanol zeigen sich Absorptionsmaxima im gesamten Wellenlängenbereich zwischen 265 nm und 500 nm (vgl. Abb. 3.1[B]). Diese erreichen bei Addition von 800 μM CoCl_2 eine Extinktion von maximal 0,6. Bei Zugabe von 1 mM CoCl_2 fällt auch hier ein schwarzer Niederschlag aus, was zu einer Abnahme der Extinktion über den gesamten Wellenlängenbereich führt. Demnach interagiert auch das β -Mercaptoethanol stark mit dem Kobaltchlorid und ist nicht für die chemische Rekonstitution mit Kobalt geeignet.

Im Gegensatz dazu ist bei der Titration von bis zu 1 mM CoCl_2 zu TCEP kein Niederschlag zu beobachten. Das absolute Extinktionsmaximum liegt bei 280 nm mit maximal 1,2 (vgl. Abb. 3.1[C]). Weitere Maxima liegen bei 450 nm und 580 nm Wellenlänge mit Intensitäten unter 0,4. Demnach zeigt das TCEP nur eine geringe Interaktion mit Kobaltchlorid. Mit Ausnahme der Extinktion bei 280 nm sind die Maxima so gering, dass sie bei Metallbindestudien vernachlässigt werden können. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Bindestudien von Kobaltchlorid an Apoproteine TCEP als Reduktionsmittel eingesetzt. Mit diesen Bedingungen wurden zunächst Bindestudien an Rubredoxinen als Modellprotein durchgeführt, um so die chemische Rekonstitution von Kobalthybriden zu etablieren.

3.1.1.2 Bindung von Kobalt an Apo-Rubredoxine

Rubredoxine bilden mit ihrem [1Fe]-Cluster, welches durch vier Cysteine gebunden wird die einfachste Variante der Eisen-Schwefel Proteine.^[47, 64] Aufgrund

ihres einfachen Aufbaus, eignen sie sich gut für die Entwicklung von Methoden zur Inkorporation von Metallionen, wie zum Beispiel Kobaltionen, in Eisen-Schwefel-Proteine.^[32, 45, 64, 71, 87]

Daher wurden die Gene des *Cupriavidus metallidurans* Rubredoxins (*CmRxn*) und das *Desulfovibrio gigas* Rubredoxins (*DgRxn*) in den pGEX-6P-2-Vektor kloniert, *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3) bzw. OverExpress C41(DE3) mit den Plasmiden transformiert und die Proteine in 2YT-Medium heterolog produziert. Nach dem Zellaufschluss konnten die rötlichen Rubredoxine mittels Glutathion-S-Transferase (GST)-Chromatografie aus dem Zelllysat isoliert werden. Der GST-Tag wurde mithilfe der PreScission-Protease und nachfolgender GST-Säule entfernt.

Um das Apoprotein zu erhalten wurden die Rubredoxine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, wobei das Eisen aus der Metallbindestelle in Lösung blieb und entfernt werden konnte. Das ausgefallene Rubredoxin ließ sich nach dem Waschen mit Aceton in Puffer lösen. Im Anschluss konnten das *CmRxn* und das *DgRxn* für die chemische Rekonstitution eingesetzt werden. Dazu wurden 100 μM Protein mit 10 Äquivalenten (eq.) TCEP reduziert und bis zu zwei Äquivalente Kobalt hinzu titriert. Nach Zugabe von 0,5 eq. CoCl_2 wurde je ein Elektronenabsorptionsspektrum aufgenommen (vgl. Abb. 3.2). Das EAS-Spektrum verhält sich sehr sensitiv auf Änderungen der Geometrie- und Koordinationsumgebung des Kobalts und lässt somit einen Schluss auf die Art der Kobaltbindung zu.

Schon das Spektrum des *CmRxn* ohne Kobaltzugabe zeigt, neben dem für aromatische Aminosäuren typischen Peak bei 280 nm, ein Maximum bei etwa 500 nm, welches kennzeichnend für Eisen-Proteine ist^[76] (vgl. Abb. 3.2[A]). Dies spricht dafür, dass nach der TCA-Fällung noch Eisen im Protein gebunden ist. Mit Zugabe von Kobalt entsteht eine weitere Absorptionsbande bei 354 nm, welche auf Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer (LMCT) zwischen dem Schwefel des Cysteinrests und dem Kobaltion zurückgeführt werden kann^[45, 157, 158]. Weitere Extinktionsbanden entstehen bei 627 nm, 670 nm, 695 nm und 745 nm. Diese resultieren aus d-d-Ligandenfeld (LF)-Übergängen, welche charakteristisch für eine verzerrte tetraedrische Symmetrie von high-spin Co(II)-Komplexen sind^[159]. Die Absorption bei 745 nm steigt bis zur Zugabe von 1 eq. Kobalt, was dafür spricht, dass ein Kobaltion ausreicht, um das Protein komplett mit Kobalt

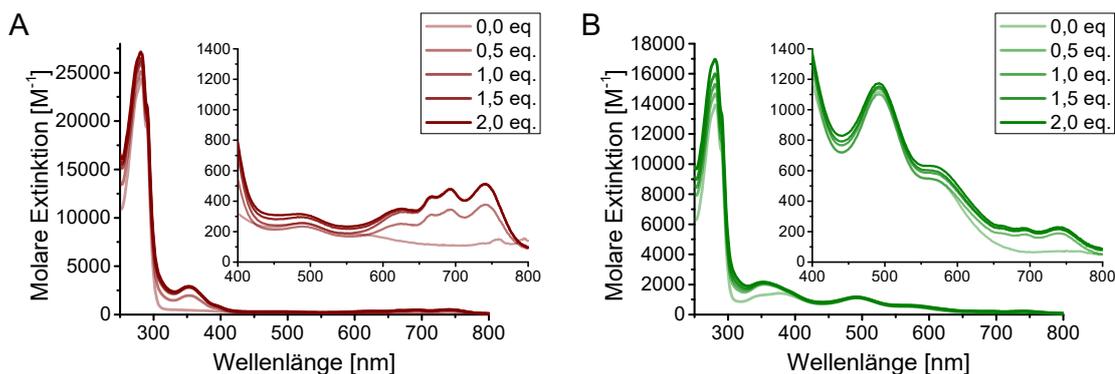


Abbildung 3.2: Bindung von Kobalt an Apo-Rubredoxine. Zu $100 \mu\text{M}$ der Rubredoxine [A] *CmRxn* und [B] *DgRxn* wurden bis zu 2 eq. CoCl_2 titriert und die Bindung von Kobalt spektroskopisch von 250-800 nm Wellenlänge verfolgt. Die Kobalt-Rubredoxin-Spektren werden charakterisiert durch LMCT und LF-Übergänge, welche entsprechend durch Extinktion bei 350 nm und zwischen 600 nm und 750 nm sichtbar werden. Die Extinktionsmaxima bei etwa 500 nm Wellenlänge resultieren aus der Bindung von Eisen, welches bei der TCA-Fällung nicht komplett aus der Metallbindestelle entfernt wurde.

zu beladen. Da bei einem Teil der Rubredoxine die Metallbindestelle noch mit Eisen besetzt ist, können nicht alle Monomere ein Kobaltion binden. Daher ist der Anstieg der Extinktion von 0 eq. auf 0,5 eq. Co(II) fast doppelt so groß, wie der Anstieg von 0,5 eq. auf 1 eq. Co(II) .

Auch das *DgRxn* zeigt ohne Kobaltzugabe Absorptionsbanden bei 500 nm und 570 nm, was für Eisen in der Metallbindestelle eines Teils der Rubredoxinmonomere spricht. Die Maxima des LMCT bzw. der LF-Übergänge sind bei 350 nm bzw. 627-745 nm vorhanden, aber mit einer Extinktion von 250 im Vergleich zu den Spektren des *CmRxn* mit einer Extinktion von 300-500 an den LMCT geringer. Allerdings zeigt das Extinktionsmaxima bei 745 nm Wellenlänge nur von 0 eq auf 0,5 eq. Co(II) einen Anstieg in der Intensität. Daher kann angenommen werden, dass noch Eisen im *DgRxn* gebunden ist und auch nicht durch Kobalt kompetitiv verdrängt werden kann.

Beide Rubredoxine zeigten nach der Kobaltbindestudie eine grünliche Färbung. Demnach können Rubredoxine, nach der Reduktion mit TCEP, Kobalt in ihrer Metallbindestelle binden. Nach der erfolgreichen chemischen Rekonstitution von [1Co]-Rubredoxinen sollten die dabei entwickelten Techniken auf [4Fe-4S]-Proteine übertragen werden, um [4Co-4S]-Proteine zu generieren.

3.1.1.3 Bindung von Kobalt an Apo-[4Fe-4S]-Proteine

[4Fe-4S]-Proteine können mit ihren kubischen Cofaktoren Reaktionen katalysieren, welche die Übertragung von bis zu vier Elektron bedürfen. Daher eröffnet die Synthese von neuartigen vierkernigen Cofaktoren, wie zum Beispiel [4Co-4S]-Cluster, eine Vielzahl an neuen Katalysiermöglichkeiten, auch im Bezug auf die Wasseroxidation. Um dabei eine hohe Variabilität zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Gerüstproteine für die chemische Rekonstitution mit Kobalt gewählt (vgl. Tab. 3.1). Diese besitzen nur [4Fe-4S]-Cluster als Cofaktoren, welche über drei Cysteinreste am Protein komplexiert sind, während das vierte Metallion eine freie Koordinationsstelle für das Substrat der Katalyse besitzt.^[90–92] Ein artifizielles [4Fe-4S]-Proteine, das DSD-4C^[89] dient aufgrund seiner geringen Größe als Modellprotein.

So wurde die *E. coli* Aconitat Hydratase B (AcnB) mit GST-Tag nach der Expression in *E. coli* NiCo pGEX-6P-2-*acnB* über eine GSTrap HF-Säulen isoliert. Weiter wurden die *E. coli* Quinolinsäuresynthase A (NadA) in *E. coli* BL21 pET-46 Ek/LIC-NadA, die *E. coli* 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-Reductase (IspH) in *E. coli* XL1 pACYC184*iscS-fdx* pQE-30-TEV-*ispH* und das artifizielles [4Fe-4S]-Protein DSD-4C in *E. coli* BL21 pET16bTEV-SUMO-DSD-4C in TB-Medium überexprimiert, mittels IMAC isoliert und der Polyhistidintag entfernt.

Tabelle 3.1: Expressionsbedingungen der [4Fe-4S]-Cluster.

Protein	Plasmid	Expressionsstamm
GST-AcnB	pGEX-5P-2- <i>aacnB</i>	<i>E. coli</i> NiCo(DE3)
NadA	pET46 Ek/LIC- <i>nadA</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
IspH	pQE-30-TEV- <i>ispH</i>	<i>E. coli</i> XL1-Blue pACYC184 <i>iscS-fdx</i>
SUMO-DSD-4C	pET16b-TEV-SUMO-DSD-4C	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
<i>AaAcn</i>	pET16b- <i>aco</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
<i>TtAcnA</i>	pET16b- <i>acoA</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)

Außerdem wurden die *Aquifex aeolicus* Aconitase (*AaAcn*) und die *Thermus thermophilus* Aconitase A (*TtAcnA*) heterolog in *E. coli* BL21 im pET16b-Vektor exprimiert. Hier erfolgte die Isolierung über ein Erwärmen der Zellsuspension

für 1 h auf 60 °C. Dabei aggregierten die meisten der *E. coli* Proteine, während die hitzestabilen Aconitasen in Lösung blieben. Restliche Verunreinigungen konnten per Anionenaustauschchromatografie (AEC), Hydrophober-Interaktions-Chromatografie (HIC) und Größenausschlusschromatografie entfernt werden. Zur Entfernung von gebundenem Eisen wurden die isolierten [4Fe-4S]-Proteine mit 1000 eq. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Natriumdithionit versetzt und nach mindestens sechs Stunden Inkubation bei 4 °C in HEPES-Puffer dialysiert. Um eine unspezifische Bindung des Kobalts von einer spezifischen Interaktion der Metallbindestelle mit dem Metallion unterscheiden zu können, wurde zusätzlich ein kommerziell erhältliches Rinderserumalbumin (BSA) in Kobaltbindestudien eingesetzt. Dieses und die Apo-[4Fe-4S]-Proteine wurden vor der Kobaltbindestudie mit TCEP reduziert und anschließend die Bindung von Kobalt während der Titration von Kobaltchlorid spektroskopisch verfolgt (vgl. Abb. 3.3).

Die Spektren der verschiedenen Bindestudien unterscheiden sich zum Teil stark voneinander. Zum BSA, welches keine Bindestelle für Eisen-Schwefel-Cluster besitzt, wurden in einer Bindestudie bis zu sechs Äquivalente Co(II) gegeben und Elektronenabsorptionsspektren aufgenommen (siehe 3.3[A]). Dabei steigt die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm, was auf die Interaktion von Kobalt und TCEP zurückzuführen ist. Auch im Wellenlängenbereich von 350 nm bis 700 nm steigt die Extinktion und erreicht bei 700 nm maximale Intensitäten von $600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und bei 350 nm $3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Extinktionsmaxima der CoCl_2 -TCEP-Interaktion, welche bei 459 nm und bei 580 nm liegen (vgl. Abb. 3.1[C]), werden davon überlagert. Demnach führen unspezifische Interaktion von Co(II) und Proteinen zu einer Zunahme der Extinktion ohne spezifische Maxima im Wellenlängenbereich von 350 nm bis 700 nm.

Beim GST-getagten [4Fe-4S]-Gerüstprotein AcnB ist ebenfalls die Zunahme der Extinktion bei 280 nm und die Verschiebung der Extinktion im Wellenlängenbereich zwischen 350 nm und 700 nm zu erkennen (vgl. Abb. 3.3[B]). Zusätzlich entstehen bei Zugabe von Kobaltchlorid Extinktionsmaxima bei 540 nm, 650 nm und 689 nm, mit entsprechenden Intensitäten von $1440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $1130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Am Maximum bei 689 nm Wellenlänge ist erkennbar, dass nicht mehr als 3 eq. CoCl_2 nötig sind, um die Metallbindestellen des GST-AcnB

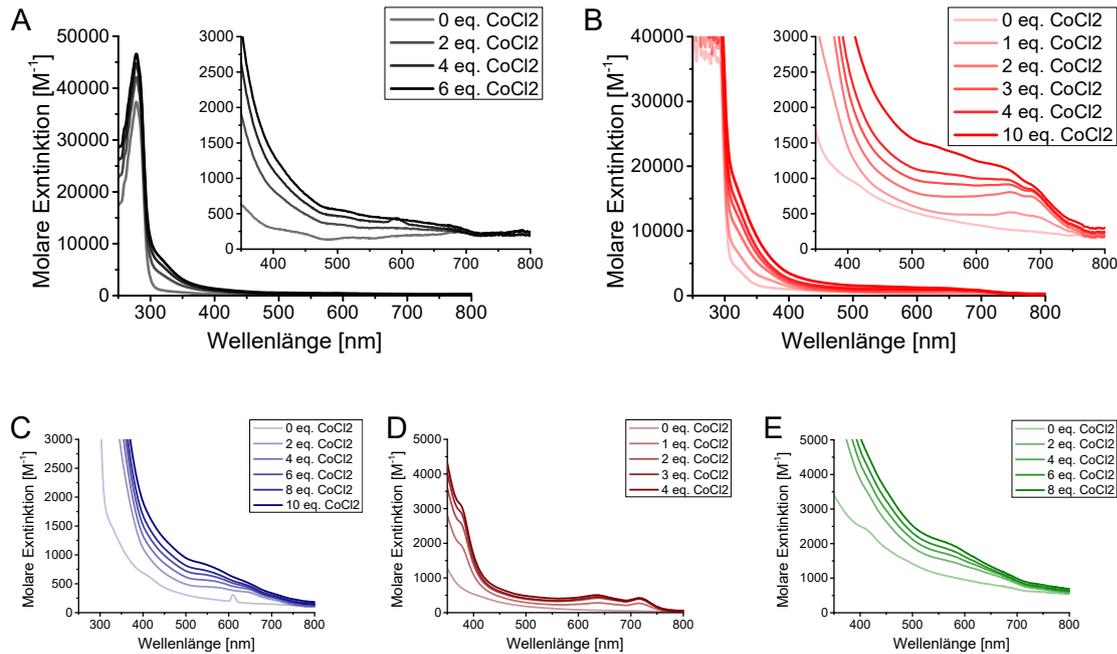


Abbildung 3.3: Bindung von Kobalt an Apo-[4Fe-4S]-Proteine. Zu $50 \mu\text{M}$ [A] BSA, [B] GST-AcnB, [C] IspH, [D] AaAcn und [E] NadA mit 10 eq. TCEP wurden bis zu 10 eq. CoCl_2 titriert und die Bindung von Kobalt spektroskopisch von 250-800 nm verfolgt. Bei einer unspezifischen Bindung, wie beim BSA steigt die Extinktion im Bereich von 350-700 nm ohne definierte Maxima, während beim AcnB-GST und beim IspH Extinktionsbanden bei 540-700 nm zu beobachten sind. Dagegen zeigt AaAcn Banden bei 370-720 nm und NadA eine Bande bei 580 nm, was gegen eine Bindung von Kobalt in der Metallbindestelle spricht.

mit Co(II) zu besetzen. Dies deutet auf eine direkte Interaktion des Co(II) mit den drei Cysteinen der Cofaktorbindestelle des GST-AcnB hin.

Entsprechend wurde die Interaktion von Co(II) mit weiteren [4Fe-4S]-Proteinen untersucht. Die EAS-Spektren der Kobaltbindestudie mit IspH ergaben ein vergleichbares Spektrum zum GST-AcnB mit Extinktionsmaxima bei 540 nm (max. $850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 650 nm (max. $490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und 689 nm ($340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (3.3[C]). Auch hier genügen weniger als 4 eq. Kobalt zur kompletten Besetzung der Metallbindestellen. Daher kann angenommen werden, dass auch hier die Bindung an die drei Cysteinreste der Metallbindestelle des IspH stattfindet.

Dagegen weichen die Elektronenabsorptionsspektren der Kobaltbindestudie mit *AaAcn* davon ab. Dort werden mit zunehmender Kobaltchloridkonzentration Extinktionsmaxima bei 378 nm, 640 nm und 719 nm detektiert (vgl. Abb. 3.3[D]). Auch ist erkennbar, dass nicht mehr als 2 eq. Co(II) pro Monomer gebunden werden. Da ausgeschlossen werden kann, dass diese Extinktionsbanden durch eine Co(II)-TCEP-Interaktion hervorgerufen werden, scheint hier eine Bindung von Kobalt an nicht-Cystein-Liganden stattzufinden.

Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum des NadA ein Extinktionsmaximum bei 580 nm (3.3[E]). Da dieses auch von der Interaktion des CoCl_2 mit dem Reduktionsmittel resultieren kann (vgl. Abb. 3.1[C]), kann angenommen werden, dass NadA unter diesen Bedingungen kein Co(II) bindet. Entsprechende Ergebnisse wurden auch für das thermostabile *TtAcnA* und das artifizielle SUMO-DSD-4C ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Demnach können manche [4Fe-4S]-Proteine in ihrer Apoform Co(II) binden. Zur Assemblierung eines vollständigen [4Co-4S]-Clusters muss allerdings zusätzlich eine Schwefelquelle hinzugefügt werden.

3.1.1.4 Assemblierung von [4Co-4S]-Clustern in Apo-[4Fe-4S]-Proteinen

Für die chemische Rekonstitution von [4Co-4S]-Clustern in Apo-[4Fe-4S]-Proteinen wurden diese mit TCEP reduziert, mit Kobaltchlorid inkubiert und schrittweise Sulfid hinzugegeben. Als Sulfidquelle wurde Lithiumsulfid

eingesetzt, da mit Natriumsulfid keine Bindung nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurden nicht gebundene Ionen chromatografisch entfernt und die rekonstituierten Proteine spektroskopisch und mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) charakterisiert (vgl. Abb. 3.4).

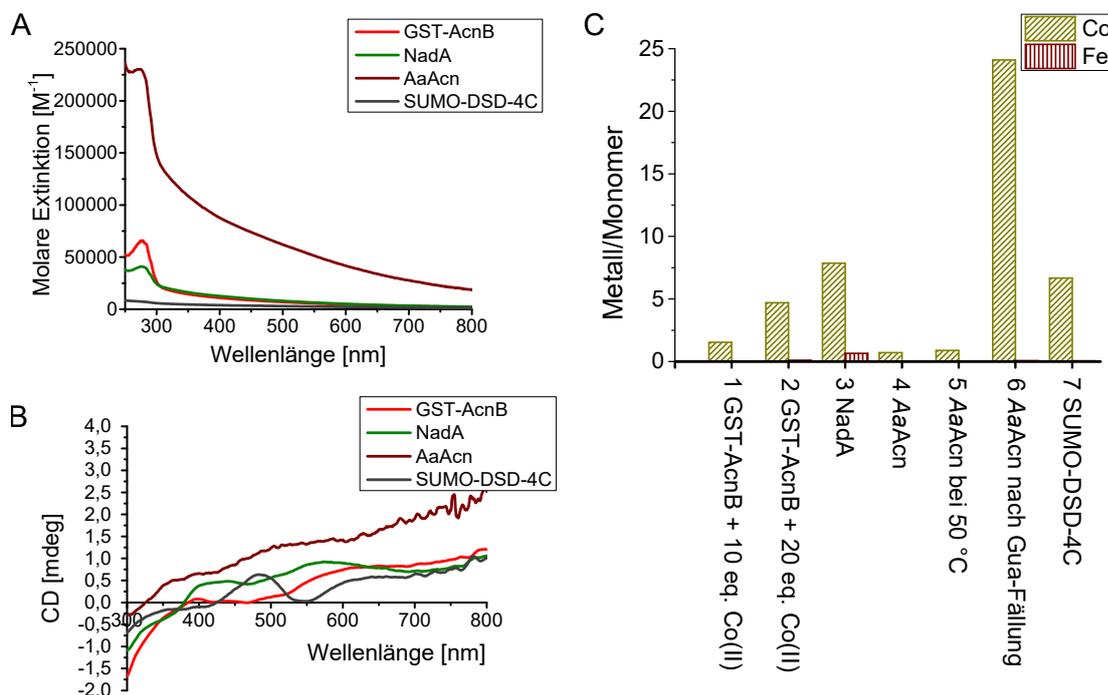


Abbildung 3.4: Assemblierung von [Co-S]-Clustern *in vitro* in Gerüstproteinen. Die [Fe-S]-Gerüstproteine GST-AcnB (rot), NadA (grün), AaAcn (braun) und SUMO-DSD-4C (grau) wurden unter Zugabe von TCEP mit CoCl_2 und Li_2S inkubiert, um über chemische Rekonstitution [4Co-4S]-Cluster zu assemblieren. [A] EAS-Spektren von 250-800 nm der rekonstituierten Proteine. [B] CD-Spektren von 300-800 nm der rekonstituierten Konstrukte. Die Spektren wurden über adaptives Glätten („Convolution width“=15, „Deviation Noise“=1,5) bearbeitet. [C] Die Menge an pro Monomer gebundenem Kobalt und Eisen wurde mittels ICP-MS und Bradfordassay quantifiziert. Dazu wurde 1. GST-AcnB mit 10 eq. Co^{2+} und 10 eq. S^{2-} , 2. AcnB mit 20 eq. Co^{2+} und 10 eq. S^{2-} , 3. NadA mit 20 eq. Co^{2+} und 10 eq. S^{2-} , 4. AaAcn mit 5 eq. Co^{2+} und 5 eq. S^{2-} , 5. AaAcn mit 5 eq. Co^{2+} und 5 eq. S^{2-} bei 50 °C, 6. AaAcn nach einer Guanidinium-Fällung mit 20 eq. Co^{2+} und 10 eq. S^{2-} und 7. SUMO-DSD-4C + 20 eq. Co^{2+} + 10 eq. S^{2-} eingesetzt.

Die rekonstituierten Kobalt-Schwefel-Proteine sollten zunächst mittels EAS von 250-800 nm charakterisiert werden (siehe Abb. 3.4[A]). Neben dem Maximum bei 280 nm sind keine weiteren Maxima zu erkennen. Insgesamt haben die Spektren allerdings einen hohen Hintergrund über den gesamten Wellenlängenbereich, weshalb einzelne Absorptionsbanden nicht zu identifizieren sind.

Zur Darstellung der in der chiralen Umgebung der Proteine gebundenen Ionen wurden Zirkulardichroismus (CD)-Spektren im ultravioletten und sichtbaren (UV/VIS-)Bereich der rekonstituierten Proteine aufgenommen (vgl. Abb. 3.4[B]). Dabei geben nur Bestandteile ein Signal, welche in einer chiralen Umgebung liegen, wie das im Protein komplexierte Kobalt. Außerdem spalten die Signale in Maxima und Minima auf, was eine bessere Beobachtung von spektralen Veränderungen erlaubt. Außerdem wurden sowohl der Kobalt-, als auch der Eisengehalt der Proteine über ICP-MS und Bradford-Assay ermittelt (vgl. Abb. 3.4[C]).

Die Lösung des rekonstituierten GST-AcnB zeigte eine graue Färbung. Im CD-Spektrum sind Maxima im Bereich von 400-580 nm zu erkennen, während Minima im Bereich von 470-700 nm detektiert wurden. Dabei zeigt sich keine Übereinstimmung mit den EAS-Spektren der Kobaltbindestudie. Die chemische Rekonstitution wurde mit 10 eq. bzw. mit 20 eq. CoCl_2 durchgeführt und im Anschluss die Menge an Kobalt und Eisen ermittelt, welche an das Protein gebunden waren. Dabei waren bei beiden Proben noch etwa 0,1 eq. Eisen pro Monomer komplexiert. Mit Zugabe von 10 eq. CoCl_2 und 10 eq. Li_2S konnten 1,5 Kobalt pro Monomer gebunden werden. Wurde die Zugabe von Kobaltchlorid auf 20 eq. erhöht, konnten 4,7 Kobalt pro Monomer gebunden werden. Demnach ist unter den hier gewählten Bedingungen ein hoher Überschuss an Kobaltchlorid nötig, um mindestens vier Kobalt pro Monomer zu binden. Die hier gewählten Bedingungen wurden für die chemische Rekonstitution des [4Co-4S]-Clusters in anderen Gerüstproteinen übertragen.

Da beim NadA keine Bindung in der Kobaltbindestudie nachgewiesen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob die zusätzliche Addition von Sulfid eine Kobaltbindung ermöglicht. Nach der Rekonstitution des NadA mit Kobaltchlorid und Lithiumsulfid konnten neben 0,7 Eisen auch bis zu 7,9 Kobalt pro Monomer nachgewiesen werden. Dies spricht einerseits dafür, dass die zusätzliche Addition von Sulfid eine Kobaltbindung ermöglicht, dieses allerdings auch

unspezifisch gebunden wurde. Das CD-Spektrum zeigt mit Maxima bei 350 nm, 425 nm und 580 nm und Minima bei 370 nm, 470 nm und 700 nm Übereinstimmungen mit dem Spektrum der AcnB, ist mit diesem allerdings nicht identisch. Dies spricht dafür, dass Kobalt zusätzlich an einer weiteren Metallbindestelle komplexiert wurde.

Bei der chemischen Rekonstitution von *AaAcn* mit Kobaltchlorid und Lithiumsulfid bei 4 °C konnten nur 0,7 eq. Kobalt beladen werden, obwohl der Eisengehalt bei nur 0,02 Eisen pro Monomer lag. Daher wurde das Protein während der Rekonstitution für 30 min auf 50 °C erhitzt, um die dreidimensionale Struktur des thermostabilen Enzym aufzulockern und so ein Eindringen der Ionen zu erleichtern. Allerdings wurden so auch nur 0,9 Kobalt pro Monomer gebunden. Daher wurde die thermostabile *AaAcn* mittels Guanidinium gefällt und unter Addition von Kobaltchlorid und Lithiumsulfid schrittweise rekonstituiert. Nach dem Entfernen von nicht gebundenen Ionen wurden Kobalt- und Eisengehalt der dunkelgrauen Lösung bestimmt. Neben geringen Spuren von Eisen enthielt die *AaAcn* mit 24,1 Kobalt pro Monomer mehr als sechs Kobalt pro Eisenbindestelle. Das CD-Spektrum des so rekonstituierten Proteins zeigt Maxima bei 360 nm und 505 nm, während Minima bei 430 nm und 600 nm liegen. Demnach kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein [4Co-4S]-Cluster in der thermostabilen *A. aeolicus* Aconitase assembliert wurde.

Auch das artificielle [4Fe-4S]-Protein DSD-4C wurde für eine chemische Rekonstitution von [4Co-4S]-Clustern eingesetzt. Dieses enthielt noch 0,1 eq. Eisen pro Monomer und konnte dann 6,7 Kobalt pro Monomer binden. Das CD-Spektrum zeigt mit Maxima bei 350 nm, 490 nm und 650 nm und Minima bei 380 nm und 550 nm größere Übereinstimmungen mit dem Spektrum der *AaAcn*. Zwar bindet es seine Cluster über vier Cysteinreste, was den Unterschiede zum CD-Spektrum des Kobalt-Schwefel-AcnB verursachen könnte, doch scheint eine unspezifische Bindung von Kobalt wahrscheinlich..

Demnach können Apo-[4Fe-4S]-Proteine *in vitro* unter Zugabe von Kobaltchlorid und Lithiumsulfid mehr als drei Kobalt pro Monomer binden. Allerdings scheinen sie unter Zugabe von hohen Überschüssen an Kobaltchlorid auch unspezifisch Kobalt zu binden. Daher wäre es interessant, die Cluster unter

Nutzung der *E. coli* Assemblierungs-Maschinerien zu synthetisieren und das artifizielle Cluster *in vivo* spezifisch auf die Gerüstproteine zu übertragen.

3.1.2 *In vivo*-Synthese artifiziieller Kobalt-Schwefel-Proteine

Von der „iron-sulfur cluster“ (ISC)-Assemblierungsmaschinerie in *E. coli* ist bekannt, dass diese bei einem Überschuss an Kobalt im Medium dieses statt Eisen in die Eisen-Schwefel-Proteine einbauen kann.^[14] Dies sollte dazu genutzt werden, *in vivo* Kobalt-Schwefel-Proteine zu produzieren. Dazu wurden die Eisen-Schwefel-Protein-produzierenden Stämme in einem speziellen M9-Medium unter Eisenausschluss mit 150 μ M Kobaltchlorid angezogen und das Protein im Anschluss isoliert.

3.1.2.1 Isolierung von Kobalt-Rubredoxinen

Da Rubredoxine nur eine Metallbindestelle besitzen, wurden zunächst *E. coli* BL21 pGEX-6P-2-*rubA* und *E. coli* C41 pGEX-6P-2-*rxn* in M9-Medium passagiert und anschließend die Genexpression in je 1 L M9-Medium induziert. Nach 16 h Expression wurden 3,3 g *CmRxn*-produzierende Zellen und 3,2 g *DgRxn*-produzierende Zellen in einem grünlichen Zellpellet geerntet. Über eine GST-Chromatografie wurde eine grüne Rubredoxinlösung isoliert, welche im Anschluss in HEPES-Puffer dialysiert wurde. Dabei fiel ein Teil des GST-*DgRxn* aus. Vom restlichen Protein wurde mittels ICP-MS der Kobalt-, Eisen- und Zinkgehalt pro Monomer bestimmt (vgl. Abb. 3.5).

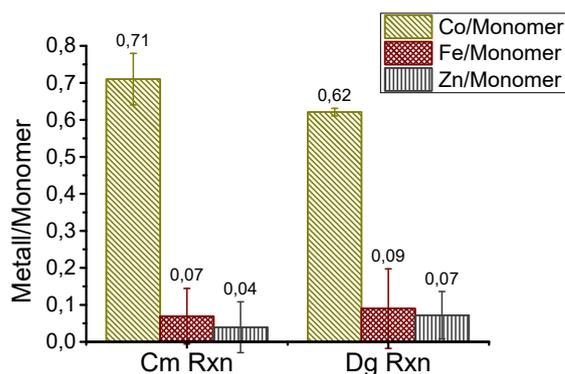


Abbildung 3.5: Metallzusammensetzung der aus M9-Medium isolierten Rubredoxine. Mittels ICP-MS wurden der Metallgehalt in den Rubredoxinen GST-CmRxn und GST-DgRxn bestimmt, während die Proteinkonzentration über die Bestimmung nach Bradford ermittelt wurde. Daraus ergibt sich, dass etwa ein Drittel der isolierten Rubredoxine als Kobalt-Proteine und ein geringer Anteil Eisen oder Zink gebunden hatte.

Pro Liter Medium wurden $0,55 \mu\text{mol}$ GST-CmRxn isoliert. Diese enthielten $0,72$ Kobalt, $0,07$ Eisen und $0,04$ Zink pro Monomer. Vom DgRxn wurden $0,12 \mu\text{mol}$ GST-DgRxn pro Liter M9-Medium isoliert. Pro Monomer enthielt dieses Protein $0,62$ Kobalt, $0,09$ Eisen und $0,07$ Zink.

Zusammengefasst waren die aus dem M9-Medium isolierten Proteine etwa zu zwei drittel mit Kobalt beladen, während ungefähr 20 % in der Apoform vorlagen. Die restlichen Monomere trugen zu etwa gleichen Teilen entweder Eisen oder Zink in ihrem aktiven Zentrum. Demnach kann *E. coli* Kobalt aus dem Medium *in vivo* in Rubredoxine einbauen. Diese Methode sollte im Anschluss auf die komplexeren [4Fe-4S]-Proteine übertragen werden.

3.1.2.2 Isolierung von Kobalt-Schwefel-Proteine

Für die *in vivo*-Assemblierung der [4Co-4S]-Cluster wurden die Aconitasen als Gerüstproteine eingesetzt. Die AcnB zeigte in den bisherigen Bindestudien gute Kobaltbindeigenschaften, während die thermostabilen Aconitasen AaAcn und TtAcnA, welche *in vitro* kaum Kobalt gebunden haben, eine stabile Variante der [4Co-4S]-Biohybride ergeben würden. Um Konstrukte ohne Polyhistidintag zu

erhalten, wurden *E. coli* BL21 pET16b-*acnB*, *E. coli* BL21 pET16b-*acn* bzw. *E. coli* BL21 pET16b-*acnA* in M9-Medium passagiert und im Anschluss AcnB, AaAcn bzw. TtAcnA in 1 L M9-Medium produziert. Aus 5,4 g Zellpellet wurden mittels AEC und HIC 1,2 mM AcnB isoliert. AaAcn und TtAcnA wurden aus jeweils 2,5 g Zellen isoliert. Das gelbliche Protein wurde mittels EAS charakterisiert (vgl. Abb. 3.6).

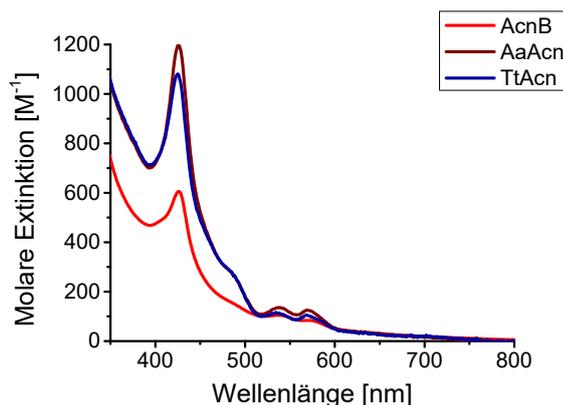


Abbildung 3.6: Aus M9-Medium isolierte Kobalt-Schwefel-Aconitasen. Das Elektronenabsorptionsspektrum von 350-800 nm von 22 μM AcnB (rot), 85 μM AaAcn (braun) und 65 μM TtAcn (dunkelblau) nach der Isolierung aus einem Kobalt-M9-Medium.

Die Spektren der aus M9-Medium isolierten Aconitasen zeigt Maxima bei 335 nm, 430 nm, 590 nm, 540 nm und 580 nm und eine Schulter bei 650 nm. Dies spricht dafür, dass die Aconitasen AcnB, AaAcn und TtAcn *in vivo* unter diesen Bedingungen zwar noch Eisen in ihrem aktiven Zentrum gebunden haben, allerdings auch Kobalt binden können. Daher eignet sich, nach einer Optimierung des Ausschlusses von Eisen, diese Methoden, um *in vivo* Kobalthybride zu erzeugen. Demnach ließen sich die Rubredoxine sowohl *in vitro* über chemische Rekonstitution, als auch *in vivo* mit Kobalt beladen. Auch verschiedene [4Fe-4S]-Proteine, wie die Aconitasen oder die IspH, sind in ihrer Apoform in der Lage, Kobalt zu binden, auch wenn bei manchen der Gerüstproteine, wie der NadA, die Zugabe einer Sulfidquelle nötig ist. *In vivo* ist ebenfalls eine Komplexierung kleinerer Mengen Kobalt möglich.

3.2 Die Eisen-Bindestellen des *P. putida* AlkG

Das Rubredoxin AlkG aus *Pseudomonas putida* (*P. putida*) GPo1 unterscheidet sich von allen weiteren bekannten Rubredoxinen dadurch, dass es aus zwei Domänen mit jeweils einer Eisenbindestelle besteht.^[70] Die N-terminale Domäne ist dabei weniger stabil im Vergleich zur C-terminalen Domäne.^[76] Um das Vorhandensein der zweiten Bindestelle besser zu verstehen, wurden verkürzte Versionen des *alkG*-Gens konstruiert. Das *alkG-CT* codiert die Aminosäuren 51-173, was der C-terminale Region mit dem Linker, welcher zwischen den beiden Domänen liegt, entspricht. Im Gen *alkG-NT* ist in den Aminosäuren 1-50 die N-terminale Domäne codiert.

Nach der heterologen Genexpression in *E. coli* BL21 wurden die rötlichen *P. putida* GPo1 Konstrukte mit einem Affinitätstag als His₁₀-TEV-AlkG, His₆-SUMO-AlkG-CT und His₆-SUMO-AlkG-NT aus den Zellen isoliert. Das His₆-SUMO-AlkG-NT verlor dabei seine rötliche Färbung, was auf den Verlust des Metallions unter Luftsauerstoff zurückzuführen ist. Im Anschluss konnte der Affinitätstag über einen Protease-Verdau mit der Ulp1- bzw. der TEV-Protease abgetrennt werden. Der abgetrennte Affinitätstag wurde nachfolgenden mittels IMAC entfernt und bei Bedarf ein weiterer Isolationsschritt mittels SEC durchgeführt. Die isolierten Rubredoxine wurden zunächst mit Kobalt rekonstituiert.

3.2.1 Charakterisierung der Metallbindestelle mit Kobalt

Um einen tieferen Einblick in die Charakteristika der Metallbindestelle der N-terminalen Domäne des *P. putida* GPo1 AlkG zu bekommen, wurde die Metallbindestelle des Vollängenkonstrukts AlkG mit der des AlkG-CT über die Bindung von Co(II) verglichen. Da Kobalt ähnliche chemische Eigenschaften wie Eisen besitzt, dabei weniger leicht durch Luftsauerstoff oxidiert werden kann und als Co(III) wasserlöslich bleibt^[10], eignet es sich dazu die Metallbindestelle in Eisen-Schwefel-Proteinen aerob zu charakterisieren. In Kombination mit den stabilen Konstrukten des AlkG und AlkG-CT bietet es ein indirektes System, um die Instabilität des [Fe]-AlkG-NT zu umgehen.

3.2.1.1 Charakterisierung von Co-AlkG-Konstrukten

Um den natürlichen Cofaktor Eisen zu entfernen wurden AlkG und AlkG-CT mit 10 % TCA gefällt. Zur Gewinnung des Apoprotein wurde das gefällte Protein mit HEPES-Puffer gelöst. Durch die Zugabe eines 10-fachem Überschuss von TCEP und des zweifachen Überschuss an Kobaltchlorid wurden grüne Kobaltderivate erhalten. Das Resultat der chemischen Rekonstitution des AlkG mit Kobalt wurde über EAS verfolgt (vgl. Abb. 3.7[A]).

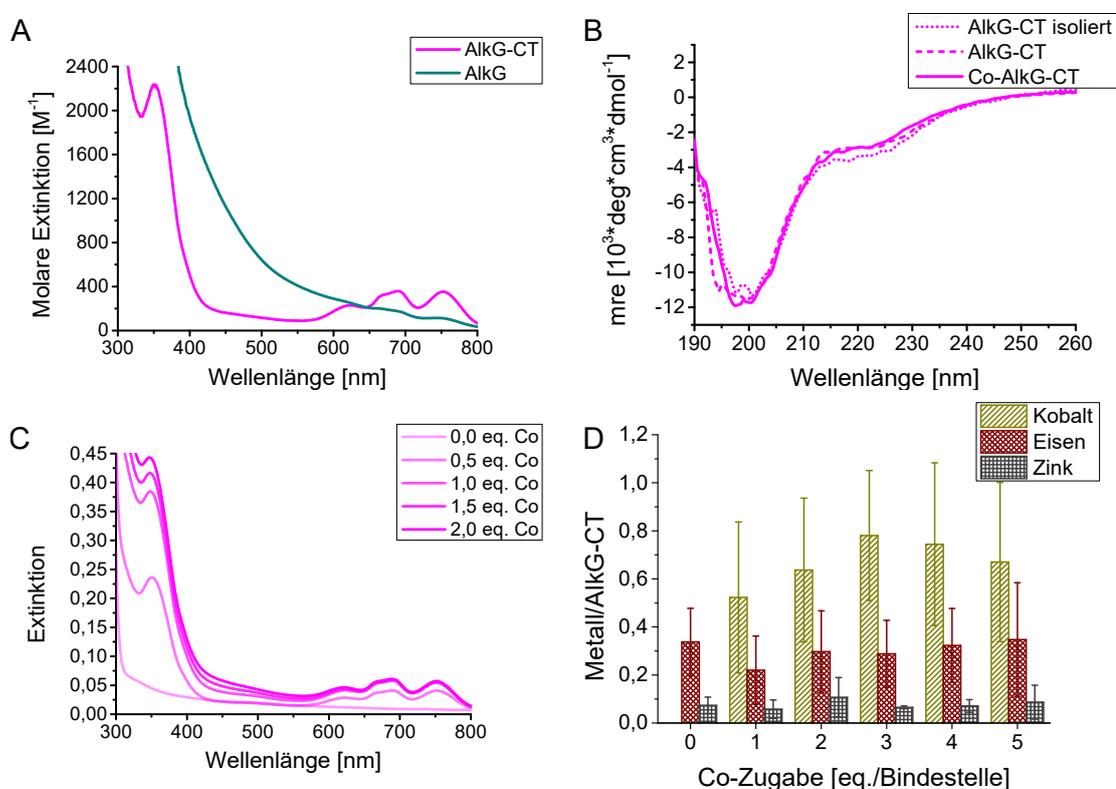


Abbildung 3.7: Bindung von Kobalt an die C-terminale Bindestelle des AlkG. [A] Vergleich des EAS-Spektrums von 250-800 nm von 100 μM chemisch rekonstituierten AlkG-CT (magenta) mit dem des chemisch rekonstituierten AlkG (cyan). [B] CD-Spektren von 190-250 nm vom 15 μM AlkG-CT nach dem Isolieren, des Apoproteins nach der TCA-Fällung und des chemisch rekonstituierten Co-AlkG-CT in „mean residue ellipticity“ (mre). [C] Titration von 100 μM AlkG-CT mit 0-2 eq. Co(II) pro Metallbindestelle. Die Bindung von Kobalt wurde über EAS von 250-800 nm verfolgt. [D] Gebundene Äquivalente Kobalt pro Monomer bei Zugabe von 0-5 eq. Co(II) pro Bindestelle, welche über ICP MS und Bradfordassay bestimmt wurden.

Das EAS-Spektrum des AlkG-CT zeigt Absorptionsmaxima im UV/VIS-Bereich. Die Absorptionsbande bei 350 nm mit einer molaren Absorption von $2231 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kann auf einen LMCT zwischen dem Co(II) und dem Schwefel des Cysteins zurückgeführt werden^[45, 157, 158]. Die weiteren Extinktionsbanden bei 623 nm, 662 nm, 690 nm und 753 nm zeigen geringere Intensitäten und lassen sich auf LF-Übergänge einer verzerrt tetraedrische Symmetrie von high-spin Co(II)-Komplexen zurückführen^[159]

Das TCA-gefällte AlkG-CT wurde mit und ohne Zugabe von CoCl_2 rekonstituiert und die Sekundärstrukturelemente des isolierten Fe-AlkG, des Apo-AlkG-CT und der Kobalt-substituierte Variante über CD-Spektroskopie bestimmt (vgl. Abb. 3.7[B]). Durch den Abgleich des fernen UV-CD-Spektrums mit bekannten Strukturen können Sekundärstrukturelemente, wie α -helikale oder β -Faltblatt-Strukturen, anhand des Spektrums bestimmt werden. Die „mean residue ellipticity“ (mre) ergibt sich aus dem gemessenen CD-Signal in mdeg, der Küvette mit 1 mm Schichtdicke und Eigenschaften der gemessenen Probe, einschließlich der Konzentration und der Anzahl der Aminosäuren.

Die CD-Spektren des AlkG-CT zeigen Minima bei 200 nm und bei 220 nm mit nahezu identischen Intensitäten. Daher übernimmt das Apoprotein eine vergleichbare Struktur wie das [Fe]-AlkG-CT oder das [Co]-AlkG-CT. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung des Metallions kaum Einfluss auf die Sekundärstruktur und damit vermutlich auch die Tertiärstruktur des Proteins hat. Demnach ist auch kein Metallion zur korrekten Rückfaltung des AlkG-CT nötig und das Apoprotein kann im Anschluss mit Kobalt beladen werden.

Daher wurde das Apoprotein mit TCEP reduziert und Kobaltchlorid zum AlkG-CT titriert, um die Bindung des Co(II) an die Metallbindestelle mittels EAS zu verfolgen (vgl. Abb. 3.7[C]). Da die Banden der LF-Übergänge sensitiver auf die Bindung des Kobalts reagieren und sich im Bereich der LMCT eine Verschiebung der Basislinie zeigte, wurden die LF-Übergänge verwendet, um die Menge an Kobalt zu bestimmen, welche für die komplette Beladung der Metallbindestelle nötig sind. Schon mit mehr als einem Äquivalent Kobalt steigt die Extinktion bei 750 nm nicht mehr an. Demnach ist eine äquimolare Konzentration ausreichend, um das AlkG-CT komplett mit Kobalt zu beladen. Auch das Vollängenkonstrukt AlkG wurde mit Kobalt rekonstituiert. Nach Ent-

fern von TCEP und überschüssigen Kobaltchlorid zeigt das EAS-Spektrum ebenfalls den LMCT bei 350 nm und die LF-Übergänge zwischen 600 nm und 800 nm (vgl. Abb. 3.7[A]). Die molare Extinktion bei 750 nm lag bei $530 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, also fast doppelt so hoch im Vergleich zum AlkG-CT mit $350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Demnach bindet AlkG vermutlich mehr als ein Kobalt pro Monomer.

Um die Bindung des Co(II) an das AlkG zu verfolgen, wurde Kobaltchlorid zum reduzierten Apoprotein titriert und die Bindung über EAS verfolgt (vgl. Abb. 3.8[A]). Auch hier genügt ein Äquivalent Kobalt pro Bindestelle, was für eine Beladung beider Domänen mit Kobalt spricht.

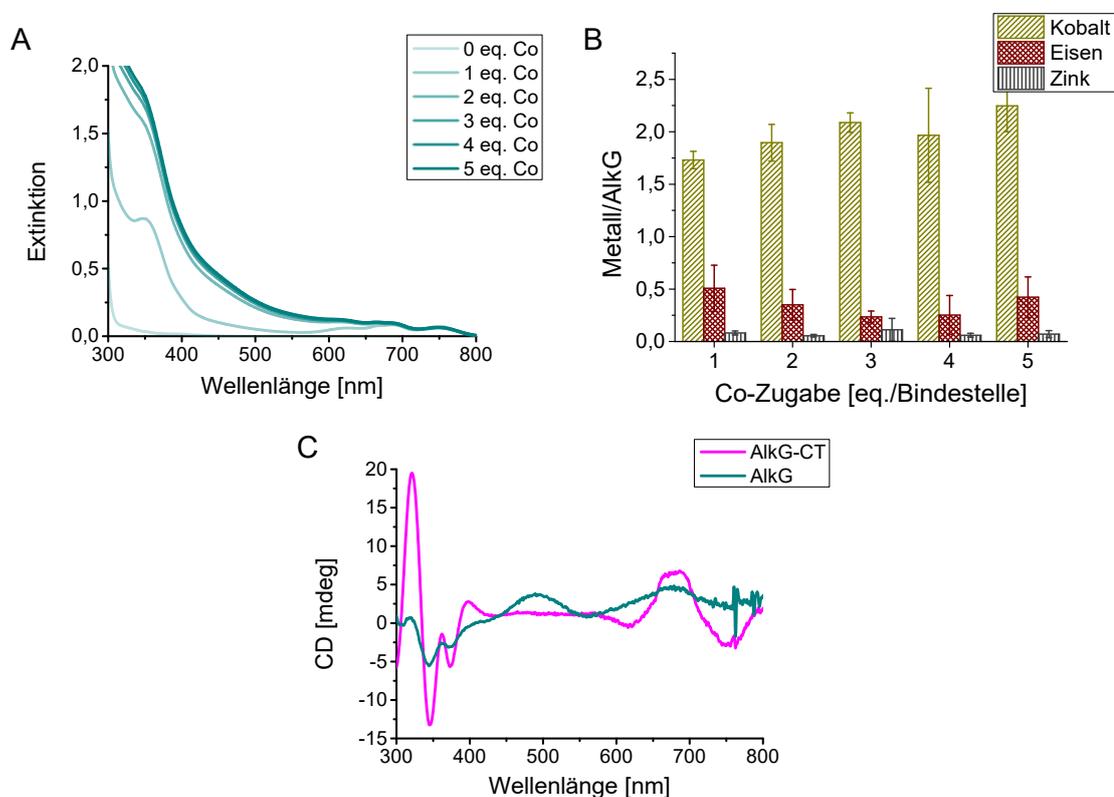


Abbildung 3.8: Bindung von Kobalt an das AlkG. [A] Bindestudie von $100 \mu\text{M}$ AlkG mit 0-2 eq. Co(II) pro Metallbindestelle. Die Bindung von Kobalt wurde über EAS von 250-800 nm verfolgt. [B] Gebundene Äquivalente Kobalt pro Monomer bei Zugabe von 0-5 eq. Co(II) pro Bindestelle bestimmt über ICP-MS und Bradford-Assay. [C] CD-Spektren von 300-800 nm von $1,2 \text{ mM}$ AlkG (cyan) nach der Rekonstitution mit Kobalt im Vergleich zum CD-Spektrum der C-terminalen Domäne (magenta) nach der Rekonstitution mit Kobalt.

Um den großen Hintergrund im EAS-Spektrum des AlkG zu umgehen, wurden CD-Spektren im UV- und VIS-Bereiche aufgenommen (vgl. Abb. 3.8[C]). Auch hier zeigen sich große Übereinstimmungen in den Spektren von AlkG und AlkG-CT im Bezug auf die Lage der Maxima, doch zeigt auch hier das AlkG-CT ausgeprägtere Peaks. Im Vergleich zur EAS wird im CD-Spektrum eine weitere Absorptionsbande des AlkG bei 490 nm sichtbar. Diese könnte zu einer low-spin Co(III)-Spezies gehören, welche über Röntgenabsorptionsspektroskopie, „extended X-ray absorption fine structure“ (EXAFS)-Spektroskopie und Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie identifiziert. [160]

3.2.1.2 Quantifizierung der Kobaltbindung

Um die Kobaltbindung zu quantifizieren wurden bis zu fünf Äquivalente CoCl_2 pro Metallbindestelle zu $10 \mu\text{M}$ reduziertem Apoprotein gegeben, nicht gebundenes Kobalt entfernt und die Menge an Kobalt, Eisen und Zink mittels ICP-MS bestimmt und mit der Proteinkonzentration verglichen.

Beim AlkG-CT konnten vor der chemischen Rekonstitution $\sim 0,3$ Eisen und $>0,1$ Zink pro Monomer gemessen werden, welche auch durch Zugabe von Kobaltchlorid nicht verdrängt werden konnten (vgl. Abb. 3.7[D]). Weiter wurden $\sim 0,8$ Kobaltionen pro Monomer komplexiert. Auch mit Zugabe von bis zu 5-fachen Überschuss an Kobaltchlorid konnte nicht mehr Kobalt gebunden werden. Dies könnte ein Resultat von Missfaltung nach der TCA-Fällung oder einer Ungenauigkeit bei der Proteinkonzentration liegen. Auch die Bildung von Thiolgruppen könnte die Kobaltbindung verhindern. Mittels Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS) des AlkG-CT konnte jedoch kein Hinweis auf oxygenierte Cysteine am Apo-AlkG-CT gefunden werden. [160]

Die Kobaltbindung an das Vollängenkonstrukt von AlkG wurde ebenfalls mittels ICP-MS quantifiziert. Dabei kam es mit der Zugabe von zwei Äquivalenten Co(II) pro Metallbindestelle zu einer geringen Erhöhung des Kobaltgehalts auf ~ 2 Kobalt pro Monomer (vgl. Abb. 3.8[B]). Demnach sind beide Bindestellen des AlkG mit Kobalt beladen. Allerdings ist dafür 1 Äquivalent pro Bindestelle nicht ausreichend. Größere Mengen Kobalt konnten auch bei einer höheren Verfügbar-

keit von Co(II) nicht erreicht werden. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen der EAS überein.

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass sich beide Bindestellen des AlkG mit Kobalt besetzen lassen. Während beim AlkG-CT eine äquimolare Menge Kobalt ausreicht, ist beim AlkG ein geringer Überschuss an Kobalt nötig. Daher wurden für die folgenden Rekonstitutionen zwei Äquivalente Kobalt pro Metallbindestelle eingesetzt. Neben der Tatsache, dass die N-terminale Domäne des AlkG erst bei höheren Kobaltkonzentrationen vollständig besetzt ist, zeigt sich dort auch anstelle einer Co(II)- eine Co(III)-Spezies. Im Folgenden sollte ermittelt werden, ob dies auch *in vivo* eine Bedeutung hat.

3.2.1.3 Biologische Relevanz der Co(III)-Spezies

Um die biologische Relevanz der Co(III)-Spezies in der N-terminalen Domäne des AlkG zu untersuchen, wurden die *alkG*-exprimierenden Zellen an ein spezielles M9-Medium adaptiert, welches Eisen ausschließt und 150 μM CoCl_2 enthält. Anschließend wurde in großen Kulturen exprimiert und das AlkG mittels einer IMAC mit einer Co TALON-Säule isoliert. Charakterisiert wurden die Kobalt-Rubredoxine mittels EAS (vgl. Abb. 3.9) und ICP-MS.

Das Elektronenabsorptionsspektrum des His₁₀-TEV-AlkG zeigte identische Signal zum rekonstituierten AlkG. Mittels ICP-MS konnte ermittelt werden, dass es $\sim 0,9$ Co pro Monomer enthielt. Dies deutet darauf hin, dass nur eine Domäne mit Kobalt beladen war. Auch zeigt sich mit je 0,2 Äquivalenten noch eine signifikante Menge Eisen und auch Zink.

Anschließend wurde der Affinitätstag mit der tobacco edge virus (TEV)-Protease in Anwesenheit von DTT und EDTA entfernt und ungeschnittenes Protein, Protease und Tag vom AlkG chromatografisch abgetrennt. Im Elektronenabsorptionsspektrum werden dadurch die Signale, welche verantwortlich für die Koordination des Tetrathiolats sind, geringer. Dafür entsteht ein Maximum bei 530 nm, welches von einer Co(III)-Spezies stammen könnte.

Anhand der *in vitro* und *in vivo* Bindestudien des AlkG und AlkG-CT mit Kobaltchlorid kann zusammengefasst werden, dass die N-terminale Domäne des

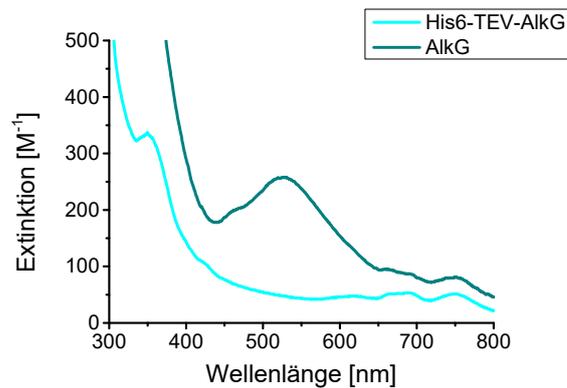


Abbildung 3.9: Kobalt-AlkG nach der Isolierung aus M9-Medium. Das EAS-Spektrum von 250-800 nm zeigt die molare Extinktion von 100 μM AlkG, welches unter Ausschluss von Eisen in Medium mit 150 μM CoCl_2 *in vivo* synthetisiert wurde, vor und nach der Entfernung des Affinitätstags. Diese unterscheiden sich durch ein Maximum bei 530 nm nach dem Entfernen des Tags.

AlkG Co(II) binden kann. Dabei komplexiert sie das Co(II) weniger stark als die C-terminale Domäne, weshalb dieses leicht zu Co(III) reduziert werden kann. Weiter sollte überprüft werden, ob dies auf die Eisenbindung übertragen werden kann.

3.2.2 Charakterisierung der Metallbindestelle mit Eisen

3.2.2.1 Stabilität des AlkG-NT

Die N-terminale Domäne des AlkG wurde in bisherigen Studien als Spaltungsprodukt des Vollängenproteins untersucht.^[70] In dieser Arbeit wurde ein Konstrukt mit einem Polyhistidin-SUMO-Tag designet, welcher über Proteolyse mit der Ulp1-Protease abgetrennt werden kann. Die Stabilität des AlkG-NT sollte anhand der Bindungskapazität von Eisenionen an das Protein überprüft werden. Dazu wurde von einem Teil des AlkG-NT der His₆-SUMO-Tag entfernt und das Protein 24 h bei 4 °C gelagert. Nachdem auch von dem restlichen AlkG-NT der Affinitätstag entfernt wurde, wurde direkt eine Eisenbindestudie mit beiden Proben durchgeführt. Beide AlkG-NT-Proben wurden reduziert und unter

Ausschluss von Sauerstoff mit einer Fe(II)- bzw. Fe(III)-Quelle rekonstituiert. Die Bindung von Eisen wurde photometrisch verfolgt (vgl. Abb. 3.10).

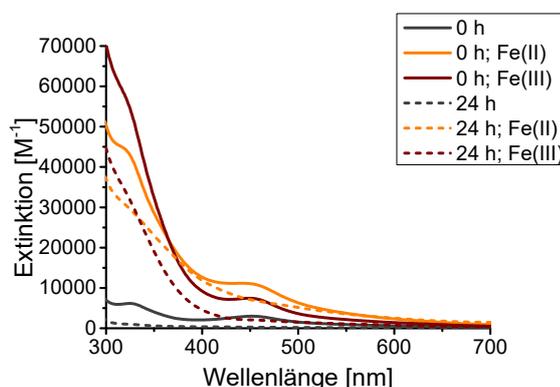


Abbildung 3.10: Bindung von Eisen an AlkG-NT. Das AlkG-NT wurde direkt nach dem Protease-Dau (durchgezogene Linie) und nach 24 h bei 4 °C mit Fe(II) (orange) und Fe(III) (braun) rekonstituiert. Die Elektronenabsorptionsspektren zeigen, dass durch die Lagerung die Bindungskapazität des AlkG-NT verloren geht.

Auch ohne Zugabe einer Eisenquelle sind im EAS-Spektrum der Probe direkt nach dem Protease-Verdau Extinktionsmaxima bei 330 nm und 455 nm zu erkennen. Demnach ist nach der IMAC noch Eisen in der Metallbindestelle des AlkG-NT vorhanden ist. Sowohl die Zugabe von Fe(II), als auch die Zugabe von Fe(III) führt zu einer Zunahme der Extinktion dieser Maxima. Demnach kann das frisch isolierten AlkG-NT Eisen in seiner Metallbindestelle komplexieren. Dagegen liegt nach 24 h bei 4 °C kein [Fe]-AlkG-NT mehr vor. Das Apoprotein ist auch nicht mehr in der Lage, Eisen zu binden. Das EAS-Spektrum zeigt nur eine Verschiebung der Basislinie und eine Schulter bei 330 nm.

Da auch bei dem hier verwendeten Konstrukt die Stabilität des AlkG-NT nach dem Abtrennen des restlichen Proteins gering ist, wurde im folgendem mit dem His₆-SUMO-AlkG-NT gearbeitet. Um den Einfluss des Affinitätstags auf die Studien zu beurteilen, wird das deutlich stabilere AlkG-CT mit dem His₆-SUMO-AlkG-CT verglichen. Zunächst solle ermittelt werden, welchen Einfluss die Eisenquelle auf die Bindung von Eisen an die Rubredoxine hat.

3.2.2.2 Einfluss der Eisenquelle auf die Bindekapazität des AlkG-CT

Für die *in vitro*-Synthese der Fe-Rubredoxine aus den Apoproteinen verschiedener Konstrukte des AlkG sollte nach der Reduktion mit 10 eq. TCEP die Rekonstitution durch Zugabe einer Eisen-Quelle erfolgen. Zur Ermittlung der am besten geeigneten Fe-Quelle wurde das AlkG-CT mit Ammoniumeisen(II)-sulfat, mit Ammoniumeisen(III)-citrat und mit einer 1:1-Mischung dieser Eisensalze inkubiert. Eingesetzt wurden jeweils 2,5 eq. Fe im Bezug auf die Proteinkonzentration. Die Bindung wurde photometrisch verfolgt (vgl. Abb. 3.11)

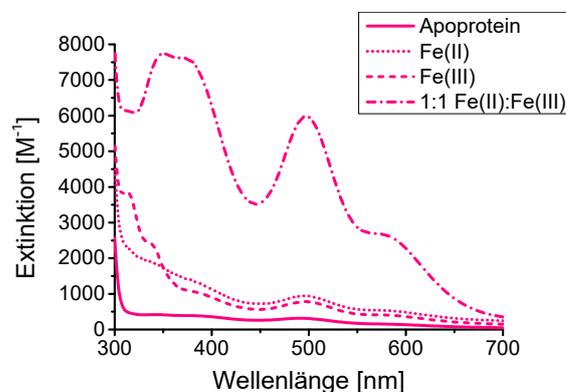


Abbildung 3.11: Einfluss der Eisenquelle auf die Bindung an das AlkG-CT. Das AlkG-CT wurde anaerob mit einer Fe(II)-, einer Fe(III)-Quelle und einer Fe(II)-Fe(III)-Mischung inkubiert und mittels EAS von 250-nm 800 nm charakterisiert. Anhand der Spektren des rekonstituierten AlkG-CT ist zu erkennen, dass die Effektivität der Eisenbindung bei einer Mischung von Fe(II) und Fe(III) besser ist, als bei Einsatz nur einer Eisenquelle.

Nach Zugabe von Eisenionen zum reduzierten Apoprotein AlkG-CT zeigen sich Absorptionsmaxima bei Wellenlängen zwischen 315 nm und 585 nm. Diese liegen bei der Probe mit Fe(II) bei maximal $2000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und für die Probe mit Fe(III) bei maximal $4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dagegen sind die Peaks bei der Zugabe einer 1:1-Mischung von Fe(II) und Fe(III) mit einer maximalen Absorption vom $8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ intensiver und klarer voneinander zu unterscheiden. Daher wurden die chemischen Rekonstitution der Konstrukte des AlkG mit einer Mischung von Ammoniumeisen(II)-sulfat und Ammoniumeisen(III)-citrat im Verhältnis 1:1 durchgeführt.

3.2.2.3 Charakterisierung des rekonstituierten [Fe]-AlkG

Zur strukturellen Charakterisierung der isolierten Konstrukte des AlkG wurden unmittelbar nach dem Abtrennen des Polyhistidintags mittels CD-Spektroskopie im fernen UV-Bereich aufgenommen (vgl. Abb. 3.12).

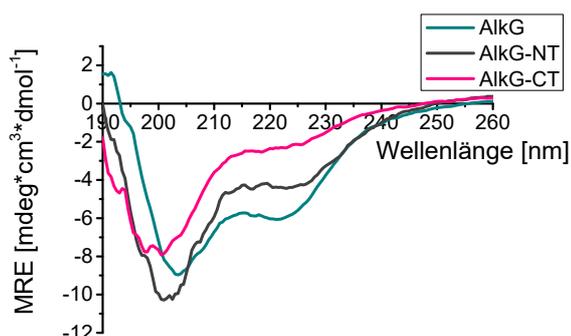


Abbildung 3.12: Struktur der AlkG-Konstrukte nach dem Isolieren. Die allgemeine Struktur der AlkG-Konstrukte wurde nach dem Isolieren mittels CD-Spektroskopie von 190-250 nm verglichen. Das CD-Spektrum im fernen UV-Bereich zeigt, dass das AlkG (cyan) hauptsächlich in α -helikaler Form vorliegt, während AlkG-NT (grau) und AlkG-CT (magenta) auch einen größeren Anteil an random coil-Strukturen enthält.

Die CD-Spektrum von AlkG hat ein negatives Maximum bei etwa 205 nm, während diesen bei AlkG-NT und AlkG-CT bei etwa 200 nm liegt. Einen weiteren negativen Peak zeigen die Spektren bei etwa 222 nm. Das Spektrum des AlkG schneidet zusätzlich die X-Achse bei etwa 195 nm. Sowohl dies, als auch die beiden Minima weisen auf α -helikale Elemente hin, während die Verschiebung des Spektrums in den negativen Bereich unterhalb von 200 nm auf „random coil“-Strukturen beim N- und beim C-terminalen Konstrukt hinweist. Demnach stabilisieren sich die beiden Domänen gegenseitig.

Zur Charakterisierung der Bindung des Eisens im Protein wurden die rekonstituierten AlkG-Konstrukte mittels EAS und CD-Spektroskopie im UV/VIS-Bereich untersucht (vgl. Abb. 3.13).

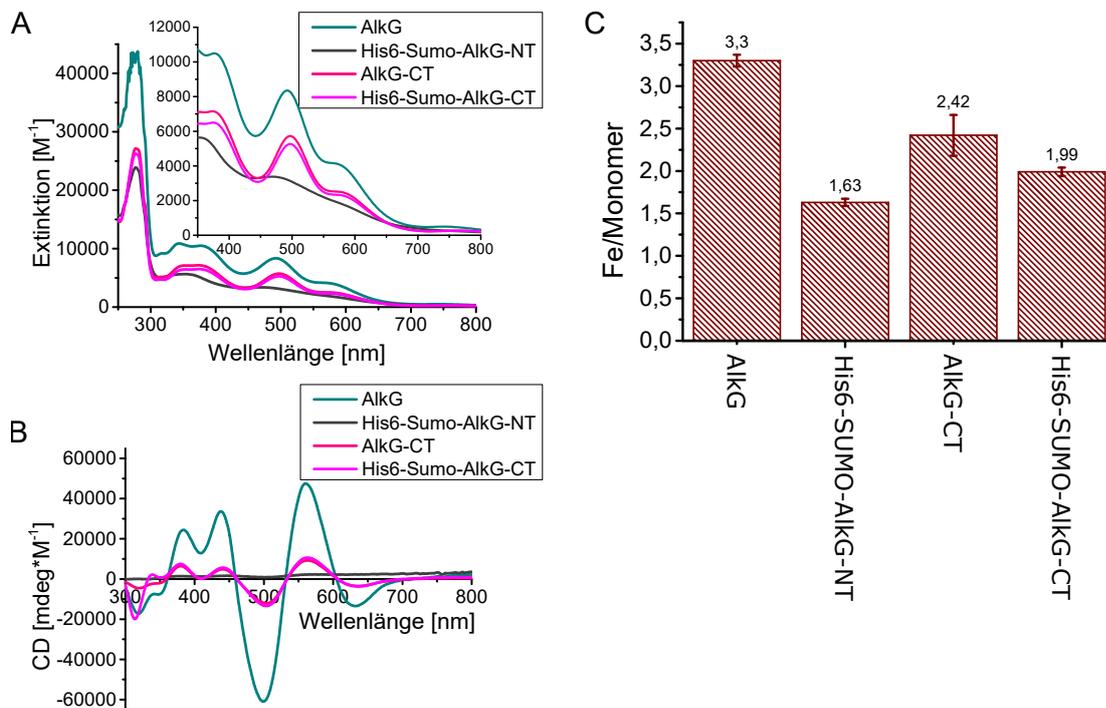


Abbildung 3.13: Charakterisierung der rekonstituierten AlkG-Konstrukte. [A] Das EAS-Spektrum von AlkG (cyan), AlkG-CT (magenta), His₆-SUMO-AlkG-CT (pink) und His₆-SUMO-AlkG-NT (grau) von 250-800 nm. Die Spektren des AlkG und beider AlkG-CT unterscheiden sich nur in ihrer Intensität, während das N-terminale Konstrukt andere Maxima zeigt. [B] Das CD-Spektrum von AlkG (cyan) und des AlkG-CT (magenta), His₆-SUMO-AlkG-CT (pink) und His₆-SUMO-AlkG-NT (grau) im UV/VIS-Bereich. Das Spektrum des AlkG entspricht dem des AlkG-CT, während der His₆-SUMO-Tag im kurzwelligen Bereich Unterschiede verursacht. Das Spektrum des His₆-SUMO-AlkG-NT weicht von diesen Spektren ab. [C] Die Ergebnisse der ICP-MS-Proben zeigen zwei gebundenen Eisen pro Monomer beim AlkG-NT und beim AlkG-CT, während das Vollängenkonstrukt vier Eisen pro Monomer gebunden hat.

Die EAS-Spektren der verschiedenen AlkG-Konstrukte zeigen dabei Unterschiede (vgl. Abb. 3.13[A]). Das Absorptionsspektrum des AlkG zeigt neben dem für Proteine typischen Peak bei 280 nm weitere Peaks zwischen 300 nm und 650 nm. Die Maxima liegen bei 315 nm, 340 nm, 380 nm, 495 nm und 585 nm. Während das AlkG-CT, sowohl mit als auch ohne Polyhistidin-SUMO-Tag, ein vergleichbares Spektrum mit geringerer Intensität zeigt, zeichnet sich das Spektrum des His₆-SUMO-AlkG-NT nur durch zwei Peaks bei 355 nm und 480 nm und einer Schulter bei 585 nm aus. Insgesamt zeigen diese geringere molare Intensitäten, was auf eine geringere Beladung hindeutet.

Die Eisen-Rubredoxine wurden ebenfalls mittels CD-Spektroskopie im UV/VIS-Bereich charakterisiert (vgl. Abb. 3.13[B]). Die Maxima sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Minima und Maxima der CD-Spektren im UV/VIS-Bereich von AlkG,(His₆-SUMO-)AlkG-CT und His₆-SUMO-AlkG-NT.

	AlkG	(His ₆ -SUMO-)AlkG-CT	His ₆ -SUMO-AlkG-NT
Minimum	320 nm	320 nm	330 nm
	350 nm	350 nm	410 nm
	410 nm	410 nm	500 nm
	500 nm	500 nm	
	630 nm	630 nm	
Maximum	340 nm	340 nm	320 nm
	385 nm	385 nm	380 nm
	440 nm	440 nm	450 nm
	560 nm	560 nm	580 nm

Dabei sind im CD-Spektrum des AlkG bedeutend mehr Signale zu beobachten. So sind Minima bei 320 nm, 350 nm, 410 nm, 500 nm und 630 nm im CD-Spektrum des AlkG zu erkennen, während die Maxima dazwischen bei 345 nm, 385 nm, 440 nm und 565 nm liegen. Das AlkG-CT zeigt die selben Maxima, allerdings mit geringerer Intensität. Insgesamt ist das Spektrum des His₆-SUMO-AlkG-CT damit vergleichbar, allerdings sind die Intensitäten der Peaks bei 320 nm und bei 345 nm durch den Tag deutlich erhöht.

Das N-terminale Konstrukt His₆-SUMO-AlkG-NT zeigt auch bei den CD-Spektren deutlich geringere Intensitäten und weniger Peaks als das C-terminale und das Volllängen-Konstrukt. Übereinstimmend zeigt es bei 410 nm und bei 500

nm ein Minimum. Bei 320 nm besitzt des AlkG-Spektrum ein weiteres Minimum, während dort bei Spektrum des His₆-SUMO-AlkG-NT ein Maximum liegt (vgl. 3.2. Des Weiteren gibt es abweichend noch ein Minimum bei der Wellenlänge 330 nm und Maxima bei den Wellenlängen 380 nm und 589 nm.

Die Bindung von Eisen an die AlkG-Konstrukte wurde mittel ICP-MS auch quantifiziert (vgl. Abb. 3.13[C]). Demnach waren am AlkG $3,30 \pm 0,07$, am His-SUMO-AlkG-NT $1,63 \pm 0,04$, am AlkG-CT $2,42 \pm 0,24$ und am His-SUMO-AlkG-CT $1,99 \pm 0,05$ Eisen pro Monomer gebunden. Dies entspricht bei allen Konstrukten etwa zwei Eisen pro bekannter Metallbindestelle. Diese deutet darauf hin, dass jede Rubredoxindomäne zwei Eisenbindestellen besitzt. Der His-SUMO-Tag scheint kaum Einfluss auf die Bindekapazitäten zu haben.

Demnach ist das Eisen in der N-terminalen Domäne anders komplexiert, als in der C-terminalen Domäne des Rubredoxins AlkG. Nachfolgend soll ermittelt werden, ob dieser Unterschied einen Einfluss auf die Stabilität des [Fe]-Clusters in den Domänen hat.

3.2.2.4 Stabilität der [1Fe]-Clusters in *P. putida* AlkG

Zur Ermittlung der Stabilität der [1Fe]-Cluster des Rubredoxins AlkG wurden die Konstrukte nach der Rekonstitution mit Eisen unter Sauerstoffausschluss in eine Küvette überführt, Luftsauerstoff ausgesetzt und der Verlust des Clusters photometrisch verfolgt (vgl. Abb. 3.14).

Das EAS-Spektrum des AlkG zeigt eine geringe Verschiebung der Absorption im Verlauf der Inkubation des Proteins unter Luftsauerstoff (vgl. Abb. 3.14[A]). Dagegen bleibt das Spektrum des His₆-SUMO-AlkG-CT stabil (vgl. Abb. 3.14[B]). Das N-terminale Konstrukt dagegen verliert das Eisen innerhalb von 4 h fast komplett (vgl. Abb. 3.14[C]).

Demnach ist das Eisen in der C-terminalen Domäne vor Luftsauerstoff geschützt, während es in der N-terminalen Domäne oxidiert werden kann. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass das AlkG-NT im Verlauf der Isolierung seine rötliche Färbung verliert. Allerdings scheint die C-terminale Domäne eine schützende Wirkung auf die N-terminale Domäne zu besitzen, was sich in der

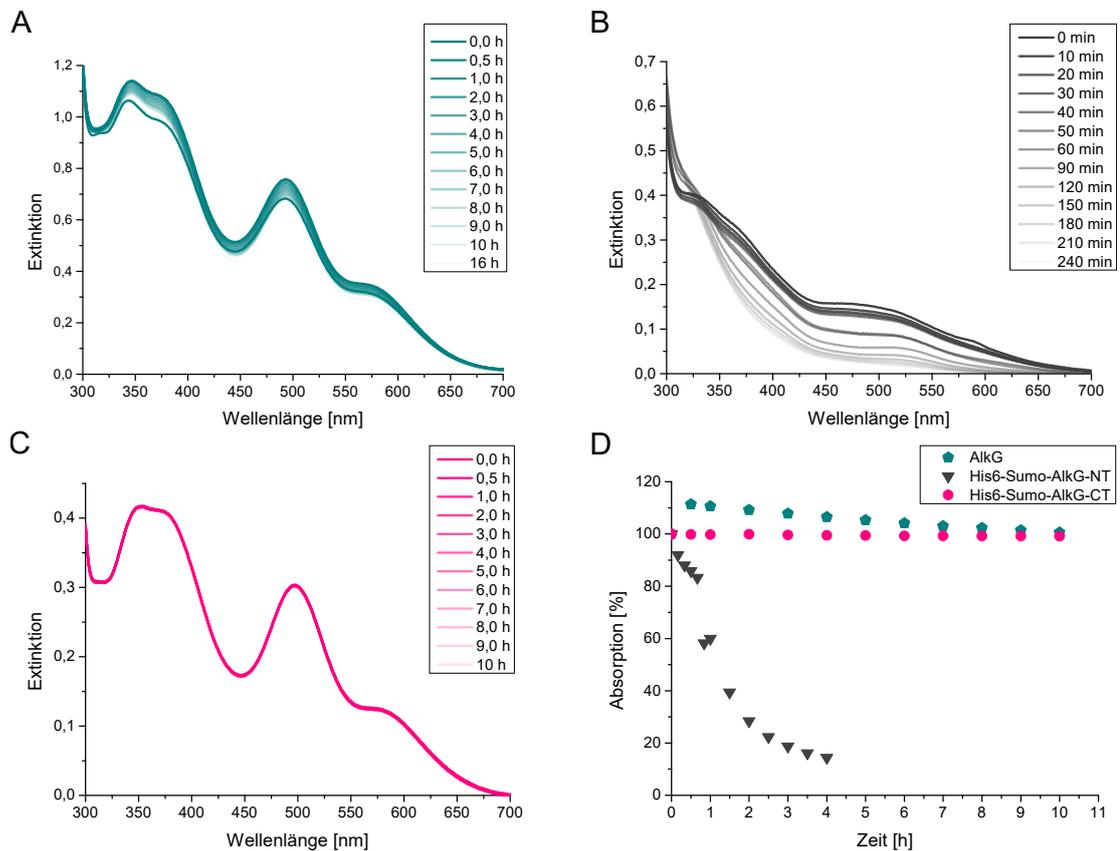


Abbildung 3.14: Stabilität der rekonstituierten [Fe]-Rubredoxine. Die AlkG-Konstrukte wurden unter Sauerstoffausschluss rekonstituiert, Luftsauerstoff ausgesetzt und EAS-Spektren aufgenommen [A] Stabilität des AlkG über einen Zeitraum von 16 h. Ein geringer Shift des Spektrums zeigt wenig Zerfall der [Fe]-Cluster. [B] Stabilität des His₆-SUMO-AlkG-NT. Das [Fe]-Cluster zerfällt innerhalb von 4 h. [C] Stabilität des His₆-SUMO-AlkG-CT. Über 10 h unter Luftsauerstoff ist kein Zerfall des [Fe]-Clusters zu beobachten. [D] Vergleich der Extinktion der AlkG-Konstrukte bei einer Wellenlänge von 500 nm in Abhängigkeit von der Zeit unter Luftsauerstoff.

geringen Abnahme der Intensität im Spektrum des AlkG widerspiegelt. Weiter sollte ermittelt werden, ob bei allen Konstrukten eine äquimolare Zugabe von Eisen ausreicht, um die Bindestellen zu besetzen.

3.2.2.5 Bindung von Eisen in die Metallbindestelle der *P. putida* Rubredoxine

Um die Bindung von Eisen an die Metallbindestellen der *P. putida* AlkG photometrisch zu verfolgen, wurden in einer Bindestudie zwei Äquivalente Eisen pro Bindestelle zu 100 μM der verschiedenen AlkG-Konstrukte titriert. Dabei wurde alle 0,5 eq. ein Spektrum im UV/VIS-Bereich aufgenommen (vgl. Abb. 3.15).

Dabei zeigt sich sowohl beim Volllängen-AlkG, als auch beim N-terminalen Konstrukt eine Sättigung mit 1 eq. Eisen pro Bindestelle, während das C-terminale Konstrukt sowohl mit als auch ohne Histidintag 1,5 eq. zur Sättigung benötigt. Beide Domänen des AlkG können demnach Eisen sowohl einzeln, als auch im Volllängenkonstrukt binden. Doch werden hier die Ergebnisse der Kobaltbindestudien bestätigt, dass das Metallion in der C-terminalen Bindestelle stärker gebunden wird. Außerdem wird die Sekundärstruktur des AlkG-NT von der C-terminalen Domäne stabilisiert.

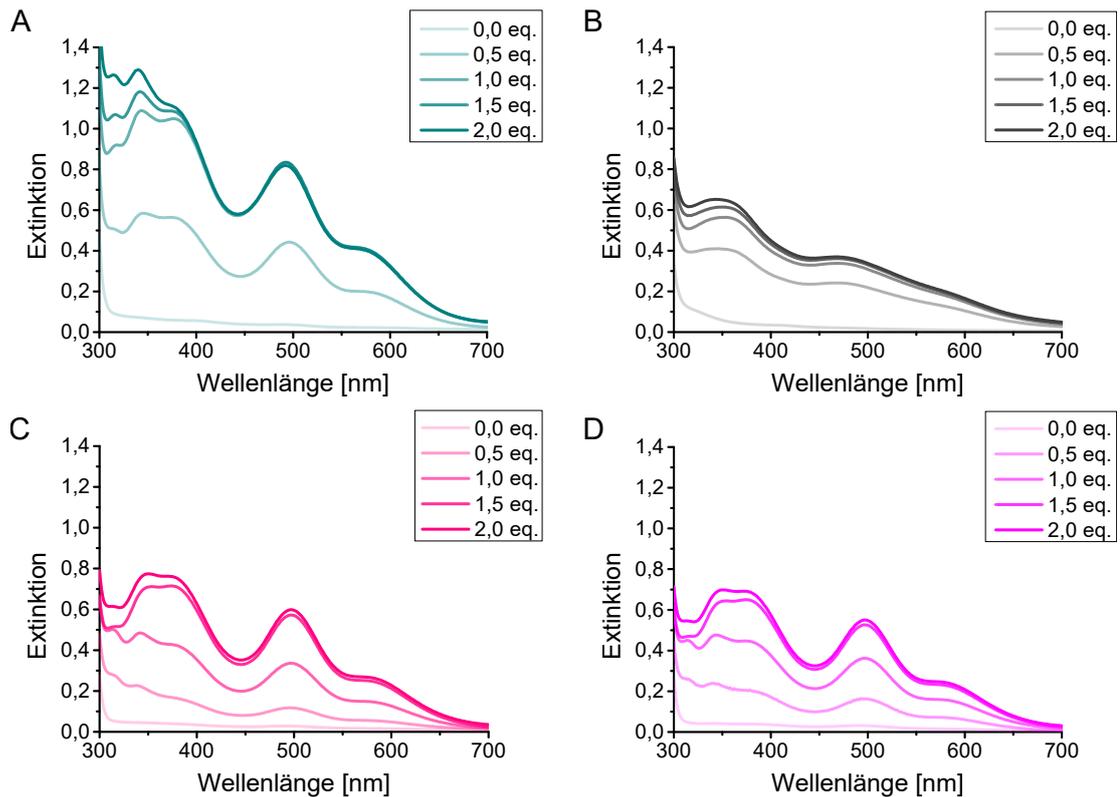


Abbildung 3.15: Bindung von Eisen an die AlkG-Konstrukte des AlkG. Zu $100 \mu\text{M}$ der Rubredoxine [A] AlkG, [B] His_{10} -SUMO-AlkG-NT, [C] AlkG-CT und [D] His_{10} -SUMO-AlkG-CT wurden bis zu 2 eq. CoCl_2 pro Bindestelle titriert und die Bindung von Kobalt spektroskopisch von 300-700 nm Wellenlänge verfolgt. Die Kobalt-Rubredoxin-Spektren werden charakterisiert durch LMCT, welche entsprechend durch Extinktion bei zwischen 350 nm und 650 nm sichtbar werden.

3.3 Strukturelle Charakterisierung einer sauerstoffstabilen Variante der *DdHydAB*

Die *Desulfovibrio desulfuricans* Hydrogenase (*DdHydAB*) enthält in seiner aktiven Form, neben zwei [4Fe-4S]-Clustern, ein sogenanntes H-Cluster bestehend aus einem [4Fe-4S]-Cluster, welches über einen Cysteinrest mit einem speziellen [2Fe]-Cluster mit kleinen anorganischen Liganden verbunden ist. Am distalen Eisen (Fe_d) findet die reversible Oxidation von Wasserstoff statt.^[114] In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Natriumsulfid zur enzymatisch aktiven Holoform des *DdHydAB* zu einer sauerstoffstabilen, aber inaktiven Variante der *DdHydAB* (H_{inact}) führt^[46]. Diese sollte nun mittels Dampfdiffusions-Methode kristallisiert und über Röntgenstrukturanalyse charakterisiert werden, um die Position und Art des Liganden zu analysieren.

3.3.1 *DdHydAB* nach drei Tagen unter Luftsauerstoff

Die *DdHydAB* in seiner H_{inact} -Form kristallisierte unter aeroben Bedingungen innerhalb von drei Tagen bei 12 °C. Es entstanden längliche, braune Kristalle im Größenbereich von 20-200 μm , was darauf hindeutet, dass diese Eisen-Schwefel-Cluster enthalten (vgl. Abb. 3.16[A]). Die Kristalle behielten ihre Farbe für mindestens zwei Wochen. Um einen oxidativen Schaden zu vermeiden, wurde ein Teil der Kristalle dennoch nach drei Tagen gefischt, in cryoprotektierender Lösung inkubiert und in flüssigem Stickstoff bis zur Röntgenstrukturanalyse gelagert.

Die *DdHydAB* H_{inact} kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Zellparametern $a=93 \text{ \AA}$, $b=86 \text{ \AA}$, $c=88 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$ (vgl. Tab. 5.1). Eine asymmetrische Einheit enthält ein Molekül *DdHydAB*. Zum Lösen der Struktur des *DdHydAB* im H_{inact} -Zustand wurde die bisher einzige veröffentlichte Struktur der *DdHydAB* (PDB-ID: 1HFE) als Startmodell zum Molekularen

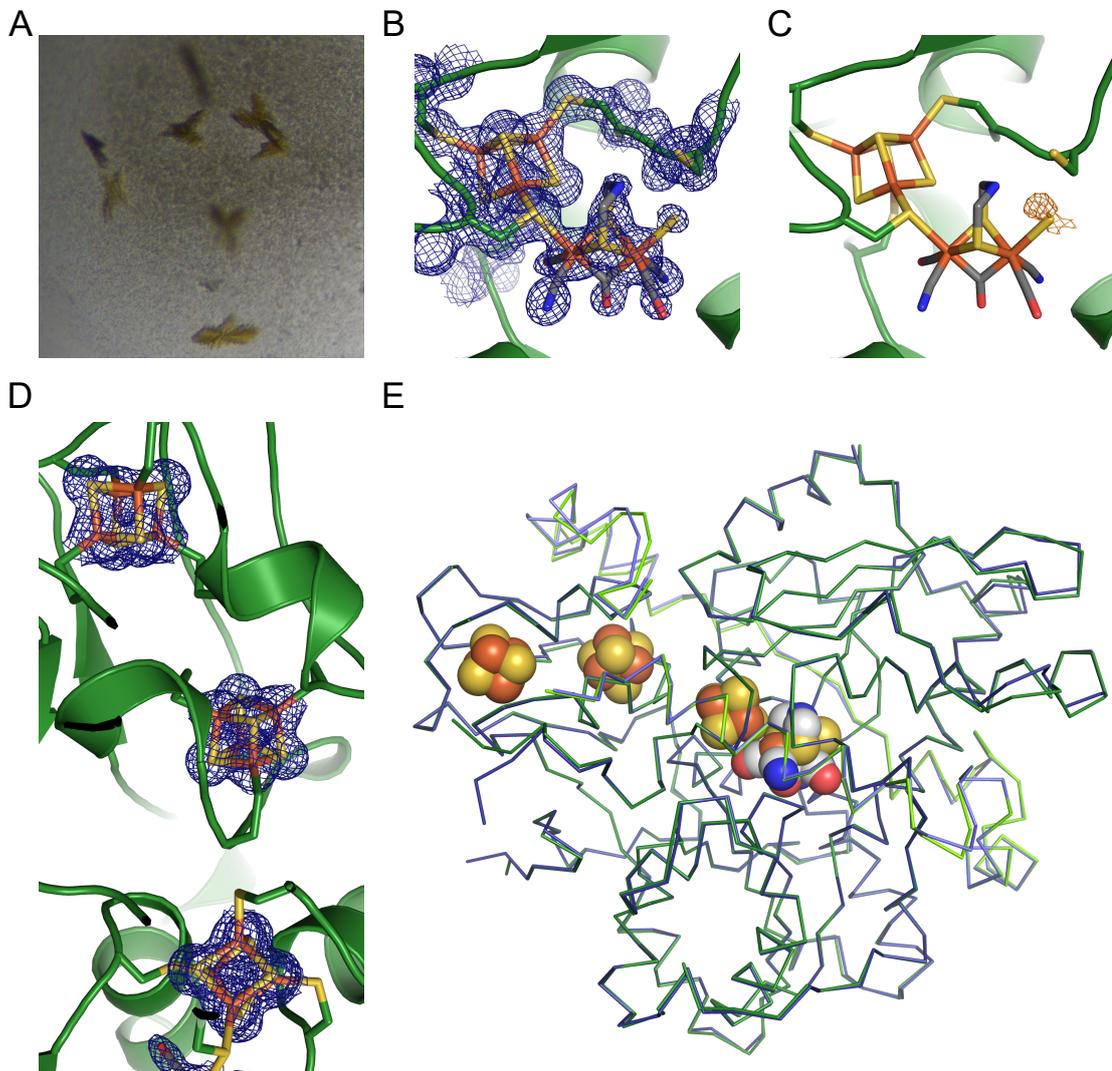


Abbildung 3.16: Kristallstruktur der *D. desulfuricans* Hydrogenase im inaktiven Zustand. [A] Braune *DdHydAB*-Kristalle nach drei Tagen Wachstum. [B] Das Proteinrückgrat ist im Cartoon-Stil repräsentiert, während die Aminosäureseitenketten und die Cofaktoren in der Stick-Darstellung gezeigt sind. Das H-Cluster und das Cys178 in ihrer *2Fo-Fc*-Elektronendichtekarte (blaues Netz). [C] Anormale Elektronendichte (orangefarbenes Netz) der zusätzlichen Liganden an der freien Koordinationsstelle des Fe_d . [D] Die Elektronendichte an den drei [4Fe-4S]-Cluster der *DdHydAB*. [E] Überlagerung der Struktur mit dem Modell der *DdHydAB* im H_{OX} -Zustand (PDB ID:1HFE). Die Architektur der *DdHydAB* im H_{inact} -Zustand (blau) ist insgesamt identisch zu der Struktur des Startmodells (grün).

Ersatz eingesetzt. Die Autoren geben an, dass sich dieses im H_{inact} -Zustand befindet. Es kristallisierte in der Raumgruppe $P2_12_12$ mit zwei Monomeren pro asymmetrischer Einheit.^[117] Die Parameter des Kristalls und die Verfeinerungsstatistiken der *DdHydAB* H_{inact} -Struktur können Tabelle 5.1 entnommen werden. Die Struktur wurde bis zu einer Auflösung von 1,65 Å verfeinert.

Insgesamt ist das dreidimensionale Strukturmodell der *DdHydAB* im H_{inact} -Zustand mit einer Standardabweichung („root mean square deviation“; r.m.s.d.) von 0,367 identisch mit der Struktur im H_{OX} -Zustand (vgl. Abb. 3.16[E]). Alle Aminosäurereste, mit Ausnahme des C-terminalen Affinitätstags der großen Untereinheit, konnten in die Elektronendichte modelliert werden. Die Kette A setzt sich zusammen aus 16 helikalen Strukturen und 12 β -Strängen in drei β -Faltblättern, während die Kette B sechs helikale Strukturen bildet. Die Cofaktoren werden an Cysteinen der Kette A komplexiert und deren Elektronendichte sind definiert (vgl. Abb. 3.16[D]). Allerdings musste die Besetzung des [2Fe]-Clusters auf 0,6 reduziert werden, was auf eine unvollständige Beladung des Clusters hindeutet. An der Elektronendichte der kubischen Cluster ist kein oxidativer Schaden zu erkennen.

Die Elektronendichte am H-Cluster im inaktiven Zustand nach drei Tagen zeigt, neben dem kubischen [4Fe-4S]-Cluster und den beide Eisen, die zwei terminalen CN- und die zwei terminalen CO-Liganden, das überbrückende ADT und den überbrückenden CO-Liganden (vgl. Abb. 3.16[B]). Zusätzlich ist die Elektronendichte eines weiteren Liganden an der freien Koordinationsstelle des Fe_d zu erkennen. Die Elektronendichte entspricht einem Atom mit einem Molekulargewicht größer als 1 mit einem Abstand von 2,4 Å vom Fe. Dies könnte einer Fe-S- oder einer Fe-O-Bindung entsprechen.^[46]

Zur weiteren Charakterisierung wurden anomale Diffraktionsdaten bei 6 keV gesammelt und analysiert (vgl. Abb. 3.16[C]). Dabei ist die Streuung der Eisen- und Sauerstoffatome unterdrückt und die von anderen Atomen, wie Schwefel oder Chlorid, erhöht. Die Röntgenabsorptionsbande von Schwefel liegt mit 2,472 keV unter den 6 keV. Dennoch ist es möglich, bei dieser Energie Schwefelatome zu lokalisieren. Die daraus resultierende Elektronendichte zeigt einen entsprechenden Liganden in apikaler Position des Fe_d , was, in Kombination mit

spektroskopischen Analysen und quantenmechanischen Berechnungen (Daten nicht veröffentlicht), auf die Bindung eines Sulfids hindeutet.

3.3.2 Wechsel der Liganden unter aeroben Bedingungen

Ein Teil der Kristalle wurde acht Tage aerob bei 12 °C in den Kristallisationsbedingungen gelagert. Auch diese wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um sie über Röntgenstrukturanalyse strukturell zu charakterisieren (vgl. Abb. 3.17).

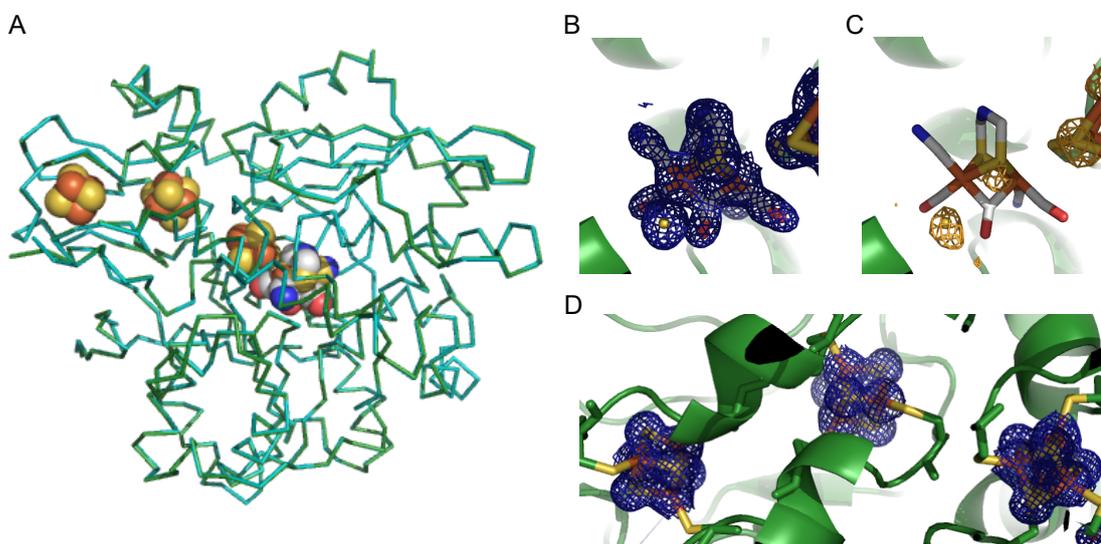


Abbildung 3.17: Kristallstruktur der *D. desulfuricans* Hydrogenase im inaktiven Zustand nach 8 Tagen unter Sauerstoff. [A] Überlagerung der Struktur (grün) mit dem Modell der *DdHydAB* nach 3 Tagen unter Sauerstoff (blau). Die Architektur der *DdHydAB* im H_{inact} -Zustand sind insgesamt identisch. [B] Das Proteinrückgrat ist im Cartoon-Stil repräsentiert, während die Aminosäuren der Aminosäureseitenketten und die Cofaktoren in der Stick-Darstellung gezeigt sind. Das H-Cluster und das Cys178 in ihrer 2Fo-Fc-Elektronendichtekarte (blaues Netz). [C] Anormale Elektronendichte (oranges Netz) der zusätzlichen Liganden an der freien Koordinationsstelle des Fe_d . [D] Die Elektronendichte an den drei [4Fe-4S]-Cluster der *DdHydAB*.

Die dabei ermittelte dreidimensionale Struktur entspricht dabei der Struktur nach drei Tagen Kristallwachstum (vgl. Abb. 3.17[A]). Allerdings sind Veränderungen der Kofaktoren zu erkennen, welche vermutlich auf oxidative Schädigung zurückzuführen ist. So spricht ein Verlust an Elektronendichte an dem [4Fe-4S]-Cluster, welches am nächsten zur Proteinoberfläche liegt, dafür, dass dieses zum Teil zerfallen ist (vgl. Abb. 3.17[D]).

Auch am H-Cluster ist in der bei 12,4 keV gemessenen Elektronendichte eine Veränderung zu erkennen (vgl. Abb. 3.17[B] und [C]). An der freien Koordinationsstelle des Fe_d liegt nun ein Ligand, welcher aus zwei Atomen besteht. Dafür wurde an der Position des Cyanidliganden nur noch die Elektronendichte eines Atoms mit einem Molekulargewicht von mindestens 1 gemessen. Bei 6 keV konnte keine Elektronendichte in der freien Koordinationsstelle mehr gemessen werden. Stattdessen streut der Ligand an der früheren Position des Cyanidliganden. Dies spricht dafür, dass bei längerer Inkubation des *DdHydAB* im H_{inact} -Zustand unter Luftsauerstoff, das gebundene Schwefel mit dem Cyanid am Fe_d die Position tauschen kann.

Zusammenfassend kann die Bindung eines Schwefelliganden an der freien Koordinationsstelle des [2Fe]-Clusters der *DdHydAB* im H_{inact} -Zustand gezeigt werden. Diese Form des H-Clusters ist für mindestens drei Tage unter Luftsauerstoff stabil, bevor ein Austausch des Schwefelliganden mit dem CN-Liganden am Fe_d stattfinden kann.

4 Diskussion

Inhaltsangabe

4.1	Assemblierung von Kobalt-Schwefel-Biohybriden	108
4.2	Die N-terminale Eisenbindestelle des AlkG	115
4.3	Die sauerstoffstabile <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Hydrogenase	122
4.4	Ausblick	125

Wasserstoff ist ein emissionsfreier, erneuerbarer Energieträger mit einer hohen Energiedichte, welcher in elementarer Form allerdings nur in geringen Mengen in der Natur vorliegt.^[1, 2] Bei der biologischen Wasserstoffproduktion erfolgt zunächst eine Spaltung von Wasser in Protonen und Elektronen, was durch Enzyme wie Hydrogenasen oder dem Photosystem II^[2--4] an komplexen, sauerstoffsensitive Cofaktoren, wie dem kubischen [Ca-3Mn-4O]-Cluster^[5, 6], katalysiert wird. Für eine effiziente und kostengünstige, industrielle Wasserstoffproduktion stehen bisher keine stabilen Katalysatoren zur Verfügung.^[3]

4.1 Assemblierung von Kobalt-Schwefel-Biohybriden

Allerdings zeigten in bisherigen Studien, neben Edelmetallkatalysatoren, synthetische Kobalt-Cluster eine Katalyse der Wasserspaltung in organischen Lösungsmitteln oder in Mischungen aus organischen Lösungsmitteln und Wasser.^[2, 7, 8] Eine Gruppe der artifiziellen Kobaltkatalysatoren sind kubische Kobalt-Schwefel-Cluster. Diese sind isostrukturell zum [4Fe-4S]-Clustern des Eisenproteins der *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase, einem Elektronentransportprotein, und zeigen auch ähnliche Potentialdifferenzen.^[27] Zur Entwicklung wasserlöslicher Katalysatoren für die Wasserspaltung wäre die Stabilisierung dieser Cluster in Gerüstproteinen von entscheidender Bedeutung. Da sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Kobalt und Eisen nicht stark voneinander unterscheiden, Kobalt, im Gegensatz zu Eisen, in beiden Oxidationsstufen wasserlöslich ist^[10] und das Eisen in verschiedenen Proteinen ganz oder teilweise durch Kobalt ersetzt werden kann^[14, 32, 161], sollten im Rahmen dieser Arbeit die artifiziellen [4Co-4S]-Cluster durch die Komplexierung in den [4Fe-4S]-Gerüstproteinen in wässriger Lösung stabilisiert werden.

Zunächst wurde ein geeignetes Reduktionsmittel ermittelt, um die Thiolgruppen der Cysteinreste in den Metallbindestellen zu reduzieren, ohne dass eine Interaktion der Reduktionsmittel mit dem Kobaltchlorid stattfindet. Für Eisen-Schwefel-Cluster ist der Einsatz von Dithiothreitol (DTT) und β -Mercaptoethanol

etabliert.^[162] DTT zeigte bei einer Titration von Kobaltchlorid Extinktionsbanden von 280-525 nm mit hohen Intensitäten, während das β -Mercaptoethanol mehrerer Signale von 265-500 nm zeigte. Bei beiden Reduktionsmitteln fiel ein schwarzer Niederschlag aus, was eine Bildung von unlöslichen Kobaltverbindungen zeigt. Beide Reduktionsmittel enthalten Thiolgruppen, von welchen bekannt ist, dass diese mit den Thiolgruppen von Cysteinresten konkurrieren können.^[163] Mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) war kein Niederschlag zu erkennen und bis auf eine starke Extinktionsbande bei 280 nm waren nur Signale mit schwacher Intensität zu erkennen. Daher wurde in den Kobaltbindestudien TCEP als Reduktionsmittel eingesetzt, um durch chemische Rekonstitution Kobalthybride aus Gerüstproteinen und Kobaltchlorid zu assemblieren.

4.1.1 Chemische Rekonstitution von artifiziellen Kobalt-Schwefel-Clustern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rubredoxine als exzellentes Modellprotein für den Austausch des natürlichen Cofaktors in Eisen-Schwefel-Proteinen durch Kobalt eingesetzt. In ihrem aktiven Zentrum wird nur ein [1Fe]-Cluster in einer tetraedrischen Geometrie an vier Cysteinresten komplexiert, weshalb sie trotz fehlenden Schwefels die einfachste Variante der Eisen-Schwefel-Proteine darstellen.^[47, 64] Aufgrund ihrer geringen Komplexität und Größe wurden sie eingesetzt, um Methoden für die chemische Rekonstitution und die Analytik von Kobalt-Biohybriden zu etablieren.

Dazu wurden zunächst das *Cupriavidus metallidurans* Rubredoxin (*CmRxn*) und das *Desulfovibrio gigas* Rubredoxin (*DgRxn*) aus *Escherichia coli* (*E. coli*) isoliert und der natürliche Cofaktor mittels Trichloressigsäure (TCA)-Fällung entfernt. Während der Titration von Kobaltchlorid zu den Rubredoxinen wurden Elektronenabsorptionsspektren aufgenommen. Der Peak bei 500 nm im Spektrum der Rubredoxine ohne Kobaltzugabe resultiert aus geringen Mengen Eisen^[76], welche nach der TCA-Fällung noch in der Metallbindestelle gebunden waren. Ansonsten stimmt das Elektronenabsorptionsspektrum des

[1Co]-*CmRxn* und des [1Co]-*DgRxn* mit den Kobaltderivate aus anderen Organismen überein.^[32, 45, 86] Das Maximum bei 350 nm kann auf Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer (LMCT) zurückgeführt werden, während die Signale bei 600-800 nm von d-d-Ligandenfeld (LF)-Übergängen herrühren. Mit Extinktionen im Bereich von 315-744 M⁻¹cm⁻¹ entsprechen diese den Werten aus der Literatur mit 335-645 M⁻¹cm⁻¹ ^[45] bzw. 1034-1232 M⁻¹cm⁻¹ ^[32]. Die LF-Übergänge entsprechen einer verzerrt tetraedrischen Symmetrie von high-spin Co(II)-Komplexen ^[159], was zu einer grünen Färbung der [1Co]-Rubredoxine führt. Demnach können Rubredoxine durch die Zugabe von TCEP und Kobaltchlorid in HEPES-Puffer zu Kobaltderivaten rekonstituiert werden. Diese Methode sollte nun auf die Beladung von [4Fe-4S]-Apo-Proteine mit Kobalt übertragen werden. Für die chemische Rekonstitution von [4Co-4S]-Biohybriden wurden verschiedene Gerüstproteine eingesetzt, um eine große Bandbreite an artifiziellen Katalysatoren zu erhalten. Als Gerüstproteine wurden [4Fe-4S]-Proteine gewählt, deren kubisches Cluster eine freie Koordinationsstelle für die Substratbindung zur Verfügung stellt. In der *E. coli* Quinolinsäuresynthase A (NadA)^[90] und der *E. coli* 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-Reduktase (IspH)^{Span2012} wird ein vollständiges Cluster gebildet, während in der *E. coli* Aconitat Hydratase B (AcnB)^[91] im inaktiven Zustand nur ein [3Fe-4S]-Cluster bindet^[93], was dazu führen könnte, dass dieses bei der Rekonstitution nur drei Kobaltionen komplexiert. Die thermostabilen Proteine *Aquifex aeolicus* Aconitase (AaAcn)^[164, 165] und die *Thermus thermophilus* Aconitase A (TtAcnA)^[166, 167] sind generell kompakter und robuster, was allerdings auch dazu führen könnte, dass es durch ihre rigide Struktur schwierig ist, ein Cluster zu assemblieren. Im Gegensatz dazu besitzt das Cluster des artifiziellen Bis-[4Fe-4S]-Proteins DSD-4C keine freie Koordinationsstelle, und komplexiert als Dimer zwei [4Fe-4S]-Cluster.^[89]

In einem ersten Schritt sollten diese mit Kobalt beladen werden. Dafür wurde zunächst der natürliche Cofaktor aus den Gerüstproteinen entfernt, bis dieser nicht mehr mittels Elektronenabsorptionsspektroskopie (EAS) nachweisbar war. Nach erfolgreicher Bindung von Kobalt sollte zur Assemblierung eines vollständigen [4Co-4S]-Clusters in den Gerüstproteinen eine Schwefelquelle hinzugefügt und die resultierenden Proteine charakterisiert werden. Als Ne-

gativkontrolle in den Kobaltbindestudien diente das kommerziell erhältliche nicht-Eisen-Schwefel-Protein Rinderserumalbumin (BSA), welches 36 Cysteine-Reste enthält. Dort steigt mit Titration von Kobaltchlorid von 350-700 nm die Extinktion, ohne erkennbare Peaks, was auch die Extinktionsmaxima überlagert, welche durch die Kobaltchlorid-TCEP-Interaktion entstehen.

Dagegen zeigen die Spektren des AcnB und des IspH definierte Maxima bei 540-689 nm bei der Zugabe von Kobaltchlorid. Bei der Titration von Kobaltchlorid steigt dort die Extinktion bis zur Zugabe von drei Äquivalenten pro Monomer. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei beiden Proteinen alle Metallbindestellen besetzt und somit drei Äquivalenten Co(II) pro Monomer gebunden sind.^[91, 92] Das AcnB wurde anschließend mit Kobaltchlorid und Natriumsulfid rekonstituiert. Da die Elektronenabsorptionsspektren der rekonstituierten Proteine einen hohen Hintergrund aufwiesen, wurden diese stattdessen mittels Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie im ultravioletten und sichtbaren (UV/VIS-)Bereich und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) analysiert. Dabei war ein Überschuss von zehn Äquivalenten Co(II) pro Monomer nicht ausreichend, um das AcnB komplett mit Kobalt zu beladen. Bei einem fünffachen Überschuss pro Metallbindestelle wurden pro Monomer fünf Kobaltionen gebunden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass AcnB, neben den Metallbindestellen im aktiven Zentrum, eine weitere, regulatorische Eisenbindestelle an der Untereinheit 4 oder 5 besitzt.^[97] Das entsprechende CD-Spektrum zeigt drei Maxima bei 400-580 nm und drei Minima bei 470-700 nm. Hier zeigen sich keine Übereinstimmungen mit dem Elektronenabsorptionsspektrum der Kobaltbindestudie. Dies ist vermutlich auf die höhere Komplexität des Clusters im Vergleich zu einer Kobalt-Thiol-Bindung zurückzuführen.

Das Elektronenabsorptionsspektrum des AaAcn zeigt dagegen Extinktionsmaxima von 370-720 nm, wobei eine Sättigung der Metallbindestellen mit Co(II) bereits mit weniger als zwei Äquivalenten erreicht ist. Dies spricht dafür, dass hier das Kobalt nicht in der Metallbindestelle gebunden wurde, oder diese nur eingeschränkt zugänglich ist. Auch in der quantitativen Bestimmung des Metallgehalts konnte nur ein Kobalt pro Monomer nach der chemischen Rekonstitution mit einer Schwefelquelle gemessen werden. Um das Vordringen des Kobalts zu erleichtern, wurde das thermostabile Protein mit einer Kobalt- und einer

Schwefelquelle auf 50 °C erwärmt. Dabei konnte die Struktur des *AaAcn* nicht so weit auflockern werden, dass bedeutend mehr Kobalt gebunden wurde. Daher wurde das Protein durch die Zugaben von Guanidiniumchlorid komplett entfaltet, wobei sechs Kobaltionen pro Bindestelle gebunden wurden. Dies spricht für eine Komplexierung von Kobalt an einer unspezifischen Metallbindestelle. Da die *AaAcn* insgesamt sieben Cysteinreste besitzt, wird das Kobalt vermutlich auch an anderen Aminosäureresten, wie Histidine, Argininen, Serinen oder Aspartaten^[52] komplexiert. Da auch das CD-Spektrum keine Übereinstimmung mit dem des *AcnB* zeigt, kann angenommen werden, dass hier keine Bildung von Kobalt-Thiol-Bindungen stattfand.

Im Gegensatz dazu zeigen die Elektronenabsorptionsspektren des *NadA*, des SUMO-DSD-4C und des *TtAcnA* keinen Hinweis auf die Bindung von Kobalt. Daher sollte nun überprüft werden, ob durch die Zugabe von Sulfid auch die Kobaltbindung gefördert werden kann. Das *NadA* konnte mit Zugabe einer Schwefelquelle fast acht Kobaltionen binden, was etwa zwei Co(II) pro Metallbindestelle und somit einer unspezifischen Bindung entspricht. Auch das CD-Spektrum zeigte Unterschiede zu dem Spektrum des *AcnB* mit Maxima bei 350-580 nm und Minima bei 370-700 nm. Neben den drei an der Clusterbindung beteiligten Cysteinen, besitzt die *NadA* noch sechs weitere Cysteine. Dies könnte für eine Überlagerung der Signale der Schwefel-Thiol-Bindungen im Cluster mit einer weiteren Komplexierung von Kobaltionen am Protein sprechen. Da das SUMO-DSD-4C einen Dimer bildet, zwischen dessen Monomeren zwei [4M-4S]-Cluster gebunden werden^[89], könnte die Zugabe einer Schwefelquelle das gebundene Metallion stabilisieren. Bei Zugabe von Sulfid wurden etwa sieben Kobalt pro Monomer gebunden. Das CD-Spektrum zeigt mit Maxima bei 350-650 nm und mit Minima bei 380-nm und 550 nm größere Übereinstimmungen mit dem Spektrum der *AaAcn*. Die Unterschiede könnten darauf zurückzuführen sein, dass beim Bis-DSD-4C das Cluster über vier Cysteinreste gebunden wird. Allerdings weist die Komplexierung von mehr als vier Cysteinen pro Monomer eher auf eine unspezifische Bindung an anderen Aminosäureresten hin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Apo-[4Fe-4S]-Proteine Kobalt *in vitro* komplexieren können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die aus der

chemischen Rekonstitution resultierenden Kobalt-Biohybride zum ersten Mal charakterisiert. AcnB und IspH komplexierten vermutlich an ihren drei Metallbindestellen je ein Kobaltion, während bei NadA und SUMO-DSD-4C die Zugabe einer Schwefelquelle zur Kobaltbindung nötig war. Allerdings wurden dabei mehr Co(II) gebunden, als für die vollständige Assemblierung der [4Co-4S]-Hybride notwendig gewesen wäre, was auf eine unspezifische Bindung spricht. Auch an die Metallbindestellen der thermostabilen Proteine *AaAcn* und *TtAcnA* *in vitro* kein Kobalt gebunden werden. Daher sollte die *in vivo*-Assemblierung genutzt werden, um die kubischen Cluster gezielt auf die Gerüstproteine zu übertragen.

4.1.2 Biologische Inkorporation von artifiziellen Kobalt-Schwefel-Clustern

Fe-Porphyrin-haltige Enzyme können in einem speziellen M9-Medium mit 150 μM CoCl_2 , nach einer Adaption an diese Bedingungen, als Co-Porphyrine isoliert werden.^[31] Auch von Eisen-Schwefel-Proteinen, wie der *E. coli* AcnB, ist bekannt, dass diese unter Kobaltstress Kobalt anstelle des Eisens einbauen können. Dabei verdrängt Kobalt das Eisen aus der Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthesemaschinerie.^[14] Dies sollte nun dazu genutzt werden, die [4Co-4S]-Biohybride *in vivo* gezielt zu generieren.

Auch hier wurden zunächst die Rubredoxine *CmRxn* und *DgRxn* aus dem speziellen M9-Medium isoliert und der Metallgehalt bestimmt. Neben einem geringen Anteil Apoprotein enthielten jeweils etwa 10 % der Rubredoxine Eisen oder Zink, während etwa 70 % als [1Co]-Rubredoxine isoliert wurden. Demnach ist es möglich, unter diesen Bedingungen Eisen-Schwefel-Proteine mit Kobalt zu beladen. Diese Methode sollte nun auf die kubischen Eisen-Schwefel-Cluster übertragen werden.

Für die *in vivo*-Assemblierung der [4Co-4S]-Cluster wurde einerseits die AcnB eingesetzt, welches sich auch durch chemische Rekonstitution assemblieren ließ. Außerdem wurden *AaAcn* und *TtAcnA* aus den thermostabilen Organismen *Aquifex aeolicus* bzw. *Thermus thermophilus* eingesetzt, welche sich nicht chemisch

rekonstituieren ließen. Alle wurden ohne Affinitätstag aus M9-Medium isoliert und mittels Elektronenabsorptionsspektrometrie analysiert. Diese ergaben vergleichbare Spektren, wobei die Maxima bei 430 nm und bei 490 nm der oxidierten, inaktiven Variante der Eisen-Aconitase zugeordnet werden kann. In diesem Zustand wird das AcnB meist aus Vollmedium isoliert, wobei sie ein [3Fe-4S]-Cluster enthält.^[168] Die Signale bei 540-650 nm können keinem bekannten Zustand der Eisen-Schwefel-Aconitasen zugeordnet werden, zeigen aber Übereinstimmungen mit den Spektren des Kobalt-substituierten *E. coli* IscU^[14]. Dies lässt vermuten, dass ein Teil der Eisenionen im Cluster durch Co(II) ersetzt wurde.

Zwar muss der Eisenausschluss bei der biologischen Inkorporation von [4Co-4S]-Clustern noch optimiert werden, doch zeigen die Ergebnisse, dass über diese Methoden [4Co-4S]-Cluster in [4Fe-4S]-Gerüstproteinen *in vivo* assembliert werden können. Zusammenfassend werden hier Methoden zur *in vitro* und *in vivo* Assemblierung und Charakterisierung von Kobalt-Schwefel-Hybriden gezeigt, welche neue, potentielle Katalysatoren für die sauerstoffstabile Produktion von Wasserstoff darstellen.

4.2 Die N-terminale Eisenbindestelle des AlkG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Pseudomonas putida* (*P. putida*) GPo1 Rubredoxin AlkG im Hinblick auf seine Metallbindestellen charakterisiert. Es ist als Elektronentransporter an der Hydroxylierung von Alkanen beteiligt^[66] und besteht als einziges Rubredoxin aus zwei Rubredoxindomänen mit jeweils einer Eisenbindestelle^[69]. Da lineare Alkane ein Hauptbestandteil des Rohöls sind^[80], ist es im Hinblick auf Ölkatastrophen von großem Interesse zu verstehen, wie diese oxidiert und abgebaut werden können.

Das 19 kDa AlkG setzt sich zusammen aus einer N-terminalen (AlkG-NT) und einer C-terminalen Domäne, welche über einen Linker verbunden sind.^[70] Diese beiden Domänen zeigen Unterschiede in ihrer Sequenz^[77] und in ihren Bindungsaffinitäten^[70, 71, 76]. Allerdings wurden bisherige Studien des AlkG-NT an einem Proteolyseprodukt des AlkG durchgeführt, welches nur eine geringe Stabilität aufwies, während das AlkG-CT eine deutlich höhere Stabilität zeigte.^[70, 76] Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die C-terminale Domäne mit Linker (AlkG-CT) als Modellsystem gewählt. Dieses sollte anhand der Komplexierung von Kobalt, welches im Gegensatz zu Eisen nicht so schnell von Luftsauerstoff oxidiert werden kann^[10], im Vergleich zum Vollängenkonstrukt charakterisiert werden.

4.2.1 Komplexierung von Co(II) durch die Domänen des AlkG

Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass das Apo-AlkG-CT Kobalt in seinem aktiven Zentrum bindet. Durch die Titrationsexperimente wurde gezeigt, dass ein Kobalt ausreicht, um das Protein vollständig zu beladen. Doch führte dies nur zur Bindung von 0,8 Kobalt pro Monomer. In diesen Bindestudien wurde die Proteinkonzentration über die Tyrosin-, Tryptophan- und Cystein-Extinktion bei 280 nm^[169, 170] bestimmt. Der entsprechende Extinktionskoeffizient wurde anhand der Proteinsequenz ermittelt, weshalb hier eine Abweichung aufgrund äußerer Faktoren, wie der räumlichen Anordnung

der Aminosäurereste, nicht auszuschließen ist. Daher wurde diese Methode mit der Proteinkonzentrationsbestimmung über IR-Spektroskopie [150] und der Methode nach Bradford [149] verglichen (vgl. Abb. 5.1). Dies ergab, dass die Proteinkonzentration bei der Bindestudie mit AlkG-CT überschätzt wurde und somit die Kobaltbeladung des AlkG-CT bei über 90 % liegt. Beim AlkG ergaben sich keine großen Abweichungen zwischen den Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

Weiter ist anhand des CD-Spektrums im fernen UV-Bereich erkennbar, dass die sekundäre und tertiäre Struktur unabhängig von der Bindung von Eisen oder Kobalt ist. Demnach kann das Rubredoxin auch ohne Zugabe eines Metallions rekonstituiert und als korrekt gefaltetes Apoprotein für Titrationsexperimente eingesetzt werden. Das Spektrum zeigt mit dem Minimum bei 200 nm einen großen Anteil von ungefaltetem Rubredoxin, das Fehlen einer positiven Elliptizität spricht für Anteile von α -helikalen und das Minimum bei 220 nm für einen Anteil von β -Faltblatt-Strukturen. Das entspricht der Struktur der Cd-substituierten AlkG-CT, welches aus einer kurzen α -Helix und einem dreisträngiges antiparallelen β -Faltblatt mit engen Turns besteht, während der Aminosäurelinker nur gering strukturiert ist.^[70]

Die Elektronenabsorptionsspektren entsprechen denen der anderen im Rahmen dieser Arbeit gemessenen [1Co] Rubredoxin-Spektren. Mit Intensitäten im Bereich von $230\text{-}360\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ liegen die Maxima unter den bisher gemessenen Spektren von [Co]-CmRxn, [Co]-DgRxn und andere Kobaltderivaten^[32, 45]. Dies ist vermutlich auf Unterschiede im Hintergrund der Spektren zurückzuführen. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen, dass Apo-AlkG-CT Kobalt im aktiven Zentrum binden kann.

Um das [1Co]-AlkG-CT weiter zu charakterisieren, wurde dieses am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion mittels EPR-Spektroskopie und HERFD XAS untersucht.^[160] Die dabei gesammelten Daten zeigen ein high-spin Co(II)-Center mit einer pseudo-tetraedrischen Symmetrie, was der D_{2d} -Symmetrie der Kristallstruktur des *Clostridium pasteurianum* [Co]-Rubredoxin entspricht^[64]. Eine EXAFS-Analyse zeigt neben den 90 % Kobalt-Thiolat-Bindungen der $\text{Co}(\text{Cys})_4$ -Koordination eine 3S1(O/N)-Koordination oder eine zweite Kobaltspezies, wie zum Beispiel ein $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]$.

Kobaltderivate des Volllängen-AlkG wurden bereits charakterisiert.^[32, 76, 78] Dennoch geben die hier dargelegten Ergebnisse neue Einblicke in die Eigenschaften der beiden Rubredoxindomänen. Die Kobaltbindestudien zeigen, dass zwei Kobaltionen nötig sind, um das Protein komplett zu beladen. Danach sind die Metallbindestellen des AlkG voll besetzt. Es werden zwei Kobaltionen durch jeweils vier Thiolliganden in der N- und der C-terminale Domäne gebunden, was auch durch die quantitativen Daten der ICP-MS-Messungen unterstützt wird. Die Signale im Elektronenabsorptionsspektrum des AlkG sind, trotz eines höheren Hintergrund, vergleichbar mit dem Spektrum des AlkG-CT. Interessanterweise haben May *et al.* zusätzlich ein Signal bei 470 nm beobachtet, welches von den Autoren einem weiteren LMCT zugeordnet wurde.^[32] Dieses Signal wurde ebenfalls nicht mit dem *D. gigas* [1Co]-Rubredoxin beobachtet.^[45] Es ist anzunehmen, dass das Signal bei 470 nm auf die Interaktion des Kobaltchlorids mit dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol zurückzuführen ist.

Allerdings zeigen die CD-Spektren im UV/VIS-Bereich des AlkG und AlkG-CT zwei verschiedene Kobaltspezies. Das breite Signal bei 490 nm beim AlkG ist keine durch Cysteinreste koordinierten Co(II)-Spezies, wie beim AlkG-CT, sondern kann entweder eine low-spin Co(III)-Spezies oder aber einem $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6$ -Komplex zugeordnet werden^[160]. Da allerdings das [2Co]-AlkG nach dem selben Protokoll wie das [1Co]-AlkG-CT präpariert wurde, ist es unwahrscheinlich, dass hier freie Co^{2+} -Ionen in Lösung waren. Auch das [2Co]-AlkG wurde am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion mittels EPR und XAS analysiert^[160] und die Daten mit dem [Co]-AlkG-CT verglichen. Die EPR-Daten zeigen keinen Hinweis auf zwei durch Cysteinreste komplexierte Co^{2+} -Ionen. Dies spricht mit den bisherigen Daten überein, da Co(III) kein EPR-Signal ergibt. Auch die HERFD XAS-Analyse stimmt mit der Annahme einer Co(III)-Spezies überein.^[160]

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass nur die Metallbindestelle der C-terminalen Domäne des AlkG mit Co(II) besetzt ist. Auch die N-terminale Domäne ist in der Lage, Kobalt zu binden, doch besitzt dieses eine alternative Metallbindestelle, in welche ein Co(III) vorliegt.

Um die Relevanz der alternativen N-terminalen Metallbindestelle *in vivo*

zu beurteilen, wurde das AlkG aus einem speziellen M9-Medium isoliert, welches Eisen ausschließt und 150 μM Kobalt enthält^[31]. Das Elektronenabsorptionsspektrum des His₁₀-TEV-AlkG zeigte das Vorhandensein einer Co(II)-Spezies, welche durch vier Thiolgruppen koordiniert ist. Allerdings ergab eine Quantifizierung des Metallgehalts nur ein Kobalt pro Monomer. Nach der Entfernung des Polyhistidintags werden die Signale für die Koordination des Tetrathiolats im Elektronenabsorptionsspektrum geringer. Dafür entsteht ein für Co(III) spezifisches Maximum bei 530 nm. Demnach wird das AlkG unter diesen Bedingungen nicht vollständig mit Kobalt beladen, wobei keine Diskriminierung der Bindestellen festzustellen ist. Die Oxidierung des N-terminal gebundenen Kobalt findet erst nach der Isolierung aus der Zelle statt, weshalb die Co(III)-Spezies *in vivo* keine Bedeutung hat. Allerdings schützt die C-terminale Bindestelle das Co(II) vor einer Oxidation durch Luftsauerstoff, während das in der N-terminalen Domäne gebundene Kobalt oxidiert werden kann.

4.2.2 Komplexierung von Eisen in den Domänen des AlkG

Weiter sollten die Domänen des AlkG anhand der Komplexierung ihrer natürlichen Cofaktor Eisen charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die N-terminale Domäne des AlkG in einem Konstrukt mit einem Polyhistidin-SUMO-Tag konstruiert, welcher über Proteolyse abgetrennt werden kann. Dieser stabilisierte das AlkG-NT, weshalb in weiteren Studien mit dem His₆-SUMO-AlkG-NT (SUMO-AlkG-NT) gearbeitet wurde. Beide Domänen des AlkG sind in der Lage, *in vitro* Eisen zu binden. Eisenbindestudien mit dem AlkG-CT zeigten, dass der Einsatz einer 1:1-Mischung von einer Fe(II)- und einer Fe(III)-Quelle, im Vergleich zu nur einer der beiden Eisenquelle, eine bessere Komplexierung von Eisen ergab. Zwar zeigten alle Elektronenabsorptionsspektren die selben Maxima, doch waren die Extinktionsintensitäten mit der Mischung deutlich größer. Daher wurde in folgenden Bindestudien diese Mischung eingesetzt. Von den isolierten Proteinen wurden CD-Spektren im UV-Bereich aufgenommen.

Das Spektrum des AlkG-NT entspricht dem Spektrum des Apoproteins aus der Literatur^[76], während das isolierte AlkG-CT eher der Fe-Form^[76] ähnelt. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, dass das AlkG-NT sein Eisen im Verlauf der Isolierung verliert. Die Unterschiede in den Spektren mit und ohne Metallion führen die Autoren auf Einflüsse des Metallions auf das Spektrum und nicht auf strukturelle Änderungen zurück.^[76] Die Spektren zeigen, dass das AlkG-CT und das AlkG NT im Vergleich zum Vollängenkonstrukt mehr unstrukturierte Bereiche aufwiesen. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Domänen jeweils die Struktur der anderen Domäne stabilisieren. Weiter zeigt das CD-Spektrum des AlkG Übereinstimmungen mit der [1Fe]- und mit der [2Fe]-Form^[71], was dafür spricht, dass im Verlauf der Proteinisolierung ein aus einem Teil der N-terminalen Domänen ein Eisen verloren gegangen ist.

Die rekonstituierten Eisen-Rubredoxine wurden mittels EAS und CD-Spektroskopie im UV/VIS-Bereich charakterisiert. Dabei wurden neben dem SUMO-AlkG-NT sowohl das AlkG-CT, als auch das His₆-SUMO-AlkG-CT eingesetzt, um den Einfluss des Affinitätstags zu beurteilen. Diese wurden mit dem Vollängenkonstrukt verglichen. Das Extinktionsspektrum des AlkG entspricht mit fünf Peaks im Bereich 300-650 nm den Spektren aus der Literatur.^[71] Das $A_{280\text{ nm}}/A_{498\text{ nm}}$ -Verhältnis liegt mit 5,2 zwischen den Werten der [1Fe]- und des [2Fe]-Form, doch liegt die Extinktion bei 280 nm außerhalb des linearen Bereichs. Nimmt man für die Extinktion bei 280 nm den theoretischen Wert von $34,2\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei $100\text{ }\mu\text{M}$ Protein an, so entspricht das Verhältnis mit 4,1 dem der [2Fe]-Form^[71]. Demnach kann angenommen werden, dass bei der Rekonstitution zwei Eisen pro Monomer gebunden wurden.

Die EAS-Spektren der beiden rekonstituierten AlkG-CT entsprechen dem des AlkG mit geringeren Intensitäten, während sich das Spektrum des SUMO-AlkG-NT nur durch zwei breite Peaks bei 355 nm und 480 nm und einer Schulter bei 585 nm aus. Beide sind, auch in ihren Intensitäten, vergleichbar mit dem der isolierten [1Fe]-Varianten^[76], was für eine korrekte Rekonstitution spricht. Die Intensitäten sind beim AlkG am höchsten, während das N-terminale Konstrukt die geringsten Intensitäten zeigt. Dabei fällt auf, dass das Spektrum des AlkG keine Addition der Spektren der beiden Konstrukte darstellt.

Während AlkG und His₆-SUMO-AlkG-CT unter Luftsauerstoff für mindestens

zehn Stunden keinen Verlust an gebundenem Eisen zeigten, verlor das His₆-SUMO-AlkG-NT innerhalb von vier Stunden unter Luftsauerstoff einen Großteil des Metallions. Dies spricht dafür, dass die Bindung des Metallions in der N-terminalen Domäne durch die C-terminale Domäne stabilisiert wird. Unterstützt wird dies dadurch, dass für die Sättigung der Eisenbindestellen des AlkG, des AlkG-CT und des His₆-SUMO-AlkG-CT ein Eisen pro Eisenbindestelle ausreicht, während die N-terminale Domäne alleine 1,5 eq. pro Bindestelle zur Sättigung benötigte.

Die rekonstituierten Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit auch über CD-Spektroskopie im UV/VIS-Bereich charakterisiert. Die Spektren zeigen große Übereinstimmungen mit den EAS-Spektren, doch lassen sich die Signale leichter unterscheiden, was den Vergleich der Spektren erleichtert. Die CD-Spektroskopie ist demnach ein gutes Werkzeug zur Analytik von Metalloproteinen. Es zeigen sich hier auch Intensitätsunterschiede zwischen den Spektren des AlkG-CT und des SUMO-AlkG-CT im kurzen Wellenlängenbereich. Durch den His₆-SUMO-Tag zeigen sich im Bereich von 300-350 nm höhere Intensitäten. Allerdings scheint der Affinitätstag keinen Einfluss auf das Spektrum des AlkG-NT zu haben, welches insgesamt weniger Peaks mit geringeren Intensitäten zeigt. Dies unterstützt die Annahme, dass das hier gebundene Metallion weniger stark komplexiert ist.

Die Quantifizierung der Eisenbindung ergab, dass alle Konstrukte doppelt so viel Eisen gebunden haben, als sie natürliche Metallbindestelle bereitstellen. Dies deutet auf eine weitere Bindestelle für Eisenionen in beiden Domänen hin. Da von dieser allerdings noch nie berichtet wurde und die Spektren auf keine weitere Eisenbindung hinweisen, muss eine Verunreinigung im Verlauf der Präparation der ICP-MS-Proben in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse eine unterschiedliche Komplexierung des Eisenions in den Bindestellen des AlkG, was mit den Daten der Kobaltbindestudien übereinstimmt. Doch muss bedacht werden, dass eine Stabilisierung der N-terminalen Domäne durch AlkG-CT stattfindet, was auch die Eisenbindung in AlkG-NT beeinflusst. Dies könnte auch erklären, weshalb das Spektrum des [2Fe]-AlkG nicht einer Addition der Spektren von den beiden Domänen entspricht. Die neuen Erkenntnisse können helfen, den Elektronen-

transport zur Alkanmonooxygenase AlkB zu verstehen und so die industrielle Anwendung dieses Prozesses zu erleichtern.

4.3 Die sauerstoffstabile *Desulfovibrio desulfuricans* Hydrogenase

Während Eisen-Schwefel-Proteine eine Rolle in der artifizielle Wasserstoffproduktion spielen könnten, gehören Hydrogenasen zu den der natürlichen H₂-produzierenden Enzymen^[114]. Die [FeFe]-Hydrogenasen zeigen die höchste katalytische Aktivität, aber auch die größte Sauerstoffsensitivität.^[115, 116] Neben mehreren [4Fe-4S]-Clustern besitzen sie das sogenannte H-Cluster, welches sich aus einem [4Fe-4S]-Cluster und einem [2Fe]-Cluster mit drei Carbonyl (CO)-, zwei Cyanid (CN)- und einem überbrückenden Azadithiolatliganden (ADT) zusammensetzt.^[114, 115, 117]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans* (*DdHydAB*) im H_{inact}-Zustand innerhalb von drei Tagen aerob kristallisiert und die Struktur mittels Röntgenkristallografie bei einer Auflösung von 1,65 Å gelöst (vgl. Abb. 3.16). Wie alle [FeFe]-Hydrogenase ist die *DdHydAB* in ihrem aktiven Zustand (H_{OX}) sauerstoffsensitiv^[42, 136], kann allerdings reversibel in eine sauerstoffstabile, aber inaktive Variante (H_{inact}) versetzt werden. Dieser soll sich durch einen zusätzlich gebundenen Liganden am distalen Eisens des [2Fe]-Clusters im Bezug auf das [4Fe-4S]-Cluster (Fe_d) auszeichnen^[116, 139, 140], an dessen freier Koordinationsstelle im H_{OX}-Zustand die Katalyse stattfindet^[125]. Die Struktur des *DdHydAB* im H_{inact}-Zustand stimmt weitgehend mit den Startmodell der *DdHydAB* im H_{OX}-Zustand^[117] überein. Es ist ein Heterodimer mit zwei [4Fe-4S]-Cofaktoren und einem H-Cluster.^[117, 135] Die native Elektronendichte zeigte das gesamte H-Cluster inklusive aller CO-Liganden, welche bei der zuvor veröffentlichten Struktur nicht aufgelöst werden konnten. Allerdings musste anhand der Elektronendichte die Besetzung des Clustern auf 60 % gesetzt werden, was für eine unvollständige Beladung der *DdHydAB* mit dem Cofaktor spricht.

Zusätzlich zeigt sich eine positive Elektronendichte an der freien Koordinationsstelle des Fe_d. Diese entspricht einem Liganden, bestehend aus einem Atom mit einem Molekulargewicht größer als 1. Der Abstand zum Eisen beträgt 2,4 Å, was einer Fe-S-, einer Fe-O oder einer Fe-Cl-Bindung entspricht.^[46] Da zur Um-

wandlung der aktiven Form der *DdHydAB* mit einem H_{OX} -Cluster in ihren H_{inact} -Zustand, neben dem Oxidationsmittel Hexaaminruthenium(III)-chloride (HAR), nur Na_2S hinzugegeben werden muss^[140], ist das Vorhandensein eines Schwefelliganden wahrscheinlich. Da der Energiebereich der PETRA III P11 Beamline auf 5,5-30 keV begrenzt ist, wurden anomale Daten bei 6 keV aufgenommen. Während die Absorptionskante von Sauerstoff mit 0,5 keV^[171] hier kein Signal gibt, können Schwefelliganden mit einer „X-ray Absorption K-Edge“ von 2,5 keV^[172] identifiziert werden. Allerdings führte dies zu einem Schatten auf den Bildern, was zu einer schwachen anomalen Elektronendichte am Liganden führte. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei dem Liganden um ein Schwefel handelt und nicht, wie theoretische Kalkulationen ergeben haben, ein H_2O oder ein OH^- ^[173].

Anhand dieser Daten lässt sich nicht ausschließen, dass der Ligand am Fe_d ein Chloridion ist. Daher wurden am Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion Röntgenabsorptions- und Kernresonanz-Vibrations-Spektroskopie, sowie Quantenmechanische Berechnungen durchgeführt (Daten nicht veröffentlicht), welche die Anwesenheit eines SH^- -Liganden bestätigen. Die Kristallstruktur der *DdHydAB* im H_{inact} -Zustand nach acht Tagen Wachstum unter Luftsauerstoff zeigt einen Austausch des Schwefelliganden mit dem CN-Liganden am Fe_d (vgl. Abb. 3.17). Zwar ist die dreidimensionale Struktur insgesamt stabil, doch zeigen die nativen Daten einen zweiatomigen Liganden an der im H_{OX} -Zustand freien Koordinationsstelle des H-Clusters, während an der Position des CN-Liganden nur noch ein Atom gebunden scheint. Auch die anomale Streuung zeigt nun einen Schwefelliganden an dieser Position, was darauf schließen lässt, dass die beiden Atome ihre Position getauscht haben. Die Daten bestätigen die Annahme, dass das HAR das H-Cluster oxidiert hält und verhindert, dass dieses durch das H_2S oxidiert wird. Das H_2S wird zu HS^- deprotoniert, welches dann an das Fe_d gebunden wird (vgl. Abb. 4.1). Mittels Oxidation durch Luftsauerstoff oder ein anderen Oxidationsmittels, wie z.B. HAR, wird das H-Cluster anschließend vom H_{trans} -Zustand in den H_{inact} -Zustand versetzt. Der H_{OX} Zustand lässt sich dann durch Reduktion mit Natriumdithionit und anschließender Reoxidation mit HAR beinahe vollständig wieder herstellen.^[46] Weiter wurde gezeigt, dass die es bei Inkubation unter Sauerstoff zu einer sterischen Umlagerung

am H-Cluster kommen kann, wobei der Schwefelligand die Position mit dem benachbarten CN-Liganden tauscht.

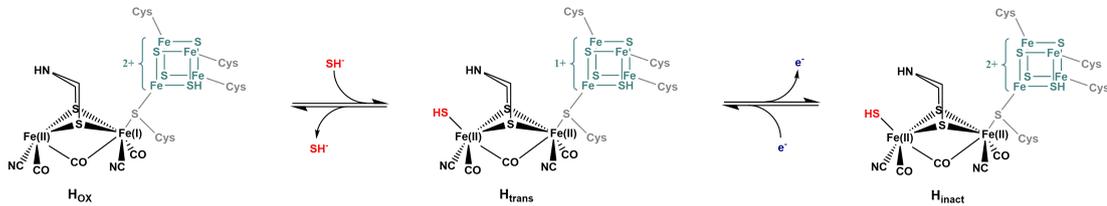


Abbildung 4.1: Modell der Deaktivierung der *DdHydAB*. Die *DdHydAb* bindet im H_{OX}-Zustand HS⁻, was zum H_{trans}-Zustand führt. Dieser kann zum H_{inact}-Zustand oxidiert werden.

Die reversible Umwandlung der *DdHydAB* vom aktiven H_{OX}- in den sauerstoffstabilen, inaktiven H_{inact}-Zustand verläuft demnach über die Komplexbildung eines HS⁻ an der freien Koordinationssstelle des H-Clusters. Die neuen Erkenntnisse über diesen Zustand kann helfen, die Hydrogenase für eine sauerstoffstabile Produktion von Wasserstoff nutzbar zu machen.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gezeigt, dass Eisen-Schwefel-Proteine Kobalt binden können und somit die Konstruktion von [4Co-4S]-Clustern in Apo-[4Fe-4S]-Proteinen als neue Katalysatoren der Wasserspaltung in wässrigen Lösungen möglich ist. Während die Kobaltbindung an Rubredoxinen *in vitro* und *in vivo* möglich ist, muss die Assemblierung von [4Co-4S]-Biohybriden weiter optimiert werden. So könnte es sein, dass *in vitro* der Einsatz eines anderen Reduktionsmittels nötig ist, um die Thiolgruppen der Cysteinreste optimal zu reduzieren^[162]. Bei der Überexpression in M9-Medium könnte es helfen, die ISC-Assemblierungsmaschinerie hoch zu regulieren, zum Beispiel durch Expression in einem *E. coli*-Stamm, in welchem der Regulator IscR deletiert ist^[174].

Besonders interessant wäre dann, ob das assemblierten [4Co-4S]-Cluster in der Lage ist, Wasser an der freien Koordinationsstelle zu binden. Im Anschluss müssten die Katalysatoren, insbesondere im Bezug auf die artifiziiellen^[26–28] und biologischen Katalysatoren der Wasserspaltung^[5, 6, 135], strukturell und elektrochemisch charakterisiert werden. Anschließend lässt sich das Redoxpotential durch gezielte Mutagenese variieren, indem die Kobalt-bindenden Cysteinreste durch andere Aminosäuren ersetzt^[144, 145] oder andere Metallionen gebunden werden^[29]. Um effiziente und stabile Katalysatoren für die Wasserspaltung zu erhalten, könnte auch die Proteinoberfläche so modifiziert werden, dass Elektronentransportproteine besser binden können^[143].

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die stärkere Komplexierung der Metallionen in der C-terminale Domäne des *P. putida* GPo1 Rubredoxins AlkG das Metallionen vor Oxidation schützt und diese die Sekundärstruktur der AlkG-NT stabilisiert. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, dass die Bindung an die Rubredoxinreduktase AlkT nur über die C-terminale Domäne stattfindet^[78]. Doch könnte dies auch die Folge einer Threonin-Arginin-Mutation nach dem zweiten Bindemotiv im AlkG-NT sein.^[70, 77] Durch gezielte Mutagenese^[146] an dieser Position und anschließender Charakterisierung der AlkG-AlkT-Interaktion^[70] könnte dies weiter untersucht werden. So wäre ein noch tieferes Verständnis der Katalyse der Alkanhydroxylierung möglich, was

eine industrielle Anwendung dieses Prozesses vereinfachen würde. Auch wäre es im Bezug auf Ölkatastrophen von Interesse, da Rohöl zu 50 % aus gesättigten Kohlenwasserstoffen besteht^[80].

Weiter wurde hier gezeigt, dass der zusätzliche Ligand am Fe_d der *DdHydAB* ein Schwefelligand ist, was mit dem Modell von Rodríguez-Maciá *et al.* (2018) übereinstimmt, in welchem ein HS^- -Ligand angenommen wird. Dies kann dazu genutzt werden, weitere spektroskopische und elektrochemische Untersuchungen der *DdHydAB* H_{inact} besser interpretieren zu können und so einen tieferen Einblick in die Sauerstoffstabilität zu erhalten.

5 Anhang

Inhaltsangabe

5.1	Charakterisierung des AlkG	128
5.2	Kristallstruktur der <i>DdHydAB</i>	128
5.3	Plasmidkarten	131

5.1 Charakterisierung des AlkG

Die Konzentration von AlkG und von AlkG-CT wurde über die Extinktion bei 280 nm, den Bradfordassay und Infrarot (IR)-Spektroskopie bestimmt (vgl. Abb. 5.1).

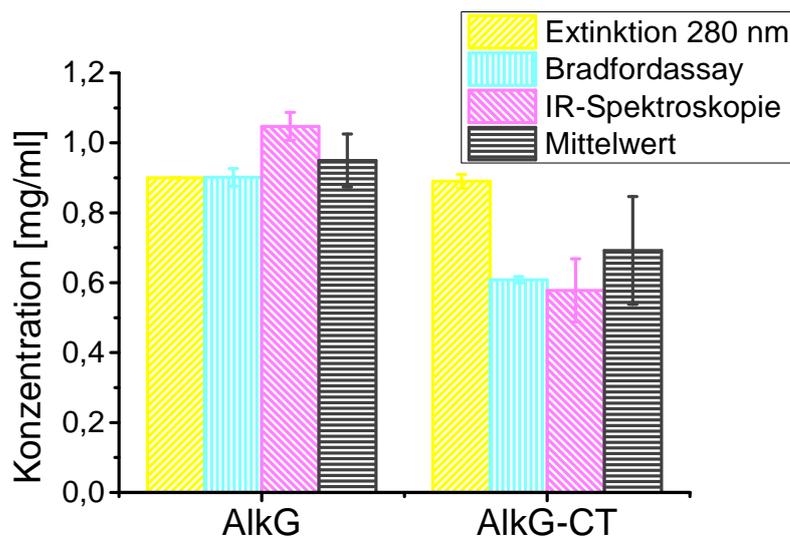


Abbildung 5.1: Bestimmung der Proteinkonzentration des AlkG und des AlkG-CT über verschiedene Techniken. Die Proteinkonzentration wurde in Dreifachbestimmung mittels der Extinktion bei 280 nm (gelb), Bradfordassay (türkis) und Infrarot (IR)-Spektroskopie (Rosa) bestimmt. Der Mittelwert (grau) ergibt sich aus allen drei Methoden.

5.2 Kristallstruktur der *DdHydAB*

Die Statistiken der Kristallstruktur der *DdHydAB* H_{inact} nach drei Tagen unter Luftsauerstoff (vgl. Abb. 5.1 und nach acht Tagen unter Luftsauerstoff (vgl. Abb. 5.2).

Tabelle 5.1: „Table 1“ der Kristallstruktur des *DdHydAB* nach drei Tagen unter Luftsauerstoff.

	<i>DdHydAB</i> nativ	<i>DdHydAB</i> Schwefel
Data collection		
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter		
a; b; c [Å]	49,34; 86,82; 88,17	49,28; 86,75; 88,08
α ; β ; γ [°]	90; 90; 90	90; 90; 90
Auflösung [Å]	43,41-1,65 (1,68-1,65)	38,91-1,94 (1,98-1,95)
R _{merge}	0,151 (2,024)	0,106 (0,900)
I/ σ _I	10,6 (1,0)	19,5 (0,4)
Completeness [%]	100 (100)	85,8 (14,4)
Multiplizität	13,0 (12,5)	19,6 (2,1)
cc(1/2)	0,998 (0,526)	0,999 (0,482)
Anomale Completeness		81,9 (1,6)
Anomale Multiplizität		10,6 (1,9)
Verfeinerung		
Auflösung [Å]	43,45–1,65	
Anzahl Reflektionen	44094	
R _{work} /R _{free}	0,179/0,213	
Anzahl Atome		
Protein	3755	
Ligand/Ion	42	
Wasser	138	
B-Faktoren [Å²]		
Protein	24,9	
Ligand/Ion	23,0	
Wasser	26,7	
R.m.s.d. Abweichungen		
Bindungslängen [Å]	0,008	
Bindungswinkel [°]	2,112	

Tabelle 5.2: „Table 1“ der Kristallstruktur des *DdHydAB* nach acht Tagen unter Luftsauerstoff.

	<i>DdHydAB</i> nativ	<i>DdHydAB</i> Schwefel
Data collection		
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter		
a; b; c [Å]	49,43; 87,56; 88,87	49,43; 87,50; 88,93
α; β; γ [°]	90; 90; 90	90; 90; 90
Auflösung [Å]	44,44-1,57 (1,54-1,54)	49,43-2,01 (1,97-1,97)
R _{merge}	0,116 (1,937)	0,060 (0,405)
I/σ _I	11,9 (1,3)	22,7 (1,2)
Completeness [%]	99,3 (98,2)	72,5 (18,6)
Multiplizität	12,7 (13,2)	10,1 (1,5)
cc(1/2)	0,999 (0,840)	0,999 (0,716)
Anomale Completeness		69,4 (7,2)
Anomale Multiplizität		5,2 (1,2)
Verfeinerung		
Auflösung [Å]	44,48-1,54	
Anzahl Reflektionen	57321	
R _{work} /R _{free}	0,156/0,183	
Anzahl Atome		
Protein	3741	
Ligand/Ion	41/1	
Wasser	196	
B-Faktoren [Å²]		
Protein	24,4	
Ligand/Ion	22,12/24,18	
Wasser	29,84	
R.m.s.d. Abweichungen		
Bindungslängen [Å]	0,020	
Bindungswinkel [°]	1,88	

5.3 Plasmidkarten

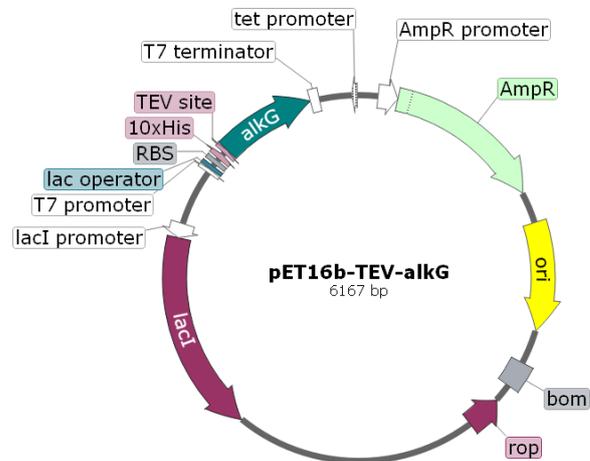


Abbildung 5.2: Plasmidkarte von pET16b-TEV-alkG Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist His₁₀-TEV-AlkG.

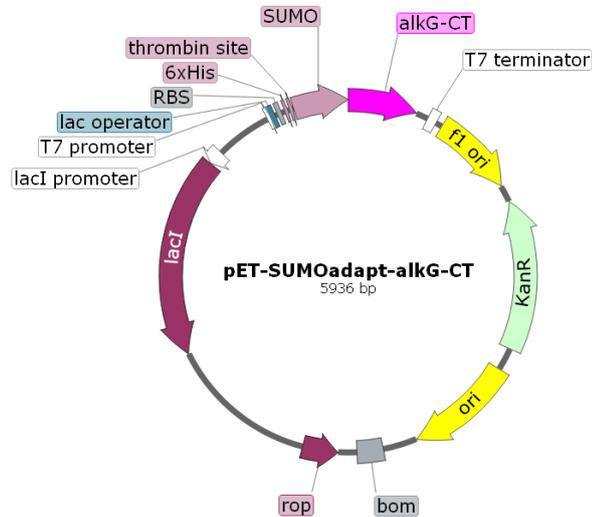


Abbildung 5.3: Plasmidkarte von pET-SUMOadapt-alkG-CT. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist His₆-SUMO-AlkG-CT.

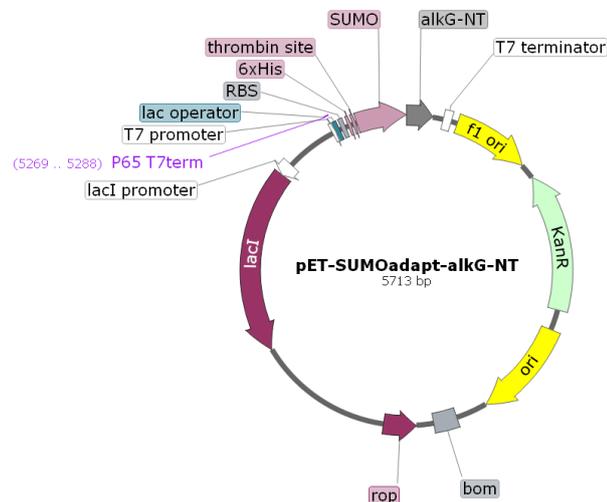


Abbildung 5.4: Plasmidkarte von pET-SUMOadapt-alkG-NT. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist His₆-SUMO-AlkG-NT.

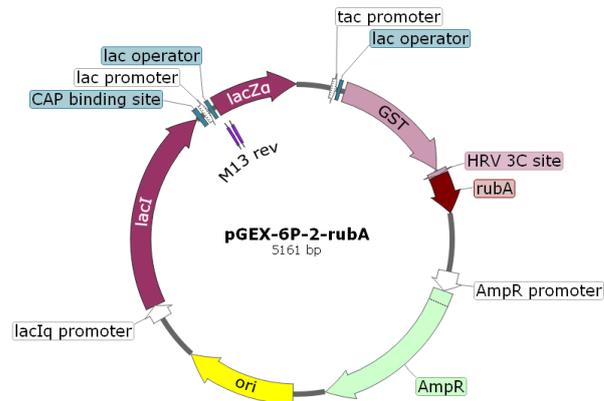


Abbildung 5.5: Plasmidkarte von pGEX-6P-2-rubA. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist GST-CmRxn.

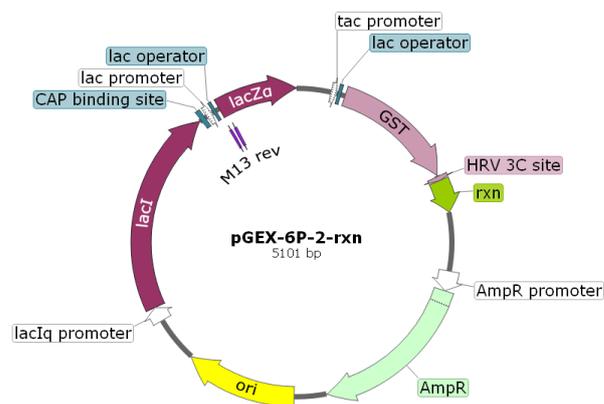


Abbildung 5.6: Plasmidkarte von pGEX-6P-2-rxn. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist GST-DgRxn.

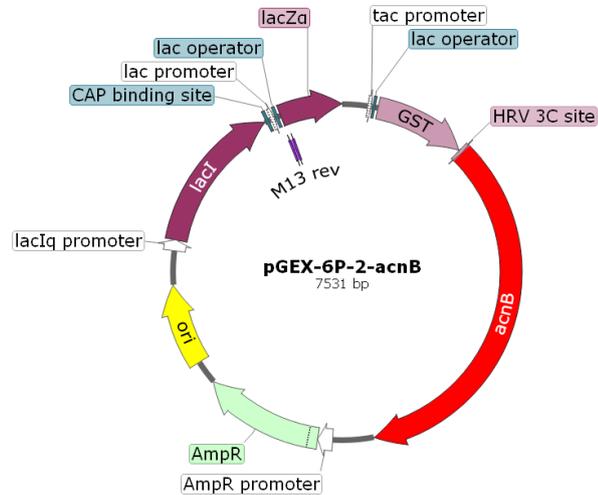


Abbildung 5.7: Plasmidkarte von pGEX-6P-2-*acnB*. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist GST-AcnB.

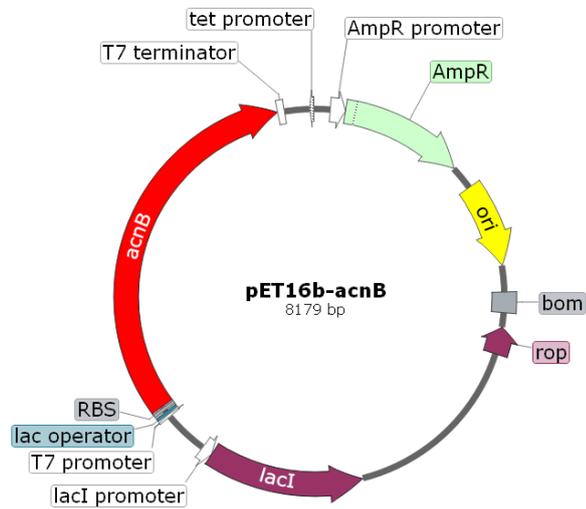


Abbildung 5.8: Plasmidkarte von pET16b-*acnB*. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist AcnB.

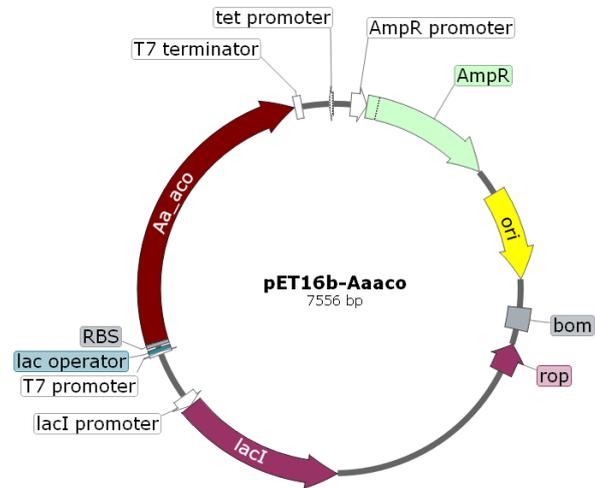


Abbildung 5.9: Plasmidkarte von pET16b-*aco*. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist *AaAcn*.

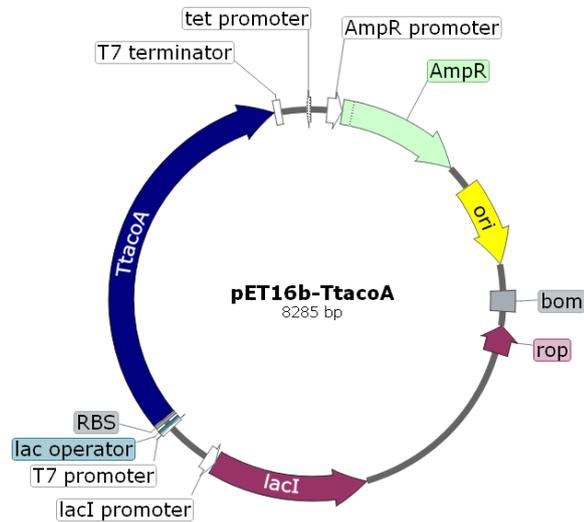


Abbildung 5.10: Plasmidkarte von pET16b-*acoA*. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist *TtAcnA*.

EkLIC-nadA.pdf EkLIC-nadA.pdf

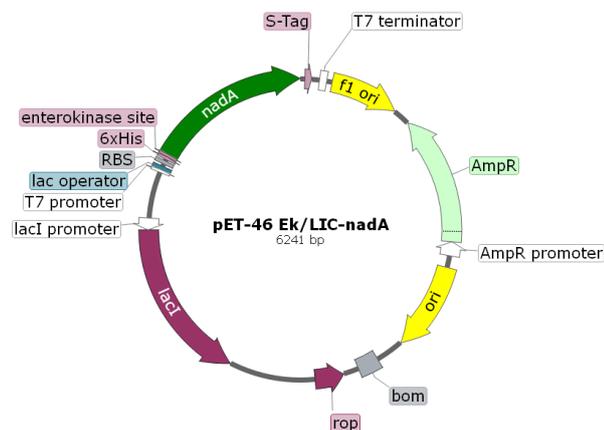


Abbildung 5.11: Plasmidkarte von pET-46 Ek/LIC-*nadA*. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist His₆-Ek-*nadA*.

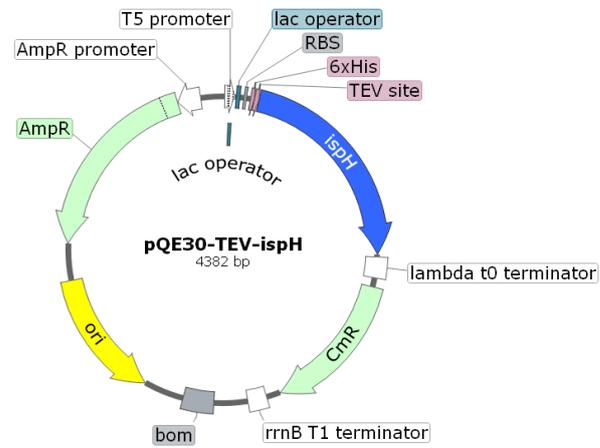


Abbildung 5.12: Plasmidkarte von pQE30-TEV-ispH. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist His₆-TEV-IspH.

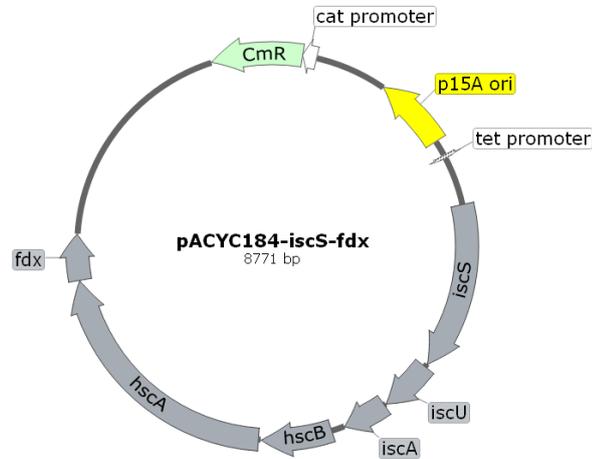


Abbildung 5.13: Plasmidkarte von pACYC184-*iscS-fdx*. Die Produkte der Genexpression von diesem Plasmid sind die Proteine der ISC-Assemblierungsmaschinerie IscS, IscU, IscA, HscB, HscA und Fdx-Gen.

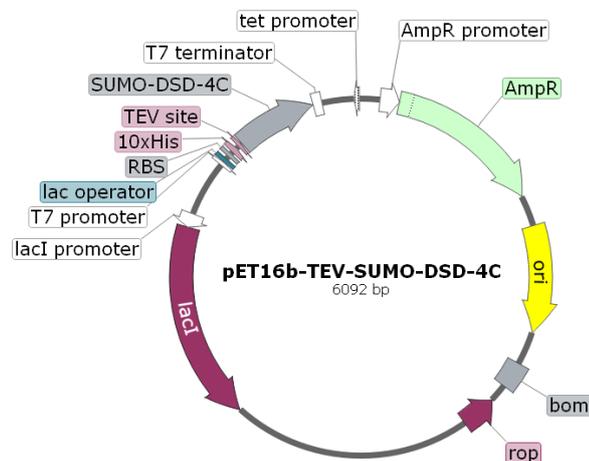


Abbildung 5.14: Plasmidkarte von pET16b-TEV-SUMO-DSD-4C. Das Produkt der Genexpression von diesem Plasmid ist His₁₀-TEV-SUMO-DSD-4C.

6 Danksagung

Zunächst danke ich Frau Jun.-Prof. Dr. Ingrid Span, dass sie mich als Betreuerin begleitet hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation an diesen spannenden Themen durchzuführen. Vielen Dank auch für die vielen konstruktiven Gespräche und die Hilfe beim Schreiben von Manuskripten und der Arbeit. Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold, für die Bereitstellung des Institut.

Ich möchte mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. Georg Groth für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die vielen konstruktiven Vorschläge während unserer Treffen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre liebevolle Unterstützung während meiner Studienzeit und auch darüber hinaus. Vielen Dank auch an meinen Freund für die schöne Zeit und die großartige Unterstützung, die ich erfahren durfte. Auch meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle danken, dass sie mich während der anstrengenden Zeit immer wieder aufgebaut haben.

Ein großer Dank geht auch an alle gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Biologie, besonders an die AG Span und an Laetitia und Nadine. Ihr wart mir in eine große Hilfe und Unterstützung, auch außerhalb des Arbeitsalltags. Vielen Dank auch an meine Studenten Julia, Timo, Aline, Angelina, Ida und Oliver.

Meinen Kooperationspartner danke ich sehr für die tolle Zusammenarbeit. Zuerst an Herr Dr. James Birrel und Frau Patricia Rodríguez-Maciá für die Möglichkeit, am Hydrogenaseprojekt mitzuarbeiten. Frau Dr. Astrid Höppner und Stefanie Kobus vom „Center of Structural Studies“ danke ich für die Hilfe beim

Ansetzen von Kristallisationsplatten mit dem Roboter. Herrn Dr. George Cutsail III danke ich für die EPR- und XAS-Analysen. Vielen Dank an Frau Dr. Sabine Metzger für die ESI-MS-Messungen und an Herrn Dr. Volker Nischwitz für die ICP-MS-Messungen.

Zuletzt danke ich allen Korrektoren dieser Arbeit.

Tabellenverzeichnis

2.1	In dieser Arbeit verwendete Primer.	33
2.2	In dieser Arbeit eingesetzte Plasmide.	34
2.3	In dieser Arbeit klonierte Plasmide.	34
2.4	In dieser Arbeit verwendete Expressionsstämme und Vollme- dien.	50
2.5	In dieser Arbeit verwendete berechnete Extinktionskoeffizien- ten ϵ	56
3.1	Expressionsbedingungen der [4Fe-4S]-Cluster.	75
3.2	Peaks der CD-Spektren der Eisen-Rubredoxine	96
5.1	„Table 1“ der Kristallstruktur des <i>DdHydAB</i> nach drei Tagen unter Luftsauerstoff.	129
5.2	„Table 1“ der Kristallstruktur des <i>DdHydAB</i> nach acht Tagen unter Luftsauerstoff.	130

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau von Eisen-Schwefel-Clustern.	7
1.2	Die ISC-Assemblierungsmaschinerie für Eisen-Schwefel Cluster.	9
1.3	Strukturmodell des C-terminalen Domäne des <i>P. putida</i> Rubredoxins AlkG.	12
1.4	Die Elektronentransportkette der Alkanhydroxlierung.	15
1.5	Katalyse der Aconitat-Hydratasen.	17
1.6	Die AcnB aus <i>E. coli</i>	18
1.7	Katalyse der Chinolinsäuresynthase A.	20
1.8	Katalyse der IspH.	21
1.9	Schematischer Aufbau der aktiven Zentren der Hydrogenasen.	22
1.10	Modell der Katalyse der [FeFe]-Hydrogenasen.	24
3.1	Interaktion von CoCl_2 mit verschiedenen Reduktionsmitteln.. . . .	71
3.2	Bindung von Kobalt an Apo-Rubredoxine.. . . .	74
3.3	Bindung von Kobalt an Apo-[4Fe-4S]-Proteine.. . . .	77
3.4	Assemblierung von [Co-S]-Clustern <i>in vitro</i> in Gerüstproteinen.	79
3.5	Metallzusammensetzung der aus M9-Medium isolierten Rubredoxine.. . . .	83
3.6	Aus M9-Medium isolierte Kobalt-Schwefel-Aconitasen.. . . .	84
3.7	Bindung von Kobalt an die C-terminale Bindestelle des AlkG.. . . .	86
3.8	Bindung von Kobalt an das AlkG.. . . .	88
3.9	Kobalt-AlkG nach der Isolierung aus M9-Medium.. . . .	91
3.10	Bindung von Eisen an AlkG-NT.. . . .	92
3.11	Einfluss der Eisenquelle auf die Bindung an das AlkG-CT.. . . .	93
3.12	Struktur der AlkG-Konstrukte nach dem Isolieren.. . . .	94

3.13	Charakterisierung der rekonstituierten AlkG-Konstrukte.	95
3.14	Stabilität der rekonstituierten [Fe]-Rubredoxine.	98
3.15	Bindung von Eisen an die AlkG-Konstrukten des AlkG.	100
3.16	Kristallstruktur der <i>D. desulfuricans</i> Hydrogenase im inaktiven Zustand.	102
3.17	Kristallstruktur der <i>D. desulfuricans</i> Hydrogenase im inaktiven Zustand nach 8 Tagen unter Sauerstoff.	104
4.1	Modell der Deaktivierung der <i>DdHydAB</i>	124
5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration des AlkG und des AlkG-CT über verschiedene Techniken.	128
5.2	Plasmidkarte von pET16b-TEV- <i>alkG</i>	131
5.3	Plasmidkarte von pET-SUMOadapt- <i>alkG-CT</i>	132
5.4	Plasmidkarte von pET-SUMOadapt- <i>alkG-NT</i>	132
5.5	Plasmidkarte von pGEX-6P-2- <i>rubA</i>	133
5.6	Plasmidkarte von pGEX-6P-2- <i>rxn</i>	133
5.7	Plasmidkarte von pGEX-6P-2- <i>acnB</i>	134
5.8	Plasmidkarte von pET16b- <i>acnB</i>	134
5.9	Plasmidkarte von pET16b- <i>aco</i>	135
5.10	Plasmidkarte von pET16b- <i>acoA</i>	136
5.11	Plasmidkarte von pET-46 Ek/LIC- <i>nadA</i>	136
5.12	Plasmidkarte von pQE30-TEV- <i>ispH</i>	137
5.13	Plasmidkarte von pACYC184- <i>iscS-fdx</i>	138
5.14	Plasmidkarte von pET16b-TEV-SUMO- <i>DSD-4C</i>	138

Literaturverzeichnis

- [1] Nicola Armaroli and Vincenzo Balzani. The Hydrogen Issue. *ChemSusChem*, 4(1):21–36, jan 2011.
- [2] Vincent Artero, Murielle Chavarot-Kerlidou, and Marc Fontecave. Splitting Water with Cobalt. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(32):7238–7266, aug 2011.
- [3] Anne K. Jones, Emma Sillery, Simon P. J. Albracht, and Fraser A. Armstrong. Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst. Electronic supplementary information (ESI) available: Levich plots at 1% and 10% hydrogen, and a comparison of the effect of carbon monoxide on oxidation c. *Chemical Communications*, 8(8):866–867, apr 2002.
- [4] A. Vincent, K. A., Parkin, , and F. A. Armstrong. Investigating and Exploiting the Electrocatalytic Properties of Hydrogenases. *Chemical Reviews*, 107, 2007.
- [5] Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen, and Nobuo Kamiya. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473(7345):55–60, may 2011.
- [6] Michihiro Suga, Fusamichi Akita, Kunio Hirata, Go Ueno, Hironori Murakami, Yoshiki Nakajima, Tetsuya Shimizu, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Hideo Ago, and Jian-Ren Shen. Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 517(7532):99–103, jan 2015.
- [7] Benjamin Probst, Miguel Guttentag, Alexander Rodenberg, Peter Hamm, and Roger Alberto. Photocatalytic H₂ Production from Water with Rhenium and Cobalt Complexes. *Inorganic Chemistry*, 50(8):3404–3412, apr 2011.
- [8] David W. Wakerley and Erwin Reisner. Development and understanding of cobaloxime activity through electrochemical molecular catalyst screening. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16(12):5739–5746, feb 2014.

- [9] Judit Gál, Andrew Hursthouse, Paul Tatner, Fran Stewart, and Ryan Welton. Cobalt and secondary poisoning in the terrestrial food chain: Data review and research gaps to support risk assessment. *Environment International*, 34(6):821–838, aug 2008.
- [10] D G Barceloux. Cobalt. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*, 37(2):201–6, 1999.
- [11] Aleksandar Cvetkovic, Angeli Lal Menon, Michael P. Thorgersen, Joseph W. Scott, Farris L. Poole II, Francis E. Jenney Jr, W. Andrew Lancaster, Jeremy L. Praissman, Saratchandra Shanmukh, Brian J. Vaccaro, Sunia A. Trauger, Ewa Kalisiak, Junefredo V. Apon, Gary Siuzdak, Steven M. Yannone, John A. Tainer, and Michael W. W. Adams. Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature*, 466(7307):779–782, aug 2010.
- [12] Michihiko Kobayashi and Sakayu Shimizu. Cobalt proteins. *European Journal of Biochemistry*, 261(1):1–9, mar 1999.
- [13] Markos Koutmos, Supratim Datta, Katherine A Patridge, Janet L Smith, and Rowena G Matthews. Insights into the reactivation of cobalamin-dependent methionine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44):18527–32, nov 2009.
- [14] Caroline Ranquet, Sandrine Ollagnier-de Choudens, Laurent Loiseau, Frédéric Barras, and Marc Fontecave. Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. *The Journal of biological chemistry*, 282(42):30442–51, oct 2007.
- [15] S Catalani, MC Rizzetti, A Padovani, and P Apostoli. Neurotoxicity of cobalt. *Human & Experimental Toxicology*, 31(5):421–437, may 2012.
- [16] Tomas Majtan, Frank E Frerman, and Jan P Kraus. Effect of cobalt on *Escherichia coli* metabolism and metalloporphyrin formation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 24(2):335–47, apr 2011.
- [17] Michael P Thorgersen and Diana M Downs. Cobalt targets multiple metabolic processes in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*, 189(21):7774–81, nov 2007.
- [18] Jiujun Cheng, Branislava Poduska, Richard A Morton, and Turlough M Finan. An ABC-type cobalt transport system is essential for growth of *Sinorhizobium meliloti* at trace metal concentrations. *Journal of bacteriology*, 193(17):4405–16, sep 2011.
- [19] Agnès Rodrigue, Géraldine Effantin, and Marie-Andrée Mandrand-Berthelot. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 187(8):2912–6, apr 2005.

- [20] Jochen A Stadler and Rudolf J Schweyen. The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance. *The Journal of biological chemistry*, 277(42):39649–54, oct 2002.
- [21] F. Barras and M. Fontecave. Cobalt stress in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: molecular bases for toxicity and resistance. *Metallomics*, 3(11):1130, nov 2011.
- [22] Stephen Leonard, Peter M. Gannett, Yon Rojanasakul, Diane Schwegler-Berry, Vince Castranova, Val Vallyathan, and Xianglin Shi. Cobalt-mediated generation of reactive oxygen species and its possible mechanism. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 70(3-4):239–244, jul 1998.
- [23] Poorna Roy, Mariia A Bauman, Hayfa Habes Almutairi, Walimuni Geethamala Jayawardhana, Nathan M Johnson, and Andrew T Torelli. Comparison of the Response of Bacterial IscU and SufU to Zn²⁺ and Select Transition-Metal Ions. *ACS chemical biology*, 13(3):591–599, mar 2018.
- [24] Chung-Wei Kung, Joseph E. Mondloch, Timothy C. Wang, Wojciech Bury, William Hoffeditz, Benjamin M. Klahr, Rachel C. Klet, Michael J. Pellin, Omar K. Farha, and Joseph T. Hupp. Metal–Organic Framework Thin Films as Platforms for Atomic Layer Deposition of Cobalt Ions To Enable Electrocatalytic Water Oxidation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(51):28223–28230, dec 2015.
- [25] Yukun Zhao, Junqi Lin, Yongdong Liu, Baochun Ma, Yong Ding, and Mindong Chen. Efficient light-driven water oxidation catalyzed by a mononuclear cobalt (III) complex. *Chemical Communications*, 51(97):17309–17312, nov 2015.
- [26] Rao P Venkateswara and R. H. Holm. Synthetic Analogues of the Active Sites of Iron-Sulfur Proteins. *Chemical reviews*, 104(2):527–560, 2003.
- [27] Liang Deng, Eckhard Bill, Karl Wieghardt, and R H Holm. Cubane-type Co₄S₄ clusters: synthesis, redox series, and magnetic ground states. *Journal of the American Chemical Society*, 131(31):11213–21, aug 2009.
- [28] Nicholas S McCool, David M Robinson, John E Sheats, and G Charles Dismukes. A Co₄O₄ cubane water oxidation catalyst inspired by photosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 133(30):11446–11449, 2011.
- [29] J. E. Folk and J. A. Gladner. Cobalt activation of carboxypeptidase A. *The Journal of biological chemistry*, 235:60–3, jan 1960.

- [30] Hanna M. Key, Paweł Dydio, Douglas S. Clark, and John F. Hartwig. Abiological catalysis by artificial haem proteins containing noble metals in place of iron. *Nature*, 534(7608):534–537, jun 2016.
- [31] Tomas Majtan, Katherine M Freeman, Aaron T Smith, Judith N Burstyn, and Jan P Kraus. Purification and characterization of cystathionine β -synthase bearing a cobalt protoporphyrin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(1):25–30, apr 2011.
- [32] Sheldon W. May and Jong-Yuan Kuo. Preparation and properties of cobalt(II) rubredoxin. *Biochemistry*, 17(16):3333–3338, aug 1978.
- [33] Helmut Beinert. Iron-sulfur proteins: Ancient structures, still full of surprises, feb 2000.
- [34] Helmut Beinert and R.H. Sands. Studies on succinic and DPNH dehydrogenase preparations by paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3(1):41–46, jul 1960.
- [35] L.E. Mortenson, R.C. Valentine, and J.E. Carnahan. An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7(6):448–452, may 1962.
- [36] Richard Malkin and Jesse C. Rabinowitz. The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 23(6):822–827, jun 1966.
- [37] Marc Fontecave. Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature Chemical Biology*, 2(4):171–174, apr 2006.
- [38] Béatrice Py, Patrice L Moreau, and Frédéric Barras. Fe–S clusters, fragile sentinels of the cell. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2):218–223, apr 2011.
- [39] Holger Webert, Sven-Andreas Freibert, Angelo Gallo, Torsten Heidenreich, Uwe Linne, Stefan Amlacher, Ed Hurt, Ulrich Mühlenhoff, Lucia Banci, and Roland Lill. Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nature Communications*, 5(1):5013, dec 2014.
- [40] M M Thayer, H Ahern, D Xing, R P Cunningham, and J A Tainer. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *The EMBO journal*, 14(16):4108–20, aug 1995.
- [41] J. A. Grandoni, R. L. Switzer, C. A. Makaroff, and H. Zalkin. Evidence that the iron-sulfur cluster of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase determines stability of the enzyme to degradation in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 264(11):6058–6064, 1989.

- [42] F. A. Vincent, K. A., Parkin, A., Lenz, O., Albracht, S. P. J., Fontecilla-Camps, J. C., Cammack, R., Friedrich, B., Armstrong. Electrochemical Definitions of O₂ Sensitivity and Oxidative Inactivation in Hydrogenases. *Chemical Reviews*, 127, 2005.
- [43] Géraldine Mitou, Catherine Higgins, Pernilla Wittung-Stafshede, Richard C. Conover, Archer D. Smith, Michael K. Johnson, Jacques Gaillard, Audria Stubna, Eckard Münck, and Jacques Meyer. An Isc-Type Extremely Thermostable [2Fe-2S] Ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. Biochemical, Spectroscopic, and Unfolding Studies. *Biochemistry*, 42(5):1354–1364, 2003.
- [44] Charles W. Jr. Carter, Joseph Kraut, Stephan T. Freer, Xuong Nguyen-huu, Richard A. Alden, and Robert G. Bartsch. Two-Angstrom Crystal Structure of Oxidized Chromatium High Potential Iron Protein. *The Journal of biological chemistry*., 249(13):4212–4225, 1972.
- [45] Isabel Moura, Miguel Teixeira, José J.G. Moura, and Jean LeGall. Spectroscopic studies of cobalt and nickel substituted rubredoxin and desulfuredoxin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 44(2):127–139, nov 1991.
- [46] Patricia Rodríguez-Maciá, Edward J. Reijerse, Maurice van Gastel, Serena DeBeer, Wolfgang Lubitz, Olaf Rüdiger, and James A. Birrell. Sulfide Protects [FeFe] Hydrogenases From O₂. *Journal of the American Chemical Society*, 140(30):9346–9350, aug 2018.
- [47] W Lovenberg and B E Sobel. Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(1):193–9, jul 1965.
- [48] J. Cambray, R. W. Lane, A. G. Wedd, Richard W. Johnson, and R. H. Holm. Chemical and electrochemical interrelationships of the 1-Fe, 2-Fe, and 4-Fe analogs of the active sites of iron-sulfur proteins. *Inorganic Chemistry*, 16(10):2565–2571, oct 1977.
- [49] Douglas C. Rees. Great Metalloclusters in Enzymology. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1):221–246, jun 2002.
- [50] Anne Volbeda and Juan C. Fontecilla-Camps. Structural bases for the catalytic mechanism of Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *Dalton Transactions*, 21(21):3443, oct 2005.
- [51] Ilija Čorić and Patrick L Holland. Insight into the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase from Synthetic Iron Complexes with Sulfur, Carbon, and Hydride Ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 138(23):7200–11, 2016.
- [52] Jacques Meyer. Iron–sulfur protein folds, iron–sulfur chemistry, and evolution. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(2):157–170, feb 2008.

- [53] B. Blanc, C. Gerez, and S. Ollagnier de Choudens. Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems: Biochemistry of the bacterial ISC system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(6):1436–1447, jun 2014.
- [54] L Zheng, V L Cash, D H Flint, and D R Dean. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *The Journal of biological chemistry*, 273(21):13264–72, may 1998.
- [55] Jonathan W. Olson, Jeffery N. Agar, Michael K. Johnson, and Robert J. Maier. Characterization of the NifU and NifS Fe-S Cluster Formation Proteins Essential for Viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry*, 39(51):16213–16219, 2000.
- [56] Yasuhiro Takahashi and Umechiyo Tokumoto. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *The Journal of biological chemistry*, 277(32):28380–3, aug 2002.
- [57] Sibali Bandyopadhyay, Kala Chandramouli, and Michael K Johnson. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 6):1112–9, dec 2008.
- [58] Roland Lill and Ulrich Mühlenhoff. Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1):669–700, jun 2008.
- [59] MartyR. Jacobson, ValerieL. Cash, MaryC. Weiss, NancyF. Laird, WilliamE. Newton, and DennisR. Dean. Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *MGG Molecular & General Genetics*, 219(1-2), oct 1989.
- [60] Roland Lill. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 460(7257):831–838, aug 2009.
- [61] Huanggen Ding, Juanjuan Yang, Liana C Coleman, and Simon Yeung. Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions. *The Journal of biological chemistry*, 282(11):7997–8004, mar 2007.
- [62] Jin Hae Kim, Ronnie O. Frederick, Nichole M. Reinen, Andrew T. Troupis, and John L. Markley. [2Fe-2S]-Ferredoxin Binds Directly to Cysteine Desulfurase and Supplies an Electron for Iron-Sulfur Cluster Assembly but Is Displaced by the Scaffold Protein or Bacterial Frataxin. *Journal of the American Chemical Society*, 135(22):8117, 2013.
- [63] Carla Ayala-Castro, Avneesh Saini, and F Wayne Outten. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72(1):110–25, table of contents, mar 2008.

- [64] Megan Maher, Maddalena Cross, Matthew C. J. Wilce, J. Mitchell Guss, Anthony G. Wedd, and IUCr. Metal-substituted derivatives of the rubredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(2):298–303, feb 2004.
- [65] Larry C. Sieker, Ronald E. Stenkamp, and Jean Legall. Rubredoxin in crystalline state. *Methods in Enzymology*, 243:203–216, jan 1994.
- [66] M Kok, R Oldenhuis, M P van der Linden, C H Meulenber, J Kingma, and B Witholt. The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry*, 264(10):5442–51, apr 1989.
- [67] Jan B. van Beilen, Marcel G. Wubbolts, and Bernard Witholt. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*, 5(3-4):161–174, dec 1994.
- [68] Jan B. van Beilen, Sven Panke, Sacha Lucchini, Alessandro G. Franchini, Martina Röthlisberger, and Bernard Witholt. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology*, 147(6):1621–1630, jun 2001.
- [69] E T Lode and M J Coon. Enzymatic omega-oxidation. V. Forms of *Pseudomonas oleovorans* rubredoxin containing one or two iron atoms: structure and function in omega-hydroxylation. *The Journal of biological chemistry*, 246(3):791–802, feb 1971.
- [70] Ashlee Perry, Winston Tambyrajah, J. Günter Grossmann, Lu-Yun Lian, and Nigel S. Scrutton. Solution Structure of the Two-Iron Rubredoxin of *Pseudomonas oleovorans* Determined by NMR Spectroscopy and Solution X-ray Scattering and Interactions with Rubredoxin Reductase. *Biochemistry*, 43:3167–3182, 2004.
- [71] H J Lee, L Y Lian, and N S Scrutton. Recombinant two-iron rubredoxin of *Pseudomonas oleovorans*: overexpression, purification and characterization by optical, CD and ¹¹³Cd NMR spectroscopies. *The Biochemical journal*, 328 (Pt 1(Pt 1):131–6, nov 1997.
- [72] Ronald E. Stenkamp, Larry C. Sieker, and Lyle H. Jensen. The structure of rubredoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* strain 27774 at 1.5 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8(4):352–364, jan 1990.
- [73] Robert Bau, D. C. Rees, Donald M. Kurtz, Robert A. Scott, Heshu Huang, Michael W. W. Adams, and M. K. Eidsness. Crystal structure of rubredoxin from *Pyrococcus furiosus* at 0.95 Å resolution, and the structures of N-terminal methionine and formylmethionine variants of Pf Rd. Contributions of N-terminal interactions to thermostability. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 3(5):484–493, oct 1998.

- [74] Brian J Goodfellow, Iven C N Duarte, Anjos L Macedo, Brian F Volkman, Sofia G Nunes, I Moura, John L Markley, and José J G Moura. An NMR structural study of nickel-substituted rubredoxin. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 15(3):409–20, mar 2010.
- [75] Ivano Bertini, Donald M. Jr Kurtz, Marly K. Eidsness, Gaohua Liu, Claudio Luchinat, Antonio Rosato, and Robert A. Scott. Solution structure of reduced *Clostridium pasteurianum* rubredoxin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 3(4):401–410, apr 1998.
- [76] A Perry, L Y Lian, and N S Scrutton. Two-iron rubredoxin of *Pseudomonas oleovorans*: production, stability and characterization of the individual iron-binding domains by optical, CD and NMR spectroscopies. *The Biochemical journal*, 354(Pt 1):89–98, feb 2001.
- [77] Jan B van Beilen, Martin Neuenschwander, Theo H M Smits, Christian Roth, Stefanie B Balada, and Bernard Witholt. Rubredoxins involved in alkane oxidation. *Journal of bacteriology*, 184(6):1722–32, mar 2002.
- [78] Ho Joon Lee, Jaswir Basran, and Nigel S. Scrutton. Electron Transfer from Flavin to Iron in the *Pseudomonas oleovorans* Rubredoxin Reductase-Rubredoxin Electron Transfer Complex. *Biochemistry*, 37(44):15513–15522, 1998.
- [79] John Meurig Thomas, Robert Raja, Gopinathan Sankar, and Robert G. Bell. Molecular Sieve Catalysts for the Regioselective and Shape- Selective Oxyfunctionalization of Alkanes in Air. *Accounts of Chemical Research*, 34:191–200, 2001.
- [80] Fernando Rojo. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(10):2477–2490, oct 2009.
- [81] Mélanie Bordeaux, Anne Galarneau, and Jullien Drone. Catalytic, Mild, and Selective Oxyfunctionalization of Linear Alkanes: Current Challenges. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(43):10712–10723, oct 2012.
- [82] Ian M. Head, D. Martin Jones, and Wilfred F. M. Röling. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3):173–182, mar 2006.
- [83] Rachel Narehood Austin and John T. Groves. Alkane-oxidizing metalloenzymes in the carbon cycle. *Metallomics*, 3(8):775, aug 2011.
- [84] J A Peterson, D Basu, and M J Coon. Enzymatic omega-oxidation. I. Electron carriers in fatty acid and hydrocarbon hydroxylation. *The Journal of biological chemistry*, 241(21):5162–4, nov 1966.

- [85] Yong Nie, Jieliang Liang, Hui Fang, Yue-Qin Tang, and Xiao-Lei Wu. Two novel alkane hydroxylase-rubredoxin fusion genes isolated from a *Dietzia* bacterium and the functions of fused rubredoxin domains in long-chain n-alkane degradation. *Applied and environmental microbiology*, 77(20):7279–88, oct 2011.
- [86] J. R. Anglin and A. Davison. Iron(II) and cobalt(II) complexes of Boc-(Gly-L-Cys-Gly)₄-NH₂ as analogs for the active site of the iron-sulfur protein rubredoxin. *Inorganic Chemistry*, 14(2):234–237, feb 1975.
- [87] Z Dauter, K S Wilson, L C Sieker, J M Moulis, and J Meyer. Zinc- and iron-rubredoxins from *Clostridium pasteurianum* at atomic resolution: a high-precision model of a ZnS₄ coordination unit in a protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17):8836–40, aug 1996.
- [88] Jeffrey W. Slater and Hannah S. Shafaat. Nickel-Substituted Rubredoxin as a Minimal Enzyme Model for Hydrogenase. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(18):3731–3736, sep 2015.
- [89] Vikas Nanda, Stefan Senn, Douglas H. Pike, Agustina Rodriguez-Granillo, Will Hansen, Sagar D. Khare, and Dror Noy. Structural principles for computational and de novo design of 4Fe-4S metalloproteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(5):531, may 2016.
- [90] Carine Rousset, Marc Fontecave, and Sandrine Ollagnier de Choudens. The [4Fe-4S] cluster of quinolinate synthase from *Escherichia coli*: Investigation of cluster ligands. *FEBS Letters*, 582(19):2937–2944, aug 2008.
- [91] Colin H. Williams, Timothy J. Stillman, Vladimir V. Barynin, Svetlana E. Sedelnikova, Yue Tang, Jeffrey Green, John R. Guest, and Peter J. Artymiuk. *E. coli* aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein–protein recognition. *Nature Structural Biology*, 9(6):447–452, jun 2002.
- [92] Ingrid Span, Ke Wang, Weixue Wang, Yonghui Zhang, Adelbert Bacher, Wolfgang Eisenreich, Kai Li, Charles Schulz, Eric Oldfield, and Michael Groll. Discovery of acetylene hydratase activity of the iron-sulphur protein IspH. *Nature communications*, 3:1042, 2012.
- [93] A H Robbins and C D Stout. Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10):3639–43, may 1989.
- [94] L. Cunningham, M. J. Gruer, and J. R. Guest. Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 143(12):3795–3805, dec 1997.

- [95] A. H. Robbins and C. D. Stout. The structure of aconitase. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 5(4):289–312, jan 1989.
- [96] A. J. Bradbury, M. J. Gruer, K. E. Rudd, and J. R. Guest. The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 142(2):389–400, feb 1996.
- [97] Yue Tang, John R. Guest, Peter J. Artymiuk, and Jeffrey Green. Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation. *Molecular Microbiology*, 56(5):1149–1158, may 2005.
- [98] H Beinert and M C Kennedy. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(15):1442–9, dec 1993.
- [99] C Alén and A L Sonenshein. *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18):10412–7, aug 1999.
- [100] Yue Tang, Michael A. Quail, Peter J. Artymiuk, John R. Guest, and Jeffrey Green. *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiology*, 148(4):1027–1037, apr 2002.
- [101] J W Foster and A G Moat. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiological reviews*, 44(1):83–105, mar 1980.
- [102] T P Begley, C Kinsland, R A Mehl, A Osterman, and P Dorrestein. The biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotides in bacteria. *Vitamins and hormones*, 61:103–19, 2001.
- [103] Sandrine Ollagnier-de Choudens, Laurent Loiseau, Yiannis Sanakis, Frédéric Barras, and Marc Fontecave. Quinolate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *FEBS Letters*, 579(17):3737–3743, jul 2005.
- [104] Robert M. Cicchillo, Loretta Tu, Jeffrey A. Stromberg, Lee M. Hoffart, Carsten Krebs, and Squire J. Booker. *Escherichia coli* Quinolate Synthetase Does Indeed Harbor a [4Fe-4S] Cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 127(127):7310–7311, 2005.
- [105] Ilaria Marinoni, Simona Nonnis, Carmine Monteferrante, Peter Heathcote, Elisabeth Härtig, Lars H. Böttger, Alfred X. Trautwein, Armando Negri, Alessandra M. Albertini, and Gabriella Tedeschi. Characterization of l-aspartate oxidase and quinolate synthase from *Bacillus subtilis*. *FEBS Journal*, 275(20):5090–5107, oct 2008.

- [106] Haruhiko Sakuraba, Hideaki Tsuge, Kazunari Yoneda, Nobuhiko Katunuma, and Toshihisa Ohshima. Crystal structure of the NAD biosynthetic enzyme quinolinate synthase. *The Journal of biological chemistry*, 280(29):26645–8, jul 2005.
- [107] Mickaël V. Cherrier, Alice Chan, Claudine Darnault, Debora Reichmann, Patricia Amara, Sandrine Ollagnier de Choudens, and Juan C. Fontecilla-Camps. The Crystal Structure of Fe4S4 Quinolinate Synthase Unravels an Enzymatic Dehydration Mechanism That Uses Tyrosine and a Hydrolase-Type Triad. *Journal of the American Chemical Society*, 136(14):5253–5256, apr 2014.
- [108] Petra Adam, Stefan Hecht, Wolfgang Eisenreich, Johannes Kaiser, Tobias Grawert, Dui-lio Arigoni, Adelbert Bacher, and Felix Rohdich. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19):12108–13, sep 2002.
- [109] Boran Altincicek, Evert C. Duin, Armin Reichenberg, Reiner Hedderich, Ann-Kristin Kollas, Martin Hintz, Stefanie Wagner, Jochen Wiesner, Ewald Beck, and Hassan Jomaa. LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters*, 532(3):437–440, dec 2002.
- [110] Tobias Gräwert, Felix Rohdich, Ingrid Span, Adelbert Bacher, Wolfgang Eisenreich, Jörg Eppinger, and Michael Groll. Structure of Active IspH Enzyme from *Escherichia coli* Provides Mechanistic Insights into Substrate Reduction. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(31):5756–5759, jul 2009.
- [111] Weixue Wang, Ke Wang, Ingrid Span, Johann Jauch, Adelbert Bacher, Michael Groll, and Eric Oldfield. Are free radicals involved in IspH catalysis? An EPR and crystallographic investigation. *Journal of the American Chemical Society*, 134(27):11225–34, jul 2012.
- [112] Ingrid Span, Ke Wang, Wolfgang Eisenreich, Adelbert Bacher, Yong Zhang, Eric Oldfield, and Michael Groll. Insights into the binding of pyridines to the iron-sulfur enzyme IspH. *Journal of the American Chemical Society*, 136(22):7926–32, jun 2014.
- [113] Franck Borel, Elodie Barbier, Sergiy Krasutsky, Karnjapan Janthawornpong, Philippe Chaignon, C. Dale Poulter, Jean-Luc Ferrer, and Myriam Seemann. Further Insight into Crystal Structures of *Escherichia coli* IspH/LytB in Complex with Two Potent Inhibitors of the MEP Pathway: A Starting Point for Rational Design of New Antimicrobials. *ChemBioChem*, 18(21):2137–2144, nov 2017.
- [114] Wolfgang Lubitz, Hideaki Ogata, Olaf Rüdiger, and Edward Reijerse. Hydrogenases. *Chemical Reviews*, 114(8):4081–4148, apr 2014.

- [115] Michael W.W. Adams. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1020(2):115–145, nov 1990.
- [116] Bernard R. Glick, William G. Martin, and Stanley M. Martin. Purification and properties of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 26(10):1214–1223, oct 1980.
- [117] Y Nicolet, C Piras, P Legrand, C E Hatchikian, and J C Fontecilla-Camps. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure (London, England : 1993)*, 7(1):13–23, jan 1999.
- [118] Vladimir Pelmeshnikov, James A Birrell, Cindy C Pham, Nakul Mishra, Hongxin Wang, Constanze Sommer, Edward Reijerse, Casseday P Richers, Kenji Tamasaku, Yoshitaka Yoda, Thomas B Rauchfuss, Wolfgang Lubitz, and Stephen P Cramer. Reaction Coordinate Leading to H₂ Production in [FeFe]-Hydrogenase Identified by Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy and Density Functional Theory. *Journal of the American Chemical Society*, 139(46):16894–16902, 2017.
- [119] Philipp Knörzer, Alexey Silakov, Carina E Foster, Fraser A Armstrong, Wolfgang Lubitz, and Thomas Happe. Importance of the protein framework for catalytic activity of [FeFe]-hydrogenases. *The Journal of biological chemistry*, 287(2):1489–99, jan 2012.
- [120] J Esselborn, N Muraki, K Klein, V Engelbrecht, N Metzler-Nolte, U-P Apfel, E Hofmann, G Kurisu, and T Happe. A structural view of synthetic cofactor integration into [FeFe]-hydrogenases. *Chemical science*, 7(2):959–968, feb 2016.
- [121] Oliver Lampret, Agnieszka Adamska-Venkatesh, Hannes Konegger, Florian Wittkamp, Ulf-Peter Apfel, Edward J. Reijerse, Wolfgang Lubitz, Olaf Rüdiger, Thomas Happe, and Martin Winkler. Interplay between CN- Ligands and the Secondary Coordination Sphere of the H-Cluster in [FeFe]-Hydrogenases. *Journal of the American Chemical Society*, 139(50):18222–18230, dec 2017.
- [122] Sven T. Stripp and Thomas Happe. How algae produce hydrogen - news from the photosynthetic hydrogenase. *Dalton Transactions*, 45(45):9960, nov 2009.
- [123] F. Wittkamp, M. Senger, S. T. Stripp, and U.-P. Apfel. [FeFe]-Hydrogenases: recent developments and future perspectives. *Chemical Communications*, 54(47):5934–5942, jun 2018.
- [124] Alexey Silakov, Eduard J. Reijerse, Simon P. J. Albracht, Claude E. Hatchikian, and Wolfgang Lubitz. The Electronic Structure of the H-Cluster in the [FeFe]-Hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*: A Q-band 57Fe-ENDOR and HYSORE Study. *Journal of the American Chemical Society*, 129:11447–11458, 2007.

- [125] Moritz Senger, Konstantin Laun, Florian Wittkamp, Jifu Duan, Michael Haumann, Thomas Happe, Martin Winkler, Ulf-Peter Apfel, and Sven T. Stripp. Proton-Coupled Reduction of the Catalytic [4Fe-4S] Cluster in [FeFe]-Hydrogenases. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(52):16503–16506, dec 2017.
- [126] Giulia Filippi, Federica Arrigoni, Luca Bertini, Luca De Gioia, and Giuseppe Zampella. DFT Dissection of the Reduction Step in H₂ Catalytic Production by [FeFe]-Hydrogenase-Inspired Models: Can the Bridging Hydride Become More Reactive Than the Terminal Isomer? *Inorganic Chemistry*, 54(19):9529–9542, oct 2015.
- [127] Stefan Mebs, Ramona Kositzki, Jifu Duan, Leonie Kertess, Moritz Senger, Florian Wittkamp, Ulf-Peter Apfel, Thomas Happe, Sven T. Stripp, Martin Winkler, and Michael Haumann. Hydrogen and oxygen trapping at the H-cluster of [FeFe]-hydrogenase revealed by site-selective spectroscopy and QM/MM calculations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859(1):28–41, jan 2018.
- [128] Maria E Carroll, Bryan E Barton, Thomas B Rauchfuss, and Patrick J Carroll. Synthetic models for the active site of the [FeFe]-hydrogenase: catalytic proton reduction and the structure of the doubly protonated intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 134(45):18843–52, nov 2012.
- [129] Nipa Chongdar, James A. Birrell, Krzysztof Pawlak, Constanze Sommer, Edward J. Reijerse, Olaf Rüdiger, Wolfgang Lubitz, and Hideaki Ogata. Unique Spectroscopic Properties of the H-Cluster in a Putative Sensory [FeFe] Hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 140(3):1057–1068, jan 2018.
- [130] Martin McCullagh and Gregory A. Voth. Unraveling the Role of the Protein Environment for [FeFe]-Hydrogenase: A New Application of Coarse-Graining. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(15):4062–4071, apr 2013.
- [131] Bojana Ginovska-Pangovska, Ming-Hsun Ho, John C. Linehan, Yuhui Cheng, Michel Dupuis, Simone Raugei, and Wendy J. Shaw. Molecular dynamics study of the proposed proton transport pathways in [FeFe]-hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(1):131–138, jan 2014.
- [132] Adam J. Cornish, Bojana Ginovska, Adam Thelen, Julio C. S. da Silva, Thereza A. Soares, Simone Raugei, Michel Dupuis, Wendy J. Shaw, and Eric L. Hegg. Single-Amino Acid Modifications Reveal Additional Controls on the Proton Pathway of [FeFe]-Hydrogenase. *Biochemistry*, 55(22):3165–3173, jun 2016.
- [133] Gabrielle Goldet, Caterina Brandmayr, Sven T. Stripp, Thomas Happe, Christine Cavazza, Juan C. Fontecilla-Camps, and Fraser A. Armstrong. Electrochemical Kinetic Investigations of the Reactions of [FeFe]-Hydrogenases with Carbon Monoxide and Oxygen: Comparing

- the Importance of Gas Tunnels and Active-Site Electronic/Redox Effects. *Journal of the American Chemical Society*, 131(41):14979–14989, oct 2009.
- [134] Sven T Stripp, Gabrielle Goldet, Caterina Brandmayr, Oliver Sanganas, Kylie A Vincent, Michael Haumann, Fraser A Armstrong, and Thomas Happe. How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41):17331–6, oct 2009.
- [135] E. Claude Hatchikian, Nicole Forget, Victor M. Fernandez, Ruth Williams, and Richard Cammack. Further characterization of the [Fe]-hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757. *European Journal of Biochemistry*, 209(1):357–365, oct 1992.
- [136] Kevin D. Swanson, Michael W. Ratzloff, David W. Mulder, Jacob H. Artz, Shourjo Ghose, Andrew Hoffman, Spencer White, Oleg A. Zadvornyy, Joan B. Broderick, Brian Bothner, Paul W. King, and John W. Peters. [FeFe]-Hydrogenase Oxygen Inactivation Is Initiated at the H Cluster 2Fe Subcluster. *Journal of the American Chemical Society*, 137(5):1809–1816, feb 2015.
- [137] Carole Baffert, Marie Demuez, Laurent Cournac, Bénédicte Burlat, Bruno Guigliarelli, Patrick Bertrand, Laurence Girbal, and Christophe Léger. Hydrogen-Activating Enzymes: Activity Does Not Correlate with Oxygen Sensitivity. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(11):2052–2054, feb 2008.
- [138] Christophe Orain, Laure Saujet, Charles Gauquelin, Philippe Soucaille, Isabelle Meynial-Salles, Carole Baffert, Vincent Fourmond, Hervé Bottin, and Christophe Léger. Electrochemical Measurements of the Kinetics of Inhibition of Two FeFe Hydrogenases by O₂ Demonstrate That the Reaction Is Partly Reversible. *Journal of the American Chemical Society*, 137(39):12580–12587, oct 2015.
- [139] Simon P. J. Albracht, Winfried Roseboom, and E. Claude Hatchikian. The active site of the [FeFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. I. Light sensitivity and magnetic hyperfine interactions as observed by electron paramagnetic resonance. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(1):88–101, jan 2006.
- [140] Winfried Roseboom, Antonio L. De Lacey, Victor M. Fernandez, E. Claude Hatchikian, and Simon P. J. Albracht. The active site of the [FeFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. II. Redox properties, light sensitivity and CO-ligand exchange as observed by infrared spectroscopy. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(1):102–118, jan 2006.
- [141] Kylie A. Vincent, Natalie A. Belsey, Wolfgang Lubitz, and Fraser A. Armstrong. Rapid and Reversible Reactions of [NiFe]-Hydrogenases with Sulfide. *Chemical Reviews*, 128, 2006.

- [142] Vincent C-C Wang, Mehmet Can, Elizabeth Pierce, Stephen W Ragsdale, and Fraser A Armstrong. A unified electrocatalytic description of the action of inhibitors of nickel carbon monoxide dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 135(6):2198–206, feb 2013.
- [143] Richard H. Holm, Pierre Kennepohl, and Edward I. Solomon. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical reviews*, 96(7):2239–2314, nov 1996.
- [144] Phillip S. Brereton, Marc F. J. M. Verhagen, Zhi H. Zhou, and Michael W. W. Adams. Effect of Iron-Sulfur Cluster Environment in Modulating the Thermodynamic Properties and Biological Function of Ferredoxin from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry*, 37(20):7351–7362, 1998.
- [145] Asako Kounosu, Zhongrui Li, Nathaniel J Cosper, Jacob E Shokes, Robert A Scott, Takeo Imai, Akio Urushiyama, and Toshio Iwasaki. Engineering a three-cysteine, one-histidine ligand environment into a new hyperthermophilic archaeal Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin from *Sulfolobus solfataricus*. *The Journal of biological chemistry*, 279(13):12519–28, mar 2004.
- [146] Olga Makarova, Emmanuel Kamberov, and Ben Margolis. Generation of Deletion and Point Mutations with One Primer in a Single Cloning Step BioTechniques. *BioTechniques*, 29(5):970–972, 2000.
- [147] Marc R. Wilkins, Elisabeth Gasteiger, Amos Bairoch, Jean-Charles Sanchez, Keith L. Williams, Ron D. Appel, and Denis F. Hochstrasser. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. In *2-D Proteome Analysis Protocols*, volume 112, pages 531–552. Humana Press, New Jersey, 1999.
- [148] Elisabeth Gasteiger, Christine Hoogland, Alexandre Gattiker, S'everine Duvaud, Marc R. Wilkins, Ron D. Appel, and Amos Bairoch. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, pages 571–607. Humana Press, Totowa, NJ, 2005.
- [149] M M Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2):248–54, may 1976.
- [150] Ivona Strug, Christopher Utzat, Amedeo Cappione, Sara Gutierrez, Ryan Amara, Joseph Lento, Florian Capito, Romas Skudas, Elena Chernokalskaya, and Timothy Nadler. Development of a univariate membrane-based mid-infrared method for protein quantitation and total lipid content analysis of biological samples. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2014:657079, oct 2014.

- [151] Wolfgang Kabsch. XDS. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 2):125–32, feb 2010.
- [152] Martyn D Winn, Charles C Ballard, Kevin D Cowtan, Eleanor J Dodson, Paul Emsley, Phil R Evans, Ronan M Keegan, Eugene B Krissinel, Andrew G W Leslie, Airlie McCoy, Stuart J McNicholas, Garib N Murshudov, Navraj S Pannu, Elizabeth A Potterton, Harold R Powell, Randy J Read, Alexei Vagin, and Keith S Wilson. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67(Pt 4):235–42, apr 2011.
- [153] Airlie J. McCoy, Ralf W. Grosse-Kunstleve, Paul D. Adams, Martyn D. Winn, Laurent C. Storoni, Randy J. Read, and IUCr. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4):658–674, aug 2007.
- [154] P Emsley, B Lohkamp, W G Scott, and K Cowtan. Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 4):486–501, apr 2010.
- [155] Alexei A. Vagin, Roberto A. Steiner, Andrey A. Lebedev, Liz Potterton, Stuart McNicholas, Fei Long, Garib N. Murshudov, and IUCr. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(12):2184–2195, dec 2004.
- [156] Paul D Adams, Pavel V Afonine, Gábor Bunkóczi, Vincent B Chen, Ian W Davis, Nathaniel Echols, Jeffrey J Headd, Li-Wei Hung, Gary J Kapral, Ralf W Grosse-Kunstleve, Airlie J McCoy, Nigel W Moriarty, Robert Oeffner, Randy J Read, David C Richardson, Jane S Richardson, Thomas C Terwilliger, and Peter H Zwart. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 2):213–21, feb 2010.
- [157] Andrée Curdel and Motohiro Iwatsubo. Biosynthetic incorporation of cobalt into yeast alcohol dehydrogenase. *FEBS Letters*, 1(3):133–136, aug 1968.
- [158] David E. Drum and Bert L. Vallee. Optical properties of catalytically active cobalt and cadmium liver alcohol dehydrogenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 41(1):33–39, oct 1970.
- [159] Yukio Sugiura. Electronic properties of sulfhydryl- and imidazole-containing peptide-cobalt(II) complexes: their relationship to cobalt(II)-substituted “blue” copper proteins. *Bioinorganic Chemistry*, 8(5):453–460, jan 1978.
- [160] Lisa M. Galle, George E. Cutsail III, Volker Nischwitz, Serena DeBeer, and Ingrid Span. Spectroscopic characterization of the Co-substituted C-terminal domain of rubredoxin-2. *Biological Chemistry*, 399(7):787–798, jun 2018.

- [161] Yukio Sugiura, Kazuhiko Ishizu, and Tokuji Kimura. Cobalt and ruthenium replacement for iron in adrenal iron-sulfur protein (adrenodoxin). Preparation and some properties. *Biochemistry*, 14(1):97–101, jan 1975.
- [162] Sven-Andreas Freibert, Benjamin D. Weiler, Eckhard Bill, Antonio J. Pierik, Ulrich Mühlhoff, and Roland Lill. *Biochemical Reconstitution and Spectroscopic Analysis of Iron–Sulfur Proteins*, volume 599. Elsevier, 2018.
- [163] Elise Burmeister Getz, Ming Xiao, Tania Chakrabarty, Roger Cooke, and Paul R. Selvin. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Analytical Biochemistry*, 273(1):73–80, aug 1999.
- [164] Robert Huber, Thomas Wilharm, Dagmar Huber, Antonio Trincone, Siegfried Burggraf, Helmut König, Rachel Reinhard, Ingrid Rockinger, Hans Fricke, and Karl O. Stetter. *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., Represents a Novel Group of Marine Hyperthermophilic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3):340–351, aug 1992.
- [165] Gerard Deckert, Patrick V. Warren, Terry Gaasterland, William G. Young, Anna L. Lennox, David E. Graham, Ross Overbeek, Marjory A. Snead, Martin Keller, Monette Aujay, Robert Huber, Robert A. Feldman, Jay M. Short, Gary J. Olsen, and Ronald V. Swanson. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature*, 392(6674):353–358, mar 1998.
- [166] T. Oshima and K. Imahori. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a Japanese Thermal Spa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24(1):102–112, jan 1974.
- [167] Felicitas Fazius, Ekaterina Shelest, Peter Gebhardt, and Matthias Brock. The fungal α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Molecular microbiology*, 86(6):1508–30, dec 2012.
- [168] M H Emptage, J L Dreyers, M C Kennedy, and H Beinert. Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase. *The Journal of biological chemistry*, 258(18):11106–11, sep 1983.
- [169] Harold Edelhoch. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry*, 6(7):1948–1954, jul 1967.
- [170] Stanley C. Gill and Peter H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182(2):319–326, nov 1989.

- [171] Benjamin Gilbert, Christopher S. Kim, Chung-Li Dong, Jinghua Guo, Peter S. Nico, and David K. Shuh. Oxygen K-Edge Emission and Absorption Spectroscopy of Iron Oxyhydroxide Nanoparticles. *AIP Conference Proceedings*, 882(1):721–725, feb 2007.
- [172] A. Mijovilovich, L. G. M. Pettersson, S. Mangold, M. Janousch, J. Susini, M. Salome, F. M. F. de Groot, and B. M. Weckhuysen. The Interpretation of Sulfur K-Edge XANES Spectra: A Case Study on Thiophenic and Aliphatic Sulfur Compounds. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113(12):2750–2756, mar 2009.
- [173] Claudio Greco, Maurizio Bruschi, Luca De Gioia, and Ulf Ryde. A QM/MM Investigation of the Activation and Catalytic Mechanism of Fe-Only Hydrogenases. *Inorganic Chemistry*, 46(15):5911–5921, 2007.
- [174] C J Schwartz, J L Giel, T Patschkowski, C Luther, F J Ruzicka, H Beinert, and P J Kiley. 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(26):14895–900, dec 2001.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lisa Marie Galle, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist.