

Funktion, Modifikation und Anwendung von O₂-toleranten, NAD(P)⁺-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenasen

Vorgelegt von
Dipl. Biol. (t.o.)
Janina Preissler
geb. in Siegen

von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Lerch

Gutachter: Prof. Dr. Peter Hildebrandt

Gutachterin: Prof. Dr. Silke Leimkühler

Gutachter: Dr. Oliver Lenz

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12. Juli 2018

Berlin 2018

Zusammenfassung

Lösliche, NAD(P)⁺-abhängige [NiFe]-Hydrogenasen („Soluble Hydrogenase“, SH) katalysieren die reversible Spaltung von H₂ in jeweils zwei Elektronen und Protonen sowie die damit gekoppelte Reduktion des Pyridinnukleotid-Kofaktors. Die beiden Reaktionen erfolgen in zwei unterschiedlichen Modulen, dem Hydrogenasemodul HoxHY, das das H₂-spaltende aktive [NiFe]-Zentrum trägt, und dem flavinhaltigen NAD⁺-Reduktasemodul HoxFU. Die beiden aktiven Zentren sind über eine Reihe von [FeS]-Zentren elektronisch verbunden. Neben dem H₂-Oxidierer *Ralstonia eutropha* H16 besitzen auch andere Knallgasbakterien wie *Rhodococcus opacus* und *Hydrogenophilus thermoluteolus* NAD⁺-abhängige Hydrogenasen, die aufgrund ihrer ungewöhnlichen Sauerstofftoleranz von besonderem Interesse sind. Für die SH aus *Ralstonia eutropha* (ReSH) wurde gezeigt, dass sie biotechnologisch für die H₂-getriebene Regeneration von NADH eingesetzt werden kann. Allerdings ist die ReSH hochspezifisch für NAD⁺, während das phosphorylierte Derivat NADP⁺ nur in Spuren umgesetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Substratspektrum der ReSH mithilfe gezielter Mutagenese auf NADP⁺ erweitert, was zu einer 240-fachen Erhöhung der katalytischen Effizienz für das neue Substrat führte. Die SH-Varianten mit synthetischer NADP⁺-Reduktionsaktivität wurden eingehend biochemisch und elektrochemisch charakterisiert und ihre Funktionalität in gekoppelten Enzymreaktionen gezeigt.

Für die biotechnologische Anwendung der SH sind neben der Substratspezifität noch weitere Eigenschaften wie Thermostabilität und Salztoleranz von Bedeutung. Die heterologe Produktion der SH aus dem thermophilen Organismus *Hydrogenophilus thermoluteolus* (HtSH) in *Ralstonia eutropha* und die anschließende Reinigung ermöglichte erstmals eingehende biochemische und spektroskopische Untersuchungen dieser Hydrogenase mit besonderer Thermostabilität. Dabei zeigte sich im Vergleich zur ReSH ein höheres Temperaturoptimum von 80 °C und ein niedrigerer optimaler pH-Wert von 6.5. Infrarotspektroskopische Untersuchungen ergaben, dass auch die Streckschwingungen der für [NiFe]-Hydrogenasen typischen CN⁻- und CO-Liganden des aktiven Zentrums von denen der ReSH abweichen, was auf alternative Strukturen und/oder Redox-Zustände des aktiven Zentrums hindeutet.

Im Falle der HtSH und der SH aus *Rhodococcus opacus* wurden Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Reaktivität aufgedeckt. Im Gegensatz zur ReSH zeigten beide Enzyme nur in Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie Ni²⁺ und Mg²⁺ im Reaktionsansatz die typische H₂-abhängige Reduktion von NAD⁺. Diese Kationen-Abhängigkeit wurde mit in dieser Arbeit konstruierten SH-Hybriden näher untersucht. Hierfür wurden die Hydrogenase- bzw. NAD⁺-Reduktase-Module von *H. thermoluteolus* und *R. opacus* heterolog in $\Delta hoxH$ - bzw. $\Delta hoxFU$ -Deletionsstämmen von *R. eutropha* produziert und durch die jeweiligen *R. eutropha*-eigenen Module zur vollständigen, chimären SH komplementiert. Durch diese Strategie konnte die Abhängigkeit für die zweiwertigen Ni²⁺- und Mg²⁺-Ionen eindeutig den Hydrogenasemodulen von *H. thermoluteolus* und *R. opacus* zugeordnet werden. Hybride, die das Hydrogenasemodul aus *R. eutropha* trugen zeigten H₂-getriebene NAD⁺-Reduktaseaktivität auch ohne Zugabe dieser Kationen. Mit Ausnahme der SH-Variante aus HtHydrogenase und

ReNAD⁺-Reduktase sind alle SH-Chimären in der Lage, autotrophes Wachstum von *R. eutropha* in einer Atmosphäre aus H₂, O₂ und CO₂ zu vermitteln. Die Funktionalität dieser Hybridtechnik ermöglicht die Anpassung der biochemischen Eigenschaften entsprechend der gewünschten Reaktionsbedingung durch geeignete Modulkombination. Beispielsweise kann die im Vergleich zur *ReSH* höhere NAD⁺-Affinität der *RoNAD*⁺-Reduktase mit der aktiveren *ReHydrogenase* kombiniert werden, sodass ein SH-Hybrid entsteht, das im Gegensatz zur *RoSH* nicht abhängig von Kationen ist.

Summary

Soluble, NAD(P)-dependent hydrogenases (SHs) catalyse the reversible splitting of H₂ into two electrons and two protons followed by the reduction of the pyridine nucleotide cofactor. The two reactions take place in two different enzyme modules. The hydrogenase module consists of the subunits HoxHY and contains the active [NiFe]-center. The NAD⁺ reductase module comprised of HoxFU harbours a flavin close to the active site. A chain of [FeS] clusters electronically links both catalytic centers. Apart from the aerobic H₂ oxidizer *Ralstonia eutropha* H16, there are further Knallgasbacteria such as *Rhodococcus opacus* and *Hydrogenophilus thermoluteolus* that possess SHs with extraordinary O₂ tolerance, a very appealing feature for biotechnological applications. It has been shown that the SH from *R. eutropha* is well applicable for H₂-driven cofactor recycling. While highly specific towards NAD⁺, its reactivity with NADP⁺ is very low. As a part of this work, the substrate spectrum of the *ReSH* was extended to NADP⁺ by rational mutagenesis resulting in a 240-fold higher catalytic efficiency for the new substrate. The SH variants with synthetic NADP⁺-reducing activity were characterized biochemically and electrochemically, and their functionality was challenged in coupled enzyme reactions.

Apart from substrate specificity, improved thermostability and, e.g., salt tolerance is crucial for biotechnological application of SH. The thermophilic organism *Hydrogenophilus thermoluteolus* contains an SH (*HtSH*) with remarkable activity and stability at high temperatures. The *HtSH* was heterologously produced in *R. eutropha*, which enabled the first comprehensive enzymatic and spectroscopic study of this particular hydrogenase. In contrast to *ReSH*, the *HtSH* showed highest H₂-dependent NAD⁺-reduction activity at 80°C and at pH 6.5. Infrared spectroscopic measurements revealed unusual vibrational stretching frequencies for the typical CO and CN⁻ ligands of the H₂-activating catalytic center, which differ from those known for *ReSH*. This indicates partially different structures/redox states of the active site.

In case of the SHs from *H. thermoluteolus* and *Rhodococcus opacus* the H₂-driven NAD⁺-reducing activity was found to depend strongly on the presence of divalent cations such as Ni²⁺ and Mg²⁺ in the enzyme assay. To obtain insight into this cation dependence, SH chimeras with mixed compositions of NAD⁺ reductase (HoxFU) and hydrogenase (HoxHY) modules of *R. eutropha*, *R. opacus*, and *H. thermoluteolus* were constructed. It turned out that the variants containing hydrogenase modules from either *H. thermoluteolus* or *R. opacus* in combination with the NAD⁺ reductase from *R. eutropha* showed cation-dependent, H₂-driven NAD⁺ reduction activities. SH, chimeras carrying the hydrogenase module from *R. eutropha* were

fully active also without additional Ni^{2+} and Mg^{2+} . This identified the hydrogenase module to be responsible for the cation dependence. With exception of the SH-variant, which contains the hydrogenase module from *H.thermoluteolus* all chimeric SHs were able to facilitate autotrophic growth in *R. eutropha* under an atmosphere of H_2 , O_2 and CO_2 . This subunit mixing system allows the optimization of biochemical features of the SH according to the desired reaction conditions. For example, the combination of highly NAD^+ -affine *RoNAD*⁺ reductase with the more active *Rehydrogenase* results in a chimeric SH that is not dependent on divalent cations in contrast to *RoSH*.

Publikationen

Janina Preissler, Stefan Wahlefeld, Christian Lorent, Christian Teutloff, Marius Horch, Lars Lauterbach, Stephen P. Cramer, Ingo Zebger, and Oliver Lenz (2018) “Enzymatic and spectroscopic properties of a thermostable [NiFe]-hydrogenase performing H₂ - driven NAD⁺-reduction in the presence of O₂.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859 (1). 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.09.006>

Janina Preissler, Holly A. Reeve, Tianze Zhu, Kouji Urata, Lars Lauterbach, Luet L. Wong, Kylie A. Vincent, and Oliver Lenz (expected 2018) “H₂-driven NADPH recycling in P450-catalyzed oxidations mediated by an engineered O₂-tolerant hydrogenase”
in preparation

Poster und Vorträge

- 1) „Extension of the substrate spectrum of the NAD⁺-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* for cofactor regeneration“
gemeinsame Tagung der **VAAM & DHGM** in Dresden **2014**
Posterpräsentation
- 2) „Biochemistry of a thermostable, O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase“
Konferenz der **European Federation of Biotechnology (EFB)**: “Bacterial Electron Transfer Processes and Their Regulation” in Vimeiro (Portugal) **2014**
Posterpräsentation
- 3) „Application and biochemistry of oxygen-tolerant, NAD⁺-reducing hydrogenases“
ICIQ-UniCat Summer School in Berlin **2015**
Posterpräsentation
- 4) „Altering substrate specificity of soluble, NAD⁺-reducing hydrogenase for H₂-driven cofactor regeneration in cytochrome P450-catalyzed selective oxidations“
Tagung der **VAAM** in Jena **2016**
Posterpräsentation
- 5) „Biochemical properties of a thermostable, O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase“
11. internationale **Hydrogenase Konferenz (CNRS)** in Marseille (Frankreich) **2016**
flash-Session-Vortrag

Danksagung

Ich möchte mich gerne bei allen Menschen bedanken, die mir während meiner Doktorarbeit zur Seite standen und mich unterstützt haben. Dazu zählen, neben meiner Familie und Freunde, die Kollegen des Max-Volmer-Laboratoriums. Insbesondere folgenden Personen gilt mein Dank:

- Dr. Oliver Lenz: für die Möglichkeit, diese Arbeit in einem angenehmen Umfeld eigenständig und dennoch unter sehr guter Betreuung anzufertigen.
- Prof. Dr. Peter Hildebrandt: für die Funktion als Gutachter sowie für die unterstützende Bereitschaft, eine mikrobiologisch-orientierte Arbeitsgruppe im MVL aufzunehmen.
- Prof. Dr. Silke Leimkühler: für die Bereitschaft als Gutachterin meiner Arbeit zu fungieren.
- Prof. Dr. Thomas Friedrich: für die Übernahme der Rolle als Vorsitzender des Promotionsausschusses.
- Janna Schoknecht und Sven Hartmann: besonderer Dank für eure tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen und eure ständige Hilfsbereitschaft. Eure Erfahrungen und Kenntnisse haben des Öfteren maßgeblich zur Problemlösung beigetragen und mir vermutlich einige Fehler erspart.
- Drs. Lars Lauterbach und Stefan Frielingsdorf: für die Vorarbeiten zur Bindestellenumwandlung der SH und für die bereitwillige Weitergabe eurer Expertise sowie hilfreicher Diskussionen.
- Stefan Wahlefeld, Christian Lorent, Catharina Kulka, Dr. Marius Horch und Dr. Ingo Zebger: für eine angenehme, unkomplizierte Zusammenarbeit und der effizienten Verwendung zahlreicher SH-Proben.
- Andrea Schmidt und Dr. Patrick Scheerer: für die unermüdliche Geduld bei der SH-Kristallisation und das Ansetzen unzähliger Kristallisationsplatten.
- Dr. Holly Reeve und Prof. Dr. Kylie Vincent: für die hilfreichen Diskussionen, vielseitigen Ideen und elektrochemischen Experimente mit SH-Präparationen.
- Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter des MVLs und der AG Lenz: hervorzuheben sind Dr. Katja Karstens für die Vorarbeiten an der *R.opacus*-SH und Dr. Caspar Schäfer für sein stets offenes Ohr und seine Hilfsbereitschaft.
- Meinen Eltern, meinem Bruder, meiner Großmutter, meiner Tante, meinem Onkel und Ronja: Ohne ihren Zuspruch und die Unterstützung in jeglicher Form wäre Vieles nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Publikationen	IV
Danksagung	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Wasserstoff.....	1
1.2 Hydrogenasen.....	2
1.3 Einteilung der Hydrogenasen anhand des aktiven Zentrums.....	2
1.4 [NiFe]-Hydrogenasen.....	4
1.5 Katalytischer Mechanismus der [NiFe]-Hydrogenasen.....	5
1.6 Hydrogenasen aus <i>Ralstonia eutropha</i> H16.....	7
1.7 Sauerstofftoleranz der [NiFe]-Hydrogenasen.....	9
1.8 Die NAD ⁺ -reduzierende Hydrogenase aus <i>R. eutropha</i> H16.....	10
1.9 Andere lösliche, bidirektionale [NiFe]-Hydrogenasen.....	12
1.10 Kofaktorregeneration.....	14
1.11 Wasserstoffgetriebene Kofaktorregeneration.....	15
1.12 Fragestellung und Zielsetzung.....	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Stämme und Plasmide.....	19
2.2 Zellkultivierung.....	23
2.2.1 Nährmedien.....	23
2.2.2 Bestimmung der Wachstumsparameter.....	25
2.2.3 Kultivierung und Wachstum von <i>Ralstonia eutropha</i>	25
2.2.4 Zellernte.....	26
2.2.5 Lagerung und Konservierung von Bakterienstämmen.....	26
2.3 Proteinreinigung.....	26
2.3.1 Aerobe Affinitätschromatographie zur Isolierung von <i>StrepII</i> ®-tag-tragenden SH-Derivaten.....	26
2.3.2 Anaerobe Affinitätschromatographie zur Isolierung von <i>StrepII</i> ®-tag-tragenden HtSH-Derivaten und der HtHY/ReFU-Chimäre.....	28

2.3.3	Größenausschlusschromatographie der <i>HtSH</i>	28
2.4	Probenanalytik.....	29
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.4.2	Messung der H ₂ -abhängigen NAD(P) ⁺ -Reduktionsaktivität	29
2.4.3	Messung der NAD(P)H-abhängigen Benzylviologen-Reduktionsaktivität.....	31
2.4.4	Messung der H ₂ -abhängigen Benzylviologen-Reduktionsaktivität.....	31
2.4.5	Messung der NADH-abhängigen H ₂ -Produktion	31
2.4.6	Aufnahme von UV/Vis Absorptionsspektren	32
2.4.7	Bestimmung des FMN-Gehalts.....	32
2.4.8	Bestimmung des Metallgehalts	32
2.4.9	Kristallisation.....	33
2.5	Elektrochemische Untersuchung der ReSH	34
2.5.1	Elektrochemische Aktivitätsmessung der löslichen, NAD ⁺ -reduzierenden Hydrogenase	34
2.5.2	Zyklische Voltammetrie.....	35
2.5.3	Chronoamperometrie	35
2.6	Spektroskopische Untersuchungen der <i>HtSH</i>	36
2.6.1	IR-Spektroskopie	36
2.6.2	IR-Spektroelektrochemische Untersuchung	36
2.6.3	EPR-Spektroskopie	37
2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.7.1	SDS-PAGE	37
2.7.2	Coomassie-Färbung	39
2.7.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen nach dem Western-Blot-Verfahren...	39
2.8	DNA-Grundtechniken	40
2.8.1	Behandlung von Geräten und Lösungen.....	40
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
2.8.3	Restriktionsverdau	41
2.8.4	Ligation.....	42
2.9	DNA-Isolierung.....	42
2.9.1	Plasmidisolation: Mini-Präparation	42
2.9.2	Isolierung von <i>low-copy</i> -Plasmiden mithilfe von Anionenaustauschersäulen ..	43
2.9.3	Agarosegelelektrophorese.....	43
2.10	Plasmidtransfer.....	44

VIII

2.10.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	44
2.10.2	Transformation von <i>E. coli</i>	45
2.10.3	Herstellung elektrokompetenter <i>R. eutropha</i> -Zellen	45
2.10.4	Elektroporation von <i>R. eutropha</i>	46
2.10.5	Konjugation.....	46
2.10.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
2.10.7	Homologe Rekombination	50
2.11	Sequenzierung	51
2.12	Enzyme und Chemikalien	51
2.13	Dokumentation und Datenverarbeitung	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Charakterisierung der thermostabilen SH aus <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> TH-1T (<i>Ht</i>).....	53
3.2	Die thermostabile <i>Ht</i> SH kann in <i>Ralstonia eutropha</i> heterolog produziert werden .	54
3.3	Die thermostabile SH unterscheidet sich biochemisch von der <i>Re</i> SH.....	56
3.3.1	Temperatur- und pH-Optimum	56
3.3.2	Kinetische Parameter	58
3.3.3	O ₂ -Toleranz.....	59
3.3.4	Metall- und Kofaktor-Gehalt	60
3.3.5	Reaktivierungsverhalten	61
3.3.6	Langzeitstabilität; Ionenabhängigkeit.....	62
3.3.7	Phylogenetische Beziehung zu anderen löslichen [NiFe]-Hydrogenasen	64
3.3.8	Spektroskopische Eigenschaften der thermostabilen SH.....	64
3.3.9	Reduktion synthetischer Kofaktoren mithilfe der thermostabilen Hydrogenase	67
3.4	SH-Chimäre bestehend aus SH-Modulen verschiedener Organismen.....	69
3.4.1	Chimäre SH-Varianten können lithoautotrophes Wachstum von <i>R. eutropha</i> vermitteln.....	71
3.4.2	Immunologischer Nachweis der SH-Untereinheiten	74
3.4.3	Aktivitäten im löslichen Extrakt	76
3.4.4	Reinigung der SH-Chimären mittels Affinitätschromatographie.....	77
3.5	Umwandlung der NAD ⁺ -Bindestelle in <i>Re</i> HoxF zur Erhöhung der Spezifität für NADP ⁺	83
3.5.1	Die NAD(H)-Bindetasche in HoxF unterscheidet sich von der in NADP(H)-spezifischen Enzymen	84

3.5.2	Durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren in der NAD(H)-Bindetasche von HoxH lässt sich die Substratspezifität der SH verändern	86
3.5.3	Die SH-Varianten mit veränderter Substrataffinität vermitteln kein lithoautotrophes Wachstum des Wirtsstammes	88
3.5.4	Die NADP(H)-umsetzenden SH-Varianten sind auch in Gegenwart von O ₂ aktiv	90
3.5.5	Kinetische Parameter der SH-Varianten mit Veränderungen in der NAD(H)-Bindetasche.....	91
3.5.6	Die NADP ⁺ -spezifischen SH-Varianten können auf einer Elektrode adsorbiert werden und sind katalytisch aktiv	93
3.5.7	SH ^{E341A/S342R} als Teil NADPH-abhängiger Redoxenzym-Kaskaden	94
4	Diskussion	97
4.1	Charakterisierung der thermostabilen SH aus <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> TH-1T	97
4.1.1	Die <i>HtSH</i> katalysiert die H ₂ -abhängige NAD ⁺ -Reduktion kontinuierlich bei hohen Temperaturen	97
4.1.2	Die Sauerstofftoleranz der <i>HtSH</i>	101
4.1.3	Die Struktur der <i>HtSH</i>	104
4.1.4	Dissoziation von FMN aus der <i>HtSH</i> unter reduzierenden Bedingungen: Schutzmechanismus vor ROS-Bildung?	104
4.1.5	Mögliche Auswirkungen der Bindung von Glutamat an das Nickel im katalytischen Zentrum im oxidierten Zustand	107
4.2	Chimäre SHs zusammengesetzt aus den Modulen verschiedener Mikroorganismen... ..	110
4.2.1	Die Hyp-Maschinerie des Megaplasmids ermöglicht die Maturation und Produktion heterologer Hydrogenasen in <i>Ralstonia eutropha</i>	110
4.2.2	Die Hydrogenase-Module aus <i>Rhodococcus opacus</i> und <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> benötigen zweiwertigen Kationen für die H ₂ -Konversion	112
4.3	<i>ReSH</i> : Umwandlung der NAD ⁺ -Bindestelle in eine NADP ⁺ -Bindetasche	116
4.3.1	Das Substratspektrum der <i>ReSH</i> lässt sich durch den Austausch eines Glutamats und das Einfügen eines Arginins zugunsten von NADP ⁺ verschieben	116
4.3.2	Die synthetische NADP ⁺ -Reduktionsaktivität der neuen SH-Varianten ermöglicht eine H ₂ -getriebene Kofaktorregeneration.....	118
4.3.3	Ein veränderter Bias zugunsten der NAD(P)H-Oxidation könnte hilfreich für die SH-abhängige H ₂ -Produktion sein.....	121
5	Anhang	123
6	Literatur	128
7	Tabellenverzeichnis	144
8	Abbildungsverzeichnis	145

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
<i>Amp</i>	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren/Aminosäurereste
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AUT	Minimalmedium für autotrophe Anzucht
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Benzylviologen
CIP	Alkalische Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DFT	Diskrete Fourier-Transformation
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von x nm
EC	engl.: „ <i>Enzyme Commission numbers</i> “
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Elektronen-Paramagnetische-Resonanz
<i>et al.</i> ,	<i>et alteri</i> (und andere)
FCN	Ferricyanid

FDH	Formiat-Dehydrogenase
FGN	Fruktose-Glycerol-Minimalmedium
FMN	Flavinmononukleotid
FN	Fruktose-Minimalmedium
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
ICP-OES	engl.: „ <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> “; optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasma
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
<i>Km</i>	Kanamycin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LE	Löslicher Extrakt
MBH	engl.: „ <i>membrane bound hydrogenase</i> “; membrangebundene Hydrogenase
MCS	engl.: „ <i>multi cloning site</i> “
mol	$6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen
MV	Methylviologen
NAD ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl.: „ <i>polymerase chain reaction</i> “; Polymerase-Kettenreaktion
PDB	engl.: „ <i>protein data bank</i> “
PEG	Ployethylenglykol
pH	pH-Wert
pK _s	pK _s -Wert; negativer Logarithmus der Säurekonstante K _s

ppm	engl.: „ <i>parts per million</i> ” (10^{-6})
psi	engl.: „ <i>pounds per squareinch</i> “
QM/MM	Quantenmechanik/ Molekularmechanik
RH	engl.: „ <i>regulatory hydrogenase</i> “; Regulatorische Hydrogenase
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	engl.: „ <i>sodium dodecyl sulfate</i> “; Natriumdodecylsulfat
SH	engl.: „ <i>soluble hydrogenase</i> “; lösliche, NAD^+ -reduzierende Hydrogenase
SHE	engl.: „ <i>standard hydrogen electrode</i> “; Standardwasserstoffelektrode
<i>Tet</i>	Tetracyclin
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) [Einheit der Enzymaktivität]
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VE	voll entmineralisiert
WT	Wildtyp
$\cdot g$	Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Wasserstoff

Bereits Paracelsus dokumentierte im frühen 16. Jahrhundert bei dem Lösen von Eisen in Schwefelsäure die Entstehung von Gas. Auch Robert Boyle (1671) und später Henry Cavendish (1766) erzeugten durch das Experimentieren mit Metallen wie Eisen, Zink oder Zinn und Säure das entflammbare Gasgemisch, welches als „entzündbare Luft“ bekannt wurde. Antoine Laurent de Lavoisier zeigte 1783 schließlich, dass bei der Verbrennung von diesem Gas lediglich Wasser entsteht und nannte es fortan „*hydro-gen*“, aus dem Griechischen für „Wasser-formend“.

Dabei liefert die Oxidation von H_2 , die „Knallgasreaktion“, aufgrund der hohen Enthalpie etwa $-286 \text{ kJ pro mol } H_2O$. Dank des niedrigen Redoxpotentials $E^0(1/2 H_2/H^+) = -0,42 \text{ V}$ kann diese Energie in einer Vielzahl von Redoxsystemen genutzt werden und macht molekularen Wasserstoff zu einem attraktiven, emissionsfreien Energieträger.

Elementarer Wasserstoff ist das häufigste Element des Weltalls, jedoch auf der Erde nur mit etwa 1% am Aufbau der Erdkruste beteiligt und in seiner molekularen Form als H_2 zu etwa $5 \cdot 10^{-5} \text{ Vol.}\%$ in der Atmosphäre vorhanden (Paneth, 1937; Schmidt, 1974). Dennoch spielt er eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel einiger Mikroorganismen. Als Abfallprodukt kann er beim anaeroben Abbau von organischen Substanzen von fermentativen Mikroorganismen produziert werden, oder als Nebenprodukt der Stickstofffixierung (Evans *et al.*, 1987; Schubert & Evans, 1976) und der Phosphitoxidation (Yang & Metcalf, 2004) entstehen. Andere Mikroorganismen, häufig Methanogene, Azetogene oder Sulfatreduzenten, hingegen, können H_2 aufnehmen und die Energie der Spaltung für ihren anaeroben Stoffwechsel nutzen (Conrad, 1996). Die langjährige Annahme, der H_2 -Metabolismus beschränke sich auf überwiegend anaerobe Lebensräume wurde widerlegt und die Bedeutung des Wasserstoffs für das Überleben und Wachstum auch von bodenlebenden Bakterien betont (Greening *et al.*, 2014). Auch Organismen in aeroben Habitaten sind in der Lage, die dort vorhandenen geringen Mengen an H_2 in Anwesenheit von O_2 umzusetzen und werden daher auch als Knallgasbakterien bezeichnet (Conrad, 1996).

Trotz der unterschiedlichen Habitate und Stoffwechseltypen ist diesen Mikroorganismen ein zentrales Enzym gemein, die Hydrogenase.

1.2 Hydrogenasen

Hydrogenasen katalysieren die reversible Spaltung von Wasserstoff nach folgender Reaktionsgleichung:

$$H_2 \rightleftharpoons 2 e^- + 2 H^+ \quad (1)$$

Dabei erfolgt die H₂-Spaltung am bimetallicen aktiven Zentrum. Da die Hydrogenasen im Stoffwechsel der Mikroorganismen (über-)lebenswichtige Funktionen einnehmen und an wichtige Prozesse wie die Photosynthese und Atmungskette gekoppelt sind, ist ihre Funktionsfähigkeit und Stabilität entscheidend. Die häufig niedrige Wasserstoffkonzentration in der Umgebung hat im Laufe der Evolution auch Hydrogenasen mit besonders hoher Affinität entstehen lassen. Dabei werden niedrige K_M-Werte von etwa 10-70 nM für H₂ als Substrat angegeben (Constant *et al.*, 2010).

Insbesondere im Hinblick auf technische Anwendungen des regenerativen Energieträgers H₂ erscheinen Hydrogenasen demnach interessant. Die H₂-Spaltung oder -produktion mithilfe metallischer Katalysatoren erfolgt unter hohem Energie- und Kostenaufwand und im Falle des bei Brennstoffzellen häufig verwendeten Platins kann es zu Nebenreaktionen mit Verunreinigungen wie CO oder H₂S kommen, was zur Inaktivierung des Katalysators führt (Karyakin *et al.*, 2005; Tye *et al.*, 2005).

Die Selektivität und hohe Affinität der Hydrogenasen könnte diese Problematik umgehen und ermöglicht die Anwendung bei Umgebungstemperaturen.

1.3 Einteilung der Hydrogenasen anhand des aktiven Zentrums

Hydrogenasen, die die vollständige Umwandlung von H₂ katalysieren, können anhand der Zusammensetzung der Metallatome im aktiven Zentrum in zwei phylogenetisch nicht verwandte Hauptklassen der Hydrogenasen unterschieden werden (Vignais & Billoud, 2007). Die phylogenetisch größere und vielfältigere Klasse wird von den [NiFe]-Hydrogenasen gebildet. Die Kristallstruktur des Kernmoduls konnte u. a. aus *Desulfovibrio*-Spezies, aus *Allochromatium vinosum*, *Escherichia coli* und *Ralstonia eutropha* aufgeklärt werden (Volbeda *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1997; Matias *et al.*, 2001; Stadler *et al.*, 2002; Volbeda *et al.*, 2005; Fritsch *et al.*, 2011; Schäfer *et al.*, 2013).

Die Hydrogenase wird hierbei von zwei unterschiedlich großen Untereinheiten gebildet (**Abbildung 1**). Die große Untereinheit ist etwa 60 kDa schwer und beinhaltet das aktive

Zentrum, das sich aus je einem Nickel- und einem Eisenatom zusammensetzt. Die kleinere Untereinheit ist etwa 30 kDa schwer und beinhaltet die für den Elektronentransport wichtigen [FeS]-Zentren. Über eine große Kontaktfläche können diese Untereinheiten stark interagieren und formen somit ein globuläres heterodimeres Protein mit einem tief im Inneren liegenden aktiven Zentrum. Das Nickelatom wird durch vier Thiolgruppen von Cysteinen des Proteinrückgrates koordiniert. Die Koordination des Fe-Atoms erfolgt durch zwei dieser Cysteine und zusätzliche Liganden. Durch Infrarotspektroskopie konnte die Identität dieser Liganden weitestgehend aufgeklärt werden (Happe *et al.*, 1997; Pierik *et al.*, 1999). Es handelt sich demnach um zwei CN⁻- sowie eine CO-Gruppe. Im oxidierten Zustand ergänzt eine Sauerstoffspezies diese Liganden und wirkt wie zwei der Cysteine als Brückenligand zwischen dem Nickel- und dem Eisenatom (Ogata *et al.*, 2005; Volbeda *et al.*, 2005, 2015).

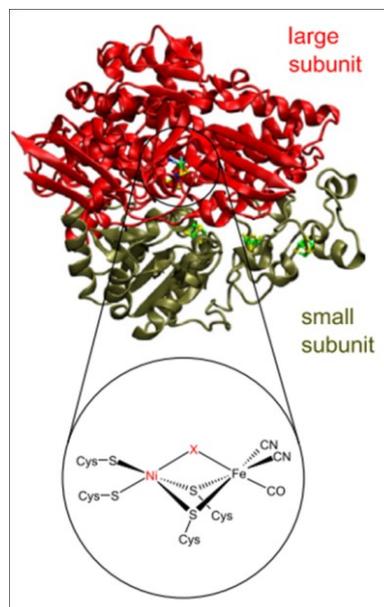


Abbildung 1. Struktur der sogenannten Standard-[NiFe]-Hydrogenase bestehend aus einer großen (rot; engl.: „*large subunit*“) und kleinen (grün, engl.: „*small subunit*“) Untereinheit nach M. Horch *et al.* (2010). X stellt einen austauschbaren Brückenliganden dar. Die hellgrünen Moleküle repräsentieren [FeS]-Cluster.

Obwohl die Reaktion in beide Richtungen katalysiert werden kann, überwiegt bei den [NiFe]-Hydrogenasen die H₂-Oxidation.

Hydrogenasen, deren aktives Zentrum aus zwei Eisenatomen gebildet wird, werden der [FeFe]-Klasse zugeordnet. Vorrangig sind sie in H₂-produzierenden Mikroorganismen zu finden. Das aktive Zentrum wird dabei als „*H-cluster*“ bezeichnet (Peters *et al.*, 1998). Es besteht aus dem binukleären [FeFe]-Zentrum, das über die Thiolgruppe eines Cysteinrestes an einen [4Fe4S]-Cluster gebunden ist. Auch hier sind weitere Ligandengruppen, CN- und CO, an der Koordination des [FeFe]-Zentrums beteiligt (Garcin *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 1999).

In allen Hydrogenasen ermöglichen hydrophobe Gaskanäle die Diffusion der H₂-Moleküle zum aktiven Zentrum (Volbeda *et al.*, 1995; Montet *et al.*, 1997; Nicolet *et al.*, 1999, 2001; Hiromoto *et al.*, 2009; Kalms *et al.*, 2016). Durch diese Kanäle können jedoch auch andere kleine Gasmoleküle, wie O₂ oder CO, zum aktiven Zentrum gelangen. Während die Reaktion des O₂ mit dem aktiven Zentrum bei [FeFe]-Hydrogenasen zur irreversiblen Zerstörung des „H-Clusters“ führt (De Lacey *et al.*, 2007; Goldet *et al.*, 2009), werden [NiFe]-Hydrogenasen durch O₂-Anwesenheit lediglich reversibel inaktiviert. Eine kleine Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen ist sogar in der Lage, in der Anwesenheit von Sauerstoff die Wasserstoffumwandlung zu katalysieren. Daher werden sie auch als „sauerstofftolerant“ bezeichnet (Burgdorf *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2005; Goldet *et al.*, 2008; Lenz *et al.*, 2010; Krassen *et al.*, 2011; Fritsch *et al.*, 2013).

1.4 [NiFe]-Hydrogenasen

Anhand von Sequenzvergleichen, der Genomorganisation und der physiologischen Funktion ist eine weitere Einteilung der [NiFe]-Hydrogenasen möglich (Greening *et al.*, 2016; Vignais & Billoud, 2007). Dabei lassen sich die folgenden vier Gruppen unterscheiden: Die erste Gruppe umfasst membrangebundene Hydrogenasen, die zumeist der H₂-Aufnahme dienen und die Elektronen aus der H₂-Oxidation für die Reduktion von Chinonen in der Atmungskette verwenden.

In der zweiten Gruppe werden Hydrogenasen zusammengefasst, die nicht über ein Signalpeptid an der kleinen Untereinheit verfügen und daher im Cytosol lokalisiert sind. Bei dieser Gruppe handelt es sich um Hydrogenasen aus Cyanobakterien sowie Hydrogenasen, die als H₂-Sensoren fungieren (Tamagnini *et al.*, 2007). Letztere wirken in Abhängigkeit der H₂-Konzentration regulatorisch auf die Biosynthese von Hydrogenasen zur H₂-Aufnahme (Lenz *et al.*, 2002).

Die Hydrogenasen der dritten Gruppe befinden sich ebenfalls im Cytoplasma. Jedoch sind im Gegensatz zu den vorherigen Gruppen weitere Untereinheiten an das Hydrogenase-Modul assoziiert. Diese Untereinheiten ermöglichen die Bindung und reversible Reduktion von löslichen Kofaktoren, wie F₄₂₀ (8-hydroxy-5-deazaflavin) (Kulkarni *et al.*, 2009; Mills *et al.*, 2013), NAD⁺ (Burgdorf, van der Linden, *et al.*, 2005; Houchins & Burris, 1981; Rákhely *et al.*, 2004) oder NADP⁺ (Ma *et al.*, 1993; Kanai *et al.*, 2011; Greening *et al.*, 2014). Aufgrund der reversiblen Katalyse der H₂-Spaltung werden sie auch als bidirektionale Hydrogenasen

bezeichnet. Der vierten Gruppen werden multimere, membranständige Hydrogenasen zugeordnet, die überschüssige Reduktionsäquivalente über H₂-Produktion abführen.

Die außergewöhnlich hohe H₂-Affinität, die für verschiedene Aktinobakterien gefunden wurde, veranlasste zu tiefergehenden Untersuchungen und Vergleichen der dafür verantwortlichen Gensequenzen (Constant *et al.*, 2010). Diese führten zur Identifizierung einer Klasse von [NiFe]-Hydrogenasen, die sich durch außergewöhnlich hohe H₂-Affinität auszeichnen. Charakteristisch sind zwei konservierte Konsensussequenzen, L1 und L2, die sich in der großen Untereinheit dieser Hydrogenasegruppe befinden und Cysteine für die Koordination der H₂-bindenden Metalle enthalten (Constant *et al.*, 2011; Vignais & Billoud, 2007). Vorerst wurden sie als eigene, fünfte Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen postuliert, die aktuell aber der Gruppe 1 untergeordnet werden (Greening *et al.*, 2016).

1.5 Katalytischer Mechanismus der [NiFe]-Hydrogenasen

[NiFe]-Hydrogenasen sind aus mindestens zwei Untereinheiten aufgebaut; einer großen Untereinheit mit dem katalytischen Nickel-Eisen-Zentrum, an dem die H₂-Spaltung erfolgt, und einer kleineren Untereinheit, die Kofaktoren zur Weiterleitung der Elektronen beinhaltet. Dabei wird das [NiFe]-Zentrum von anorganischen Liganden wie CN⁻ und CO koordiniert (Happe *et al.*, 1997; Volbeda *et al.*, 2005). Die Anwesenheit und die Redoxzustände der metallhaltigen Kofaktoren in den [NiFe]-Hydrogenasen lassen sich gut mithilfe spektroskopischer Methoden untersuchen, so dass bereits Einsichten in den Mechanismus der H₂-Katalyse gewonnen werden konnten. Mit der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) lassen sich die CO- und CN⁻-Bindungen der koordinierenden Ligandenmoleküle nach Absorption von Infrarotlicht untersuchen. Die Absorption führt zur Schwingung der Bindungen, deren Frequenzen abhängig von den beteiligten Atomen und ihrer Masse, sowie der Bindungsstärke sind. Somit gibt das Spektrum Auskunft über die Identität der Liganden. Da die Bindungsstärke auch von den umgebenden Atomen beeinflusst wird, können die Schwingungsmodi auch Informationen zum Zustand der Metalle im aktiven Zentrum liefern. Freie, ungepaarte Elektronen, wie sie z.B. in reduzierten [4Fe4S]- und [2Fe2]-Zentren sowie in Ni⁺³⁺ auftreten, können mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR, engl.: „*electron paramagnetic resonance*“) detektiert werden.

Bei der Wasserstoffumsetzung am aktiven Zentrum einer „Standard“-Hydrogenase (1.3; **Abbildung 1**; Volbeda *et al.*, 1995) verbleibt das Eisenatom in einer Fe(II)-, „*low-spin*“-Konfiguration, während das Nickelatom redoxaktiv ist (Armstrong & Fontecilla-Camps,

2008). Nähere Untersuchungen dieser Redoxzustände wurden u.a. von Albracht *et al.* durchgeführt und vermittelten Einsicht in den Katalysemechanismus (Albracht *et al.*, 1984; Albracht *et al.*, 1982; Cammack *et al.*, 1982; Horch *et al.*, 2011; Lacey *et al.*, 1997; LeGall *et al.*, 1982). Bereits 1982 zeigten Albracht *et al.* mithilfe der EPR-Spektroskopie, dass das Nickel der Hydrogenase reversibel paramagnetische, detektierbare Redoxzustände (EPR-aktiv) aufweist (Albracht *et al.*, 1982). Diese wurden als Ni-A, Ni-B, Ni-C und Ni-L bezeichnet (Albracht, 1994; Lubitz *et al.*, 2007). Die EPR-inaktiven Zustände des aktiven Zentrums wurden später durch Messung mittels FTIR (Fourier-Transform-Infrarot)-Spektrometrie genauer untersucht (Happe *et al.*, 1997). Dabei zeigten sich anhand der Streckenschwingungen der anorganischen CN⁻- und CO-Liganden verschiedene Redoxzustände. Die beiden EPR-aktiven Zustände Ni-A und Ni-B stellen oxidierte, reversibel inaktive Zustände dar (**Abbildung 2**). Sie unterscheiden sich in der Kinetik, mit der sie reaktiviert werden können (Fernandez *et al.*, 1985; Kurkin *et al.*, 2004). Während Ni-B (auch Ni_r-B mit „r“ für „ready“) in der Gegenwart von Wasserstoff schnell (re-) aktiviert werden kann (< 1 min), benötigt die Aktivierung von Ni-A (auch Ni_u-A mit „u“ für „unready“) weit mehr Zeit (> ~1 h). Dieses Verhalten wird auf unterschiedliche, sauerstoffmodifizierte Strukturen des aktiven Zentrums zurückgeführt. Im Fall von Ni-B befindet sich eine OH-Gruppe zwischen den beiden Metallatomen, bei Ni-A handelt es sich eventuell um eine Peroxidspezies (Pandelia *et al.*, 2010; Shafaat *et al.*, 2013). Die Reduktion der beiden Zustände mit jeweils einem Elektron führt zu den EPR-inaktiven Varianten Ni_r-S und Ni_u-S, in denen Nickel nun die Oxidationsstufe (+II) hat. Auch diese Zustände sind nicht katalytisch aktiv. Erst durch die Freisetzung eines Wasser-Moleküls wird Ni_r-S aktiviert und in den Ni_a-S-Zustand („a“ für „active“) überführt. Die weitere Reduktion des Ni_a-S mit einem Elektron führt jedoch zum Ni_a-C-Zustand, der als Brückenligand ein Hydridion enthält. Dieses Intermediat ist in „Standard“-Hydrogenasen zentral an der Wasserstoffumwandlung beteiligt. Bei sehr niedrigen Temperaturen und unter Bestrahlung mit weißem Licht dissoziiert das Hydridion aus der Brückenposition und führt so zu dem EPR-aktiven Ni-L-Zustand. Ni_a-C kann jedoch auch unter der Aufnahme eines Elektrons weiter reduziert werden. Dieser Zustand wird als Ni-R bezeichnet und enthält ebenfalls ein Hydridion in der Brückenposition (Lubitz *et al.*, 2014).

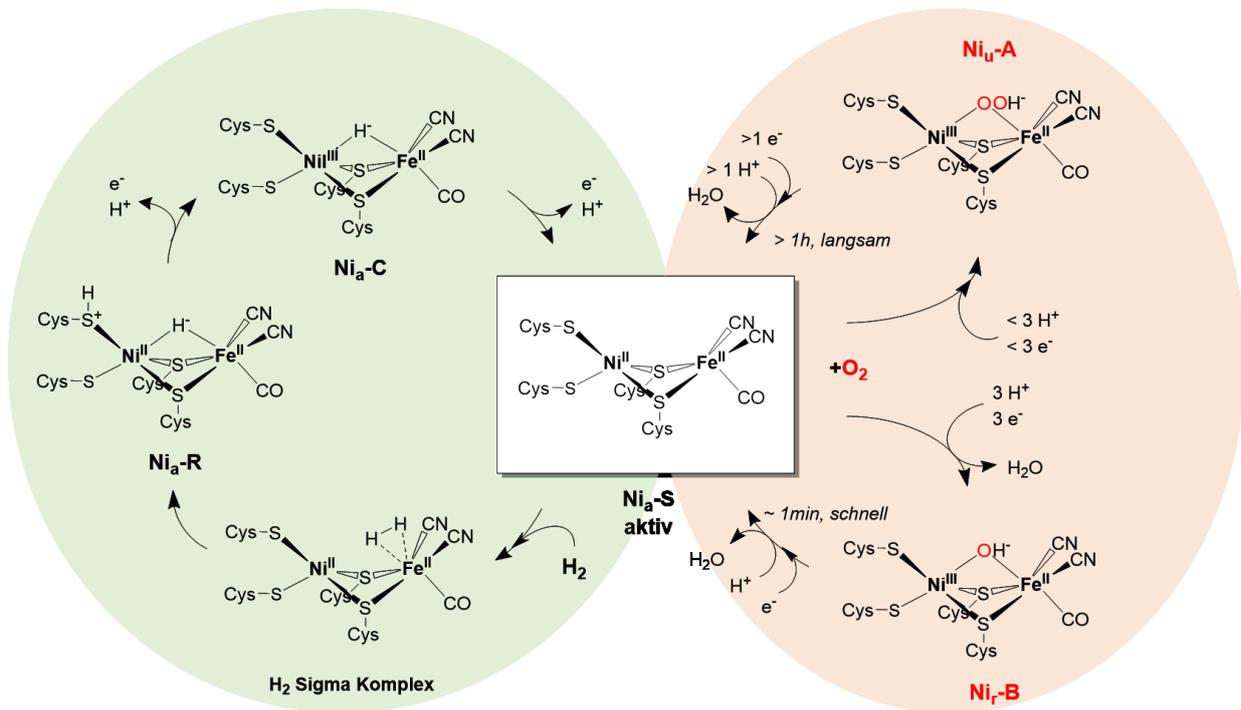


Abbildung 2. Schema des allgemeinen katalytischen Zyklus von [NiFe]-Hydrogenasen für die Umwandlung von H_2 (linke Seite) sowie die oxidative Inaktivierung des aktiven Zentrums (rechte Seite). Ausgehend von $\text{Ni}_a\text{-S}$ werden abhängig von der Verfügbarkeit an Elektronen die inaktiven Ni^{III} -Zustände $\text{Ni}_r\text{-B}$ und $\text{Ni}_u\text{-A}$ gebildet. Während $\text{Ni}_r\text{-B}$ schnell reaktiviert werden kann, erfordert die Reaktivierung von $\text{Ni}_u\text{-A}$ mehr Zeit. Die Identität des Brückenliganden in $\text{Ni}_u\text{-A}$ ist noch nicht eindeutig geklärt; es handelt sich sehr wahrscheinlich um OOH^- oder OH^- Molekül. Die Abbildung wurde basierend auf den von Siegbahn *et al.* (2007) und Armstrong *et al.* (2009) publizierten Mechanismen erstellt.

1.6 Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* H16

Wasserstoff ist in seiner molekularen Form nur in geringen Mengen in der Atmosphäre vorhanden. Zwar wird H_2 auch natürlicherweise durch Mikroorganismen produziert, geschieht dies jedoch größtenteils im anaeroben Milieu, in dem er schnell von Archaeen, Azetogenen, Sulfatreduzierern und anderen anaeroben Organismen wieder verbraucht wird (Burgdorf *et al.*, 2005). So gelangt nur wenig H_2 in aerobe Lebensräume, in denen *Ralstonia eutropha* offenbar besonders gut an die knappe und stark schwankende H_2 -Verfügbarkeit sowie die O_2 -Anwesenheit angepasst erscheint. Aufgrund der Eigenschaft, aus explosiven $\text{H}_2\text{-O}_2$ -Gasmischungen seinen Energiehaushalt zu bestreiten, wird *R. eutropha* auch als „Knallgasbakterium“ bezeichnet (Wilde, 1962). Die Nutzung von H_2 als einziger Energiequelle wird durch vier unterschiedliche, sauerstofftolerante [NiFe]-Hydrogenasen (Abbildung 3)

ermöglicht, die sämtlich auf einem Megaplasmid, genannt pHG1, kodiert sind (Kortlüke *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 2003; Tran-Betcke *et al.*, 1990).

Die membranständige Hydrogenase (MBH) ist in die Cytoplasmamembran integriert, wobei das katalytische Zentrum ins Periplasma ragt. Sie überträgt Elektronen aus der H₂-Spaltung auf Cytochrome der Atmungskette (Bernhard *et al.*, 1997; Kortlüke *et al.*, 1992; Schink & Schlegel, 1978). Zugeordnet wird sie der Gruppe 1 der [NiFe]-Hydrogenasen.

Bei der löslichen, NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase („*soluble hydrogenase*“, SH), die im Cytoplasma der Zelle lokalisiert ist, werden die freiwerdenden Elektronen der H₂-Spaltung direkt auf NAD⁺ übertragen. Sie gehört somit zur Gruppe 3 der bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenasen.

Die regulatorische Hydrogenase (RH) reguliert die Expression der Hydrogenase-Gene in Abhängigkeit von der H₂-Konzentration. Sie beeinflusst dabei den Phosphorylierungsgrad einer Histidin-Protein-Kinase, die wiederum mittels Phosphorylierung/Dephosphorylierung die Aktivität eines Response-Regulators steuert (Lenz *et al.*, 2002). Die RH übt somit eine sensorische Funktion aus und ist daher nur indirekt an der Energiegewinnung durch Wasserstoffspaltung beteiligt. Das Gen für die Histidinkinase weist in dem Wildtypstamm *R. eutropha* H16 eine Punktmutation auf, die die Hydrogenasegenexpression unabhängig von der Anwesenheit von H₂ macht (Lenz & Friedrich 1998). Während Hydrogenasegenexpression bei Wachstum auf bevorzugten Energie- und Kohlenstoffquellen wie Pyruvat, Succinat oder Fruktose unterdrückt wird, erfolgt bei Wachstum auf schlechter verwertbaren Substraten wie Glycerin eine starke Synthese der Hydrogenasen (Friedrich *et al.*, 1981; Friedrich *et al.*, 1982). Eine vierte Hydrogenase (*Actinomyceten* Hydrogenase, AH), die Ähnlichkeit zu den in Aktinobakterien verbreiteten Hydrogenasen hat, wurde zunächst Gruppe 5 der [NiFe]-Hydrogenasen zugeordnet (Constant *et al.*, 2010; Schäfer *et al.*, 2013).

Hydrogenasen gefunden wird, sondern um ein [4Fe3S]-Zentrum, das durch insgesamt sechs Cysteinreste im Proteinerückgrat verankert ist. In Abhängigkeit vom Redoxzustand ändert sich die Struktur und Koordination dieses Clusters. Dadurch kann der proximale Cluster insgesamt drei verschiedene Redoxzustände unter physiologischen Bedingungen einnehmen und so zwei Elektronen gleichzeitig lagern und übertragen, was ihn von konventionellen [FeS]-Clustern unterscheidet, die lediglich ein Elektron tragen können. Bindet O₂ an das aktive Zentrum, können diese Elektronen zusammen mit je einem Elektron des Ni^{II}-Ions und des medialen [3Fe4S]⁰-Clusters zur vollständigen Reduktion des O₂ zu H₂O genutzt werden und verhindern so die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Cracknell *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2013; Goris *et al.*, 2011). Zur Ableitung der entstehenden Wassermoleküle besitzt die MBH Hohlräume, die in sauerstoffempfindlichen Hydrogenasen fehlen (Fritsch *et al.*, 2011).

Für die SH konnte erstmals experimentell gezeigt werden, dass sie neben Hydrogenase- auch Oxidase-Aktivität zeigt (Lauterbach & Lenz, 2013; Schneider & Schlegel, 1981). Sauerstoff wird katalytisch unter intermediärer Bildung von Cysteinsulfenaten entgiftet (Horch *et al.*, 2015; Lauterbach & Lenz, 2013). Die Hauptprodukte der SH-vermittelten Oxidase-Aktivität sind Wasserstoffperoxid und Wasser (Lauterbach & Lenz, 2013). Ein Vergleich der Umsatzraten für H₂ und O₂ ergab, dass in der Anwesenheit von 40% O₂ - bis zu 3% der durch H₂-Oxidation erzeugten Elektronen als "Schutz" dienen und für die O₂-Reduktion wiederverwendet werden (Lauterbach & Lenz, 2013).

1.8 Die NAD⁺-reduzierende Hydrogenase aus *R. eutropha* H16

In der Zelle sorgt die NAD⁺-reduzierende Hydrogenase (SH, EC 1.12.1.2) aus *R. eutropha* H16 für die Übertragung der Elektronen aus der H₂-Oxidation auf NAD⁺ und sorgt damit für Reduktionsäquivalente, die u.a. dem Aufbau der protonenmotorischen Kraft dienen (Cramm, 2009). Herrscht dagegen ein Überfluss an Energie in Form von reduzierten Kofaktoren, kann die SH diese durch die Rückreaktion, nämlich der NADH-abhängigen Reduktion von H⁺ zu H₂ abführen (Kuhn *et al.*, 1984). Die SH gehört zu den sogenannten bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 3d (Schneider & Schlegel, 1981; Burgdorf *et al.*, 2005). Die SH ist ein ca. 208 kDa großes Heterohexamer, das aus zwei Funktionsmodulen aufgebaut ist. Während das Heterodimer, HoxHY, das Hydrogenase-Modul bildet, welches sowohl H₂-Spaltung als auch –Bildung katalysiert, ist das Heterodimer aus den Untereinheiten HoxF und HoxU für die reversible Reduktion des NAD⁺ zuständig. Daher wird letzteres auch als NAD⁺-

Reduktasemodul bezeichnet, an das zusätzlich noch zwei HoxI-Proteineinheiten assoziiert sind (**Abbildung 3**).

Die heterotetramere SH weist große Ähnlichkeiten zu mitochondrialem und bakteriellen Proteinen des Komplex I auf, die schon früh Indizien für die Anwesenheit von [FeS]-, FMN-Kofaktoren und Pyridinnukleotid-Bindestelle lieferten (Albracht & Hedderich, 2000; Albracht, 1993; Albracht *et al.*, 2003; Sazanov, 2006). Das Diaphorase-Modul weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Untereinheiten Nqo1, Nqo2 und Nqo3 des respiratorischen Komplex 1 auf.

Die H₂-Spaltung findet am [NiFe]-Zentrum des Hydrogenase-Moduls statt. Danach werden die zwei Elektronen einzeln über eine Serie von [FeS]-Clustern und Flavinen zu der NAD⁺-Bindestelle in der HoxF-Untereinheit geleitet. Dort erfolgt anschließend die Übertragung eines Hydrids auf NAD⁺. Bei dieser FMN-haltigen Bindestelle handelt es sich um eine besondere Struktur, auch *Rossmannfalte* genannt. Diese unterscheidet sich in einigen Schleifen und kurzen α -Helix-Teilbereichen von der in Nqo1.

Eine Elektronenübertragung auf die phosphorylierte Version von NAD⁺, NADP⁺, konnte bisher nicht experimentell nachgewiesen werden. Es wurde jedoch vermutet, dass eine Bindung des reduzierten Kofaktors NADPH an HoxI, zur reduktiven Reaktivierung oxidierter SH führen könnte (Burgdorf *et al.*, 2005).

Die Sequenzähnlichkeit des NAD⁺-Reduktasemoduls der SH und der Nqo1-Untereinheit aus Komplex I (Albracht & Hedderich, 2000) sowie spektroskopische Messungen am entsprechenden NAD⁺-Reduktasemodul aus dem Streptomyceten *R. opacus* (Schneider *et al.*, 1984) identifizieren einen der Flavinmononukleotide als Bestandteil der HoxF Untereinheit, der als FMN-b bezeichnet wird.

In Komplex I wirkt er analog zur Funktion in der SH somit als Verbindung zwischen ein-Elektronen-Zentren, Fe-S-Cluster, und zwei-Elektronen-Zentren, NADH (Berrisford & Sazanov, 2009). Bei dem FMN-a, das sich in der HoxY-Untereinheit befindet, wird vermutet, dass es als Elektronenspeicherung dient, für die „Entgiftung“ von O₂ zu Wasser (Lauterbach & Lenz, 2013).

Neben NAD⁺ akzeptiert die SH auch andere Elektronenakzeptoren und -donoren als Substrat. Sie kann auch mit Methylviologen (MV), Benzylviologen (BV), Ferricyanid (FCN), Methylenblau, Phenazinmethosulfat (PMS), Flavomononukleotid (FMN), Cytochrom *c* oder mit Sauerstoff reagieren (Schneider & Schlegel, 1976). Diese Eigenschaft ermöglicht es, die Teilreaktionen der beiden SH-Module getrennt voneinander zu untersuchen. So kann z.B. die Wasserstoffproduktion durch das Hydrogenase-Modul unter Zugabe von reduziertem MV

nachverfolgt werden. Die Teilreaktion des NAD⁺-Reduktasemoduls lässt sich durch die NADH-abhängige Reduktion von BV nachweisen (Lauterbach *et al.*, 2011).

Bei EPR-Untersuchungen zur Aufklärung des katalytischen Mechanismus am [NiFe]-Zentrum der SH konnten zunächst keine oder nur kaum Nickel (+III)-Signale detektiert werden (Schneider *et al.*, 1979; Schneider *et al.*, 1984; Zaborosch *et al.*, 1995; Serebryakova *et al.*, 1996; Happe *et al.*, 2000; van der Linden *et al.*, 2006; Germer *et al.*, 2009). In „Standard“-Hydrogenasen befindet sich das katalytisch aktive Nickelatom jedoch in dieser Oxidationsstufe. Während IR-Messungen treten zwei zusätzliche Absorptionssignale auf, die CN⁻-Liganden zugeordnet wurden. Anhand der Vermutung, dass zusätzliche CN⁻-Gruppen an der Koordination des aktiven Zentrums beteiligt sind, wurde ein alternativer katalytischer Zyklus postuliert, bei dem das Nickel in der Oxidationsstufe (+II) verbleibt. In späteren Studien in ganzen Zellen wurde der paramagnetische Ni_a-C-Zustand und weitere Redoxzustände, die Ähnlichkeiten mit denen in „Standard“-Hydrogenasen haben, nachgewiesen (Horch *et al.*, 2011; Horch *et al.*, 2010). Dies demonstriert, dass die Beteiligung zusätzlicher CN-Gruppen ausgeschlossen werden kann und das [NiFe]-Zentrum der SH eine starke Ähnlichkeit zu anderen [NiFe]-Hydrogenasen aufweist, bei denen ein CO- und nur zwei CN⁻-Liganden das aktive Zentrum koordinieren (Horch *et al.*, 2011; Horch *et al.*, 2010).

1.9 Andere lösliche, bidirektionale [NiFe]-Hydrogenasen

Neben *Ralstonia eutropha* H16 gibt es viele weitere Bakterien, die die Energie der H₂-Oxidation zum Wachstum nutzen können. Die Organismen dieser physiologischen Gruppe der „Knallgasbakterien“ sind phylogenetisch nicht verwandt, und so finden sich Vertreter in grampositiven, gramnegativen Bakterien und auch in Archaeen (Rosenberg *et al.*, 2013). In den meisten Fällen besitzen diese Organismen mindestens eine membranständige Hydrogenase (Grzeszik *et al.*, 1997). Eine besondere Ausnahme ist das grampositive Bakterium *Rhodococcus opacus* MR11 (ehemals *Nocardia opaca* 1b), welches nur über eine cytoplasmatische, NAD⁺-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase verfügt. Die Untereinheiten HoxF, HoxU, HoxH und HoxY, die auf dem Megaplasmid pHG201 kodiert werden, weisen eine hohe Ähnlichkeit zu den entsprechenden Proteinen in *R. eutropha* auf (Zaborosch *et al.*, 1989). Dennoch unterscheidet sich die SH aus *R. opacus* deutlich in ihren biochemischen Eigenschaften (Schneider *et al.*, 1984). In der Abwesenheit von Nickel- oder Magnesiumionen, bei niedriger Ionenstärke oder in basischen pH-Werten dissoziiert die heterotetramere RoSH in

die zwei Module HoxFU und HoxHY. Daneben wirken die zweiwertigen Ionen Ni^{2+} oder Mg^{2+} stimulierend auf die H_2 -abhängige Reduktionsaktivität von NAD^+ , ein Effekt, der bei der *ReSH* nicht zu beobachten ist (Schneider *et al.*, 1984). Da die Produktion der SH in *R. opacus* auf lithoautotrophe Bedingungen beschränkt ist, wurden die Gene *hoxFUHY* sowie das Gen der spezifischen Endopeptidase HoxW unter Kontrolle des *ReSH*-Promotors gestellt und konnten in *R. eutropha* heterolog exprimiert werden (Porthun *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 1998). Das *hoxI* Gen liegt bei *R. opacus* nur als verkürztes 5'-Fragment vor (Grzeszik *et al.*, 1997).

Andere bidirektionale, cytoplasmatische [NiFe]-Hydrogenasen finden sich auch in Cyanobakterien wie *Anabeana variabilis* ATC 29413 (Schmitz *et al.*, 1995; Serebryakova *et al.*, 1996) und *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Appel *et al.*, 2000; McIntosh *et al.*, 2011), wo sie vermutlich als ein Ventil zur Ableitung überschüssiger Energie unter anaeroben Bedingungen in Form von H_2 wirken. Die cyanobakteriellen Hydrogenasen weisen eine zusätzliche Untereinheit HoxE auf, die homolog zu NuoE des Komplex I ist, ein [2Fe2S]-Zentrum beinhaltet und an HoxFU bindet (Schmitz *et al.*, 2002). Möglicherweise ist HoxE an Membran-Interaktionen oder einer elektronenleitenden Verbindung zwischen HoxFU und HoxHY beteiligt (Tamagnini *et al.*, 2007).

Auch im hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* (Ma *et al.*, 1993, 2000) und *Thermococcus litoralis* (Rákhely *et al.*, 1999) konnten lösliche, bidirektionale [NiFe]-Hydrogenasen identifiziert werden. Sie sind aus den vier Untereinheiten HydA, HydD, HydB und HydG aufgebaut und verwenden NADPH sowie ein gebundenens Molekül FAD als Elektronenmediatoren. Besonders ihre Thermostabilität macht sie attraktiv für biotechnologische Anwendungen.

Sowohl für strukturelle und biochemische Untersuchungen der löslichen, bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenasen sowie deren potentielle Anwendung ist eine effiziente Produktion im größeren Maßstab erstrebenswert. Der komplexe Reifungsprozess des aktiven Zentrums, die Anwesenheit der [FeS]- und Pyridinnukleotid-Kofaktoren und die strenge Genregulation erschweren jedoch die Übertragung in heterologe Über-Expressionssysteme. Die SH aus *R. eutropha* sowie die *Pyrococcus furiosus*-SH konnten zwar in *E.coli* exprimiert werden (Schiffels *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2010), waren jedoch mit Einbußen der Aktivität bzw. Thermostabilität verbunden.

1.10 Kofaktorregeneration

Da Enzyme hochselektiv und -aktiv viele verschiedene Reaktionen katalysieren können, sind chemische Firmen zunehmend daran interessiert, sie als Biokatalysatoren bei der industriellen Synthese von Feinchemikalien einzusetzen. Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen auch unter milden Reaktionsbedingungen und weisen eine hohe Substrat-, Stereo- und Regiospezifität auf, die insbesondere bei der Herstellung von pharmazeutischen Grundstoffen erforderlich ist.

Sie sind zum Beispiel von der Synthese von Steroidhormonen oder Penicillinantibiotika, Aminosäuren (L-Glutaminsäure, L-Lysin), Carbonsäuren (L-Milchsäure, L-Zitronensäure), Vitaminen (Vitamin B₂, Vitamin C) und Alkoholen nicht mehr wegzudenken.

Den Hauptanteil der dabei verwendeten Enzyme stellen die Klassen der Hydrolasen sowie die Oxidoreduktasen. Als Beispiele der Oxidoreduktasen finden verschiedene Dehydrogenasen, Oxidasen oder Reduktasen häufige Anwendung bei der Katalyse von reduktiven Aminierungen, Hydrierungen von Ketonen und Reduktionen von Kohlenstoffdoppelbindungen. Diese Reaktionen sind wichtige Bestandteile bei der industriellen Herstellung von optisch reinen Aminosäuren wie z.B. *L-tert*-Leucin (Hall & Bommarius, 2011) oder der Synthese von Statinen wie z.B. Ethyl-4-(S)-Chlor-3-Hydroxybutyrat (Kataoka *et al.*, 1997).

Für die Aktivität der meisten Oxidoreduktasen sind jedoch „freie“ Kofaktoren, die Elektronen aufnehmen können und nur locker an das Enzym binden, essentiell. Bei diesen Kofaktoren handelt es sich meist um NAD(H) und NADP(H), deren stöchiometrische Zugabe bei industriellen Synthesen allerdings aufgrund ihrer geringen Stabilität und hoher Kosten nicht wirtschaftlich ist (van der Donk & Zhao, 2003). Daher wurden Methoden entwickelt, die die Regeneration der „verbrauchten“ Kofaktoren *in-situ* ermöglichen (Chenault & Whitesides, 1987; Chenault *et al.*, 1988).

Die Regeneration kann nach verschiedenen Strategien erfolgen, die in vier Gruppen eingeteilt werden. Neben der chemischen, elektrochemischen und photochemischen Erneuerung der Kofaktoren, ist auch die enzymatische Regeneration möglich. Bei letzterer werden die Kofaktoren entweder durch das gleiche Enzym, das auch die produktbildende Reaktion katalysiert, wieder oxidiert bzw. reduziert. Oder aber es wird ein zweites Enzym an die produktbildende Reaktion gekoppelt. Ein Beispiel ist die Regeneration von NADH mithilfe der Formiatdehydrogenase (FDH; EC 1.2.1.2) aus *Candida boidinii* (Vasič-Racki *et al.*, 1989). Der

große Vorteil dieser Dehydrogenase ist die Verwendung des preisgünstigen Reduktionsmittel Formiat zur Reduktion von NAD^+ . Da als Produkt gasförmiges CO_2 entsteht, wird die Reaktion in Richtung der Kofaktorregeneration verschoben und die Reinigung des gewünschten Produktes erleichtert. Die FDH weist jedoch nur eine geringe spezifische Aktivität von $6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ für die NADH-Bildung und eine geringe Stabilität in organischen Lösungsmitteln auf (Slusarczyk *et al.*, 2000; V. Tishkov & Popov, 2006). Durch gezielten Austausch von Cysteinresten der FDH konnten jedoch deutliche Verbesserungen der Stabilität erreicht werden.

Neben der FDH werden auch Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) zur Regeneration der reduzierten Kofaktoren eingesetzt (Weckbecker *et al.*, 2010). Dabei oxidieren sie gleichzeitig Alkohole zu Ketonen. Für die Regeneration der Kofaktoren wird häufig Isopropanol als Reduktionsmittel eingesetzt. Das entstehende Aceton wird durch Pervaporation abgetrennt. Es gibt zwei Klassen der ADH, die sich anhand des Substratspektrums unterscheiden. ADH der EC-Gruppe 1.1.1.1 sind NAD^+ -abhängig, die der EC-Gruppe 1.1.1.2 verwenden NADP^+ . ADH aus *Lactobacillus kefir* und *L. brevis* weisen besonders hohe spezifische Aktivität für NADP^+ -Reduktion auf ($100\text{-}500 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Ebenfalls häufig zur Kofaktorregeneration wird die Glukose-Dehydrogenase (GDH; EC 1.1.1.47) verwendet, da sie das kostengünstige Substrat Glukose verwendet und eine hohe spezifische Aktivität von bis zu $550 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ aufweist (Hall & Bommarius, 2011). Die Glukose wird dabei zu Glukonolakton umgesetzt, das spontan zu Glukonsäure hydrolysiert und so die Kofaktorreduktion begünstigt. Die Glukonsäure muss jedoch aus dem Reaktionsansatz entfernt werden und erschwert somit die Produktreinigung.

1.11 Wasserstoffgetriebene Kofaktorregeneration

Wasserstoff, das Substrat der SH, ist ein preiswerter Energieträger der Zukunft und bei der Spaltung und Elektronenübertragung auf NAD^+ entstehen keine zusätzlichen, schädlichen Nebenprodukte außer H^+ . Die Atome des Wasserstoffs werden vollständig auf das Substrat übertragen und es ist keine aufwändige Trennung überflüssiger Nebenprodukte nötig (Lauterbach, Lenz & Vincent, 2013)(**Abbildung 4**).

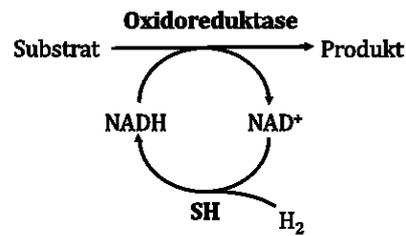


Abbildung 4. Schema der H₂-abhängigen NADH-Regeneration

Diese Problematik tritt bei Verwendung der sauerstofftoleranten löslichen Hydrogenase aus *R. eutropha* nicht auf.

Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass die katalytische Effizienz sowie die spezifische Aktivität der SH sogar die der häufig verwendeten Formiatdehydrogenase aus *Candida boidii* übertreffen (Ratzka *et al.*, 2012). Ein Nachteil ist allerdings die geringe Stabilität, die sich vermutlich auf den komplexen molekularen Aufbau der SH aus verschiedenen Untereinheiten, sowie die Anwesenheit mehrerer [FeS]-Clustern, Flavinen und des aktiven [NiFe]-Zentrums zurückführen lässt. So weist die gereinigte SH unter den üblichen Reaktionsbedingungen von 35 °C bei pH 8 eine Halbwertszeit von 5,3 h auf. Erschwerend hinzu kommt die Sensibilität der SH gegenüber Scherkräften und erhöhten Salzkonzentrationen.

Die Verringerung der SH-Aktivität und der Stabilität in verschiedenen organischen Lösungsmitteln konnte durch Modifikation der SH mithilfe von methoxy-poly(Ethylen)-Glykol (mPEG) bereits verbessert werden (Ratzka *et al.*, 2012). Die mit mPEG-modifizierte SH weist eine größere Toleranz gegenüber Lösungsmitteln auf, die für den Einsatz in technischen Anwendungen von Vorteil ist.

Auch Experimente mit den isolierten, an Graphit-Partikel adsorbierten NAD⁺-Reduktasemodul der SH führten zur erfolgreichen Regeneration von NADH in Kombination einer ebenfalls adsorbierten Hydrogenase (Reeve *et al.*, 2015; Reeve *et al.*, 2011). Dazu wurden die Untereinheiten HoxFU der SH von dem Hydrogenasemodul getrennt isoliert und an Graphitpartikel adsorbiert. Anstelle der SH-Hydrogenase wurde die stabilere Hydrogenase Hyd2 aus *E. coli* ebenfalls an die Partikel adsorbiert. Da die Partikel elektrisch leitfähig sind, können die Elektronen aus der Wasserstoffoxidation durch die Hydrogenase an das SH-NAD⁺-Reduktasemodul weitergeleitet werden und dienen dort der Reduktion von NAD⁺. Dieser modulare Aufbau ermöglicht die effiziente Regeneration von NADH, das dann für die Katalyse einer Oxidoreduktase zur Verfügung steht.

Zur Regeneration von NADPH stehen bisher erst wenige Enzyme zur Verfügung. Beispiele sind die Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* (Lamed & Zeikus, 1981) oder die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase aus *Bacillus* (Wong *et al.*, 1985).

In Folge der fortschreitenden Entwicklung von molekularen Methoden zur Proteinoptimierung und –anpassung an „unnatürliche“ Substrate ergeben sich in der Biotechnologie viele neue Möglichkeiten (Bornscheuer, 2001; Bornscheuer *et al.*, 2012; Nestl *et al.*, 2011). Diese werden auch im Rahmen der Kofaktorregeneration genutzt, um das Substratspektrum bekannter NAD(H)-abhängiger Dehydrogenasen zu erweitern. So wurden bereits mithilfe von Strukturvergleichen und Aminosäureaustauschen Derivate der FDH entwickelt, die NADP(H) als neues Substrat verwenden (Hoelsch *et al.*, 2013; Tishkov & Popov, 2006; Tishkov *et al.*, 1999).

1.12 Fragestellung und Zielsetzung

Der Einsatz der SH als O₂-tolerantes, kofaktorregenerierendes Enzym zeigte sich in mehreren Beispielen erfolgreich, beschränkte sich aber auf die H₂-abhängige Regeneration des natürlichen Substrates NADH (Ratzka *et al.*, 2011; Reeve *et al.*, 2011, 2015; Lauterbach, Lenz & Vincent, 2013; Holzer *et al.*, 2015; Lonsdale *et al.*, 2015). Das Ziel dieser Arbeit war die SH-katalysierte, synthetische NADP⁺-Reduktionsaktivität weiter zu verbessern und ihre Anwendung in enzym-gekoppelten Reaktionen zu testen. Im Vorfeld zeigten bereits verschiedene SH-Derivate mit einzelnen Aminosäureaustauschen in der NAD⁺-Bindestelle ein verändertes Substratspektrum (L. Lauterbach, 2013). Zusätzliche Optimierung des Produktionssystems sowie das Einfügen konservierter Aminosäuremotive aus NADP(H)-spezifischen Enzymen brachten die Anwendung der SH zur H₂-abhängigen NADPH-Regeneration weiter vor. Die kinetischen Parameter der resultierenden SH-Derivate sollten bestimmt werden und einen Einblick in das Substratspektrum ermöglichen. Die Funktionalität ausgewählter SH-Varianten mit synthetischer Affinität zu NADP⁺ wurde beispielhaft in Kombination mit NADPH-abhängigen Enzymen belegt.

Die große Ähnlichkeit der Gensequenzen von bidirektionalen, löslichen [NiFe]-Hydrogenasen sowie deren häufig konservierte Operonstruktur ermöglichte die Identifizierung von SH-spezifischen Genen in Organismen besonderer Herkunft. So wurden HoxFUHYW-kodierende Sequenzen in dem Genom des thermophilen Organismus *Hydrogenophilus thermoluteolus* gefunden (L. Lauterbach, persönliche Mitteilung). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die

heterologe Produktion der thermostabilen SH in *Ralstonia eutropha* und die anschließende Proteinreinigung. Das isolierte Enzym wurde biochemisch und spektroskopisch charakterisiert. Dies sollte das Verständnis über Vielfalt und Besonderheiten löslicher, bidirektionaler [NiFe]-Hydrogenasen erweitern und damit helfen, grundlegende, gemeinsame Eigenschaften wie die O₂-Toleranz besser zu verstehen.

Um die charakteristischen, biochemischen Unterschiede zwischen SHs aus verschiedenen Organismen näher zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit außerdem ein Produktionssystem entworfen werden, welches die Kombination von HoxFU- und HoxHY-Modulen aus verschiedenen Organismen zu heterotetrameren SH-Hybriden ermöglicht. Die heterologe Produktion der heterotetrameren SH sowie deren getrennte Dimere aus *Rhodococcus opacus* MR11 in *Ralstonia eutropha* wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Porthun *et al.*, 2002; K. Karstens, 2014). Auf dieser Grundlage sollten die vorhandenen Plasmide zusätzlich zu entsprechenden Konstrukten mit *Ralstonia eutropha*- und *Hydrogenophilus thermoluteolus*-spezifischen Vektoren auf ihre Fähigkeit zur Bildung von funktionsfähigen SH-Hybriden getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Stämme und Plasmide

Die Stämme und Bakterienstämme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Für einfache Klonierungen wurden die *E. coli*-Stämme JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und NEB-10beta (New England Biolabs) eingesetzt. Für den konjugativen Plasmidtransfer wurde *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) als Donor gebraucht. Der Rezipientenstamm ist ein Derivat von *R. eutropha* H16, der durch die Buchstaben HF gekennzeichnet ist.

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pLO1/pLO2	Km ^R , sacB, RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i>	O. Lenz (1994)
pCM62	Tet ^R , P _{lac} , ColE1 <i>ori</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i>	Marx (2001)
pCM66	Km ^R , P _{lac} , ColE1 <i>ori</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i>	Marx (2001)
Litmus 28	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , Plac-lacZ', BgIII-KpnI-MCS	New England Biolabs
pCH552	Amp ^R , lacZ' T7; ϕ 10 Promoter, f1 <i>ori</i> ; 15.0-kbp HindIII-Fragment von pGE15 in pKS+ mit Deletion von 1.2-kbp-EcoRI-Fragment in <i>hoxH</i>	C. Massanz (1998)
pCH591	Amp ^R , lacZ', ColE1 <i>ori</i> ; 0.26-kbp HindIII-NdeI-Fragment mit SH Promoter (P _{SH})	L. Kleihues (2000)
(#2904)	Amp ^R , ColE1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , 14.9-kbp-HindIII-Fragment mit <i>strep-hoxFUyHWhypA2B2F2CDEXhoxA'</i> aus <i>R.e.</i> H16 in LITMUS28/HindIII	J. Hamann/O. Lenz (unveröffentlicht)
pDAK94	Tet ^R , 7.2 kbp-HpaI-FseI-Fragment aus pDAK91b mit P _{SH-strep-RehoxF'-RohoxFUyHWI'-RehypA2B2 in #3001/FseI+Scal mit <i>Rehyp'B2F2CDEX</i>}	K. Karstens (2014)
pDAK113.o1	Tet ^R , 2.9 kbp-SpeI-Fragment aus pDAK109 mit P _{SH-strep-hoxFU' aus <i>R.o.</i> MR11 in XbaI-pEDY309 (Tet^R downstream der Expressionskassette und in sense)}	J. Hamann/ K. Karstens (2014)
pDAK113.o2	Tet ^R , 2.9 kbp-SpeI-Fragment aus pDAK109 mit P _{SH-strep-hoxFU aus <i>R.o.</i> MR11 in XbaI-pEDY309 (Tet^R upstream der Expressionskassette und in antisense)}	J. Hamann/ K. Karstens (2014)
pDAK114	Tet ^R , 3 kbp-SpeI-Fragment aus pDAK110 mit P _{SH-strep-hoxYHW aus <i>R.o.</i> MR11 in XbaI-pEDY309 (Tet^R downstream der Expressionskassette und in sense)}	J. Hamann/ K. Karstens (2014)
pLL2000	Km ^R , ColE1 <i>ori</i> , M13 <i>ori</i> , P _{SH-hoxStrepFUyHW aus <i>H.t.</i> in pGE837 mittels Gibson Assembly}	L. Lauterbach (2018)
pJP09	Tet ^R , 5.7 kbp-XbaI-Eco53KI-Fragment aus pLL2000 in XbaI-Scal pEDY309, P _{SH-hoxStrepFUyHW aus <i>H.t.</i>}	Diese Arbeit

pJP66	Km ^R ; NdeI-Scal-XbaI-BamHI-Fragment mit <i>RehoxStrepFU</i> aus (#2904) in XbaI-BamHI-geschnittenen pCM 66	Diese Arbeit
pJP10	Amp ^R , XbaI-NcoI verdautes PCR-Produkt; #2904 als template (<i>RehoxHYW</i>) in XbaI-NcoI-geschnittenen Vektor pCH591 (P _{SH})	Diese Arbeit
pJP62.2	Tet ^R , 2.8 kbp-XbaI-HindIII-Fragment aus pJP10 in XbaI pCM62; P _{SH} - <i>hoxYH</i> aus <i>R.e.</i>	Diese Arbeit
pJP66.6	Km ^R , 2.8 kbp-XbaI-HindIII-Fragment aus pJP10 in XbaI pCM66; P _{SH} - <i>hoxYHW</i> aus <i>R.e.</i>	Diese Arbeit
pJP01	pJP66 mit <i>hoxF^{ED467S}</i>	Diese Arbeit
pJP02	pJP66 mit <i>hoxF^{EE341A}</i>	Diese Arbeit
pJP03	pJP66 mit <i>hoxF^{EE341A D467S}</i>	Diese Arbeit
pJP04	pJP66 mit <i>hoxF^{EE341A S342R}</i>	Diese Arbeit
pJP05	pJP66 mit <i>hoxF^{EE341A S342R D467S}</i>	Diese Arbeit
pJP06	pJP66 mit <i>hoxF^{EE341A S342R K358R}</i>	Diese Arbeit
pJP09 HY a	Deletion von 2.5 kbp- Fragment (Δ <i>hoxFU</i>) in pLL2000 mittels MegaWHOP-PCR	Diese Arbeit
pJP09 HY	Tet ^R , 3.2 kbp xbaI-Eco53KI-Fragment aus pJP09 HY a in xbaI-scaI pEDY309	Diese Arbeit
pJP09 FU a	Deletion von 2.1 kbp- Fragment (Δ <i>hoxHY</i>) in pLL2000 mittels MegaWHOP-PCR	Diese Arbeit
pJP09 FU	Tet ^R , 3.6 kbp XbaI-Eco53KI-Fragment aus pJP09 FU a in XbaI-Scal pEDY309	Diese Arbeit
pJP11	1.2 kbp PCR-Produkt (Δ <i>hoxH</i>) mit template pCH552 in EcoRV-pLO2	Diese Arbeit
pJP12 a	pLL2000 mit P _{SH} - <i>hoxStrepFU^{His6}YHW</i> aus <i>H.t.</i>	Diese Arbeit
pJP12	Tet ^R , 5.7 kbp xbaI-Eco53KI-Fragment aus pJP12 a in xbaI-scaI pEDY309 P _{SH} - <i>hoxStrepFU^{His6}YHW</i> aus <i>H.t.</i>	Diese Arbeit
pJP13 a	pLL2000 mit P _{SH} - <i>hoxStrepF^{EE319AS320R}UYHW</i> aus <i>H.t.</i>	Diese Arbeit
pJP13	Tet ^R , 5.7 kbp xbaI-Eco53KI-Fragment aus pJP13 a in xbaI-scaI pEDY309 P _{SH} - <i>hoxStrepF^{EE319AS320R}UYHW</i> aus <i>H.t.</i>	Diese Arbeit
pJP14 a	pLL2000 mit P _{SH} - <i>hoxStrep[*]FUYHW</i> aus <i>H.t.</i> (verkürzter N-terminaler Linker zwischen <i>strepII</i> und <i>hoxF</i>)	Diese Arbeit
pJP14	Tet ^R , 5.7 kbp xbaI-Eco53KI-Fragment aus pJP14 a in xbaI-scaI pEDY309 P _{SH} - <i>hoxStrep[*]FUYHW</i> aus <i>H.t.</i> (verkürzter n-terminaler Linker zwischen <i>strepII</i> und <i>hoxF</i>)	Diese Arbeit

Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>		
NEB10-beta	<i>recA1 endA1 fhuA lacX74 araD139, Δ(ara,leu)7697 lacZΔM15 galE15 galK16 nupG rpsL::StrepR mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), F⁻</i>	New England Biolabs
JM109	<i>recA1 endA1 supE44 gyrA96 thi hsdR17(rK - mK +) relA1 Δ(lac-proAB) e14- mcrB+ F'[traD36 proAB+ lacq lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
S17-1	Strep ^R , Tet ^R , <i>recA1 pro thi hsdR17(rK- mK +)</i> ; RP4-2 tra-Gen chromosomal integriert	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>Ralstonia eutropha</i>		
HF 500	<i>ΔhoxH, ΔhoxG, ΔhoxC</i> (SH ⁻ ,MBH ⁻ ,RH ⁻)	L. Kleihues (2000)
HF 500 (pJP62.2)	<i>ΔhoxH, ΔhoxG, ΔhoxC</i> (SH ⁻ ,MBH ⁻ ,RH ⁻) ReP _{SH} - <i>hoxHYW</i>	Diese Arbeit
HF 500 (pJP66.6)	<i>ΔhoxH, ΔhoxG, ΔhoxC</i> (SH ⁻ ,MBH ⁻ ,RH ⁻) ReP _{SH} - <i>hoxHYW</i>	Diese Arbeit
HF 500 (pJP 09 HY)	<i>ΔhoxH, ΔhoxG, ΔhoxC</i> (SH ⁻ ,MBH ⁻ ,RH ⁻) ReP _{SH} - <i>HthoxStrep-YHW</i>	Diese Arbeit
HF 500 (pDAK114)	<i>ΔhoxH, ΔhoxG, ΔhoxC</i> (SH ⁻ ,MBH ⁻ ,RH ⁻) ReP _{SH} - <i>RohoxStrep-YHW</i>	Diese Arbeit
HF 798	<i>ΔhoxG; ΔhoxC</i> (MBH ⁻ SH ⁺)	Horch und Lauterbach (2010)
HF 903	<i>ΔhoxFU</i> (MBH ⁻ SH ⁻)	Lauterbach (2011)
HF 903 (pJP66)	<i>ΔhoxFU</i> (MBH ⁻ SH ⁻) ReP _{SH} - <i>hoxStrepFU</i>	Diese Arbeit
HF 903 (pJP01)	<i>ΔhoxFU</i> (MBH ⁻ SH ⁻) ReP _{SH} - <i>hoxStrep^{FD467SU}</i>	Diese Arbeit
HF 903 (pJP02)	<i>ΔhoxFU</i> (MBH ⁻ SH ⁻) ReP _{SH} - <i>hoxStrep^{FE341AU}</i>	Diese Arbeit
HF 903 (pJP03)	<i>ΔhoxFU</i> (MBH ⁻ SH ⁻) ReP _{SH} - <i>hoxStrep^{FE341A D467SU}</i>	Diese Arbeit
HF 903 (pJP04)	<i>ΔhoxFU</i> (MBH ⁻ SH ⁻) ReP _{SH} - <i>hoxStrep^{FE341A S342RU}</i>	Diese Arbeit
HF 903 (pJP05)	<i>ΔhoxFU</i> (MBH ⁻ SH ⁻)	Diese Arbeit

	<i>ReP_{SH}-hox_{Strep}^{FE341A S342R D467S}U</i>	
HF 903 (pJP06)	$\Delta hoxFU$ (MBH-SH ⁻)	Diese Arbeit
	<i>ReP_{SH}-hox_{Strep}^{FE341A S342R K358R}U</i>	
HF 903 (pDAK113.o1)	$\Delta hoxFU$ (MBH-SH ⁻)	Diese Arbeit
	<i>ReP_{SH}-Rohox_{Strep}FU</i>	
HF 903 (pDAK113.o2)	$\Delta hoxFU$ (MBH-SH ⁻)	Diese Arbeit
	<i>ReP_{SH}-Rohox_{Strep}FU</i>	
HF 903 (pJP09 FU)	$\Delta hoxFU$ (MBH-SH ⁻)	Diese Arbeit
	<i>ReP_{SH}-Hthox_{Strep}FU</i>	
HF 1009	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hofG$, <i>strep-hoxF</i>	K. Karstens (2015)
HF 1009 $\Delta hoxH$	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hofG$, $\Delta hoxH$, <i>strep-hoxF</i>	Diese Arbeit
HF 1009 $\Delta hoxH$ (pJP62.2)	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hofG$, $\Delta hoxH$, <i>strep-hoxF</i> <i>ReP_{SH}-hoxHYW</i> (um 46 bp verkürztes hoxY)	Diese Arbeit
HF 1009 $\Delta hoxH$ (pJP66.6)	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hofG$, $\Delta hoxH$, <i>strep-hoxF</i> <i>ReP_{SH}-hoxHYW</i> (um 46 bp verkürztes hoxY)	Diese Arbeit
HF 1009 $\Delta hoxH$ (pJP09 HY)	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hofG$, $\Delta hoxH$, <i>strep-hoxF</i> <i>ReP_{SH}-Hthox_{Strep}-YHW</i>	Diese Arbeit
HF 1009 $\Delta hoxH$ (pDAK114)	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hofG$, $\Delta hoxH$, <i>strep-hoxF</i> <i>ReP_{SH}-Rohox_{Strep}-YHW</i>	Diese Arbeit
HF 1054	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxFUYHW'$, $\Delta hoxI$ (Deletion von 330 bp zwischen NarI und MroI)	J. Hamann/ K. Karstens/ L. Lauterbach (unveröffentlicht)
HF 1054 (pJP09)	$\Delta hoxG$, $\Delta hoxFUYHW'$, $\Delta hoxI$ (Deletion von 330 bp zwischen NarI und MroI) <i>ReP_{SH}-Hthox_{Strep}-FU^{YHW}</i>	Diese Arbeit

2.2 Zellkultivierung

2.2.1 Nährmedien

Die Kultivierung und Anzucht von *Escherichia coli*-Stämmen wurden stets in sterilen, autoklavierten Schüttel-oder Schikanekolben durchgeführt, deren Größe etwa dem fünffachen Volumen des Mediums entspricht. Dieses Verhältnis gewährleistet eine optimale Sauerstoffversorgung der Zellen während der Kultivierung auf dem Schüttler.

Um gewünschte Plasmide zu amplifizieren und anschließend zu isolieren wurden Kulturen mit den entsprechenden *E. coli*-Stämmen, die das Plasmid enthalten, in LB-Medium angeimpft. Je nachdem welche Antibiotikaresistenz von dem Plasmid codiert wird, wurde das jeweilige Antibiotikum zum Medium zugegeben (**Tabelle 4**). Handelte es sich bei dem Plasmid um ein *low-copy*-Plasmid wurden 100 mL-Kulturen in 500 mL-Schüttelkolben angezogen. Bei *high-copy*-Plasmiden genügten 10 mL-Kulturen in 100 mL-Schüttelkolben, um bei der Isolierung eine ausreichend hohe Konzentration des Plasmids zu erhalten.

Die Anzucht von Kulturen für die Herstellung kompetenter Zellen wird unter 2.9. beschrieben. Die Kolben werden bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt.

Für das heterotrophe Wachstum von *Ralstonia eutropha*-Stämmen wurde NB-, LSLB-Sac- (Lenz *et al.*, 1994), Fruktose- (FN) oder Fruktose-Glycerin-Minimalmedium (FGN) (Friedrich *et al.*, 1982) verwendet. Autotrophes Wachstum wurde in Mineralmedium ohne Zusatz einer Kohlenstoffquelle getestet (AutN).

Zur Herstellung fester Medien wurde 1,2 % (w/ v) Agar-Agar (Roth) bzw. für Minimalmedien Reinst-Agar (Difco Bacto™ Agar) zu dem Ansatz des flüssigen Mediums zugesetzt und durch Autoklavieren gelöst, so dass es danach in Platten gegossen werden konnte.

Die verschiedenen Medien setzen sich, wie in folgender **Tabelle** ersichtlich, zusammen:

Tabelle 3. Zusammensetzung der Kultivierungsmedien

Medium	Substanzen	Finale Konzentration
LB	Bacto Trypton	1 % w/v
	Bacto Yeast Extract	0.5 % w/v
	NaCl	0.5 % w/v
		ad 1000 mL ddH ₂ O
LSLB	Bacto Trypton	1 % w/v
	Bacto Yeast Extract	0.5 % w/v
	NaCl	0.25 % w/v
		ad 1000 mL ddH ₂ O
LB-Sac	Bacto Trypton	1 % w/v
	Bacto Yeast Extract	0.5 % w/v
	NaCl	0.25 % w/v
	Saccharose	15 % w/v
		ad 1000 mL ddH ₂ O
NB	Nutrient Broth	0.8 % w/v
		ad 1000 mL ddH ₂ O
SOC	Bacto Trypton	2 % w/v
	Bacto Yeast Extract	0.5 % w/v
	NaCl	0.05 % w/v
	KCl	2.5 mM
	MgCl ₂	0.01 M
	Glukose	0.02 M
		ad 1000 mL ddH ₂ O
AutN	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	25.1 mM
	KH ₂ PO ₄	11 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.81 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.068 mM
	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	18 µM
	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	1 µM
	NH ₄ Cl	37.4 mM
FN	Fruktose	0.4 % w/v
FGN	Fruktose	0.2 % w/v
	Glycerin	0.2 % w/v
FGN _{mod}	Fruktose	0.05 % w/v
	Glycerin	0.4 % w/v
		ad 1000 mL ddH ₂ O

Tabelle 4. Konzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Arbeitskonzentration [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		Stammlösungskonzentration [$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$]
		<i>E. coli</i>	<i>R. eutropha</i>	
Ampicillin	<i>Amp</i>	50	-	100 in ddH ₂ O
Kanamycin	<i>Km</i>	50	350	30 oder 100 in ddH ₂ O
Tetrazyklin	<i>Tet</i>	10	10-15	10-15 in 80 % v/v Ethanol

2.2.2 Bestimmung der Wachstumsparameter

Das Wachstumsverhalten von flüssigen Kulturen wurde durch Absorptionsmessung bei einer geeigneten Wellenlänge im Spektrophotometer (Hitachi, U-2000) beobachtet. Die optische Dichte von *E. coli*-Lösungen wurde bei 578 oder 600 nm nach Messung der Absorption des unbewachsenen Mediums bestimmt. Für Kulturen mit *R. eutropha* wurde die Wellenlänge 436 nm und H16-Puffer als Leerwert verwendet. Es wurden 1 mL Probenvolumen in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm benutzt. Die Zellproben wurden gegebenenfalls verdünnt, so dass die Absorption unter 0.5 liegt.

2.2.3 Kultivierung und Wachstum von *Ralstonia eutropha*

Bei der Kultivierung von *Ralstonia eutropha* wurden unterschiedliche Medien verwendet, die an die gewünschte Wachstumsart angepasst wurden. Für heterotrophes Wachstum, das z.B. zur nachfolgenden Isolierung von Plasmiden geeignet ist, wurde LSLB-, NB- oder FN-Medium verwendet. Da das Wachstum in FN langsamer erfolgt als in NB wurden über-Nachkulturen häufig in NB angeimpft. Sollte jedoch die Aktivität der löslichen Hydrogenase bestimmt werden, wurde die Kultivierung auf deren Expression in der späten Wachstumsphase ausgerichtet. Die Vorkultur wurde dazu in FN angezogen, aus der nach 2-3 Tagen Wachstum bei 30 °C die FGN-Hauptkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und mit einer Füllhöhe von 80 % bei 120 rpm und 30 °C inkubiert wird. Nach erneutem Wachstum für etwa 7 Tage sollte die OD₄₃₆ dann über 10 liegen und die Zellen können geerntet werden.

Das autotrophe Wachstum, bei dem CO₂-als einzige C- und H₂ als Energiequelle dienen, erfolgte auf Platten aus Minimalmedium in einem Exsikkator, der mit den entsprechenden Gasen gefüllt wurde. Die Zusammensetzung betrug dabei 10 % CO₂, 10 % O₂, 10 % H₂ und 70 % N₂.

Da die verwendeten *R. eutropha* – Stämme bereits eine Kanamycin-Resistenz genomisch kodieren, musste nach dem Einbringen von Plasmiden mit zusätzlichem Kanamycin-Resistenzgen die Antibiotikakonzentration im Medium erhöht werden, um die Selektion des Plasmides zu gewährleisten. So wurde die Arbeitskonzentration von Kanamycin im Medium auf $350 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ erhöht.

2.2.4 Zellernte

Die Ernte der Zellkulturen erfolgte stets in gekühlten Zentrifugen. Kulturen mit Volumina bis 3 mL wurden in 1.5- oder 2 mL-Eppendorf-Gefäßen in einer Tischzentrifuge (Heraeus™ Fresco™ 17) für 2 min bei 13000 rpm geerntet. Zellkulturen mit größeren Volumina bis 50 mL wurden in Falcon-Gefäßen in einer Megafuge (Thermo Scientific™ Heraeus™ Megafuge™ 16) bei $5800 \cdot g$ für 15 min abzentrifugiert. Große Kulturvolumina wurden bei $6800 \cdot g$ für 16 min in einer Standzentrifuge (Beckman Coulter Avanti® J-20 XP) geerntet und nach dem Wiegen des Pellet-Nassgewichtes in flüssigem N₂ schockgefroren.

2.2.5 Lagerung und Konservierung von Bakterienstämmen

Die geernteten Zellen wurden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Auf LB-Platten ausgestrichene *E. coli*-Stämme wurden etwa 4 Wochen gekühlt bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. *R. eutropha*-Stämme, die auf Minimalmedien gewachsen sind, konnten längere Zeit bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Von Einzelkolonien angeimpfte Flüssigkulturen in Selektionsmedium wurden nach 1- 2 Tagen Wachstum zum Herstellen eines Glycerinstocks verwendet. Dazu wurden 1.65 mL der Bakterienkultur mit 0.35 mL Glycerin in sterilen 2 mL-Cryo-Glasröhrchen gemischt und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Mit einer sterilen Impföse wurde dieses Zellmaterial zum Animpfen von Vorkulturen genutzt.

2.3 Proteinreinigung

2.3.1 Aerobe Affinitätschromatographie zur Isolierung von *StrepII*®-tag-tragenden SH-Derivaten

Die Reinigung verschiedener *StrepII*-tag-tragender SH-Varianten mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie erfolgte nach Anzucht der entsprechenden Stämme aus **Tabelle 2** unter heterotrophen Wachstumsbedingungen bis eine $\text{OD}_{436} > 10$ erreicht wurde. Die geernteten Zellen wurden auf Eis mit dem jeweiligen Puffer unter Rühren mithilfe eines Rührfisches

resuspendiert. Dazu wurden pro 1 g Zellmaterial 3 mL des Puffers verwendet. Je nach SH-Derivat wurde das jeweilige Puffersystem angepasst und der entsprechende Puffer verwendet (Tabelle 5). Alle Schritte der Reinigung erfolgten unter gekühlten Bedingungen bzw. wurden im Kühlraum durchgeführt.

Die resuspendierten Zellen wurden mit 2-3 Passagen durch die gekühlte French-press-Zelle mit 125 MPa aufgeschlossen und der lösliche Extrakt durch anschließende Zentrifugation bei $72500 \cdot g$ und $4^{\circ}C$ für 45 min in der Ultrazentrifuge (Beckman Coulter Optima XE-90) von den Zelltrümmern getrennt. Der lösliche Extrakt wurde vorsichtig in ein Gefäß überführt und auf eine mit dem Grundpuffer äquilibrierte *Strep*-Tactin-Superflow oder -High-Capacity-Säule (IBA Göttingen) aufgetragen. Pro 20 mL löslicher Extrakt wurde 1 mL Bettvolumen verwendet. Der Durchlauf wurde insbesondere für die SH-Chimären und die *HtSH* ein weiteres Mal auf die Säule aufgebracht, um die Ausbeute zu erhöhen. Danach erfolgte das Waschen der Säule mit mind. 10 Säulenvolumina des Waschpuffers. Eluiert wurde mit einem Puffer, der 3-5 mM Desthiobiotin enthält. Das SH- enthaltende Eluat wurde mittels Ultrafiltration in Filtereinheiten mit einem molekularen Ausschlussvolumen (MWCO „molecular weight cut off“) von 100 kDa bei maximal $3200 \cdot g$ konzentriert und in Aliquotes nach Einfrieren in flüssigem N_2 bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

Die Regeneration der *Strep*-Tactin-Säulen erfolgt mit 10 Säulenvolumen 0.1 M NaOH und dem nachfolgenden Waschen mit 50 mM Tris pH 8 bzw. 50 mM KPO_i pH 7.

Tabelle 5. Verwendete Puffer und Lösungen für die Reinigung verschiedener SH-Derivate

Reinigungsschritt	ReSH (heterotetramer)	<i>HtSH</i>	SH-Chimäre	Anaerob (<i>HtSH</i> und <i>HtHY</i> / ReFU)
Grundpuffer (GP)	50 mM Tris, pH 8, 5 % (v/v) Glycerin, 150 mM KCl	50 mM KPO_i , pH 7.2, 15–20 % (v/v) Glycerin, 5mM $MgCl_2$, 0.5 mM $NiCl_2$	50 mM KPO_i , pH 7, 15 % (v/v) Glycerin	50 mM KPO_i , pH 7, 15– 20 % (v/v) Glycerin, 5mM $MgCl_2$, 0.5 mM $NiCl_2$
Resuspension	GP + 5 mM NAD^+ , EDTA- freier Protease-Inhibitor (Roche)	GP + 5 mM NAD^+ , EDTA- freier Protease-Inhibitor (Roche)	GP + EDTA-freier Protease-Inhibitor (Roche)	GP + 3 mM Na-Dithionit EDTA-freier Protease- Inhibitor (Roche)
Elution	GP + 5 mM Desthiobiotin	GP + 5 mM Desthiobiotin	GP + 3 mM Desthiobiotin	GP + 3 mM Desthiobiotin
Säulen- Regeneration	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH

2.3.2 Anaerobe Affinitätschromatographie zur Isolierung von *StrepII*®-tag-tragenden *HtSH*-Derivaten und der *HtHY/ReFU*-Chimäre

Für die anaerobe Reinigung der löslichen Hydrogenase aus *Hydrogenophilus thermoluteolus* wurde zu dem Zellpellet mit N₂ anaerobisierter Resuspensionspuffer zugegeben und die Zellen auf Eis unter Übersichtung mit Argon aufgetaut. Ein Gefäß für die Ultrazentrifuge, sowie zwei 50 mL-Falcon-Gefäßen werden mit Argon gefüllt und dicht verschlossen.

Die Zellsuspension wurde dreimal durch die Presse passagiert und nach jeder Passage in ein frisches, anaerobes Gefäß überführt. Nach der letzten Passage wurde das Ultrazentrifugenröhrchen nochmal mit Argon überschichtet. Anschließend erfolgt die Ultrazentrifugation wie unter 2.3.1 beschrieben.

Parallel zur Zentrifugation wurden eine *Strep*-Tactin-Säule sowie die benötigten Puffer in der anaeroben Box äquilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der lösliche Extrakt in ein mit Argon gefülltes Gefäß überführt und in die anaerobe Box eingeschleust. Die Reinigung über die *Strep*-Tactin-Säulen erfolgt wie in 2.3.1 angegeben, jedoch innerhalb der anaeroben Box bei etwa 9 °C in einer Atmosphäre aus 95% N₂ und 5 % H₂.

2.3.3 Größenausschlusschromatographie der *HtSH*

Da die Untereinheiten der eluierten *HtSH* nach der Affinitätschromatographie nicht stöchiometrisch homogen im SDS-Gel erschienen, wurde anschließend eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Insbesondere für die Proben, die zur Kristallisation und Spektroskopie verwendet werden sollten, ist eine hohe Reinheit der heterotetrameren *HtSH* wichtig. Für die Größenausschlusschromatographie, die Proteinproben anhand ihres Molekulargewichtes auftrennt, wurden 200 µL-Aliquotes der konzentrierten *HtSH*-Probe (etwa 20 mg · mL⁻¹) nach Affinitätschromatographie auf eine äquilibrierte Superdex 200 10/300 GL Säule aufgetragen. Mithilfe des ÄKTA pure Systems wurde eine Flussrate von 0.2 mL · min⁻¹ eingestellt. Die Elution der heterotetrameren *HtSH* nach etwa 0.3 Säulenvolumina wurde durch UV/Vis Absorptionsmessung bei den Wellenlängen 280 nm und 420 nm beobachtet. Fraktionen, die sowohl proteinspezifisch bei 280 nm wie auch für [FeS]-Zentren typisch bei 420 nm hohe Absorptionssignale zeigten, wurden in 400 µL-Aliquotes gesammelt und die spezifische, H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität gemessen sowie die Zusammensetzung der Untereinheiten durch SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Fraktionen mit höchsten spezifischen Reduktionsaktivitäten wurden vereinigt und mithilfe der Filtrationseinheiten wie unter 2.3.1 beschrieben konzentriert.

Sollten die Proben biochemisch oder spektroskopisch untersucht werden, wurde zur Größenausschlusschromatographie der gleiche Puffer wie zur Affinitätschromatographie verwendet. Proben, die für die Kristallisation verwendet wurden, wurden überwiegend in Tris-basierten Puffern gereinigt, um die spätere Bildung von Phosphatkristallen zu verhindern.

2.4 Probenanalytik

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den verschiedenen Fraktionen des Reinigungsprotokolls wurde der BCA-Assay durchgeführt. Das BCATMKit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden gegebenenfalls verdünnt und parallel zu einer Standardreihe aus BSA-Lösungen mit bekannter Konzentration in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Zugabe von je 200 μL der frisch angesetzten Mischung aus Reagenz A und B startet die proteinabhängige Farbreaktion. Dabei werden Cu^{2+} -Ionen der Lösung zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 562 nm im Mikrotiterplattenlesegerät SpectraMax 340 (Molecular Devices, USA). Anhand der erstellten Eichgerade konnten die entsprechenden Konzentrationen durch Drei- oder Mehrfachbestimmung ermittelt werden.

2.4.2 Messung der H_2 -abhängigen NAD(P)^+ -Reduktionsaktivität

Die Messung der H_2 -abhängigen NAD(P)^+ -Reduktionsaktivitäten wurde je nach Akzeptor der beobachteten Reaktion in 2 mL-bzw. 200 μL -Reaktionsansätzen mit entsprechenden Küvetten durchgeführt. Beobachtet wurde die SH-spezifische reduzierende Aktivität von NAD^+ bzw. NADP^+ zu NADH bzw. NADPH bei 365 nm ($\epsilon_{\text{NAD(P)H}} = 3.43 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$, Bergmeyer, H. U., 1983) unter H_2 -Spaltung (Schneider & Schlegel, 1976). Bei der Verwendung von NADP^+ als Substrat wurde häufig der kleinere Reaktionsansatz gewählt. Die Messung erfolgte hierbei im UV-Vis-Spektrophotometer des Typs Cary 300 von VarianTM.

Die Untersuchung der Reaktionen mit NAD^+ als Substrat erfolgte in 2 mL-Reaktionsansätzen im UV-Vis-Spektrophotometer des Typs Cary 50 ebenfalls von VarianTM.

Die Messungen der H₂-abhängigen Kofaktorreduktion erfolgte in verschlossenen Küvetten mit H₂-gesättigtem Puffer. Für die SH-Varianten von *Ralstonia eutropha* sowie *Rhodococcus opacus* und die entsprechenden chimären SH-Derivate wurde 50 mM Tris-HCl, pH 8 mit 1 mM DTT oder 0.75 mM TCEP, 1 µM FMN sowie 1 mM NAD⁺ bzw. 2 mM NADP⁺ bei 30 °C verwendet. Die Aktivitätsmessungen der SH aus *Hydrogenophilus thermoluteolus* wurden in 50 mM Bis-Tris, pH 6.5 mit 0.75 mM TCEP, 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgCl₂ und 2 µM FMN bei 50 °C durchgeführt.

Wurden zusätzliche Salzlösungen zu den Reaktionsansätzen zugefügt, wurde stets TCEP verwendet, um ein Ausfällen der Salze durch DTT zu verhindern.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5-25 µL der SH-Probe gestartet.

Die Messung der SH-spezifischen Reduktion von NAD⁺ unter H₂-Spaltung mit CTAB-lysierten Zellen wurde nach dem Protokoll von Friedrich *et al.* (1981) mit etwa 1 OD₄₃₆-Äquivalenten durchgeführt.

Nach der Messung wurde die Steigung im linearen Bereich des Reaktionsverlaufes bestimmt. Sie gibt die zeitliche Veränderung der Absorption wieder. Daraus lässt sich anschließend unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten und der verwendeten Proteinmenge die spezifische Aktivität (U · mg⁻¹) berechnen. Dazu wurde die folgende Formel angewendet:

$$\text{spezifische Aktivität (U} \cdot \text{mg}^{-1}\text{)} = \frac{\frac{V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}}} \cdot \frac{\Delta A}{t}}{\varepsilon \cdot \text{cm} \cdot c_{\text{Probe}}}$$

V_{gesamt}= Volumen des Reaktionsansatzes; V_{Probe}= Volumen der eingesetzten Probe; ΔA/t= Absorptionsänderung; ε= Extinktionskoeffizient bei der verwendeten Wellenlänge; c_{Probe}= Proteinkonzentration der verwendeten Probe

Zur Auswertung der Messungen wurde das Programm CaryWin (Varian™) verwendet. Die Angabe von Enzymaktivitäten erfolgte in internationalen Einheiten (Units/ U). Eine Einheit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol Substrat pro min umsetzt, bzw. 1 µmol Produkt pro min bildet.

Um den K_M-Wert der Reaktion zu erhalten, wurden die Messungen mit variierender Substratkonzentration wiederholt und mithilfe des Programms „SigmaPlot“ ausgewertet.

2.4.3 Messung der NAD(P)H-abhängigen Benzylviologen-Reduktionsaktivität

Für die Messung der NAD(P)H-abhängigen Reduktion von Benzylviologen (BV) wurde 5 mM Benzylviologen als Elektronenakzeptor dem Reaktionsansatz zugefügt. Dieser enthielt außerdem 90 μM Dithionit und die Substrate 1 mM NADH bzw. NADPH. Um den Ansatz anaerob zu halten, wurde nach Verschließen der Küvette mit N_2 begast. Der Puffer wurde der SH-Variante angepasst, d.h. 50 mM Tris pH 8 für *ReSH*, *RoSH* und die entsprechenden Chimären und 50 mM Bis-Tris pH 6.5 für *HtSH*-Proben.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 0.4-5 μg der Hydrogenaseprobe gestartet und spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 578 nm ($\epsilon_{\text{BV}} = 8.9 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) bei 30 °C bzw. 50 °C verfolgt.

2.4.4 Messung der H₂-abhängigen Benzylviologen-Reduktionsaktivität

Die Hydrogenaseaktivität der SH-Derivate wurde als H₂-abhängige Benzylviologen (BV)- Reduktionsaktivität photometrisch bei 578 nm ($\epsilon_{\text{BV}} = 8.9 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) und 30 °C bzw. 50 °C bestimmt (Schneider und Schlegel, 1976). Die mit Septen luftdichtverschlossenen Küvetten enthielten 2 ml-Ansätze mit 25 μM NADH, 2,4 mM BV und isolierter SH-Probe in H₂-gesättigtem Puffer.

2.4.5 Messung der NADH-abhängigen H₂-Produktion

Die H₂-Produktion wurde amperometrisch in der invertierten Clark-Elektrode (modifizierter Oxygraph, Hansatech Instruments) verfolgt (Wang *et al.*, 1971). Dazu wurde die Reaktionskammer vollständig mit 1.3 mL N₂-gesättigter Puffer mit 5 mM NADH, 7 mM Natriumdithionit (DT) und 1-5 μg Proteinkomplex gefüllt und die H₂-Entstehung online verfolgt. Eine Kalibrierung erfolgte durch die Messung der Stromstärken-Zunahme bei Zugabe von 100 μL H₂-gesättigter Puffer zu 1.2 mL N₂-gesättigtem Reaktionsansatz.

2.4.6 Aufnahme von UV/Vis Absorptionsspektren

Die Aufnahme von UV-VIS-Spektren erfolgte im Zweistrahl-UV-VIS-Spektrometer (Referenz-UV-Vis/NIR-Spektrophotometer des Typs Cary 5000 von Varian™, Palo Alto, USA). Die Messung erfolgte in 100- μ L-Quarzküvetten (Varian, optische Weglänge 1 cm) bei RT und einer Scangeschwindigkeit von 600 nm pro min im Wellenlängenbereich von 200 – 700 nm. Als Leerwert diente der jeweilige Lagerungspuffer. Für Messungen des Spektrums einer oxidierten Probe wurden 100 μ L der Probe direkt nach der Reinigung (*as isolated*) eingesetzt. Zur Reduktion wurde die gleiche Probe mit einem Gummiseptum luftdicht verschlossen und mit N₂ begast. Dann wurden 1 mM NADH und 0.75 mM TCEP zugefügt. Alternativ erfolgt die Reduktion durch Begasung von H₂.

2.4.7 Bestimmung des FMN-Gehalts

Für die Bestimmung des FMN-Gehalts isolierter SH-Proben wurde nach einem modifizierten Protokoll von Schneider und Schlegel (1976) vorgegangen. Durch Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure wurden die FMN-Kofaktoren aus dem Proteinkomplex extrahiert. Hierzu wurden 45 μ L Probe mit dem gleichen Volumen an 20 %-iger (w/v) Trichloressigsäure versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 10000 \cdot g wurden 80 μ L des Überstand durch Zugabe von 30 μ L KH₂PO₄-Lösung (4 M) neutralisiert. Die FMN- Konzentration der Extrakte wurde im direkten Vergleich mit einer ebenso behandelten Standardreihe aus kommerziell erhältlichem FMN (0.05-20 μ M FMN) bestimmt. Hierzu wurde die Fluoreszenz der neutralisierten Extrakte mit dem Infinite 200 Plattenleser (Tecan, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm und einer Emissionswellenlänge von 526 nm (cut-off bei 515 nm, bottom-read) in einer schwarzwandigen Mikrotiterplatte (BRAND plates™) gemessen. Die ermittelte FMN-Konzentration wurde mit der Konzentration der für die Extraktion eingesetzten Proteinlösung ins Verhältnis gesetzt.

2.4.8 Bestimmung des Metallgehalts

Der Gehalt der Metalle Eisen und Nickel in gereinigten Proteinproben der *HtSH* wurde durch optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES; Optima 2100 DV, Perkin Elmer) unter Verwendung einer Multi-Element Standardlösung XVI

(Merck) als Referenz quantifiziert. Die Bestimmungen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Silke Leimkühler, Universität Potsdam, durchgeführt.

2.4.9 Kristallisation

Um die Proteinstruktur der SH mittels Röntgenstrukturanalyse zu lösen, sind Proteinkristalle notwendig. Diese entstehen durch die langsame Präzipitation des gelösten, gereinigten Proteins mithilfe von anorganischen Salzen oder/ und organischen Verbindungen. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Methoden, die zum Herabsetzen der Proteinlöslichkeit genutzt werden. Je nach Position des Tropfens, der die Proteinlösung und das Präzipitationsmittel enthält, wird zwischen hängendem („*hanging drop*“) und sitzendem („*sitting drop*“) Tropfen unterschieden. Die Kristallisationsplatte enthält mehrere Kammern, die mit der Präzipitationslösung gefüllt und nach Ansetzen der Kristallisationstropfen luftdicht verschlossen werden. Der hängende Tropfen befindet sich dabei auf dem Deckglas, das zum Verschließen der Kammer genutzt wird. Zum Ansetzen eines sitzenden Tropfens wird eine Mikro-Brücke in die Kammer gestellt und der Tropfen darauf in einer Vertiefung aufgebracht. Da die Atmosphäre in der luftdicht verschlossenen Kammer mit dem Präzipitationsmittel gesättigt ist, werden der Proteinlösung H₂O-Moleküle entzogen, was so zum langsamen Ausfallen der Proteine führt.

Die Kristallisation der frischen *HtSH*-Proben nach *Strep*-Tactin- und Größenausschlusschromatographie wurde in Kooperation mit Dr. Patrick Scheerer und Andrea Schmidt am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene kommerziell erhältliche Puffersysteme wie JBScreen Classic, Cryo2, Basic, Wizard, Kinase etc. (Jena Bioscience), Index, PEGRx und Crystal (Hampton Research) sowie die in Taketa *et al.* (2015) publizierten Bedingungen für die Kristallisation getestet. Es wurden 24-well-Linbro-Kristallisationsplatten unter aeroben Bedingungen bei 4, 6, 8, 10, 18, 25 und 45 °C sowie anaerob bei 9.2- 10 °C inkubiert. Die getesteten Konzentrationen der *HtSH*-Proben waren 7-25 mg · mL⁻¹.

Bei Verwendung von 0.1M HEPES Puffer, pH 7.0-7.8 und verschiedenen Polyethylenglycolen (PEG3350-6000) bei 5-15% im Verhältnis 1:1.25 (Präzipitantz:Proteinlösung) sind Kristalle nach frühestens zwei Wochen bei 4°C (aerob) erkennbar gewesen. Anaerob bildeten sich stäbchenförmige Kristalle nach 3 Monaten bis zu einem Jahr Inkubationszeit.

Die Kristalle wurden mit 0.2 – 1.0 mm Nylonschlingen mit Magnetbasis, die man zur Kristalljustage auf einem Goniometerkopf benötigt, geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Messung der Röntgenbeugung der Proteinkristalle erfolgte am European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble) mit der Beamline ID23_2 (Gabadinho *et. al.*, 2010).

2.5 Elektrochemische Untersuchung der ReSH

Die elektrochemischen Experimente zur Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der ReSH-Varianten wurden in Kooperation mit der AG von Prof. Kylie Vincent am Department of Chemistry der University of Oxford durchgeführt.

2.5.1 Elektrochemische Aktivitätsmessung der löslichen, NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase

Die Umsetzung der Substrate NAD(P)⁺/ NAD(P)H durch die NAD⁺-reduzierende Hydrogenase kann neben der photometrischen Messung auch mithilfe elektrochemischer Methoden verfolgt werden. Fraser Armstrong führte zur Untersuchung der Katalyse durch Redoxenzyme die Proteinfilmvoltametrie ein, die den direkten Elektronentransport durch das Enzym an einer Elektrodenoberfläche messbar macht (Armstrong, 2002). Dazu wird das gereinigte Protein an eine Elektrode adsorbiert und eine geeignete Spannung angebracht. Vorausgesetzt die Katalyse durch das Enzym ist nicht von intramolekularem Elektronentransfer oder Massentransport des Substrats/ Produkts limitiert, kann die gemessene Stromstärke als Maß der katalytischen Aktivität betrachtet werden. Je höher der auftretende Strom, desto höher ist die Enzymaktivität.

Der Aufbau der Messapparatur besteht aus verschiedenen Elektroden, die in einer Anaerobenbox (O₂ < 2 ppm; M. Braun, Deutschland) aufgebaut und an einen Potentiostat (Autolab PGstat128N, EcoChemie, Niederlande), der die elektrischen Parameter kontrolliert, angeschlossen werden. Die Messelektrode, ein dünner Draht aus Platin, misst die entstehenden Ströme, die von Redoxreaktionen an der pyrolytischen Graphitelektrode (engl.: „*pyrolytic graphite electrode*“, PGE) resultieren. Eine Referenzelektrode, deren Spannung während der Messung konstant bleibt, wird ebenfalls benötigt. Für die Adsorption des Enzyms wird die PGE-Arbeitslektrode zunächst mit einer wässrigen α -Aluminiumoxid-Suspension (1 μ m, Buehler, Germany) poliert, in einem Wasserbad für etwa 30 s sonifiziert und mit

demineralisiertem Wasser abgespült. Auf die trockene, etwa 0.03 cm^2 große Elektrodenfläche werden dann $0.7 \text{ }\mu\text{L}$ der Proteinlösung aufgebracht.

In einem speziellen Glasgefäß mit drei Öffnungen werden 3 mL des Reaktionspuffers (50 mM Bis-Tris, $\text{pH } 6$) vorgelegt und die Elektroden angebracht. Um eine gute Verteilung des Substrats bzw. Produkts in dem Reaktionsansatz während der Messung zu gewährleisten wird die Arbeitselektrode mithilfe eines Rotators (Autolab RDE, EcoChemie, Niederlande) mit etwa 1800 rpm rotiert.

Durch Verbindung des Potentiostat an einen Computer werden mithilfe der Software GPES (EcoChemie) die elektrochemischen Parameter eingestellt, kontrolliert und die gemessenen Werte in Diagrammen dargestellt.

2.5.2 Zyklische Voltammetrie

Eine Anwendung der Proteinfilmvoltammetrie ist die zyklische Voltammetrie (engl.: „*cyclic voltammetry*“, CV), bei der die angelegte Spannung der Arbeitselektrode auf der das Enzym adsorbiert ist, kontinuierlich variiert wird und die resultierende Stromstärke aufgenommen wird. Dadurch ändert sich das Redoxpotential für das adsorbierte Enzym. Wird bei höheren Elektrodenpotentialen ein positiver Stromfluss gemessen, deutet dies auf die Oxidation des Substrates hin. Wird das Elektrodenpotential verringert, so nimmt auch die Stromstärke ab und es erfolgen zunehmend reduzierende Reaktionen.

Mit dieser Methode können die Potentiale ermittelt werden, die nötig sind um die enzymatische Katalyse der Reduktion oder Oxidation zu ermöglichen. Durch den Vergleich mehrerer aufeinanderfolgender Zyklen eines Proteinfilms kann zudem die Stabilität des Enzyms abgeschätzt bzw. mögliche Reaktivierungsprozesse offenbart werden.

Bei der Untersuchung der löslichen Hydrogenase wird üblicherweise in einem Potentialbereich von -800 mV bis 200 mV mit einer Scanrate von $0.01 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ gemessen.

2.5.3 Chronoamperometrie

Bei der Chronoamperometrie wird die Spannung der Arbeitselektrode während der Messung konstant gehalten. Die angelegte Spannung wird so gewählt, dass das Redoxpotential des Enzyms für die Katalyse geeignet ist. Nun wird Substrat zu dem Reaktionsansatz zugefügt, so dass sich infolge der ablaufenden Redoxreaktionen die gemessene Stromstärke ändert. Die

Messung der Stromstärken bei verschiedenen Substratkonzentrationen kann durch Auswertung mithilfe der Michaelis-Menten-Kinetik zur Bestimmung der K_M -Werte dienen.

Das bei der Chronoamperometrie verwendete Potential beträgt für die reduzierenden Reaktionen -0.65 mV für die Oxidationen -0.1 mV.

2.6 Spektroskopische Untersuchungen der *HtSH*

Alle spektroskopischen Experimente mit Proben der isolierten *HtSH* wurden in Zusammenarbeit mit Stefan Wahlefeld und Christian Lorent aus der AG Hildebrandt durchgeführt.

2.6.1 IR-Spektroskopie

Für die Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Schwingungsspektroskopie wurden je 8 μL der 0.3 mM SH-Proben im Luft-oxidierten („*as-isolated*“) und chemisch reduzierten Zustand in eine gasdichte, temperaturkontrollierte IR-Flüssigkeitszelle mit CaF_2 -Fenster (optische Länge 50 μm) überführt. Die FTIR-Spektren mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} wurden mit einem Bruker Tensor 27 FTIR Spektrometer (Bruker, Deutschland), das mit einer globaTM-Infrarotlichtquelle, einem ROCKSOLID™- Interferometer sowie mit einem durch flüssigen N_2 gekühlten Mercury-Cadmium-Tellurid (MCT)-Detektor ausgestattet ist, aufgenommen. Die Probenkammer wurde mit einem Peltierelement auf $10\text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Je 200 Scans wurden zu einem Spektrum zusammengefasst. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden die zweiten Ableitungen der aufgezeichneten Absorptionsspektren gebildet und interpretiert. Dazu wurde die Bruker Opus Software Version 5.5 oder höher verwendet.

2.6.2 IR-Spektroelektrochemische Untersuchung

Für die spektroelektrochemischen Experimente wurde die 0.3 mM *HtSH*-Probe zunächst anaerob mit 2 mM TCEP in einer OTTLE (engl.: „*optically transparent thin layer electrochemical*“)- Zelle (Moss *et al.*, 1990) mit einer optischen Weglänge unter 10 μm aktiviert. Zur Vermeidung der Protein-Adsorption wurde die Goldnetz-Arbeits Elektrode mit einem selbst-assemblierenden Monolayer aus 1 mM Cysteamin und 1 mM Mercaptopropionsäure (in Ethanol) anaerob für 30 min inkubiert. Die Vorbereitung der

OTTLE-Zelle erfolgte anaerob in einer Argon-gefüllten Box. Zur schnellen Äquilibriumierung des jeweils angebrachten Potentials wurden folgende, verschiedene Redox-Mediatoren mit einer Konzentration von je 0.5 mM zur Proteinlösung verwendet: TMPPO (+262 mV), 1,2-Naphthoquinon (+145 mV), 1,4-Naphthoquinon (+60 mV), Methylenblau (+11 mV), IndigoTrisulfat (-80 mV), Indigo Disulfat (-130 mV), 2-hydroxy-1,2-Naphthoquinon (-139 mV), Resorufin (-195 mV), Anthraquinone-2-sulfonat (-225 mV), Safranin T (-290 mV), Benzylviologen (-358 mV), Methylviologen (-446 mV).

Die Potential-abhängigen IR-Spektren wurden mit einer spektralen Auflösung von 2 cm^{-1} mithilfe eines Bruker IFS 66 FTIR Spektrometers, ausgestattet mit einem flüssig N_2 -gekühlten MCT- Detektor, bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Zur Potentialkontrolle wurde ein Model 263 A Potentiostat (Princeton Applied Science) mit der PARControl 1.05 Software verwendet. Die Äquilibriumierung der Potentiale erfolgte für mindestens 3 min bis keine Veränderung im IR-Spektrum zu beobachten war.

2.6.3 EPR-Spektroskopie

Die 9.29 GHz-X-Band-Spektren der *HtSH*-Proben wurden mit einem Bruker EMXplus Spektrometer in Kombination mit einem ER 4122 SHQE Resonator und einem Oxford EPR 900 Helium Flusscryostaten bei Temperaturen zwischen 5 und 310 K aufgenommen. Die Basislinien-Korrektur des Spektrums erfolgte durch Messen des Puffers unter gleichen Bedingungen und Abziehen des resultierenden Hintergrundspektrums. Simulationen der Spektren wurden mit der MATLAB Toolbox EasySpin Version 5.1.7 durchgeführt.

2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.7.1 SDS-PAGE

Benötigte Puffer und Lösungen:

SDS-Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl, 40 % w/v Glycerin, 500 mM DTT, 0.1 % Bromphenolblau, 5 % w/v SDS; pH 6.8
Tris/Glycin-Laufpuffer:	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % w/v SDS, pH 8.3

Mit der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli (1970) können Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Aufgrund der Anlagerung von SDS

(engl.: „*sodium dodecyl sulfate*“) erfolgt die Wanderung in dem Gel fast ausschließlich proportional zu den Molekulargewichten der Proteine.

Die SDS-Polyacrylamidgele beinhalten zwei Phasen, die sich in ihrem Acrylamidanteil und damit ihrem Polymerisierungsgrad unterscheiden. Auch die pH-Werte sind unterschiedlich. Die obere Phase, das Sammelgel, ist weniger polymerisiert, so dass die Proteine leichter das Gel durchwandern, bis sie sich an der Grenze zu der dichteren, unteren Phase sammeln. Dort ist der Polymerisierungsgrad höher und die Wanderung durch das Gel erschwert.

Beim Gießen der Gele werden zunächst ca. 5 ml des Trenngels in die Kammern gefüllt und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, damit Luftblasen und ungerade Lauffronten verhindert werden. Nachdem das Gel ausgehärtet ist, wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel darüber geschichtet. Um Taschen für die Proteinproben zu formen wird ein Kamm in das noch flüssige Gel eingesetzt. Diese Taschen werden, nach der vollständigen Polymerisierung und dem Einsetzen in die Vorrichtung der Laufkammer, mit den Proben beladen. Zur Vorbereitung der Proben werden jeweils 0.25 Volumen SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proben zweimal 5 min. im Wasserbad bei 90-100 °C aufgeköcht und anschließend kurz in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Kammer wird mit SDS-haltigem Tris/Glycin-Laufpuffer befüllt und die Elektrophorese nach Beladen des Geles bei 35 mA für 40 min durchgeführt. Zur Größenabschätzung wird ein Proteinmarker mit aufs Gel aufgetragen (Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-Rad). Die genauen Zusammensetzungen der beiden Gele sind in **Tabelle 6** ersichtlich.

Tabelle 6. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Durchführung einer SDS-Gelelektrophorese

Komponente	12.5 %-iges Trenngel für 2 Gele	Sammelgel für 2 Gele
	[mL]	[mL]
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	5	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	2.5
Rotiphorese Gel A 30 % Acrylamid	4.05	1.62
Rotiphorese Gel B 2 % Bisacrylamid	1.69	0.675
10 % w/v SDS	0.1	0.05
10 % w/v APS	0.1	0.07
TEMED	0.005	0.007

2.7.2 Coomassie-Färbung

Benötigte Puffer und Lösungen:

Färbelösung:	0.5 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 2 g Coomassie Brillant Blue R-250, 425 mL Ethanol, 100 mL Eisessig, 50 mL Methanol; ad 1000 mL ddH ₂ O
Entfärbelösung	250 mL Methanol, 50 mL Eisessig; ad 1000 mL ddH ₂ O

Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die Proteine in dem Polyacrylamidgel mithilfe einer Färbelösung sichtbar gemacht werden. Die Methode beruht auf der Anlagerung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an Proteine. Insbesondere die Bindung an basische Aminosäuren durch elektrostatische Kräfte und van-der-Waals-Wechselwirkungen stabilisiert den anionischen, blaugefärbten Zustand des Farbmoleküls (Meyer und Lambert, 1965). Die Detektionsgrenze liegt dabei bei etwa 0.1 µg Protein.

Die Färbung erfolgt durch Schwenken des Gels in der Färbelösung für etwa 30 min bei RT. Nach Entfernen der Farblösung erfolgt die Entfärbung durch Zugabe der Entfärbelösung. Die Entfärbelösung wird 2-3 mal gewechselt, bis der Hintergrund vollständig farblos ist.

2.7.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen nach dem Western-Blot-Verfahren

Benötigte Puffer und Lösungen:

„fast semidry transfer“ Puffer:	48 mM Tris-HCl, 20 mM HEPES
TBS-T	50 mM Tris-HCl, 270 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.05 % (w/v) Tween@20, pH 8.0
Blocking-Lösung	TBS-T mit 5% (w/v) Milchpulver
Entwickler-Lösung	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ pH 9,5
BCIP	50 mg · mL ⁻¹ in 100 % DMSO
NBT	50 mg · mL ⁻¹ in 70 % DMSO

Nachdem die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt wurden, können sie auf eine Nitrozellulosemembran (BioTrace™, Pall Corporation, Dreieich, Deutschland) übertragen und anschließend spezifisch mithilfe von Antikörpern detektiert werden. Die elektrophoretische Übertragung aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran

wurde nach dem semi-dry-Verfahren in einem Trans-Blot®Turbo™ Transfer System (BioRad) bei 1.3 A und 25 V für 10 min durchgeführt. Die Membran sowie zwei Whatmanpapiere (3 mm Dicke) wurden zuvor in einem Puffer aus 48 mM Tris und 20 mM HEPES (Garić *et al.*, 2013) getränkt.

Nach dem Transfer wird die Nitrozellulosemembran über Nacht oder mindestens für 1 h bei RT in der Blockinglösung geschwenkt, um unspezifische Antikörperbindungen an die Membran zu verringern. Danach wird die Membran 3-mal für etwa 10 min in TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers (**Tabelle 7**) für mindestens 1 h bei RT. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an eine der SH-Untereinheiten und stammt aus Kaninchenserum. Nach dem erneuten Waschen der Membran für 3 mal 10 min in TBS-T erfolgt die Bindung des sekundären Antikörper-Konjugats für 1 h bei RT. Dieses Konjugat, welches den primären Kaninchen-Antikörper bindet, ist an eine alkalische Phosphatase gekoppelt. Nach erneutem Waschen wird die Färbereagenz aus 90 µL BCIP und 70 µL NBT in 20 mL Entwicklerlösung frisch angesetzt und auf die Membran gegeben. Die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers setzt das Substrat BCIP zu einem violetten Indigofarbstoff um. Die Membran wird nun im Dunkeln bei RT so lange inkubiert, bis deutliche Proteinbanden zu erkennen sind.

Tabelle 7. Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Verwendete Verdünnung
α-HoxF (AK61)	1:2500 in TBS-T
α-HoxU (AK60)	1:3300 in TBS-T
α-HoxH (AK59)	1:25000 in TBS-T
α-HoxY (AK62)	1:5000 in TBS-T
α-Kaninchen-AK-AP- Konjugat (Dianova)	1:10000 in TBS-T

2.8 DNA-Grundtechniken

2.8.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Die Sterilisierung von verwendeten Geräten und Lösungen erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C in gesättigtem Wasserdampf für 20 min. Das Trocknen erfolgte im Trockenschrank bei 70 °C für 1-2 Tage. Chemikalien, die hitzelabil sind wurden mit Filtern der Porengröße $\leq 0.2 \mu\text{m}$ sterilfiltriert und in autoklavierte Behälter überführt.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von DNA-Mengen erfolgte entweder visuell durch Vergleich der Bandenintensität mit dem verwendeten Standard im Agarosegel oder durch Absorptionmessung einer gelösten DNA-Probe im NanoDrop bei 260 nm.

2.8.3 Restriktionsverdau

Für die Konstruktion von Plasmiden mit gewünschten DNA-Sequenzen müssen die Strangenden der Insertfragmente kompatibel mit denen des Vektors sein, damit die Ligation erfolgen kann. Dazu werden die Plasmide, aus denen die zu verknüpfenden Fragmente stammen, mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Der Ansatz wird dafür wie folgt zusammenpipettiert: zwischen 5-20 μL des isolierten Plasmides (max. 1 μg) werden zusammen mit 5 Units Restriktionsenzym und 3 μL des entsprechenden Puffers mit autoklavierten, DNase-freiem ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 30 μL aufgefüllt. Abhängig von dem Temperaturoptimum der Restriktionsendonuklease werden die Ansätze bei 37 °C mind. 1 h im Wasserbad inkubiert. Auch das als Vektor dienende Plasmid wird mit Restriktionsenzymen geschnitten und zusätzlich mit 1 U einer alkalischen Phosphatase (engl.: „*cal*f intestinal phosphatase“, CIP, New England Biolabs) behandelt, die durch die Dephosphorylierung der entstehenden 5'-DNA-Enden eine Rezirkulation verhindern soll. Die entstandenen Fragmente wurden nach dem Verdau mithilfe der Gel-Elektrophorese anhand ihrer Größe und Konformation aufgetrennt. Die gewünschten Abschnitte wurden unter der UV-Lampe aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe eines Extraktionskits (QIAEX II® Gel Extraction Kit) aus dem Gel gereinigt.

2.8.4 Ligation

Die geschnittenen und gereinigten Vektoren und die Insertfragmente wurden für die Ligation zusammen mit T4-Ligasepuffer und der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Eppendorfgefäß angesetzt. Dabei wurde ein Verhältnis von 3:1-Insert zu Vektor gewählt und entsprechende Mengen der jeweiligen Fragmente eingesetzt. Die Ligation erfolgt dann bei 16 °C über Nacht.

2.9 DNA-Isolierung

2.9.1 Plasmidisolierung: Mini-Präparation

Je nach Art und Ursprung des Plasmides sowie der weiteren Verwendung wurde die Methode der Isolierung ausgewählt. Für *high-copy* Plasmide aus *E. coli* genügen bereits wenige mL der entsprechenden LB-Übernachtskultur zur Isolierung mithilfe des Invisorb Kits (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two). Dabei wurde besonders für größere Fragmente jedoch nicht mit dem mitgelieferten Elutionspuffer sondern mit vorgewärmten 1 mM Tris eluiert. Alternativ kann eine größere Zahl von Kulturen schnell nach einer abgeänderten Methode von Birnboim und Doly (1979) alkalisch lysiert und die Plasmide isoliert werden.

Benötigte Puffer und Lösungen:

P1-Puffer: 50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 8; 100 µg · mL⁻¹ RNase A

P2-Puffer: 0.2 N NaOH; 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer: 3 M Kaliumacetat pH 4.8

Dazu wurden 1.5 mL der Übernachtskultur durch einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (13.800 rpm) geerntet und das Pellet mit 100 µL P1-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µL P2 wurde durch vorsichtiges Schwenken des Eppis der Ansatz gemischt und eine Minute bei Raumtemperatur zur vollständigen Lyse inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µL des P3-Puffers und es wurde erneut vorsichtig durch 5-6-maliges Invertieren des Eppendorfgefäßes gemischt. Durch Zentrifugation bei v_{\max} für 5 min wurden die Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Nach erneutem Zentrifugieren und Überführen des Überstandes wurde durch Zufügen von 1 mL eiskaltem, 96%-igem Ethanol die DNA ausgefällt. Anschließend wurde für 15 Minuten bei v_{\max} zentrifugiert und der Überstand dann gut entfernt. Mit 0.5 mL eiskaltem, 70%-igem Ethanol wurde das Pellet gewaschen und nochmals 5 Minuten zentrifugiert. Der Ethanol wurde danach

gut entfernt und das Pellet 10 Minuten vakuumgetrocknet. Das transparente bis leicht weißliche Pellet wurde mit 50 µL autoklaviertem, DNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.9.2 Isolierung von *low-copy*-Plasmiden mithilfe von Anionenaustauschersäulen

Benötigte Puffer und Lösungen:

P1-Puffer:	50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 8; 100 µg · mL ⁻¹ RNase A
P2-Puffer:	0.2 N NaOH; 1 % w/v SDS
P3-Puffer:	3 M Kaliumacetat pH 5.5
Puffer FWB2	1 M Kaliumacetat pH 5
<i>(QIAfilter wash buffer):</i>	
Puffer QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% v/v Isopropanol;
<i>(equilibration buffer):</i>	15% v/v Triton® X-100
Buffer QC (<i>wash buffer</i>):	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% v/v Isopropanol
Buffer QF (<i>elution buffer</i>):	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 15% v/v Isopropanol

Low-copy Plasmide wurden hingegen aus 100 mL Übernachtskultur mithilfe einer QIAGEN® TIP 100-Säule isoliert, so dass eine ausreichend hohe Konzentration des Plasmides erhalten wird. Für anschließende Klonierungen, z. B. mit pEDY, wurde diese Methode gewählt. Auch für die Isolierung von Plasmiden aus *R. eutropha* wurde nach diesem Protokoll vorgegangen. Die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers mit den mitgelieferten Lösungen (QIAGEN® Plasmid Midi Kit). Zur Steigerung der Ausbeute kann das Eluat nach dem Durchlaufen der Säule ein zweites Mal aufgetragen werden.

2.9.3 Agarosegelelektrophorese

Benötigte Puffer und Lösungen:

TPE-Puffer:	80 mM Tris; 8 mM EDTA; pH 7.6
Schwere Lösung:	20 % w/ v Ficoll 400; 0.05 % v/ v Bromphenolblau

Nukleinsäuren verschiedener Größe und Herkunft lassen sich mithilfe der Agarosegelelektrophorese voneinander trennen und identifizieren. Dazu wurde zunächst

Agarose in Elektrophoresepuffer aufgeköcht, ein Gelfärbemittel wie z. B. GelRed hinzugefügt und dieses Gemisch in eine Gelkammer geschüttet. Ein Kamm wurde eingesetzt und nach Aushärten des Geles konnte die Kammer mit Puffer gefüllt und die Geltaschen mit den Proben beladen werden. Davor wurden die Proben noch mit Schwerer Lösung versetzt, die zum Beschweren der Probenlösung dient und ein Auslaufen aus der Tasche verhindert. Die Menge der eingesetzten Agarose richtete sich nach der Größe der Fragmente, die aufgetrennt werden sollen. Handelt es sich um große DNA-Fragmente, wurde weniger Agarose eingesetzt, so dass der Widerstand im Gel abnimmt und kleinere Fragmente wesentlich schneller im Gel wandern können als die größeren. Sollten kleine Fragmente voneinander getrennt werden, wurden die Agarosemenge und damit der resultierende Wanderungswiderstand erhöht. Für die spätere Größenordnung der Banden werden zwischen 6-8 μL des 2-log-Markers (New England Biolabs) aufs Gel aufgetragen.

Das Gel wurde gestartet und lief bei 90 V und 400 mA etwa 45 min.

Nach dem Stoppen der Elektrophorese sind die Banden der DNA-Fragmente unter der UV-Lampe im Gel zu erkennen und das Gel kann fotografiert werden.

2.10 Plasmidtransfer

2.10.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Benötigte Puffer und Lösungen:

TFB 1: 10 mM CaCl_2 ; 15 % (v/v) Glycerin; 30 mM Kaliumacetat pH 5.8; 100 mM RbCl_2 ; 50 mM MnCl_2

TFB2: 10 mM MOPS pH 7; 10 mM RbCl_2 ; 15 % (v/v) Glycerin; 75 mM CaCl_2

Für die Transformation von Plasmiden in *E. coli*-Zellen müssen die Zellen des zu transformierenden Stammes zunächst kompetent gemacht werden. Dies kann chemisch ähnlich wie bei der Calciumchlorid-Methode auch durch die Behandlung mit Rubidiumchlorid erfolgen. Dazu wurde eine 10 mL-Übernachtskultur mit dem entsprechenden Stamm in LB-Medium angeimpft. Mit 1 mL dieser Kultur wurde am folgenden Tag die Hauptkultur angeimpft und ebenfalls bei 30 °C und 170 rpm geschüttelt. Das für die Hauptkultur verwendete LB-Medium sollte beim Beimpfen vorgewärmt sein und das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD verfolgt. Erreichte die Kultur eine OD_{600} von etwa 0.5 wurden die Zellen in ein steriles 50 mL-Falcon-Gefäß überführt und auf Eis für 5 min. gekühlt. Von

hier an wurde nur noch auf Eis und in vorgekühlten Zentrifugen bei 4 °C gearbeitet. So erfolgte das Ernten durch Zentrifugation bei 4000 · g für 5 min und bei 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Zellpellet mit 30 mL gekühltem TFB1-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 90 min auf Eis inkubiert, bevor sie erneut durch Zentrifugation bei 4000 · g für 5 min gewaschen werden. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet nun in 4 mL eiskaltem TFB2-Puffer aufgenommen. Von der Suspension wurden 100 µL-Aliquots auf 2 mL-Eppendorfgefäße verteilt und sofern sie nicht sofort verwendet werden sollten noch mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.10.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von Plasmiden aus *E. coli* in die vorbereiteten chemokompetenten Zellen erfolgt nach dem „*high efficiency transformation protocol*“ aus dem New England Biolabs-Katalog. Dazu wurden die eingefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut und zwischen 2-15 µL des Ligationsansatzes oder des isolierten Plasmides hinzugefügt. Die eingesetzte Menge richtet sich dabei nach der Art des Plasmides. Bei großen Vektoren wird mehr eingesetzt, bei den kleineren genügen wenige µL um eine ausreichend hohe Anzahl der Konstrukte zu übertragen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis und der anschließende Hitzeschock bei 42 °C für maximal 3 min sorgt für die erhöhte Aufnahmefähigkeit von DNA in die Zellen. Bevor 950 µL SOC-Medium zugegeben werden, erfolgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Zur Regeneration in dem Vollmedium wird der Transformationsansatz daraufhin eine Stunde bei 30 °C geschüttelt. Nun wurden von dem Ansatz etwa 800 µL und 150 µL auf je eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotika zur Selektion der Transformanten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

2.10.3 Herstellung elektrokompenter *R. eutropha*-Zellen

Auch bei der Transformation von Plasmiden in *R. eutropha*-Zellen mittels Elektroporation ist eine Vorbehandlung der entsprechenden Zellkulturen nötig. Dafür wurde aus einer 10 mL NB-*R. eutropha*-Übernachtskultur mit 100 µL die Hauptkultur von 100 mL NB-Medium angeimpft. Das Wachstum erfolgte bei 30 °C, bis eine OD₄₃₆ zwischen 0.3-0.5 erreicht ist. Dann wird die Kultur in 50 mL-Falcon-Gefäßen überführt und auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation bei 4000 · g und 4 °C für 10 min wurden die Zellen geerntet. Das Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes in 100 mL sterilem 10%-igem, eiskaltem Glycerin resuspendiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde

noch zweimal wiederholt. Das Pellet wurde dann in etwa 2 mL 10%-igem Glycerin aufgenommen und die Zellsuspension in 40 μ L-Aliquots auf 2 mL Eppendorfgefäße verteilt. Die Zellen können entweder direkt für die Elektroporation verwendet werden oder durch schockfrieren mit flüssigem Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Wie auch bei der Herstellung chemokompetenter Zellen sinkt durch das Einfrieren jedoch die Kompetenz, d.h. die Anzahl der zu erwartenden Transformanten nimmt deutlich ab.

2.10.4 Elektroporation von *R. eutropha*

Das Einbringen von Plasmiden und DNA-Konstrukten in *R. eutropha* kann neben der Konjugation auch mithilfe der Elektroporation geschehen. Die dafür vorbereiteten Zellen, die durch die Waschschritte möglichst frei von Salzen sein sollten, wurden dazu auf Eis aufgetaut und mit 1-5 μ L der DNA-Lösung vermischt. Nach einer Minute Inkubation auf Eis wurde die Zelllösung in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt und mit einem elektrischen Puls von 2500 Volt, 25 μ F und 200 Ω versetzt. So schnell wie möglich wurde 1 mL NB-Medium hinzugegeben und die Lösung mit den Zellen zur Regeneration der beschädigten Zellwand 1 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Glasröhrchen geschüttelt. Danach wurden 800 μ L und 200 μ L auf je eine Agarplatte mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und 2-3 Tage bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wachsen gelassen.

2.10.5 Konjugation

Für den Austausch von Plasmiden aus *E. coli* S 17-1 in *R. eutropha* durch Konjugation nach dem Spot-mating-Verfahren (Simon *et al.*, 1983) wurden zunächst 10 mL über Nacht-Kulturen angezogen. Nach dem Ernten von je 1.5 mL durch Zentrifugation bei $4000 \cdot g$ für 10 min und dem 3-maligen Waschen in 1 ml H16-Puffer wurden 200 μ L der resuspendierten Pellets auf einer NB-Agarplatte ohne Antibiotika ausplattiert und mind. 5 h wachsen gelassen. Danach wurde der Rasen von der Platte abgeschabt und in 1 mL H16-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Waschen durch Zentrifugation bei $4000 \cdot g$ für 10 min und dem Resuspendieren in 1 mL H16-Puffer werden Verdünnungen der Zellsuspension angesetzt. Pro Verdünnung wurden nun 350 μ L auf einer FN-Agarplatte mit Antibiotika zur Selektion ausplattiert und etwa 3 Tage bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wachsen gelassen.

2.10.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR (Mullis & Faloona, 1987) wurden zum Einen genetische Veränderungen wie Basenaustausche oder Deletionen in Plasmiden vorgenommen. Zum anderen wurde sie auch zur Überprüfung und Amplifizierung von DNA-Sequenzen genutzt. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide ist in **Tabelle 8** aufgeführt. Je nach Zweck der PCR wurden 25 µL- oder 50 µL-Ansätze in PCR-tubes angesetzt und nach Zugabe der Polymerase im Thermocycler C1000 (Bio-Rad) mit einem entsprechenden Protokoll inkubiert.

Tabelle 8. Liste der verwendeten Oligonukleotide

Primerbezeichnung	5' → 3'
pCM66 fwd	CACTTTATGCTTCCGGCTCG
pCM66 rev	CCTCTTCGCTATTACGCCAG
RehoxFU fwd	GAT CGA ACG ATG GCA GC
RehoxFU rev	GTT ATC GCC GCG TAT GC
RehoxF D467S	CGC AAG CTC GCG TAC GAA TCG CTT <u>TCG</u> TGC AAT GGC GCC
RehoxF E341A	ATC TGC GGC GAC <u>GCA</u> TCG GCG CTC ATC
RehoxF S342R fwd	CTTATATCTGCGGCGACGCACGCGCGCTCATCGAGTCCTGCG
RehoxF S342R rev	CGCAGGACTCGATGAGCGCGCGTGCCTCGCCGAGATATAAG
RehoxF K358R fwd	CCTTGCTGCACCGGGAACGGAGGGCGCACCCGTGGCGTGCC
RehoxF K358R rev	GGCACGCCACGGGTGCGCCCTCCGTTCCCGGTGCAGCAAGG
HthoxU rev	GAACGTGACCCACTCTG
HthoxF fwd	GATGCCCGACTCGAC
HthoxF E319AS320R xhoI fwd	CGCGTACGTCTGCGGCGAAGCTCGAGCATTGATCGAATCGCTGGAA GGAAAACC
HthoxF rev E319AS20R xhoI rev	GGTTTTCTTCCAGCGATTTCGATCAATGCT <u>TCGAGCT</u> TCGCCGCAGAC GTACGCG
HtHoxY 6-His fwd	CTGAAGCGATGAGCGACAAGGAGCGCTACACATGCATCATCACCATC <u>ACCACACCTCTGCCGCACCCTCCGCGATGCCTCCCCGAAAAATC</u>
HtHoxY 6-His rev	GATTTTTTCGGGAGGCATCGCGGAGGGTGCGGCAGAGGT <u>GTGGTGA</u> <u>TGGTGATGATGCATGTGTAGCGCTCCTTGTGCTCATCGCTTCAG</u>
HtHoxY fwd	ACTTCAAAGCGGCGGGATTC
HtHoxY rev	CGAGCCAGATGGTGACCTTG
HtHoxY fwd 2	CAGTCTGGCCGAAGGGAAAG
HtHoxFU invPCR rev	GCCGTTCCGGTACTGAGTTGTCATGTGTAGCGCTCCTTGTGCG
HtHoxFU invPCR fwd	CAACTCAGTACCCGGAACGGCC
HtHoxHY invPCR rev	GAGGGTGCGGCAGAGGTCATGGTTCTCCTCCTCGTGTGCG
HtHoxHY invPCR fwd	ATGACCTCTGCCGCACCCTC
ReHoxY NcoI fwd	CTGCGACGCC <u>AT</u> GGATCCGG
ReHoxW XbaI rev	CGCGTTCTCTTCTAGATGATTTACGAGGTTTGACG
ReHoxH QxxQ106ExxE fwd	CTACGCGGAGATGCTCGAGTCCCATACGAC
ReHoxH Q106E fwd	CTACGCGGAGATGCTCCAGTCCCATACGAC

Re delta <i>HoxHY</i> SacI fwd	GCCTGAATGTCGAGCTCAACGACC
Re delta <i>HoxHY</i> XbaI rev	CAAAGACCGAGATCTCCAGCG

2.10.6.1 Kolonie-PCR

Sollten ganze Zellen bzw. Kolonien auf die Anwesenheit eines Ligationsproduktes oder einer genomischen Deletion überprüft werden, wurde typischerweise auf die *Taq*-Polymerase zurückgegriffen und 25 µL-Ansätze gewählt, in die Zellmaterial mit sterilen Pipettenspitzen eingebracht wurde. Die Ansätze wurden wie in **Tabelle 9** und **Tabelle 10** aufgeführt, angesetzt.

Tabelle 9. PCR-Ansätze mit der *Taq*-Polymerase

Komponente	25 µL Reaktion	50 µL Reaktion	Finale Konzentration
10X ThermoPol Reaktionspuffer	2.5 µL	5 µL	1X
10 mM dNTPs	0.5 µL	1 µL	200 µM
10 µM <i>Forward</i> Primer	0.5 µL	1 µL	0.2 µM (0.05–1 µM)
10 µM <i>Reverse</i> Primer	0.5 µL	1 µL	0.2 µM (0.05–1 µM)
Template DNA	variabel	2 µL	<1,000 ng
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.125 µL	0.25 µL	1.25 U pro 50 µL PCR
Nuklease-freies ddH ₂ O	ad 25 µL	ad 50 µL	

Tabelle 10. PCR-Protokoll der *Taq*-Polymerase

	Schritt	Temperatur	Dauer
30 Zyklen	Initiale Denaturierung	95°C	30 s -3 min
	Denaturierung	95°C	15-30 s
	Primer Anlagerung	45-68°C	15-60 s
	Verlängerung	68°C	1 min pro kbp
	Finale Verlängerung	68°C	5 min
	Lagerung	4-10°C	

2.10.6.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten oder Basenaustausche enthalten, wurde die Q5® High-Fidelity-Polymerase verwendet, da sie

eine geringere Fehlerrate besitzt und auch für längere PCR-Produkte geeignet ist. Die Ansätze und Protokolle der Polymerasen sind in **Tabelle 11** und **Tabelle 12** aufgeführt. Einfache Basenaustausche wurden überwiegend nach einem modifizierten QuikChange™-Protokoll (Pfaffmann *et al.*, 2013) in Plasmide eingebracht. Längere Deletionen, Insertionen von Protein-*tag*-kodierenden Sequenzen oder Basenaustausche in größere Plasmide wurden mithilfe der MEGAWHOP-Klonierung (Miyazaki, 2011) vorgenommen. Hierbei wurde der zu verändernde DNA-Bereich zunächst mit einem Primerpaar in einer gewöhnlichen PCR amplifiziert. Dabei beinhaltet einer der Primer den Basenaustausch oder die Deletion. In einer zweiten, anschließenden PCR (**Tabelle 13**) diente das PCR-Produkt der ersten PCR als Megaprimer für die Amplifikation des vollständigen Plasmids. Nach Restriktionsverdau des methylierten Templates mit DpnI, kann das PCR-Produkt transformiert werden.

Tabelle 11. PCR-Ansätze mit der Q5-Polymerase

Komponente	25 μ L Reaktion	50 μ L Reaktion	Finale Konzentration
5X Q5 Reaktionspuffer	5 μ L	10 μ L	1X
10 mM dNTPs	0.5 μ L	1 μ L	200 μ M
10 μ M <i>Forward</i> Primer	1.25 μ L	2.5 μ L	0.5 μ M
10 μ M <i>Reverse</i> Primer	1.25 μ L	2.5 μ L	0.5 μ M
Template DNA	variable	2 μ L	< 250 ng
5X Q5 High GC Enhancer (optional)	(5 μ L)	(10 μ L)	1x
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0.25 μ L	0.5 μ L	1.0 U pro 50 μ L PCR
Nuklease-freies ddH ₂ O	ad 25 μ L	Ad 50 μ L	

Tabelle 12. PCR-Protokoll der Q5-Polymerase

	Schritt	Temperatur	Dauer
	Initiale Denaturierung	98°C	60 s
25-35 Zyklen	Denaturierung	98°C	5–10 s
	Primer Anlagerung	64°C	10–30 s
	Verlängerung	72°C	20–30 s pro kbp
	Finale Verlängerung	72°C	2 min
	Lagerung	4–10°C	

Tabelle 13. PCR-Protokoll der MEGAWHOP-Klonierung

	Schritt	Temperatur	Dauer
	Initiale Denaturierung	98°C	3 min
5 Zyklen	Denaturierung	98°C	30 s
	Primer Anlagerung	55°C	60 s
	Verlängerung	72°C	60 s
25 Zyklen	Denaturierung	98°C	30 s
	Verlängerung	72°C	20–30 s pro kbp
	Finale Verlängerung	72°C	5-10 min
	Lagerung	4–10°C	

2.10.7 Homologe Rekombination

Für den Allelaustausch durch homologe Rekombination wurden die Vektoren pLO1 und pLO2 (O Lenz *et al.*, 1994) verwendet. Diese basieren auf dem ColE1-Replikon und tragen neben dem Gen für Kanamycinresistenz auch das für die meisten gramnegativen Bakterien letale Gen *sacB*. Dieses kodiert das Enzym Levansucrase aus *Bacillus subtilis*, welches aus Saccharose unter Glukosefreisetzung entstehende Fruktosylreste zu Levan polymerisiert. Dieses sammelt sich im Periplasma gramnegativer Bakterien an und führt zur Lysis der Zellen (Gay *et al.*, 1985).

In die Multi-Cloning-Site dieser Plasmide wurden DNA-Fragmente mit homologen Bereichen (etwa 500 bp – 2 kbp) zu dem auszutauschenden Allel eingebracht. Das Plasmid wurde dann von *E. coli* S17-1 nach *R. eutropha* transferiert. Erst die Integration des Plasmids ins Genom ermöglicht die stabile Replikation, sodass auf FN-Selektionsplatten nur Klone mit integriertem Plasmid wachsen können. Diese wurden dann in NB-Medium ohne Antibiotikum wachsen gelassen, so dass eine zweite Rekombination d.h. die Exzision des integrierten Plasmids stattfinden kann. Verdünnungen aus diesen Kulturen wurden auf Saccharose-haltigen LSLB-Platten (Tabelle 3) ausgestrichen und 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien, die nach Ausplattieren auf Selektionsplatten keine Resistenz mehr zeigten, wurden mittels Kolonie-PCR (2.10.6.1) überprüft und unter autotrophen Wachstumsbedingungen (2.2.3) auf die Abwesenheit der SH getestet.

2.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Kolonien der Transformanten erfolgte durch die Firma Sequenzierservice ABI BigDye-Terminator-Chemie SMB Services in Molecular Biology durchgeführt.

2.12 Enzyme und Chemikalien

Chemikalien und Biochemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Biotline GmbH, (Luckenwalde), BIO-RAD (München), Boehringer (Mannheim), DIFCO (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München). Nitrocellulosemembranen und Blotpapier stammten von Schleicher & Schüll (Dassel). Ultrafiltrationseinheiten lieferte die Firma Millipore (Eschborn). Gase lieferte die Firma Air Liquide (Düsseldorf). Deionisiertes und gereinigtes Wasser (Millipore-H₂O) wurde mit einem MembraPure Aquintus (membraPure, Bodenheim) bei einem spezifischen Widerstand von $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ hergestellt. Kristallisationspuffer und -platten wurden von Hampton Research (USA) und Jena Bioscience (Jena) bezogen. Restriktionsendonukleasen, Polymerasen und andere DNA-modifizierende Enzyme lieferten New England Biolabs (Frankfurt) und Invitrogen (Karlsruhe). Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (München) und Sigma (München) bezogen.

2.13 Dokumentation und Datenverarbeitung

Die Betrachtung von DNA-Sequenzen und Plasmiden sowie die Ausarbeitung von Klonierungsstrategien erfolgten mithilfe der Software VectorNTI, CLC sequence viewer und ApE. Vergleiche von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der SH Varianten wurden online mit den Programmen BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), ClustalW (Goujon *et al.*, 2010) und Clustal Ω (Sievers *et al.*, 2014) erstellt bzw. mit Jalview (<http://www.jalview.org/>) oder TCOFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/>) durchgeführt. SDS-PAGE-Gele und Western-Blots, sowie Agarplatten wurden abfotografiert und mithilfe von Adobe Photoshop X4 und Microsoft PowerPoint 2010 oder höher digital bearbeitet.

Zur Ermittlung der K_M -Werte wurden die spezifischen Aktivitäten mithilfe von CaryWin 3.0 und Microsoft Excel 2010 oder höher aus den erhaltenen Messwerten berechnet und die entsprechenden Kinetiken durch Origin 2016 dargestellt.

Zum strukturellen Vergleich und der Darstellung von Kristallstrukturen wurde mit PyMOL 1.8.4.1 gearbeitet. Die pdb-Dateien der Kristallstrukturen wurden von der Datenbank <http://www.rcsb.org/> bezogen. Homologiemodelle wurden mithilfe des SWISS-MODEL-Servers (swissmodel.expasy.org) erstellt.

Die Erstellung der Strukturformeln zum katalytischen Zyklus erfolgt mithilfe von ChemDraw Professional 17.0.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der thermostabilen SH aus *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T (*Ht*)

Neben der löslichen Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch mit einer thermostabilen löslichen [NiFe]-Hydrogenase aus dem thermophilen Organismus *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T gearbeitet. Dieser Organismus ist wie *Ralstonia eutropha* zu chemolithoautotrophen Wachstum mit der Verwendung von H₂ als Energie- und CO₂ als Kohlenstoffquelle fähig (Goto *et al.*, 1977; Hayashi *et al.*, 1999). Diese Fähigkeit lässt auf die Anwesenheit von Hydrogenasen schließen, die gemäß dem Wachstumsoptimum dieses Stammes von 52 °C Thermostabilität aufweisen müssten. Nach der Sequenzierung des Genoms von *H. thermoluteolus* (L. Lauterbach) konnte durch Suche nach *hox*-ähnlichen Genen eine entsprechende Operonstruktur identifiziert werden. Dabei wurden unter anderem die Strukturgene *hoxFUHY* sowie daran anschließend *hoxW* gefunden. Diese wurden wie folgt amplifiziert und in einen geeigneten Vektor kloniert, der erfolgreich in *Ralstonia* übertragen wurde, um die Gene heterolog zu exprimieren. Es wurden Primer erstellt, mit denen die Gene *hoxFUHYW* genomischen DNA aus *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T amplifiziert wurden (s. unten).

5'-agaacctgtactccagggcgcaacacgaggaggaggaac-3'

5'-ctcggatcccgggatccatacctcctcttcgtgggtgaaaaaac-3'

Die unterstrichenen, überhängenden Sequenzen dieser Primer sind komplementär zu einem pCM66-Derivat (pGE837), das eine Sequenz trägt, die P_{SH}-StrepII-TEV-HoxF kodiert. Nach der Linearisierung des Empfänger-Plasmids durch inverse PCR mit den Primern 5'-atggatccccgggtaccga-3' und 5'-gccctggaagtacaggttctcg-3' wurde der amplifizierte *Hthox*-Cluster entsprechend dem „Gibson Assembly“-Protokoll inseriert (New England Biolabs). Das so entstandene P_{SH}-Hox_{StrepII}FUHYW-kodierende Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen Eco53KI und XbaI geschnitten, so dass das resultierende 5.7-kb-Fragment mit dem ScaI-XbaI-verdauten Vektor pEDY309 ligiert werden konnte. Das erhaltene Plasmid (pJP09) wurde in den HoxI-freien *Ralstonia eutropha*-Stamm HF1054 (Massanz *et al.*, 1998) konjugativ übertragen.

3.2 Die thermostabile *HtSH* kann in *Ralstonia eutropha* heterolog produziert werden

In den ersten Versuchen zur Reinigung der heterolog produzierten *HtSH* nach dem Standard-Reinigungsprotokoll für *ReSH* konnte zunächst eine geringe H₂-abhängige Reduktion von NAD⁺ im löslichen Extrakt nachgewiesen werden, allerdings wurde keine Aktivität mehr nach Affinitätschromatographie detektiert. Erst die Zugabe der zweiwertigen Ionen Ni²⁺ und Mg²⁺ (2.3.1, **Abbildung 5**) führte in den nachfolgenden Reinigungen zu einer nachweisbaren, H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivität. Da sich demnach die biochemischen Eigenschaften der *HtSH* von denen der *ReSH* unterscheiden, wurde zunächst versucht, die Reinigungsbedingungen weiter zu optimieren. Die Beobachtung, dass Nickel- und Magnesium-Ionen die Ausbeute sowie die Aktivität deutlich verbessern, führte dazu, dass sie in folgenden Reinigungen standardmäßig allen Puffern zugesetzt wurden.

Daneben wurde zunächst getestet, ob die *HtSH* eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Natriumionen aufweist wie die *ReSH* (Keefe *et al.*, 1995). Es zeigte sich in der Tat eine hemmende Wirkung der Natrium-Ionen auf die NAD⁺-Reduktionsaktivität (**Abbildung 5**). Die Proteinausbeute nach Affinitätschromatographie wurde hingegen nicht durch die Anwesenheit von NaCl verringert. KCl beeinflusste die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität nicht, führte jedoch zu etwas geringeren Proteinausbeuten. Wurde während der Reinigung komplett auf zusätzliche Salze neben NiCl₂ und/ oder MgCl₂ verzichtet, konnten die höchsten Aktivitäten und Proteinausbeuten erreicht werden.

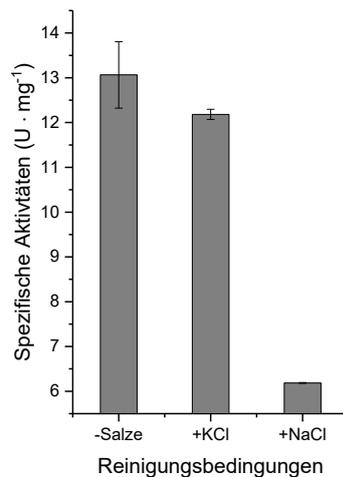


Abbildung 5: Einfluss von NaCl und KCl auf die H₂-abhängige Reduktion von NAD⁺ der gereinigten *HtSH* bei 50 °C. Die Reinigungen wurden in 50 mM KPO_i pH 7.4 mit Ni²⁺- und Mg²⁺-Ionen ohne, sowie entweder mit 150 mM KCl oder 150 mM NaCl durchgeführt.

Neben der zunächst ausbleibenden H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivität aufgrund der Abwesenheit von Nickel- und Magnesium-Ionen wurde auch ein dissoziatives Verhalten der heterotetrameren SH beobachtet, in dessen Verlauf sich die Hydrogenase- und NAD⁺-Reduktase-Einheiten trennten. Die Zugabe zweiwertiger Ionen und ein relativ hoher Gehalt an Glycerin im Reinigungspuffer konnte die daraus folgende unausgeglichene Stöchiometrie der Untereinheiten nicht verhindern. Aufgrund des *Strep*-tagII an HoxF des NAD⁺-Reduktasemoduls zeigten sich in der eluierten Probe nach Affinitätschromatographie größere Mengen von HoxFU als von HoxHY (**Abbildung 6**). Durch eine anschließende chromatographische Größenauftrennung des Eluats konnte allerdings weit homogenere *HtSH* gereinigt werden (**Abbildung 6**). Die entsprechende Fraktion zeigte die höchste, H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität von 30-40 U · mg⁻¹.

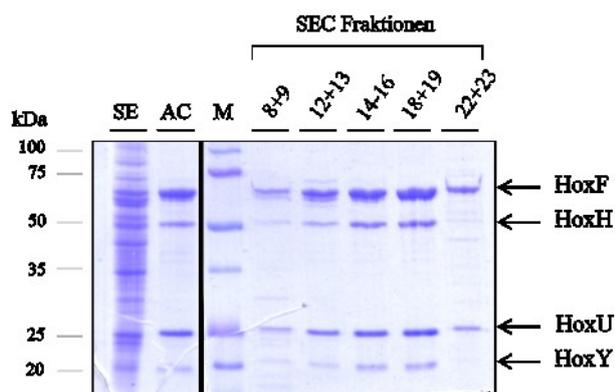


Abbildung 6. Reinigung der *HtSH* aus dem Stamm HF1054 (pJP09). 30 μg Gesamtprotein vom löslichen Extrakt (SE) und je 5 μg der verschiedenen Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Blau. AC, nach Affinitätschromatographie; M Markerprotein; SEC „size exclusion chromatographie“, Größenausschlusschromatographie

Tabelle 14. Reinigung der *HtSH* aus *R. eutropha* HF 1054 (pJP09) mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie (AC, SEC). Die angegebenen Werte stammen aus einer repräsentativen Reinigung, wie sie mehrfach wiederholt wurde.

Fraktion	Volumen (mL)	Protein- konzentration (mg/mL)	Gesamt- protein (mg)	Spezifische Aktivität ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) [*]	Gesamt- aktivität (U)	Ausbeute (%)	Konzentrations- faktor
Löslicher Extrakt	40	29.2	1168	2.50 ± 0.13	2920	100	1
AC	1.4	29.7	41.6	12.07 ± 0.14	502	17	4.8
SEC	2.4	4.9	11.7	33.41 ± 0.61	391	13	13.4

*Die spezifische Aktivität der H_2 -abhängigen NAD^+ -Reduktion wurde wie in 2.4.2 beschrieben gemessen und ist als Mittelwert aus mind. 2-3 Replikaten angegeben.

3.3 Die thermostabile SH unterscheidet sich biochemisch von der *ReSH*

3.3.1 Temperatur- und pH-Optimum

Anders als *Ralstonia eutropha* wächst *Hydrogenphilus thermoluteolus* optimal bei einer Temperatur von 52°C . Dementsprechend ist die *HtSH* bei hohen Temperaturen über 50°C besonders aktiv (**Abbildung 7**). Höchste Aktivität von $71.0 \pm 0.3 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ konnte bei einer Temperatur von 80°C gemessen werden.

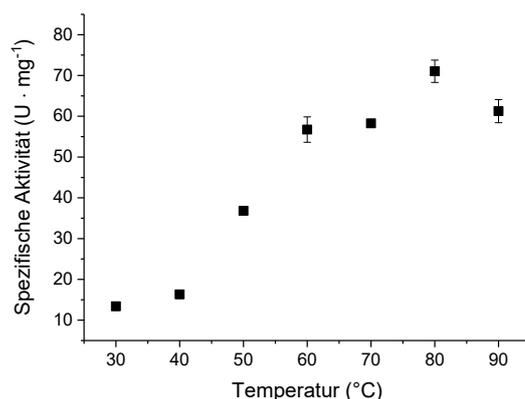


Abbildung 7. H₂-abhängige NAD⁺ Reduktionsaktivität der *HtSH* bei verschiedenen Temperaturen. Für alle Messreihen wurde ein Puffer aus 50 mM Bis-Tris pH 6.5 mit 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgCl₂, 2 μM FMN und 0.75 mM TCEP verwendet, der bei den entsprechenden Temperaturen auf den pH-Wert 6.5 titriert wurde.

Auch das pH-Optimum der *HtSH* unterscheidet sich von dem der *ReSH* deutlich. Maximale H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität der *ReSH* wurden bei leicht basischem pH von 7.5-8.5 gemessen (Keefe *et al.*, 1995), dagegen liegt der optimale pH-Wert der *HtSH* eher im leicht sauren Bereich von 6.0-6.5 (**Abbildung 8**). Bei der Untersuchung der einzelnen Teilreaktionen, die von Hydrogenase- bzw. NAD⁺-Reduktasemodul katalysiert werden, konnte ein deutlicher Unterschied in den pH-Optima beobachtet werden. Das pH-Optimum der vom Hydrogenase-Modul katalysierten H₂-abhängigen Reduktion von Benzylviologen liegt mit einem pH-Optimum von 6.0-7.5 in einem ähnlichen Bereich wie das Optimum der Gesamtreaktion von H₂ → NAD⁺. Die NADH-abhängige Reduktion von BV, die von dem NAD⁺-Reduktasemodul katalysiert wird, ist jedoch besonders bei basischen pH-Werten hoch und erreicht ein Maximum von 63.7 ± 5.3 U · mg⁻¹ bei pH 10.5. Das pH-Optimum der Gesamtreaktion scheint demnach durch die Aktivität des Hydrogenasedimers vorgegeben bzw. limitiert zu sein.

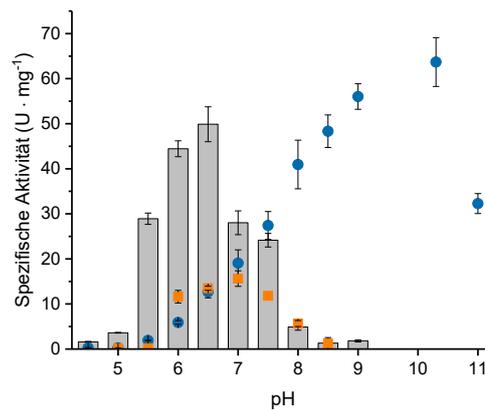


Abbildung 8. Aktivität der *HtSH* bei verschiedenen pH-Werten. Die grauen Balken repräsentieren die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität. In blau ist die NADH abhängige BV-Reduktion durch das NAD⁺-Reduktasemodul (HoxFU) dargestellt. Orange Symbole geben die Werte der H₂ Oxidation und Reduktion von BV, die durch das Hydrogenasedimer (HoxHY) katalysiert wird, wieder. Alle Messungen wurden in Anwesenheit von 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgCl₂, 2 μM FMN und 0.75 mM TCEP, 1 mM NAD⁺ oder NADH und 5 mM BV in einem Universalpuffer bestehend aus 16 mM Citrat, 16 mM Tris und 16 mM Glycin bei 50 °C gemessen.

3.3.2 Kinetische Parameter

Neben dem Temperatur- und pH-Optimum wurden auch die K_M -Werte als Maß für die Affinität der *HtSH* zu ihren natürlichen Substraten NAD⁺, NADH und H₂ untersucht (**Abbildung 9**). Der erhaltene K_M Wert für NAD⁺ liegt bei 474 μM und damit geringfügig niedriger als der $K_M^{\text{NAD}^+}$ von 560 μM für die *ReSH* mit (Schneider & Schlegel, 1976). Die Affinität der *HtSH* zu NADH liegt mit 1.11 mM deutlich über dem K_M^{NADH} von 80 μM der *ReSH* (Schneider & Schlegel, 1976). H₂ als Substrat wird von beiden SHs ähnlich affin gebunden. Der $K_M^{\text{H}_2}$ der *HtSH* liegt bei 42 μM, der $K_M^{\text{H}_2}$ der *ReSH* wurde mit 37 μM bestimmt (Schneider & Schlegel, 1976). Die Kinetik der H₂-Aufnahme durch die *HtSH* folgt dabei einem sigmoidalen Kurvenverlauf, wie es für kooperative Bindungsmechanismen typisch ist, die mithilfe der Hill-Gleichung beschrieben werden.

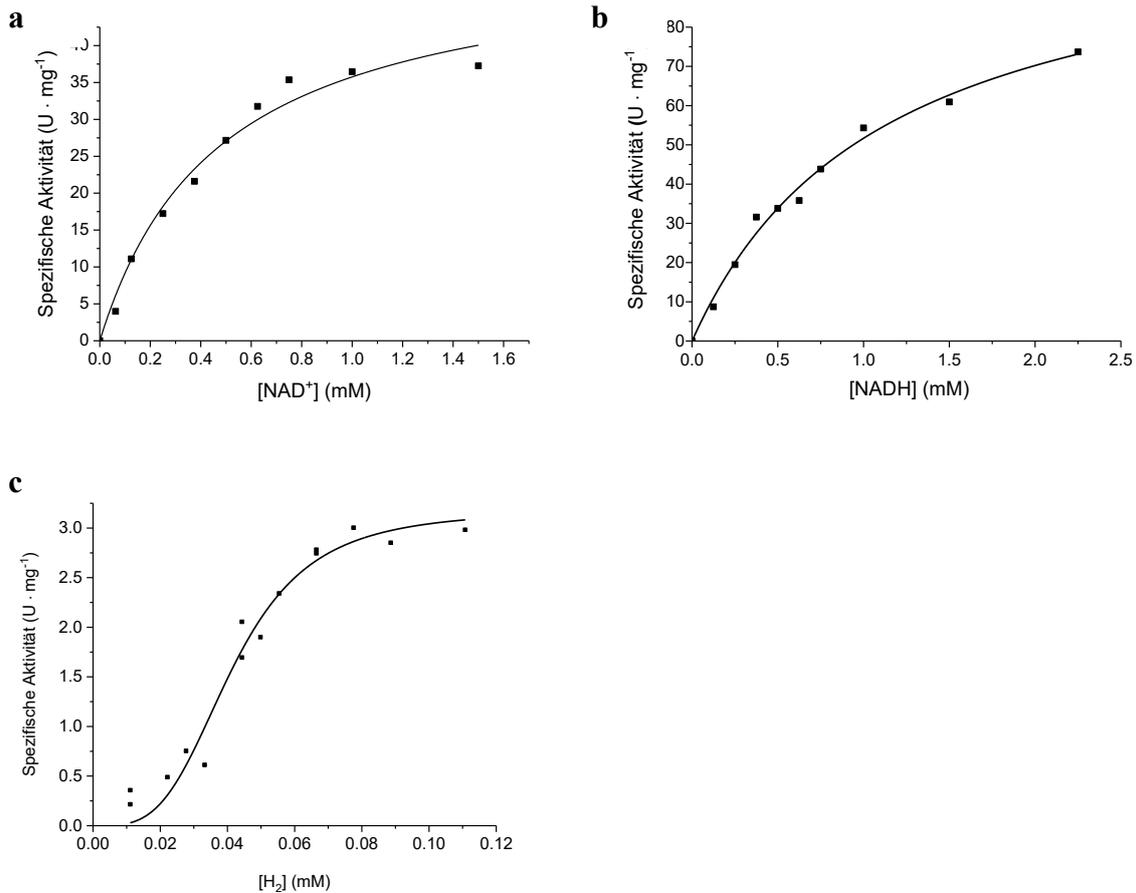


Abbildung 9. Michaelis-Menten Kinetiken der *HtSH* für die Substrate NAD⁺ (a), NADH (b), H₂ (c). Während die Bestimmung der K_M -Werte für die Pyridindinukleotide photometrisch bestimmt wurde, erfolgte die Messung der H₂-Oxidation amperometrisch mit einer modifizierten Clark-Elektrode. Für alle Messreihen wurde ein Puffer aus 50 mM Bis-Tris pH 6.5 mit 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgCl₂, 2 μ M FMN und 0.75 mM TCEP verwendet.

3.3.3 O₂-Toleranz

Der thermophile Organismus *Hydrogenophilus thermoluteolus* wächst chemolithoautotroph in einer Atmosphäre aus H₂ und CO₂ und O₂ (Goto *et al.*, 1977). Die Hydrogenase(n), die dieses Wachstum ermöglichen, sollten demnach sauerstofftolerant sein. Um diese O₂-Toleranz zu bestätigen und genauer zu untersuchen, wurde die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität der gereinigten *HtSH* in Anwesenheit verschiedener O₂-Konzentrationen bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutlich weniger ausgeprägte Sauerstofftoleranz als sie für die *ReSH* beobachtet wurde (Lauterbach & Lenz, 2013). Bereits eine vergleichsweise geringe O₂-Konzentration von 18.8 μ M verringerte die Aktivität um etwa 50 % (Tabelle 15).

Eine Untersuchung der Sauerstofftoleranz der *HtSH* unter physiologischen Bedingungen in Form von chemolithoautotrophen Wachstumstests in Anwesenheit verschiedener O₂-Partialdrücke war leider nicht möglich. Die bevorzugte Wachstumstemperatur des Produktionsstammes *R. eutropha* liegt mit 30 °C offenbar zu stark unterhalb des Temperaturoptimums der *HtSH*-Aktivität. Somit ist die *HtSH* nicht in der Lage, ausreichend Reduktionsäquivalente für chemolithoautotrophes Wachstum bereitzustellen.

Tabelle 15. H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität der *HtSH* in Anwesenheit verschiedener O₂-Konzentrationen.

O ₂ / H ₂ / N ₂ (% v/v) ^a	[O ₂] (μM)	Hydrogenase-Aktivität (U · mg ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	Hydrogenase-Aktivität (%)
0 / 33.33 / 66.66	0.00	16.3 ± 1.5	45.9	100
0.2 / 33.33 / 66.46	1,9	15.4 ± 3.8	43.0	94.2
2 / 33.33 / 64.66	18,8	7.7 ± 0.3	21.5	49.8
10 / 33.33 / 56.66	94,0	1.3 ± 0.5	3.6	16.6

^aAlle Messreihen wurden in einem Puffer aus 50 mM Bis-Tris pH 6.5 mit 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgCl₂, 2 μM FMN, 0.75 mM TCEP und 1 mM NAD⁺ bei 50 °C gemessen.

3.3.4 Metall- und Kofaktor-Gehalt

Bidirektionale, Pyridinnukleotid-abhängige [NiFe]-Hydrogenasen wie die SHs aus *R. e.* und *R. o.* beinhalten ein fest gebundenes FMN-Molekül als Kofaktor in der zugehörigen Bindetasche von HoxF. Zusätzlich wurde ein weiteres FMN-Molekül in HoxY der *ReSH* vermutet (Lauterbach, Liu, *et al.*, 2011; Schneider & Schlegel, 1978; Van Der Linden *et al.*, 2004).

Mithilfe einer abgeänderten Methode nach Schneider und Schlegel (Schneider & Schlegel, 1976) (2.4.7) wurden mittels Fluoreszenzmessung 1.07 FMN-Molekülen pro *HtSH*-Heterotetramer bestimmt. Neben FMN sind weitere Kofaktoren, vorrangig Fe-S-Zentren, in Pyridinnukleotid-abhängigen [NiFe]-Hydrogenasen zu finden. Aufgrund der hohen Aminosäuresequenzähnlichkeit der *HtSH* zur *ReSH* und der gemeinsamen Homologie zu Komplex I lassen sich konservierte, Metallzentren koordinierende Cystein-Reste identifizieren (Anhang). Diese lassen einen Gehalt von 19 Eisenatomen sowie einem Nickelatom pro SH-Molekül vermuten.

Um welche Art von Fe-S-Zentren es sich in der *HtSH* handeln könnte, sollte mittels Kernresonanz-Schwingungsspektroskopie („*Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy*“, NRVS) untersucht werden. Die entsprechenden NRVS-Messungen ergaben ein Spektrum, das denen ähnelt, die bereits für *DvSH* und *ReSH* beobachtet wurden (Kamali *et al.*, 2013; Lauterbach *et al.*, 2015). Dieses legt die Vermutung nahe, dass 16 der erwarteten 19 Fe-Atome an der Bildung von vier [4Fe4S]-Zentren beteiligt sind. Daneben zeigte sich ein für [2Fe2S]-Cluster typisches Signal bei 414 cm^{-1} . Zusätzlich wurden mittels ICP-OES 14.2 ± 0.19 Fe und 2.4 ± 0.1 Ni pro *HtSH* gemessen.

3.3.5 Reaktivierungsverhalten

Bei der standardmäßigen Messung der H_2 -abhängigen NAD^+ -Reduktionsaktivität der *HtSH* bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ war eine ausgeprägte Anlaufphase zu beobachten, bevor das Enzym Aktivität zeigte. Über eine solche verzögerte Kinetik wurde zuvor auch für die *RoSH* berichtet (Aggag & Schlegel, 1974). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass die Anlaufphase durch Zugabe katalytischer Mengen von NADH erfolgte oder höhere Proteinkonzentrationen deutlich verkürzt wurde. Entsprechende Aktivierungsversuche wurden auch für die H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktion durch die *HtSH* vorgenommen. Eine besonders signifikante Verkürzung der Anlaufphase sowie Erhöhung der Aktivität konnte durch Zugabe von $0.75 - 1\text{ mM}$ TCEP erreicht werden (**Abbildung 10**). Ohne die Zugabe von TCEP trat die H_2 -abhängige Reduktion von NAD^+ erst nach einer Anlaufphase von fast 25 Minuten ein. Auch der Zusatz von NADH verkürzte die Anlaufphase, es wurde aber nicht die maximale Aktivität wie bei Zugabe von TCEP erreicht. Ebenso verkürzte die Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge die Anlaufphase, hatte ebenfalls aber keinen positiven Einfluss auf die spezifische Aktivität. Auch FMN zur Rekonstitution der SH führte zu einer verkürzten Anlaufphase (Anhang).

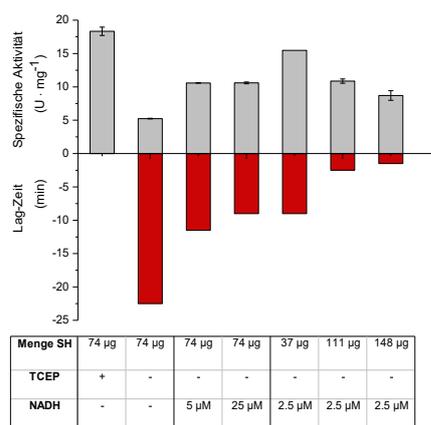


Abbildung 10. Reaktivierungsverhalten der *HtSH* mit verschiedenen Reduktionsmitteln bzw. Proteinmengen. Die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität wurde in 50 mM Bis-Tris pH 6.5 bei 50°C in Anwesenheit von 0.5 mM NiCl₂ und 5 mM MgCl₂ gemessen. Als Lag-Zeit (Anlaufphase) wurde die Zeit gemessen, die verging, bevor ein linearer Anstieg der Absorption wahrgenommen wurde.

Die stark schwankende Ausprägung der Anlaufphase zwischen Proben unterschiedlicher Reinigungen veranlasste zu der Vermutung, dass die *HtSH* eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff zeigt. Je nach Inkubationsdauer der Probe unter sauerstoffhaltiger Luft wiesen die Proben eine längere oder kürzere Anlaufphase auf. Daraufhin wurde ein Protokoll zur anaeroben Reinigung der *HtSH* entworfen, welches in der Tat auch ohne Zugabe von Reduktionsmitteln im Reaktionsassay in eine deutlich verkürzte Anlaufphase resultierte. Dies war die Reinigung der *HtSH* unter anaeroben Bedingung (2.3.2), wobei die Menge von ca. 5 % H₂ in der Formiergasatmosphäre für die Aktivierung des Enzyms (Reduktion) ausreichte und alternative Reduktionsmittel nicht mehr notwendig waren.

3.3.6 Langzeitstabilität; Ionenabhängigkeit

Da die *HtSH* besonders bei hohen Temperaturen katalytisch aktiv ist, sollte ihre Stabilität bei längerer Lagerung unter kalten Bedingungen genauer untersucht werden. Dazu wurde eine Probe des gereinigten Enzyms nicht eingefroren, sondern bei 4 °C gelagert. Nach 1, 2, 3 und 9 Tagen wurde die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktion unter gleichbleibenden

Bedingungen gemessen. Auch nach 9 Tagen Lagerung bei 4 °C nahm die Aktivität nur um etwa 15 % ab (Abbildung 11).

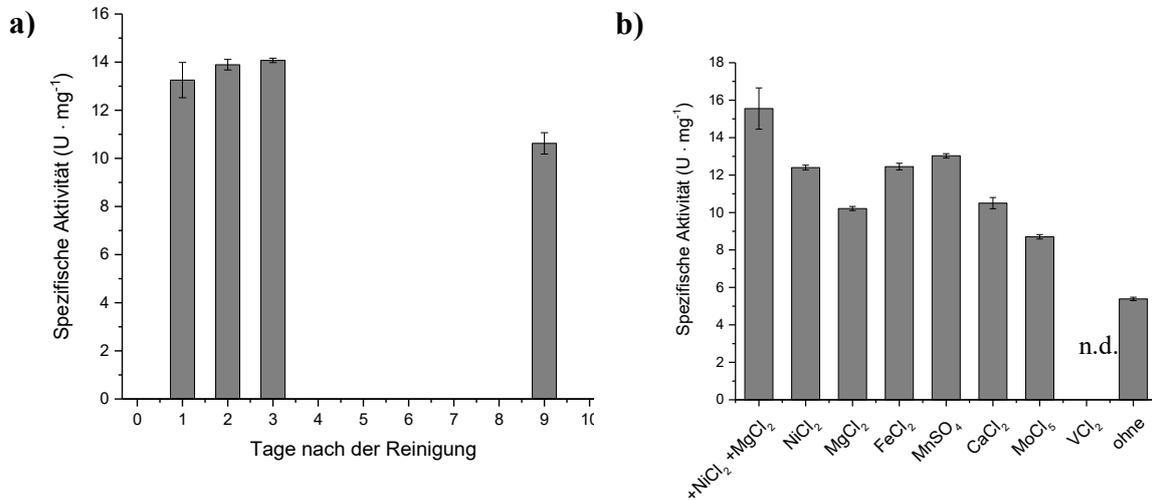


Abbildung 11. H₂-abhängige Reduktion von NAD⁺ zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Reinigung (a) und in Gegenwart verschiedener Metallsalze (b). Die Aktivitäten wurde in 50 mM Bis-Tris Puffer pH 6.5 unter Zugabe von 0.75 mM TCEP und 2 μM FMN gemessen. Die Verwendeten Konzentrationen der verschiedenen Salze waren (von links nach rechts): 0.5 mM NiCl₂ + 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM FeCl₂, 5 mM MnSO₄, 5 mM CaCl₂, 5 mM MoCl₅, 1 mM VCl₂

n.d. nicht detektierbar

3.3.7 Phylogenetische Beziehung zu anderen löslichen [NiFe]-Hydrogenasen

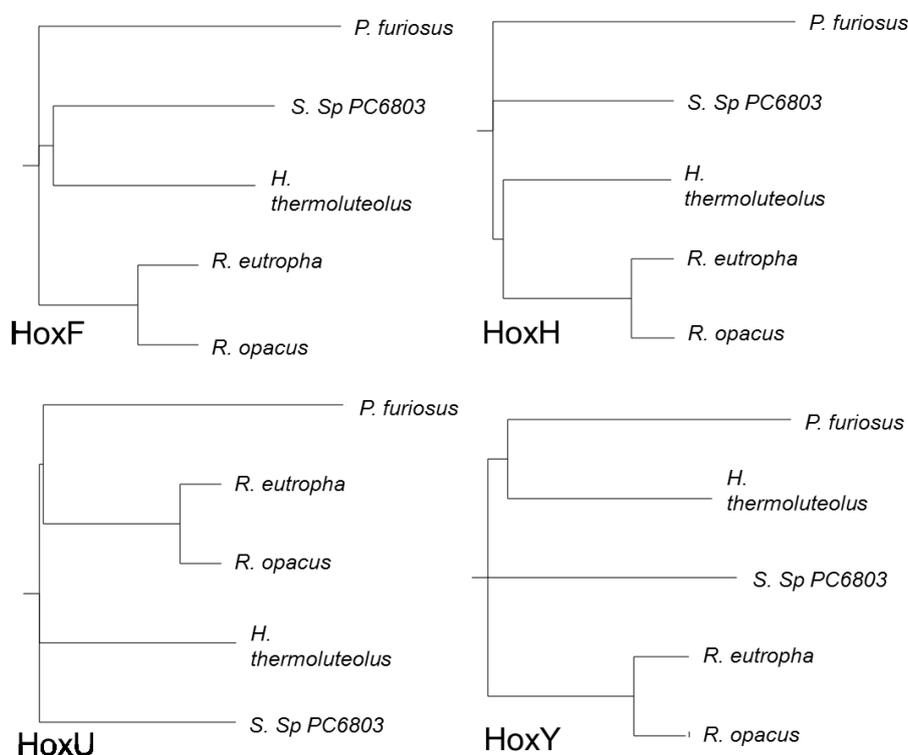


Abbildung 12. Phylogenetische Bäume zur Darstellung der Verwandtschaft zwischen den Aminosäure-Sequenzen der SH-Untereinheiten aus verschiedenen Organismen. Die phylogenetischen Bäume wurden nach dem multiplen Sequenzvergleich mithilfe der Software „PhyloDendron“ (<http://iubio.bio.indiana.edu/>) visualisiert.

Die phylogenetischen Bäume basieren auf den Proteinsequenzen der einzelnen Untereinheiten und zeigen die besondere Stellung der *HtSH* auf. Während alle vier Untereinheiten der *RoSH* und *ReSH* starke Verwandtschaft aufzeigen, zeigt die *HtSH* - besonders die Untereinheiten HoxY und HoxF – verwandtschaftliche Nähe eher zu den SHs von *Synechocystis* sp. sowie *P. furiosus*.

3.3.8 Spektroskopische Eigenschaften der thermostabilen SH

Um einen genaueren Einblick in die Struktur und Funktion der Metallkofaktoren im aktiven Zentrum zu erlangen, wurden Proben der gereinigten *HtSH* mittels IR und EPR spektroskopisch charakterisiert. Dazu wurden die Proben für beide Methoden identisch mit verschiedenen Reduktionsmitteln behandelt und vorbereitet. Die spektroskopischen Messungen wurden von Stefan Wahlefeld und Christian Lorent aus der AG Hildebrandt durchgeführt.

Das IR-Spektrum, das als zweite Ableitung dargestellt wird, zeigt für die frisch isolierte Probe der *HtSH* im unbehandelten Zustand drei deutliche Absorptionssignale bei 1993, 1964, und 1936 cm^{-1} (**Abbildung 13**). Banden in diesem Bereich des Spektrums sind charakteristisch für Streckschwingungen des CO-Liganden im aktiven [NiFe]-Zentrum. Die einzelnen Maxima sind dabei etwa 30 cm^{-1} voneinander entfernt, so wie es typisch für [NiFe]-Hydrogenasen im oxidierten Zustand ist. Für eine vereinfachte Zuordnung der Redoxzustände wird im Folgenden nur auf die CO-Streckschwingungen eingegangen. Die Schwingungen der CN-Liganden sind **Tabelle 16** zu entnehmen. Dieses Spektrum suggeriert das Vorhandensein dreier verschiedener Zustände des Zentrums. Das Signal bei 1964 cm^{-1} entspricht dabei dem „Ni_r-B“-ähnlichen Zustand, der bereits bei *ReSH* und anderen NAD(P)⁺-reduzierenden Hydrogenasen beobachtet wurde (Germer *et al.*, 2009; Greene *et al.*, 2015; Horch *et al.*, 2011; Horch *et al.*, 2010; Karstens *et al.*, 2015; van der Linden *et al.*, 2006). Die Absorptionsbande bei 1936 cm^{-1} kann dem Ni_r-S-Zustand zugeordnet werden. Das außergewöhnliche Signal bei 1993 cm^{-1} wurde bisher noch nicht bei [NiFe]-Hydrogenasen beobachtet und ist demzufolge auch nicht für die SH aus *R. eutropha* beobachtet worden (Happe *et al.*, 2000; Lauterbach, Liu, *et al.*, 2011).

Unter reduzierenden Bedingungen, d.h. durch Behandlung der Probe mit TCEP und NADH, verschwinden die Absorptionsbanden bei 1993 und 1964 cm^{-1} und es treten Signale bei 1971 und 1951 cm^{-1} auf. Diesen werden die Zustände Ni_a-C und Ni_a-S zugeordnet. Die Intensität der Bande bei 1936 cm^{-1} nimmt unter Inkubation der Probe mit NADH und TCEP an Intensität zu, was auf einen teilweise reduzierten Zustand mit Ni^{II} hindeutet.

Wird die Probe der *HtSH* zusätzlich mit H₂ reduziert, verstärkt sich das Ni_a-C Signal bei 1971 cm^{-1} und es können die Streckschwingungen der CN-Liganden bei 2076 und 2089 cm^{-1} identifiziert werden.

Daneben formiert sich ein deutliches Absorptionssignal bei 1958 cm^{-1} . Spektroelektrochemische Messungen zeigten, dass das Erreichen dieses Zustandes niedrigere Redoxpotentiale als der Ni_a-C-Zustand erfordert. Demnach wird dieses Signal dem vollständig reduzierten Ni_a-SR-Zustand zugeordnet. Die entsprechenden CN-Streckschwingungen sind bei 2076 und 2062 cm^{-1} zu beobachten. Zwei weitere reduzierte Zustände Ni_a-SR' und Ni_a-SR'' sind mit den etwas schwächeren Signalen bei 1943 und 1934 cm^{-1} assoziiert. Diese Bandenzuordnung ähnelt dem Spektrum der *PfSH1*, die wie die *HtSH* generell höhere Frequenzen der CO-Streckschwingungen aufweist als die *ReSH* (Greene *et al.*, 2015).

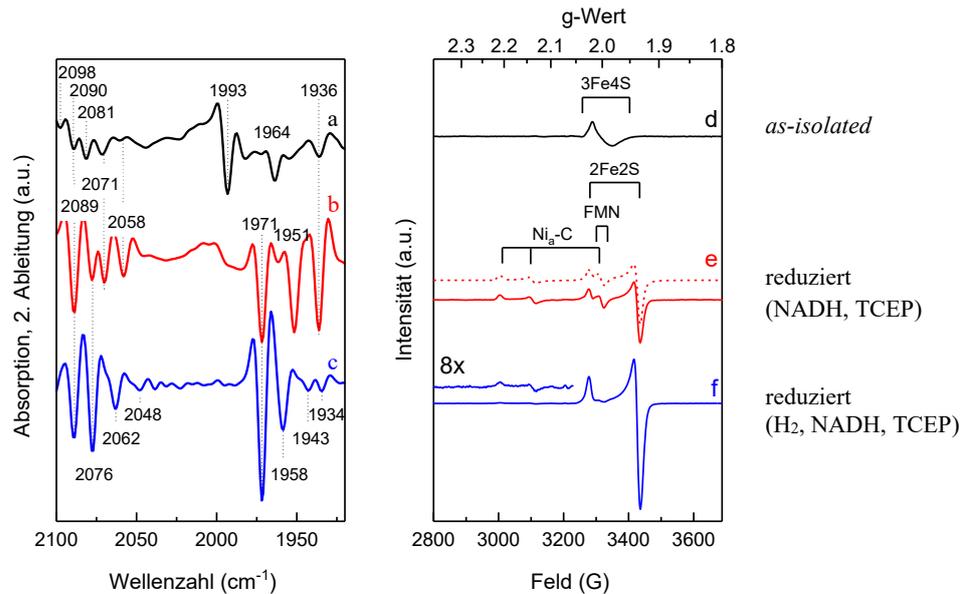


Abbildung 13. IR- (links) und EPR- (rechts) Spektren der gereinigten *HtSH* in verschiedenen Zuständen. Die Proben wurden im unbehandelten, oxidierten (“as-isolated”) Zustand gemessen (schwarze Linien; a, d) und unter reduzierenden Bedingungen (rote Linien b, d, mit TCEP und NADH; blaue Linien c, f, mit H_2 , TCEP, NADH). IR Spektren wurden bei 10 °C aufgenommen, während EPR Spektren entweder bei 10 K (d) oder 35 K (e, f) gemessen wurden.

Neben IR wurden die Proben der *HtSH* auch mittels EPR untersucht (**Abbildung 13**). Dabei weist das Spektrum der unbehandelten Probe nur ein schwaches Signal auf, welches im Gegensatz zu dem erwarteten $[\text{4Fe4S}]$ - einem $[\text{3Fe4S}]$ -Cluster zugeschrieben wird und auf mögliche oxidative Beschädigung zurückzuführen ist. Wie auch bei anderen NAD(P)^+ -reduzierenden Hydrogenasen konnte kein Signal eines oxidierten Zustandes des aktiven Zentrums detektiert werden (Germer *et al.*, 2009; Happe *et al.*, 2000; Horch *et al.*, 2010; Karstens *et al.*, 2015; van der Linden *et al.*, 2006).

Nach Reduktion der *HtSH* mit TCEP und NADH zeigt das EPR-Spektrum, welches bei 35 K aufgenommen wurde, Signale des Hydrid-bindenden $\text{Ni}_a\text{-C}$ -Zustandes, korrespondierend mit der IR-Absorptionsbande bei 1971 cm^{-1} . Daneben treten auch Signale eines $[\text{2Fe2S}]$ -Clusters sowie eines Flavin-Radikals auf. Messungen, die bei 10 K durchgeführt wurden (Anhang), zeigen zusätzlich ein breites Signal bei $g = 1.85$, welches möglicherweise einem $[\text{4Fe4S}]$ -Cluster entspricht.

Nach Inkubation mit H_2 dominiert das Signal des $[\text{2Fe2S}]$ -Cluster im EPR-Spektrum bei 35 K. Erst die Aufnahme eines Spektrums bei 6.5 K zeigt auch Signale, die charakteristisch für den

Ni_a-C Zustand sind (Anhang). Daneben sind auch Signale von [4Fe4S]-Zentren zu identifizieren.

Auch hier zeigt die *Pf*SH1 (Bryant & Adams, 1989) Ähnlichkeit mit der *Ht*SH. Für beide SHs können deutliche Ni_a-C-Signale erst bei sehr niedrigen Temperaturen detektiert werden, sodass eine starke magnetische Kopplung zwischen Fe/S-Kofaktoren und [NiFe]-Zentrum vermutet wird, die zu einer Signalverbreiterung führt.

Tabelle 16. Redoxzuständen des aktiven Zentrums zugeordnete Wellenzahlen für gereinigte *Ht*SH

Redoxzustand	v(CO) (cm ⁻¹)	v(CN) (cm ⁻¹)	
Nicht zugeordnet	1993	2081	2090
Ni _r -B-like	1964	2087	2098
Ni _r -S	1936	2058	2071
Ni _a -S	1951	2076	2089
Ni _a -C	1971	2076	2089
Ni _a -SR	1958	2062	2076
Ni _a -SR'	1943	2048	2062
Ni _a -SR''	1934	2048	2062

Tabelle 17. Auf der Basis von EPR-Spektroskopie zugeordnete g-Werte der Kofaktoren in *Ht*SH

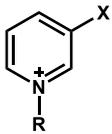
	g ₁	g ₂	g ₃
[3Fe4S]	2.004	1.982	
[2Fe2S]	2.026	1.935	
[NiFe]: Ni _a -C	2.210	2.139	2.013
[NiFe]: nicht zugeordnet Ni ^{III}	2.260	2.127	2.034
FMN	2.003		

3.3.9 Reduktion synthetischer Kofaktoren mithilfe der thermostabilen Hydrogenase

Da die thermostabile SH eine NAD⁺-Reduktionsaktivität bei höheren Temperaturen zeigt und auch in Gegenwart von geringen Konzentrationen an Sauerstoff aktiv bleibt, erscheint sie sehr interessant für die Anwendung als kofaktorregenerierendes Enzym. Im Gegensatz zur *Re*SH könnte die *Ht*SH auch in Kombination mit produktbildenden, Pyridinnukleotid-abhängigen Enzymen angewendet werden, die ebenfalls aus thermophilen Organismen stammen und somit ein erhöhtes Temperaturoptimum aufweisen, so wie z.B. einige „*old yellow*

enzymes“. Für solche wurde vor kurzem ein alternatives Kofaktorsystem etabliert, welches auf synthetisierten Derivaten der Pyridinnukleotide basiert (Okamoto *et al.*, 2016; Paul *et al.*, 2013). Diese synthetischen Kofaktoren sind strukturell mit NAD^+ verwandt, können jedoch einfach chemisch hergestellt werden und sind kostengünstiger. Allerdings fehlt es noch an effizienten Regenerationssystemen dieser Derivate, da sie durch ihre strukturellen Unterschiede zum natürlichen Kofaktor NAD^+ nicht von den gewöhnlichen kofaktorreduzierenden Enzymen, wie der Formiat- und der Glukosedehydrogenase (FDH, GDH) gebunden werden können. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kylie Vincent konnte gezeigt werden, dass die *HtSH* jedoch zur Reduktion der artifiziellen Kofaktoren fähig ist (**Tabelle 18**). Während für die kommerziell erhältlichen Dehydrogenasen keine Aktivität in Anwesenheit der synthetischen Kofaktoren zu beobachten war, konnte für die *HtSH* eine Absorptionszunahme und damit Reduktion verschiedener Derivate detektiert werden.

Tabelle 18. Vergleich der *HtSH* mit kommerziell erhältlichen, kofaktorregenerierenden Dehydrogenasen.

	NAD^+ R = Adenosindinukleotid X = CONH_2	BNA^+ R = CH_2Ph X = CONH_2	mCN R = CH_2Ph X = CN	mCOOH R = CH_2Ph X = COOH
<i>HtSH</i>	✓	✓	✓	✓
Glukosedehydrogenase	✓	✗	✗	✗
Formiatdehydrogenase	✓	✗	n.g.	n.g.

Es wurden die Aktivitäten für verschiedene Derivate von NAD^+ (jeweils 1 mM) in 50 mM Tris-HCl pH 8 bei 40°C mittels UV-Vis Spektroskopie getestet. In Ansätzen der GDH und FDH wurden zusätzlich 10 mM Glukose bzw. Formiat hinzugefügt. Reaktionsansätze der *HtSH* wurden mit H_2 begast und gasdicht verschlossen.

n.g. = nicht gemessen

✗ = keine Aktivität beobachtet (über einen Zeitraum von 24 h)

✓ = deutliche Aktivität (innerhalb von 4 h beobachtet)

3.4 SH-Chimäre bestehend aus SH-Modulen verschiedener Organismen

In Arbeiten von Schneider (1984) und Zaborosch (1989) wurde bereits über die Dissoziation der tetrameren SH aus *Rhodococcus opacus* in die zwei Heterodimere HoxFU und HoxHY berichtet. Diese Dissoziation wurde beobachtet, wenn die Enzymreinigung in Abwesenheit von zweiwertige Kationen wie Ni^{2+} oder Mg^{2+} durchgeführt wurde. Die dadurch getrennten Hydrogenase- und NAD^+ -Reduktasemodule waren jedoch stabil und katalytisch aktiv ($\text{H}_2 \rightarrow \text{BV}$, bzw. $\text{NADH} \rightarrow \text{BV}$). Lediglich die Gesamtreaktion, d.h. die H_2 -abhängige Reduktion von NAD^+ gemessen werden, war nicht mehr möglich, da der Elektronentransport vom aktivem [NiFe]- Zentrum der Hydrogenase zur Nicotinamidbindestelle im NAD^+ -Reduktasemodul unterbrochen war.

Erste Reinigungsversuche der heterolog produzierten SH aus *H.t.* in *R.e.* basierten auf Protokollen zur Reinigung der *ReSH*. Es konnte zwar Protein im Eluat nach der Affinitätschromatographie nachgewiesen werden, eine H_2 -abhängige Reduktion von NAD^+ wurde jedoch nicht festgestellt. Aufgrund der Kenntnis von der dissoziativen Eigenschaft der *RoSH* wurde daraufhin der Puffer mit NiCl_2 supplementiert. Dieser Zusatz führte tatsächlich zur einer erhöhten Proteinausbeute und einer höheren NAD^+ -reduzierende Aktivität der *HtSH*.

Dass sich auch die SH-Module aus *Ralstonia eutropha* einzeln reinigen lassen und auch aktiv und stabil bleiben, konnte von (Lauterbach & Idris, *et al.*, 2011; Lauterbach & Liu, *et al.*, 2011) gezeigt werden. Dabei beruhte die Isolierung der getrennten Module nicht auf der biochemischen Eigenschaft der SH, sondern wurde durch ein geeignetes Expressionssystem erzielt. Dieses erlaubt die Produktion nur eines Heterodimers in einem *R.e.*-Stamm, bei dem SH-spezifische Strukturgene deletiert wurden und die Module dabei von einem Plasmid kodiert werden.

Trotz der hohen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von *ReSH*, *RoSH* und *HtSH* weisen die jeweils isolierten heterotetrameren Proteine unterschiedliche biochemische Charakteristika auf. So unterscheiden sich neben dem Dissoziationsverhalten z.B. auch die K_M -Werte für die natürlichen Substrate NAD^+ , NADH und H_2 sowie die Temperatur- und pH-Optima.

Um die möglichen strukturellen und biochemischen Ähnlichkeiten zwischen den löslichen Hydrogenasen aus unterschiedlichen Organismen zu untersuchen, wurde ein Komplementationssystem entworfen. Hierfür wurden Produktionssysteme in *R. eutropha* konstruiert, die verschiedenen Zusammensetzungen der heterotetrameren SH aus

Hydrogenase- und NAD⁺-Reduktasemodule von *R. eutropha*, *R. opaccus* und *H. thermoluteolus* erlauben sollen.

Dazu wurde zum einen der Stamm *R. eutropha* HF903 ($\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$) verwendet, der eine Leseraster erhaltende Deletion in *hoxFU* trägt (Lauterbach *et al.*, 2011). Daneben wurde im Stamm *R. eutropha* HF1009 ($\Delta hoxG$, $\Delta hoxC$, $\Delta hoxF$, *strep* – *hoxF*; Karstens *et al.*, 2015) eine Leseraster erhaltende Deletion in *hoxHY* vorgenommen. Diese beiden Stämme dienten zunächst als Produktionsstämme für *ReHoxHY* bzw. *Strep-ReHoxFU*, in die die entsprechenden fehlenden, heterologen SH-Module über Plasmide eingebracht wurden. Für die Produktion *R. opacus*-spezifischer SH-Module wurde auf Plasmide von K. Karstens (2014) zurückgegriffen. Eine Übersicht der Kombinationen und Plasmide ist in **Tabelle 19** dargestellt.

Tabelle 19. Übersicht über verwendete Stämme und chimäre SH-Varianten. Die Proteine wurden entsprechend der Genherkunft farblich markiert: *R.e.* blau, *H.t.* rot, *R.o.* grün.

Ausgangsstamm Relevanter Genotyp	Eingebrachtes Plasmid	Plasmidbezeichnung	Resultierende SH- Zusammensetzung	Position des <i>StreptI</i> - tag
HF1009 $\Delta hoxHY$	pJP62.2	pRe $hoxHY$ 1	SH $ReFU$ YH	n-terminal HoxF
HF1009 $\Delta hoxHY$	pJP66.6	pRe $hoxHY$ 2	SH $ReFU$ YH	n-terminal HoxF
HF1009 $\Delta hoxHY$	pJP09 HY	pHt $hoxHY$	SH $ReFU$ HtYH	n-terminal HoxF und HoxY
HF1009 $\Delta hoxHY$	pJP09a (Km ^R)	pHt $hoxHY$	SH $ReFU$ HtYH	n-terminal HoxF und HoxY
HF1009 $\Delta hoxHY$	pDAK114o1	pRo $hoxHY$	SH $ReFU$ RoYH	n-terminal HoxF und HoxY
HF500 $\Delta hoxH$	pJP62.2	pRe $hoxHY$	SH $ReFU$ YH	Nicht vorhanden
HF500 $\Delta hoxH$	pJP66.6	pRe $hoxHY$	SH $ReFU$ YH	Nicht vorhanden
HF500 $\Delta hoxH$	pJP09 HY	pHt $hoxHY$	SH $ReFU$ HtYH	n-terminal HoxY
HF500 $\Delta hoxH$	pJP09a (Km ^R)	pHt $hoxHY$	SH $ReFU$ HtYH	n-terminal HoxY
HF500 $\Delta hoxH$	pDAK114o1	pRo $hoxHY$	SH $ReFU$ RoYH	n-terminal HoxY
HF903 $\Delta hoxFU$	pJP66	pRe $hoxFU$	SH $ReFU$ YH	n-terminal HoxF
HF903 $\Delta hoxFU$	pJP09 FU	pHt $hoxFU$	SH $HtFU$ ReYH	n-terminal HoxF
HF903 $\Delta hoxFU$	pDAK113o1	pRo $hoxFU$ 1	SH $RoFU$ ReYH	n-terminal HoxF
HF903 $\Delta hoxFU$	pDAK113o2	pRo $hoxFU$ 2	SH $RoFU$ ReYH	n-terminal HoxF

3.4.1 Chimäre SH-Varianten können lithoautotrophes Wachstum von *R. eutropha* vermitteln

Um zu überprüfen, ob die heterologen Gene funktionell exprimiert werden, d.h. die Deletionen der Gene *hoxHY* bzw. *hoxFU* in den Stämmen *R. eutropha* HF1009 (Δ *hoxHY*), HF500 und HF903 komplementiert werden können, wurden die entsprechenden Transkonjuganten auf chemolithoautotrophes Wachstum getestet.

Die Ausgangsstämme HF903 (Δ *hoxFU*) und HF1009 (Δ *hoxHY*) sowie HF500 (Δ *hoxH*) sind aufgrund der fehlenden, vollständigen SH nicht in der Lage, lithoautotroph zu wachsen. Porthun und Mitarbeiter (2002) haben zuvor gezeigt, dass heterolog produzierte SH aus *R. opacus* lithoautotrophes Wachstum von *R. eutropha* vermitteln kann. Obwohl nach dem Transfer der verschiedenen Plasmide in den Stamm *R. eutropha* HF1009 Δ *hoxHY* die genetische Information für alle Untereinheiten der SH vorhanden ist, wird bei diesem Stamm offensichtlich nicht genügend funktionale Hydrogenase produziert, um lithoautotrophes Wachstum zu ermöglichen.

Um auszuschließen, dass die mangelnde Produktion der Hydrogenasemodule in dem Stamm HF1009 Δ *hoxHY* auf Fehlern in den Plasmidkonstruktion oder auf Plasmidinstabilität beruht, wurden die Hydrogenase-kodierenden Vektoren ebenfalls in den Stamm *R. eutropha* HF500 (MBH⁻, RH⁻, Δ *hoxH*) transferiert. Nach Konjugation der verschiedenen HoxHY-kodierenden Plasmide, konnte bei den Transkonjuganten das Wachstum unter Verwendung von H₂ als Energie- und CO₂ als Kohlenstoffquelle beobachtet werden (**Abbildung 14 a**). Demzufolge lässt sich *ReHoxHY* durch *RoHoxHY* soweit ersetzen, dass ein Elektronentransfer vom Hydrogenasemodul von *R. opacus* zum NAD⁺-Reduktasemodul von *R. eutropha* und damit die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktion möglich ist. Die Hydrogenase-Untereinheit des thermophilen Organismus scheint unter den gegebenen Wachstumsbedingungen jedoch nicht über ausreichend Aktivität oder Stabilität zu verfügen, um mit dem NAD⁺-Reduktasemodul in *ras* zu interagieren und das autotrophe Wachstum zu vermitteln (**Abbildung 14 b**).

Auch HoxFU von *R.e.* in dem Stamm *R. eutropha* HF903 kann durch die heterologen NAD⁺-Reduktasemodule ersetzt werden. Nach Einbringen der verschiedenen HoxFU-kodierenden Plasmide in diesen Stamm, wurde ausreichend rekombinante, heterotetramere SH produziert werden, um lithoautotrophes Wachstum zu ermöglichen (**Abbildung 14 b**).

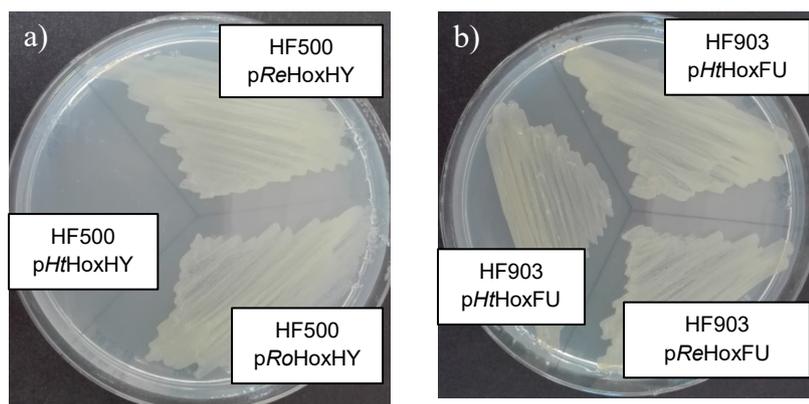


Abbildung 14. Lithoautotrophes Wachstum von HF903 ($\Delta hoxFU$) (a) bzw. HF500 ($\Delta hoxH$) (b) mithilfe chimärer Hydrogenase-Varianten. In dem Stamm HF903 wurde die Deletion von *hoxFU* durch heterologe HoxFU-Module aus den Organismen *R. opacus* oder *H. thermoluteolus* komplementiert. Die Deletion von *hoxH* in HF500 wurde durch Transfer HoxHY-kodierender Plasmide komplementiert. Die Platten wurden 5 Tage in einer Atmosphäre aus 10% H₂, 5 % O₂, 10 % CO₂ und 75% N₂ bei 30 ° C inkubiert.

Um genauere Einblicke in die physiologische Funktionalität der chimären Hydrogenase-Varianten in *R. eutropha* zu erhalten, wurde das Wachstumsverhalten auch in flüssigem Nährmedium verfolgt (**Abbildung 15**). Nach Ermittlung der Wachstumsraten und Verdopplungszeiten wurden unterschiedliche Wachstumsverhalten der verschiedenen Stämme aufgezeigt. So wuchsen die Stämme HF903 und HF500, in die *ReSH* homologe Untereinheiten eingebracht wurden mit Verdopplungszeiten von 79.5 h und 74.1 h am schnellsten. Danach folgte Stamm *R. eutropha* HF903 mit dem heterologen NAD⁺-Reduktasemodul aus *H. thermoluteolus* mit einer Verdopplungszeit von 96.9 h. Deutlich langsamer wuchsen die Stämme HF903 und HF500, die HoxFU bzw. HoxHY aus *R. opacus* synthetisieren. Der Stamm HF500, in den das Hydrogenase-Dimer aus *H.t.* eingebracht wurde wuchs kaum nachweisbar, und eine Bestimmung der Wachstumsrate war aufgrund der sehr niedrigen OD-Werte nicht möglich.

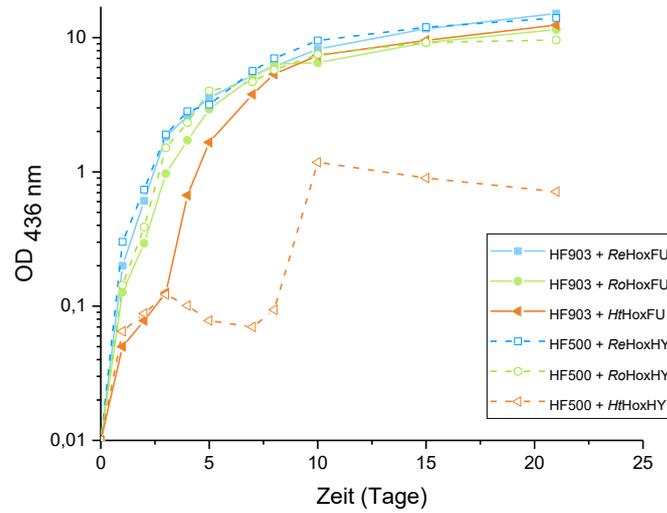


Abbildung 15. Lithoautotrophes Wachstum der verschiedenen HF903 ($\Delta hoxFU$)- und HF500 ($\Delta hoxH$)-Stämme in Minimalmedium unter einer Atmosphäre aus 10% H_2 , 5 % O_2 , 10 % CO_2 und 75% N_2 bei 30 ° C.

Tabelle 20. Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der verschiedenen Transkonjuganten basierend auf den *R. eutropha* Stämme HF903 ($\Delta hoxFU$) und HF500 ($\Delta hoxH$) unter lithoautotrophen Wachstumsbedingungen. Die angegebenen Mittelwerte wurden aus zwei unabhängigen Kultivierungsexperimenten ermittelt.

	HF903 + pRehoxFU	HF903 + pRohoxFU 1	HF903 + pHthoxFU	HF500 + pRehoxHY 1	HF500 + pRohoxHY	HF500 + pHthoxFU
SH-Variante	SH ^{ReFU} YH	SH ^{RoFU} ReYH	SH ^{HtFU} ReYH	SH ^{ReFU} YH	SH ^{ReFU} RoYH	SH ^{ReFU} RoYH
Wachstumsrate μ (h ⁻¹)	0.0087	0.0063	0.0072	0.0094	0.0051	-
Verdopplungszeit (h)	79.5	110.8	96.6	74.1	135.2	-

3.4.2 Immunologischer Nachweis der SH-Untereinheiten

Die Produktion der Module in den rekombinanten *R.-eutropha*-Stämmen wurde mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese und der anschließenden immunologischen Detektion über *ReSH*-spezifische Antikörper nachgewiesen. In Transkonjuganten des Stammes *R.e.ΔhoxHY* mit Plasmiden, die *HoxHY*-Module verschiedenen Ursprungs kodieren, konnte lediglich eine Bande in Proben des löslichen Extraktes detektiert werden, die nicht einer SH-Untereinheit zuzuordnen war (**Abbildung 16 c**), d.h. die SH-Untereinheiten sind in diesem Stammhintergrund nicht nachweisbar. Eine Ausnahme bilden diejenigen Transkonjuganten, die das *R.e.*-eigene *HY*-Modul trugen. In diesen konnte die große Hydrogenaseuntereinheit, *HoxH*, in Spuren detektiert werden (**Abbildung 16 c**).

Die oben erwähnte, kreuzreagierende Bande wurde ebenfalls in löslichen Extrakten von *R.e.ΔhoxH*-Stämmen nachgewiesen, die Plasmide mit *hoxHY*-Genen trugen (**Abbildung 16c**). Allerdings wurden hier auch alle SH-Untereinheiten, d. h. *HoxF*, *HoxH*, *HoxU* und *HoxY* detektiert. Dies galt sowohl für *R.e.ΔhoxH* mit *pRehoxHY*, *pRohoxHY* sowie *pHthoxHY*, wobei im letzteren Fall nur sehr schwache Banden für *HoxH* und *HoxY* zu erkennen waren.

Im löslichen Extrakt des *R.e.*-Stammes *ΔhoxFU*, der *pRehoxFU* trug, lassen sich sowohl *HoxH* wie auch *HoxY* deutlich nachweisen (**Abbildung 16 a, b**). Die Anwesenheit des Plasmids *pJP66* resultierte in der Produktion aller vier SH-Untereinheiten, die sich mithilfe der *ReSH*-spezifischen Antikörper deutlich detektieren ließen. Konjugation mit *pRohoxFU*- sowie *pHthoxFU* führte ebenfalls zu immunologisch nachweisbaren Mengen von *HoxFU*.

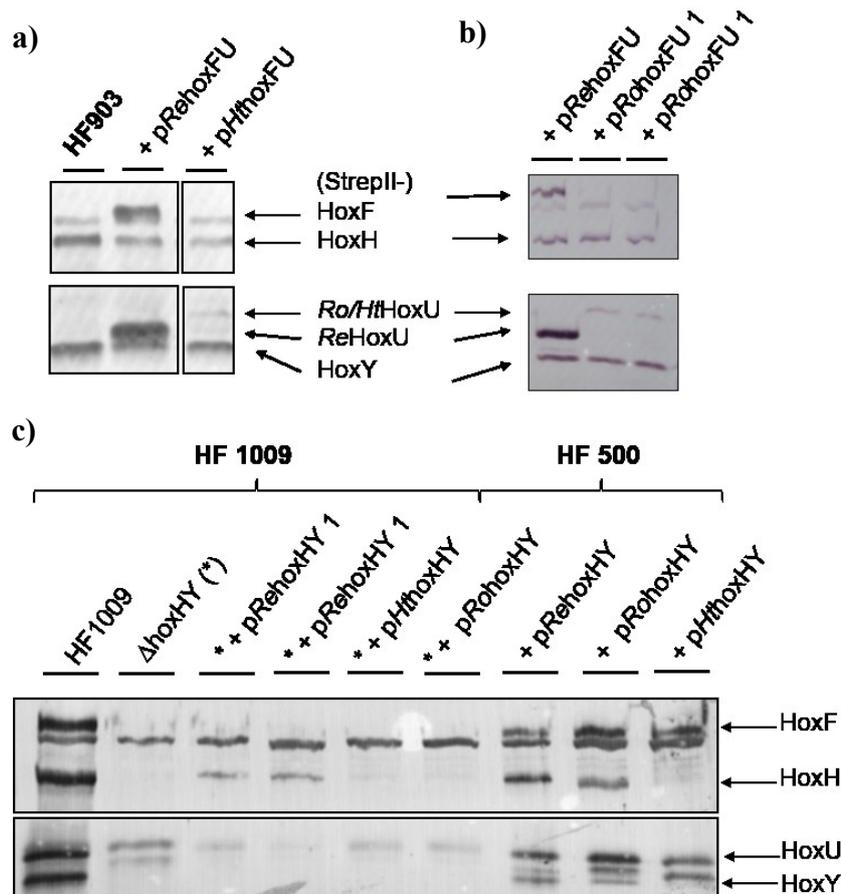


Abbildung 16. Immunologische Nachweis der SH-Untereinheiten in rekombinanten *R. eutropha*-Stämmen, die SH-Hybridproteine synthetisieren. Abbildung a) zeigt den *R. eutropha*-Stamm HF903, der aufgrund von Δ hoxFU nur die SH-Untereinheiten HoxH und HoxY produziert. Die Transkonjuganten HF903 mit pRehoxFU und pHthoxFU (a), sowie pRoHoxFU 1 und 2 (b) besitzen alle vier SH-Untereinheiten. In Abbildung c) ist der *R. eutropha*-Stamm HF1009 als WT mit allen vier SH-Untereinheiten abgebildet. Die Deletion von *hoxHY* führt zum Verlust der entsprechenden Untereinheiten. Transkonjuganten basierend auf dem *R. e.*-Stamm HF500 mit pRehoxHY, pRoHoxy 1 und pHthoxy 1 zeigen die Anwesenheit aller vier SH-Untereinheiten. Proben der löslichen Extrakte wurden mittels SDS-Gelelektrophorese in 12%-igen Acrylamidgelen aufgetrennt und anschließend im „Semi-dry Western blot“-Verfahren auf Nitrocellulose übertragen. ReHoxHYFU-spezifische Antikörper wurden zur Detektion der SH-Untereinheiten verwendet.

3.4.3 Aktivitäten im löslichen Extrakt

Im Anschluss zu den physiologischen Wachstumstests und dem immunologischen Nachweis der vier SH-Untereinheiten wurden die SH-Aktivitäten in den *R. eutropha*-Transkonjuganten bestimmt. Zunächst wurden die Aktivitätsmessungen auf Proben des löslichen Extraktes beschränkt, da nicht für alle SH-Hybridproteine mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden konnten (**3.4, Tabelle 19**). Alle Stämme wurden in modifiziertem FGN-Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 30°C bis zu einer OD_{436nm} von etwa 10 kultiviert. Nach dem Aufschluss der Zellen und anschließender Ultrazentrifugation wurde die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität bei 30 °C in den resultierenden löslichen Extrakten gemessen. Um den von Aggag und Schlegel (1974) beobachteten stimulierenden Effekt von Ni²⁺ und Mg²⁺ auf die Aktivität der RoSH einem der beiden SH-Dimere genau zuordnen zu können, wurden alle Messungen zusätzlich auch in Anwesenheit von NiCl₂ und MgCl₂ durchgeführt.

Die höchsten spezifischen Aktivitäten von etwa 1- 1.2 U · mg⁻¹ wurden im löslichen Extrakt der Transkonjugante des *R. eutropha*-Stammes HF903 mit pRehoxFU sowie der Transkonjugante mit pHthoxFU ohne Zugabe von NiCl₂ und MgCl₂ gemessen (**Abbildung 17**). Mit 0.6-0.8 U · mg⁻¹ etwas geringer waren die Aktivitäten der Transkonjugante des *R. eutropha*-Stammes HF903 mit pRohoxFU. Dass neben der nativen ReSH auch das HtHoxFU-Modul hohe SH-Aktivität im löslichen Extrakt vermittelt, deckt sich mit der Beobachtung aus den lithoautotrophen Wachstumstests. Auch dabei zeigte die Transkonjugante des *R. eutropha*-Stammes HF903 mit pHthoxFU nach der Transkonjugante HF903 mit pRehoxFU die schnellste Wachstumsrate.

Die Supplementierung des Reaktionsansatzes mit NiCl₂ und MgCl₂ führte erstaunlicherweise bei fast allen auf HF903 basierenden Trankonjuganten zu einer Abnahme der H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivität (**Abbildung 17**).

Deutlich niedriger waren die H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivitäten der Transkonjuganten basierend auf dem *R. eutropha*-Stamm HF500. Die höchste Aktivität wies auch hier die Transkonjugante des *R.e.*-Stammes HF500 mit pRehoxHY auf. Aktivitäten der HF500 Stämme mit den Hydrogenasemodulen RoHoxHY sowie HtHoxHY waren mit etwa 0.04 U · mg⁻¹ sehr gering. Unter Zugabe der zweiwertigen Kationen war eine leichte Zunahme der Aktivitäten erkennbar, jedoch war dieser Effekt sehr schwach. Wurde die Aktivität des thermostabilen Hydrogenasemoduls im löslichen Extrakt von HF500 bei einer erhöhten

Temperatur von 50 °C gemessen, war der stimulierende Effekt von NiCl₂ und MgCl₂ dagegen deutlicher sichtbar, was in einer insgesamt höheren H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität resultierte.

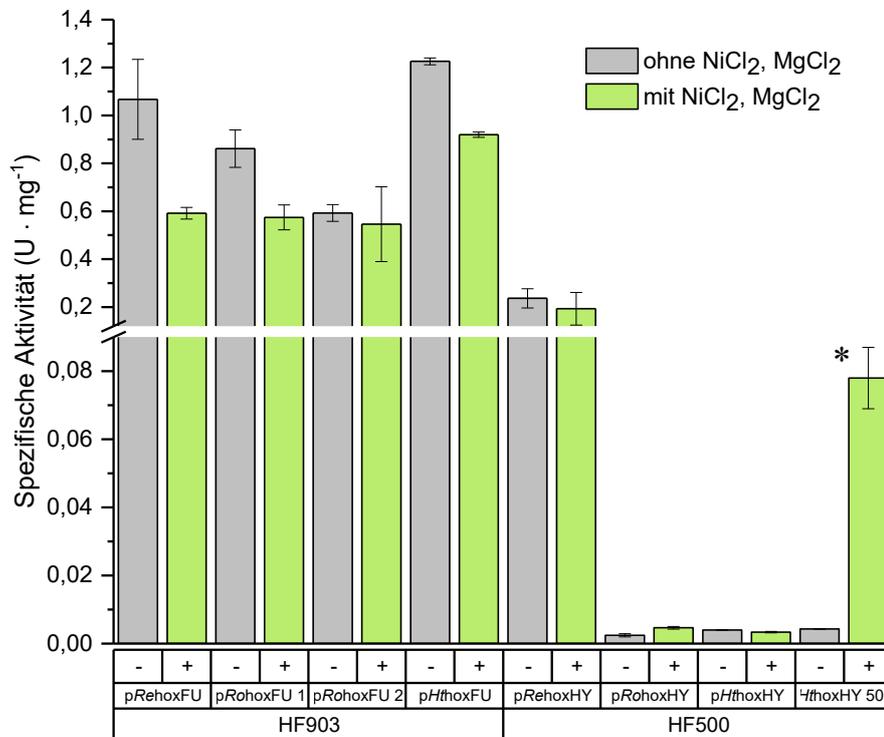


Abbildung 17. Spezifische H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivitäten in den löslichen Extrakten der Transkonjuganten der *R. eutropha*-Stämme HF903 (Δ *hoxFU*) bzw. HF500 (Δ *hoxH*) mit den angegebenen Plasmiden ohne und in Anwesenheit von 0.5 mM NiCl₂ und 5 mM MgCl₂. Die Aktivitäten wurden bei 30 °C bzw. 50 °C (*) in 50 mM Tris, pH 8 mit 1 mM NAD⁺, 0.75 mM TCEP und 2 μ M FMN gemessen. Die Werte stammen aus mindestens zwei biologischen Replikaten. Bei den Transkonjuganten des Stammes HF903 mit pRehoxFU und pHthoxFU wurden vier unterschiedliche biologische Replikate getestet.

3.4.4 Reinigung der SH-Chimären mittels Affinitätschromatographie

Um den stimulierenden Effekt von Nickel- und Magnesiumionen auf die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktion genauer zu untersuchen, sollten die chimären SH-Varianten über die *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Da sich der Stamm HF1009 Δ *hoxHY* (*StrepII-hoxF*) für die Produktion der heterologen Hydrogenase-Module nicht eignete, wurde auf den Stamm HF500 Δ *hoxH* ausgewichen. Dieser kodiert jedoch keine *Strep*-tag II-Sequenz

an einer der SH-Untereinheiten, so dass aus den Transkonjuganten des *R. eutropha*- Stammes HF500 mit *pRehoxHY* 1 sowie *pRehoxHY* 2 keine lösliche Hydrogenase über die Affinitätschromatographie isoliert werden konnte. Bei den Transkonjuganten des *R. e.*- Stammes HF500 mit *pHthoxHY* und *pRohoxHY* befindet sich ein *StrepII*-tag an HoxY, sodass dieser die Reinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglichte. Heterotetramere, homogene *ReSH* als Kontrolle wurde durch die Proteinreinigung aus der Transkonjuganten des *R.e.*-Stammes HF903 mit *pRehoxFU* erhalten.

Für die Reinigungen der chimären SHs wurde zunächst ein Puffersystem (50 mM KPO_i, pH 7, 15 % Glycerin) ohne Salze gewählt, um störende Effekte wie z.B. die zuvor beobachtete Sensibilität der *ReSH* auf Natriumionen (Keefe *et al.*, 1995) oder eine niedrige Ausbeute der *HtSH* bei Anwesenheit von Kaliumionen auszuschließen (3.2). Dieser Puffer erscheint geeignet für die Reinigung der *Ro*-Module und der *HtHoxFU*-Untereinheiten, eignete sich jedoch nicht für die Isolierung von *HtHoxHY* zusammen mit *ReHoxFU*. Bei dieser chimären SH-Variante wurde zwar Protein im Eluat nachgewiesen, das zugehörige SDS-Gel zeigte jedoch nur Banden, die sich in Laufhöhe der Untereinheiten HoxF und HoxU befinden (**Abbildung 18 a**). Der immunologische Nachweis der HoxFUHY-Untereinheiten mittels *ReSH*-spezifischer Antikörper wurde für die Reinigung der Transkonjugante HF500 mit *pHthoxHY* mit Proben des löslichen Extraktes, des Durchflusses nach Auftragen auf die Streptactinsäule und des eluierten Proteins durchgeführt. Dabei zeigten sich insbesondere im Durchfluss Banden in den Laufhöhen aller vier SH-Untereinheiten. Im Eluat waren diese Banden wesentlich schwächer, und das HoxF-spezifische Signal war scheinbar ganz verschwunden (**Abbildung 18 b**). Das Fehlen bzw. der Mangel an HoxF erklärt die sehr geringe H₂- abhängige NAD⁺-spezifische Aktivität dieser Fraktion. Auch die Supplementation des Aufschlusspuffers mit NiCl₂ und MgSO₄ konnte die Proteinausbeute nicht verbessern (**Abbildung 18 a, b**). Das Eluat der Transkonjugante HF500 mit *pHthoxHY* wies lediglich bei 50 °C und in Anwesenheit von Nickel- und Magnesiumionen eine nur sehr geringe H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität auf. Im löslichen Extrakt dieser Transkonjugante wurde dagegen eine höhere Aktivität nachgewiesen.

Deutliche Verbesserung der Aktivität der chimären *ReFU HtHY*-Variante konnte durch die Vermeidung von Sauerstoff während der Reinigung erzielt werden. Die Affinitätschromatographie wurde hierbei in der Anaerobenbox mit einer Atmosphäre aus Formiergas mit etwa 4.5-5% H₂ durchgeführt (2.3.2). Die zusätzliche Inkubation von eluierten

Proteinproben in der Atmosphäre der Anaerobenbox verkürzte die zunächst beobachtete Lagphase von 120 Minuten (**Abbildung 5**).

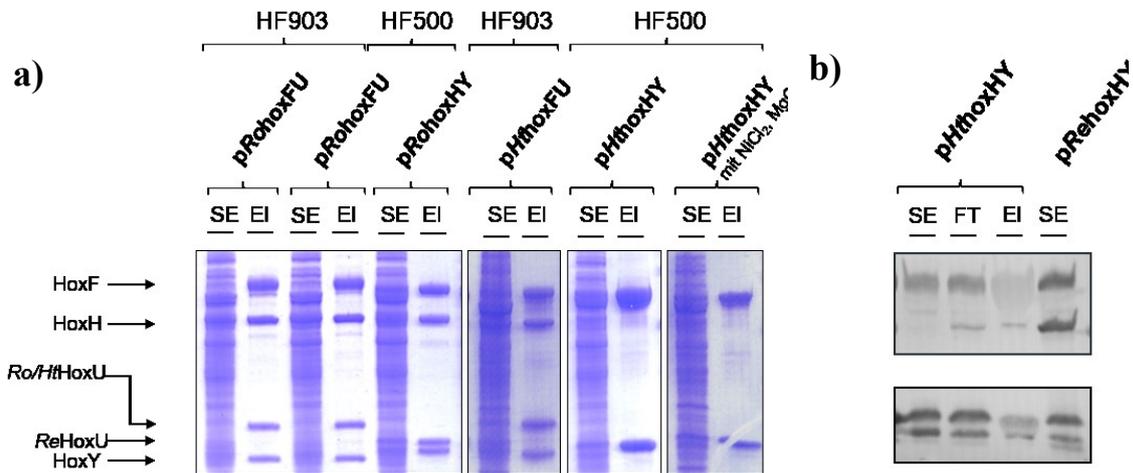


Abbildung 18. SDS-Gel (a) und Western-Blot (b) der gereinigten SH-Chimären aus HF903 ($\Delta hoxFU$) bzw. HF500 ($\Delta hoxH$). Es wurden etwa 30 μg löslicher Extrakt (SE) sowie 6 μg der gereinigten Proteinproben (EI) nach Affinitätschromatographie aufgetragen und mittels Gelelektrophorese in einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die immunologische Detektion der SH-Untereinheiten wurden etwa 10 μg der gereinigten Proteinproben (EI) sowie 30 μg des löslichen Extraktes (SE) und des Durchflusses während der Affinitätschromatographie (FT) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Da sich insbesondere für die Proben der löslichen Extrakte der Transkonjuganten basierend auf dem *R. eutropha*-Stamm HF500 nur eine sehr geringe H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivität ermitteln lies, wurden die entsprechenden SH-Varianten über *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Um eine Aussage über den Effekt der Ni^{2+} - und Mg^{2+} -Zugabe treffen zu können, wurden alle Aktivitäten auch in Reaktionsansätzen mit und ohne die zweiwertigen Kationen gemessen. Wie auch in Abschnitt 3.5.2 gezeigt, wurde die homogene *ReSH* aus der Transkonjuganten des *R.e.*-Stammes HF903 mit p*RehoxFU* mit einer hohen spezifischen Aktivität isoliert werden. Dabei werden standardmäßig NAD^+ -Reduktionsaktivitäten von etwa $100 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ isoliert.

Die höchste spezifische Aktivität einer chimären SH mit $30.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ wurde für die Variante bestehend aus *RoHoxFU* und *ReHoxHY* in Abwesenheit von Ni^{2+} und Mg^{2+} festgestellt (**Abbildung 19**). Dieser Wert liegt sogar um etwa 30 % über der Aktivität der heterolog

produzierten heterotetrameren *RoSH* (K. Karstens, 2014). Die biochemisch betrachtet gleiche Chimäre, die aber von einem anderen Plasmidkonstrukt kodiert wird, zeigte niedrigere spezifische Aktivitäten um $19.2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Aktivitäten beider SH-Varianten sind durch die Zugabe der Ionen kaum beeinflusst und mit 26.6 bzw. $19 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ vergleichsweise hoch.

Bei der Kombination des Hydrogenasedimers aus *R.eutropha* mit dem thermostabilen NAD^+ -Reduktasedimer aus *H. thermoluteolus* wurde ebenfalls eine hohe H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivität von $25.7 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ gemessen. Auch die Aktivität dieser Chimäre ist höher als die heterolog produzierte tetramere *HtSH* und nimmt nur um etwa $5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ab, wenn Ni^{2+} und Mg^{2+} im Reaktionsansatz anwesend sind (**Abbildung 19**).

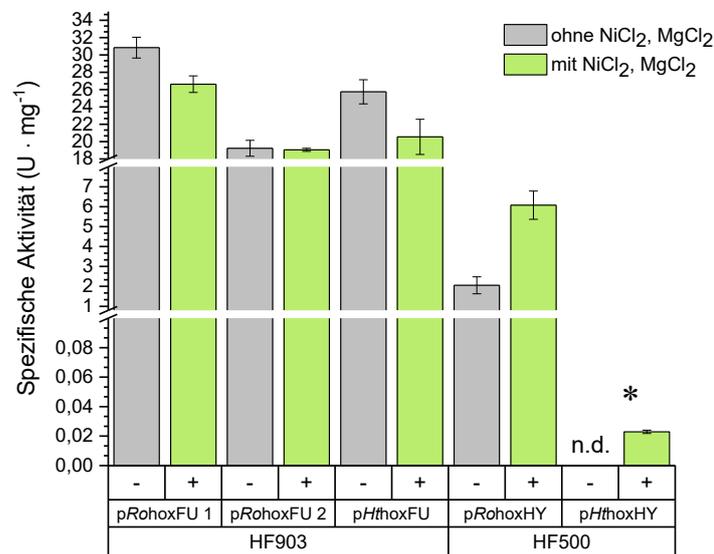


Abbildung 19. Spezifische H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivitäten der gereinigten SH-Chimären aus den Stämmen HF903 bzw. HF500 ohne und in Anwesenheit von 0.5 mM NiCl_2 und 5 mM MgCl_2 . Die Aktivitäten wurden bei 30°C bzw. 50°C in 50 mM Tris , $\text{pH } 8$ mit 1 mM NAD^+ , 0.75 mM TCEP und $2 \mu\text{M FMN}$ gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Reinigungen mit 2-3 Messungen pro Variante und Reaktionsbedingung.

n.d. nicht detektierbar

Die gereinigten SH-Hybride, die aus einem heterologen Hydrogenasedimer und der *Re*-eigenen NAD^+ -Reduktase bestehen, wiesen wesentlich geringere spezifische Aktivitäten auf. Die SH-Variante mit *RoHoxHY* und *ReHoxFU* zeigte in Abwesenheit der Kationen eine niedrige Aktivität von $2.1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Erst durch Zugabe von Ni^{2+} und Mg^{2+} konnte die Aktivität auf $6.1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ erhöht werden.

Für die Variante aus *HtHoxHY* und *ReHoxFU* war eine genaue Messung der spezifischen Aktivität kaum möglich. Erst eine Temperaturerhöhung sowie die Zugabe der Kationen ermöglichte die Bestimmung der H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivität. Diese lag mit einem Wert von etwa 0.02 U · mg⁻¹ aber sogar noch unter der Aktivität des Konstrukts im löslichen Extraktes (s. auch **Abbildung 17**).

3.4.4.1 Analyse der Kationenabhängigkeit der chimären SHs bestehend aus *ReHoxFU* und fremden *HoxHY*-Modulen

Nachdem die Aktivitätsmessungen der gereinigten chimären SHs bestehend aus *RoHoxHY* bzw. *HtHoxHY* und dem NAD⁺-Reduktase-Modul aus *R.e.* einen stimulierenden Effekt von Nickel- und Magnesiumionen aufzeigten, sollte die Kationenabhängigkeit näher untersucht werden. Dazu wurden die H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivitäten in Anwesenheit verschiedener Metallionenkonzentrationen gemessen. Wie zuvor für die heterotetrameren SHs aus *R.o.* und *H.t.* beobachtet (Schneider & Schlegel, *et al.* 1984; **3.3.6**), zeigte die Supplementierung des Reaktionspuffers mit Nickelionen die stärkste Wirkung. Bereits die Anwesenheit von 0.5 mM NiCl₂ führte zu etwa 87 % bzw. 86 % der Aktivitäten, die bei Zugabe beider Kationen für die SH-Varianten aus *ReHoxFU* und *RoHoxHY* bzw. *HtHoxHY* gemessen wurden. Eine weitere Erhöhung der NiCl₂-Konzentration führte zu keiner weiteren Steigerung der Aktivität. Wurde dem Reaktionsansatz lediglich MgCl₂ zugefügt, so erreichte das SH-Hybrid mit *RoHoxHY*-Modul etwa 56 % der Maximalaktivität. Die heterotetramere *HtSH* sowie die SH-Chimäre mit *HtHoxHY*-Modul erreichen unter MgCl₂-Zusatz 22 % bzw. etwa 8 % der jeweils maximalen Aktivität. Ohne die Zugabe der Metallionen lagen die H₂-abhängigen NAD⁺-Reduktionsaktivitäten der *RoHoxHY-ReHoxFU*- und der *HtHoxHY-ReHoxFU*-Chimäre bei etwa 34 % bzw. 64 % der Maximalaktivität in Gegenwart beider Kationen (**Abbildung 19**). Im Gegensatz zu den heterotetrameren SHs aus *R.o.* und *H.t.* war also trotz Abwesenheit von Kationen noch eine Aktivität zu messen. Im Fall der SH-Chimäre „*HtHoxHY-ReHoxFU*“ war diese Aktivität erstaunlicherweise sogar höher als unter Zugabe von MgCl₂, was auf eine eher hemmende Wirkung von MgCl₂ auf diese SH-Variante hindeutet.

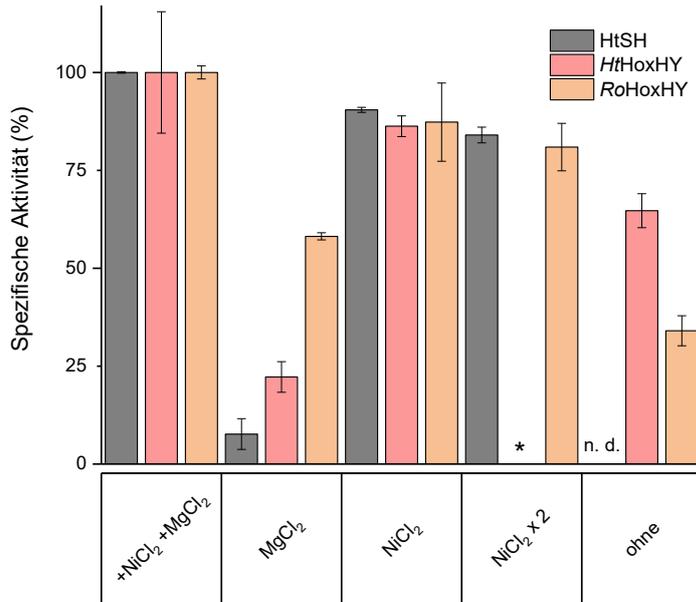


Abbildung 20. H₂-abhängige Reduktion von NAD⁺ katalysiert von der heterotetrameren *HtSH* (grau) und den SH-Varianten bestehend aus *ReHoxFU* und *HtHoxHY* (rot) bzw. *RoHoxHY* (orange) in Gegenwart von verschiedenen Salzen. Die Aktivitäten der *HtSH* und der SH-Variante mit dem *HtHoxHY*-Modul wurden bei 50°C in 50 mM BisTris, pH 6.5, gemessen. Die Aktivitäten der SH-Chimäre aus *ReHoxFU* und *RoHoxHY* wurden bei 30 °C in 50 mM Tris pH 8 untersucht. Die Proben der SH-Chimäre aus *ReHoxFU* mit *HtHoxHY* wurden unter anaeroben Bedingungen gereinigt und nach einer zweitägigen Inkubation in der Anaerobenbox zur Messung verwendet. Die Aktivitäten in Anwesenheit der Salze und ohne die Salzzugabe beziehen sich auf die maximale Aktivität der jeweiligen Variante bei Zugabe von 0.5 mM NiCl₂ und 5 mM MgCl₂. Die getesteten Konzentrationen waren 5 mM MgCl₂, 0.5 mM NiCl₂ und 1 mM NiCl₂ (entspricht NiCl₂x2).

* nicht gemessen

n.d. nicht detektierbar

Da für die aerob gereinigte SH-Variante bestehend aus *HtHoxHY* und *ReHoxFU* auch bei Zugabe der IMetallionen im Aufschluss- und Reinigungspuffers zunächst keine deutliche Aktivität gemessen werden konnte, wurde ein Protokoll zur anaeroben Reinigung des Chimärs herangezogen (2.3.2). Dieses sollte die Oxidation und eine damit verbundene mögliche strukturelle Veränderung der chimären SH, die zur Dissoziation der HoxHY- und HoxFU-Module führt, verhindern. Die Analyse der anaerob-gereinigten Proben im SDS-PAGE-Gel zeigte das gleiche Laufmuster der SH-spezifischen Banden wie für das aerob gereinigte Protein. Allerdings konnte nach der langen Inkubationsdauer unter den anaeroben, reduzierenden Reinigungsbedingungen eine deutliche Verkürzung der Anlaufphase beobachtet werden (**Abbildung 21**). Nach Zugabe der beiden Salze NiCl₂ und MgCl₂ und zweitägiger Inkubation in der anaeroben Box in einer Formiergas-Atmosphäre mit 5% H₂ bei etwa 9°C verschwand diese Verzögerung in der Aktivitätsausprägung sogar völlig. Die maximale spezifische Aktivität veränderte sich dabei nicht wesentlich. Nach mehrtägiger Inkubation

unter reduzierenden Bedingungen wurde für diese Proben sofort deutliche Aktivitäten gemessen werden. Dieses Phänomen verdeutlicht die lange Anlaufphase dieser chimären SH-Variante und erklärt rückblickend geringe/ausbleibende Aktivitäten für aerob gereinigtes Protein.

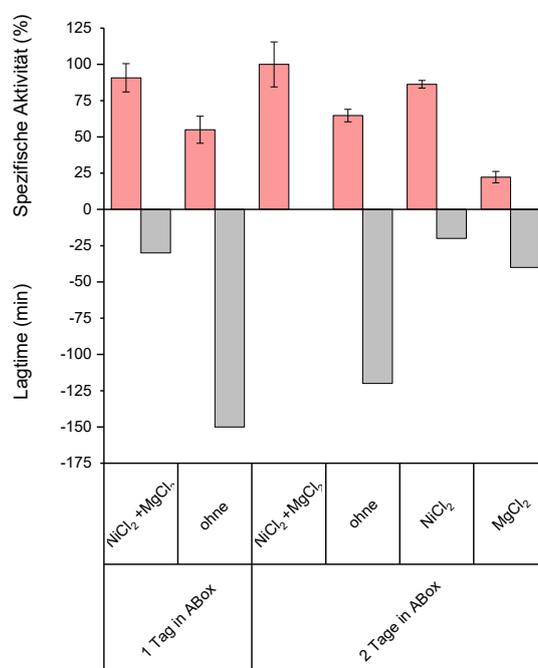


Abbildung 21. H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivitäten (%) und Anlaufphase (Lagtime/ min) der SH-Chimäre bestehend aus *HtHoxHY* und *ReHoxFU* in Anwesenheit von verschiedenen Salzen nach Reinigung und Inkubation unter reduzierenden Bedingungen in einer anaeroben Box (ABox). Die Reduktionsaktivitäten der SH-Variante mit dem *HtHoxHY*-Modul wurden bei 50°C in 50 mM BisTris, pH 6.5, gemessen. Die getesteten Konzentrationen waren 5 mM MgCl₂ und/ oder 0.5 mM NiCl₂. Als Anlaufphase (lagtime) wird die Zeit bezeichnet, die nach Zugabe des Enzyms zum Reaktionsassay während der photometrischen Aktivitätsmessung vergeht, bevor eine Absorptionszunahme bzw. Aktivität beobachtet werden kann.

3.5 Umwandlung der NAD⁺-Bindestelle in *ReHoxF* zur Erhöhung der Spezifität für NADP⁺

Die Biokatalyse zur Herstellung industriell relevanter, chemischer Verbindungen gewinnt zunehmend an Bedeutung (Michael & Abraham, 1992; Nestl, Nebel & Hauer, 2011). Besonders die enzymkatalysierte asymmetrische Reduktion von Ketonen, Alkenen und Iminen sowie die kontrollierte Oxidation terminaler Alkohole kann mit der traditionellen chemischen Synthese konkurrieren (Kroutil *et al.*, 2004; Muñoz Solano *et al.*, 2012). Die dabei verwendeten Oxidoreduktasen benötigen ihrerseits allerdings Reduktionsäquivalente wie

NAD(P)⁺ oder NAD(P)H (Bernhardt & Urlacher, 2014). Der Zusatz dieser Kofaktoren in stöchiometrischen Mengen wäre wirtschaftlich nicht sinnvoll. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es verschiedene Möglichkeiten die Kofaktoren zu regenerieren (Zhao *et al.*, 2003).

Die SH aus *R. eutropha* wurde bereits in mehreren Experimenten erfolgreich zur H₂-getriebenen Regeneration von NADH verwendet (Ratzka *et al.*, 2011; Reeve *et al.*, 2011, 2015, 2017; Lauterbach, Lenz & Vincent, 2013; Lonsdale *et al.*, 2015). Da es neben den NAD(H)-abhängigen Oxidoreduktasen aber auch Enzyme gibt, die die phosphorylierte Form NADP(H) bevorzugen, sollte die NAD(H)-Bindetasche der SH durch gerichtete Mutagenese so angepasst werden, dass auch NADP⁺ als Substrat akzeptiert wird.

3.5.1 Die NAD(H)-Bindetasche in HoxF unterscheidet sich von der in NADP(H)-spezifischen Enzymen

Die kofaktorbindende Untereinheit HoxF von löslichen, bidirektionalen [NiFe] Hydrogenasen der Gruppe 3d weist eine hohe Sequenzähnlichkeit auf mit Nqo1 der Nqo1-Untereinheit von Komplex 1 aus *Thermus thermophilus* (Pilkington *et al.*, 1991; Friedrich *et al.*, 1995; Lauterbach & Idris, *et al.*, 2011). Mit Hilfe der Kristallstruktur von Komplex I (Berrisford & Sazanov, 2009; Sazanov, 2006) ließ sich ein Homologiemodell von HoxF aus *Ralstonia eutropha* erstellen, welches einen detaillierten Einblick in die Bindung der Kofaktoren FMN und NAD⁺ in der Rossmannfalte ermöglicht. Im Vergleich zu anderen Pyridinnukleotid-abhängigen Enzymen ließen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung ausmachen. So sind in NAD(H)-abhängigen Enzymen vorrangig Aminosäuren mit einer negativ geladenen Seitengruppe wie Aspartat und Glutamat an der direkten Wasserstoffbrückenbindung mit den 2'- und 3'-Hydroxylgruppen der Ribose beteiligt. Im Fall von NADP(H)-affinen Enzymen sind an den äquivalenten Positionen häufig ein konserviertes Arginin und/ oder nur Aminosäuren mit neutralen, kleinen Seitengruppen auf (Cahn *et al.*, 2017; Lerchner *et al.*, 2013). Die Guanidino-Seitengruppe des Arginins trägt zur Stabilisierung der negativ-geladenen Phosphatgruppe des NADP(H) bei, während negativ geladene bzw. große Seitengruppen diese abstoßen oder sterisch hindern würden. Im Modell für HoxF interagiert die Säuregruppe des Glutamats an Position 341 mit den Hydroxylgruppen der Ribose im gebundenen Kofaktor NAD⁺ (**Abbildung 22 c**). An der benachbarten Position 340 befindet sich ein Aspartat, welches jedoch keine offensichtlichen Wechselwirkungen mit dem Substrat eingeht. Positiv geladene Aminosäuren sind NADP(H)-Bindetaschen

offensichtlich nicht vorhanden. Tatsächlich führte der Austausch des Glutamats an Position 341 in der Wildtypform von HoxF zu einer verringerten Affinität für das natürliche Substrat NAD^+ (L. Lauterbach, 2013). Das Einfügen einer Aminosäure mit positiver Seitenkette konnte die Bindung von NADP^+ weiter verbessern.

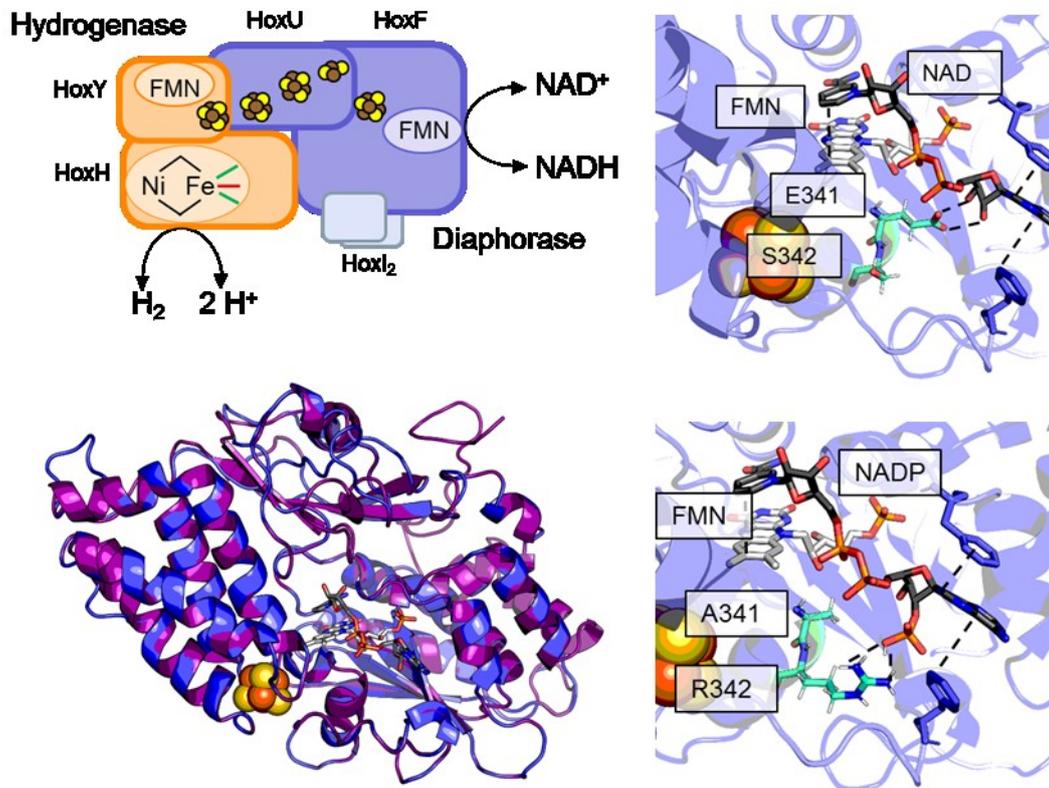


Abbildung 22. Darstellungen der Untereinheiten- und Kofaktorzusammensetzung der löslichen, NAD^+ -reduzierenden $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenase aus *R. eutropha* H16. (A) Vereinfachte Darstellung des Hydrogenase (HoxHY in orange dargestellt) und NAD^+ -Reduktase (HoxFU in blau dargestellt)-Moduls. An dem NAD^+ -Reduktase-Modul gebunden ist das HoxI-Dimer, in hellblau eingefärbt. Die Eisen-Schwefel-Zentren, die die beiden Module elektronisch miteinander verbinden sind als gelb-orange Sphären abgebildet. (B) Homologiemodell der Untereinheit HoxF (blau) basierend auf der Kristallstruktur von Nqo1 (violett) des Komplex I aus *Thermus thermophilus* (2FUG). Das Flavinmononukleotid und NADH sind als Stäbchen von dem pdb-Eintrag 3IAM übernommen. (C) Die NAD(H)-Bindetasche der nativen SH. Wichtige H-Bindungen und π - π -Interaktionen sind als gestrichelte Linie angedeutet. (D) Modell der NAD(P)(H)-Bindetasche mit den Aminosäureaustauschen E341A und S342R (Die Kohlenstoffatome der Aminosäuren sind in cyan gezeigt).

3.5.2 Durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren in der NAD(H)-Bindetasche von HoxH lässt sich die Substratspezifität der SH verändern

Die Aminosäuren in HoxF, die vermutlich eine tragende Rolle bei der Koordination von NAD(H) in der Bindetasche spielen, wurden mittels zielgerichteter Mutagenese ausgetauscht. Hierzu Vektor konstruiert, der auf der Basis von pCM66 beruht und auf dem die Gene *hoxFU* unter Kontrolle des SH-Promotors vorliegen. Zudem trägt der 5'-Terminus von *hoxF* eine den *Strep-tagII* kodierende Sequenz. Die entsprechenden Basenaustausche in *hoxF* wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die verwendeten Plasmide und die von ihnen kodierten HoxF-Varianten sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21. Verwendete Plasmidkonstrukte, die HoxF-Varianten mit Aminosäureaustausche in der NAD(H)-Bindetasche kodieren.

Plasmidname	Aminosäureaustausch(e) in HoxF	Bezeichnung der SH-Variante
pJP66	-	SH
pJP01	E341A	SH ^{E341A}
pJP02	D467S	SH ^{D467S}
pJP03	E341A, D467S	SH ^{E341A/D467S}
pJP04	E341A, S342R	SH ^{E341A/S342R}
pJP05	E341A, S342R, K358R	SH ^{E341A/S342R/K358R}
pJP06	E341A, S342R, D467S	SH ^{E341A/S342R/D467S}

Nach der Konjugation dieser Plasmide in HF903 wurden die resultierenden Stämme in modifiziertem FGN-Medium über 7 Tage bei 30 °C kultiviert. Aus etwa je 5-10 g Zellen wurden nach *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie (2.3.1) routinemäßig 6-12 mg der heterotetrameren SH-Varianten gereinigt.

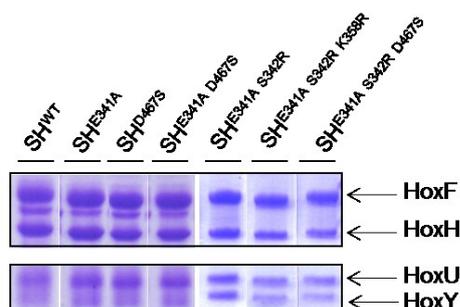


Abbildung 23. SDS-PAGE der verschiedenen, mittels Affinitätschromatographie gereinigten SH-Derivate. Pro Spur wurden 5 μg Protein aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivität der gereinigten SH-Varianten wurde standardmäßig in 50 mM Tris, pH 8, bei 30°C bestimmt. Die native SH zeigte mit $95\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ die höchste Aktivität (**Abbildung 24**). Etwas weniger als 50 % der Aktivität der nativen SH besitzt die Variante mit dem Austausch D467S in HoxF. Wesentlich niedrigere NAD^+ -Reduktionsaktivitäten von 12-20 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ wurden für die übrigen SH-Varianten ermittelt. Im Gegensatz zur nativen SH zeigen diese jedoch messbare H_2 -abhängige NADP^+ -Reduktionsaktivität. Dabei erreicht die $\text{SH}^{\text{E341A/S342R}}$ -Variante mit etwa $1\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ die bis dahin höchste H_2 -abhängige NADP^+ -Reduktionaktivität.

Die SH-Varianten katalysierten auch die Rückreaktionen, nämlich die NAD(P)H -abhängige Reduktion des artifiziellen Akzeptors Benzylviologen. Hierbei zeigte für NADH ebenfalls die native SH die höchste Aktivität von etwa $56\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (**Abbildung 24**). Die niedrigste NADH -Oxidationsaktivität mit einem Wert von nur noch $8\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ wies die $\text{SH}^{\text{E341A/S342R/D467S}}$ -Variante auf. Interessanterweise sind bei der Variante $\text{SH}^{\text{E341A/S342R/K358R}}$ sowohl die NADH - als auch die NADPH -Oxidationsaktivität, höher als die entsprechenden Reduktionsaktivitäten. Die Werte liegen bei dieser Variante bei 13 ($\text{NADH} \rightarrow \text{BV}$) bzw. 1.4 ($\text{NADPH} \rightarrow \text{BV}$) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ im Vergleich zu 8 ($\text{H}_2 \rightarrow \text{NAD}^+$) bzw. 0.5 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($\text{H}_2 \rightarrow \text{NADP}^+$) (s. auch **Tabelle 23**).

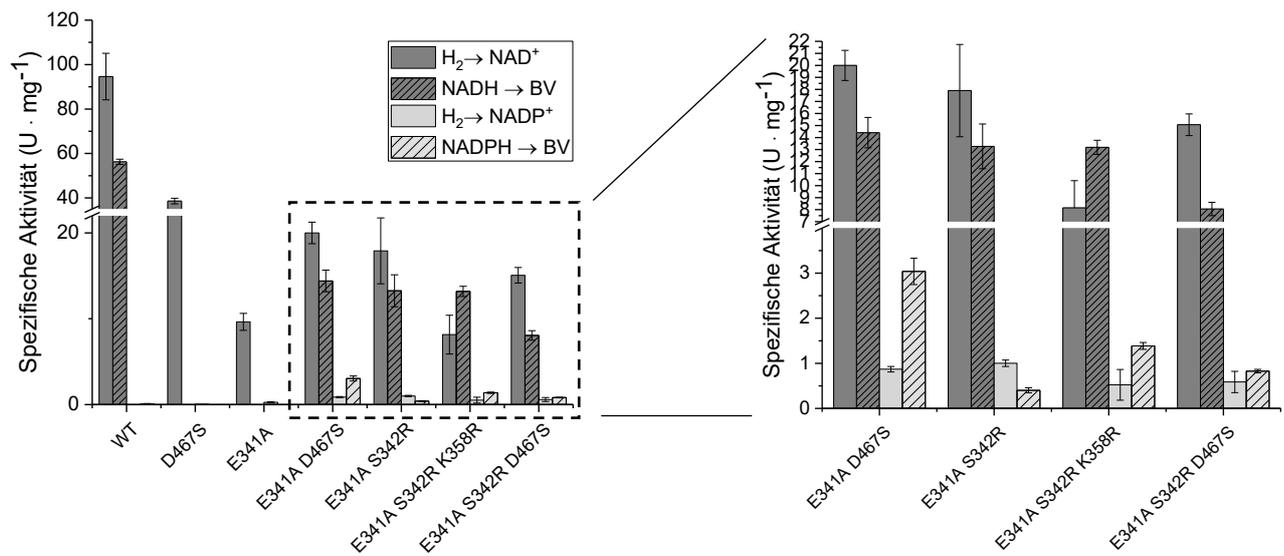


Abbildung 24. Spezifische Aktivitäten der SH-Derivate mit Aminosäureaustauschen in HoxF. Die Aktivitäten wurden in 50 mM Tris pH 8 mit 2 μ M FMN und 1 mM Dtt im Reaktionsansatz bei 30 °C photometrisch gemessen. Dunkel graue Balken stellen die H_2 -abhängige Reduktion von NAD^+ (1 mM), hell graue Balken die H_2 -abhängige Reduktion von $NADP^+$ (1 mM) dar. Balken mit Schraffur repräsentieren die Rückreaktionen, d.h. die NAD(P)H-abhängige Reduktion von Benzylviologen (0.6 mM).

3.5.3 Die SH-Varianten mit veränderter Substrataffinität vermitteln kein lithoautotrophes Wachstum des Wirtsstammes

Die Auswirkung der Aminosäureaustausche in HoxF auf die *In-vivo*-Aktivität der SH wurde über das Wachstumsverhalten unter lithoautotrophen Bedingungen getestet. Der verwendete Expressionsstamm *R. eutropha* HF903 weist Deletionen in *hoxG* (MBH⁻), *hoxC* (RH⁻) und *hoxF* (SH⁻) auf und ist daher nicht in der Lage, H_2 als Energiequelle für lithoautotrophes Wachstum zu nutzen (Lauterbach & Idris, *et al.*, 2011). Die *hoxF*-Deletion kann jedoch durch den Transfer des Plasmids pJP66 (*hoxFU*) komplementiert werden, so dass der resultierende Stamm zum Wachstum mit H_2 , CO_2 und O_2 fähig war (**Abbildung 25**). Auch die SH^{D467S}-Variante ermöglicht das Wachstum mit H_2 . Die Auswirkungen durch den Austausch anderer oder zusätzlicher Aminosäuren auf die Bereitstellung nötiger Reduktionsäquivalente durch die SH waren schwerwiegend. Die entsprechenden *R.-eutropha*-

Transkonjuganten waren nicht oder nur kaum (für SH^{E341A} sowie SH^{E341A/D467S}) in der Lage, chemolithoautotroph zu wachsen (**Abbildung 25**).

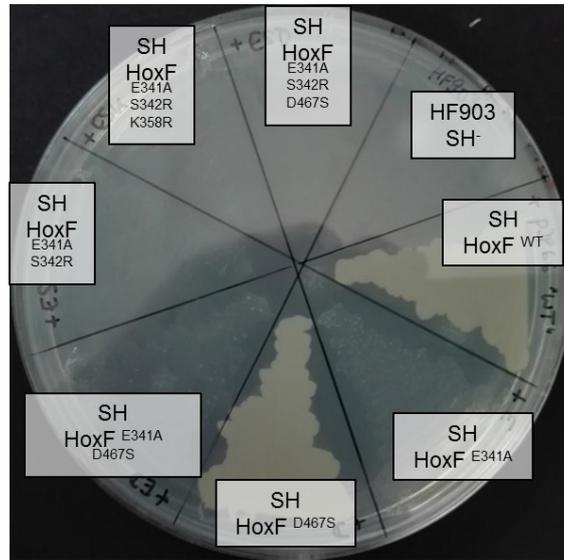


Abbildung 25. Fähigkeit der SH-Varianten mit Aminosäureaustauschen in HoxF lithoautotrophes Wachstum mit H₂, CO₂ und O₂ zu vermitteln. Transkonjuganten von *R. eutropha* HF903 mit den in Tabelle 21 aufgeführten Plasmiden wurden auf festes Minimalmedium ausgestrichen und für 5 Tage bei 30 °C in einer Atmosphäre bestehend aus 10% O₂, 10% CO₂, 5 % H₂ und 75% N₂ inkubiert.

3.5.4 Die NADP(H)-umsetzenden SH-Varianten sind auch in Gegenwart von O₂ aktiv

Um einen Einfluss der Aminosäureaustausche in HoxF auf die Sauerstofftoleranz der SH zu untersuchen, wurde die H₂-abhängige NAD(P)⁺-Reduktion in Anwesenheit von 230 μM (20 % vol/vol) O₂ gemessen.

Tabelle 22. H₂-abhängige NAD(P)⁺-Reduktionsaktivität in Anwesenheit von O₂ der SH-Varianten mit Austausch in der NAD(H)-Bindetasche von HoxF.

SH Variante	O ₂	Aktivität (U · mg ⁻¹) ^a	Aktivität (%)
SH	–	53.6 ± 2.3 †	100
	+	46.9 ± 0.5 †	87
SH ^{E341A}	–	0.78 ± 0.01	100
	+	0.43 ± 0.01	56
SH ^{D467S}	–	0.22 ± 0.07	100
	+	0.10 ± 0.02	46
SH ^{E341A/D467S}	–	0.93 ± 0.01	100
	+	0.83 ± 0.01	89
SH ^{E341A/S342R}	–	1.22 ± 0.01	100
	+	1.15 ± 0.02	94
SH ^{E341A/S342R/D467S}	–	0.11 ± 0.02	100
	+	0.06 ± 0.0004	56
SH ^{E341A/D467S/K358R}	–	0.56 ± 0.02	100
	+	0.31 ± 0.04	55

^aAktivitäten wurden bei 30 °C in 50 mM Tris/HCl, pH 8, mit etwa 40 nM SH-Protein in Gegenwart von entweder 50% H₂/50% N₂ (–O₂) oder 50% H₂/30% N₂/20% O₂ (+O₂) gemessen. † Da für die native SH keine NADP⁺-Reduktionsaktivität messbar war, wurde NAD⁺ als Substrat verwendet. Die angegebenen Werte repräsentieren arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Messungen unter anaeroben Bedingungen für die native SH sowie die SH^{E341A/D467S}- und SH^{E341A/S342R}-Varianten mit 6-13 % nur eine relative geringe Abnahme der NAD(P)⁺-Reduktionsaktivität durch O₂ (**Tabelle 22**). Im Fall der anderen SH-Varianten war die Aktivitätsabnahme in Anwesenheit von O₂ prägnanter. Sie betrug für die

SH^{D467S}-Variante sogar ca. 50 %. Dieser Effekt kann aber auch durch die insgesamt niedrigen Aktivitäten dieser SH-Derivate zustande kommen.

3.5.5 Kinetische Parameter der SH-Varianten mit Veränderungen in der NAD(H)-Bindetasche

Im Anschluss an die *In-vivo*-Untersuchung der Auswirkungen von Aminosäureaustauschen in HoxF und ersten Aktivitätsmessungen wurden die Affinitäten der SH-Varianten für die Substrate NAD(H) und NADP(H) bestimmt. Diese wurden in Form von Michaelis-Menten-Konstanten, K_M , gemessen und sind in **Tabelle 23** aufgeführt. Demnach wies die native SH mit einem K_M -Wert von 0.55 mM die höchste Affinität zu dem natürlichen Substrat NAD⁺ auf. Im Falle der Varianten mit einfachen Aminosäureaustauschen sowie dem SH^{E341A/D467S}-Protein lagen die $K_M^{\text{NAD}^+}$ -Werte mit 0.61 – 0.66 mM in einem ähnlichen Bereich. Mit einem Wert von 1.32 mM mehr als doppelt so hoch war der $K_M^{\text{NAD}^+}$ der SH^{E341A/S342R}. Die Bindungsaffinität zu dem natürlichen Substrat hat sich demzufolge durch den zweifachen Austausch deutlich verringert. Im Gegensatz dazu war der K_M -Wert für das alternative Substrat, NADP⁺, mit 0.6 mM nun geringer als der K_M -Wert für das natürliche Substrat (**Tabelle 23**). Durch die Aminosäureaustausche E341A und S342R in HoxF wurde demnach ein Wechsel der Spezifität von NAD⁺ zu NADP⁺ erreicht. $K_M^{\text{NADP}^+}$ -Werte der anderen SH-Varianten.

Wird lediglich die Wechselzahl (molekulare Aktivität, k_{cat}) für den NADP⁺-Umsatz betrachtet, so erreichen die SH^{E341A}- und SH^{E341A/D467S}-Proteine mit 3.3 und 3.0 s⁻¹ die höchsten Werte. Da die NADP⁺-Bindung jedoch weniger spezifisch ist als bei der Variante SH^{E341A/S342R}-Variante, weisen die beiden Proteine auch noch relative hohe Wechselzahlen für NAD⁺ auf (19.9 – 54.8 s⁻¹). Diese ist für die SH^{E341A/S342R}-Variante mit 8.8 s⁻¹ weit geringer. Welches Substrat von den einzelnen Varianten bevorzugt wird, wird durch das Verhältnis der kinetischen Parameter deutlich (**Tabelle 23**, letzte Spalte). Im Vergleich mit der nativen SH wird deutlich, dass sich die Werte für SH^{E341A/S342R} zugunsten von NADP⁺ verschoben haben.

Tabelle 23. K_M - und k_{cat} - Werte der SH-Varianten für die H_2 -abhängige $NAD(P)^+$ -Reduktion

SH-Variante	$NAD^+ \rightarrow NADH$		$NADP^+ \rightarrow NADPH$		Verhältnis	
	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$K_M^{NAD^+}/K_M^{NADP^+}$	$k_{cat}^{NAD^+}/k_{cat}^{NADP^+}$
SH ^{WT}	0.55 ± 0.08	690	> 50	< 0.1	>91	<0.001
SH ^{E341A}	0.61 ± 0.11	19.9	4.83 ± 1.70	3.3	7.9	0.17
SH ^{D467S}	0.66 ± 0.18	54.8	3.39 ± 0.98	0.2	5.1	0.09
SH ^{E341A D467S}	0.65 ± 0.18	24.3	2.25 ± 1.05	3	3.5	0.12
SH ^{E341A S342R}	1.32 ± 0.29	8.8	0.60 ± 0.33	2.1	0.5	0.24
SH ^{E341A S342R D467S}	n.g.	42.9	0.25 ± 0.03	1.7	-	0.04
SH ^{E341A S342R K358R}	n.g.	23.2	0.27 ± 0.05	1.5	-	0.06

Reaktionsbedingungen: 780 μ mol H_2 , 0.1 – 6 mM $NAD(P)^+$, ca. 40 nM Enzym in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, bei 30 °C. Jede K_M -Wertbestimmung wurde mindestens zweimal durchgeführt n.g. nicht gemessen

Im Anschluss wurden die kinetischen Parameter für die entsprechenden Rückreaktionen der SH-Varianten bestimmt, d.h. die $NAD(P)H$ -abhängige Reduktion von Benzylviologen, die durch das HoxFU-Modul der SH katalysiert wird. Besonders interessant war das Verhalten der SH^{E341A/S342R/K358R}-Variante deren $NADPH$ -Oxidations- größer als die NAD^+ -Reduktionsaktivität war.

Tabelle 24. K_M - und k_{cat} - Werte der SH-Varianten für die $NAD(P)H$ - abhängige Reduktion von BV

SH	$NADH \rightarrow BV$		$NADPH \rightarrow BV$		Verhältnis $k_{cat}^{NADPH}/k_{cat}^{NADH}$
	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	
SH ^{WT}	0.13 ± 0.02	159.3	7.06 ± 3.68	0.2	0.001
SH ^{E341A D467S}	1 ± 0.18	40.8	0.21 ± 0.02	8.6	0.21
SH ^{E341A S342R}	n.g.	37.6	n.g.	1.1	0.03
SH ^{E341A S342R D467S}	n.g.	22.8	n.g.	2.3	0.1
SH ^{E341A S342R K358R}	n.g.	37.4	0.062 ± 0.003	3.9	0.1

Reaktionsbedingungen: 483 $\mu\text{mol N}_2$, 0.1 – 8 mM NAD(P)H, 0.6 mM BV, ca. 40 nM Enzym in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 at 30 °C. [Jede Messreihe wurde mindestens zweimal durchgeführt].n.g. nicht gemessen

Die kinetischen Parameter der SH-Derivate wurden auch elektrochemisch in der Arbeitsgruppe von Prof. Kylie Vincent (Department of Chemistry, University of Oxford) bestimmt. Nach Adsorption der SH-Proben auf einer Graphitelektrode erfolgte die Messung der SH-Aktivität bei verschiedenen NAD(P)⁺-Konzentrationen mit Hilfe der Chronoamperometrie. Dabei ist die SH-Aktivität direkt proportional zum gemessenen Strom, der durch die direkte NAD(P)H-getriebene Elektronenübertragung vom Enzym auf die Elektrode zustande kommt. Somit kann der gemessene Strom zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante herangezogen werden. Diese Methode ist einerseits genauer als die biochemische Bestimmung der Aktivität, da sie unabhängig von Diffusionsereignissen ist und die misst. Andererseits ist bei dieser Messmethode unklar, wieviel Protein tatsächlich auf der Elektrodenoberfläche haften bleibt, und eine Bestimmung des Parameters k_{cat} ist daher nur schätzungsweise möglich. Unter anderem aus diesen Gründen wurden bei den elektrochemischen Messungen deutlich niedrigere kinetische Werte festgestellt als bei der biochemischen Messung der kinetischen Parameter (4.3.1). Die elektrochemische Studie bestätigte jedoch, dass die SH^{E341A/S342R}-Variante die bis dahin höchste Affinität zu für NADP⁺ aufweist.

3.5.6 Die NADP⁺-spezifischen SH-Varianten können auf einer Elektrode adsorbiert werden und sind katalytisch aktiv

Der Austausch verschiedener Aminosäuren in HoxF erfolgte mit dem Vorhaben, die SH auch für die H₂- abhängige NADPH-Regeneration einzusetzen. Dass die Austausche tatsächlich zu einem veränderten Substratspektrum der SH führten, wurde biochemisch bestätigt (3.5.2). Neben den biochemischen Methoden zur Charakterisierung des Substratspektrums, bietet auch die Elektrochemie alternative Möglichkeiten, um die SH-Varianten eingehender zu untersuchen (Vincent *et al.*, 2005, 2007). Diese Methode hat den Vorteil, dass der Substratumsatz als Strom gemessen werden kann, der über direkten Elektronentransfer vom Enzym auf die einer Elektrode generiert wird. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kylie Vincent (University of Oxford) wurden die verschiedenen SH-Varianten elektrochemisch auf ihre kofaktorreduzierenden Aktivitäten getestet. Hierfür wurden sie auf

einer Graphitelektrode immobilisiert und mittels zyklischer Voltametrie in Gegenwart der Substrate NAD(P)^+ auf ihre Katalyseeigenschaften getestet. Bei einem Elektrodenpotential von weniger als -300 mV ($E^{\circ}_{\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+} = -320 \text{ mV}$) wurde eine Zunahme der Stromstärke beobachtet, die proportional zur NAD(P)^+ -Reduktionsaktivität der SH ist. Bei allen SH-Varianten wurde diese Zunahme in Anwesenheit von NAD^+ detektiert, wobei die native SH sowie die SH^{D467S} -Variante die größten Ströme zeigten (**Abbildung 26**). In Anwesenheit von NADP^+ verhielt es sich anders. Mit abnehmendem Potential war eine hohe Stromstärke besonders für die auf der Elektrode immobilisierten Varianten $\text{SH}^{\text{E341A/D467S}}$, SH^{E341A} und $\text{SH}^{\text{E341A/S342R}}$ zu beobachten. Quantitative Aussagen, wie z.B. die Berechnung der Umsatzrate k_{cat} , sind bei diesen Experimenten nicht möglich, da keine genaue Information über die Menge immobilisierter und aktiver SH-Moleküle vorliegt.

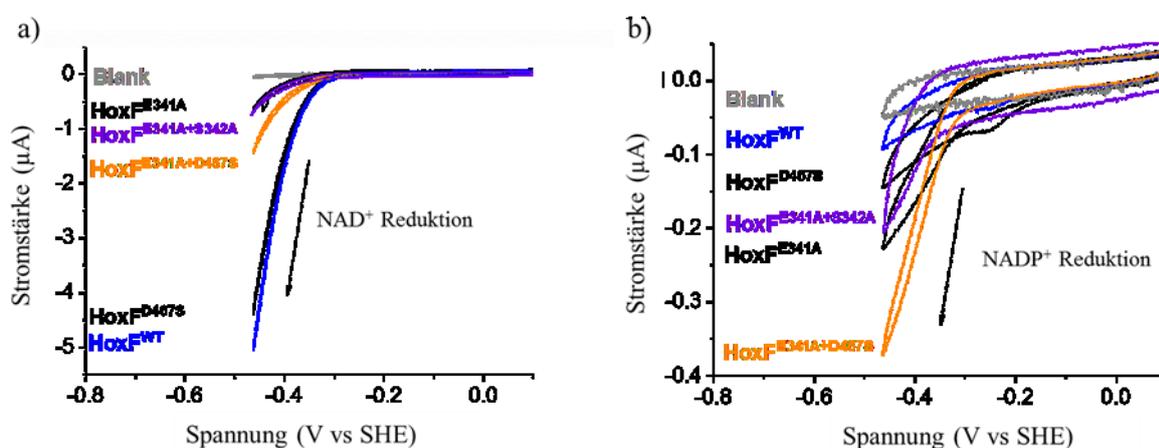


Abbildung 26. Zyklische Voltamogramme der SH-Varianten in Gegenwart von NAD(P)^+ . Die SH-Derivate wurden auf einer pyrolytischen Graphitelektrode immobilisiert und in Anwesenheit von 5 mM NAD(P)^+ in 100 mM Tris-HCl-Buffer, pH 8,0, mit einer Scan-Rate von $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen. Als Kontrolle („Blank“) diente eine nicht mit Protein beschichtete Graphitelektrode.

3.5.7 $\text{SH}^{\text{E341A/S342R}}$ als Teil NADPH-abhängiger Redoxenzym-Kaskaden

Nachdem sowohl bio- wie auch elektrochemisch die H_2 -abhängige NADP^+ -Reduktionsaktivität SH-Varianten bestätigt wurde, sollte die neu erworbene Reaktivität in gekoppelten Enzymreaktionen getestet werden. Diese Experimente wurden von Dr. Holly Reeve (Department of Chemistry, University of Oxford) mit SH-Proben aus mindestens 3 unabhängigen Reinigungen durchgeführt.

Zunächst wurde die H_2 -getriebene NADPH-Regeneration in einem Modellsystem bestehend aus $\text{SH}^{\text{E341A/S342R}}$ und der kommerziell erhältlichen Enreduktase PETNR getestet. Diese

Pentaerythritol-Tetranitrat-Reduktase gehört zur Familie der „old yellow enzymes“, die die asymmetrische Reduktion einer Vielzahl von industriell relevanten, ungesättigten Alkenen wie z.B. 2-Cyclohexenon katalysiert. Die vollständige Reduktion des Substrates der NADPH-abhängigen PETNR erfolgte in Anwesenheit der SH-Variante und der Begasung des Reaktionsansatzes mit H_2 (Abbildung 27). Dazu wurden 5 mM $NADP^+$ als Kofaktorkonzentration eingesetzt. Im Ansatz mit 1.5 mM $NADP^+$ erfolgte die Konversion des Alkens zum Alkan noch zu 95%.

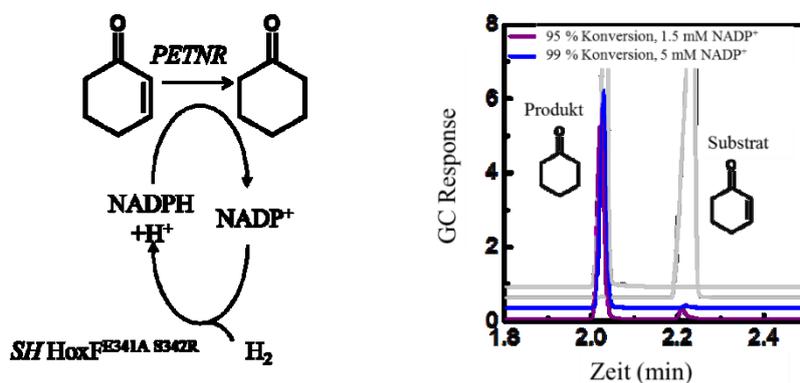


Abbildung 27. Reduktion der C=C-Doppelbindung von Cyclohexenon in einer gekoppelten Enzymreaktion mit $SH^{E341A/S342R}$ und der Enzymbiokatalysator PETNR. In Gegenwart von H_2 und 5 mM $NADP^+$ erfolgte die 99%ige Konversion von Cyclohexenon.

Die $SH^{E341A/S342R}$ ließ sich also erfolgreich für die NADPH-Kofaktorregeneration in einer gekoppelten enzymatischen Reaktion einsetzen. Nun sollte zudem die Eigenschaft ausgenutzt werden, die H_2 -abhängige Reduktion von $NADP^+$ auch in Gegenwart von 20 % Sauerstoff zu katalysieren. Dies ist besonders interessant für die Bereitstellung von NADPH für O_2 -abhängige Enzyme, wie beispielsweise Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP). Diese komplexen Biokatalysatoren katalysieren die Oxidation von nicht-aktivierten CH-Bindungen und besitzen ein großes Potential für die Synthese pharmazeutischer Wirkstoffe und Feinchemikalien. Eine gut untersuchte Monooxygenase dieser Klasse ist die Fettsäure-Hydroxylyase CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* (Whitehouse *et al.*, 2008, 2012). Dieses Enzym katalysiert die NADPH-abhängige Oxidation von verschiedenen Fettsäuren mit unterschiedlicher Selektivität. Das Substratspektrum der CYP102A1 wurde in der Arbeitsgruppe von Luet-Lok Wong (University of Oxford) mittels zufälliger Mutagenese erweitert und sowohl das Produktspektrum verändert als auch die Aktivität erhöht (Whitehouse *et al.*, 2008). Eine dieser Varianten, $CYP102A1^{A330P}$, basierte auf einem einzigen

Aminosäureaustausch und zeigte für das Substrat Octan eine wesentlich erhöhte Aktivität und ein alternatives Produktspektrum verglichen mit dem nativen Enzym. Sowohl native CYP102A1 als auch die CYP102A1^{A330P}-Variante wurden in einer vergleichenden Studie für die Octan-Oxidation mit der SH^{E341A/S342R} als NADPH-regenerierendes Enzym getestet. Neben der SH^{E341A/S342R} als H₂-abhängiges Kofaktorregenerationssystem wurde parallel der Industriestandard, die Glucose-abhängige Glukosedehydrogenase (GDH) für die Rückgewinnung von NADPH getestet. Wie in **Abbildung 28** gezeigt wurde das Octan in allen vier Reaktionsansätzen vollständig umgesetzt.

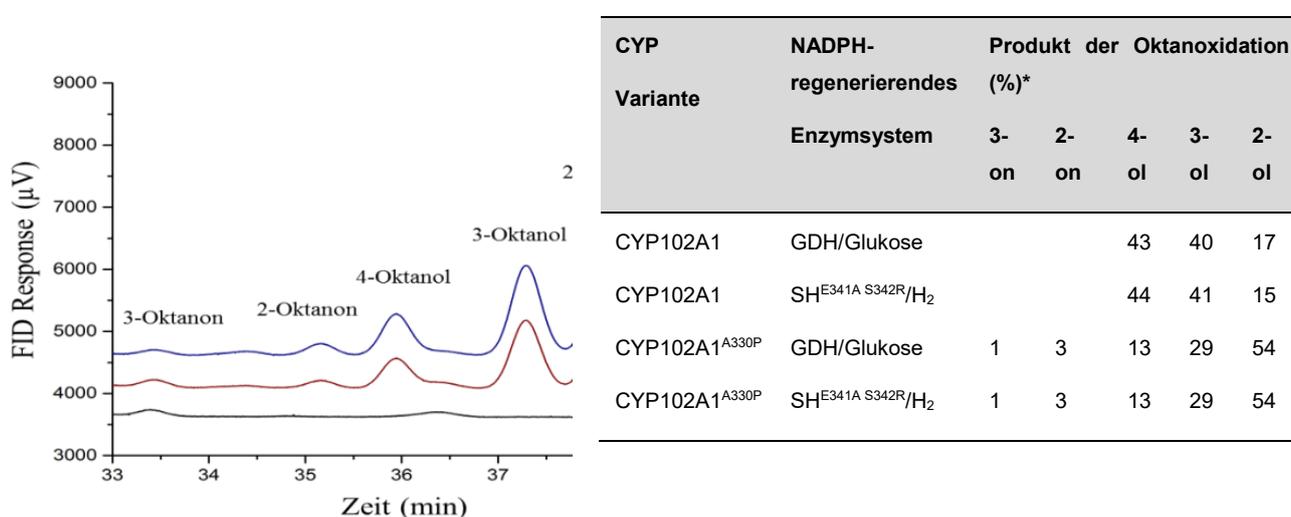


Abbildung 28. NADPH- sowie O₂-abhängige Oktanoxidation durch P450-Monooxygenasen unter Verwendung der Kofaktorregenerationssysteme H₂/SH^{E341A/S342R} sowie Glukose/GDH. Die Reaktionen wurden in H₂-gesättigtem 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 mit 0.5 µM P450, 20 mg · mL⁻¹ Katalase, 1 mM NADP⁺, 5 mM Octan und 1 U · mL⁻¹ SH (rote Linie) oder 10 U · mL⁻¹ Glukose-Dehydrogenase mit 0.2 M Glukose (blaue Linie) durchgeführt. Analyse mittels GC. Die Kontrollreaktion ohne Substrat NADP⁺ ist durch die schwarze Linie dargestellt. In blau ist das Profil der Produkte aus der Reaktion unter Zugabe der Glukose-Dehydrogenase (10 U · mL⁻¹) abgebildet.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der thermostabilen SH aus *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T

4.1.1 Die *Ht*SH katalysiert die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktion kontinuierlich bei hohen Temperaturen

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die thermostabile SH aus *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T heterolog in *Ralstonia eutropha* zu produzieren und ein geeignetes Protokoll zur Proteinreinigung zu entwerfen. Anhand dieses Protokolls war es möglich, die *Ht*SH routinemäßig nach Strep-Tactin-Affinitätschromatographie mit Ausbeuten von etwa 2 mg Protein/ g Zellen und einer spezifischen Aktivität von 12- 18 U · mg⁻¹ zu isolieren. Nach zusätzlicher Größenausschlusschromatographie war es möglich, die spezifische Aktivität auf über 30 U · mg⁻¹ zu erhöhen. Diese Erhöhung ist darauf zurückzuführen, dass die Stöchiometrie der Untereinheiten in den Proben nach Affinitätschromatographie nicht äquimolar ist und erst nach der Auftrennung mittels Größenausschlusschromatographie homogene, heterotetramere SH vorliegt. Selbst die Anwesenheit der zweiwertigen Ni²⁺- und Mg²⁺-Ionen kann das dissoziative Verhalten der *Ht*SH nicht vollständig verhindern, sodass sich das Hydrogenase-Modul, HoxHY, während der Reinigung über den N-terminalen Strep-tagII an HoxF vom HoxFU-Modul ablöst. Wie auch bei der Reinigung der SH aus *Rhodococcus opacus* MR11 ist die Supplimentierung der für die Reinigung verwendeten Puffer mit NiCl₂ und MgCl₂ essentiell für H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität (Schneider & Schlegel, *et al.*, 1984). Diese liegt mit einem maximalen Wert von 33.4 U · mg⁻¹ bei 50 °C und pH 6.5 in einer ähnlichen Größenordnung wie die NAD⁺-Reduktionsaktivität der *Ro*SH mit 27.7 – 45 U · mg⁻¹ (Katja Karstens, 2014; Schneider & Schlegel, *et al.*, 1984).

Das thermophile Bakterium *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T wächst optimal bei einer optimalen Temperatur von 52 °C. Darüber hinaus zeigt die lösliche, NAD⁺-reduzierende Hydrogenase aus diesem Organismus zeigt aber sogar noch bei Temperaturen über 80 °C hohe, H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität. Höchste Aktivität von 71 U · mg⁻¹ wurde bei 80 °C gemessen werden. Deutlich geringer waren die Aktivitäten unterhalb von 50 °C. Eine weitere Besonderheit dieser Hydrogenase ist ihr pH-Optimum, welches bei einem Wert von 6.5 liegt und somit niedriger als das der *Re*SH (pH 8.0, Keefe *et al.*, 1995) ist. Dieser Wert scheint dabei hauptsächlich durch die Aktivität des HoxHY-Dimers reguliert zu werden, das höchste H₂-abhängige BV-Reduktionsaktivitäten im sauer-neutralen pH-Bereich von 6-7 aufweist. Im

Gegensatz dazu ist das HoxFU-Dimer auch noch bei basischen pH-Werten von über 10 höchst aktiv in der Katalyse der NADH-abhängigen BV-Reduktion. Diese beiden Eigenschaften machen die *HtSH* besonders interessant für die Anwendung in der Biokatalyse, wo häufig thermostabile, NADH-abhängige Oxidoreduktasen für die Synthese chiraler Feinchemikalien im neutralen pH-Bereich eingesetzt werden. **Tabelle 25** zeigt einen Vergleich der grundlegenden biochemischen Charakteristika verschiedener löslicher, NAD(P)⁺-reduzierenden Hydrogenasen der Gruppe 3.

Tabelle 25. Vergleich der biochemischen Eigenschaften von löslichen, NAD(P)⁺-reduzierenden [NiFe]- Hydrogenasen aus verschiedenen Mikroorganismen.

Herkunft	<i>H. thermoluteolus</i>	<i>R. eutropha</i>	<i>R. opaccus</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Pyrococcus</i> <i>furiosus</i>
Bezeichnung	SH	SH	SH	Bi- direktionale Hydrogenase	SH1
Untereinheiten- Zusammensetzung	HoxHYFU	HoxHYFU ₂ (Burgdorf <i>et al.</i> , 2005)	HoxHYFU	HoxFHUYE (Schmitz <i>et al.</i> , 2002)	αδβγ (Ma <i>et al.</i> , 2000)
Scheinbares Molekulargewicht (kDa)	168 (diese Arbeit)	207 (Burgdorf <i>et al.</i> , 2005)	172 (Johannssen <i>et al.</i> , 1991)	180 (Schmitz <i>et al.</i> , 2002)	153.3 (Ma <i>et al.</i> , 2000)
Dissoziations- verhalten	Stabilitätserhöhung durch Zusatz von Ni ²⁺ und Mg ²⁺ (diese Arbeit)	stabil ohne Zusatz von divalenten Kationen	Stabilitätserhöhung durch Zusatz von Ni ²⁺ und Mg ²⁺ (Schneider, Cammack, <i>et al.</i> , 1984)	Dissoziation der Modulbestandteile beobachtet (Long <i>et al.</i> , 2006; Palágyi-Mészáros <i>et al.</i> , 2009; Serebriakova & Sheremet'eva, 2006)	stabil ohne Zusatz von divalenten Kationen
$K_M^{H_2}$ (μM)	42 (diese Arbeit)	37 (Schneider & Schlegel, 1976)	63 (Aggag & Schlegel, 1974)	11.3 von <i>Anabeana</i> <i>variabilis</i> (Serebryakova <i>et</i> <i>al.</i> , 1996) (Schmitz <i>et al.</i> , 1995)	140 (Ma <i>et al.</i> , 2000) (Van Haaster <i>et</i> <i>al.</i> , 2008)

$K_M^{NAD(P)^+}$	469 (NAD ⁺)	560 (NAD ⁺)	150 (NAD ⁺)	n.p.	40 (NADP ⁺)
(μM)	(diese Arbeit)	(Aggag & Schlegel, 1974)	(Schneider & Schlegel, <i>et al.</i> , 1984)		(Ma <i>et al.</i> , 2000) n.p. (NAD ⁺)
Physiologische Elektronenmediatoren	NAD⁺	NAD⁺	NAD⁺	NAD⁺, NADP⁺/NAD(P)H, ferredoxin_{red}flavodoxin_{red}	NADP⁺, NAD⁺
TOF NAD/P ⁺	150	485	211	n.p.	99 (NAD ⁺)
(s ⁻¹)	(diese Arbeit)	(van der Linden <i>et al.</i> , 2006) 84400 h ⁻¹ (Reeve <i>et al.</i> , 2015)	(Zaborosch <i>et al.</i> , 1989)		(Ma <i>et al.</i> , 2000) 38.3 - 88.6 (NADP ⁺) (Chandrayan <i>et al.</i> , 2012)
$V_{\text{max}}^{\text{H}_2}$ Produktion	0.9 U · mg⁻¹	1.2 U · mg⁻¹	3.49 U · mg⁻¹	2.81 U · mg⁻¹	1.5-2 U · mg⁻¹
(mit NADH)	(diese Arbeit)			(Schmitz <i>et al.</i> , 2002)	(NADPH)
T_{opt}	80	35	30	60	80
(°C)	(diese Arbeit)	(Ratzka <i>et al.</i> , 2011)		(Schmitz <i>et al.</i> , 2002)	(Ma <i>et al.</i> , 1993) (Bryant & Adams, 1989)
pH_{opt}	6.5	8	7.8-8	6.3	8.4
	(diese Arbeit)	(Ratzka <i>et al.</i> , 2011)(Schneider & Schlegel, 1976)	(+NiCl ₂) <7 (- NiCl ₂) (Schneider & Schlegel, <i>et al.</i> , 1984)	(Schmitz <i>et al.</i> , 2002)	(Ma <i>et al.</i> , 1993)
Verhalten gegenüber O ₂	Ca. 50 % in Anwesenheit von 18.8 μM O ₂	Ca. 85% in Anwesenheit von 470 μM O ₂ (Lauterbach & Lenz, 2013)	n.p.	O ₂ -sensitiv (Chandrayan <i>et al.</i> , 2012)	Ca. 25% H ₂ -Oxidationsaktivität auf Elektrode (Kwan <i>et al.</i> , 2015)

† n.p. nicht publiziert

Die SH aus *Ralstonia eutropha* sowie die SH aus *Rhodococcus opacus* wurden für den Vergleich in der oben aufgeführten **Tabelle** ausgewählt, da sie ein Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe darstellen und auch im Rahmen dieser Dissertation eingehender untersucht werden sollten. Neben den löslichen [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 3d, zu denen die *ReSH*, *RoSH* und *HtSH* zugeordnet werden, gibt es auch gut untersuchte Beispiele anderer löslicher Hydrogenasen. Besonders im Hinblick auf die potentielle Anwendung in der Biotechnologie sind die entsprechenden Hydrogenasen aus *Synechocystis sp.* sowie *Pyrococcus furiosus* interessant. *Synechocystis sp.* PC6803 ist ein Cyanobakterium, welches mithilfe der löslichen, „bidirektionalen“ Hydrogenase das Redoxpotential der Zelle beim Übergang zwischen Licht- und Dunkelphase stabil hält (Khanna & Lindblad, 2015; McIntosh *et al.*, 2011), was durch die Produktion von H₂ aus überschüssigen Reduktionsäquivalenten bewerkstelligt wird. Im Gegensatz zu den löslichen [NiFe]-Hydrogenasen anderer Subgruppen katalysiert die bidirektionale Hydrogenase aus *Synechocystis* eher die Protonenreduktion als die H₂-Oxidation (McIntosh *et al.*, 2011). Demnach besteht großes Interesse an dieser SH im Hinblick auf die lichtgetriebene H₂-Produktion (Krassen *et al.*, 2011).

Neben der cyanobakteriellen SH weist auch die lösliche Hydrogenase SH1 aus dem hyperthermophilen, anaeroben Archaeon *Pyrococcus furiosus* besondere Merkmale auf. Da sie aus einem thermophilen Organismus stammt, der sogar bei Temperaturen bis 100 °C wachsen kann, wird ihr eine besondere Stabilität zugeschrieben (Ma *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2015). Obwohl die SH1 aus einem strikten Anaerobier stammt, zeigt sie eine Sauerstofftoleranz (Kwan *et al.*, 2015). Neben der ausgeprägten Thermostabilität ist ihre Eigenschaft interessant, vorrangig NADP⁺ als Elektronenakzeptor zu verwenden. Aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften wurde die SH1 aus *P. furiosus* sowohl für die biotechnologische H₂-Produktion als auch für die H₂-getriebene NADPH-Regeneration eingesetzt (Wu *et al.*, 2015).

Das auffällige Verhalten der Dissoziation in die zwei funktionalen Module in Abwesenheit zweiwertiger Kationen zeigen sowohl die *HtSH* wie auch die *RoSH*. Auch bei verschiedenen cyanobakteriellen SHs wurde die Dissoziation in Hydrogenase- und HoxFUE- Modul mehrmals beobachtet, konnte jedoch nicht bestimmten Reaktions- oder Pufferbedingungen zugeschrieben werden (Long *et al.*, 2006; Palágyi-Mészáros *et al.*, 2009; Serebriakova & Sheremet'eva, 2006). Das pH-Optimum der Protonenreduktion liegt bei etwa 6.3 (Schmitz *et al.*, 2002) und auch die *SsSH* zeigt gute Aktivitäten bei erhöhten Temperaturen. Allerdings ist

die H₂-Produktionsrate der *SsSH* etwa dreifach höher (Schmitz *et al.*, 2002). Die *HtSH* verfügt dagegen über eine moderate Sauerstofftoleranz, die der *SsSH* fehlt. Schon geringe Sauerstoffkonzentrationen führen zur Inaktivierung, was die biotechnologische Anwendung erschwert.

Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung der thermostabilen *HtSH* ist ein Vergleich mit der *PfSH* als Kofaktorregenerationssystem bei hohen Temperaturen naheliegend. Zwar weist die *PfSH* einen um Faktor 10 niedrigeren $K_M^{\text{NADP}^+}$ auf, ihre Wechselzahl für NADP⁺ ist aber deutlich geringer. Das Temperaturoptimum liegt für beide Hydrogenasen bei etwa 80 °C. Ein Vorteil den die *HtSH* bietet, ist die gute Aktivität bei neutral bis schwach sauren pH-Werten. Um optimale Aktivität der *PfSH* zu erhalten, ist dagegen ein Ansatz mit basischen pH-Werten oberhalb von 8 nötig. Wenn das Substratspektrum der *HtSH* ebenso wie das der *ReSH* durch zielgerichtete Mutagenese verändert werden kann, wäre dies eine gute Alternative zum NADPH-Regenerationssystem basierend auf *PfSH*.

4.1.2 Die Sauerstofftoleranz der *HtSH*

Neben der besonderen Abhängigkeit der *HtSH* von zweiwertigen Kationen in Salzen wie NiCl₂ oder MgCl₂ unterscheidet sich diese Hydrogenase auch in ihrem Verhalten gegenüber Sauerstoff deutlich von der *ReSH*. So ist die H₂-abhängige NAD⁺-Reduktionsaktivität der *HtSH* bereits bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen von gelöstem Sauerstoff im Reaktionsansatz (18.8 μM) um etwa 50 % herabgesetzt. Insbesondere im Kontext der Sauerstofftoleranz der löslichen [NiFe]-Hydrogenasen erscheint die genauere Untersuchung konservierter, [FeS]-Zentren koordinierender Cysteinreste in HoxY interessant (**Abbildung 29**). Speziell die Koordination und Konformation des [FeS]-Zentrums, das proximal zum [NiFe]-Zentrum positioniert ist, zeigte sich am Beispiel der MBH als ausschlaggebend für die besondere Sauerstofftoleranz (Fritsch *et al.*, 2011; Goris *et al.*, 2011). Dieses ungewöhnliche, proximale [FeS]-Zentrum der MBH liefert die Elektronen zur Reaktivierung des oxidierten [NiFe]-Zentrum und ist nicht in der SH-Struktur vorhanden. Die Herkunft der Elektronen zur Reduktion von Sauerstoffspezies am [NiFe]-Zentrum ist bei der SH bisher nicht eindeutig geklärt. Bei dem Sequenzvergleich der HoxY-Untereinheiten von SHs aus *R. eutropha*, *R. opacus* sowie dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 und dem thermophilen Organismus *Pyrococcus furiosus* können [FeS]-koordinierende Cysteine identifiziert werden (**Abbildung 29**).

Position (HoxY)	34-57	76-88	99-118	177-188
	39 41 43	79	104 113	179
<i>R. eutropha</i>	ATIGL C G C WG C TL S F L D M D E R L L	PER C AIGFVEGGV	HFREN C DILISVGA C AVWGG	P G C P P D GDAIFK
<i>H. thermoluteolus</i>	ATASL A G C F G C HMSFADIDTRLL	GE- C DIALIEGGV	AYRRAARILVAVGA C AINGG	P G C P P T A E VIWT
<i>R. opacus</i>	AMIGL C G C WG C TL S F L D M D E R L L	TER C AIGFIEGGV	HYREN C DVLISVGA C AVWGG	P G C P P D ADAI F K
<i>S. sp</i> PC6803	ATVWL A G C S G C HMSF L D M D E W L I	PDNVDVCLVEGAI	ELRQ K TKVVISFG C AVTAN	P G C P P D AHR I R A
<i>P. furiosus</i>	GFYAL T S C Y G C QLQLAMMDELLQ	DEKVDIAFIEGSV	KIRE N AKIVVAVGA C AVQGG	Y G C P P E KKDFLY

Abbildung 29. Ausschnitte aus einem multiplen Sequenzvergleich der HoxY-Proteine aus verschiedenen Organismen. Die Positionen beziehen sich auf die Sequenzangaben von *ReHoxY* (HOXY_CUPNH, UniProt: P22319). HOXY_HYDTE *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T, UniProt: A0A077L7R5; HOXY_RHOOP *Rhodococcus opaus* MR11, UniProt: P72306; HOXY_SYNY3 *Synechocystis sp.* PCC 6803, UniProt: P74024; HYD1D_PYRFU *Pyrococcus furiosus*, UniProt: E7FHU4). Gelb markiert sind die konservierten Cysteine, die bei der Koordination des [FeS]-Clusters in HoxY beteiligt sind. Grau hinterlegt sind Cysteine, die insbesondere bei den löslichen Hydrogenasen der Gruppe 3d vorhanden sind. Aminosäuren mit roter Schrift zeigen ähnliche Aminosäuren der *HtSH* und der *SsSH*.

Besonders die Aminosäuresequenzen um die konservierten Cysteine C41 und C43 unterscheiden sich zwischen den Hydrogenasen unterschiedlicher Gruppen. Während bei den HoxY-Sequenzen der sauerstofftoleranten Hydrogenasen aus *R. eutropha* und *R. opacus* ein zusätzliches Cystein an Position 39 zu finden ist, weisen die sauerstoffempfindlichen, cyanobakteriellen Hydrogenasen dort kleinere Aminosäuren wie Alanin und Glycin auf. Auch bei der *HtSH* ist an dieser Stelle kein zusätzliches Cystein, sondern ein Alanin lokalisiert. Weitere strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen *HtHoxY*- und *SsHoxY*-Sequenz sind an den Positionen 44, 45 sowie 104 zu finden. Anstelle des T44L45-Motivs in den HoxY-Sequenzen von *R. eutropha* und *R. opacus* befinden sich bei *SsHoxY* und *HtHoxY* hier die Aminosäurereste H44M45. Das ebenfalls im sauerstofftoleranten HoxY-Typ konservierte C104 ist sowohl bei der *HtSH* wie auch den cyanobakteriellen und der thermostabilen *PfSH* nicht vorhanden.

Um einen möglichen Einfluss dieser Positionen auf die Sauerstofftoleranz bzw. –empfindlichkeit der *HtSH* zu untersuchen, können gezielt Austausch dieser Aminosäuren hilfreich sein. Dazu wurden bereits Primer entworfen (s. Anhang). So wäre z. B. der Austausch des Alanins an Position 39 gegen ein Cystein möglich, um der Sequenz von *ReHoxY* und *RoHoxY* zu entsprechen. Ebenso wäre dazu ein Austausch des Histidin 44 sinnvoll. Das Entfernen der aromatischen Aminosäure F41 gegen ein Serin würde dagegen eine Annäherung

an das Motiv aus *SsHoxY* bedeuten. Da ein entsprechendes pCM-basiertes Konstrukt zur Expression der *HtSH* oder des solitären *HtHoxHY*-Dimers zur Verfügung steht (**Tabelle 1, 2.1**), könnten entsprechende Mutagenese-Experimente schon bald neue Einblicke in die Sauerstofftoleranz löslicher, NAD^+ -reduzierender Hydrogenasen ermöglichen.

Auch bei dem Sequenzvergleich der HoxH-Untereinheiten zeigen sich an einzelnen Positionen um konservierte Motive Ähnlichkeiten zwischen der *HtHoxH* Sequenz und den Sequenzen von Hydrogenasen aus anderen Untergruppen der Gruppe 3-Hydrogenasen.

Position (HoxH)	12-16	59-74	110-120	390-396	454-465
	* * *	*		*	* *
<i>R. eutropha</i>	VTRIEG ^H GK	QRICG ^L IC ^L FPVSH ^H HL ^H CG	HYAQMLQ ^S H	PRG ^L TL ^L H	RAYDP ^C CLS ^C CATH
<i>H. thermoluteolus</i>	LSRVEG ^H GK	QRICG ^L IC ^L FPVSH ^H HL ^A A	HYGQVLQ ^S H	PRG ^L TL ^L H	RAFDP ^C CLS ^C CATH
<i>R. opacus</i>	VTRIEG ^H GK	QRICG ^L IC ^L FPVSH ^H HL ^H CG	HYAQMLQ ^S H	PRG ^L TL ^L H	RAYDP ^C CLS ^C CATH
<i>S. sp. PC6803</i>	VTRIEG ^H AK	ARICG ^L IC ^L FPVSH ^H LL ^C A	NLQITQ ^S H	PRG ^L TL ^F H	RCYDP ^C CLS ^C STH
<i>P. furiosus</i>	IARVE ^G GKGG	PRIC ^S FC ^S AAH ^L KLTA	YIGDMIES ^H	PRG ^L ILVY	RAYDP ^C IS ^C SVH

Abbildung 30. Ausschnitte aus dem multiplen Sequenzvergleich von HoxH aus verschiedenen Organismen. Die Positionen beziehen sich auf die Sequenzangaben von *ReHoxH* (HOXY_CUPNH, UniProt: P22320). HOXY_HYDTE *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T, UniProt: A0A077LA15; HOXY_RHOOP *Rhodococcus opacus* MR11, UniProt: P72306; HOXY_SYNY3 *Synechocystis sp. PCC 6803*, UniProt: E7FI44; HYD1D_PYRFU *Pyrococcus furiosus*, UniProt: P74018). Gelb sind besonders konservierte Aminosäuren markiert, die sehr wahrscheinlich an der Koordination des aktiven Zentrums beteiligt sind. In grün sind Aminosäuren hinterlegt, die besonders bei den Hydrogenasen der Gruppe 3d zu finden sind, jedoch nicht in der Sequenz von HoxH der *Pyrococcus furiosus* Hydrogenase erscheinen, die der Gruppe 3b zugeordnet wird. Die Sternchen markieren Aminosäuren, deren Austausch im Rahmen von gezielter Mutagenese von Tanja Burgdorf (Burgdorf *et al.*, 2002) dazu führten, dass ein SH-basiertes lithoautotrophes Wachstum mittels dieser Varianten nicht mehr möglich ist. Aminosäuren mit roter Schrift sind Positionen, an denen sich die *HtSH* von den Sequenzen der *ReSH* und *RoSH* unterscheidet. In grau hinterlegt ist das QxxQ-Motiv, das bei Hydrogenasen der Gruppe 3d zu finden ist und an deren Position bei den Hydrogenasen der Gruppe 3b häufig ein D/ExxE-Motiv auftritt.

4.1.3 Die Struktur der *HtSH*

Um die Mechanismen der Sauerstofftoleranz von löslichen Hydrogenasen besser zu verstehen, ist ein Einblick in die Proteinstruktur und die Konformation der Kofaktoren unerlässlich. Vor Kurzem ist es der Arbeitsgruppe um Y. Higuchi gelungen, die Kristallstruktur der *HtSH* zu lösen (Shomura *et al.*, 2017; Taketa *et al.*, 2015). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten Kristalle der *HtSH* sowohl unter reduzierenden wie auch oxidierenden Bedingungen gewonnen werden. Allerdings konnte aus den erhaltenen Datensätze nach Messung der Röntgenbeugung keine Struktur ermittelt werden, da die Auflösung noch zu gering war und es an ausreichend homologen Strukturen fehlte. Anhand der nun öffentlich zugänglichen Proteinstrukturen ist ein Abgleich der Datensätze nach dem Ansatz des molekularen Ersatzes möglich, um Elektronendichtekarten zu erzeugen.

In den veröffentlichten Strukturen liegt die *HtSH* als Dimer aus zwei HoxFHUY-Einheiten vor. Dabei stehen die folgenden Untereinheiten in der oxidierten Struktur in Kontakt miteinander: HoxU–Y (1071 Å²), HoxU–H (774 Å²) und HoxF–Y (Shomura *et al.*, 2017).

4.1.4 Dissoziation von FMN aus der *HtSH* unter reduzierenden Bedingungen: Schutzmechanismus vor ROS-Bildung?

Besonders zwei Eigenschaften der *HtSH* scheinen in den Strukturen auffällig. Zum einen besitzt das Nickel des [NiFe]-aktiven Zentrums im oxidierten Kristall die Carboxygruppe eines Glutamats als Ligand. Ebenfalls nur im oxidierten Kristall zu beobachten ist ein FMN-Molekül als Kofaktor in HoxF. In der Struktur der H₂-reduzierten *HtSH* fehlt dagegen das FMN (Shomura *et al.*, 2017). Assoziiert mit der Bindung von FMN wird die Bewegung des C-Terminus von HoxF. Dieser C-Terminus, der etwa 38 Aminosäuren umfasst, nimmt in der Struktur des reduzierten Kristalls eine andere Position ein als im oxidierten. In der reduzierten Struktur steht er in Kontakt mit HoxY und reicht armförmig fast über HoxY hinweg bis zur HoxH-Untereinheit (**Abbildung 31C**). Im oxidierten Zustand knickt der C-Terminus dagegen ein und ist im nahen Umfeld der FMN-Bindetasche zu finden. Von den Autoren der Veröffentlichung (Shomura *et al.*, 2017) wird mit der Dissoziation des FMNs im reduzierten Zustand ein Mechanismus vorgeschlagen, der vor der Bildung von radikalen Sauerstoffspezies

schützen soll. Überschüssige Elektronen, die nicht direkt auf NAD^+ übertragen werden, sollen so nicht durch reduziertes FMN zur Bildung von Sauerstoffspezies beitragen können.

Vor dem Hintergrund, dass in lebenden Zellen von *R. eutropha* ein reduzierendes Milieu herrscht und das aktive Zentrum der ReSH im zellulären Hintergrund verschiedene reduzierte Zustände einnimmt (Horch *et al.*, 2010) erscheint diese Erklärung für das Fehlen des FMN-Moleküls in der Kristallstruktur als unzureichend. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch im Zellinneren von *H.t.* überwiegend reduzierende Bedingungen vorliegen. So müsste, der Hypothese folgend, die HtSH stets inaktiv ohne gebundenes FMN vorliegen. Da die gelöste Struktur bislang nur auf einem einzigen gemessenen Kristall beruht, bleibt abzuwarten, ob das FMN-Molekül generell unter reduzierenden Bedingungen fehlt.

Eine reversible Dissoziation des FMN-Moleküls wurde auch für NuoE des Komplex I aus *E. coli* unter reduzierenden Bedingungen beobachtet (Holt *et al.*, 2016). In diesem Fall ist eine Abnahme der ROS-Bildung mit der Dissoziation des FMN aus der mit NADH-reduzierten Untereinheit NuoE nachgewiesen. Begründet wird die Dissoziation des FMN aus der reduzierten NuoE-Untereinheit mit der starken Abnahme der Bindungsaffinität nach Reduktion der beiden nahestehenden [FeS]-Zentren N1a und N3. Eine Änderung der FMN-Bindungsaffinität und eine daraus folgende schnelle Dissoziation von FMN ist im homologen Protein NqoI aus *T. thermophilus* nicht zu beobachten (Holt *et al.*, 2016). Dieser Unterschied wird mit dem ungewöhnlich hohen Mittelpunktpotential von N1a in NuoE aus *E. coli* begründet, der somit sensibler gegenüber reduzierenden Bedingungen reagiert (Gnandt *et al.*, 2017; Holt *et al.*, 2016; Leif *et al.*, 1995). Die Autoren schlussfolgern, dass FMN eine Rolle als Redox-Mediator übernimmt und die feste Bindung von NAD^+ , die nach Reduktion der [FeS]-Zentren N1a und N3 erfolgt, die Reduktion von FMN durch NADH bzw. die Bindung von O_2 an FMN verhindert. Das [FeS]-Zentrum, welches in diesem Beispiel hauptsächlich an dem Schutzmechanismus beteiligt ist, ist in der HtSH jedoch nicht vorhanden, sodass der Mechanismus der FMN-Dissoziation aus HoxF näher untersucht werden muss.

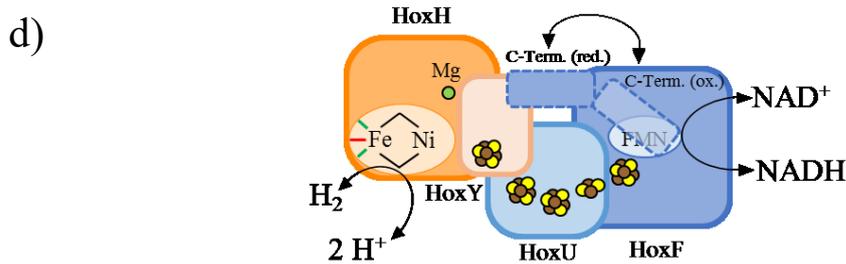
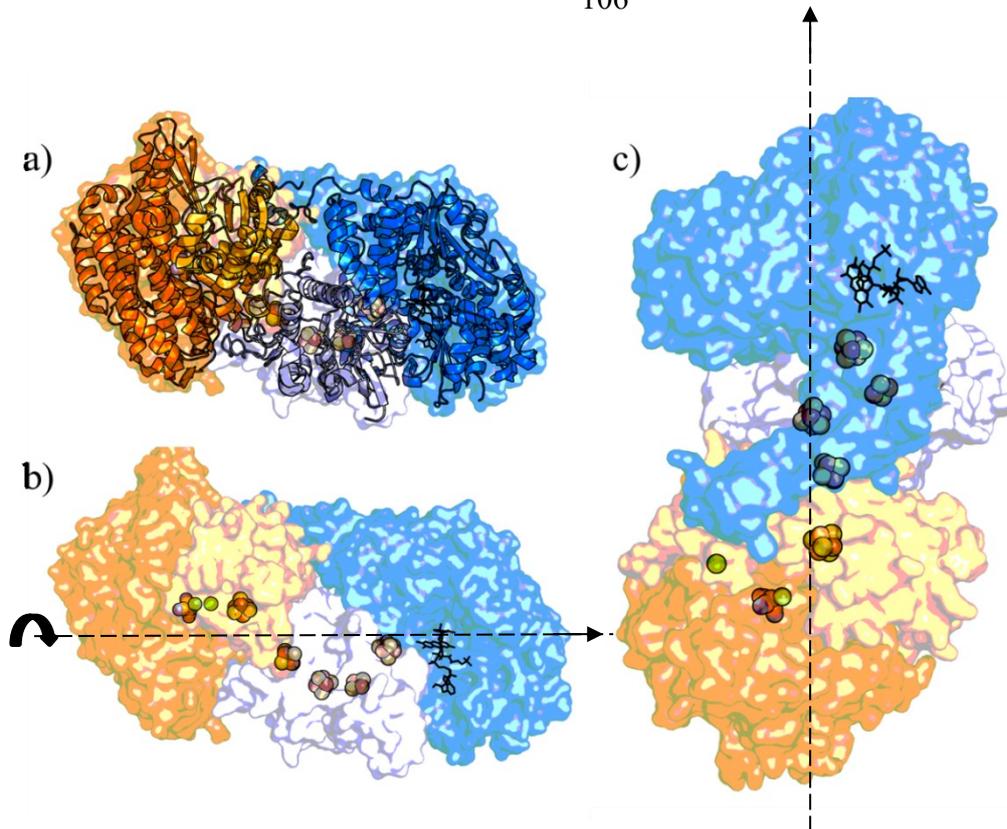


Abbildung 31. Verschiedene Ansichten der *HtSH* Struktur unter reduzierenden Bedingungen (pdb 5xf9). FMN wurde aus der Struktur der oxidierten *HtSH* (pdb 5xfa) in die Bindetasche eingefügt. NAD^+ als Kofaktor wurde aus einem Homologiemodell der *ReSH* eingefügt, welches wiederum auf der Kristallstruktur des Komplex I basiert (pdb 2fug und 3iam). Die [FeS]-Cluster sowie das [NiFe]-Zentrum und das Magnesiumatom sind in Sphärendarstellung, die Kofaktoren FMN und NAD^+ als sticks abgebildet. Die Untereinheit HoxH mit dem [NiFe]-Zentrum ist orange, HoxY hellorange, HoxU hellblau und HoxF dunkelblau dargestellt. a) Ansicht der tetrameren *HtSH* als Cartoondarstellung mit eingebetteten Kofaktoren und transparenter Oberfläche. b) Ansicht der tetrameren *HtSH* mit transparenter Oberfläche ohne Cartoondarstellung des Proteinrückgrates um die Anordnung der Kofaktoren aufzuzeigen. c) Ansicht der tetrameren *HtSH* 90°C um die Längsachse rotiert. d) Vereinfachte Darstellung der Kofaktorzusammensetzung in den Untereinheiten und ihrer Anordnung zueinander. Mit der Besonderheit des C-Terminus, der nur in der Struktur des reduzierten Kristalls auch in Kontakt mit der Untereinheit HoxY steht.

4.1.5 Mögliche Auswirkungen der Bindung von Glutamat an das Nickel im katalytischen Zentrum im oxidierten Zustand

Infolge der Strukturaufklärung wurde die *HtSH* auch EPR-spektroskopisch untersucht (Shomura *et al.*, 2017). Dabei zeigten sich zwei verschiedene EPR-aktive Zustände, deren *g*-Werte gut mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Werten übereinstimmen. Nach Reduktion durch H_2/BV , ließ sich der Ni_a-C -Zustand mit ähnlichen *g*-Werten detektieren, wie sie auch bei der *ReSH* und der Standard-Hydrogenasen gefunden wurden (**Tabelle 26**). Interessanterweise wurde das Ni_a-C -spezifische Signal der H_2 -reduzierten *HtSH* nur bei Temperaturen unterhalb von 10 K gemessen werden. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, warum es bislang nicht gelang, paramagnetische Ni-Spezies in anderen löslichen, bidirektionalen Hydrogenasen zu detektieren (Germer *et al.*, 2009; Horch *et al.*, 2011).

Tabelle 26. Übersicht über die EPR-Zustände des [NiFe]-aktiven Zentrums in der *HtSH* im Vergleich zu *ReSH* und der Standard-[NiFe]-Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum*.

Zuordnung	g_1	g_2	g_3	Literatur
<i>HtSH</i>				
[NiFe]: Ni^{III} , unbekannter Zustand	2.260	2.127	2.034	diese Arbeit
[NiFe]: Ni_a-C	2.210	2.139	2.013	
[NiFe]: Ni^{III} , unbekannter Zustand in Luft-oxidiertem Enzym	2.25 2.26	2.13	2.04	(Shomura <i>et al.</i> , 2017)
[NiFe]: Ni_a-C nach Reduktion durch H_2	2.21	2.14	-	
<i>ReSH</i>				(Horch <i>et al.</i> , 2010)
Ni_a-C	2.2	2.14	2.01	
Ni_a-L	2.27	2.1	2.05	
Std Hyd				(Bleijlevens <i>et al.</i> , 2001)
Ni_a-C	2.21	2.15	2.01	
Ni_a-L	2.28	2.12	2.05	

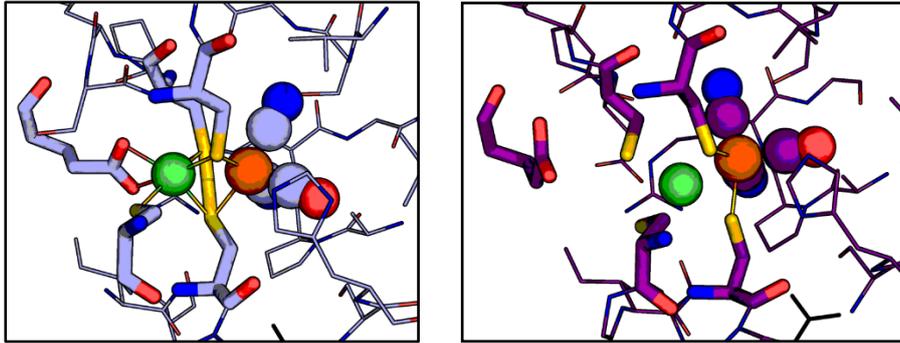


Abbildung 32. Darstellungen des oxidierten (links) und reduzierten (rechts) [NiFe]-Zentrums in der HoxH-Untereinheit der *HtSH*, die mithilfe der pdb-Einträge 5XF9 und 5XFA erstellt wurden (nach Shomura *et al.* (2017)).

Der im Rahmen dieser Arbeit erstmalig detektierte Zustand des aktiven Zentrums in frisch isolierter, oxidiertes *HtSH* mit den Werten $g_1 = 2.26$, $g_2 = 2.217$ und $g_3 = 2.034$ wurde auch von Shomura *et. al* in der Luft-oxidierten Probe der Hydrogenase festgestellt und könnte auf das Glutamat-gebundene Ni^(III) zurückzuführen sein.

Neben den EPR-aktiven Zuständen des aktiven Zentrums wurden von Christian Lorent (AG Hildebrandt) mit Hilfe der EPR-Spektroskopie die Anwesenheit von FMN sowie von [2Fe2S]- und [4Fe4S]-Zentren in der *HtSH*-Enzym nachgewiesen (3.3.4). IR-Spektroskopie (durchgeführt von Stefan Wahlefeld, AG Hildebrandt) ermöglichte zudem die Identifikation weiterer Redoxzustände des aktiven Zentrums (**Tabelle 16**). Darunter befindet sich der Ni_r-B-ähnliche Zustand des oxidierten Enzyms sowie die Intermediate der H₂-Umwandlung, namentlich Ni_a-S, Ni_a-C und Ni_a-SR (Horch *et al.*, 2010, 2015). Mit Ausnahme des Ni_a-C-Zustandes, der sowohl mittels IR und auch EPR nachgewiesen werden konnte, sind alle anderen Zustände EPR-inaktiv.

Tabelle 27. Vergleich der CO-Streckschwingungen (angegeben in cm^{-1}) verschiedener NAD(P)-reduzierender Hydrogenasen der Gruppe 3 in unterschiedlichen Redoxzuständen.

Herkunft ^a	Ni _U -?	Ni _r - B- like	Ni _r - S	Ni _a - SI	Ni _a - C	Ni _a -L	Ni _a - LII	Ni _a - SR	Ni _a - SR2	Ni _a - SR'	Ni _a - SR''	
<i>Ht</i> SH	1993	1964	1936	1951	1971	-	-	1958	-	1943	1934	diese Arbeit
<i>Ro</i> SH	-	-	-	-	1956	-	-	-	1958	1922	1913	(K. Karstens 2014)
<i>Re</i> SH	-	1957	-	-	1961	-	-	1946	1958	1922	1913	(Horch <i>et al.</i> , 2010, 2015)
<i>Pf</i> SH (SH1)	-	1960	1931	1950	1967	1917	1922	1954	-	1940	1931	(Greene <i>et al.</i> , 2015, 2016)
<i>Ss</i> SH	-	1957	-	1947	1968	-	-	1955	-	-	-	(Germer <i>et al.</i> , 2009)

^a*Ht* *Hydrogenophilus thermoluteolus*, *Ro* *Rhodococcus opacus* MR11, *Re* *Ralstonia eutropha* H16, *Pf* *Pyrococcus furiosus*, *Ss* *Synechocystis* sp. PCC 6803

Den CO-Schwingungen bei 1964 und 1936 cm^{-1} wurden Zustände Ni_r-B-like und Ni_r-S zugeordnet, die nicht Teil des katalytischen Zyklus der H₂-Konversion sind. Diefür die *Ht*SH beobachteten CO-Banden bei 1951, 1971 und 1958 cm^{-1} stehen dagegen für die Zustände Ni_a-S, Ni_a-C und Ni_a-SR, die Intermediate der H₂-Konversion darstellen.

Neben den bislang zugeordneten Zuständen wurde in der unbehandelten, Luft-oxidierten Probe der *Ht*SH eine dominante CO-Bande bei 1993 cm^{-1} beobachtet. Diese konnte vor Bekanntwerden der Kristallstruktur keinem Zustand des aktiven Zentrums zugeordnet werden. Vermutlich ist sie eine starke strukturelle Abweichung in der Geometrie des oxidierten Zentrums im Vergleich zu anderen Hydrogenasen zuzuordnen. Tatsächlich wurde in der Kristallstruktur der oxidierten *Ht*SH eine Koordination Nickels durch die Carboxylgruppe eines Glutamats beobachtet (Shomura *et al.*, 2017), die diese ungewöhnlich hochfrequente CO-Schwingung erklären könnte. Über den Wahrheitsgehalt dieser Annahme könnten QM/MM- sowie DFT-Rechnungen Aufschluss geben.

Im Vergleich zu den entsprechenden Signalen der *ReSH* und *RoSH* liegen die CO-Schwingungen der *HtSH* insgesamt bei höheren Frequenzen. In einem ebenso erhöhten Frequenzbereich finden sich auch die CO-Streckschwingungen der *PfSH*. Die *HtSH* scheint in diesem Zusammenhang größere Ähnlichkeit zur *PfSH* als zu den beiden bakteriellen SHs aufzuweisen, obwohl das [NiFe]-Zentrum in allen Hydrogenasen in gleicher Weise aufgebaut und koordiniert zu sein scheint. Auf welche strukturelle Unterschiede die verschiedenen Frequenzbereiche zurückzuführen sind, bleibt demnach noch offen.

4.2 Chimäre SHs zusammengesetzt aus den Modulen verschiedener Mikroorganismen

4.2.1 Die Hyp-Maschinerie des Megaplasmid ermöglicht die Maturation und Produktion heterologer Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha*

Dass die vollständige funktionsfähige, heterotetramere SH aus dem Actinobakterium *Rhodococcus opacus* heterolog in dem β -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* produziert werden kann, wurde bereits von Porthun *et al.* (2002) gezeigt. Hierfür wurden lediglich die vier Strukturgene *hoxFUYH* sowie das für die Endopeptidase codierende Gen *hoxW* aus *R. opacus* in *R. eutropha* übertragen. Die Reifung und der Einbau des Nickel-Eisen-Zentrums in die apo-Form der *RoHoxH*-Untereinheit wurde dabei von der megaplasmidständigen Hyp-Maschinerie von *R. eutropha* bewerkstelligt (2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gleiche Strategie verwendet, um mit Erfolg die Strukturgene der thermostabilen SH aus *Hydrogenophilus thermoluteolus* heterolog in *R. eutropha* zu exprimieren, was zur Isolation von katalytisch aktivem Enzym führte. Die Hyp-Maschinerie in *Ralstonia eutropha* scheint demnach nicht spezifisch auf die Reifung der eigenen Hydrogenasen beschränkt zu sein.

Die Expressionsstrategie wurde ebenfalls verwendet, um chimäre SHs aus den HoxFU- und HoxHY-Modulen verschiedener Mikroorganismen herzustellen. Bei dieser Studie fielen jedoch Unterschiede bezüglich der Fähigkeit der verschiedenen HoxHY-Module zur Komplementation eines entsprechenden Deletionsstamms von *R. eutropha* auf.

Zunächst wurde die Produktion aller vier Untereinheiten der SH-Chimären mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Besonders die Untereinheiten der heterologen HoxHY-Module waren in den *R. eutropha* Stämmen mit Δ *hoxH*-Hintergrund nur schwach sichtbar, wohingegen das *R.-eutropha*-eigene HoxHY-Modul in wildtypähnlichen Mengen synthetisiert wurde (3.4.2 **Abbildung 16**). Für heterologe Produktion der HoxFU-Module in *R. eutropha*-Stämmen mit

$\Delta hoxFU$ -Hintergrund wurde dieses Phänomen jedoch nicht beobachtet. Abgesehen von der Tatsache, dass die Antikörper gegen die SH-Untereinheiten von *R. eutropha* hergestellt wurden und möglicherweise eine geringere Spezifität für die heterologen Untereinheiten besitzen, lässt sich diese Beobachtung auf die Reifung zurückführen. Der Einbau des [NiFe]-Zentrums in die HoxH-Untereinheit erfordert neben der spezifischen Endopeptidase HoxW, sieben weitere Hyp-Proteine, nämlich HypA, B, C, D, E, F und X, die in einem vollständigen Satz im Operon der MBH kodiert sind (*hypA1*, *hypB1*, *hypF1*, *hypC1*, *hypD1*, *hypE1*, *hypX*) (Dernedde *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 2003). Eine Teilkopie in Form von *hypA2*, *hypB2* und *hypF2* findet sich auch im SH-Operon von *R. eutropha*, diese ist allerdings nicht ausreichend für die vollständige Reifung der SH und muss durch die fehlenden *hyp*-Gene des MBH-Operons ersetzt werden (Dernedde *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1998). In dieser Arbeit waren für die Herstellung der SH-Chimäre lediglich die im MBH-Operon kodierten Hyp-Proteine zugegen. Tatsächlich konnte im Falle der heterologen Expression der tetrameren RoSH in *R. eutropha* eine deutliche Erhöhung der spezifischen Aktivität erzielt werden, wenn zusätzlich die Gene *hypA2*, *hypB2* und *hypF2* co-exprimiert wurden (Porthun *et al.*, 2002). Diese Strategie könnte auch für die Produktion aktiverer SH-Chimäre erfolgreich sein. Denkbar ist auch eine unvollständige Reifung der apo-HoxH-Proteine aufgrund einer möglichen Kreuzreaktion der jeweils doppelt vorhandenen Endopeptidasen.

Nichtsdestotrotz scheint die Synthese und Reifung der chimären SH-Varianten ausreichend zu sein, um lithoautotrophes Wachstum der plasmidtragenden Stämme mit $\Delta hoxFU$ - und $\Delta hoxH$ -Hintergrund zu vermitteln (3.4.1 **Abbildung 14**). Mit Ausnahme des HoxHY-Moduls aus *H. thermoluteolus* kann dabei jedes heterolog synthetisierte Modul das entsprechende SH-Modul aus *R. eutropha* ersetzen. Jedoch sind die Wachstumsraten der Expressionsstämme mit chimären SHs niedriger als die der Stämme, die beide Module der ReSH besitzen.

Dass sogar die chimäre SH bestehend aus ReHoxHY und HtHoxFU lithoautotrophes Wachstum ermöglichen kann, war insofern überraschend, als das die Wachstumstemperatur in diesem Experiment mit 30°C deutlich unter der optimalen Wachstumstemperatur von 52°C von *H. thermoluteolus* liegt. Im Gegensatz dazu erscheint die SH bestehend aus HtHoxHY und ReHoxFU deutlich labiler. Lithoautotrophes Wachstum mit dieser chimären SH-Variante im $\Delta hoxH$ -Stamm war bei 30°C nicht möglich, da die Hydrogenase-Aktivität offensichtlich zu gering ist, um der Zelle ausreichend Reduktionsäquivalente zur Verfügung zu stellen.

Auch Proben des löslichen Extraktes dieses Stammes besaßen vergleichsweise geringe Hydrogenase-Aktivität (3.4.3 **Abbildung 17**). Selbst unter Zugabe der zweiwertigen Ni^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen und der Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C, wurde nur etwa 10 % der spezifischen Aktivität erreicht, die für die SH-Variante bestehend aus *ReHoxHY* und *HtHoxFU* gemessen wurde.

Die Produktion der HoxHY- und HoxFU- Module aus unterschiedlichen Organismen in *R. eutropha* führte zu aktiven, chimären SHs, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften von den wildtypischen SHs unterscheiden. Dieses Baukasten-Prinzip könnte zukünftig noch um weitere SH-spezifische Module aus anderen Organismen wie z.B. *P. furiosus* oder *Synechocystis sp.* erweitert werden und ermöglicht die Erzeugung synthetischer SHs. Diese könnten dann durch die geeignete Modul-Kombination wunschgemäß optimiert und den wildtypische SHs womöglich überlegen sein.

4.2.2 Die Hydrogenase-Module aus *Rhodococcus opacus* und *Hydrogenophilus thermoluteolus* benötigen zweiwertigen Kationen für die H_2 -Konversion

Nachdem die in Kapitel 3.4 beschriebenen Untersuchungen der transkonjuganten Stämme ΔhoxFU bzw. ΔhoxH signifikante Unterschiede in den H_2 -abhängigen NAD^+ -Reduktionsaktivitäten der chimären SH-Varianten ergaben, sollten die gereinigten Enzyme eingehender analysiert werden. Die Reinigungen chimärer SH-Varianten, die Module aus *R. opacus* enthielten, erbrachten etwa 0.9-1 mg gereinigtes Protein pro Gramm Zellen, und alle vier SH-Untereinheiten waren nach Elektrophorese deutlich im SDS-Gel zu identifizieren (**Abbildung 18**). Zwar konnten auch die chimären SH-Derivate mit den Modulen aus *H. thermoluteolus* mit ähnlichen Ausbeuten gereinigt werden, allerdings waren nur für die SH bestehend aus *HtHoxFU* und *ReHoxHY* alle vier charakteristischen Banden der Hydrogenase-Untereinheiten im SDS-Gel sichtbar (**Abbildung 18**). Das Eluat der SH-Variante bestehend aus *HtHoxHY* und *ReHoxFU* zeigte auch nach Supplementation des Reinigungspuffers mit zweiwertigen Metallionen nur zwei undeutliche Banden für HoxH und HoxY im SDS-Gel (**Abbildung 18**). Diese Beobachtung sowie die immunologische Analyse der entsprechenden Proben lassen vermuten, dass es trotz der Ionen-Supplementation zu einer Dissoziation der beiden SH-Module kommt. Die Interaktion zwischen dem *HtHoxHY*-Modul und *ReHoxFU* ist demnach zu schwach, um das heterotetramere Chimär stabil zusammenzuhalten. Daher konnte auch nach Erhöhung der Temperatur und unter Zugabe von Mg^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen nur eine sehr geringe spezifische H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivität für diese Variante festgestellt

werden. Es ist wichtig zu erwähnen, dass ohne Zugabe der zweiwertigen Ionen nur Spuren von Aktivität gemessen werden konnten (**Abbildung 19**).

Auch bei für die SH-Variante bestehend aus *ReHoxFU* und *RoHoxHY* wurde eine deutliche Erhöhung der Aktivität nach Zugabe von Ni^{2+} und Mg^{2+} festgestellt (**Abbildung 19**). Daraus kann gefolgert werden, dass die Hydrogenase-Module aus *R. opacus* und *H. thermoluteolus* die Anwesenheit zweiwertiger Metallionen benötigen, um einen effektiven Elektronentransport zwischen HoxHY und HoxFU zu ermöglichen. Dies wird auch dadurch belegt, dass SH-Chimäre, die das *ReHoxHY*-Modul tragen, volle Aktivität auch ohne Zugabe der Ionen zeigten (**Abbildung 19**). Der Einfluss der Ionen kann sich dabei auf verschiedenen Ebenen auswirken. Es ist denkbar, dass die Bindung der Ionen an Oberflächenstrukturen von HoxH oder HoxY Konformationsänderungen bewirken, die den Kontakt zu HoxFU stabilisieren. Auch die Wechselwirkungen zwischen HoxHY und HoxFU selbst könnten so durch ein Netzwerk aus ionischen und Wasserstoffbrückenbindungen verstärkt werden, wenn die Ionen als Ladungsträger das geeignete Umfeld schaffen.

Für diese Hypothese, dass die Ionen stabilisierend auf den Zusammenhalt der zwei Module der SHs aus *R. opacus* und *H. thermoluteolus* wirken, sprechen mehrere Beobachtungen. Zum einen ist das Ausmaß der Kationenabhängigkeit der SH-Chimären aus *ReFU-RoHY* und *ReHoxFUHtHY* geringer als die der nativen SHs aus *R.o.* bzw. *H.t.*, die in Abwesenheit der Salze NiCl_2 und MgCl_2 keine H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivität zeigen. Hingegen ist bei den chimären SHs auch ohne die Zugabe der Salze eine Restaktivität vorhanden, da das FU-Dimer aus der kationenunabhängigen *ReSH* stammt. Außerdem konnte insbesondere bei der SH-Chimäre *HtHY-ReFU*, die unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen gereinigt wurde, eine drastische Verkürzung der Anlaufphase festgestellt werden, wenn der Reaktionsassay mit NiCl_2 und MgCl_2 supplementiert wurde (**Abbildung 21**). Die Interaktionen zwischen dem HoxFU- und HoxHY-Modul in der SH aus *H.t.* könnte durch den C-Terminus von HoxF stabilisiert werden, der armförmig bis zur HoxY-Untereinheit ragt (**Abbildung 31**), wie es deutlich in der Kristallstruktur der reduzierten *HtSH* zu erkennen ist (Shomura *et al.*, 2017). Das Fehlen dieser Interaktion im oxidierten Zustand (Shomura *et al.*, 2017) könnte dann die leichte Dissoziation der Module voneinander sowie die daraus resultierende vergleichsweise niedrige H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivität erklären. Da diese C-terminale Extension in HoxF von *R. eutopha* fehlt, ist auch die Stabilität der chimären SH *HtHY-ReFU* besonders in Abwesenheit der zweiwertigen Metallionen limitiert.

Daneben wäre es auch denkbar, dass das Mg^{2+} -Ion, welches vielfach auch in der Nähe des [NiFe]-Zentrums gefunden wurde (Volbeda & Charon, *et al.*, 1995; Higuchi *et al.*, 1997; Fritsch *et al.*, 2011; Schäfer *et al.*, 2016), direkt an der Katalyse bzw. am Protonentransfer um das [NiFe]-aktive Zentrum beteiligt ist. Von Higuchi *et al.* wurde ein dementsprechender Mechanismus für die Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki vorgeschlagen (Higuchi *et al.* 1997). Ein Mg^{2+} -Ion findet sich auch in der Kristallstruktur der MBH aus *R.e.* (pdb 4IUD). Die MBH und auch die Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* benötigen jedoch keine Supplementation des Reaktionsansatzes mit Mg^{2+} , um katalytisch voll aktiv zu sein. Die Bindung des Mg^{2+} könnte aber im Gegensatz zu den SHs aus *R.o.* und *H.t.* auch sehr viel stärker sein. Ein Indiz dafür ist die Position des Ions in der Struktur. Zwar wird das Mg^{2+} von ähnlichen Aminosäuresequenzen koordiniert. Es befindet sich bei der MBH sowie der Hydrogenase aus *Desulfovibrio* (pdb 1YQ9) viel tiefer in der Struktur verborgen als im Falle der *HtSH*, wo es eher an der Oberfläche von HoxH lokalisiert und nur etwa 8 Å von HoxY entfernt ist (**Abbildung 33c**). Homologiemodelle für die *ReHoxH*- sowie *RoHoxH*-Untereinheit suggerieren ebenfalls die Anwesenheit eines Magnesiumions. Dieses erscheint im Fall von *RoHoxH* ebenso an der Oberfläche lokalisiert zu sein, verbirgt sich bei dem Modell von *ReHoxH* dagegen hinter einer Schleife (**Abbildung 33a, b**).

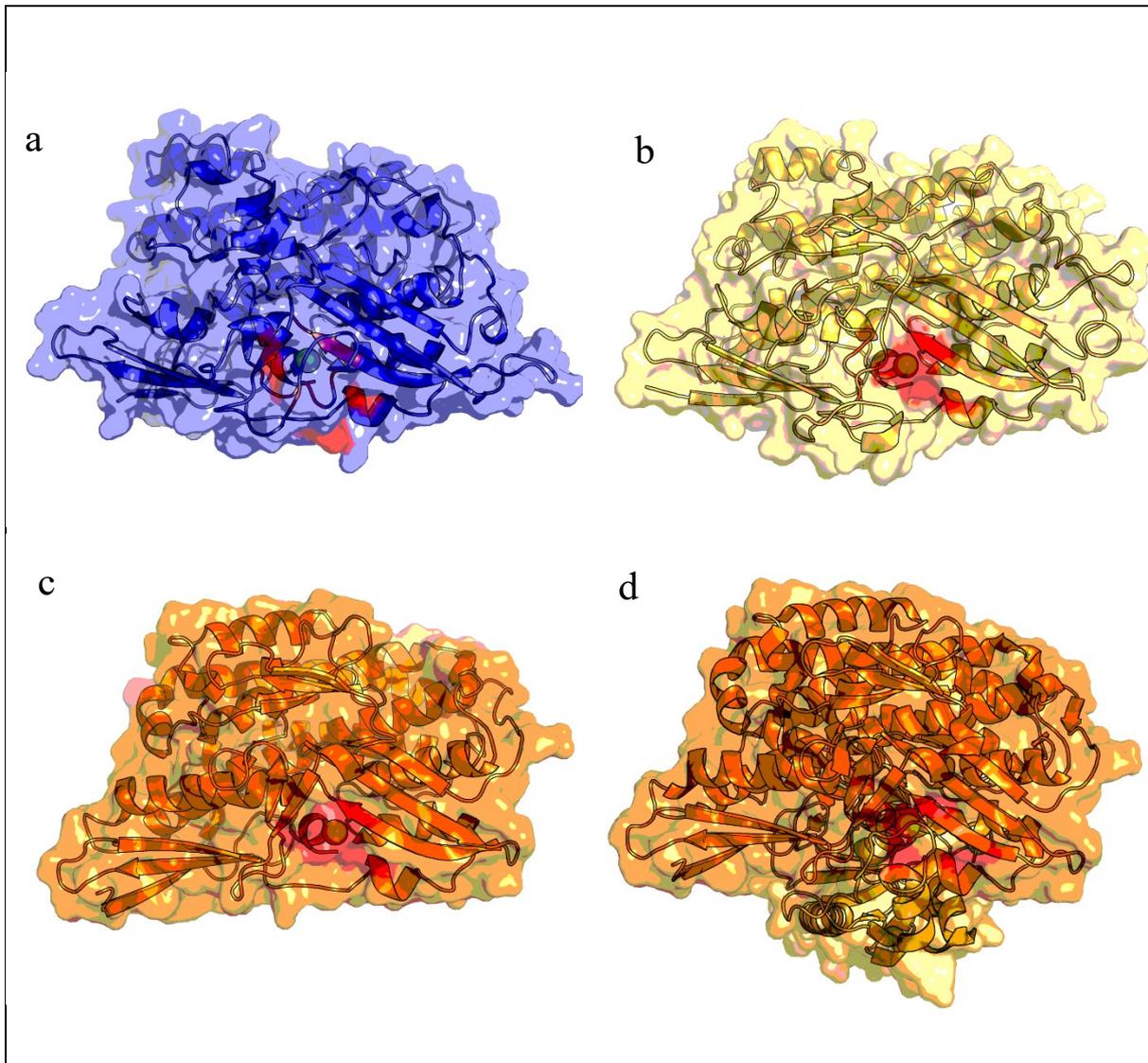


Abbildung 33. Darstellung der HoxH-Untereinheit aus *R. eutropha* (a), *R. opacus* (b) und *H. thermoluteolus* (c, d). Für die Strukturen der *ReHoxH* und *RoHoxH*-Untereinheiten wurden Homologiemodelle verwendet, die mithilfe der pdb-Datei 5xf9 erstellt wurden. d) Zusätzlich zu *HtHoxH* wurde HoxY in gelb zur Abbildung hinzugefügt. Das Mg²⁺-Ion ist als Kugel dargestellt, das Proteinrückgrat ist in der Cartoon-Darstellung dargestellt. Aminosäuren, die sich innerhalb eines Radius von 6 Å (a, b, c) bzw. 8 Å (d) um das Magnesiumion befinden wurden rot eingefärbt.

Auch wenn sich in den Strukturen nur das zusätzliche Magnesium-Ion findet, ist der stimulierende Effekt von Ni²⁺ im Reaktionsassay stärker. Bereits niedrige Konzentrationen von 0.5 mM NiCl₂ führten zu 80% der maximalen spezifischen NAD⁺-Reduktionsaktivität der nativen *HtSH* (**Abbildung 21**). Dagegen konnten mit einer hohen Konzentration von 5 mM Mg²⁺ im Reaktionsassay nur etwa 65 % der maximalen Aktivität gemessen werden. Die Differenz zwischen den Aktivitäten beträgt etwa 15% und deckt sich gut mit früheren Beobachtungen, die für die Aktivitätsmessungen der *RoSH* gemacht wurden (Schneider,

Schlegel, *et al.*, 1984). Auch bei der *RoSH* war die Erhöhung der Aktivität durch Zugabe niedriger NiCl_2 -Konzentrationen (0.1 mM) etwa um 14% höher als in Anwesenheit von 2.5 mM MgCl_2 .

Die zweiwertigen Ionen Mg^{2+} und Ni^{2+} unterscheiden sich in ihren Ionenradien abhängig von ihrer Koordination. So beträgt z.B. für eine tetraedrische Koordination der Radius des Nickels 63 pm und der des Magnesium 71 pm. Für eine oktaedrische Koordination sind es 83 pm bzw. 103 pm. Dies bedeutet, dass das Magnesium-Ion einen größeren Ionenradius aufweist, was eine Diffusion zur Bindestelle in HoxH erschweren würde.

4.3 *ReSH*: Umwandlung der NAD^+ -Bindestelle in eine NADP^+ -Bindetasche

4.3.1 Das Substratspektrum der *ReSH* lässt sich durch den Austausch eines Glutamats und das Einfügen eines Arginins zugunsten von NADP^+ verschieben

Da sich die *ReSH* in vorherigen Arbeiten bereits als geeignetes Enzym für die H_2 -abhängige Regeneration von NADH gezeigt hat (Holzer *et al.*, 2015; Lonsdale *et al.*, 2015; Ratzka *et al.*, 2011; Reeve *et al.*, 2015; Reeve *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017), sollte ihre Anwendung zur Reduktion des phosphorylierten Version von NADH, nämlich NADPH ausgeweitet werden. Dazu wurde ein geeignetes Plasmid zur Expression des SH-Moduls HoxFU konstruiert, in welches Basenaustausche in kurzer Zeit mithilfe einer modifizierten Quikchange-Methode eingebracht werden konnten. So wurden verschiedene Derivate der SH effizient mit einzelnen, doppelten oder dreifachen Aminosäureaustauschen in HoxF erstellt, die nachfolgend auf ihre Affinität für NADP^+ getestet wurden. Hierfür wurden auch Aminosäuren ausgetauscht, die sich zuvor als förderlich für den Affinitätswechsel zu NADP^+ erwiesen haben (L. Lauterbach, 2013; J. Preissler, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich insbesondere durch Austausch des Glutamats an der Position 341 zu Alanin und dem Einfügen eines Arginins statt eines Serin an Position 340 von HoxF signifikante Änderungen im Substratspektrum. Die Kombination beider Austausche bewirkte mit einem K_M -Wert von 0.6 mM eine signifikante erhöhte Affinität zu NADP^+ , wohingegen die Affinität zu dem natürlichen Substrat NAD^+ (K_M -Wert 1.32 mM im Vergleich zu 0.55 mM für native SH) deutlich abnahm. Gleichzeitig sank auch die Umsatzrate, sodass nur noch etwa 9 Moleküle NAD^+ pro Sekunde umgesetzt wurden. Dies entspricht etwa nur noch 1.2 % nativer SH. Eine Verringerung der Aktivität wird allerdings häufig beobachtet, wenn durch gerichtete Mutagenese die Substratspezifität von Enzymen verändert wird (Cahn *et al.*, 2017; Mesecar *et al.*, 1997; Woodyer *et al.*, 2003).

Ein Wechsel der Substrataffinität von NAD^+ zu NADP^+ (und umgekehrt) durch gentechnische Methoden ist vielfach molekularbiologisch und auch auf Strukturebene untersucht worden. Besonders bei biotechnologisch interessanten Oxidoreduktasen gibt es zahlreiche Beispiele für ein solches „Cofactor engineering“ (Cahn *et al.*, 2017; Khoury *et al.*, 2009; Marohnic *et al.*, 2003). Auch wenn sich die SH aufgrund ihrer Kombination aus NAD^+ - und FMN-Bindetasche und der Anwesenheit von [FeS]-Zentren strukturell von den meisten anderen NAD(P)(H) -abhängigen Enzymen unterscheidet, so sind ähnliche Aminosäuren an der Koordination der Pyridinnukleotid-Kofaktoren beteiligt. Dabei zeigten sich besonders ein oder mehrere konservierte Argininreste in den Bindetaschen NADP(H) -spezifischer Enzyme, während in den Bindetaschen NAD(H) -spezifischer Enzyme Glutamate oder Aspartate zu finden sind (Cahn *et al.*, 2017). Dieses Muster konnte auch auf die SH angewendet werden und belegt trotz ferner Verwandtschaft die Ähnlichkeit zwischen den NAD(P)(H) -Bindestellen unterschiedlicher Enzymklassen.

Physiologische Studien an den die SH-Varianten tragenden Transkonjuganten des *R. eutropha*-Deletionsstamms HF903 (ΔhoxFU) waren mit Ausnahme des die SH^{D467S} tragenden Stammes nicht mehr in der Lage, in einer Atmosphäre aus 5% H_2 , 10% O_2 , 10% CO_2 mit 75% N_2 zu wachsen (**Abbildung 25**). Offensichtlich war die Restaktivität für die NAD^+ -Reduktion zu gering, um lithoautotrophes Wachstum zu ermöglichen. Die H_2 -abhängige Reduktion von NADP^+ , die mit Ausnahme der nativen SH für alle Derivate gemessen werden konnte, scheint den Verlust der NAD^+ -Reduktionsaktivität jedoch nicht kompensieren zu können. Der die SH^{D467S} tragende Stamm war mit einer spezifischen Aktivität von $54.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ für das gereinigte Enzym gerade noch in der Lage, genügend NADH bereitstellen zu können.

Um die NADP^+ -Reduktionsaktivität der verschiedenen SH-Varianten weiter zu verbessern, wäre ein Ansatz basierend auf zufälliger Mutagenese denkbar. Neueste rechenbasierte Strategien zur Änderung des Substratspektrums und der anschließenden Optimierung der Stabilität und Aktivität könnten ebenfalls auf die SH-Derivate angewendet werden. Ein solcher vielversprechender Ansatz ist beispielsweise die CSR-SLD-Methode die von J. Cahn *et al.* kürzlich veröffentlicht wurde (2017). Um eine Bibliothek vieler verschiedener SH-Derivate schnell zu untersuchen, könnte ein SH-spezifischer Aktivitätsassay im Hochdurchsatzverfahren in 96-well Platten hilfreich sein.

4.3.2 Die synthetische NADP⁺-Reduktionsaktivität der neuen SH-Varianten ermöglicht eine H₂-getriebene Kofaktorregeneration

Die synthetische NADP⁺-Reduktionsaktivität der SH-Variante mit dem doppelten Austausch E341A und S342R in HoxF ist mit einem $k_{\text{cat}}^{\text{NADP}^+}$ von 2.1 s⁻¹ in Kombination mit der hohen Spezifität zu NADP⁺ ($K_{\text{M}}^{\text{NADP}^+} = 0.6 \text{ mM}$) vielversprechend für die Anwendung als kofaktorregenerierendes Enzym und kann diesbezüglich durchaus mit bereits etablierten NADPH-regenerierenden Enzymen verglichen werden (**Tabelle 28**).

Zwar bestehen sowohl die Glukose-Dehydrogenase (GDH) als auch die Formiat-Dehydrogenase (FDH) mit hohen Umsatzraten von bis zu 493 Molekülen NADP⁺ pro Minute, jedoch produzieren sie unerwünschte Nebenprodukte (Weckbecker *et al.*, 2010). Im Fall der GDH entsteht Glukonolacton, welches zur Verunreinigung des Produktes führt und daher meist mithilfe aufwändiger Methoden entfernt werden muss (Weckbecker *et al.*, 2010). Bei der Kofaktorregenerierung mittels FDH entsteht CO₂, welches einerseits die Reduktion des Kofaktors thermodynamisch begünstigt, andererseits zur Ansäuerung des Reaktionsmediums führt und aus ökologischen Gründen ungünstig ist (Tishkov & Popov, 2004; Wang *et al.*, 2017). Die Kofaktorregenerierung durch die Verwendung der Phosphit-Dehydrogenase (PDH) wird durch ihre niedrige Aktivität und das vergleichsweise teure Kosubstrat Phosphit limitiert (Relyea & van der Donk, 2005). Die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) besitzt zwar eine hohe Umsatzrate von 264 min⁻¹, aber auch hier muss das entstehende Nebenprodukt, d.h. das entsprechende Keton oder Aldehyd, abgetrennt werden. Zudem könnte der Einsatz von Alkoholen das produktbildende Enzym inhibieren (Hollmann *et al.*, 2011).

Im Vergleich dazu hat die NAD(P)⁺-reduzierende Hydrogenase den Vorteil, dass sie mit H₂ ein kostengünstiges, anorganisches Kosubstrat mit 100%iger Atomeffizienz verwendet und es dementsprechend keine Nebenprodukte gibt (Lauterbach, Lenz & Vincent, 2013).

Tabelle 28. Übersicht über kinetische Parameter einiger Dehydrogenasen, die für die Kofaktorregeneration verwendet werden

Enzym	$K_M^{\text{NADP}^+}$ [mM]	k_{cat} [min ⁻¹]	Kosubstrat/ Nebenprodukt	Referenz
Lösliche Hydrogenase SH ^{E341A S342R} (<i>Ralstonia eutropha</i>)	0.6	126	H ₂ H ₂ O	Diese Arbeit
Formiat-Dehydrogenase FDHC ^{145S D221Q C255V} (<i>Mycobacterium vaccae</i> N10)	0.92	493.2	Formiat CO ₂	(Hoelsch <i>et al.</i> , 2013b)
Phosphit-Dehydrogenase (<i>Pseudomonas stutzeri</i>) Nativ	2.51	85	H ₃ PO ₃ H ₃ PO ₄	(Woodyer <i>et al.</i> , 2003)
Variante E175A A176R	0.0035	114		
Glukose-Dehydrogenase (<i>Bacillus subtilis</i>)	0.26	n.p.†	Glukose Glukonolacton	(Fujita <i>et al.</i> , 1977)
Glucose-Dehydrogenase (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SB5)	0.05	420	Glukose Glukonolacton	(Pongtharangkul <i>et al.</i> , 2015)
Alkohol-Dehydrogenase (<i>Lactobacillus brevis</i>)	0.015	264	Alkohol Aldehyd	(Schlieben <i>et al.</i> , 2005)

† n.p. nicht publiziert

Dass die Variante SH^{E341A S342R} für die Anwendung als kofaktorregenerierendes Enzym geeignet ist, konnte u. a. durch verschiedene Tests, die am Department of Chemistry der University of Oxford durchgeführt wurden, belegt werden.

Dabei gelang es erstmalig, nach Adsorption verschiedener SH-Derivate auf einer Graphitelektrode, die NADP⁺-Reduktion katalysiert von der SH mittels Proteinfilmvoltametrie zu beobachten (**Abbildung 26**). Auch die K_M -Werte der SH^{E341A}, SH^{D467S}, SH^{E341A D467S} und SH^{E341A S342R} konnten mithilfe der Chronoamperometrie elektrochemisch bestimmt werden. Die dabei gemessenen Werte sind deutlich niedriger als die biochemisch gemessenen Parameter, zeigen aber einen ähnlichen Trend auf. Das SH^{E341A S342R}-Protein hat dabei mit einem K_M von 0.353 mM die höchste Affinität zum Kofaktor NADP⁺, gefolgt von der Variante SH^{E341A D467S} (1.018 mM), SH^{E341A} (1.322 mM), SH^{D467S} (3.695 mM) und schließlich der nativen HoxF^{WT}, die keine nachweisbare Aktivität mit NADP⁺ zeigt (**Tabelle 29**).

Die biochemisch bestimmten $k_{\text{cat}}^{\text{NADP}^+}$ -Werte der Varianten SH^{E341A D467S} und SH^{E341A} sind höher als die des SH^{E341A S342R}-Proteins (**Tabelle 29**). Dies könnte durch die noch vergleichsweise hohe Affinität der SH-Varianten zu dem natürlichen Substrat NAD⁺ begründet sein. Bei den biochemischen Messungen wurde kommerziell erhältlich NADP⁺ verwendet, welches die Verunreinigung NAD⁺ in Spuren enthalten kann und demzufolge die Messungen insbesondere bei den Varianten mit breitem Substratspektrum und vergleichsweise hoher

Affinität für NAD^+ verfälschen kann. Leider konnten die individuelle Umsatzraten (k_{cat}) nicht mittels Elektrochemie gemessen werden, da keine genaue Bestimmung der adsorbierten und aktiven SH-Moleküle möglich ist.

Tabelle 29. Übersicht über die kinetischen Parameter der SH-Varianten für die Substrate NAD^+ und NADP^+ , die sowohl biochemisch (s. 3.5.4) als auch wie elektrochemisch gemessen wurden.

SH Variante	K_M (mM)		K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	Biochemisch ^a	Elektrochemisch ^b			Biochem./ elektrochem.	Biochem./ Biochem.
H₂ → NAD⁺						
SH	0.55 ± 0.08	0.12 ± 0.13		689,5	1254	5843
SH^{E341A}	0.61 ± 0.11	0.77 ± 0.20		19,9	32.62	25.7
SH^{D467S}	0.66 ± 0.18	0.11 ± 0.12		54,8	83.03	517
SH^{E341A D467S}	0.65 ± 0.18	1.77 ± 0.32		24,3	37.4	13.7
SH^{E341A S342R}	1.32 ± 0.29	0.65 ± 0.23		8.8	6.7	13.6
H₂ → NADP⁺						
SH	50	8.00		0.1	0.00	0.01
SH^{E341A}	4.83 ± 1.7	1.32 ± 0.36		3.3	0.68	2.50
SH^{D467S}	3.4 ± 1.0	3.70 ± 0.33		0.2	0.06	0.05
SH^{E341A D467S}	2.3 ± 1.1	1.02 ± 0.2		3.0	1.33	2.95
SH^{E341A S342R}	0.60 ± 0.33	0.353 ± 0.104		2.1	3.50	5.95

^a 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 °C

^b 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 °C

Diskrepanzen zwischen den kinetischen Parametern, die aus verschiedenen Messverfahren gewonnen wurden, können auch auf Reinheit der verwendeten Kofaktoren zurückzuführen sein. Die Kofaktoren, die in den elektrochemischen Versuchen verwendet wurden stammten von einem anderen Hersteller und wurden vor den Messungen chromatografisch gereinigt (Holly Reeve, persönliche Mitteilung). Dementsprechend kann die tatsächliche Kofaktor-Konzentration im Reaktionsassay von der rechnerischen abweichen. Der Einfluss der Aminosäureaustausche auf die Proteinestabilität kann bei den verschiedenen Varianten

schwanken. Demzufolge unterschiedlich empfindlich könnten sie sich gegenüber der Adsorption und Rotation der Graphitelektrode während der Proteinfilmvoltametrie zeigen. Die Aminosäureaustausche können auch Einfluss auf das pH-Optimum für die H_2 -abhängige NAD(P)^+ -Reduktion haben. So entspricht beispielsweise ein pH-Wert von 7 eher dem Optimum für die NADP^+ -Reduktion durch die $\text{SH}^{\text{E341A S342R}}$, wohingegen die NAD^+ -Reduktion bevorzugt bei pH 8 katalysiert wird. Die Bestimmung der $K_M^{\text{NAD(P)}^+}$ -Werte der für die SH-Derivate in Puffern mit geeigneteren pH-Werten wurde von Anna Koczula im Rahmen eines Projektpraktikums getestet. Tatsächlich zeigte sich für die Variante $\text{SH}^{\text{E341A S342R}}$ ein in den sauren Bereich verschobenes pH-Optimum (Anna Koczula, persönliche Mitteilung).

In einem ersten Modellsystem, bestehend aus einer kommerziell erhältlichen En-Reduktase und der $\text{SH}^{\text{E341A S342R}}$ konnte nach H_2 -Begasung die vollständige Umsetzung des Substrates Cyclohexanon zu Cyclohexenol in nur wenigen Minuten erreicht werden (**Abbildung 27**). Eine Kofaktorkonzentration von 5 mM NADP^+ führte zu einer 99%igen Substratkonversion. Selbst eine Konzentration von nur 1.5 mM NADP^+ führte im gleichen Zeitraum zu einem 95%igen Umsatzes von Cyclohexanon zu Cyclohexenol (**Abbildung 27**).

Im Vergleich lieferte die $\text{SH}^{\text{E341A S342R}}$ ähnliche Resultate für die Oktan-Oxidation durch die NADPH -abhängige P450-Monooxygenase wie die GDH als kofaktorregenerierendes Enzym. Obwohl nur etwa $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ der $\text{SH}^{\text{E341A S342R}}$ und 1 mM NADP^+ verwendet wurden, waren keine deutlichen Unterschiede zur Verwendung der kommerziell erhältlichen GDH ($10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) bei der Reduktion von Oktan zu beobachten (**3.5.7**).

Diese Versuche belegen die Funktionalität des $\text{SH}^{\text{E341A S342R}}$ -Proteins als H_2 -abhängiges, NADPH -regenerierendes Enzym, das selbst in Anwesenheit von O_2 und organischen Lösemitteln ausreichend aktiv bleibt, um z. B. eine Monooxygenase mit den nötigen Reduktionsäquivalenten zu versorgen.

4.3.3 Ein veränderter Bias zugunsten der NAD(P)H -Oxidation könnte hilfreich für die SH-abhängige H_2 -Produktion sein

Da sich insbesondere die Anwesenheit eines Arginins in der NAD^+ -Bindetasche der SH als sehr vorteilhaft für die NADP^+ -Affinität erwiesen hat, sollte getestet werden, ob die synthetische NADP^+ -Reduktionsaktivität durch das Einfügen eines weiteren Arginins noch

verbessert werden kann. Daher wurde die Kombination der Aminosäureaustausche E341A, D467S und S342R in HoxF hinsichtlich der Auswirkungen auf das Substratspektrum der SH getestet. Durch den Dreifachaustausch konnten die H₂-abhängigen NADP⁺-Reduktionsaktivitäten der Varianten SH^{E341A D467S} und SH^{E341A S342R} jedoch nicht übertroffen werden (**Tabelle 23**). Verglichen mit den SH-Varianten mit zwei Aminosäureaustauschen wurden etwas niedrigere $K_M^{\text{NADP}^+}$ -Werte für die SH-Derivate mit dreifachen Substitutionen gemessen. Hinsichtlich der NAD(P)H-Oxidationsaktivität zeigten sich jedoch Unterschiede. Besonders die SH-Variante mit dem A341/R342/R358-Motiv in HoxF katalysierte diese Reaktionen mit höheren spezifischen Aktivitäten als die NADP⁺-Reduktionen. Der $K_M^{\text{NADPH}_-}$ -Wert der Variante SH^{E341A S342R D467S} liegt mit 0.062 mM tatsächlich etwa um den Faktor 100 niedriger als der entsprechende Wert für die native SH ($K_M^{\text{NADPH}} = 7.06$ mM, **Tabelle 24**). Die Bestimmung der kinetischen Parameter aller SH-Varianten für die Substrate NAD(P)⁺ sowie NAD(P)H ist wichtig für das Verständnis der katalytischen Eigenschaften hervorgerufen durch die Aminosäureaustausche. Ob der niedrige $K_M^{\text{NADPH}_-}$ -Wert und der Bias zugunsten der NAD(P)H-Oxidation, wie sie bei der SH^{E341A S342R D467S} beobachtet wurden, nützlich ist für die In-vivo/In-vitro-Verwendung der SH zur H₂-Produktion ist, stellt dabei eine interessante Fragestellung für zukünftige Arbeiten dar.

5 Anhang

HOXF_CUPNH	MDSR-ITLILERYRSDRTRLIDILWDVQHEYGHIIPD-AVLPQLGAGLKL-
HOXF_HYDTE	MTTE-----RQRTA-PGLLAALHQARSRFRPLDAQALAEI LSTAFSL-
HOXF_RHOOP	MSGD-IKAILERNRSERTRIDLIDILWDVQHLYGHIPD-EVLPQLADELNL-
HOXF_SYNY3	MDIKELKEIATKSREKQT-----
HYD1B_PYRFU	MRYVKL--PKENTYEFL---ERLKDW-----GKLY * .
HOXF_CUPNH	SPLDIRETASFYHFFLDKPSGKYRIYLCNSVIAKINGYQAVREAL-----
HOXF_HYDTE	PPGEIAATASFYHFFQT-PPARYQIHVFDVVDHAGVAALCNHL-----
HOXF_RHOOP	SPLDILETASFYHFFHRKPSGKYRIYLSDTVIAKMNGYQAVHDSL-----
HOXF_SYNY3	-----KIRIRCCSAAGCLSSEGETVKKNL-----
HYD1B_PYRFU	APVKI--SDKFYDFREIDDVRKIEFHYNRTIMPPKFFFKPREKLFEFDI : : . *
HOXF_CUPNH	----ERETGIRFGETDPNGMFGFLDTPFCIGLSDQEPAMLIDK--VVFTRL
HOXF_HYDTE	----CAAFAIQPGQRTADARLFVGTACAGLSDQAPAAALING--RMPRL
HOXF_RHOOP	----ERETGARFGGTDKTMFGLFETPCIGLSDQEPAMLIDN--VVFTRL
HOXF_SYNY3	----TTAIAAA-GLEEK---VEVCGVCGMKFCGRGPLVAVDDRNLQYEFV
HYD1B_PYRFU	SKPEY---REVIEVEPFIIFGVHACDI----- : .
HOXF_CUPNH	RPGKITDIIAQLKQGRSPA EIANPAGLPSQDIAYVDAMVES--NVRTKGP
HOXF_HYDTE	DAARIDALIEKIQ-AQ-----IPMDQWPEWFAVTN--AIHRHGP
HOXF_RHOOP	RPGTIVDIIITQLRQGRSPEDIANPAGLPSDDVAYVDGVVES--NVRTKGP
HOXF_SYNY3	TPDQVGDIVKQLKQPDVAE TGLISGDPH---HPFYALQR--NIALENS
HYD1B_PYRFU	-----YGLKILDTVYLDEFDPKYYKVRREK : .
HOXF_CUPNH	--V-----F-FRGRDRLSLLDQCLLLKPEQVIETIVDSRLRGRGGAGFS
HOXF_HYDTE	--L-----LTWLDTPAEAVFEHPTAHDPAI LQAVTDAGLRGRGGAGFP
HOXF_RHOOP	--V-----F-FRGLTDYGRLELCLALRPEQI IDRIIESKLRGRGGAGFS
HOXF_SYNY3	GRIDPESIDEYIALGGYQLHKVVYEMTPEEVIVEMNKSGLRGRGGGGYP
HYD1B_PYRFU	--I-----II----- :
HOXF_CUPNH	TGLKWRLCRDAESEQKYVICNADEGE PGTFKDRVLLTRAPKKVFGMVIA
HOXF_HYDTE	TATKWRFCRENADPERFLICNADEGE PGTFKDRVLLTRYPEHLFAGMILA
HOXF_RHOOP	TGLKWQLCRTAVSDDKYI ICNADEGE PGTFKDRVLLTRSPKKVFMGMIIA
HOXF_SYNY3	TGLKWATVAKMPGQKYVICNADEGDPGAFMDRSVLESDPHRILEGMAIA
HYD1B_PYRFU	-G-----ISCMPDEYCFCNLRETD FAD----- : : : * * : .
HOXF_CUPNH	AYAIGCRKGIYVLRGEYFYLDYLERQLQELREDG LLGRAIGGRAGDFDD
HOXF_HYDTE	ARAIGADKAILYLRYEYQYLLPQLEAA---RERIASAQATV-PQAERT
HOXF_RHOOP	ARAIGSRNGIYLRWEYIYLDYLERQLQELRDELLGARIGGQSGDFDD
HOXF_SYNY3	AYAVGANHGYYVRAEYPLAIQRLQKAIQQAKRYGLMGTQIF-DSPIDFK
HYD1B_PYRFU	-----DGFDFFHLE----- : :
HOXF_CUPNH	IRIQMGAGAYICGDESALIESCEGKRGTPRVKPPFPVQGYLGKPTSVNN
HOXF_HYDTE	LEIALGAGAYVCGEESALIESLEGKPRPRVPPYPVTQGYLGHP TVVNN
HOXF_RHOOP	IRIQMGAGAYICGDESALIESCEGKRGTPRVKPPFPVQGYLGKPTCVNN
HOXF_SYNY3	IDIRVGAGAFVCGEETALIASVEGKRGTPRPRPPYPAQSGLWQSP TLINN
HYD1B_PYRFU	-----
HOXF_CUPNH	VETFAAVSRIMEEGADWFRAMGTPDSAGTRLLSVAGDCSKPGIYEVWGV
HOXF_HYDTE	VETLVAVAAIVGNGAAWWRALGTPDSSGPKLFCVSGDVAQPGLYEFYGLV
HOXF_RHOOP	VETFAAAARIMEEGPNWFRALGTPESTGTRLLSVAGDCSRPGIYEVWGV
HOXF_SYNY3	VETYANVVP IIREGGDWYGSIGTEKSKGTVFALTGKVENAGLIEVPMGT
HYD1B_PYRFU	-----PDGWLVRVGT--TGHRLVD-----KNI * : ** * : : .
HOXF_CUPNH	TLNEVLAMVGAR-----DARAVQISGSPGECVSV A-KDGERKLAY-----
HOXF_HYDTE	ALGDVVTAARPL----GTRYAVQVSGPSG TLLPATPEQLARPLAF-----
HOXF_RHOOP	TLNEVLTTVGAR-----DARAVQISGSPGQC VSV A-EDGERRMAY-----
HOXF_SYNY3	TVRQVVEEMGGVPNGGQVKAVQTGGPSGGCIPA-D-KLDTPIEYDTLLA
HYD1B_PYRFU	KLFE EVT-----DKD-----ICAFR-DFEKR---RQQA : : : : . .
HOXF_CUPNH	-EDLSCNGAFTIFNCKRD LLEIVRDHMQFFVE----ESCGIC----VPCR
HOXF_HYDTE	-EALPCNGTVMVFDVRRDPVAIVH HFAFFAH----ESCGFC----TPCR
HOXF_RHOOP	-EDISCNGAFTIFNTERD LLEIVKDFMQFFVD----ESCGIC----VPCR

HOXF_SYNY3	LGTMMSGGMIVMDESTNMVDVAQFYMDFKS----ESCGKC----IPCR
HYD1B_PYRFU	FKYHE-----DWGNLRYLLELEMEHPMWDEEADKCLACGICNTTCTPCR
	. : . : : ** * . **
HOXF_CUPNH	AGNVDLHRKVEWVIAG-----KACQKDLDDMVSWGALVRRTRSRCGLGATS
HOXF_HYDTE	VGTQLIAKTFEKIAAG-----YATRFDLERLAPALEAMRLASNCGFGLSA
HOXF_RHOOP	VGNIDLHKKVELVIAG-----KACQKDLDDVVSWGALVKKTSRCGLGATS
HOXF_SYNY3	AGTVQLYDLLTRFLEG-----EATQEDLIKLENLCHMVKETSCLGLGMSA
HYD1B_PYRFU	CYEVQDIVNLDGVTGYRERRWDSQFRSH-----GLVAGG
	. . : : * : .
HOXF_CUPNH	PKPILTTLEKFPEIYQNKLVREHG-PLLPSPF-----
HOXF_HYDTE	GNPVRDLIAHFRQQLEAQLQPH---DFIPAF-----
HOXF_RHOOP	PNPILTTLDKFPETKRLRKQKKEALLSF-----
HOXF_SYNY3	PNPVI STLRYFRHEYEELL-----
HYD1B_PYRFU	HNFRPTKKDRFRNRYLCKNAYNEK--LGLSYCVGCGRCTAFCPANISFVG
	: * .
HOXF_CUPNH	DLDTALGGYEKALKDL-----EEVTR
HOXF_HYDTE	SLDAELAATR-RTGRDDPHAHLA-----QFEQPEVTR
HOXF_RHOOP	DLDAALGGYEKALEGLA-----KEEIK
HOXF_SYNY3	-----KV
HYD1B_PYRFU	NLRRILGLEENKCPPTVS-----EEIPKRGFAYSSNIRGDGV

Abbildung 34. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxF aus verschiedenen Organismen. CUPNH *Ralstonia eutropha* H16, HYDTE *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T, RHOOP *Rhodococcus opaus* MR11, SYNY3 *Synechocystis sp.* PCC 6803, HYD1B_PYRFU *Pyrococcus furiosus*

HOXH_CUPNH	M-----SRKLVIDPVTRIEGHGKVVVHLDNKKVDDA
HOXH_HYDTE	MTQHAPQAVSPRPSLPANATRRVAIDPLSRVEGHGKVTIWLDDDGQVVEA
HOXH_RHOOP	M-----STKLVIDPVTRIEGHGKVTVHLDNKNVDDA
HOXH_SYNY3	M-----SKTIVIDPVTRIEGHAKISIFLNDQGNVDDV
HYD1A_PYRFU	MKN-----LYLPITIDHIARVEGKGGVEI IIGDDG-VKEV
	* : ** : * : * : . : : : * : .
HOXH_CUPNH	KLHVVEF-RGFEKVFQGHFWEAPMFLQRCIGICFVSHHLCGAKALDDMV
HOXH_HYDTE	RLHIVEF-RGFEAFIVGRPYWEAPVVVQRLCGICPVSHHLLAAKALDRLV
HOXH_RHOOP	HLHVVEF-RGFEKLVQGHFWEAPMLMQRCIGICFVSHHLCGAKALDDMV
HOXH_SYNY3	RFHVVEY-RGFEKFCGRPMWEMAGITARICGICPVSHLLCAAKTGDKLL
HYD1A_PYRFU	KLNIIEGPRFFEAITIGKLEELALAIYPRICSFCSAAHKLTALEAAEKAV
	: : : : * * * * : * : * . * : * : * : : : : :
HOXH_CUPNH	GVGLKSGIHVPTAEKMRRLGHYAQLQSHHTAYFYLVPEMLFGMDAPP
HOXH_HYDTE	GVT-----QLPPTAEKMRRLMHYGQVLQSHALHFFYLAAPDLLLGFSDAP
HOXH_RHOOP	GVGLKSGIDVPTAEKIRRLGHYAQLQSHATAYFYLVPEMLFGMDAAP
HOXH_SYNY3	AV-----QIPPAGEKLRRLMNLGQITQSHALSFHLSPPDFLLGWSDP
HYD1A_PYRFU	GFVP-----REEIQALREVLYIGDMIESHALHLYLLVLPDY-RGYSSPL
	. . : * : . : : * : : * * : * : *
HOXH_CUPNH	AQRNVGLIEANPDLVKRVMLRWGQEVIKAVFGKMHGINSVPGGVNN
HOXH_HYDTE	AQRNVFGLAAQKRELARQGILVRQFQECIEATAGKRIHGTSAVPGGIHK
HOXH_RHOOP	EQRNVGLIEANPELVKRVMLRWGQEVIKAVFGRRMHGISSVPGGVNK
HOXH_SYNY3	ATRNVFGLIAADPDLARAGIRLRQFGQTVIELLGAKKIHSASVPGGVRS
HYD1A_PYRFU	KMVN-----EYKREIEIALKLNLTWMMDILGSRATHQENAVLGGFGK
	* . : : : * : . : : * : * * . .
HOXH_CUPNH	NLSIAERDRFLNGEGLSVDQVIDYAQDGLRLFYDFHQKHAQVDSFAD
HOXH_HYDTE	NLSRRERMALLSR---APE---IRSWCEAAVALIERLFTHEAPFFAQFGS
HOXH_RHOOP	NLSVAECQRFKGEGLPSVDEIVIEYAQEGVQLFYDFHEQNRVQVDSFAN
HOXH_SYNY3	PLSEEGRQWIVDR---LPE---AKETVYLAALNLFKNMLDRQTEVAEFGK
HYD1A_PYRFU	LPEKSVLEKM---K---AELREALPLAEYTFELFAKL-----EQYSE
	. : : * : . : * : : : . : . .
HOXH_CUPNH	V--PALSMCLVGDNDVYHGRRLRIIDDDKHIV-REFDYHDYLDHFSEA
HOXH_HYDTE	F--QTKTFSLVAADGSLDLYDGTFRVKEANGAILIDHYDPNDYDQLLVEA
HOXH_RHOOP	V--SALSMSLVDADGNVDYHGLKRIIDDDKNV-REFDYHDYLDHFSEA
HOXH_SYNY3	F--PSLFMGLVGKNEWEHYGGSLRFTDSEGNIVADNLSEDNYADFIGES
HYD1A_PYRFU	VEGPITHLAVKPRGDAYGYDYIKASDG-----EEFPSEKYRDIKEF
	. : : . * : : : . : . * : : *

HOXH_CUPNH	VEEWSYMKFPYLKELGREQGSVRVGPLGRMNVTKSLPTPLAQEALERFHA
HOXH_HYDTE	VRPWSYMKFPYLKAYGEPDGFYRVGFSARLINCDRLTTARAEARQRFLT
HOXH_RHOOP	VEEWSYMKFPFLKALGRERGSVRVGPLGRNLVNTNSLSTPLAQEALERFHA
HOXH_SYNY3	VEKWSYLKFPYKSLGYPDGIYRVGFLARLNVCHHIGTPEADQELEBYRQ
HYD1A_PYRFU	VVEHSFAKSHYKGR--R---PFMVGAISRVINNADLLYGKAKELYEANKD
	* * : * . . . * * : * . : : * . :
HOXH_CUPNH	YTKGRTNNMTLHTNWARAIEILHAAEVVKELLDHDPDLQKDLVLTPPPNA
HOXH_HYDTE	FDQGTVAHSTLGLYHVARLIEMLHCAELIEALLTDADLEGGELRARG---Q
HOXH_RHOOP	YTNGKANNMTLHTNWARAIEILHAAELIKELLDNDPDLQEQLLLTADNA
HOXH_SYNY3	RAGGV-ATSSFFHYARLVEILACLEAIELLMADPDILSKNCRKAE--I
HYD1A_PYRFU	LLKG---TNPFANNLAQALEIVYFIERAIDLLD-EALAKWPIKPRDEVEI
	* . : : * : * : : * * : :
HOXH_CUPNH	WTGEGVGVVEAPRGTLLHHRADERGNITFANLVVATTQNNQVMNRTVRS
HOXH_HYDTE	RQHRGVGVIEAPRGTLIHHEVGGDDDLITYCNLIVSTTHNNAVMNQAVTT
HOXH_RHOOP	WTGEGVGVVEAPRGTLLHHRADQEGDITFANLVVATTQNNQVMNRTVRS
HOXH_SYNY3	NCTEAVGVSEAPRGTLFHHYKIDEDGLIKKVNLIATGNNNLAMNKTVAQ
HYD1A_PYRFU	KDGFVSTTEAPRGLLVYALKV-ENGRVSYADITPTAFNLAMMEHVVM
	. * . . * * * * * * . : . : . : . : . : . : * * * . * . *
HOXH_CUPNH	VAEDYLGGHGEITEGMMNAIEVGIRAYDPCLSCATHALGQMLVSVVFDA
HOXH_HYDTE	AAKAFLSGV-TLTEALLNHIEVAVRAFDPCLSCATHALGQMLVSVLHKK
HOXH_RHOOP	VAEDYLGGQGEVTEGMMNAIEVGIRAYDPCLSCATHALGQMLIVSVHDT
HOXH_SYNY3	IAKHYIRNH-DVQEGFLNRVEAGIRCYDPCSCSTHAAGQMLMIDLVNP
HYD1A_PYRFU	MAEKHYND---PERLKILAEMVVRAYDPCISCSVHVV-----
	* : . . * : * : * : * : * * : * * : * . *
HOXH_CUPNH	A-----GRLIDE-RAR
HOXH_HYDTE	DVPTPIDMLVRHSDGTIERPTAAPALGT-KGT
HOXH_RHOOP	E-----GHVINE-RVR
HOXH_SYNY3	Q-----GELIKSIQRD
HYD1A_PYRFU	-----RL

Abbildung 35. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxH aus verschiedenen Organismen. CUPNH *Ralstonia eutropha* H16, HYDTE *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T, RHOOP *Rhodococcus opaus* MR11, SYNY3 *Synechocystis sp.* PCC 6803, HYD1B_PYRFU *Pyrococcus furiosus*

HOXU_CUPNH	MSI-----
HOXU_HYDTE	MRPTTPPFA-----
HOXU_PYRFU	MGKVRI GFYALTSCYGCQLQLAMMDELLQLIPNAEIVCFWFMIDRDSIEDE
HOXU_RHOOP	MSI-----
HOXU_SYNY3	MSV-----
	*
HOXU_CUPNH	--QITIDGKTLTTEEGRTLVDVAAENGVIYIPTLCYLKDKPCLGTCRVCSV
HOXU_HYDTE	SETFTLDEESI PFVPGQTVLEAALAGRYI PHLCWHPMGNHGSCLRCVV
HOXU_PYRFU	KVDIAFIEGVSSTEEVELVKKIRENAKIVV-----
HOXU_RHOOP	--EIEIDGVTVTTEESRTLVDVAAEAGVIYIPTLCYLKDKPCLGTCRVCSV
HOXU_SYNY3	-VTLTIDDKAIAIEEGASILQAAKEAGVPIPTLCHLEGISEAAACRLCMV
	: : : . : . : . : . :
HOXU_CUPNH	KVNGN--VAAACTVRVSKGLNVEVNDPEL-----VDMRKALV
HOXU_HYDTE	EANGR--IQASCALPAQPGLVVSKSETL-----TRVRRTLL
HOXU_PYRFU	-----AVGACAVQGGVQSWSEKPLEELWKKVYGDVAVKVFQPKKAEF
HOXU_RHOOP	KLNGT--VVAACTIRVANGMKIEVDEPEV-----VDMRKANV
HOXU_SYNY3	EVEGNTKLMACVTAVSEEMVVHTNTEKL-----QNYRRMTV
	. . . : . : :
HOXU_CUPNH	EFLFAEGNHNCPSCEKSGRCQLQAVGY-EVDMMSRFP-YRFPVRVVDHA
HOXU_HYDTE	EMLFAEGNHFCPGCEKSGDCLLQALAY-AHGMTASHFD-PFYPQRRIDAS
HOXU_PYRFU	VSKYIKVDYNIYGCPEKDFLYALGTFLIGSWPEDIDYVPCLECRNLN-G
HOXU_RHOOP	ELLFAEGNHNCPSCEKSGRCKLQAVGY-EVDMMSRFP-YRFPERVQDHA
HOXU_SYNY3	ELLFSEGHNHCAICVANGNCELQDMAI-TVGMDSRFK-YQFPKREVDLS
	: : : * . * : . . : :
HOXU_CUPNH	SEKIWLDRDCIFCQRCVEFIRD-KASGRKIFSIHRGPESRIE--IDAE
HOXU_HYDTE	HPDLWLDPNRCILCGLCVRA--S-LAEGKEALVIGGRGIASRLATSASG
HOXU_PYRFU	HPCILLEKGEPC-L-GPVTRAGCNARCPGFGVACIGCRGA-----IGYDVA
HOXU_RHOOP	SETIWLDRDCIFCQRCVEFVRD-KATGKIFSIHRGGDSRIE--IDAD

HOXU_SYNY3	HPMFGIDHNRICILCTRCVRV-CD-EIEGAHVWDVAYRGAECKIVSGLNQP : : : . . : . . . * : . **
HOXU_CUPNH	LANAMPPEQVKEAVAICPVGTILEKRVGYDDPIGRRK-Y-----EIQSV
HOXU_HYDTE	RLGDTALAAATDRAARICPVGALNFKAAGFTTPIGRRK-F-----DHRPP
HOXU_PYRFU	WFD-----SLAKVFKEKGMTKEEIIERMKMFNGHDERVEKM
HOXU_RHOOP	LANAMPPEQVREAVAICPVGTIIIEKRVGYDDPIGRRK-Y-----EIETV
HOXU_SYNY3	WGTVDACTSCGKCVDACPTGSI FHKGETTAEKIGDRR-K-----VEFLA . . : : * *
HOXU_CUPNH	RARALEGEDK
HOXU_HYDTE	EAMSDKERYT
HOXU_PYRFU	VEKIFSGGEQ
HOXU_RHOOP	RARALGGEEE
HOXU_SYNY3	TARKEKEWVR

Abbildung 36. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxU aus verschiedenen Organismen. CUPNH *Ralstonia eutropha* H16, HYDTE *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T, RHOOP *Rhodococcus opaus* MR11, SYNY3 *Synechocystis sp.* PCC 6803, HYD1B_PYRFU *Pyrococcus furiosus*

HOXY_CUPNH	MRAPHKDEIASHELTPMPDPAALANREGKIKVATIGLCGCWGCTLSFLDMDERLLPLLE
HOXY_HYDTE	MTSAA-----PSAMPPrKIRIATASLAGCFGCHMSFADIDTRLLALAE
HOXY_RHOOP	MKHSEKNEIASHELPTTPLDPVLAAGRESKIKVAMIGLCGCWGCTLSFLDMDERLLVLLD
HOXY_SYNY3	-----MAKIRFATVWLAGCSGCHMSFLDMDLIDLQAQ
HYD1D_PYRFU	-----MGKVRIGFYALTSCYGCQLQLAMMDELLQ-LIP
HOXY_CUPNH	KVTLRSSL-TDIKRI-PERCAIGFVEGGVSSEENIETLEHFRENCILISVGACAVWGG
HOXY_HYDTE	WVTFDRSPL-TDWKTV-GE-CDIALIEGGVCNAENVEVLRAYRAARILVAVGACAINGG
HOXY_RHOOP	KVTLRSSL-SDIKRI-TERCAIGFIEGGVANEENIETLEHYRENCVLSVGACAVWGG
HOXY_SYNY3	KVDVVFSPVGSDLKEY-PDNVDVCLVEGAIANEENLELALQLRQTKKVISFGDCAVTAN
HYD1D_PYRFU	NAEIVCWFM-IDRDSIEDEKVDIAFIEGSVSTEEVELVKKIRENAKIVAVGACAVQGG
HOXY_CUPNH	VPAMRNVEFLKD-CLAEAYVNSATAVPGAKAVVPFHPD-IPRITTKVYPCHEVVKMDYFI
HOXY_HYDTE	LPAQRNQHRVER-LLTQVFEADRHLAPGS--RVPNDPE-LPLLLLHVVHPIHEIVRVDYLL
HOXY_RHOOP	VPAMRNVEFLKD-CLSEVYIDSATSVPGAKPVVPFHPD-IPRITDKVYPCHEVVKMDYFI
HOXY_SYNY3	VPGMRNMLKGSDPVLRRAIYIELGDGTP----QLPDEPGIVPPLLDKVIPLHEVIVVDIFM
HYD1D_PYRFU	VQSWSE-KPLEE-LWKKVYGDAL-----VKFQP-----KKAEPVSKYIKVDYNI
HOXY_CUPNH	PGCPPDGDALFK -----
HOXY_HYDTE	PGPPTAEVIWT-----
HOXY_RHOOP	PGPPDADALFK -----
HOXY_SYNY3	PGPPDAHRIRA-----
HYD1D_PYRFU	YGCPEKDFLY

Abbildung 37. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxY aus verschiedenen Organismen. CUPNH *Ralstonia eutropha* H16, HYDTE *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1T, RHOOP *Rhodococcus opaus* MR11, SYNY3 *Synechocystis sp.* PCC 6803, HYD1B_PYRFU *Pyrococcus furiosus*

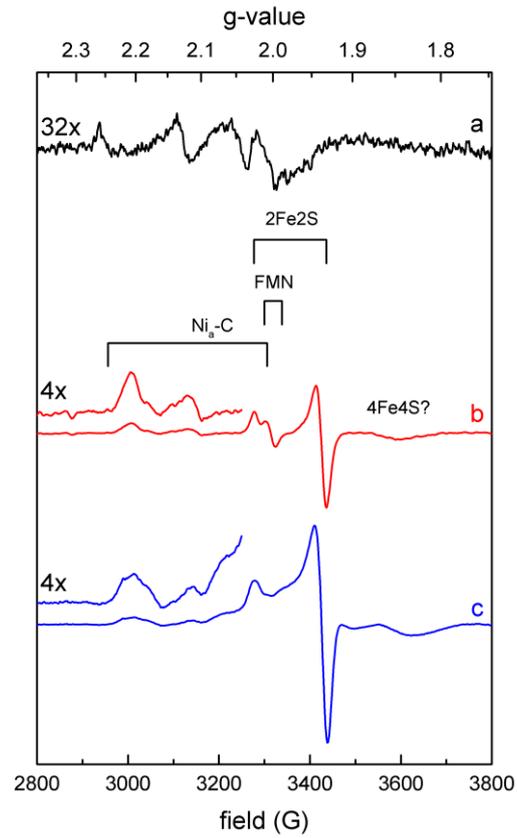


Abbildung 38. EPR-Spektrum der *as-isolated* (a), mit TCEP/NADH-reduzierten (b) und mit TCEP/NADH/H₂-reduzierten (c) *HtSH*. Die Spektren wurden bei 35 K (a), 10 K (b) und 6.5 K (c) aufgenommen.

6 Literatur

- Abraham, M. H.** (1993). Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes. *Chemical Society Reviews*, 22(2), 73.
- Aggag, M., & Schlegel, H. G.** (1974). Studies on a gram-positive hydrogen bacterium, *Nocardia opaca* 1 b. *Archives of Microbiology*, 100(1), 25–39.
- Albracht, S. P.J. & Hedderich, R.** (2000). Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *FEBS letters*, 485(1), 1–6.
- Albracht, S. P. J.** (1993). Intimate relationships of the large and the small subunits of all nickel hydrogenases with two nuclear-encoded subunits of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1144(2), 221–224.
- Albracht, S. P. J.** (1994). Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1188(3), 167–204.
- Albracht, S. P. J., Graf, E.-G., & Thauer, R. K.** (1982). The EPR properties of nickel in hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEBS Letters*, 140(2), 311–313.
- Albracht, S. P. J., Van Der Linden, E., & Faber, B. W.** (2003). Quantitative amino acid analysis of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and related enzymes. Consequences for the number of prosthetic groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1557(1–3), 41–49.
- Albracht, S. P. J., Van Der Zwaan, J. W., & Fontijn, R.** (1984). EPR Spectrum at 4, 9 and 35 GHz of hydrogenase from *Chromatium vinosum*. Direct evidence for spin-spin interaction between Ni(III) and the ironsulphur cluster. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 766(1), 245–258.
- Appel, J., Phunpruch, S., Steinmüller, K., & Schulz, R.** (2000). The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(5), 333–338.
- Armstrong, F. A.** (2002). Protein Film Voltammetry: Revealing the Mechanisms of Biological Oxidation and Reduction. *Russian Journal of Electrochemistry*, 38(1), 49–62.
- Armstrong, F. A., Belsey, N. A., Cracknell, J. A., Goldet, G., Parkin, A., Reisner, E., ... Wait, A. F.** (2009). Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology. *Chemical Society Reviews*, 38(1), 36–51.
- Armstrong, F. A., & Fontecilla-Camps, J. C.** (2008). A Natural Choice for Activating Hydrogen. *Science*, 321(5888), 498–499.
- Ash, P. A., Liu, J., Coutard, N., Heidary, N., Horch, M., Gudim, I., ... Vincent, K. A.** (2015). Electrochemical and Infrared Spectroscopic Studies Provide Insight into Reactions of the NiFe Regulatory Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* with O₂ and CO. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(43), 13807–13815.
- Bernhard, M., Benelli, B., Hochkoepler, A., Zannoni, D., & Friedrich, B.** (1997). Functional and structural role of the cytochrome b subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. *European journal of biochemistry*, 248(1), 179–86.

- Bernhardt, R., & Urlacher, V. B.** (2014). Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6185–6203.
- Berrisford, J. M., & Sazanov, L. a.** (2009). Structural Basis for the Mechanism of Respiratory Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29773–29783.
- Birnboim, H. C., & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513–23.
- Bleijlevens, B., Faber, B. W., & Albracht, S. P. J.** (2001). The [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* studied in EPR-detectable states: H/D exchange experiments that yield new information about the structure of the active site. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 6(8), 763–769.
- Bornscheuer, U.** (2001). Directed evolution of enzymes for biocatalytic applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, 19, 85–97.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K.** (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397), 185–194.
- Bryant, F. O., & Adams, M. W. W.** (1989). Characterization of Hydrogenase from the *Hyperthermophilic Arhaebacterium*, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(9), 5070–5079.
- Buhrke, T., Lenz, O., Krauss, N., & Friedrich, B.** (2005). Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23791–23796.
- Burgdorf, T., De Lacey, A. L., & Friedrich, B.** (2002). Functional analysis by site-directed mutagenesis of the NAD⁺-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*, 184(22), 6280–8.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P. J., & Friedrich, B.** (2005). [NiFe]-Hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular Enzymes for Oxygen-Tolerant Biological Hydrogen Oxidation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 10(2–4), 181–196.
- Burgdorf, T., van der Linden, E., Bernhard, M., Yin, Q. Y., Back, J. W., Hartog, A. F., ... Friedrich, B.** (2005). The Soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 Consists of Six Subunits and Can Be Specifically Activated by NADPH. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3122–3132.
- Cahn, J. K. B., Werlang, C. A., Baumschlager, A., Brinkmann-Chen, S., Mayo, S. L., & Arnold, F. H.** (2017). A General Tool for Engineering the NAD/NADP Cofactor Preference of Oxidoreductases. *ACS Synthetic Biology*, 6(2), 326–333.
- Cammack, R., Patil, D., Aguirre, R., & Hatchikian, E. C.** (1982). Redox properties of the ESR-detectable nickel in hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *FEBS Letters*, 142(2), 289–292.
- Chandrayan, S. K., McTernan, P. M., Hopkins, R. C., Sun, J., Jenney, F. E., & Adams, M. W. W.** (2012). Engineering hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* to overproduce its cytoplasmic [NiFe]-hydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(5), 3257–64.
- Chenault, H. K., Simon, E. S., & Whitesides, G. M.** (1988). Cofactor Regeneration for Enzyme-

Catalysed Synthesis. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 6(1), 221–270.

- Chenault, H. K., & Whitesides, G. M.** (1987). Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 14(2), 147–97.
- Conrad, R.** (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological reviews*, 60(4), 609–40.
- Constant, P., Chowdhury, S. P., Hesse, L., Pratscher, J., & Conrad, R.** (2011). Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H₂-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 77(17), 6027–35.
- Constant, P., Chowdhury, S. P., Pratscher, J., & Conrad, R.** (2010). Streptomyces contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environmental Microbiology*, 12(3), 821–829.
- Cracknell, J. a, Wait, A. F., Lenz, O., Friedrich, B., & Armstrong, F. a.** (2009). A kinetic and thermodynamic understanding of O₂ tolerance in [NiFe]-hydrogenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20681–20686.
- Cramm, R.** (2009). Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 38–52.
- De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Rousset, M., & Cammack, R.** (2007). Activation and Inactivation of Hydrogenase Function and the Catalytic Cycle: Spectroelectrochemical Studies. *ChemInform*, 38(51), no-no.
- Dernedde, J., Eitinger, T., Patenge, N., & Friedrich, B.** (1996). hyp gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. *Eur.J.Biochem.*, 235(0014–2956 (Print)), 351–358.
- Duché, O., Elsen, S., Cournac, L., & Colbeau, A.** (2005). Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O₂ sensitive without affecting its transducing activity. *FEBS Journal*, 272(15), 3899–3908.
- Evans, H. J., Harker, A. R., Papen, H., Russell, S. A., Hanus, F. J., & Zuber, M.** (1987). Physiology, Biochemistry, and Genetics of the Uptake Hydrogenase in Rhizobia. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 335–361.
- Evans, R. M., Parkin, A., Roessler, M. M., Murphy, B. J., Adamson, H., Lukey, M. J., ... Armstrong, F. A.** (2013). Principles of sustained enzymatic hydrogen oxidation in the presence of oxygen -the crucial influence of high potential Fe-S clusters in the electron relay of [NiFe]-hydrogenases. *Journal of the American Chemical Society*, 135(7), 2694–2707.
- Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., & Cammack, R.** (1985). Properties and reactivation of two different deactivated forms of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 832(1), 69–79.
- Friedrich, B., Heine, E., Finck, A., & Friedrich, C. G.** (1981). Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 145(3), 1144–9.
- Friedrich, C. G., Schneider, K., & Friedrich, B.** (1982). Nickel in the catalytically active hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 42–8.

- Friedrich, T., Steinmüller, K., & Weiss, H.** (1995). The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Letters*, *367*(2), 107–111.
- Fritsch, J., Lenz, O., & Friedrich, B.** (2013). Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(2), 106–114.
- Fritsch, J., Scheerer, P., Frielingsdorf, S., Kroschinsky, S., Friedrich, B., Lenz, O., & Spahn, C. M. T.** (2011). The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, *479*(7372), 249–52.
- Fujita, Y., Ramaley, R., & Freese, E.** (1977). Location and properties of glucose dehydrogenase in sporulating cells and spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *132*(1), 282–93.
- Gabadiño, J., Beteva, A., Guijarro, M., Rey-Bakaikoa, V., Spruce, D., Bowler, M. W., ... McSweeney, S. M.** (2010). MxCuBE : a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments. *Journal of Synchrotron Radiation*, *17*(5), 700–707.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C.** (1999). The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, *7*(5), 557–566.
- Garić, D., Humbert, L., Fils-Aimé, N., Korah, J., Zarfabian, Y., Lebrun, J.-J., & Ali, S.** (2013). Development of buffers for fast semidry transfer of proteins. *Analytical Biochemistry*, *441*(2), 182–184.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T., & Kado, C. I.** (1985). Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, *164*(2), 918–21.
- Germer, F., Zebger, I., Saggi, M., Lenzian, F., Schulz, R., & Appel, J.** (2009). Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(52), 36462–36472.
- Gnandt, E., Schimpf, J., Harter, C., Hoesser, J., & Friedrich, T.** (2017). Reduction of the off-pathway iron-sulphur cluster N1a of *Escherichia coli* respiratory complex I restrains NAD⁺dissociation. *Scientific Reports*, *7*(1), 13–20.
- Goldet, G., Brandmayr, C., Stripp, S. T., Happe, T., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J. C., & Armstrong, F. A.** (2009). 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.
- Goldet, G., Wait, A. F., Cracknell, J. A., Vincent, K. A., Ludwig, M., Lenz, O., ... Armstrong, F. A.** (2008). Hydrogen Production under Aerobic Conditions by Membrane-Bound Hydrogenases from *Ralstonia* Species. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(33), 11106–11113.
- Goris, T., Wait, A. F., Saggi, M., Fritsch, J., Heidary, N., Stein, M., ... Lenz, O.** (2011). A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nature chemical biology*, *7*(5), 310–8.
- Goto, E., Kodama, T., & Minoda, Y.** (1977). Isolation and Culture Conditions of Thermophilic Hydrogen Bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, *41*(4), 685–690.

- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., & Lopez, R.** (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server), W695–W699.
- Greene, B. L., Wu, C.-H., McTernan, P. M., Adams, M. W. W., & Dyer, R. B.** (2015). Proton-coupled electron transfer dynamics in the catalytic mechanism of a [NiFe]-hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 137(13), 4558–66.
- Greene, B. L., Wu, C.-H., Vansuch, G. E., Adams, M. W. W., & Dyer, R. B.** (2016). Proton Inventory and Dynamics in the Ni a -S to Ni a -C Transition of a [NiFe] Hydrogenase. *Biochemistry*, 55(12), 1813–1825.
- Greening, C., Berney, M., Hards, K., Cook, G. M., & Conrad, R.** (2014). A soil actinobacterium scavenges atmospheric H₂ using two membrane-associated, oxygen-dependent [NiFe] hydrogenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4257–4261.
- Greening, C., Biswas, A., Carere, C. R., Jackson, C. J., Taylor, M. C., Stott, M. B., ... Morales, S. E.** (2016). Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H₂ is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. *The ISME journal*, 10(3), 761–77.
- Greening, C., Villas-Bôas, S. G., Robson, J. R., Berney, M., & Cook, G. M.** (2014). The Growth and Survival of *Mycobacterium smegmatis* Is Enhanced by Co-Metabolism of Atmospheric H₂. *PLoS ONE*, 9(7), e103034.
- Grzeszik, C., Lubbers, M., Reh, M., & Schlegel, H. G.** (1997). Genes encoding the NAD-reducing hydrogenase of *Rhodococcus opacus* MR11. *Microbiology*, 143(4), 1271–1286.
- Grzeszik, C., Roß, K., Schneider, K., Reh, M., & Schlegel, H. G.** (1997). Location, catalytic activity, and subunit composition of NAD-reducing hydrogenases of some *Alcaligenes* strains and *Rhodococcus opacus* MR22. *Archives of Microbiology*, 167(2–3), 172–176.
- Hall, M., & Bommarius, A. S.** (2011). Enantioenriched Compounds via Enzyme-Catalyzed Redox Reactions. *Chemical Reviews*, 111(7), 4088–4110.
- Happe, R. P., Roseboom, W., Egert, G., Friedrich, C. G., Massanz, C., Friedrich, B., & Albracht, S. P. J.** (2000). Unusual FTIR and EPR properties of the H₂ -activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Letters*, 466(2–3), 259–263.
- Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P. J., & Bagley, K. A.** (1997). Biological activation of hydrogen. *Nature*, 385(6612), 126–126.
- Hayashi, N. R., Ishida, T., Yokota, A., Kodama, T., & Igarashi, Y.** (1999). *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), 783–786.
- Higuchi, Y., Yagi, T., & Yasuoka, N.** (1997). Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, 5(12), 1671–80.
- Hiromoto, T., Warkentin, E., Moll, J., Ermler, U., & Shima, S.** (2009). The Crystal Structure of an [Fe]-Hydrogenase-Substrate Complex Reveals the Framework for H₂ Activation. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(35), 6457–6460.

- Hoelsch, K., Sührer, I., Heusel, M., & Weuster-Botz, D.** (2013). Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2473–2481.
- Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., & Holtmann, D.** (2011). Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chemistry*, 13(9), 2285.
- Holt, P. J., Efremov, R. G., Nakamaru-Ogiso, E., & Sazanov, L. A.** (2016). Reversible FMN dissociation from *Escherichia coli* respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(11), 1777–1785.
- Holzer, A. K., Hiebler, K., Mutti, F. G., Simon, R. C., Lauterbach, L., Lenz, O., & Kroutil, W.** (2015). Asymmetric Biocatalytic Amination of Ketones at the Expense of NH₃ and Molecular Hydrogen. *Organic Letters*, 17(10), 2431–2433.
- Horch, M.** (2015). Structure-function Relationships of Metalloenzymes. *Dissertation*.
- Horch, M., Lauterbach, L., Lenz, O., Hildebrandt, P., & Zebger, I.** (2011). NAD(H)-coupled hydrogen cycling - structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Letters*, 586(5), 545–556.
- Horch, M., Lauterbach, L., Mroginski, M. A., Hildebrandt, P., Lenz, O., & Zebger, I.** (2015). Reversible active site sulfoxenylation can explain the oxygen tolerance of a NAD⁺-reducing [NiFe] hydrogenase and its unusual infrared spectroscopic properties. *Journal of the American Chemical Society*, 137(7), 2555–2564.
- Horch, M., Lauterbach, L., Saggi, M., Hildebrandt, P., Lenzian, F., Bittl, R., ... Zebger, I.** (2010). Probing the active site of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by in situ EPR and FTIR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(43), 8026–9.
- Houchins, J. P., & Burris, R. H.** (1981). Occurrence and localization of two distinct hydrogenases in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 7120. *Journal of Bacteriology*, 146(1), 209–14.
- Johannssen, W., Gerberding, H., Rohde, M., Zaborosch, C., & Mayer, F.** (1991). Structural aspects of the soluble NAD-dependent hydrogenase isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 and from *Nocardia opaca* 1b. *Archives of Microbiology*, 155(3), 303–308.
- Kalms, J., Schmidt, A., Frielingsdorf, S., Van Der Linden, P., Von Stetten, D., Lenz, O., ... Scheerer, P.** (2016). Krypton Derivatization of an O₂-Tolerant Membrane-Bound [NiFe] Hydrogenase Reveals a Hydrophobic Tunnel Network for Gas Transport. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(18), 5586–5590.
- Kamali, S., Wang, H., Mitra, D., Ogata, H., Lubitz, W., Manor, B. C., ... Cramer, S. P.** (2013). Observation of the Fe-CN and Fe-CO Vibrations in the Active Site of [NiFe] Hydrogenase by Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(2), 724–728.
- Kanai, T., Matsuoka, R., Beppu, H., Nakajima, A., Okada, Y., Atomi, H., & Imanaka, T.** (2011). Distinct Physiological Roles of the Three [NiFe]-Hydrogenase Orthologs in the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of Bacteriology*, 193(12), 3109–3116.
- Karstens, K.** (2014). Untersuchungen zur Funktion sauerstofftoleranter, NAD⁺-reduzierender

Hydrogenasen und ihrer Anwendung in der lichtgetriebenen Wasserstoffproduktion in Cyanobakterien. *Dissertation*.

- Karstens, K., Wahlefeld, S., Horch, M., Grunzel, M., Lauterbach, L., Lenzian, F., ... Lenz, O.** (2015). Impact of the iron-sulfur cluster proximal to the active site on the catalytic function of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase. *Biochemistry*, *54*(2), 389–403.
- Karyakin, A. A., Morozov, S. V., Karyakina, E. E., Zorin, N. A., Perelygin, V. V., & Cosnier, S.** (2005). Hydrogenase electrodes for fuel cells. *Biochemical Society transactions*, *33*, 73–75.
- Kataoka, M., Rohani, L. P., Yamamoto, K., Wada, M., Kawabata, H., Kita, K., ... Shimizu, S.** (1997). Enzymatic production of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate: asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by an *Escherichia coli* transformant expressing the aldehyde reductase gene from yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, *48*(6), 699–703.
- Keefe, R. G., Axley, M. J., & Harabin, A. L.** (1995). Kinetic mechanism studies of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Archives of biochemistry and biophysics*, *317*(2), 449–56.
- Khanna, N., & Lindblad, P.** (2015). Cyanobacterial hydrogenases and hydrogen metabolism revisited: Recent progress and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(5), 10537–10561.
- Khoury, G. A., Fazelinia, H., Chin, J. W., Pantazes, R. J., Cirino, P. C., & Maranas, C. D.** (2009). Computational design of *Candida boidinii* xylose reductase for altered cofactor specificity. *Protein Science*, *18*(10), 2125–2138.
- Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., & Friedrich, B.** (2000). The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *Journal of Bacteriology*, *182*(10), 2716–2724.
- Kortlüke, C., Horstmann, K., Schwartz, E., Rohde, M., Binsack, R., & Friedrich, B.** (1992). A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of bacteriology*, *174*(19), 6277–89.
- Krassen, H., Ott, S., & Heberle, J.** (2011). In vitro hydrogen production—using energy from the sun. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *13*(1), 47–57.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., & Faber, K.** (2004). Biocatalytic oxidation of primary and secondary alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *346*(2–3), 125–142.
- Kuhn, M., Steinbüchel, A., & Schlegel, H. G.** (1984). Hydrogen evolution by strictly aerobic hydrogen bacteria under anaerobic conditions. *Journal of bacteriology*, *159*(2), 633–9.
- Kulkarni, G., Kridelbaugh, D. M., Guss, A. M., & Metcalf, W. W.** (2009). Hydrogen is a preferred intermediate in the energy-conserving electron transport chain of *Methanosarcina barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(37), 15915–20.
- Kurkin, S., George, S. J., Thorneley, R. N. F., & Albracht, S. P. J.** (2004). Hydrogen-Induced Activation of the [NiFe]-Hydrogenase from *Allochromatium vinosum* as Studied by Stopped-Flow Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, *43*(21), 6820–6831.
- Kwan, P., McIntosh, C. L., Jennings, D. P., Hopkins, R. C., Chandrayan, S. K., Wu, C. H., ... Jones, A. K.** (2015). The [NiFe]-Hydrogenase of *Pyrococcus furiosus* Exhibits a New Type of

Oxygen Tolerance. *Journal of the American Chemical Society*, 137(42), 13556–13565.

- Lacey, A. L. De, Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C., Fernandez, V. M., & de Lacey, A. L.** (1997). Infrared-Spectroelectrochemical Characterization of the [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *Journal of the American Chemical Society*, 119(31), 7181–7189.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lamed, R. J., & Zeikus, J. G.** (1981). Novel NADP-linked alcohol--aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanogenic bacteria. *The Biochemical journal*, 195(1), 183–90.
- Lauterbach, L.** (2013). Die Analyse der Sauerstofftoleranz und biotechnologische Anwendung der NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16. *Dissertation*
- Lauterbach, L., Idris, Z., Vincent, K. a, & Lenz, O.** (2011). Catalytic Properties of the Isolated Diaphorase Fragment of the NAD-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *PLoS one*, 6(10), e25939.
- Lauterbach, L., & Lenz, O.** (2013). Catalytic Production of Hydrogen Peroxide and Water by Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase during H₂ Cycling in the Presence of O₂. *Journal of the American Chemical Society*, 135(47), 17897–17905.
- Lauterbach, L., Lenz, O., & Vincent, K. a.** (2013). H₂-driven cofactor regeneration with NAD(P)⁺-reducing hydrogenases. *FEBS Journal*, 280(13), 3058–3068.
- Lauterbach, L., Liu, J., Horch, M., Hummel, P., Schwarze, A., Haumann, M., ... Zebger, I.** (2011). The Hydrogenase Subcomplex of the NAD⁺-Reducing [NiFe] Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* - Insights into Catalysis and Redox Interconversions. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2011(7), 1067–1079.
- Lauterbach, L., Wang, H., Horch, M., Gee, L. B., Yoda, Y., Tanaka, Y., ... Cramer, S. P.** (2015). Nuclear resonance vibrational spectroscopy reveals the FeS cluster composition and active site vibrational properties of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe] hydrogenase. *Chemical Science*, 6(2), 1055–1060.
- LeGall, J., Ljungdahl, P. O., Moura, I., Peck, H. D., Xavier, A. V., Moura, J. J. G., ... DerVartanian, D. V.** (1982). The presence of redox-sensitive nickel in the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibriogigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 106(2), 610–616.
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., & Friedrich, T.** (1995). Isolation and Characterization of the Proton-translocating NADH:ubiquinone Oxidoreductase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 230(2), 538–548.
- Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E., & Friedrich, B.** (2002). The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 4(3), 255–62.
- Lenz, O., Ludwig, M., Schubert, T., Bürstel, I., Ganskow, S., Goris, T., ... Friedrich, B.** (2010). H₂ conversion in the presence of O₂ as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 11(6), 1107–19.

- Lenz, O., Schwartz, E., & Dervedde, J.** (1994). The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *Journal of Bacteriology*, 176(14), 4385–4393.
- Lechner, A., Jarasch, A., Meining, W., Schiefner, A., & Skerra, A.** (2013). Crystallographic analysis and structure-guided engineering of NADPH-dependent *Ralstonia* sp. Alcohol dehydrogenase toward NADH cosubstrate specificity. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(11), 2803–2814.
- Long, M., Liu, J., Chen, Z., Bleijlevens, B., Roseboom, W., & Albracht, S. P. J.** (2006). Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* and some EPR and IR properties of the hydrogenase module. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(1), 62–78.
- Lonsdale, T. H., Lauterbach, L., Honda Malca, S., Nestl, B. M., Hauer, B., & Lenz, O.** (2015). H₂-driven biotransformation of n-octane to 1-octanol by a recombinant *Pseudomonas putida* strain co-synthesizing an O₂-tolerant hydrogenase and a P450 monooxygenase. *Chem. Commun.*, 51(90), 16173–16175.
- Lubitz, W., Ogata, H., Rüdiger, O., & Reijerse, E.** (2014). Hydrogenases. *Chemical Reviews*, 114(8), 4081–4148.
- Lubitz, W., Reijerse, E., & van Gastel, M.** (2007). [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques. *Chemical reviews*, 107(10), 4331–65.
- Ma, K., Schichot, R. N., Kellyt, R. M., & Adams, M. W. W.** (1993). Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: Evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor. *Biochemistry*, 90(June), 5341–5344.
- Ma, K., Weiss, R., & Adams, M. W.** (2000). Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *Journal of bacteriology*, 182(7), 1864–71.
- Marohnic, C. C., Bewley, M. C., & Barber, M. J.** (2003). Engineering and characterization of a NADPH-utilizing cytochrome b5 reductase. *Biochemistry*, 42(38), 11170–82.
- Marx, C., & Lidstrom, M.** (2001). Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methyloprophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2065–2075.
- Massanz, C., Schmidt, S., & Friedrich, B.** (1998). Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology*, 180(5), 1023–9.
- Matias, P. M., Soares, C. M., Saraiva, L. M., Coelho, R., Morais, J., Le Gall, J., & Carrondo, M. A.** (2001). [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 6(1), 63–81.
- McIntosh, C. L., Germer, F., Schulz, R., Appel, J., & Jones, A. K.** (2011). The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. *Journal of the American Chemical Society*, 133(29), 11308–11319.
- Mesecar, A. D., Stoddard, B. L., & Koshland, D. E.** (1997). Orbital steering in the catalytic power of enzymes: small structural changes with large catalytic consequences. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5323), 202–6.

- Mills, D. J., Vitt, S., Strauss, M., Shima, S., & Vonck, J.** (2013). De novo modeling of the F420-reducing [NiFe]-hydrogenase from a methanogenic archaeon by cryo-electron microscopy. *eLife*, 2(2), 1–21.
- Miyazaki, K.** (2011). MEGAWHOP Cloning. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 498, pp. 399–406). Elsevier Inc.
- Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Field, M. J., ... Fontecilla-Camps, J. C.** (1997). Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nature Structural Biology*, 4(7), 523–526.
- Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., & Mantele, W.** (1990). Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome c. *European Journal of Biochemistry*, 187(3), 565–572.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in Enzymology* (Vol. 155, pp. 335–350).
- Muñoz Solano, D., Hoyos, P., Hernáiz, M. J., Alcántara, A. R., & Sánchez-Montero, J. M.** (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, 115, 196–207.
- Nestl, B., Nebel, B., & Hauer, B.** (2011). Recent progress in industrial biocatalysis. *Current opinion in chemical biology*, 15(2), 187–193.
- Nicolet, Y., De Lacey, A. L., Vernède, X., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., & Fontecilla-Camps, J. C.** (2001). Crystallographic and FTIR spectroscopic evidence of changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of the American Chemical Society*, 123(8), 1596–1601.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., & Fontecilla-Camps, J. C.** (1999). *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: The structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, 7(1), 13–23.
- Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., ... Higuchi, Y.** (2005). Activation Process of [NiFe] Hydrogenase Elucidated by High-Resolution X-Ray Analyses: Conversion of the Ready to the Unready State. *Structure*, 13(11), 1635–1642.
- Okamoto, Y., K?hler, V., Paul, C. E., Hollmann, F., & Ward, T. R.** (2016). Efficient in situ regeneration of NADH mimics by an artificial metalloenzyme. *ACS Catalysis*, 6(6), 3553–3557.
- Palágyi-Mészáros, L. S., Maróti, J., Latinovics, D., Balogh, T., Klement, É., Medzihradszky, K. F., ... Kovács, K. L.** (2009). Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS Journal*, 276(1), 164–174.
- Pandelia, M., Fourmond, V., Tron-Infossi, P., Lojou, E., Bertrand, P., Léger, C., ... Lubitz, W.** (2010). Membrane-Bound Hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: Enzyme Activation, Redox Intermediates and Oxygen Tolerance. *Journal of the American Chemical Society*, 132(20), 6991–7004.
- Paneth, F. A.** (1937). The chemical composition of the atmosphere. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 63(271), 433–443.
- Paul, C. E., Gargiulo, S., Opperman, D. J., Lavandera, I., Gotor-Fernández, V., Gotor, V., ...**

- Hollmann, F.** (2013). Mimicking nature: Synthetic nicotinamide cofactors for C=C bioreduction using enoate reductases. *Organic Letters*, 15(1), 180–183.
- Peters, J. W.** (1999). Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Current opinion in structural biology*, 9(6), 670–6.
- Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., & Seefeldt, L. C.** (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5395), 1853–8.
- Pfirrmann, T., Lokapally, A., Andréasson, C., Ljungdahl, P., & Hollemann, T.** (2013). SOMA: a single oligonucleotide mutagenesis and cloning approach. *PloS one*, 8(6), e64870.
- Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A., & Albracht, S. P. J.** (1999). Carbon Monoxide and Cyanide as Intrinsic Ligands to Iron in the Active Site of [NiFe]-Hydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3331–3337.
- Pilkington, S. J., Skehel, J. M., Gennis, R. B., & Walker, J. E.** (1991). Relationship between mitochondrial NADH-ubiquinone reductase and a bacterial NAD-reducing hydrogenase. *Biochemistry*, 30(8), 2166–2175.
- Pongtharangkul, T., Chuekitkumchorn, P., Suwanampa, N., Payongsri, P., Honda, K., & Panbangred, W.** (2015). Kinetic properties and stability of glucose dehydrogenase from *Bacillus amyloliquefaciens* SB5 and its potential for cofactor regeneration. *AMB Express*, 5(1), 68.
- Porthun, A., Bernhard, M., & Friedrich, B.** (2002). Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Archives of Microbiology*, 177(2), 159–166.
- Preissler, J.** (2013). Erweiterung des Substratspektrums der NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase aus *R. eutropha* H16 für die Kofaktorregeneration. *Diplomarbeit*.
- Preissler, J., Wahlefeld, S., Lorent, C., Teutloff, C., Horch, M., Lauterbach, L., ... Lenz, O.** (2018). Enzymatic and spectroscopic properties of a thermostable [NiFe]-hydrogenase performing H₂-driven NAD⁺-reduction in the presence of O₂. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859(1), 8–18.
- Rákhely, G., Kovács, Á. T., Maróti, G., Barna, D., Csanádi, G., Latinovics, D., ... Kova, T.** (2004). Cyanobacterial-Type, Heteropentameric, NAD⁺-Reducing NiFe Hydrogenase in the Purple Sulfur Photosynthetic Bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 722–728.
- Rákhely, G., Zhou, Z. H., Adams, M. W., & Kovács, K. L.** (1999). Biochemical and molecular characterization of the [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *European journal of biochemistry*, 266(3), 1158–65.
- Ratzka, J., Lauterbach, L., Lenz, O., & Ansorge-Schumacher, M. B.** (2011). Systematic evaluation of the dihydrogen-oxidising and NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 as a cofactor regeneration catalyst. *Biocatalysis and Biotransformation*, 29(6), 246–252.
- Ratzka, J., Lauterbach, L., Lenz, O., & Ansorge-Schumacher, M. B.** (2012). Stabilisation of the NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 through modification with methoxy-poly(ethylene) glycol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(3–4),

219–223.

Reeve, H. A., Ash, P. A., Park, H., Huang, A., Posidias, M., Tomlinson, C., ... Vincent, K. A. (2017). Enzymes as modular catalysts for redox half-reactions in H₂-powered chemical synthesis: from biology to technology. *Biochemical Journal*, 474(2), 215–230.

Reeve, H. A., Lauterbach, L., Lenz, O., & Vincent, K. A. (2015). Enzyme-Modified Particles for Selective Biocatalytic Hydrogenation by Hydrogen-Driven NADH Recycling. *ChemCatChem*, 7(21), 3480–3487.

Reeve, H. a, Lauterbach, L., Ash, P. a, Lenz, O., & Vincent, K. a. (2011). A modular system for regeneration of NAD cofactors using graphite particles modified with hydrogenase and diaphorase moieties. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 1–3.

Relyea, H. A., & van der Donk, W. A. (2005). Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase. *Bioorganic Chemistry*, 33(3), 171–189.

Rosenberg, E., DeLong, E. F., Stackebrandt, E., Lory, S., & Thompson, F. (2013). *The Prokaryotes Vol 5 - Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Sazanov, L. a. (2006). Structure of the Hydrophilic Domain of Respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, 311(5766), 1430–1436.

Schäfer, C., Bommer, M., Hennig, S. E., Jeoung, J. H., Dobbek, H., & Lenz, O. (2016). Structure of an Actinobacterial-Type [NiFe]-Hydrogenase Reveals Insight into O₂-Tolerant H₂ Oxidation. *Structure*, 24(2), 285–292.

Schäfer, C., Friedrich, B., & Lenz, O. (2013). Novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5137–5145.

Schiffels, J., Pinkenburg, O., Schelden, M., Aboulnaga, E.-H. a a, Baumann, M. E. M., & Selmer, T. (2013). An Innovative Cloning Platform Enables Large-Scale Production and Maturation of an Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase from *Cupriavidus necator* in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 8(7), e68812.

Schink, B., & Schlegel, H.-G. (1978). Hydrogen metabolism in aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Biochimie*, 60(3), 297–305.

Schlieben, N. H., Niefind, K., Müller, J., Riebel, B., Hummel, W., & Schomburg, D. (2005). Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity. *Journal of molecular biology*, 349(4), 801–13.

Schmidt, U. (1974). Molecular hydrogen in the atmosphere. *Tellus*, 26(1–2), 78–90.

Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F., & Bothe, H. (1995). Molecular Biological Analysis of a Bidirectional Hydrogenase from Cyanobacteria. *European Journal of Biochemistry*, 233(1), 266–276.

Schmitz, O., Boison, G., Salzmann, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S., & Happe, T. (2002). HoxE—a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1554(1–2), 66–74.

- Schneider, K., Cammack, R., & Schlegel, H. G.** (1984). Content and localization of FMN, Fe-S clusters and nickel in the NAD-linked hydrogenase of *Nocardia opaca* 1b. *European journal of biochemistry*, 142(1), 75–84.
- Schneider, K., Cammack, R., Schlegel, H. G., & Hall, D. O.** (1979). The iron-sulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 578(2), 445–461.
- Schneider, K., & Schlegel, H. G.** (1976). Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochimica et biophysica acta*, 452(1), 66–80.
- Schneider, K., & Schlegel, H. G.** (1978). Identification and quantitative determination of the flavin component of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84(3), 564–571.
- Schneider, K., & Schlegel, H. G.** (1981). Production of superoxide radicals by soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *The Biochemical journal*, 193(1), 99–107.
- Schneider, K., Schlegel, H. G., & Jochim, K.** (1984). Effect of nickel on activity and subunit composition of purified hydrogenase from *Nocardia opaca* 1 b. *European journal of biochemistry*, 138(3), 533–41.
- Schubert, K. R., & Evans, H. J.** (1976). Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(4), 1207–1211.
- Schwartz, E., Gerischer, U., & Friedrich, B.** (1998). Transcriptional Regulation of *Alcaligenes eutrophus* Hydrogenase Genes. *J. Bacteriol.*, 180(12), 3197–3204.
- Schwartz, E., Henne, A., Cramm, R., Eitinger, T., Friedrich, B., & Gottschalk, G.** (2003). Complete nucleotide sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *Journal of Molecular Biology*, 332(2), 369–383.
- Serebriakova, L. T., & Sheremet'eva, M. E.** (2006). Characterization of catalytic properties of hydrogenase isolated from the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743. *Biochemistry. Biokhimiia*, 71(12), 1370–1376.
- Serebryakova, L. T., Medina, M., Zorin, N. A., Gogotov, I. N., & Cammack, R.** (1996). Reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: catalytic properties and characterization of redox centres. *FEBS Letters*, 383(1–2), 79–82.
- Shafaat, H. S., Rüdiger, O., Ogata, H., & Lubitz, W.** (2013). [NiFe] hydrogenases: a common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(8–9), 986–1002.
- Shomura, Y., Taketa, M., Nakashima, H., Tai, H., Nakagawa, H., Ikeda, Y., ... Higuchi, Y.** (2017). Structural basis of the redox switches in the NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase. *Science*, 357(6354), 928–932.
- Siegbahn, P. E. M., Tye, J. W., & Hall, M. B.** (2007). Computational studies of [NiFe] and [FeFe] hydrogenases. *Chemical reviews*, 107(10), 4414–35.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G.** (2014). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal

Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539–539.

- Simon, R., Priefer, U., & Pühler, A.** (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology*, 1(9), 784–791.
- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M., & Pohl, M.** (2000). Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1280–1289.
- Stadler, C., de Lacey, A. L., Montet, Y., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Conesa, J. C., & Fernández, V. M.** (2002). Density Functional Calculations for Modeling the Active Site of Nickel–Iron Hydrogenases. 2. Predictions for the Unready and Ready States and the Corresponding Activation Processes. *Inorganic Chemistry*, 41(17), 4424–4434.
- Sun, J., Hopkins, R. C., Jenney, F. E., McTernan, P. M., & Adams, M. W. W.** (2010). Heterologous Expression and Maturation of an NADP-Dependent [NiFe]-Hydrogenase: A Key Enzyme in Biofuel Production. *PLoS ONE*, 5(5), e10526.
- Taketa, M., Nakagawa, H., Habukawa, M., Osuka, H., Kihira, K., Komori, H., ... Higuchi, Y.** (2015). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the NAD⁺-reducing [NiFe] hydrogenase from *Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications*, 71(Pt 1), 96–9.
- Tamagnini, P., Leitão, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D. J., ... Lindblad, P.** (2007). Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS microbiology reviews*, 31(6), 692–720.
- Tishkov, V. I., Galkin, A. G., Fedorchuk, V. V, Savitsky, P. A., Rojkova, A. M., Gieren, H., & Kula, M.-R.** (1999). Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺- and NADP⁺-specific formate dehydrogenases. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(2), 187–193.
- Tishkov, V. I., & Popov, V. O.** (2004). Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry. Biokhimiia*, 69(11), 1252–67.
- Tishkov, V., & Popov, V.** (2006). Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomolecular engineering*, 23, 89–110.
- Tran-Betcke, A., Warnecke, U., Böcker, C., Zaborosch, C., & Friedrich, B.** (1990). Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of bacteriology*, 172(6), 2920–9.
- Tye, J. W., Hall, M. B., & Darensbourg, M. Y.** (2005). Better than platinum? Fuel cells energized by enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 16911–16912.
- van der Donk, W. A., & Zhao, H.** (2003). Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 421–426.
- van der Linden, E., Burgdorf, T., de Lacey, A. L., Buhrke, T., Scholte, M., Fernandez, V. M., ... Albracht, S. P. J.** (2006). An improved purification procedure for the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*: new insights into its (in)stability and spectroscopic properties. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(2), 247–260.
- Van Der Linden, E., Faber, B. W., Bleijlevens, B., Burgdorf, T., Bernhard, M., Friedrich, B., & Albracht, S. P. J.** (2004). Selective release and function of one of the two FMN groups in the

- cytoplasmic NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *European Journal of Biochemistry*, 271(4), 801–808.
- Van Haaster, D. J., Silva, P. J., Hagedoorn, P. L., Jongejan, J. A., & Hagen, W. R.** (2008). Reinvestigation of the steady-state kinetics and physiological function of the soluble NiFe-hydrogenase I of *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1584–1587.
- Vasič-Racki, D., Jonas, M., Wandrey, C., Hummel, W., & Kula, M. R.** (1989). Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 215–222.
- Vignais, P. M., & Billoud, B.** (2007). Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews*, 107(10), 4206–4272.
- Vincent, K. a, Cracknell, J. a, Parkin, A., & Armstrong, F. a.** (2005). Hydrogen cycling by enzymes: electrocatalysis and implications for future energy technology. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, (21), 3397–403.
- Vincent, K. a, Parkin, A., & Armstrong, F. a.** (2007). Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chemical reviews*, 107(10), 4366–413.
- Vitt, S., Ma, K., Warkentin, E., Moll, J., Pierik, A. J., Shima, S., & Ermler, U.** (2014). The F420-reducing [NiFe]-Hydrogenase complex from *Methanothermobacter marburgensis*, the first X-ray structure of a group 3 family member. *Journal of Molecular Biology*, 426(15), 2813–2826.
- Volbeda, A., Charon, M.-H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C.** (1995). Crystal structure of the nickel–iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373(6515), 580–587.
- Volbeda, A., Martin, L., Barbier, E., Gutiérrez-Sanz, O., De Lacey, A. L., Liebgott, P. P., ... Fontecilla-Camps, J. C.** (2015). Crystallographic studies of [NiFe]-hydrogenase mutants: Towards consensus structures for the elusive unready oxidized states. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 20(1), 11–22.
- Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B. W., Roseboom, W., ... Fontecilla-Camps, J. C.** (2005). Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(3), 239–249.
- Wang, R., Healey, F. P., & Myers, J.** (1971). Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*. *Plant physiology*, 48, 108–110.
- Wang, X., Saba, T., Yiu, H. H. P., Howe, R. F., Anderson, J. A., & Shi, J.** (2017). Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. *Chem*, 2(5), 621–654.
- Weckbecker, A., Gröger, H., & Hummel, W.** (2010). Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 120, 195–242.
- Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G., Tufton, H. G., Kenny, R. J. P., Ogilvie, L. C. I., & Wong, L.-L.** (2008). Evolved CYP102A1 (P450_{BM3}) variants oxidise a range of non-natural substrates and offer new selectivity options. *Chemical Communications*, (8), 966.
- Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G., & Wong, L.-L.** (2012). P450_{BM3} (CYP102A1): connecting the dots. *Chem. Soc. Rev.*, 41(3), 1218–1260.

- Wilde, E.** (1962). Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. *Archives of Microbiology*, 43(2), 109–137.
- Wolf, I., Buhrke, T., Dervedde, J., Pohlmann, A., & Friedrich, B.** (1998). Duplication of hyp genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Archives of Microbiology*, 170(6), 451–459.
- Wong, C., Drueckhammer, D. G., & Sweers, H. M.** (1985). Enzymatic vs. fermentative synthesis: thermostable glucose dehydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 107(13), 4028–4031.
- Woodyer, R., van der Donk, W. A., & Zhao, H.** (2003). Relaxing the Nicotinamide Cofactor Specificity of Phosphite Dehydrogenase by Rational Design. *Biochemistry*, 42(40), 11604–11614.
- Wu, C.-H., McTernan, P. M., Walter, M. E., & Adams, M. W. W.** (2015). Production and Application of a Soluble Hydrogenase from *Pyrococcus furiosus*. *Archaea*, 2015, 1–8.
- Yang, K., & Metcalf, W. W.** (2004). A new activity for an old enzyme: *Escherichia coli* bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), 7919–7924.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103–119.
- Zaborosch, C., Köstert, M., Bill, E., Schneider, K., Schlegel, H., & Trautweint, A.** (1995). EPR and Mössbauer spectroscopic studies on the tetrameric, NAD-linked hydrogenase of *Nocardia opaca* 1b and its two dimers: 1. The $\beta\gamma$ -dimer - a prototype of a simple hydrogenase. *Biometals*, 8(2), 149–162.
- Zaborosch, C., Schneider, K., SC, H. G., & KRATZIN, H.** (1989). Comparison of the NH₂-terminal amino acid sequences of the four non-identical subunits of the NAD-linked hydrogenases from *Nocardia opaca* 1b and *Alcaligenes eutrophus* H16. *European Journal of Biochemistry*, 181(1), 175–180.
- Zhao, H., Donk, W. A. Van Der, & van der Donk, W. a.** (2003). Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 583–589.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Plasmide	19
Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme	21
Tabelle 3. Zusammensetzung der Kultivierungsmedien	24
Tabelle 4. Konzentrationen der verwendeten Antibiotika	25
Tabelle 5. Verwendete Puffer und Lösungen für die Reinigung verschiedener SH-Derivate	27
Tabelle 6. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Durchführung einer SDS-Gelelektrophorese	38
Tabelle 7. Übersicht über die verwendeten Antikörper	40
Tabelle 8. Liste der verwendeten Oligonukleotide	47
Tabelle 9. PCR-Ansätze mit der <i>Taq</i> -Polymerase	48
Tabelle 10. PCR-Protokoll der <i>Taq</i> -Polymerase	48
Tabelle 11. PCR-Ansätze mit der Q5-Polymerase	49
Tabelle 12. PCR-Protokoll der Q5-Polymerase	49
Tabelle 13. PCR-Protokoll der MEGAWHOP-Klonierung	50
Tabelle 14. Reinigung der <i>HtSH</i> aus <i>R. eutropha</i> HF 1054 (pJP09) mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie (AC, SEC)	56
Tabelle 15. H ₂ -abhängige NAD ⁺ -Reduktionsaktivität der <i>HtSH</i> in Anwesenheit verschiedener O ₂ -Konzentrationen	60
Tabelle 16. Redoxzuständen des aktiven Zentrums zugeordnete Wellenzahlen für gereinigte <i>HtSH</i>	67
Tabelle 17. Auf der Basis von EPR-Spektroskopie zugeordnete g-Werte der Kofaktoren in <i>HtSH</i>	67
Tabelle 18. Vergleich der <i>HtSH</i> mit kommerziell erhältlichen, kofaktorregenerierenden Dehydrogenasen	68
Tabelle 19. Übersicht über verwendete Stämme und chimäre SH-Varianten. Die Proteine wurden entsprechend der Genherkunft farblich markiert: <i>R.e.</i> blau, <i>H.t.</i> rot, <i>R.o.</i> grün.	70
Tabelle 20. Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der verschiedenen Transkonjuganten basierend auf den <i>R. eutropha</i> Stämme HF903 (Δ <i>hoxFU</i>) und HF500 (Δ <i>hoxH</i>) unter lithoautotrophen Wachstumsbedingungen.	73
Tabelle 21. Verwendete Plasmidkonstrukte, die HoxF-Varianten mit Aminosäureaustausche in der NAD(H)-Bindetasche kodieren.	86
Tabelle 22. H ₂ -abhängige NAD(P) ⁺ -Reduktionsaktivität in Anwesenheit von O ₂ der SH-Varianten mit Austauschen in der NAD(H)-Bindetasche von HoxF.	90
Tabelle 23. K_M - und k_{cat} -Werte der SH-Varianten für die H ₂ -abhängige NAD(P) ⁺ -Reduktion	92
Tabelle 24. K_M - und k_{cat} -Werte der SH-Varianten für die NAD(P)H-abhängige Reduktion von BV	92
Tabelle 25. Vergleich der biochemischer Eigenschaften von löslichen, NAD(P) ⁺ -reduzierenden [NiFe]-Hydrogenasen aus verschiedenen Mikroorganismen.	98
Tabelle 26. Übersicht über die EPR-Zustände des [NiFe]-aktiven Zentrums in der <i>HtSH</i> im Vergleich zu <i>ReSH</i> und der Standard-[NiFe]-Hydrogenase aus <i>Allochromatium vinosum</i>	107
Tabelle 27. Vergleich der CO-Streckschwingungen (angegeben in cm ⁻¹) verschiedener NAD(P)-reduzierender Hydrogenasen der Gruppe 3 in unterschiedlichen Redoxzuständen.	109

Tabelle 28. Übersicht über kinetische Parameter einiger Dehydrogenasen, die für die Kofaktorregeneration verwendet werden	119
Tabelle 29. Übersicht über die kinetischen Parameter der SH-Varianten für die Substrate NAD^+ und NADP^+ , die sowohl biochemisch (s. 3.5.4) als auch wie elektrochemisch gemessen wurden.....	120

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Struktur der sogenannten Standard-[NiFe]-Hydrogenase bestehend aus einer großen (rot; engl.: „ <i>large subunit</i> “) und kleinen (grün, engl.: „ <i>small subunit</i> “) Untereinheit nach M. Horch <i>et al.</i> (2010).....	3
Abbildung 2. Schema des allgemeinen katalytischen Zyklus von [NiFe]-Hydrogenasen für die Umwandlung von H_2 (linke Seite) sowie die oxidative Inaktivierung des aktiven Zentrums (rechte Seite).	7
Abbildung 3. Schematische Darstellung der vier [NiFe]-Hydrogenasen aus <i>R. eutropha</i> H16 basierend auf Kapitel 4 in Rögner „Biohydrogen“ (2011).	9
Abbildung 4. Schema der H_2 -abhängigen NADH-Regeneration.....	16
Abbildung 5: Einfluss von NaCl und KCl auf die H_2 -abhängige Reduktion von NAD^+ der gereinigten <i>HtSH</i> bei 50 °C.	55
Abbildung 6. Reinigung der <i>HtSH</i> aus dem Stamm HF1054 (pJP09).....	56
Abbildung 7. H_2 -abhängige NAD^+ Reduktionsaktivität der <i>HtSH</i> bei verschiedenen Temperaturen.	57
Abbildung 8. Aktivität der <i>HtSH</i> bei verschiedenen pH-Werten	58
Abbildung 9. Michaelis-Menten Kinetiken der <i>HtSH</i> für die Substrate NAD^+ (a), NADH (b), H_2 (c).....	59
Abbildung 10. Reaktivierungsverhalten der <i>HtSH</i> mit verschiedenen Reduktionsmitteln bzw. Proteinmengen. 62	
Abbildung 11. H_2 -abhängige Reduktion von NAD^+ zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Reinigung (a) und in Gegenwart verschiedener Metallsalze (b).....	63
Abbildung 12. Phylogenetische Bäume zur Darstellung der Verwandtschaft zwischen den Aminosäure-Sequenzen der SH-Untereinheiten aus verschiedenen Organismen.....	64
Abbildung 13. IR- (links) und EPR- (rechts) Spektren der gereinigten <i>HtSH</i> in verschiedenen Zuständen.	66
Abbildung 14. Lithoautotrophes Wachstum von HF903 (ΔhoxFU) (a) bzw. HF500 (ΔhoxH) (b) mithilfe chimärer Hydrogenase-Varianten	72
Abbildung 15. Lithoautotrophes Wachstum der verschiedenen HF903 (ΔhoxFU)- und HF500 (ΔhoxH)-Stämme in Minimalmedium unter einer Atmosphäre aus 10% H_2 , 5 % O_2 , 10 % CO_2 und 75% N_2 bei 30 ° C.	73
Abbildung 16. Immunologische Nachweis der SH-Untereinheiten in rekombinanten <i>R.-eutropha</i> -Stämmen, die SH-Hybridproteine synthetisieren..	75
Abbildung 17. Spezifische H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivitäten in den löslichen Extrakten der Transkonjuganten der <i>R. eutropha</i> -Stämme HF903 (ΔhoxFU) bzw. HF500 (ΔhoxH) mit den angegebenen Plasmiden ohne und in Anwesenheit von 0.5 mM NiCl_2 und 5 mM MgCl_2	77
Abbildung 18. SDS-Gel (a) und Western-Blot (b) der gereinigten SH-Chimären aus HF903 (ΔhoxFU) bzw. HF500 (ΔhoxH).	79
Abbildung 19. Spezifische H_2 -abhängige NAD^+ -Reduktionsaktivitäten der gereinigten SH-Chimären aus den Stämmen HF903 bzw. HF500 ohne und in Anwesenheit von 0.5 mM NiCl_2 und 5 mM MgCl_2	80

Abbildung 20. H ₂ -abhängige Reduktion von NAD ⁺ katalysiert von der heterotetrameren <i>HtSH</i> (grau) und den SH-Varianten bestehend aus <i>ReHoxFU</i> und <i>HtHoxHY</i> (rot) bzw. <i>RoHoxHY</i> (orange) in Gegenwart von verschiedenen Salzen	82
Abbildung 21. H ₂ -abhängige NAD ⁺ -Reduktionsaktivitäten (%) und Anlaufphase (Lagtime/ min) der SH-Chimäre bestehend aus <i>HtHoxHY</i> und <i>ReHoxFU</i> in Anwesenheit von verschiedenen Salzen nach Reinigung und Inkubation unter reduzierenden Bedingungen in einer anaeroben Box (ABox).	83
Abbildung 22. Darstellungen der Untereinheiten- und Kofaktorzusammensetzung der löslichen, NAD ⁺ -reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase aus <i>R. eutropha H16</i>	85
Abbildung 22. SDS-PAGE der verschiedenen, mittels Affinitätschromatographie gereinigten SH-Derivate.....	87
Abbildung 23. Spezifische Aktivitäten der SH-Derivate mit Aminosäureaustauschen in HoxF.	88
Abbildung 24. Fähigkeit der SH-Varianten mit Aminosäureaustauschen in HoxF lithoautotrophes Wachstum mit H ₂ , CO ₂ und O ₂ zu vermitteln.	89
Abbildung 26. Zyklische Voltamogramme der SH-Varianten in Gegenwart von NAD(P) ⁺	94
Abbildung 27. Reduktion der C=C-Doppelbindung von Cyclohexanon in einer gekoppelten Enzymreaktion mit SH ^{E341/S342R} und der EnreduktasePETNR.	95
Abbildung 28. NADPH- sowie O ₂ -abhängige Oktanoxidation durch P450-Monooxygenasen unter Verwendung der Kofaktorregenerationssysteme H ₂ /SH ^{E341A/S342R} sowie Glukose/GDH	96
Abbildung 29. Ausschnitte aus einem multiplen Sequenzvergleich der HoxY-Proteine aus verschiedenen Organismen.....	102
Abbildung 30. Ausschnitte aus dem multiplen Sequenzvergleich von HoxH aus verschiedenen Organismen..	103
Abbildung 31. Verschiedene Ansichten der <i>HtSH</i> Struktur unter reduzierenden Bedingungen (pdb 5xf9).....	106
Abbildung 32. Darstellungen des oxidierten (links) und reduzierten (rechts) [NiFe]-Zentrums in der HoxH-Untereinheit der <i>HtSH</i>	108
Abbildung 33. Darstellung der HoxH-Untereinheit aus <i>R. eutropha</i> (a), <i>R. opacus</i> (b) und <i>H. thermoluteolus</i> (c, d).	115
Abbildung 34. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxF aus verschiedenen Organismen.....	124
Abbildung 35. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxH aus verschiedenen Organismens	125
Abbildung 36. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxU aus verschiedenen Organismens	126
Abbildung 37. Multipler Aminosäuresequenzvergleich der SH-Untereinheit HoxY aus verschiedenen Organismen. s	126
Abbildung 38. EPR-Spektrum der <i>as-isolated</i> (a), mit TCEP/NADH-reduzierten (b) und mit TCEP/NADH/H ₂ -reduzierten (c) <i>HtSH</i>	127

Eidesstattliche Erklärung

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

Berlin, den

Janina Preissler