

„Rolle des C-terminalen Peptids der großen Untereinheit im Reifungsprozess der Hydrogenase 2“

Dissertation

angefertigt an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften),

Institut für Biologie/Mikrobiologie,

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Claudia Thomas

geboren am 30.04.1988 in Merseburg

eingereicht am: 15.09.2016

verteidigt am: 11.01.2017

Gutachter 1: Prof. Dr. R. G. Sawers

Gutachter 2: Prof. Dr. D. H. Nies

Gutachter 3: Prof. Dr. T. Selmer

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert:

Thomas C, Muhr E, Sawers RG. (2015) Coordination of Synthesis and Assembly of a Modular Membrane-Associated [NiFe]-Hydrogenase is Determined by Cleavage of the C - Terminal Peptide. *Journal of Bacteriology*, 197, 2989-2998.

Hartwig S, Thomas C, Krumova N, Quitzke V, Türkowsky D, Jehmlich N, Adrian L, Sawers RG. (2015) Heterologous Complementation Studies in *Escherichia coli* with the Hyp Accessory Protein Machinery from Chloroflexi Provide Insight into [NiFe]-Hydrogenase Large Subunit Recognition by the HypC Protein Family. *Microbiology*, 161, 2204-2219.

Wulff P, Thomas C, Sargent F, Armstrong FA. (2016) How the Oxygen Tolerance of a [NiFe]- Hydrogenase Depends on Quarternary Structure. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21, 121–134.

Soboh B, Lindenstrauss U, Granich C, Javed M, Herzberg M, **Thomas C**, Stripp ST. (2014) [NiFe]-Hydrogenase Maturation in Vitro: Analysis of the Roles of the HybG and HypD Accessory Proteins. *Biochemical Journal*, 464, 169-177.

Soboh B, Stripp ST, Bielak C, Lindenstrauß U, Brausseemann M, Javaid M, Hallensleben M, Granich C, Herzberg M, Heberle J, Sawers RG. (2013) The [NiFe]-Hydrogenase Accessory Chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are Iron- and Carbon Dioxide-Binding Proteins. *FEBS Letters*, 587, 2512-2516.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	v
II. Tabellenverzeichnis.....	vii
III. Abbildungsverzeichnis.....	viii
1. Einleitung.....	1
1.1. Klassifizierung der Hydrogenasen.....	2
1.2. Die [NiFe]-Hydrogenasen.....	3
1.3. [NiFe]-Hydrogenasen in <i>Escherichia coli</i>	3
1.4. Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenase in <i>E. coli</i>	5
1.4.1. Die Genprodukte des <i>hyp</i> -Operons.....	6
1.4.2. Ein Reifungsmodell für [NiFe]-Hydrogenasen.....	8
1.5. Die Reifungsproteine HybG und HypC.....	12
1.6. Der Einfluss des C-terminalen Peptids auf die Reifung der α - und β -Untereinheit ..	12
1.7. Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Geräteliste.....	14
2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Komplettpakete.....	14
2.3. Biologische Materialien.....	15
2.3.1. Bakterienstämme.....	15
2.3.2. Plasmide.....	16
2.3.3. Phage.....	18
2.4. Nährmedien und Medienzusätze.....	18
2.4.1. Lysogeny Broth (LB-Medium) nach Miller 1972.....	18
2.4.2. Terrific Broth (TB-Medium) modifiziert nach Sambrook und Russel 2001.....	19
2.4.3. TGYEP-Medium modifiziert nach Begg <i>et al.</i> 1977.....	19
2.4.4. M9- Minimalmedium modifiziert nach Sambrook und Russell 2001.....	19
2.4.5. Medienzusätze.....	20
2.5. Zellanzucht.....	21
2.5.1. Aerobe Zellanzucht von <i>E. coli</i>	21
2.5.2. Anaerobe Zellanzucht von <i>E. coli</i>	21
2.5.3. Messung des Bakterienwachstums.....	21
2.5.4. Stammhaltung.....	21
2.6. Molekularbiologische Methoden.....	22
2.6.1. Isolierung von Plasmid-DNA.....	22

2.6.2.	Dialyse von DNA-Lösungen Marusyk & Sergeant, 1980.....	22
2.6.3.	DNA-Konzentrationsbestimmung	22
2.6.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis <i>et al.</i> 1986	22
2.6.5.	Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.6.6.	Enzymatische Modifikationen von DNA.....	24
2.6.6.1.	Restriktionsverdau	24
2.6.6.2.	Ligation	24
2.6.7.	Sequenzierung der DNA	25
2.7.	Herstellung und Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> - Stämme	25
2.7.1.	Elektroporation nach Dower <i>et al.</i> 1988.....	25
2.7.1.1.	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	25
2.7.1.2.	Elektroporation.....	25
2.7.2.	CaCl ₂ -Methode nach Sambrook und Russell 2001	25
2.7.2.1.	Herstellung chemokompeter Zellen	25
2.7.2.2.	Transformation chemokompeter Zellen	26
2.7.3.	Phagentransduktion nach Miller, 1972	26
2.7.3.1.	Herstellung des P1-Lysates.....	26
2.7.3.2.	P1-Transduktion.....	26
2.8.	Proteinbiochemische Methoden	27
2.8.1.	Herstellung von zellfreien Extrakten für Proteinreinigung	27
2.8.2.	Proteinreinigung.....	27
2.8.2.1.	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC).....	27
2.8.2.2.	Entsalzen des Proteins mit PD10-Säule.....	28
2.8.2.3.	StrepTactin-Affinitätschromatographie	28
2.8.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry <i>et al.</i> 1951	29
2.8.4.	Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)..	29
2.8.5.	Auftrennung von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen (Native PAGE)	31
2.8.6.	Western Blot	31
2.8.6.1.	Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran.....	31
2.8.6.2.	Detektion der Proteine mittels ECL Reaktion.....	32
2.8.7.	Proteinfärbung mit <i>PAGE Blue Protein staining solution</i> (Thermofisher Scientific).....	32
2.9.	Enzymologische Untersuchungen	32

2.9.1.	Qualitativer Test auf Gasbildung	32
2.9.2.	Hydrogenase-Aktivitätsfärbung nach einer nativen PAGE	32
2.9.3.	Gaschromatographie.....	33
2.10.	Trypsinbehandlung der Proteinproben	33
2.10.1.	Limitierte Trypsinolyse als Nachweis einer Konformationsänderung.....	33
2.10.2.	Sphäroplastenisolation mittels Trypsin.....	34
3.	Ergebnisse	35
3.1.	Interaktionsanalysen des Reifungsproteins HybG und den Reifungsvarianten der großen Untereinheit HybC	35
3.2.	Einfluss des C-terminalen Peptids der großen Untereinheiten von Hyd-1 und Hyd-2 auf die Hydrogenasereifung	38
3.2.1.	Analysen zur Endoprotease-Spezifität bedingt durch das C-terminale Peptid der großen Untereinheiten.....	39
3.2.2.	Untersuchungen zur Aktivierung der Fusionsvariante HybC ^{HyaB} durch die HybG-Hyp-Maschinerie	42
3.3.	Nachweis einer Konformationsänderung der großen Untereinheit nach der Prozessierung des C-terminalen Peptids	45
3.3.1.	Genetisch prozessiertes HybC zeigt eine höhere Stabilität gegenüber der Protease Trypsin	45
3.3.2.	HybG stabilisiert pro-HybC und verhindert den proteolytischen Abbau durch Trypsin	46
3.4.	Einführung von Aminosäureaustauschen in die Reifungsproteine HybG und HypC und deren Auswirkung auf die Reifung der drei Hydrogenasen in <i>E. coli</i>	48
3.4.1.	Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HybG und deren Auswirkung auf die Hydrogenasereifung	49
3.4.2.	Analyse der Auswirkungen der HybG-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität der Deletionsstämmen.....	53
3.4.3.	Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HypC und deren Auswirkung auf die Hydrogenasereifung	54
3.4.4.	Analyse der Auswirkungen der HypC-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität der Deletionsstämmen.....	58
3.5.	Untersuchung der Heterodimerbildung der großen und der kleinen Untereinheit nach der Prozessierung des C-terminalen Peptids	59
3.5.1.	Die Tat-Signalpeptidabspaltung der kleinen Untereinheit erfordert die Prozessierung der großen Untereinheit.....	60
3.5.2.	[NiFe]-Kofaktor freies HybC _{proc} verursacht die Abspaltung des Tat-Signalpeptids von HybO	62
3.5.3.	Das HybC _{proc} -HybO Heterodimer kann ohne den NiFe(CN) ₂ CO-Kofaktor Tat-abhängig über die Membran transportiert werden	64

4. Diskussion.....	69
4.1. Das C-terminale Peptid ist erforderlich für die durch HybG vermittelte Übertragung der Fe(CN) ₂ CO-Gruppe	69
4.2. Die Abspaltung des C-terminalen Peptids verursacht eine Konformationsänderung der großen Untereinheit	70
4.3. Welche Aminosäuren in HybG und HypC sind wichtig für die Erkennung der großen Untereinheiten?	75
4.3.1. Die HybG +GS/-HQL-Variante führte zur Aktivierung von Hyd-3	76
4.3.2. Einfache Aminosäureaustausche in HypC führten nicht zur Aktivierung von Hyd-2	78
4.4. Das C-terminale Peptid von pro-HybC und dessen essentielle Kontrollfunktion hinsichtlich des Tat-abhängigen Membrantransports des Heterodimers (HybC-HybO)	79
4.5. Die essentielle Kontrollfunktion des C-terminalen Peptids im Hydrogenasereifungsmechanismus in einem Modell erklärt.....	82
5. Zusammenfassung.....	86
6. Ausblick.....	87
Literaturverzeichnis	88
Anhang.....	98
Danksagung	102
Lebenslauf.....	103
Eidesstattliche Erklärung	104

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Δ	Deletion
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Benzylviologen (1,1'-Dibenzyl-4,4'-bipyridinium dichlorid)
Cm	Chloramphenicol
CN-	Cyanid-Anion
CO	Kohlenstoffmonoxid
CP	Carbamoylphosphat
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
Da	Dalton (Masseneinheit; 1Da = 1 g mol ⁻¹)
DMF	Dimethylformamid
DNA	" <i>desoxyribonucleic acid</i> ", Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTH	Natriumdithionit
DTT	Dithiothreitol
e-	Elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
FDH-H	Formiatdehydrogenase-H
FHL	Formiat-Hydrogen-Lyase
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes, entionisiertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin

Kb	Kilobasen
<i>kit</i>	englisch für Ausrüstung oder Bausatz
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
min	Minuten
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
<i>N</i> -Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPi	Pyrophosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotation per minute</i>)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
TAT	Twin-Arginin-Transport (<i>twin-arginine translocation</i>)
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität, 1 U = Umsatz von 1 Tmol Substrat je min
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
ZE	Zellextrakt

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die akzessorischen Reifungsproteine von [NiFe]-Hydrogenasen...	7
Tabelle 2: Verwendete Geräte und deren Hersteller	14
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme	15
Tabelle 4: Genotyp und Referenz der verwendeten Plasmide	16
Tabelle 5: Medienzusätze.....	20
Tabelle 6: Spurenelementlösung SLA modifiziert nach Hormann & Andreesen, 1989	21
Tabelle 7: Zusammensetzung der Standard-PCR-Ansätze	23
Tabelle 8: Amplifizierungsprogramme der verwendeten DNA-Polymerasen	23
Tabelle 9: Zusammensetzung der SDS-Gele	30
Tabelle 10: Zusammensetzung der nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gele.....	31
Tabelle 11: Einfluss der verschiedenen HybG-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität.....	54
Tabelle 12: Einfluss der verschiedenen HypC-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität.....	59
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide (Primer).....	98

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase von <i>Desulfovibrio gigas</i>	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Aufbau und Lokalisation der drei charakterisierten [NiFe]-Hydrogenasen in <i>E. coli</i>	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Organisation der <i>hyp</i> - und <i>hyb</i> -Gene im Genom von <i>E. coli</i>	7
Abbildung 4: Reifungsmodell der Hyd-2 aus <i>E. coli</i>	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der HybC Reifungsvarianten.....	36
Abbildung 6: Nachweis einer Komplexbildung von pro-HybC-HybG und HybG-HypD mittels Nativgel und anschließendem Western Blot.....	37
Abbildung 7: Schematische Darstellung der HyaB- und HybC-Varianten.....	38
Abbildung 8: Einfluss des Austausches der HyaB-HybC-C-Termini hinsichtlich der Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität.....	39
Abbildung 9: Einfluss einer Deletion des <i>hyaD</i> -Gens auf die C-Termini Austauschvarianten hinsichtlich der Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität.....	41
Abbildung 10: Einfluss einer Deletions des <i>hybD</i> -Gens, auf die C-Termini Austauschvarianten hinsichtlich der Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität.....	42
Abbildung 11: Analyse der HybG-abhängigen Aktivierung von den Hydrogenase-Fusionsvarianten.....	43
Abbildung 12: Nachweis einer von HybG und HypC abhängigen Reifung der pro-HyaB ^{HybC} -Variante.....	44
Abbildung 13: SDS-PAGE-Analyse der limitierten Proteolyse von gereinigten pro-HybC und HybC _{proc}	46
Abbildung 14: SDS-PAGE Analyse der limitierten Proteolyse von pro-HybC + HypC und pro-HybC + HybG.....	47
Abbildung 15: Primärsequenzvergleich von HypC und HybG aus <i>E. coli</i> (E.c.) und HypC aus <i>D. mccartyi</i> (D.m.) und aus <i>T. kodakarensis</i> (T.k.).....	48
Abbildung 16: Quartärstruktur des HypD-HypC Komplexes aus <i>T. kodakarensis</i> (PDB:3VYR).....	49
Abbildung 17: Tertiärstruktur des Reifungsproteins HybG.....	50
Abbildung 18: Darstellung der unterschiedlich konstruierten HybG Varianten.....	51
Abbildung 19: Einfluss verschiedener Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HybG und deren Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität.....	52
Abbildung 20: Tertiärstruktur des Reifungsproteins HypC aus <i>E. coli</i> (PDB:2OT2).....	55
Abbildung 21: Darstellung der unterschiedlich konstruierten HypC-Varianten.....	56
Abbildung 22: Einfluss verschiedener Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HypC und deren Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität.....	58

Abbildung 23: Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zellextrakte verschiedener Hyd-2 Deletionsstämme unter denaturierenden Bedingungen.....	61
Abbildung 24: Vergleich zwischen den verschiedenen HybC Reifungsformen und deren unterschiedlichen Einfluss auf die Reifung der kleinen Untereinheit (pre-HybO) in einem <i>hypF</i> -Deletionshintergrund mittels Western Blot (A) und Nativ-PAGE (B) Analysen.	63
Abbildung 25: Vergleich zwischen den verschiedenen HybC Reifungsformen und deren unterschiedlichen Einfluss auf die Reifung der kleinen Untereinheit (pre-HybO) in einem <i>hybG</i> -Deletionshintergrund.....	64
Abbildung 26: Überprüfung der genetisch prozessierten HybC _{proc} -Variante hinsichtlich ihrer Membranlokalisation.....	66
Abbildung 27: Sphäroplasten Isolation mit anschließendem Trypsinverdau als Nachweis für die korrekte Membranlokalisation der genetisch prozessierten HybC-Variante.....	67
Abbildung 28: Primärsequenzvergleich der C-Termini von HyaB (Hyd-1), HybC (Hyd-2) und HycE (Hyd-3) aus <i>E. coli</i>	71
Abbildung 29: Theoretisch erstellte Tertiärstruktur der großen Untereinheit HybC _{proc} mit den Trypsinschnittstellen.....	75
Abbildung 30: Tertiärstruktur Alignment zwischen HypC und Wildtyp HybG und der HybG +GS/-HQL Variante.	77
Abbildung 31: Modell zur Veranschaulichung der Kontrollfunktion des C-terminalen Peptids im Hyd-2 Reifungsmechanismus.	84
Abbildung 32: SDS-PAGE Analyse der limitierten Proteolyse mittels Chymotrypsin von pro-HybC und HybC _{proc}	100
Abbildung 33: SDS-PAGE Analyse der limitierten Proteolyse mittels GluC von pro-HybC und HybC _{proc}	101
Abbildung 34: Sequenzvergleich zwischen verschiedenen HypCs aus der HypC-Familie. .	101

1. Einleitung

Wasserstoff (H₂) wird als „Öl“ der Zukunft gehandelt und viele Firmen in der Automobilindustrie und der Energieversorgung führen umfangreiche Forschungen zur Wasserstoffgewinnung durch. Momentan wird Wasserstoff unter anderem durch Dampfreformation unter hohem Druck und hohen Temperaturen, durch partielle Oxidation unter Einsatz von Erdöl, sowie durch Elektrolyse unter Nutzung von Elektrizität, hergestellt. Nachteile dieser Verfahren sind zum einen, dass Wasserstoff unter Verwendung fossiler Brennstoffe entsteht und zum anderen Treibhausgase, wie CO₂, als Nebenprodukte der industriellen Gewinnung von Wasserstoff anfallen.

Neuere und vor allem ökologischere Methoden der Wasserstoffgewinnung beschäftigen sich mit Bakterien und Algen (Melis und Happe, 2001), die unter bestimmten Bedingungen Wasserstoff produzieren können. Obwohl diese Methoden ökologischer sind und keine fossilen Brennstoffe mehr benötigt werden, sind diese wirtschaftlich kaum durchsetzbar. Die Kultivierung von Bakterien bzw. Algen ist mit hohen Investitions- und Betriebskosten verbunden. Es wird geschätzt, dass jährlich 150 Millionen Tonnen Wasserstoff durch Mikroorganismen produziert werden (Thauer *et al.*, 2010). Allerdings sind Wasserstoffproduzierer und -verwerter eng miteinander vergesellschaftet. Dadurch wird der Wasserstoff mittels Hydrogenase-synthetisierenden methanen Archaea, sulfatreduzierenden oder acetogenen Bakterien sofort wieder verbraucht (Conrad, 1996). Durch den relativ geringen Wasserstoffausstoß in der Atmosphäre bestehen noch viele Probleme für die ökologisch und auch wirtschaftlich nutzbare Wasserstoffproduktion. Eine Möglichkeit die aufwendige und kostspielige Kultivierung der Bakterien zu umgehen, wäre eine Anreicherung und Isolierung der zur H₂-Oxidation und -Produktion erforderlichen Hydrogenasen.

Hydrogenasen katalysieren die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff zu Protonen und Elektronen (Adams *et al.* 1980; Vignais und Colbeau, 2004) (Gleichung 1).



Zukünftig könnten die aktiven Zentren dieser Enzyme, als effiziente zum Nachbau geeignete alternative Modelle zur Energiegewinnung genutzt werden (Flanagan *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2005; Tard *et al.*, 2005; Darensbourg *et al.*, 2003).

Die Hydrogenasen wurden erstmals 1931 durch die beiden Wissenschaftler Marjory Stephenson und Leonard Stickland benannt. Die Enzyme sind in den drei Domänen des Lebens vertreten, den Archaea, Bacteria und Eukarya (Bowman *et al.*, 2013; Horner *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 1980). Aus chemischer Sicht werden Hydrogenasen den

Oxidoreduktasen zugeordnet und sind wichtige Schlüsselenzyme wasserstoffmetabolisierender Mikroorganismen (Thauer *et al.*, 2010; Schwartz und Friedrich, 2003).

Viele Mikroorganismen sind Wasserstoffproduzenten. Meist wird Wasserstoff aus der Vergärung von organischen Makromolekülen (z. B. aus Kohlenhydraten) produziert. Der Wasserstoffmetabolismus findet bei zahlreichen fermentativen Mikroorganismen nur unter Sauerstoffausschluss statt. In diesen obligat oder fakultativ anaeroben Bakterien werden die während der Gärung anfallenden Reduktionsäquivalente durch Oxidation regeneriert. Die Hydrogenasen können diese Reduktionsäquivalente auf die alleinigen Elektronenakzeptoren, die Protonen, übertragen. Beispiele hierfür sind Arten der Gattungen *Clostridium*, *Thermotoga* und *Escherichia*.

Umgekehrt sind Mikroorganismen durch Hydrogenasen in der Lage molekularen Wasserstoff als alleinigen Elektronendonator zur Reduktion der terminalen Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Fumarat, Sulfat oder Kohlendioxid zu verwenden. Beispiele hierfür sind Arten der Gattungen *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Desulfovibrio* und *Methanobacterium*. Die Hydrogenasen sind zumeist membrangebunden und Bestandteil einer energiekonservierenden Atmungskette. Dabei werden die durch die Wasserstoffoxidation entstehenden Elektronen über den Chinonpool der Atmungskette bereitgestellt.

1.1. Klassifizierung der Hydrogenasen

Hydrogenasen gehören zu einer sehr heterogenen Enzymklasse, die sich in der strukturellen Zusammensetzung der Metallatome ihres aktiven Zentrums unterscheiden. Basierend auf diesen Metallatomen werden die Hydrogenasen in [Fe]-Hydrogenasen, [FeFe]-Hydrogenasen und [NiFe]-Hydrogenasen unterteilt. Alle drei Klassen scheinen weder strukturell noch phylogenetisch verwandt zu sein (Vignais *et al.*, 2001).

Die [Fe]-Hydrogenasen enthalten einen Fe-haltigen Kofaktor mit zwei gebundenen CO-Liganden (Shima *et al.*, 2005) und kommen nur in einigen methanogenen Archaeen vor (Korbas *et al.*, 2006). Das aktive Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen enthält zwei Fe-haltige Kofaktoren: ein [4Fe-4S]-Kluster gekoppelt mit zwei Eisen-Ionen. Beide Eisen-Ionen binden einen CN- und einen CO-Liganden. Diese Art des aktiven Zentrums nennt man H-Kluster. Die sauerstoff-sensitiven Hydrogenasen, die ein H-Kluster tragen, kommen vermehrt in strikt anaeroben Mikroorganismen vor (Peters *et al.*, 2015). Da der Fokus dieser Arbeit auf den [NiFe]-Hydrogenasen liegt, wird im Folgenden speziell auf diese Gruppe der Hydrogenasen eingegangen.

1.2. Die [NiFe]-Hydrogenasen

Die Mehrheit der Hydrogenasen gehören den [NiFe]-Hydrogenasen an. [NiFe]-Hydrogenasen sind verhältnismäßig sauerstofftolerant und kommen in den Domänen der Bacteria und Archaea vor (Peters *et al.*, 2015; Vignais und Billoud, 2007; Vignais *et al.*, 2001). Die [NiFe]-Hydrogenasen bilden ein α - β -Heterodimer, welches aus der katalytischen großen α -Untereinheit, inklusive dem NiFe(CN)₂CO-Kofaktor, und der kleinen [FeS]-Kluster tragenden β -Untereinheit, besteht. Die kleine Untereinheit vermittelt über die [FeS]-Kluster einen Elektronentransport vom bzw. zum aktiven Zentrum der großen Untereinheit (Vignais und Billoud, 2007). Die Struktur des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenasen konnte mittels Kristallstrukturanalyse (Volbeda *et al.*, 2013; Higuchi *et al.*, 1997; Volbeda *et al.*, 1995) und Infrarotspektroskopie (Bagley *et al.*, 1995) gelöst werden. Wie in Abbildung 1 dargestellt, besteht das bimetallene aktive Zentrum aus einem Nickel- und einem Eisenatom und ist in der großen Untereinheit lokalisiert. Vier hoch konservierte Cysteine an den Positionen 61 und 64, sowie C-terminal lokalisierte Cysteine an den Positionen 546 und 549 koordinieren den [NiFe]-Kofaktor (Volbeda *et al.*, 1995; Menon *et al.*, 1994). Zwei Thiolate wirken als Brückenliganden zwischen dem Eisen- und dem Nickelatom (Bagley *et al.*, 1994). Der molekulare Wasserstoff wird heterolytisch am Nickelatom gespalten (Ogata *et al.*, 2015; Armstrong und Albracht, 2005; Volbeda *et al.*, 2005). An dem Eisenatom des katalytischen Zentrums sind die drei diatomaren Liganden gebunden, wobei es sich um zwei CN- und eine CO-Gruppe handelt (van der Spek *et al.*, 1996, Pierik *et al.*, 1999). Diese halten die Oxidationsstufe des Eisens niedrig und erleichtern somit die Reaktion am Nickel.

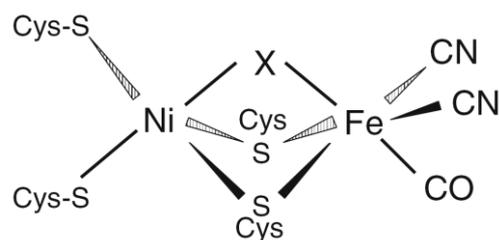


Abbildung 1: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* (nach Volbeda *et al.*, 1995; Happe *et al.*, 1997; Ogata *et al.*, 2015). CN-Cyanid Liganden, CO-Kohlenstoffmonoxid Ligand, Cys-Cystein, Ni-Nickel, Fe-Eisen, X-Reaktionszentrum.

1.3. [NiFe]-Hydrogenasen in *Escherichia coli*

Unter anaeroben Kultivierungsbedingungen synthetisiert *E. coli* drei aktive, membranständige [NiFe]-Hydrogenasen, welche durch die Operons *hya* (Hydrogenase-1), *hyb* (Hydrogenase-2) und *hyc* (Hydrogenase-3) kodiert werden (Menon *et al.*, 1994; Sauter *et al.*, 1992; Menon *et al.*, 1990; Böhm *et al.*, 1990). Eine vierte Hydrogenase, welche aufgrund von Sequenzhomologien zur Hydrogenase-3 (Hyd-3) im *E. coli* Genom entdeckt

wurde (Andrews *et al.*, 1997), wird durch das *hyf*-Operon kodiert. Diese Hydrogenase konnte bisher nicht als aktiver Enzymkomplex nachgewiesen werden (Self *et al.*, 2004).

Die Hydrogenase-1 (Hyd-1) und Hydrogenase-2 (Hyd-2) sind wasserstoffoxidierende Enzyme mit einem in das Periplasma gerichteten aktiven Zentrum (Ballantine und Boxer, 1985, Abbildung 2). Die Wasserstoffoxidation der Hyd-1 und Hyd-2 dient einerseits dem Aufbau einer Protonen-Motorischen-Kraft (*pmf*, *proton motive force*) an der Cytoplasmamembran und andererseits der Bereitstellung von Elektronen für den Chinon-pool. Hyd-1 weist im Vergleich zu Hyd-2 eine geringere Aktivität mit künstlichen Elektronenakzeptoren auf (Jacobi *et al.*, 1992, Sawers und Boxer, 1986). Hyd-1 wird unter anaeroben Bedingungen in der stationären Wachstumsphase synthetisiert (Atlung *et al.*, 1997). Die Sequenz des für die Hyd-1 kodierenden *hyaABCDEF*-Operons wurde erstmals durch Menon *et al.*, 1990 identifiziert. Es kodiert für die kleine Untereinheit (HyaA), die große Untereinheit (HyaB), ein membranintegriertes *b*-Typ Cytochrom (HyaC), die Hyd-1 spezifische Protease (HyaD) und zwei weitere Proteine mit noch ungeklärter Funktion (HyaE, HyaF) (Abbildung 2). Hyd-1 ist tolerant gegenüber Sauerstoff (Lukey *et al.*, 2010) und wird mit einer Cytochrom Oxidase koexprimiert (Brøndsted und Atlung, 1996). Diese Erkenntnisse weisen auf eine wichtige Funktion der Hyd-1 in der Übergangsphase zwischen aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen in *E. coli* hin. Die Kristallstrukturanalysen von Volbeda *et al.*, 2012 zeigen zwei große und zwei kleine Untereinheiten. Nach Volbeda *et al.*, 2013 wurde zudem ein Dimer aus zwei Trimeren identifiziert. Hyd-1 scheint demnach ein Homodimer, bestehend aus zwei kleinen, zwei großen Untereinheiten und zwei Cytochrom-*b*-Untereinheiten zu bilden.

Hyd-2 ist im Gegensatz zu der sauerstofftoleranten Hyd-1 eine sauerstoffsensitive Hydrogenase (Lukey *et al.*, 2010) und wird in der exponentiellen Wachstumsphase mit Glycerol als Kohlenstoffquelle und Fumarat als Elektronenakzeptor maximal synthetisiert (Ballantine und Boxer, 1986; Ballantine und Boxer, 1985). Glycerol wird durch *E. coli* zur anaeroben Atmung oxidiert und kann nicht durch Gärung verwertet werden. Dabei koppelt Hyd-2 die Wasserstoffoxidation an den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten (Pinske *et al.*, 2015). Hyd-2 wird durch das *hybOABCDEFG*-Operon kodiert (Sargent *et al.*, 1998; Menon *et al.*, 1994). Die Gene kodieren für die kleine Untereinheit (HybO), eine elektronentransferierende Untereinheit (HybA), eine membranintegrierte Untereinheit (HybB), die große Untereinheit (HybC), die Hyd-2 spezifische Protease (HybD) und die Hyd-2 spezifischen Reifungsproteine (HybE, HybF und HybG) (Abbildung 2). Die Genabfolge und die vorhergesagte Struktur zeigen große Unterschiede zu der sauerstofftoleranten Hyd-1 auf. Es bestehen deutlich höhere Ähnlichkeiten zu der strikt anaerob vorkommenden Hmc-Hydrogenase aus *D. vulgaris* (Dolla *et al.*, 2000).

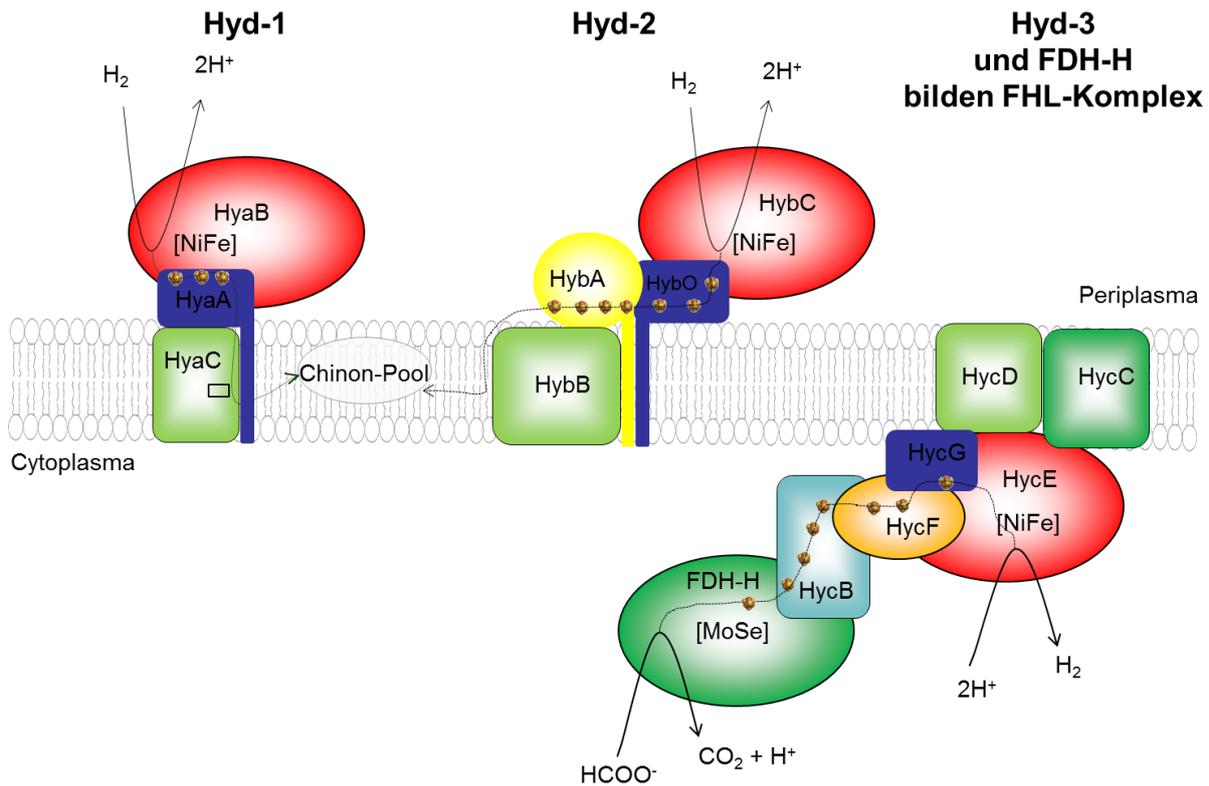


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Aufbau und Lokalisation der drei charakterisierten [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli*. Hyd-1 und Hyd-2 sind wasserstoffoxidierende Enzyme, deren jeweiliges aktives Zentrum in der großen Untereinheit auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Die Hyd-3 reduziert Protonen zu H_2 und bildet zusammen mit der FDH-H den FHL-Komplex auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Die großen Untereinheiten sind rot dargestellt. Die kleinen Untereinheiten sind lila gefärbt. Die kleinen gelb-orangen Kugeln stellen Eisen-Schwefel-Kluster in den Elektronen-transferierenden Untereinheiten der Hydrogenasen dar (modifiziert nach Sargent 2016).

Im Gegensatz zu Hyd-1 und Hyd-2 produziert Hyd-3 Wasserstoff. Die Hyd-3 wird durch das *hycABCDEFGHI*-Operon kodiert (Rossmann *et al.*, 1995; Böhm *et al.*, 1990). Zusammen mit der Formiatdehydrogenase-H (FDH-H) bildet Hyd-3 den Formiat-Hydrogen-Lyase (FHL)-Komplex (Böhm *et al.*, 1990). Wobei die FDH-H während der gemischten Säuregärung Formiat zu zwei Protonen, zwei Elektronen und CO_2 oxidiert. Die Elektronen werden in einem nächsten Schritt auf die Hyd-3 übertragen. Hyd-3 katalysiert die Reduktion von zwei Protonen durch die zwei übertragenen Elektronen zu Wasserstoff. Diese Reaktion dient der Entsorgung der Protonen und wirkt somit aufgrund der Lage des aktiven Zentrums der Hyd-3 (Abbildung 2) der Ansäuerung des Cytoplasmas entgegen (Sawers und Clark, 2004).

1.4. Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenase in *E. coli*

Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen ist von den auf dem *hyp*-Operon kodierten akzessorischen Proteinen abhängig. Die Produkte des *hyp*-Operons sind notwendig für die Synthese und Insertion des $NiFe(CN)_2CO$ -Kofaktors in das aktive Zentrum der großen Untereinheit (Pinske und Sawers, 2014; Forzi und Sawers, 2007; Böck *et al.*, 2006). Zuerst

erfolgt die Synthese und Insertion der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe und anschließend die Insertion des Nickels in das aktive Zentrum (Winter *et al.*, 2005; Magalon und Böck, 2000a; Magalon und Böck, 2000b; Maier und Böck, 1996; Menon und Robson, 1994). Nach der Vervollständigung des aktiven Zentrums der großen Untereinheit erfolgt eine C-terminale Prozessierung dieser durch eine Hydrogenase-spezifische Endoprotease (Böck *et al.*, 2006). Die Reifungsvorgänge der [NiFe]-Hydrogenasen wurden am besten in den Modellorganismen *E. coli* und *R. eutropha* untersucht. Die Komplexität des Reifungsprozesses wird anhand der Befunde mit dem *E. coli*-System geschildert.

1.4.1. Die Genprodukte des *hyp*-Operons

Die Genprodukte des *hyp*-Operons und ergänzende akzessorische Proteine sind essentiell für die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen. *E. coli* exprimiert sechs sogenannte *hyp*-Gene (**hydrogenase pleiotropic; hypA-F**) (Abbildung 3), deren Genprodukte die Hydrogenaseaktivität pleiotrop beeinflussen. Das bedeutet, eine Deletion einzelner *hyp*-Gene führt zu einem Verlust der Hydrogenaseaktivität. Mit Ausnahme von *hypF* sind die *E. coli* *hyp*-Gene in einem Operon lokalisiert. Das *hypF*-Gen liegt in inverser Orientierung 13 kb stromaufwärts des *hyp*-Operons (Maier *et al.*, 1993). In den Organismen *Bradyrhizobium japonicum* (Olson und Maier, 1997), *Rhizobium leguminosarum* (Rey *et al.*, 1993), *Ralstonia eutropha* (Dernedde *et al.*, 1993) und *Azotobacter vinelandii* (Chen und Mortenson, 1992) ist das *hypF*-Gen Bestandteil des *hyp*-Operons. Die Genprodukte von *hypA* und *hypC* sind hauptsächlich an der Reifung der Hyd-3 in *E. coli* beteiligt. In *E. coli*, wie auch in anderen Organismen, existieren orthologe Proteine, die eine entsprechende Funktion im Reifungsablauf für die Hyd-1 und Hyd-2 (Menon *et al.*, 1994) übernehmen. Dabei handelt es sich um die Genprodukte von *hybF* und *hybG* (Abbildung 3). In allen bisher untersuchten Mikroorganismen mit [NiFe]-Hydrogenasen sind die *hyp*-Genprodukte für die Reifung der großen Untereinheit konserviert (Böck *et al.*, 2006).

hyp-Operon (Hyd-1, Hyd-2 und Hyd-3)

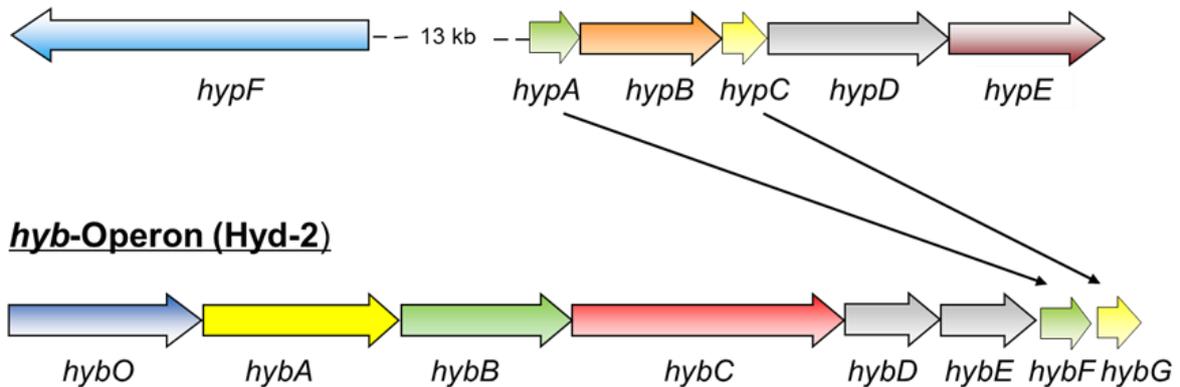


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Organisation der *hyp*- und *hyb*-Gene im Genom von *E. coli*. Die farbigen Pfeile symbolisieren die Gene und ihre Orientierung im Genom. Zu erkennen ist die Organisation der Gene *hypABCDE* als Operon und die inverse Orientierung des *hypF*-Gens, 13 kb stromaufwärts des *hyp*-Operons. Die Gene *hybF* und *hybG* sind die homologen Gene zu *hypA* bzw. *hypC*, und maßgeblich an der Reifung der Hyd-2 beteiligt sind.

In Tabelle 1 sind die Produkte der *hyp*-Gene und deren Funktion bei der Hydrogenasereifung aufgeführt. Zusätzlich wird auf die Spezifität der Proteine an der Reifung einzelner Hydrogenasen hingewiesen.

Tabelle 1: Übersicht über die akzessorischen Reifungsproteine von [NiFe]-Hydrogenasen.

Protein	MG [kDa]	Funktion	Referenz
HypA	12,8	Nickelinsertion in Prä-HycE	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
HypB	31,6	Verbesserung der Kinetik während der Nickelinsertion, GTPase	Cheng <i>et al.</i> , 2013; Maier und Böck, 1996; Rey <i>et al.</i> , 1994; Wu und Mandrand-Berthelot, 1986
HybF	12	Zink enthaltene Protein, welches beim Nickeleinbau in das aktive Zentrum der Hyd-2 beteiligt ist	Blokesch <i>et al.</i> , 2004
HypC	9,7	Interaktion mit HypD, Übertragung der Fe(CN) ₂ CO-Gruppe auf HycE und HyaB	Stripp <i>et al.</i> , 2013; Albareda <i>et al.</i> , 2013; Soboh <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2007; Watanabe <i>et al.</i> , 2007; Magalon und Böck, 2000a; Drupal und Böck, 1998

HybG	8,9	Interaktion mit HypD, Übertragung der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe auf HyaB und HybC	Soboh <i>et al.</i> , 2014; Soboh <i>et al.</i> , 2013; Butland <i>et al.</i> , 2006; Blokesch <i>et al.</i> , 2001
HypD	41,3	Proteininteraktion mit HypC oder HybG, Vorassemblierung der CN^- - bzw. CO -Liganden auf Fe	Soboh <i>et al.</i> , 2014; Stripp <i>et al.</i> , 2013; Soboh <i>et al.</i> , 2012; Watanabe <i>et al.</i> , 2007; Blokesch und Böck, 2006; Butland <i>et al.</i> , 2006; Blokesch <i>et al.</i> , 2004
HypE	35	ATP-abhängige Dehydratisierung des Carbamoylrestes, ATPase	Stripp <i>et al.</i> , 2015; Tominaga <i>et al.</i> , 2013; Shomura und Higuchi, 2012; Rangarajan <i>et al.</i> , 2008; Blokesch <i>et al.</i> , 2004; Reissmann <i>et al.</i> , 2003
HypF	82,1	carbamoylphosphatabhängige ATP-Hydrolyse, Transfer des Carbamoylrestes von Carbamoylphosphat über ein Carbamoyladenylat-Intermediat auf HypE	Petkun <i>et al.</i> , 2011; Reissmann <i>et al.</i> , 2003; Paschos <i>et al.</i> , 2002

1.4.2. Ein Reifungsmodell für [NiFe]-Hydrogenasen

Neben den Produkten der *hyp*-Gene sind weitere Proteine bekannt, die an der Reifung der Hydrogenasen beteiligt sind. Die Reifung der drei [NiFe]-Hydrogenasen kann in fünf wesentliche Teilschritte untergliedert werden (Böck *et al.*, 2006):

1. Synthese der Apoenzyme.
2. Synthese der diatomaren Liganden (CO und CN^-) und deren Assoziation mit dem zentralen Eisenatom.
3. Aktive Aufnahme von Nickel in die Zelle und anschließende Insertion in das aktive Zentrum, nachdem der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Komplex inseriert wurde.
4. Proteolytische Prozessierung des C-Terminus durch hydrogenasespezifische Proteasen.
5. Dimerisierung der kleinen und großen Untereinheit und deren Membranassoziation.

Die Expression des Gens der kleinen Untereinheiten erfolgt ko-transkriptionell mit dem der großen Untereinheiten. Pinske und Sawers, 2012 konnten ErpA und IscA als essentielle

akzessorische Proteine für die [FeS]-Kluster Insertion in die kleine Untereinheit identifizieren. Deren Synthese, die Membranassoziation und der gemeinsame TAT-abhängige Membrantransport sind essentiell für die Hydrogenaseaktivität (Pinske und Sawers, 2011).

Neben der ko-transkriptionellen Genexpression der Untereinheiten, findet die Assemblierung des Kofaktors durch die Genprodukte der *hyp*-Gene statt (Abbildung 4). In dem aktuellen Reifungsmodell ist der Ursprung der diatomaren Liganden des aktiven Zentrums bisher nur für die CN-Liganden geklärt. Diese werden aus Carbamoylphosphat synthetisiert (Paschos *et al.*, 2001). Die Synthese von Carbamoylphosphat erfolgt durch die Carbamoylphosphat-Synthetase aus Hydrogencarbonat, Glutamin, zwei ATP und Wasser (Gleichung 2). Das aktive Enzym wird durch die *carAB*-Gene kodiert. Eine Deletion in den *carAB*-Genen führt zum Verlust der Hydrogenaseaktivität, da kein Carbamoylphosphat (CP) gebildet werden kann (Paschos *et al.*, 2001; Barrett *et al.*, 1984).



Strukturelle und biochemische Analysen zeigen, dass das Reifungsprotein HypF zunächst Carbamoylphosphat an der Acylphosphatase Domäne hydrolisiert, wodurch ein reaktives Carbamat entsteht, welches sofort mit ATP reagiert, um in Carbamoyladenylat und Pyrophosphat umgewandelt zu werden (Shomura und Higuchi, 2012). HypF interagiert mit einem weiteren Reifungsprotein, HypE (Rangarajan *et al.*, 2008). Diese Interaktion ermöglicht eine schnelle Reaktion des durch HypF entstandenen Carbamoyladenylat mit dem am HypE C-Terminus lokalisierten Cystein. Dabei entsteht eine S-Carbamoyl modifizierte HypE Variante (Tominaga *et al.*, 2013; Shomura und Higuchi, 2012) (Abbildung 4, Teilschritt 1). HypE hat eine Carbamoyldehydrataseaktivität und nutzt ATP Hydrolyse für die Umwandlung des Carbamoylrestes in ein gebundenes Thiocyanat (Tominaga *et al.*, 2013) oder wie neuere Studien postulieren, möglicherweise in ein Isothiocyanat (Stripp *et al.*, 2015) (Abbildung 4, Teilschritt 2). Das mit (Iso)thiocyanat beladene HypE kann nun CN⁻ an Fe (II) abgeben (Abbildung 4, Teilschritt 3). Die Übertragung der CN-Liganden ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Bürstel *et al.*, 2012 postulierten, dass der CN-Liganden vor dem CO-Ligand an das Fe gebunden wird. Infrarotspektroskopieanalysen unterstützen in neueren Studien von Stripp *et al.*, 2014 die Theorie, dass der CO-Ligand zuerst an ein Fe gebunden wird und dann folgt die Bindung der CN-Liganden. Dabei wird entweder CO über ein Fe-Ion an HypD gebunden oder CO₂ wird an ein Fe-Ion gebunden, um dann durch einen CO₂-Reduktase-ähnlichen Mechanismus (Jeoung und Dobbek, 2007), z. B. durch HypD reduziert zu werden (Abbildung 4, Teilschritt 4). Es wird vermutet, dass das CO₂ von HypC (Hyd-1 und Hyd-3) bzw. HybG (Hyd-1 und Hyd-2) an HypD geliefert wird (Soboh *et al.*, 2013). Weitere Studien sind notwendig, um die Herkunft des CO-Liganden vollends

aufzuklären. HypD interagiert mit dem Hyd-2 spezifischen Protein HybG (alternativ für Hyd-3: HypC). Beide sind mit der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe assoziiert (Soboh *et al.*, 2013; Bürstel *et al.*, 2012; Blokesch *et al.*, 2004). Die Cysteine 41, 69 und 72 von HypD sind essentiell für die Bindung bzw. die Synthese der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe (Bürstel *et al.*, 2012; Soboh *et al.* 2012).

Nach der Insertion der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe des Kofaktors in das pro-HybC Apoprotein (Abbildung 4, Teilabschnitt 5) kann die Nickelinsertion durch die hydrogenasespezifischen Proteine HybF (Hyd-1 und Hyd-2: Blokesch *et al.*, 2004; Hube *et al.*, 2002) oder HypA (Hyd-3: Atanassova und Zamble, 2005; Jacobi *et al.*, 1992) in die jeweiligen großen Untereinheiten erfolgen. Zusätzlich sind die GTPase HypB (Watanabe *et al.*, 2015; Leach *et al.*, 2005) und die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPIase) SlyD an der Nickelinsertion beteiligt (Abbildung 4, Teilabschnitt 5). Ein *slyD*-Deletionsstamm zeigt in der stationären Wachstumsphase keine Hydrogenaseaktivität. Es wurde gezeigt, dass ein SlyD-defizienter Stamm unter hohen Nickelkonzentrationen Hydrogenaseaktivität rekonstituieren kann (Pinske *et al.*, 2015). Das unterstützt wiederum die Beobachtung, dass SlyD mit HypB interagiert (Zhang *et al.*, 2005) und die Nickelfreisetzung aus HypB fördert (Leach *et al.*, 2007). HypB kann durch erhöhte Nickelkonzentration im Medium ebenfalls ersetzt werden (Hartwig *et al.*, 2015, Maier *et al.*, 1993, Waugh und Boxer, 1986). Die Kristallstruktur von HypB (Gasper *et al.*, 2006) bestätigt die frühere Hypothese (Maier und Böck, 1996), dass HypB als GTP-regulierter Nickellieferant für Hydrogenasen fungiert.

Nach dem Einbau von Nickel in das katalytische Zentrum erfolgt die Prozessierung am C-Terminus der großen Untereinheit durch eine hydrogenasespezifische Endoprotease (Böck *et al.*, 2006). Die Protease spaltet den C-Terminus vier Aminosäuren in C-terminale Richtung entfernt von dem vierten Cystein (Cys 549), welches den Kofaktor koordiniert (Rossmann *et al.*, 1994; Sorgenfrei *et al.*, 1993; Menon *et al.*, 1993). Die Protease HyaD prozessiert den C-Terminus der großen Untereinheit der Hyd-1 (HyaB) und HybD den der Hyd-2 (HybC) (Abbildung 4, Teilabschnitt 6) um 15 Aminosäuren (Menon *et al.*, 1993). Die hydrogenasespezifische Protease Hycl prozessiert den C-Terminus der Hyd-3 um 32 Aminosäuren (Rossmann *et al.*, 1994). Nach Abschluss der Kofaktorinsertion und der Prozessierung findet eine Heterodimerbildung zwischen großer und kleiner Untereinheit statt (Abbildung 4, Teilabschnitt 7). Das an der kleinen Untereinheit (HybO), N-terminal lokalisierte Tat-Signalpeptid ist für den Tat-abhängigen Membrantransport des Heterodimers essentiell. Nur das korrekt gefaltete und den [NiFe]-Kofaktor tragende Heterodimer wird mittels dem Tat-System über die Membran transportiert (Jack *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2004; Dubini und Sargent, 2003). Weitere Untereinheiten werden separat über die Membran transportiert (Abbildung 4, Teilabschnitt 8).

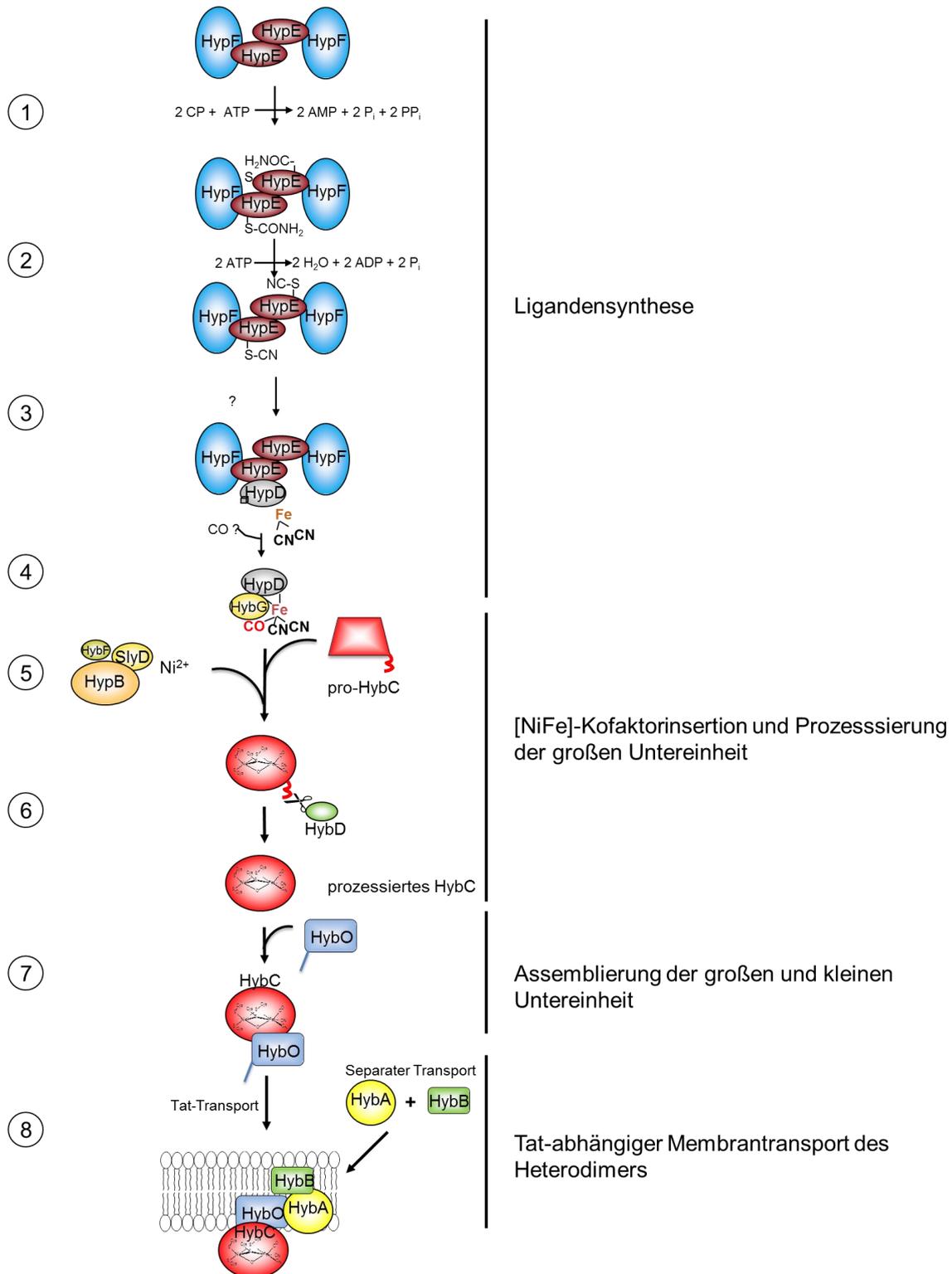


Abbildung 4: Reifungsmodell der Hyd-2 aus *E. coli*. Dargestellt sind die Proteine mit den wichtigsten Reaktionen: 1. ATP-verbrauchende Transcarbamoylierung des Carbamoylphosphates (CP); 2. ATP- verbrauchende Dehydratisierung des Thiocarboximids zu Thiocyanat durch HypE; 3. Noch mechanistisch unverstandene CO- und Cyanidübertragung auf HypD; 4. HypD bildet ein Komplex mit HybG zur Übertragung der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe; 5. Insertion des $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ Kofaktors durch HybG-HypD und des Nickels durch HypB, SlyD HypF in die große Untereinheit (rot); 6. Prozessierung der großen Untereinheit durch die Hyd-2 spezifische Protease HybD; 7. Assemblierung der großen und kleinen Untereinheit als Heterodimer; 8. Tat-abhängiger Membrantransport von HybC-HybO, die Untereinheiten HybA und HybB werden separat transportiert.

1.5. Die Reifungsproteine HybG und HypC

HybG und HypC sind wichtige Reifungsproteine, die die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe des Kofaktors an die Apoproteine, pro-HyaB (Hyd-1), pro-HybC (Hyd-2) und pro-HycE (Hyd-3), liefern (Bürstel *et al.*, 2012; Soboh *et al.*, 2012; Böck *et al.*, 2006; Blokesch und Böck, 2002; Blokesch *et al.*, 2001). Neuere Studien zeigen, dass HypC und HybG möglicherweise an der lange unbekanntem Synthese des CO-Liganden beteiligt sind. Dabei wurde ein an HypC und HybG gebundener CO_2 -Ligand via Infrarotspektroskopie identifiziert (Soboh *et al.*, 2013; Soboh *et al.*, 2012). Es wurde bereits nachgewiesen, dass HypC mit dem Apoprotein der großen Untereinheit der Hyd-3, pro-HycE, aber nicht mit der prozessierten HycE Variante, interagiert (Magalon und Böck, 2000a; Magalon und Böck, 2000b; Drapal und Böck, 1998). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in *R. eutropha* gemacht (Winter *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004). HybG überträgt die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe auf die Apoproteine der Hyd-1 (pro-HyaB) und Hyd-2 (pro-HybC) (Soboh *et al.*, 2013; Butland *et al.*, 2006; Blokesch *et al.*, 2001). Es konnten bereits stabile Komplexe zwischen HybG und den Apoproteinen der großen Untereinheiten der Hyd-1 und Hyd-2, sowie mit HypD und HypE, nachgewiesen werden (Butland *et al.*, 2006). Weiterhin konnten Blokesch *et al.*, 2001 zeigen, dass HypC die Funktion von HybG bei der Reifung der Hyd-1, jedoch nicht bei der Hyd-2 übernehmen kann. Im Gegensatz dazu ist HybG nicht in der Lage die Funktion von HypC bei der Reifung der Hyd-3 zu übernehmen. Ungeklärt ist bisher, welche Bereiche in HybG und HypC für die Interaktion mit den Apoformen der großen Untereinheiten essentiell sind. Trotz hoher Sequenzähnlichkeit zwischen HybG und HypC müssen spezifische Aminosäurereste für die Interaktion mit Hyd-2 bzw. Hyd-3 verantwortlich sein.

1.6. Der Einfluss des C-terminalen Peptids auf die Reifung der α - und β -Untereinheit

Schon frühere Studien in Bacteria und Archaea deuten darauf hin, wie essentiell der C-Terminus der großen Untereinheit für die Hydrogenasereifung ist (Sorgenfrei *et al.*, 1993; Gollin *et al.*, 1992; Kortluke und Friedrich, 1992). Weitere Untersuchungen verdeutlichen, dass die Reifungsproteine HybG und HypC nur mit den Apoformen der großen Untereinheiten interagieren, nicht jedoch mit den prozessierten großen Untereinheiten (Butland *et al.*, 2006; Magalon und Böck, 2000a; Magalon und Böck, 2000b; Drapal und Böck, 1998). Diese Analysen beweisen, dass das C-terminale Peptid der großen Untereinheiten eine wichtige Funktion bei den Interaktionen zwischen den großen Untereinheiten und den Reifungsproteinen HypC/HybG hat. Nach der Prozessierung der großen Untereinheit findet die Dimerisierung mit der kleinen Untereinheit statt. Im Falle von Hyd-2 dimerisiert HybC mit der kleinen Untereinheit HybO. HybO hat ein N-terminal lokalisiertes Tat-Signalpeptid (Berks, 1996). Es wurde bereits gezeigt, dass die Tat-Maschinerie essentiell für den Transport zahlreicher periplasmatisch orientierter Proteine ist

(Berks *et al.*, 2000). Das Tat-System transportiert nur korrekt gefaltete Proteine über die Membran (Yahr und Wickner, 2001). Rodrigue *et al.*, 1999 zeigten, dass ein aktives Hyd-2 Heterodimer mittels dem Tat-System und dem am HybO lokalisierten Tat-Signalpeptid über die Membran transportiert wird. HybE, ein spezifisches Chaperon für die Hyd-2 Reifung, bindet an das Tat-Signalpeptid der kleinen Untereinheit, HybO (Dubini und Sargent, 2003). HybE maskiert das Tat-Signalpeptid, um möglicherweise einen vorzeitigen Transport der kleinen Untereinheit über die Membran zu verhindern (Dubini und Sargent, 2003; Dubini *et al.*, 2002). Die HybO und pro-HybC Reifung erfolgt parallel. Während das aktive Zentrum in pro-HybC inseriert wird, werden [FeS]-Kluster von der Isc-Maschinerie in HybO inseriert (Pinske und Sawers, 2012b). Erst nach Vollendung der Reifung beider Untereinheiten findet die C-terminale Peptidabspaltung durch die spezifischen Proteasen und die Dimerisierung statt. Die C-terminale Abspaltung an der großen Untereinheit signalisiert die korrekte [NiFe]-Kofaktorinsertion in das aktive Zentrum (Thomas *et al.*, 2015). Im Fall einer unvollendeten Reifung von pro-HybC wird HybO proteolytisch abgebaut (Thomas *et al.*, 2015; Pinske und Sawers, 2014; Pinske und Sawers, 2012b). Alle diese Daten geben Hinweise darauf, dass die [NiFe]-Hydrogenasereifung einem starken Kontrollmechanismus unterliegt und das C-terminale Peptid der großen Untereinheiten eine wichtige Schlüsselrolle dabei übernimmt.

1.7. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Schlüsselrolle des C-terminalen Peptids der großen Untereinheiten im [NiFe]-Reifungsmechanismus näher zu charakterisieren. Dazu soll geklärt werden, ob der C-Terminus als Interaktionsfläche für die Reifungsproteine dient oder ob dieser eine bestimmte Konformation hält, welche dann durch die Prozessierung geschlossen wird. Für diese Experimente wurden Termini-Austausch Varianten von HyaB und HybC konstruiert und entsprechende Aktivitätsstudien durchgeführt. Außerdem wurden limitierte Proteolyse Experimente mit dem pro-HybC und einer genetisch prozessierten HybC-Variante (HybC_{proc}) durchgeführt, um mögliche Konformationsänderungen zu identifizieren. Die HybC_{proc}-Variante wurde außerdem genutzt, um Abhängigkeiten zwischen den Reifungen der großen und der kleinen Untereinheit zu untersuchen.

Zudem wurde die Interaktion zwischen den Apoproteinen der großen Untereinheiten und den Reifungsproteinen HybG und HypC näher charakterisiert. Einerseits sollte die Interaktion nachgewiesen werden. Andererseits sollte die Region in der die Interaktion stattfindet eingegrenzt werden. Dazu wurde unter anderem mittels Termini-Austausch-Varianten der C-Terminus der großen Untereinheit als Interaktionsfläche getestet. Außerdem wurden in HybG und HypC verschiedene Aminosäurereste ausgetauscht, um Bereiche zu identifizieren, die für die Interaktion bzw. Aktivierung der großen Untereinheiten eine Rolle spielen.

2. Material und Methoden

2.1. Geräteliste

Tabelle 2: Verwendete Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Anaerobenzelt	Coy, Ann Arbor/MI (USA)
Autoklav	
- Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
ÄKTA purifier 10	GE Healthcare, München
Elektrophoresezubehör	
- Agarosegelkammer	Peqlab, Erlangen
- Twin-Gelkammer	Biometra, Göttingen
Elektroporator	
- BioRad Gene Pulser	BioRad, München
- BioRad Pulse Controller	BioRad, München
Gelimager	
- UV-Transilluminator	Intas, Göttingen
Laminarbox	
- LF MRF 06.12 GS	Steag, Pfullingen
NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	
- Calimatic 765	Knick, Berlin
PCR-Thermocycler	
- Primus 25 advanced	Peqlab, Erlangen
Spannungsgeber (Gelkammern)	
- Power Supplies EV243	Peqlab, Erlangen
Ultraschallgerät	
- Sonoplus GM 3100/3200	Bandelin, Berlin
- Sonoplus UW 3100/3200	Bandelin, Berlin
- Sonotroden KE 76 und MS 73	Bandelin, Berlin
UV/Vis-Spektralphotometer	
- Spekol 1500	Analytik Jena, Jena
- Uvikon 930	Kontron-Instruments Tegimenta, Rotkreuz (CH)
Western-Blot Apparatur	
- Fastblot B 33	Biometra, Göttingen
Zentrifugen	
- Hettich Universal 30RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Hettich EBA 12R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Osterode
- Sorvall RC6 Plus	Thermo Scientific, Waltham/MA (USA)

2.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Komplettpakete

Die verwendeten Chemikalien stammen von folgenden Firmen: Roche (Mannheim), SERVA (Heidelberg), Fluka (Steinheim), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Peqlab (Erlangen). Verbrauchsmaterialien wurden bezogen von: Konzentrator Vivaspin 6 bzw. 20 (Sartorius Stedim, Göttingen), Spritzenfilter Rotilabo Spritzenfilter, steril, 0,22 µm (Roth, Karlsruhe). Säulenmaterial TALON Co²⁺-Affinitäts-

Säulenmaterial (Clontech, Mountain View/CA USA). StrepTactin Sepharose 50 % (IBA, Göttingen). Verwendete Komplettpakete stammten von: QIAprep Spin Miniprep (Quiagen). Quick Change Mutagenesis Kit II (Agilent Technologies), GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit (GE Healthcare).

2.3. Biologische Materialien

2.3.1. Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme (Tabelle 3) sind Abkömmlinge von *E. coli*.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
MC4100	<i>F-araD139 Δ(argF-lac) U169 rpsL150 relA1 deoC1 rbsR fthD5301 fruA25 λ-</i>	Casadaban, 1976
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac [F' proAB lacIqZΔ M15 Tn10 (TetR)]</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederland
BL21(DE3)	<i>E. coli B Derivat, F-ompT lon hsdS (rB- mB-)dcm+ gal λ(DE3) endA</i>	Novagen, Nottingham, USA
FTD147	MC4100 \DeltahyaB , \DeltahybC , \DeltahycE	Redwood <i>et al.</i> , 2008
FTD150	MC4100 \DeltahyaB , \DeltahybC , \DeltahycE , $\DeltahyfB-R$	Redwood <i>et al.</i> , 2008
DHP-F2	MC4100 \DeltahypF	Paschos <i>et al.</i> , 2002
DHB-G	MC4100 \DeltahybG	Blokesch <i>et al.</i> , 2001
DHP-C	MC4100 \DeltahypC	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
DHP-D	MC4100 \DeltahypD	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
DADE	MC4100 $\DeltatatA-E$	Wexler <i>et al.</i> , 2000
CP 793	MC4100 \DeltahyaB \DeltahycE $\DeltahybO ::Kan^r$	Pinske <i>et al.</i> , 2011
CP 695	MC4100 \DeltahybC	Pinske <i>et al.</i> , 2011
CB10	DHPF2 \DeltahybC	Thomas <i>et al.</i> , 2015
CB11	MC4100 $\DeltahybG ::Kan^r$	Thomas <i>et al.</i> , 2015
CB12	CB10 $\Deltafdx ::Kan^r$	Diese Arbeit

CB13	DADE Δ hybC	Thomas <i>et al.</i> , 2015
CB15	FTD147hybC ⁺ Δ hybG::Kan ^r	Thomas <i>et al.</i> , 2015
CB16	FTD150hyaB ⁺ Δ hyaD::Kan ^r	Thomas <i>et al.</i> , 2015
CB17	FTD150hybC ⁺ Δ hybD::Kan ^r	Diese Arbeit
CB18	FTD150hybC ⁺ Δ hybG::Kan ^r	Diese Arbeit
CB19	FTD150hyaB ⁺ Δ hypC::Kan ^r	Diese Arbeit
CB20	FTD150hybC ⁺ Δ hybE::Kan ^r	Diese Arbeit
CB21	FTD150hyaB ⁺ Δ hyaE::Kan ^r	Diese Arbeit
CB22	FTD150hyaB ⁺ Δ hyaF::Kan ^r	Diese Arbeit
CB23	FTD150hyaB ⁺ Δ hyaD::Kan ^r	Diese Arbeit
SHH228	DHP-C Δ hybG	Hartwig <i>et al.</i> , 2015

2.3.2. Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Genotyp und Referenz der verwendeten Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
pASK-hybC	hybC in pASK-IBA5, Amp ^r	Pinske <i>et al.</i> , 2011
pASK-hybC_{proc}	pASK-hybC, V553 Stoppkodon (TAA), Amp ^r	Thomas <i>et al.</i> , 2015
pASK-hybC^{hyaB}	hybC mit hyaB C-Terminus in pASK-IBA7, Amp ^r	Thomas <i>et al.</i> , 2015
puc-hyaB	hyaB in pUC18, Amp ^r	Diese Arbeit
puc-hyaB^{hybC}	hyaB mit hybC C-Terminus in puc18, Amp ^r	Diese Arbeit
pzl-hybC-CT	C-Terminus von hybC in pzl, Amp ^r	Diese Arbeit
pCAN-hybC	Erhalten von pCA24N-hybC, G568 Einbau eines Stoppkodons (GGC zu TAA), Cm ^r	Diese Arbeit
pCAN-hybC_{proc}	Erhalten von pCA24N-hybC, V553 Einbau eines Stoppkodons (GTA zu TAA), Cm ^r	Diese Arbeit
pASK-hybG	hybG in pASK-IBA3, Amp ^r	Soboh <i>et al.</i> , 2013
pCThybG-HQL	wie pASK-hybG, mit Deletion der Aminosäuren HQL an Position 17,18,19	Hartwig <i>et al.</i> , 2015

pCThybG+GS	wie pASK-hybG, mit Insertion nach Aminosäure 33, kodierend für GS	Hartwig <i>et al.</i> , 2015
pCThybG-HQL/+GS	wie pASK-hybG, mit Deletion der Aminosäuren HQL an Position 17,18,19 und mit Insertion nach Aminosäure 33, kodierend für GS	Hartwig <i>et al.</i> , 2015
pCThybG-CEGN	wie pASK-hybG, mit Deletion der Aminosäuren CEGN an Position 34-37	Hartwig <i>et al.</i> , 2015
pCThybG-YStopp	wie pASK-hybG, mit Insertion eines Stoppkodons an Aminosäureposition 77	Hartwig <i>et al.</i> , 2015
pCThybG-HQL/+GS/YStopp	wie pASK-hybG, mit Deletion der Aminosäuren HQL an Position 17,18,19 und mit Insertion nach Aminosäure 33, kodierend für GS und Insertion eines Stoppkodons an Position 77	Diese Arbeit
pJA1021	pACYC184, <i>hypC</i> ⁺ , Cm ^r	Jacobi <i>et al.</i> , 1992
pThypCStrep	pt7-7 <i>hypCStrep</i> , Amp ^r	Diese Arbeit
pCThybC+HQL	wie pJA1021, mit Insertion der Aminosäuren HQL nach Position 16	Diese Arbeit
pCThybC-GS	wie pJA1021, mit Deletion der Aminosäuren GS an Position 34 und 35	Diese Arbeit
pCThybC+HQL/-GS	wie pJA1021, mit Insertion der Aminosäuren HQL nach Position 16 und mit Deletion der Aminosäuren GS an Position 34 und 35	Diese Arbeit
pCThybC-VStopp	wie pJA1021, mit Insertion eines Stoppkodons an Position 77	Diese Arbeit
pCThybC-GStopp	wie pJA1021, mit Insertion eines Stoppkodons an Position 82	Diese Arbeit
pCThybC+HQL/-GS/VStopp	wie pJA1021, mit Insertion der Aminosäuren HQL nach Position 16 und mit Deletion der Aminosäuren GS an Position 34 und 35 und wie pJA1021, mit Insertion eines Stoppkodons an Position 77	Diese Arbeit
pCThybC+HQL/-GS/GStopp	wie pJA1021, mit Insertion	Diese Arbeit

	der Aminosäuren HQL nach Position 16 und mit Deletion der Aminosäuren GS an Position 34 und 35 und wie pJA1021, mit Insertion eines Stoppkodons an Position 82	
pCThypC+PAD	wie pJA1021, mit Austausch der Aminosäuren GQP an Position 40,41,42 gegen die Aminosäuren PAD	Diese Arbeit
pCThypC+PAD/+HQL	wie pJA1021, mit Austausch der Aminosäuren GQP an Position 40,41,42 gegen die Aminosäuren PAD und mit Insertion der Aminosäuren HQL nach Position 16	Diese Arbeit
pCThypC+PAD/+HQL/VStopp	wie pJA1021, mit Austausch der Aminosäuren GQP an Position 40,41,42 gegen die Aminosäuren PAD und mit Insertion der Aminosäuren HQL nach Position 16 und mit Insertion eines Stoppkodons an Position 77	Diese Arbeit
pCThypC+PAD/+HQL/GStopp	wie pJA1021, mit Austausch der Aminosäuren GQP an Position 40,41,42 gegen die Aminosäuren PAD und mit Insertion der Aminosäuren HQL nach Position 16 und mit Insertion eines Stoppkodons an Position 82	Diese Arbeit

2.3.3. Phage

Zur Transduktion der durch Genmarkern ersetzten Gene zwischen verschiedenen *E. coli*-Stämmen wurde der Phage P1_{vir} verwendet.

2.4. Nährmedien und Medienzusätze

Alle Medien wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 121 °C und 1,2 bar für 20 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurden diesen jeweils 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben.

2.4.1. Lysogeny Broth (LB-Medium) nach Miller 1972

Pepton aus Casein	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)

Die Komponenten wurden in H_2O_{dd} gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

2.4.2. Terrific Broth (TB-Medium) modifiziert nach Sambrook und Russel 2001

Pepton aus Casein	1,2 % (w/v)
Hefeextrakt	2,4 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
MgSO ₄	1,5 mM
Glycerin	0,4 % (v/v)

Die Komponenten wurden in H_2O_{dd} gelöst und autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von separat autoklaviertem Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (Endkonzentration 100 mM) sowie steril filtriertem Aspartat/NaOH, pH 7,0 (Endkonzentration 30 mM).

2.4.3. TGYEP-Medium modifiziert nach Begg *et al.* 1977

Pepton aus Casein	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Glukose	0,8 % (w/v)
Spurenelementlösung (SLA)	0,1 % (v/v)
Kaliumphosphatpuffer pH 6,5	100 mM

Die Komponenten Pepton, Hefeextrakt und Glukose wurden in H_2O_{dd} gelöst und autoklaviert. Danach erfolgte die Zugabe von autoklaviertem Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 (Endkonzentration 100 mM) sowie autoklavierter Spurenelementlösung.

2.4.4. M9- Minimalmedium modifiziert nach Sambrook und Russell 2001

M9-Minimalsalze	10 % (v/v)
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Glukose	0,4 %
Supplementlösung I	0,5 %
Supplementlösung II	0,5 %
Thiamin/ HCL	0,3 μ M
Spurenelementlösung SLA	0,1 %

10x M9-Minimalsalze

Na ₂ HPO ₄	476 mM
KH ₂ PO ₄	220 mM
NaCl	85,4 mM
NH ₄ Cl	186 mM

Supplementlösung I

Alanin	0,84 % (w/v)
--------	--------------

Arginin	2,53 % (w/v)
Glutamin	0,4 % (w/v)
Glycin	0,2 % (w/v)
Histidin	0,31 % (w/v)
Isoleucin	0,79 % (w/v)
Leucin	0,79 % (w/v)
Lysin	1,1% (w/v)
Methionin	0,9 % (w/v)
Phenylalanin	0,99 % (w/v)
Prolin	2 % (w/v)
Serin	2 % (w/v)
Threonin	0,71 % (w/v)
Valin	0,7 % (w/v)

Die Aminosäuren wurden in destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

Supplementlösung II

Asparagin	0,84 % (w/v)
Aspartat	1 % (w/v)
Cystein	0,73 % (w/v)
Glutamat	1 % (w/v)
Tryptophan	0,41 % (w/v)
Tyrosin	0,36 % (w/v)

Die verwendeten Aminosäuren wurden in destilliertem Wasser gelöst und steril filtriert.

2.4.5. Medienzusätze

Die in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführten Medienzusätze wurden vor Verwendung steril filtriert. Die beschriebenen Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert und zu dem autoklavierten Medium gegeben.

Tabelle 5: Medienzusätze

Medienzusatz	Stammkonzentration	Endkonzentration
Kanamycin	30 mg ml ⁻¹ in H ₂ O	30 µg ml ⁻¹
Ampicillin	100 mg ml ⁻¹ in H ₂ O	100 µg ml ⁻¹
Chloramphenicol	34 mg ml ⁻¹ in Ethanol	25 µg ml ⁻¹
IPTG	1 M in H ₂ O	150-300 µM
AHT	2 mg ml ⁻¹ in DMF	0,2-0,4 µg ml ⁻¹

Tabelle 6: Spurenelementlösung SLA modifiziert nach Hormann & Andreesen, 1989

Spurenelement	Stammkonzentration	Endkonzentration
FeCl ₂ · 4 H ₂ O ^{*a}	7,5 · 10 ⁻³ M	7,5 µM
ZnCl ₂	5 · 10 ⁻⁴ M	0,51 µM
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	5 · 10 ⁻⁴ M	0,51 µM
NiCl ₂ · 4 H ₂ O	1 · 10 ⁻⁴ M	0,1 µM
H ₃ BO ₃	1 · 10 ⁻⁴ M	0,098 µM
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	1,2 · 10 ⁻⁵ M	0,012 µM
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	8 · 10 ⁻⁴ M	0,8 µM
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	1,5 · 10 ⁻⁴ M	0,15 µM
Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	1 · 10 ⁻⁴ M	0,1 µM
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	1 · 10 ⁻³ M	1 µM
Na ₂ VO ₃ · 2 H ₂ O	1 · 10 ⁻⁴ M	0,1 µM

*a FeCl₂ wurde zunächst vollständig in 25%iger (v/v) Salzsäure gelöst.

2.5. Zellanzucht

2.5.1. Aerobe Zellanzucht von *E. coli*

Die *E. coli* Stämme wurden schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Hierbei wurden die Kulturgefäße mit 20 % (v/v) des maximalen Volumens mit Medium befüllt und bei 200 rpm geschüttelt.

2.5.2. Anaerobe Zellanzucht von *E. coli*

Für die anaerobe Zellanzucht von *E. coli* Zellen wurden bei einem Kulturvolumen bis 500 ml das Gefäß bis mindestens 70 % befüllt und als Standkultur inkubiert. Bei größeren Volumina wurde zusätzlich ein Magnetrührer, um das Absetzen der Kultur zu verhindern, eingesetzt. Nach dem Erreichen der gewünschten Wachstumsphase, wurden die Zellen bei 4 °C für 10 min bei 8000 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit Puffer gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.5.3. Messung des Bakterienwachstums

Das Wachstum der *E. coli* Kulturen wurde mittels Messung der Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) an einem Photometer verfolgt.

2.5.4. Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Stammkulturröhrchen von Pro-Lab Diagnostics (Richmond Hill, Kanada) verwendet, die eine Glycerin-LB-Medium-Mischung beinhalten. In diese wurden 1 ml einer Übernachtskultur überführt und bei -80 °C tiefgefroren. Die kurzfristige Lagerung der Kulturen erfolgte auf LB-Agar-Platten bei 4 °C.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Präparation erfolgte aus einer 5 ml Übernachtskultur nach den Angaben des Herstellers.

2.6.2. Dialyse von DNA-Lösungen Marusyk & Sergeant, 1980

Zur Entfernung von störenden Ionen vor der Elektroporation wurden die DNA-Proben auf einen Membranfilter mit Porengröße 0,025 µm (Millipore, Eschborn) pipettiert und für 45 min gegen destilliertes Wasser dialysiert.

2.6.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch am NanoDrop ND-1000 der Firma Peqlab (Erlangen) bestimmt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 µg ml⁻¹.

2.6.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis *et al.* 1986

Zur spezifischen Amplifikation von Plasmid- oder chromosomaler DNA wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Für analytische Zwecke wurde die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet und für präparative Zwecke wurden die *Phusion*-DNA-Polymerase und die *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase eingesetzt. Die *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase wurde im Rahmen eines *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Böblingen) verwendet. In Tabelle 7 sind die Zusammensetzungen der Standard-PCR-Reaktionen dargestellt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß in einem Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Standard-PCR-Ansätze

PCR-Ansatz	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase/	<i>Pfu-Turbo</i> -DNA-Polymerase
Matrize (<i>template</i>)	Zellmaterial oder Plasmid-DNA	50-200 ng Chromosomale- oder Plasmid-DNA	5-50 ng Plasmid-DNA
Primer for (10 µM)	0,12 µl	1,5 µl	1,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,12 µl	1,5 µl	1,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl	1 µl	1 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl	-	5 µl
5x Reaktionspuffer	-	10 µl	-
DNA-Polymerase	0,2 µl	0,25 µl	1 µl
H₂O_{dd}	<i>ad</i> 20 µl	<i>ad</i> 50 µl	<i>ad</i> 50 µl

Unter Tabelle 8 sind die Programme der verwendeten DNA-Polymerasen vorzufinden.

Tabelle 8: Amplifizierungsprogramme der verwendeten DNA-Polymerasen

	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase		<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase/ <i>Pfu-Turbo</i> -DNA-Polymerase		
Denaturierung	95 °C	3 min	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	95 °C	30 s	} Zyklen: <i>Taq/Phusion</i> : 35 <i>Pfu-Turbo</i> : 18
Hybridisierung	55-65 °C	30 s	55-65 °C	1 min	
Elongation	72 °C	x ^a min	72 °C	x ^a min	
Nachsynthese	72 °C	10 min	72 °C	10 min	

a Die Elongationszeit x errechnet sich aus der Syntheseleistung der eingesetzten Polymerase (1 kb min⁻¹ bei *Taq/ Pfu Turbo* und 2 kb min⁻¹ bei *Phusion*) und der erwarteten Fragmentgröße.

Die in den PCR-Ansätzen angewandten synthetischen Oligonukleotide sind in Tabelle 13 im Anhang dargestellt.

2.6.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR wurden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach mittels eines 1,5 %igen (w/v) Agarosegels aufgetrennt. Dabei wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer gekocht und als horizontales Gel gegossen. Die Proben wurden mit 1x DNA-Proben-Puffer versetzt und aufgetragen. Um einen Größenvergleich vornehmen zu können, wurde der Größenstandard *Gene Ruler DNA Ladder Mix* von Fermentas verwendet. Bei der Agarose Gelelektrophorese wurde 1x TAE-Puffer als Laufpuffer eingesetzt und eine Spannung von 100 V angelegt. Zur Detektion der Fragmente wurde das Agarosegel für 15 min in einem Ethidiumbromidbad (1 mg l⁻¹) inkubiert, um Banden unter dem UV-Transluminator sichtbar zu machen und auszuwerten.

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

Tris/HCl, pH 8	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	100 mM

5x Probenpuffer

Glycerin	50 % (w/v)
EDTA	200 mM
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden DNA Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und mittels *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* der Firma GE Healthcare nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.6.6. Enzymatische Modifikationen von DNA

2.6.6.1. Restriktionsverdau

Die Restriktion von Plasmid-DNA und per PCR amplifizierter DNA-Fragmente wurde nach Herstellerangaben mit Restriktionsenzymen und Puffern der Firma Fermentas und NEB durchgeführt.

2.6.6.2. Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden die T4 DNA-Ligase und der T4-Ligationspuffer der Firma Fermentas eingesetzt. In einem 20 µl Ansatz wurde die DNA mit 1x T4-Ligationspuffer und 1 U Ligase versetzt. Je Ansatz wurden 50-100 ng verdaute Vektor-DNA und die 3- bis 8fache Menge an Molekülen geschnittenen Inserts verwendet. In einem Thermocycler wurde der Ansatz einem Temperaturgradienten von 20 °C bis 8 °C, mit einem Gefälle von 1 °C je Stunde, ausgesetzt.

2.6.7. Sequenzierung der DNA

Für die Validierung der DNA-Sequenz wurde das PCR-Produkt sequenziert. Zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurden 1000-1200 ng der DNA-Probe mit 10 pmol eines Primers in einem Reaktionsvolumen von 15 µl gemischt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Microsynth AG (Göttingen) vorgenommen. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Programme Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd) und SerialCloner 2.1 (SerialBasics).

2.7. Herstellung und Selektion rekombinanter *E. coli*- Stämme

2.7.1. Elektroporation nach Dower *et al.* 1988

2.7.1.1. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde eine Hauptkultur in LB-Medium 1%ig aus einer Übernachtskultur angeimpft und aerob, bei 37 °C kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,7 wurden die Zellen bei 4000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Pellet wurde dreimal in 1/4 des Ausgangsvolumens in kaltem, 5%igem (v/v) Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 1/20 des Ausgangsvolumens in 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen, zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.7.1.2. Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit 10 – 800 ng dialysierter DNA und 50 µl elektrokompetenter Zellen unter Verwendung des Gene Pulser der Firma Bio-Rad (München). Die Zellen wurden mit der DNA gemischt und in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette der Firma Peqlab (Erlangen) transferiert. Am *Gene-Pulser* wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Spannung: 2,5 kV (wenn Küvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand verwendet wurden)

Kapazität: 25 TF

Widerstand: 200 g

Nach einem Puls mit Zeitkonstanten von 4,2 bis 4,9 ms wurden die Zellen in 1 ml LB + 0,8 % (w/v) Glukose Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Ausplattieren auf selektive Nähragarplatten.

2.7.2. CaCl₂-Methode nach Sambrook und Russell 2001

2.7.2.1. Herstellung chemokompetenter Zellen

Die Kultivierung und Zentrifugation wurde wie in Abschnitt 2.7.1.1 durchgeführt. Das Pellet wurde zweimal in 1/5 des Ausgangsvolumens in 100 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Nach dem CaCl₂ Waschschrift wurden die Zellen erneut in 1/5 des

Ausgangsvolumens in CaCl_2 aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach weiterem zentrifugieren wurden die Zellen in 1/20 des Ausgangsvolumens in 100 mM CaCl_2 mit 15 % Glycerin (w/v) resuspendiert und zu je 200 μl aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.7.2.2. Transformation chemokompetenter Zellen

Die 200 μl chemisch kompetenten Zellen wurden mit 1-100 ng gereinigter Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock von $42\text{ }^\circ\text{C}$ und 90 Sekunden, wurden 800 μl LB-Medium + 0,8 % Glukose (w/v) hinzugefügt und für 60 Minuten bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Im Anschluss erfolgte das Ausplattieren auf selektiven Nähragarplatten.

2.7.3. Phagentransduktion nach Miller, 1972

Die Phagentransduktion diente der Intergration definierter Mutationen in das *E. coli* Chromosom. Für die Herstellung eines Starterlysats aus MC4100 wurde der Phage P1_{vir} verwendet.

2.7.3.1. Herstellung des P1-Lysates

Für die Herstellung des P1 Phagenlysates wurden 100 μl einer Übernachtskultur (LB-Medium mit 2,5 mM CaCl_2) mit 5 μl eines Starterlysats versetzt und für 30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, ohne Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden 2 ml eines handwarmen R-*top*-Agar hinzugefügt und auf LB-Platten mit 2,5 mM Calciumchlorid gegossen. Nach 6-8 Stunden Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Lyse des Donorstammes sichtbar und der R-*top*-Agar steril mit 4 ml SM-Puffer abgeschwemmt, resuspendiert und unter Zugabe von 110 μl Chloroform für 30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach 90 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte der Agar abzentrifugiert und der Überstand als Phagenlysate bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

2.7.3.2. P1-Transduktion

Für die P1-Transduktion wurde der Akzeptorstamm in LB-Medium mit 2,5 mM Calciumchlorid über Nacht kultiviert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl MC-Lösung und 100 μl LB-Medium resuspendiert und mit 5 μl Phagenlysate versetzt. Nach einer Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min, wurden 500 μl LB-Citrat-Medium hinzugefügt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl LB-Citrat-Medium aufgenommen und auf LB-Citrat-Platten mit Hilfe von Antibiotika selektiert.

R-*top* Agar

Pepton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
Bacto-Agar	0,8 % (w/v)
NaCl	0,8 % (w/v)
CaCl_2	2 mM

Glukose 0,1 % (w/v)

SM-Puffer

Tris/HCl pH 7,5 0,05 M

NaCl 0,1 M

MgSO₄ 8 mM

Gelatine 0,01 % (w/v)

MC-Lösung

MgSO₄ 10 mM

CaCl₂ 5 mM

LB-Citrat-Medium

LB-Medium mit 0,5 M Natriumcitrat

2.8. Proteinbiochemische Methoden

2.8.1. Herstellung von zellfreien Extrakten für Proteinreinigung

Für die Gewinnung zellfreier Extrakte wurde die Hauptkultur nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ mit 5000 g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer A gewaschen und erneut pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 5 ml Puffer A/ g Zellen bei der IMAC Reinigung und in 2 ml Puffer W/ g Zellen bei der StrepTactin Sepharose Reinigung resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden mit 1 µl ml⁻¹ DNase und 0,4 mM PMSF versetzt. Der anaerobe Zellaufschluss wurde im Anaerobenzelt mittels Ultraschall durchgeführt. Dabei setzte der Ultraschallpuls pro 0,5 Sekunden aus und die Leistung betrug 40 W. Nach dem Zellaufschluss wurden durch einen 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 5000 g, die unaufgeschlossenen Zellen vom Zellextrakt getrennt. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt bei 15000 g für 30 min, wurde der Zellextrakt von *inclusion bodies* und Zelltrümmern getrennt. Der erhaltene Zellextrakt wurde direkt auf die entsprechende Säule gegeben.

2.8.2. Proteinreinigung

2.8.2.1. Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)

Das überproduzierte, C-terminal [(His)6-tag] fusionierte Protein konnte mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie gereinigt werden. Dabei wurde eine mit Cobalt beladene TALON-SuperFlow-Matrix verwendet. Unter anaeroben Bedingungen wurden alle Puffer anaerobisiert. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 10 Säulenvolumen Puffer A, konnte der Zellextrakt mittels eines Superloops mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min⁻¹ auf die Säule geladen werden. Es schloss sich ein Waschschriff mit 10-15 Säulenvolumen Puffer A an. Mit steigender Konzentration an Puffer B (5-30 mM) wurden

unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Die Elution wurde mittels 300 mM Imidazol von der Säule eluiert. Zur Überprüfung der Reinheit des Proteins wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit einem 10-15 %igen SDS-Gel durchgeführt.

Puffer A

Tris/HCl	50 mM
NaCl, pH 8	300 mM

Puffer B

Imidazol	300 mM in Puffer A
----------	--------------------

Puffer D

MES	20 mM
NaCl, pH 5	100 mM

2.8.2.2. Entsalzen des Proteins mit PD10-Säule

Zur weiteren Verwendung des Proteins musste eine Entsalzung stattfinden, da Imidazol die Proteinstabilität negativ beeinträchtigen kann. Für das Entsalzen und Umpuffern des Proteins wurde eine Sephadex G-25 Säule (PD10) verwendet. Die Säule trennt niedermolekulare Substanzen wie Salze und Imidazol, von hochmolekularen Substanzen wie Proteinen. Unter anaeroben Bedingungen wurde der Puffer anaerobisiert. Zur Äquilibration der Säule wurden 10 Säulenvolumen Puffer C verwendet. Das Protein wurde über den Superloop auf die Säule aufgetragen. Es wurde eine Flussrate von 3 ml min^{-1} angelegt.

Puffer C

Tris/ HCl	25 mM
NaCl, pH 8	150 mM

2.8.2.3. StrepTactin-Affinitätschromatographie

Die Proteinreinigung des C-terminal (*Strep*)8-tag II Fusionsproteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie über StrepTactin-Sepharose Material (IBA, Göttingen). Das Säulenvolumen betrug 1-10 ml. Nach dem Äquilibrieren mit 10 Säulenvolumen Puffer W, wurde der mit 80 µg Avidin/ 1 ml versetzte Zellextrakt auf die Säule aufgetragen. Nach dreimaligen Waschschritten mit je 1x Säulenvolumen, schloss sich die Elution mit zunächst einem Säulenvolumen Puffer E an. Im Anschluss wurde das Protein mit 2x Säulenvolumen Puffer E eluiert. Nach weiteren zwei $\frac{1}{2}$ Säulenvolumen Puffer E, konnte die Säule mit Puffer R regeneriert werden.

Puffer W

Tris/HCl	100 mM
NaCl, pH 8	150 mM

Puffer E

Puffer W mit 5 mM Desthiobiotin, pH 8

Puffer R

Tris/HCl	100 mM
NaCl	150 mM
Hydroxy-Azophenyl-Benzoessäure, pH 8	1 mM

2.8.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry *et al.* 1951

Die photometrische Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte in Kunststoffküvetten an dem Photometer Uvikon 900 der Firma Kontron Instruments (Gros-Zimmern). Die Proteinlösungen wurden auf ein Volumen von 100 μ l in H_2O_{dd} verdünnt. Nach der Zugabe von 1 ml Lösung C fand eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Nach der anschließenden Zugabe von Lösung D und 30 min Inkubation, wurde die Messung der Absorption bei 750 nm durchgeführt. Mittels BSA erstellter Kalibriergerade, konnte die Proteinmenge eines Ansatzes aus der entsprechenden Absorption berechnet werden.

Lösung A

NaOH	0,1 N
Dinatriumtartrat	0,5 % (w/v)
Na_2CO_3	2 % (w/v)

Lösung B

$CuSO_4 \times 7 H_2O_{dd}$	0,1 % (w/v)
-----------------------------	-------------

Lösung C

Lösung A	90 % (v/v)
Lösung B	10 % (v/v)

Lösung D

Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz	50 % (v/v)
----------------------------------	------------

2.8.4. Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970 durchgeführt. In Tabelle 9: Zusammensetzung der SDS-Gele sind die Zusammensetzungen der SDS-Gele aufgeführt. Es wurden alle Komponenten gemischt und abschließend zur Polymerisation APS und TEMED hinzugefügt. Das Gemisch wurde in eine vertikale Elektrophorese Apparatur von

Biorad gegossen. Nach der Polymerisation des Trenngels, konnte das Sammelgel gegossen werden. Alle Proteinproben wurden mit 5-fachem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99 °C denaturiert. Nach Beladen der Geltaschen, wurde die Elektrophorese bei Raumtemperatur und einer Spannung von 80-150 V in 1-fachem SDS-Elektrophoresepuffer durchgeführt. Die Auftrennung wurde gestoppt, sobald die Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte.

Tabelle 9: Zusammensetzung der SDS-Gele

Komponente	10 % (w/v) Trenngel	12,5 % (w/v) Trenngel	15 % (w/v) Trenngel	5 % (w/v) Sammelgel
40 % (w/v) Acrylamid- Lösung	1,5 ml	1,875 ml	2,25 ml	0,25 ml
Tris/HCl	1,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	0,5 ml (0,5 M, pH 6,8)
H₂O_{dd}	2,9 ml	2,52 ml	2,15 ml	0,5 ml
10 % (w/v) SDS	60 µl	60 µl	60 µl	20 µl
10 % (w/v) APS	40 µl	40 µl	40 µl	15 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	2 µl

10x Elektrophoresepuffer

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	34,6 mM
pH 8,0	

5x Probenpuffer

Tris/HCl pH 6,8	314 mM
SDS	347 mM
Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	25 % (v/v)

2.8.5. Auftrennung von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen (Native PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde nach dem gleichen Aufbauprinzip (Gelkammer und Gele) durchgeführt wie unter 2.8.4 beschrieben. Die Gele unterschieden sich in der Zusammensetzung und der Probenbehandlung (Tabelle 10). Die Proteinproben wurden mit 3 % Triton X-100 (w/v) behandelt und mit Beschwererlösung versetzt. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 80-100 V über 2-4 Stunden aufgetrennt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gele

Komponente	6 % (w/v) Trenngel	7,5 % (w/v) Trenngel	10 % (w/v) Trenngel	5 % (w/v) Sammelgel
Acrylamid-Lösung	1 ml 40 % (w/v)	1,12 ml 40 % (w/v)	2 ml 30 % (w/v)	0,25 ml 40 % (w/v)
Tris/HCl (2,5 M, pH 8,5)	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml	0,2 ml
H₂O_{dd}	4,32 ml	4,27 ml	3,32 ml	1,55 ml
20 % (w/v) Triton X100	30 µl	30 µl	30 µl	10 µl
10 % (w/v) APS	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

10x Laufpuffer

Tris 1 M

Glycin 1 M

Beschwererlösung

Saccharose 20 % (w/v)

Spatelspitze Bromphenolblau

2.8.6. Western Blot

2.8.6.1. Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran

Nachdem eine SDS-PAGE durchgeführt wurde, wurden das SDS-Gel, das Filterpapier und die Nitrocellulose Membran in Towbin Puffer für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde von der Anode ausgehend 3 Lagen Filterpapier, die Nitrocellulose Membran, das SDS-Gel und

nochmal 3 Lagen Filterpapier aufeinander gelegt. Die Membran wurde dann 1,5 h bei 1,2 mA pro cm² Membran geblottet (Biometra).

2.8.6.2. Detektion der Proteine mittels ECL Reaktion

Nach dem Transfer der Proteine von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose Membran mittels Western Blot Apparatur, wurde die Membran für mindestens 1 h in 5 % (w/v) Milchpulver-PBS-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen vor der Detektion zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 3x 5 min mit 1-fachem PBS-Puffer gewaschen, um danach mit 1fach PBS und 0,5 % (w/v) BSA verdünnten primären Antikörper über Nacht inkubiert zu werden. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran nach 6x 5 min Waschen mit 1fach PBS und dann mit 1-fachem PBS-Puffer und 0,5 % (w/v) BSA verdünnten Sekundären Antikörper für mindestens 1 h inkubiert. Danach schloss sich wieder ein 3x 5 min Waschschrift an, um den nicht gebundenen sekundären Antikörper von der Membran zu entfernen. Das IgG (H+L)-HRP Konjugat ist mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Somit erfolgte die Detektion der Proteine durch die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ zu einem Licht emittierenden Produkt. Für die ECL Reaktion wurde Lösung A (5 ml 100 mM Tris/HCL pH 8; 22 µl 90 mM Coumarsäure, 50 µl 250 mM Luminol) und B (5 ml 100 mM Tris/HCL pH 8; 3 µl 30 % (v/v) H₂O₂) unter Lichtausschluss miteinander vermischt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 min. Die Membran wurde im Anschluss luftblasenfrei in eine durchsichtige Folie gelegt und der Röntgenfilm auf diese. Die Zeit der Exposition richtete sich dabei nach der Stärke des zu erwartenden Signals. Danach wurde der Röntgenfilm für 1-2 min in der Entwicklerlösung geschwenkt, mit Wasser gespült und in die Fixiererlösung überführt.

2.8.7. Proteinfärbung mit *PAGE Blue Protein staining solution* (ThermoFisher Scientific).

Das SDS-Gel wurde nach Herstellerangaben vorbehandelt und gefärbt.

2.9. Enzymologische Untersuchungen

2.9.1. Qualitativer Test auf Gasbildung

Bei der gemischten Säuregärung werden Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet. Für den Aktivitätstest wurden die Kulturen in LB-Medium mit 0,8 % (w/v) Glukose bei 37 °C über Nacht angezogen. Das gebildete Gas wurde mittels Durham-Röhrchen aufgefangen.

2.9.2. Hydrogenase-Aktivitätsfärbung nach einer nativen PAGE

Für den Nachweis der Aktivitäten von Hyd-1, -2 und -3 wurden die Proteinkomplexe eines zellfreien Extraktes durch eine Native PAGE (siehe 2.8.5) aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss mit 50 mM MOPS pH 7,0 gewaschen und dann in Aktivitätspuffer unter 100 % H₂-

Atmosphäre in einer Serumflasche bei Raumtemperatur, leicht schwenkend, inkubiert (Ballantine & Boxer, 1985, Enoch & Lester, 1975).

Aktivitätspuffer

MOPS, pH 7,0	50 mM
Benzylviologen	0,5 mM
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	1 mM

2.9.3. Gaschromatographie

Die durch den FHL-Komplex und die Hyd-3 gebildete Gasmenge (H_2) kann quantitativ am Gaschromatographen bestimmt werden (Pinske und Sawers 2011). Nach einer anaeroben Kultivierung der Zellen in Minimalmedium bis zu einer OD_{600} von 1, wurden die Zellen bei 5000 g und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml MOPS, pH 7 mit 20 % (w/v) Glycerol resuspendiert. Zur Probenvorbereitung wurden Mini-Hungate-Röhrchen mit 840 μ l Messpuffer befüllt (ohne Natriumformiat und DTH) und luftdicht verschlossen. Zur Anaerobisierung der Röhrchen fand eine Begasung mit 100 % Stickstoff statt. Nach Zugabe des DTH und 100 μ l der Zellsuspension wurde dem Ansatz das Substrat Natriumformiat hinzugefügt und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. In Abständen von 1 min wurden 200 μ l der Gasphase mit einer gasdichten Spritze (Luelockverschluss, SGE International PTY LTD, Australia) entnommen und in den Gaschromatographen injiziert. Die Berechnung der Wasserstoffmenge erfolgte über eine Kalibriergerade, die mit definierten Volumina Wasserstoff erstellt wurde.

Messpuffer

MOPS pH 7	50 mM
Natriumformiat	75 mM
Natrium Dithionit	2 mM

2.10. Trypsinbehandlung der Proteinproben

2.10.1. Limitierte Trypsinolyse als Nachweis einer Konformationsänderung

Zum Nachweis einer Konformationsänderung der großen Untereinheit nach der Insertion des aktiven Zentrums und der Prozessierung des C-terminalen Peptids wurden sowohl pro-HybC als auch HybC_{proc} einer Trypsinbehandlung unterzogen. Dazu wurde ein Gesamtvolumen von 100 μ l gewählt. Es wurde 100 μ g Protein in 200 mM HEPES, 200 mM NaCl, 40 mM $CaCl_2$, pH 7,8 gelöst und 1 μ g Protease hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 2 h. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen jeweils 10 μ l Probe entnommen (0, 10, 30, 60, 120 min). Der Trypsinverdau wurde durch sofortiges Kochen in 1-fachem SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

2.10.2. Sphäroplastenisolation mittels Trypsin

Nach einer anaeroben Kultivierung der *E. coli* Zellen (50 ml), wurde die Kultur bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 25 % (w/v) Saccharose, 1 mM Tris, pH 8 bei Raumtemperatur resuspendiert. Im Anschluss wurde der Zellsuspension 20 µl einer EDTA Lösung (250 mM, pH 8) und 20 µl einer frisch vorbereiteten Lysozym Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sphäroplasten wurden bei 15000 g, 4 °C für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand beinhaltet das Periplasma und im Zellpellet befinden sich die Sphäroplasten. Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, bei 4 °C durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden vorsichtig in dem oben genannten Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 min mit 0,025 % (w/v) Trypsin versetzt. Trypsinhemmer wurde in einer Konzentration von 0,5 % (w/v) zum Abstoppen des Trypsinverdau eingesetzt. Die Sphäroplasten wurden von den durch Trypsin abgespaltenen Enzymen durch einen Zentrifugationsschritt bei 15000 g für 10 min getrennt. Im Überstand befinden sich die durch die Trypsinbehandlungen von der Cytoplasmamembran abgespaltenen Proteine und im Pellet befinden sich die Sphäroplasten. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer (siehe oben) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Im Anschluss fand die Membranfraktionierung mittels Ultrazentrifugation statt.

3. Ergebnisse

Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen läuft unter der Beteiligung mehrerer akzessorischer Proteine ab, welche an der Synthese der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe des Kofaktors und dessen Insertion in die großen Untereinheiten, HyaB (Hyd-1), HybC (Hyd-2) und HycE (Hyd-3), beteiligt sind. Dabei spielen die Reifungsproteine HypC und HybG eine essentielle Rolle in der Übertragung der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe in das aktive Zentrum der großen Untereinheiten. Diese bilden jeweils einen Komplex mit dem Reifungsprotein HypD und übertragen gemeinsam die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe auf die großen Untereinheiten (Soboh *et al.*, 2013; Bürstel *et al.*, 2012; Blokesch *et al.*, 2004). HybG ist spezifisch für die Reifung der großen Untereinheit der Hyd-2 (HybC) (Blokesch *et al.*, 2001) und HypC ist spezifisch für die Reifung der großen Untereinheit der Hyd-3 (HycE) (Drapal und Böck, 1998). Beide Reifungsproteine sind in der Lage die große Untereinheit der Hyd-1 (HyaB) zu aktivieren (Blokesch *et al.*, 2001). Nach der Insertion des [NiFe]-Kofaktors wird das C-terminale Peptid der großen Untereinheiten durch die spezifischen Proteasen, HyaD (Hyd-1), HybD (Hyd-2) und Hycl (Hyd-3), prozessiert (Fritsche *et al.*, 1999; Rossmann *et al.*, 1994; Menon *et al.*, 1993) und die Dimerisierung mit der kleinen Untereinheit findet statt. In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle des C-terminalen Peptids der großen Untereinheit während des Reifungsmechanismus analysiert werden. Dazu wird im ersten Teil der Ergebnisse auf die Interaktion zwischen dem Reifungsprotein HybG und HybC (der großen Untereinheit der Hyd-2) eingegangen. Im Anschluss werden der C-Terminus der großen Untereinheit und dessen Rolle als potentielle Interaktionsfläche für die Reifungsproteine und die spezifischen Proteasen analysiert. Untersuchungen zu einer möglichen Konformationsänderung der großen Untereinheit der Hyd-2 (HybC) nach der C-terminalen Prozessierung sollen zusätzlich Informationen über die Interaktion mit den Reifungsproteinen und die Struktur der großen Untereinheit liefern. Außerdem liegt ein weiterer Fokus auf den Reifungsproteinen HybG (Hyd-2) und HypC (Hyd-3) und deren Funktion als Aktivator der großen Untereinheiten. Nach der Insertion des aktiven Zentrums und der Prozessierung des C-terminalen Peptids findet die Heterodimerbildung zwischen der großen Untereinheit, HybC, und der kleinen Untereinheit, HybO, der Hyd-2 statt. Dabei wurde besonders die Abhängigkeit der Reifung zwischen der kleinen Untereinheit (HybO) und der großen Untereinheit (HybC) der Hyd-2 analysiert.

3.1. Interaktionsanalysen des Reifungsproteins HybG und den Reifungsvarianten der großen Untereinheit HybC

HybG ist neben HypC ein wichtiges Protein und maßgeblich an der Reifung der Hyd-2 beteiligt. Wie bereits Soboh *et al.*, 2013 postulierten, überträgt HybG gemeinsam mit dem

Reifungsprotein HypD die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe des [NiFe]-Kofaktors in das aktive Zentrum der großen Untereinheit der Hyd-2 (HybC). Es ist bereits bekannt, dass HybG im Bezug auf die Interaktion mit der großen Untereinheit ausschließlich einen Komplex mit der Apoform von HybC (pro-HybC) bildet und nicht mit der gereiften prozessierten Variante von HybC (Blokesch *et al.*, 2001). In meiner Masterarbeit (Bielak, 2012) konnte ich diese Komplexbildung in einem *in vitro*-System bestätigen. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem unter *in vivo*-Bedingungen sowohl die Interaktion zwischen HybG und pro-HybC als auch zwischen HybG und HypD nachgewiesen werden. Für die Durchführung der Experimente wurden zwei Varianten der großen Untereinheit verwendet. Zum einen die Apoform der großen Untereinheit (pro-HybC) und zum anderen die prozessierte Variante (HybC_{proc}). Die prozessierte Variante wurde durch die Mutagenese der Aminosäure V553 in ein Stoppkodon (TAA) erstellt. Somit ist HybC_{proc} bereits auf genetischer Ebene prozessiert (In Abbildung 5) und imitiert die gereifte HybC-Form, welche normalerweise nur durch die Insertion des [NiFe]-Kofaktors und die C-terminale Prozessierung entsteht.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der HybC Reifungsvarianten. Pro-HybC ist die Wildtyp-Apoform der großen Untereinheit der Hyd-2. Die Variante HybC_{proc} steht für eine genetisch prozessierte HybC Variante, bei der das Kodon für die Aminosäure V553 in ein Stoppkodon umgewandelt wurde, um den C-Terminus ab dem Valin an Position 553 zu eliminieren. Diese Variante gleicht der durch die Insertion des aktiven Zentrums und der anschließenden Prozessierung aktiven HybC Form, enthält jedoch kein [NiFe]-Kofaktor. N und C zeigen die jeweilige Lokalisation des N- und C-Terminus an.

Für die *in vivo*-Durchführung der Interaktionsstudie wurden Plasmide, jeweils kodierend für pro-HybC bzw. HybC_{proc} und HybG, in dem Proteasedelestionsstamm FTD147 Δ hybD (Δ hyaB Δ hycE Δ hybD) transformiert. Ohne die, für Hyd-2 spezifische Protease HybD wird ein Intermediat hervorgebracht, welches nicht prozessiert werden kann. Somit ist die Wahrscheinlichkeit höher eine Momentaufnahme auf der Reifungsstufe der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Übertragung von HybG auf pro-HybC zu visualisieren. Dazu wurden beide auf den Plasmiden lokalisierten Gene in dem Delestionsstamm mittels IPTG- bzw. AHT-Induktion überexprimiert. Somit lagen sowohl pro-HybC und HybG, als auch HybC_{proc} und HybG gemeinsam überproduziert in dem Delestionsstamm vor. Die Zellen wurden nach der Zellernte aufgeschlossen und 25 bzw. 100 μg Proteinlösung in einer 10%igen nicht denaturierenden PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann mit Antikörperserum gerichtet

gegen HypD, HybG und HybC inkubiert (Abbildung 6; A-C). Wie in Abbildung 6 zu sehen, weist das Sternchen auf ein Referenzprotein hin, welches mittels aller Antikörper nachgewiesen werden konnte. Somit konnte sichergestellt werden, dass alle ermittelten Banden in genau dem gleichen Abstand voneinander standen. Die Abbildung zeigt in der ersten Spur den Zellextrakt der gemeinsam überproduzierten Varianten pro-HybC und HybG und in der zweiten Spur HybC_{proc} und HybG. Diese beiden Proben wurden jeweils mit Antikörpern gegen HypD (Abbildung 6 A), HybG (Abbildung 6 B) und HybC (Abbildung 6 C) inkubiert. In der Abbildung ist zu erkennen, dass sowohl eine Bande für HypD und HybG, als auch pro-HybC und HybG auf der gleichen Migrationshöhe mit den jeweiligen Antikörpern detektiert werden konnten. Somit konnte die Komplexbildung zwischen HypD und HybG, als auch zwischen pro-HybC und HybG, neben den *in vitro*-Experimenten auch unter *in vivo*-Bedingungen bestätigt werden. In Abbildung A könnten die unteren Banden möglicherweise auf einen weiteren Komplex von HypD mit einem Partnerprotein oder einzeln vorkommendes HypD hinweisen. HybG und HybC_{proc} (Abbildung 6 B und C) konnten nicht auf einer gemeinsamen Migrationshöhe nachgewiesen werden. Das ist wiederum ein Indiz dafür, dass HybG kein Komplex mit der gereiften HybC_{proc} Variante bildete. Das C-terminale Peptid scheint die Interaktion zwischen HybG und pro-HybC maßgeblich zu begünstigen.

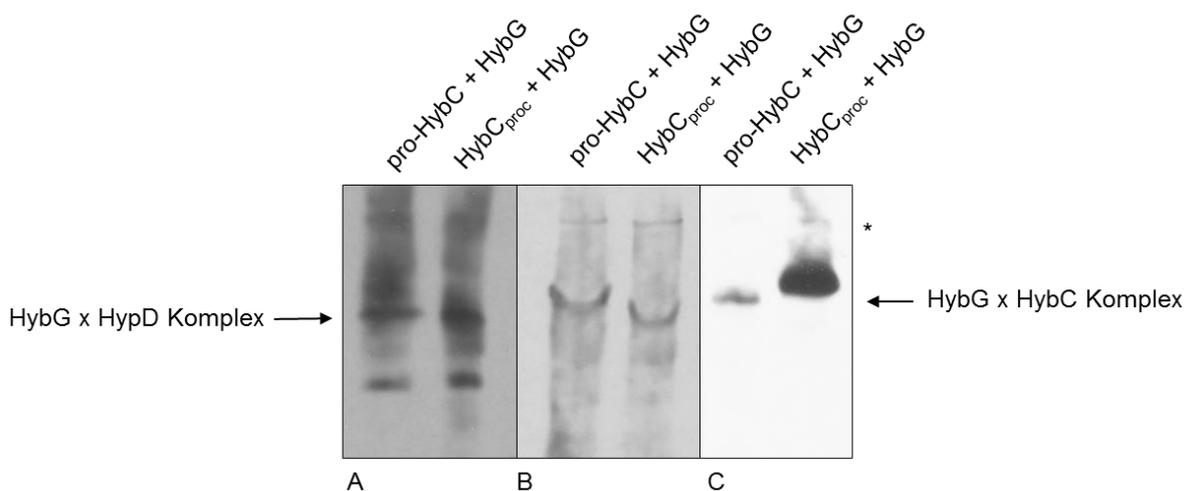


Abbildung 6: Nachweis einer Komplexbildung von pro-HybC-HybG und HybG-HypD mittels Nativgel und anschließendem Western Blot. Die auf den Plasmiden lokalisierten Gene pCAN-hybC und pCAN-hybC_{proc}, wurden jeweils gemeinsam mit pASK-hybG in dem Stamm FTD147Δ*hybD* (Δ*hyaB*Δ*hybC*Δ*hycE*Δ*hybD*) in TB Medium überexprimiert, bei OD₆₀₀ 0,4 mit IPTG und AHT induziert und bei OD₆₀₀ 1 geerntet. Nach dem Aufschluss wurden 100 µg Zellextrakt (α-HypD 1:333 - **A**) und 25 µg Zellextrakt (α-HybG 1:1000 - **B**; α-HybC 1:20000 - **C**) auf ein 10 %iges Nativgel geladen. Danach erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern. Die Pfeile links und rechts der Abbildung zeigen die Komplexbildung von HybG und dem entsprechenden Interaktionspartner. * zeigt ein Referenzprotein, welches durch alle verwendeten Antikörper nachgewiesen werden konnte.

3.2. Einfluss des C-terminalen Peptids der großen Untereinheiten von Hyd-1 und Hyd-2 auf die Hydrogenasereifung

Die Interaktionsanalysen zeigten, dass das C-terminale Peptid an der großen Untereinheit der Hyd-2 (pro-HybC) erforderlich für die Interaktion zwischen dem Reifungsprotein HybG und pro-HybC ist. In welcher Form die Anwesenheit des C-terminalen Peptids die Interaktion begünstigt, ist bisher noch nicht bekannt. Möglicherweise könnte der C-Terminus der großen Untereinheit eine Interaktionsfläche für die Reifungsproteine und die spezifischen Proteasen sein. Um die Rolle des C-Terminus näher analysieren zu können, wurden C-Terminiaustauschvarianten konstruiert. Dazu wurden ausgehend von den Apoformen der großen Untereinheiten pro-HyaB (Hyd-1) und pro-HybC (Hyd-2) Fusionsvarianten konstruiert, die für pro-HyaB mit dem C-Terminus von HybC (pro-HyaB^{HybC}), und für pro-HybC mit dem C-Terminus von HyaB (pro-HybC^{HyaB}) kodieren, an Stelle des eigenen C-Terminus (Abbildung 7).

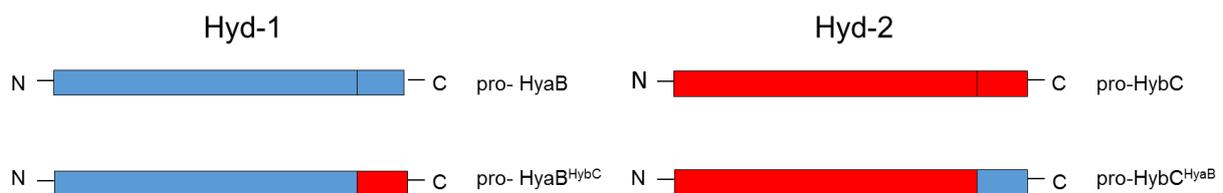


Abbildung 7: Schematische Darstellung der HyaB- und HybC-Varianten. Pro-HyaB (blau) und pro-HybC (rot) sind die Apoformen der großen Untereinheiten der Hyd-1 und Hyd-2. Die Varianten mit jeweils ausgetauschtem C-Terminus werden hier als pro-HyaB^{HybC} (HyaB fusioniert mit dem C-Terminus von HybC) und pro-HybC^{HyaB} (HybC fusioniert mit dem C-Terminus von HyaB) bezeichnet. N und C zeigen die jeweilige Lokalisation des N- und C-Terminus an.

Diese neuen Fusionskonstrukte wurden plasmidkodiert in verschiedene Deletionsstämme eingebracht und hinsichtlich der Auswirkungen auf die Hydrogenaseaktivität analysiert. Zunächst wurden die vier Varianten in dem hydrogenase-defizienten Stamm FTD150 ($\Delta hyaB\Delta hybC\Delta hycE\Delta hyfB-R$) produziert und auf Hydrogenaseaktivität mittels nicht denaturierender PAGE und anschließender Hydrogenaseaktivitätsfärbung untersucht (Abbildung 8).

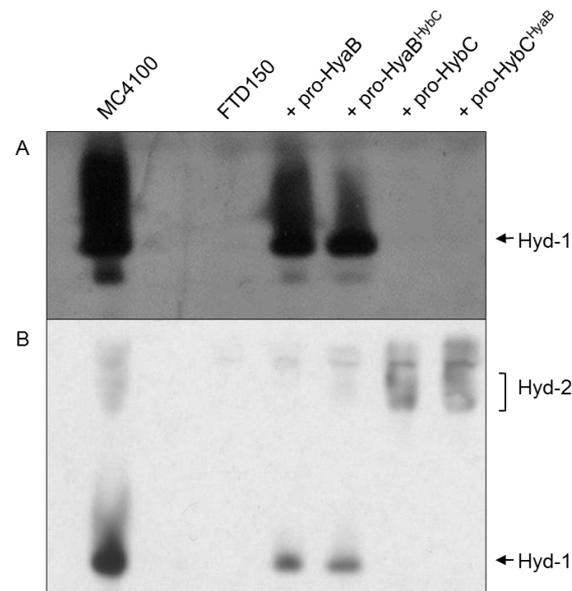


Abbildung 8: Einfluss des Austausches der HyaB-HybC-C-Termini hinsichtlich der Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität. Der Stamm FTD150 ($\Delta hyaB\Delta hybC\Delta hycE\Delta hyf$) mit den jeweiligen Plasmiden, kodierend für pro-HyaB, pro-HybC und die C-Termini-Fusions-Varianten, pro-HyaB^{HybC} und pro-HybC^{HyaB}, wurde anaerob, in Minimalmedium kultiviert. MC4100 (Wildtyp) und FTD150 wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt. Nach dem Aufschluss wurden 50 μ g Zellextrakt auf ein 7,5%iges Nativgel geladen. Im Anschluss erfolgte die Hydrogenaseaktivitätsfärbung mittels NBT/PMS (spezifisch für Hyd-1) (A) und BV/TTC (B) unter 100 % Wasserstoffatmosphäre. Die Pfeile bzw. Klammern zeigen das Migrationsverhalten der jeweiligen Hydrogenase im Nativgel.

In der ersten Spur der Abbildung 8 sind die Wildtyp Hydrogenaseaktivitäten (MC4100) visualisiert. Der Wildtyp Stamm zeigte Aktivitätsbanden für Hyd-1 (Abbildung 8 A und B) und für Hyd-2 (Abbildung 8 B). Der Stamm FTD150 wurde als Negativkontrolle mitgeführt. FTD150 war durch die Deletion der für die großen Untereinheiten der Hydrogenasen kodierenden Gene *hyaB* (Hyd-1), *hybC* (Hyd-2), *hycE* (Hyd-3) und *hyf* (Hyd-4) nicht in der Lage aktive Hydrogenasen zu bilden. In Abbildung 8 A ist die durch NBT/PMS visualisierte Hyd-1-Aktivitätsfärbung zu sehen (Pinske *et al.*, 2012). Diese Aktivitätsfärbung ist im Gegensatz zu dem TTC/BV Aktivitätsnachweis eine für Hyd-1 sehr sensitive Färbemethode. Sowohl die pro-HyaB, als auch die pro-HyaB^{HybC} Variante führten zu einer deutlich erkennbaren Hyd-1-Aktivitätsbande, die allerdings schwächer als bei dem Wildtyp erscheint. Gleiches gilt für pro-HybC und pro-HybC^{HyaB}, beide Varianten führten zu einer Hyd-2 Aktivität (Abbildung 8 B). Scheinbar unabhängig von dem C-Terminus führten die neuen Fusionsvarianten zu aktiven Hyd-1 und Hyd-2.

3.2.1. Analysen zur Endoprotease-Spezifität bedingt durch das C-terminale Peptid der großen Untereinheiten

Nachdem die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe und das Nickel in das aktive Zentrum der großen Untereinheit inseriert wurden, wird das C-terminale Peptid der großen Untereinheiten von

Hyd-1 und Hyd-2 durch die spezifischen Proteasen HyaD (Hyd-1) bzw. HybD (Hyd-2) prozessiert. Um zu analysieren, ob das C-terminale Peptid möglicherweise eine wichtige Erkennungssequenz bzw. Interaktionsstelle für die spezifischen Proteasen bei der Prozessierung sein könnte, wurden die vier Varianten der großen Untereinheiten in Proteasedeleitionsstämmen überproduziert und hinsichtlich der Hydrogenaseaktivität analysiert. In diesem Versuch wurde zusätzlich zu der Analyse der Hydrogenaseaktivität, mittels Western Blot überprüft, ob die einzelnen Varianten trotz möglichen Mangels an Enzymaktivität, produziert werden.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse zu der Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von HyaD, der Hyd-1-spezifischen Protease (Rossmann *et al.*, 1995) präsentiert. Nach Transformation des Stammes FTD150 Δ *hyaD* mit den entsprechenden Plasmiden führte keine der Varianten zu einer Hyd-1 Aktivität (Abbildung 9 A). Der Western Blot zeigte, dass die pro-HyaB-Varianten produziert wurden (Abbildung 9 B), aber scheinbar durch die Abwesenheit der für Hyd-1 spezifischen Protease HyaD keine Prozessierung erfolgte und somit keine Hydrogenaseaktivität visualisierbar war.

Abbildung 9 C zeigt die spezifische Aktivitätsfärbung für Hyd-2 und Abbildung 9 D die Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen Hyd-2. Sowohl pro-HybC als auch pro-HybC^{HyaB} wurden durch die chromosomal kodierte, für Hyd-2 spezifische Protease HybD, prozessiert, da eine Hyd-2 Aktivität für beide Konstrukte nachweisbar war. Die Western Blot Analyse zeigte für beide pro-HybC Varianten prozessiertes HybC und prozessiertes HybO (kleine Untereinheit der Hyd-2). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass nach der Prozessierung die Dimerisierung mit der kleinen Untereinheit HybO stattfand und eine aktive Hydrogenase visualisiert werden konnte. Im Western Blot fällt trotzdem auf, dass die pro-HybC^{HyaB}-Variante zu einer Akkumulation von ungereiftem HybO (pre-HybO) führte (Abbildung 9 D).

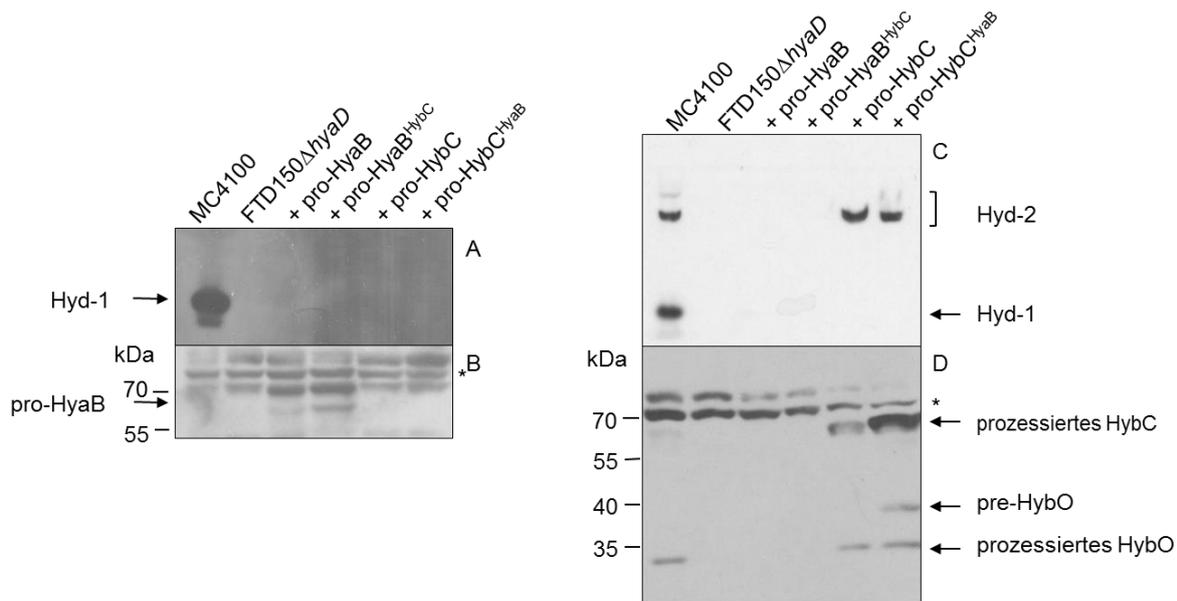


Abbildung 9: Einfluss einer Deletion des *hyaD*-Gens auf die C-Termini Austauschvarianten hinsichtlich der Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität. Der Stamm FTD150 Δ *hyaD* (Δ *hyaB* Δ *hybC* Δ *hycE* Δ *hyf* Δ *hyaD*) mit den jeweiligen Plasmiden, kodierend für pro-HyaB, pro-HybC und die C-Termini-Fusions-Varianten, pro-HyaB^{HybC} und pro-HybC^{HyaB}, wurde anaerob, in Minimalmedium kultiviert. MC4100 (Wildtyp) und FTD150 Δ *hyaD* wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt. Es wurden 50 μ g Zellextrakt auf ein 7,5%iges Nativgel geladen und die Polypeptide elektrophoretisch getrennt. Im Anschluss erfolgte eine Hydrogenaseaktivitätsfärbung mittels PMS/NBT (A) und BV/TTC (C) unter 100 % Wasserstoffatmosphäre. Die gleichen Proben wurden mittels SDS-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und diese mit α -HyaB (1:5000; B) und α -HybC (1:20000; D) inkubiert. Die Pfeile bzw. Klammern zeigen das Migrationsverhalten der jeweiligen Hydrogenase im Nativgel und der großen und kleinen Untereinheit im SDS-Gel. Die * Markierung zeigt eine undefinierbare Kreuzreaktion der Antikörper.

In weiteren Versuchsreihen wurden alle vier Varianten in einem für die Hyd-2 spezifischen Protease Deletionsstamm (FTD150 Δ *hybD*) überproduziert und ebenfalls via Western Blot die Produktion und via Hydrogenaseaktivitätsfärbung die Aktivitäten visualisiert. Abbildung 10 A zeigt, dass die chromosomal kodierte Protease HyaD lediglich pro-HyaB, jedoch nicht die pro-HyaB^{HybC} Variante prozessieren konnte und somit war auch keine Hyd-1 Enzymaktivität detektierbar. Allerdings konnten beide Varianten via Western Blot mit einem gegen HyaB gerichteten Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 10 B). Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 10 C, dass weder die pro-HybC- noch die pro-HybC^{HyaB}-Variante zu einer Hyd-2 Aktivität in einem *hybD*-Deletionshintergrund führte. Dennoch wurden beide Varianten, wie im Autoradiogramm zu sehen ist, gebildet. Darüber hinaus fand eine Akkumulation von pre-HybO statt (Abbildung 10 D). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die große Untereinheit nicht vollständig prozessiert wurde.

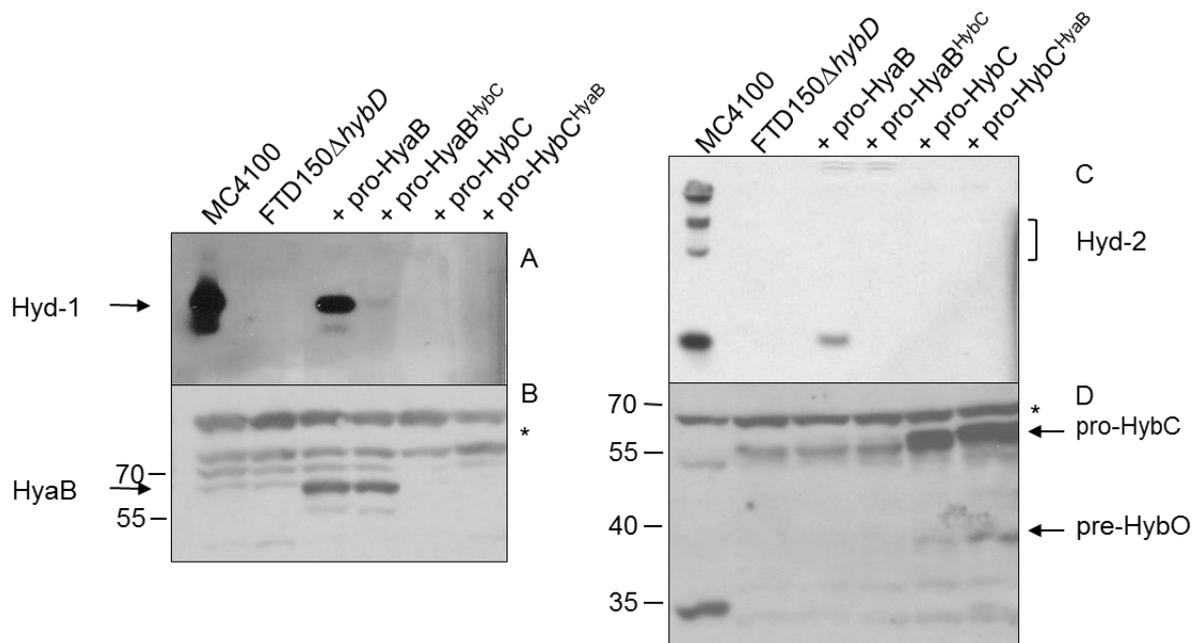


Abbildung 10: Einfluss einer Deletions des *hybD*-Gens, auf die C-Termini Austauschvarianten hinsichtlich der Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität. Der Stamm FTD150 Δ *hybD* (Δ *hyaB* Δ *hybC* Δ *hycE* Δ *hyf* Δ *hybD*) mit den jeweiligen Plasmiden, kodierend für pro-HyaB, pro-HybC und die C-Termini-Fusions-Varianten, pro-HyaB^{HybC} und pro-HybC^{HyaB}, wurde anaerob, in Minimalmedium kultiviert. MC4100 (Wildtyp) und FTD150 Δ *hybD* wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt. Nach dem Aufschluss wurden 50 μ g Zellextrakt auf ein 7,5%iges Nativgel geladen. Im Anschluss erfolgte die Hydrogenaseaktivitätsfärbung mittels PMS/NBT (A) und BV/TTC (C) unter 100 % Wasserstoffatmosphäre. Die gleichen Proben wurden mittels SDS-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und diese mit α -HyaB (1:5000; B) und α -HybC (1:20000; D) inkubiert. Die Pfeile bzw. Klammern zeigen das Migrationsverhalten der jeweiligen Hydrogenase im Nativgel und der großen und kleinen Untereinheit im SDS-Gel. Die * Markierung zeigt eine undefinierbare Kreuzreaktion der Antikörper.

Abschließend zu diesen Versuchen konnte festgestellt werden, dass das C-terminale Peptid *per se* vermutlich keine Erkennungssequenz für die spezifischen Proteasen darstellt. Nichtsdestotrotz hat der C-Terminus von HybC einen erheblichen Einfluss auf die Fähigkeit der Prozessierung von HyaB, und führt zu einer Abhängigkeit der HyaB^{HybC}-Variante von beiden Proteasen.

3.2.2. Untersuchungen zur Aktivierung der Fusionsvariante HybC^{HyaB} durch die HybG-Hyp-Maschinerie

In einem nächsten Schritt sollte die Rolle des C-Terminus als Interaktionsfläche für die Reifungsproteine HybG und HypC näher studiert werden. Dazu wurden die vier Fusionsvarianten der großen Untereinheiten der Hyd-1 und Hyd-2 in einem *hybG*-defizienten Stamm FTD150 Δ *hybG* produziert und auf Hydrogenaseaktivität mittels nicht denaturierender PAGE und anschließender Hydrogenaseaktivitätsfärbung analysiert. Ohne HybG stünde

noch das für Hyd-3 und Hyd-1 spezifische Reifungsprotein HypC zur Verfügung. Sollte der C-Terminus die Interaktionsfläche für die Reifungsproteine HybG und HypC sein, könnte möglicherweise durch die Fusion des C-Terminus von HyaB (Hyd-1) an HybC (Hyd-2) die Hydrogenaseaktivität beeinflusst werden.

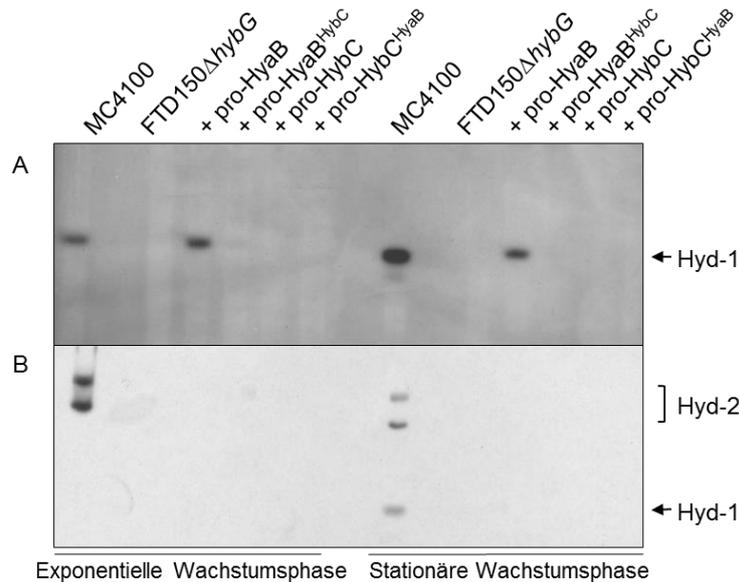


Abbildung 11: Analyse der HybG-abhängigen Aktivierung von den Hydrogenase-Fusionsvarianten. Der Stamm FTD150 Δ hybG (Δ hyaB Δ hycE Δ hyf Δ hybG) mit den jeweiligen Plasmiden, kodierend für pro-HyaB, pro-HybC und die C-Termini-Fusionsvarianten, pro-HyaB^{HybC} und pro-HybC^{HyaB}, wurde anaerob, in Minimalmedium kultiviert. MC4100 (Wildtyp) und FTD150 wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt. Es wurden jeweils Proben in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase entnommen. Nach dem Aufschluss wurden 50 μ g Zellextrakt auf ein 7,5%iges Nativgel aufgetragen. Im Anschluss an der Elektrophorese erfolgte eine Hydrogenaseaktivitätsfärbung mittels PMS/NBT (A) und BV/TTC (B) unter 100 % Wasserstoffatmosphäre. Die Pfeile bzw. Klammern zeigen das Migrationsverhalten der jeweiligen Hydrogenase im Nativgel.

In dem Versuch wurden als Kontrollen der Wildtyp (MC4100) und der Deletionsstamm FTD150 Δ hybG mitgeführt. Es wurden Proben sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Wachstumsphase entnommen, aufgeschlossen, über ein Nativgel gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Hydrogenaseaktivität geprüft. Der Wildtyp zeigte Hyd-1 und Hyd-2 Aktivitätsbanden. Bei dem Deletionsstamm war keine Hydrogenaseaktivität detektierbar, da sowohl die Gene, kodierend für die großen Untereinheiten von Hyd-1, Hyd-3 und Hyd-4, als auch das Gen, kodierend für das Reifungsprotein HybG, deletiert waren. In einem *hybG*-Deletionsstamm ist das chromosomal kodierte Reifungsprotein HypC noch vorhanden und könnte möglicherweise aufgrund des fusionierten HyaB C-Terminus die pro-HybC^{HyaB}-Variante aktivieren. In Abbildung 11 zeigt sich allerdings, dass HypC weder pro-HybC, noch die beiden Fusionsvarianten pro-HyaB^{HybC} und pro-HybC^{HyaB} aktivieren konnte. Neben dem Wildtypstamm MC4100 zeigte nur der mit pro-HyaB komplementierte *hybG*-Deletionsstamm eine Hyd-1 Aktivität (Abbildung 11 A).

Daraus lässt sich schließen, dass HybG trotz des ausgetauschten C-Terminus an HybC (pro-HybC^{HyaB}) zur Aktivierung der Hyd-2-Fusionsvariante maßgeblich beiträgt. Da die HyaB^{HybC}-Variante ebenfalls keine Aktivität in der *hybG*-Mutante zeigte, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass durch den Transfer des C-Terminus von HybC auf HyaB eine HybG-Abhängigkeit entsteht. Um diese These weiter zu unterstützen, wurden die Fusionsvarianten zusätzlich in einen *hypC*-Deletionsstamm überproduziert und genau wie im vorhergehenden Experiment auf Hydrogenaseaktivität untersucht. Abbildung 12 zeigt deutlich, dass chromosomal kodiertes HybG in der exponentiellen Wachstumsphase pro-HybC und pro-HybC^{HyaB} aktivieren konnte (Abbildung 12 B). Jedoch führte lediglich die Wildtyp Variante pro-HyaB in einem *hypC*-Deletionsstamm zu einer aktiven Hyd-1, da HybG in der Lage ist auch Hyd-1 zu aktivieren (Blokesch *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis bestätigt, dass pro-HybC^{HyaB} weiterhin durch HybG aktiviert wurde. Überraschenderweise benötigt aber die pro-HyaB^{HybC}-Variante sowohl HybG, als auch HypC zur Hydrogenasereifung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der C-Terminus an der großen Untereinheit (HybC) nicht zwangsläufig als Interaktionsfläche für die Reifungsproteine fungiert, aber dennoch eine wichtige Rolle bei der Reifung spielt.

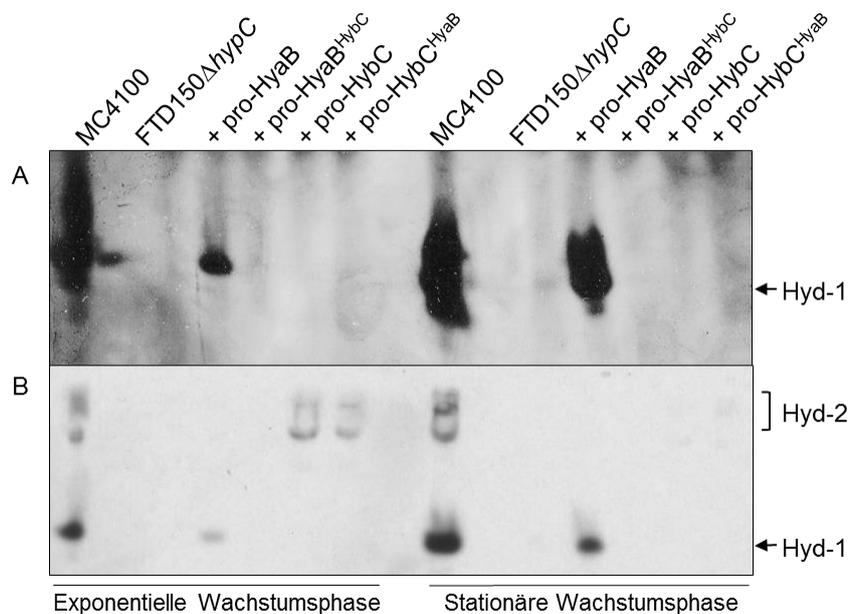


Abbildung 12: Nachweis einer von HybG und HypC abhängigen Reifung der pro-HyaB^{HybC}-Variante. Der Stamm FTD147 Δ hypC (Δ hyaB Δ hybC Δ hyf Δ hypC) mit den jeweiligen Plasmiden, kodierend für pro-HyaB, pro-HybC und die C-Termini-Fusions-Varianten, pro-HyaB^{HybC} und pro-HybC^{HyaB}, wurde anaerob, in Minimalmedium kultiviert. MC4100 (Wildtyp) und FTD150 wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen mitgeführt. Es wurden jeweils Proben in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase entnommen. Nach dem Aufschluss wurden 50 μ g Zellextrakt auf ein 7,5%iges Nativgel geladen und die Protein-Komplexe elektrophoretisch getrennt. Im Anschluss erfolgte die Hydrogenaseaktivitätsfärbung mittels PMS/NBT (A) und BV/TTC (B) unter 100 % Wasserstoffatmosphäre. Die Pfeile bzw. Klammern zeigen das Migrationsverhalten der jeweiligen Hydrogenase im Nativgel.

3.3. Nachweis einer Konformationsänderung der großen Untereinheit nach der Prozessierung des C-terminalen Peptids

Eine Interaktion zwischen dem Reifungsprotein HybG und der Apoform der großen Untereinheit pro-HybC ist bereits bekannt (Blokesch *et al.*, 2001). HybG kann jedoch keinen Komplex mit der gereiften, prozessierten großen Untereinheit der Hyd-2 eingehen. Das C-terminale Peptid scheint dabei eine maßgebliche Rolle zu spielen. Durch vorangegangene Ergebnisse wurde der C-Terminus als Hauptinteraktionsfläche für HybG ausgeschlossen. Wie schon Drapal und Böck, 1998 für das Hyd-3 spezifische Reifungsprotein HypC und die große Untereinheit der Hyd-3, HycE, vermuteten, könnte eine Konformationsänderung nach der Prozessierung erfolgen und somit wäre keine Interaktion zwischen dem Reifungsprotein und der prozessierten großen Untereinheit möglich. Für die Analyse einer möglichen Konformationsänderung wurden die Apoform der großen Untereinheit, pro-HybC, und die genetisch prozessierte Variante, HybC_{proc}, einer limitierten Proteolyse unterzogen. Bei der eingesetzten Protease handelte es sich um Trypsin. Trypsin spaltet Peptide nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (Perry *et al.* 2005). Solange diese Bereiche des Proteins frei zugänglich sind, kann eine proteolytische Spaltung durch Trypsin erfolgen. Sollten diese Bereiche nicht frei zugänglich sein, z. B. durch mögliche Strukturveränderungen oder Komplexbildungen mit anderen Proteinen, ist die proteolytische Spaltung durch Trypsin nur eingeschränkt möglich.

3.3.1. Genetisch prozessiertes HybC zeigt eine höhere Stabilität gegenüber der Protease Trypsin

Der Proteaseverdauansatz bestand aus dem Proteasepuffer (siehe 2.10.1) und 100 µg Protein, welches mit 1 µg der Protease versetzt wurde. Die Protease wurde als letztes hinzugefügt und sogleich die Nullprobe entnommen. Um die Auswirkung der Trypsinolyse auf die HybC-Reifungsvarianten (pro-HybC und HybC_{proc}) im Detail beobachten zu können, wurden dem Ansatz Proben in regelmäßigen Abständen über 2 h entnommen und mittels SDS-PAGE (Abbildung 13) analysiert. In Abbildung 13 ist linksseitig der Trypsinverdau der Apoform, pro-HybC, über 2 h dargestellt und rechtsseitig ist der Trypsinverdau der genetisch prozessierten Variante, HybC_{proc}, zu sehen. Trypsin scheint nicht in der Lage zu sein, HybC_{proc} zu spalten. Demzufolge scheint die Mehrheit der Lysine und Arginine geschützt und somit unzugänglich für Trypsin vorzuliegen. Im Vergleich zwischen Anfang und Ende des Trypsinsverdaus war am Ende weniger HybC_{proc} vorhanden, was wiederum auf den Abbau von nicht richtig gefaltetem Protein zurückzuführen sein könnte. Im Gegensatz dazu wurde die Apoform, pro-HybC (Abbildung 13, links), binnen 2 h nahezu vollständig durch Trypsin abgebaut. Die unterschiedlichen Auswirkungen des Trypsins auf die pro-HybC- und HybC_{proc}-Varianten lassen vermuten, dass eine starke Konformationsänderung der großen

Untereinheit nach der Prozessierung des C-terminalen Peptids stattfinden muss. Ähnliche Beobachtungen wurden auch unter Verwendung anderer Proteasen, wie Chymotrypsin und GluC festgestellt (siehe Anhang Abbildung 32 auf Seite 100 und Abbildung 33 auf Seite 101).

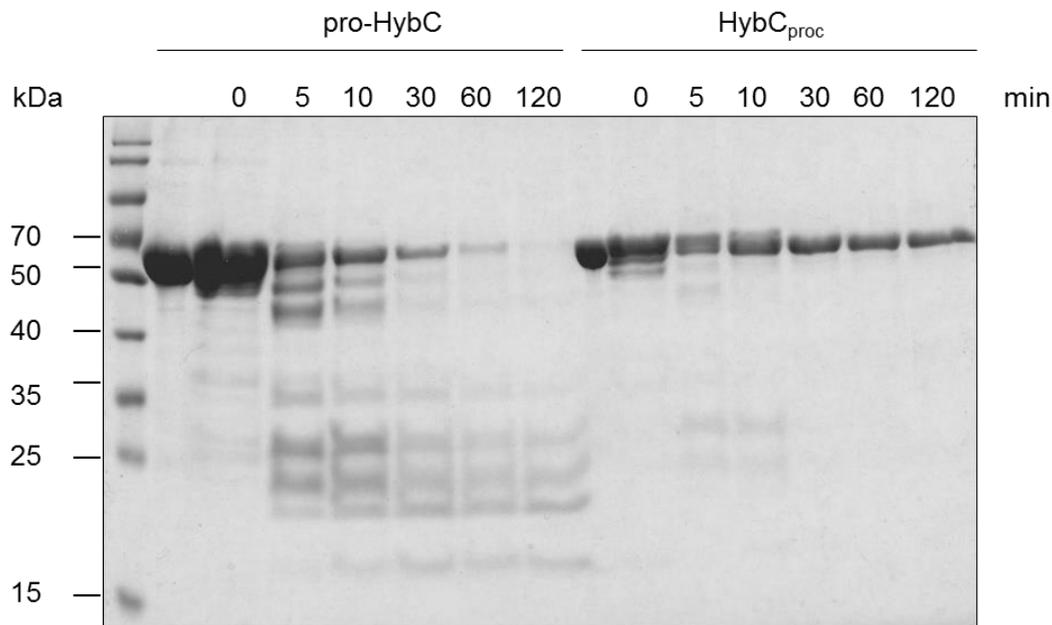


Abbildung 13: SDS-PAGE-Analyse der limitierten Proteolyse von gereinigtem pro-HybC und HybC_{proc}. Für die limitierte Proteolyse wurden 100 µg gereinigtes pro-HybC bzw. HybC_{proc} und 1 µg Trypsin verwendet. Die Trypsin-Inkubation erfolgte bei 37 °C. Nach Zugabe von Trypsin wurden in regelmäßigen Abständen 10 µl Probe (10 µg) entnommen, sofort in SDS-Probenpuffer gekocht und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Färbung erfolgte mit PAGE *Blue Protein staining solution* (ThermoFisher Scientific). Vor der Nullprobe wurde immer jeweils das Protein nochmal ohne Trypsin, nur in SDS-Probenpuffer gelöst und gekocht, aufgetragen.

3.3.2. HybG stabilisiert pro-HybC und verhindert den proteolytischen Abbau durch Trypsin

Nachdem mittels limitierter Proteolyse Hinweise für eine Konformationsänderung nach dem Einbau des NiFe(CN)₂CO-Kofaktors und der anschließenden Prozessierung des C-terminalen Peptids gefunden werden konnten, wurde eine weitere limitierte Proteolyse mit pro-HybC in der Anwesenheit von HybG durchgeführt. Dabei wurden beide Interaktionspartner gemeinsam einer Trypsinolyse unterzogen. Als Kontrolle wurde in diesem Experiment in einem zusätzlichen Ansatz pro-HybC zusammen mit dem Hyd-3 spezifischen Reifungsprotein HypC einer limitierten Proteolyse unterzogen. Es ist bereits bekannt, dass diese beiden Proteine nicht interagieren. Das Reifungsprotein HypC aktiviert die großen Untereinheiten HyaB (Hyd-1) und HycE (Hyd-3), nicht jedoch HybC (Hyd-2) (Magalon und Böck, 2000a; Drapal und Böck, 1998). In dem Versuchsansatz wurden zunächst beide potentiellen Interaktionspartner gemischt (pro-HybC+HypC und pro-HybC+HybG), für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und dann die limitierte Proteolyse durch Zugabe von Trypsin

und Inkubation bei 37 °C begonnen. Wie auch schon in dem Versuch unter 3.3.1 wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, der Trypsinverdau gestoppt und via SDS-PAGE analysiert (Abbildung 14). In der Abbildung ist linksseitig die Auswertung der Trypsinolyse von pro-HybC und HypC zu sehen. Wie in der Abbildung zu beobachten, wurde pro-HybC über einen Zeitraum von 2 h, wie auch schon in dem Experiment unter 3.3.1 fast vollständig durch Trypsin abgebaut. Ebenso HypC, welches auch komplett verdaut wurde. Im Vergleich dazu, zeigte die Analyse der limitierten Proteolyse des Komplexes aus pro-HybC und HybG ein sehr differenziertes Migrationsmuster zu dem Referenzversuch (pro-HybC+HypC). Pro-HybC, im Komplex mit HybG, wurde offensichtlich durch Trypsin nur begrenzt abgebaut. Das Bandenmuster ähnelt dem aus Abbildung 13 unter 3.3.1 im Fall für HybC_{proc.} Die sichtbaren Abbaubanden könnten ausgehend von ungebundenen pro-HybC entstanden sein. Ungebundenes pro-HybC scheint binnen 60 min abgebaut worden zu sein. Nach 120 min waren nur noch Banden für unverdautes pro-HybC und HybG detektierbar. Aufgrund der Abbaubanden in den vorherigen Spuren könnte vermutet werden, dass die Probe nach 120 min nur noch den Komplex aus pro-HybC und HybG enthält und somit jeglicher Abbau durch Trypsin gehemmt wird. HybG scheint pro-HybC zu stabilisieren und teilweise vor dem Trypsinverdau zu schützen.

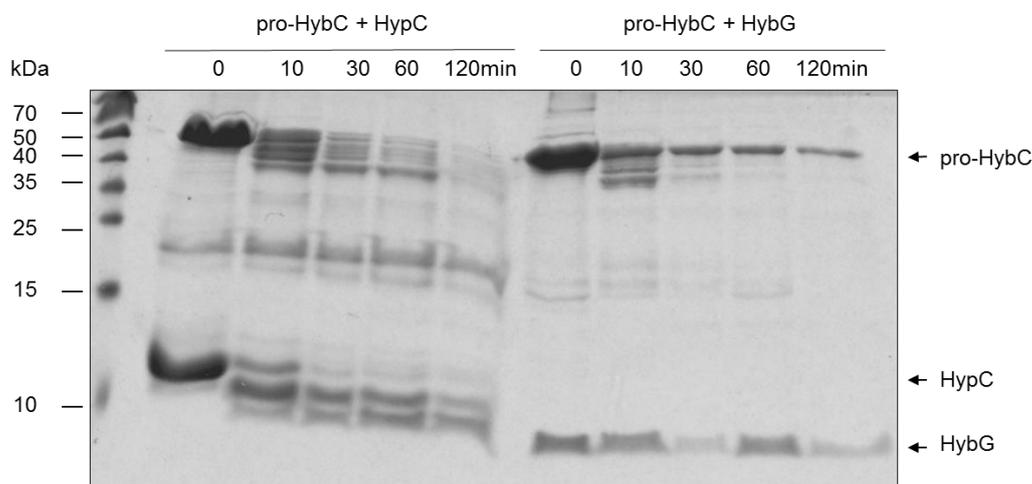


Abbildung 14: SDS-PAGE Analyse der limitierten Proteolyse von pro-HybC + HypC und pro-HybC + HybG. Für die limitierte Proteolyse wurden 100 µg pro-HybC und jeweils 50 µg HypC bzw. HybG und 1 µg Trypsin verwendet. Nach 10 minütiger Inkubation der beiden Proteine im Messpuffer, wurde 1 µg Trypsin hinzugegeben, die Nullprobe entnommen und die restliche Trypsin-Proteinlösung bei 37 °C im Thermoblock inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 10 µl Probe (15 µg) entnommen, sofort in SDS-Probenpuffer gekocht und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Färbung erfolgte mit PAGE *Blue Protein staining solution* (ThermoFisher Scientific).

Es wurde bereits publiziert, dass HypC gemeinsam mit HypD in einem Komplex die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe an die große Untereinheit der Hyd-3 (HycE) liefert (Bürstel *et al.*, 2012; Soboh *et al.*, 2012; Blokesch und Böck, 2002). Gleiches gilt auch für das Reifungsprotein HybG, welches ebenfalls gemeinsam mit HypD die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe an die große Untereinheit der Hyd-2 (HybC) liefert (Soboh *et al.*, 2014; Butland *et al.*, 2006; Blokesch *et al.*, 2001). Die durch Watanabe *et al.*, 2012 gelöste Kristallstruktur zeigt die Region in der HypC und HypD miteinander interagieren (Abbildung 16). In der Abbildung ist HypD grau markiert und HypC grün/ blau markiert. Der blaue Bereich in HypC stellt die Interaktionsfläche zu HypD dar (Aminosäuren 47-59). Aus der Abbildung geht außerdem hervor, dass alle drei identifizierten variablen Bereiche während der Komplexbildung mit HypD frei zugänglich liegen (Abbildung 16). Später werden die variablen Bereiche noch näher charakterisiert. Es könnte sich dabei um Aminosäurepositionen handeln, die für die Übertragung der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe als potentielle Interaktionsflächen mit der großen Untereinheit dienen. Aus diesem Grund wurden gezielt Aminosäuren in diesen Bereichen ausgetauscht, deletiert bzw. inseriert, um möglicherweise mit neu konstruierten HybG Varianten auch Hyd-3 zu aktivieren und mit neuen HypC Varianten Hyd-2 zu aktivieren.

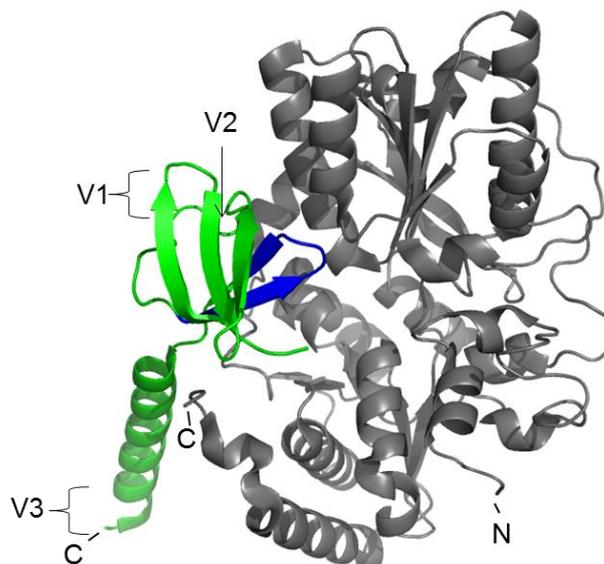


Abbildung 16: Quartärstruktur des HypD-HypC Komplexes aus *T. kodakarensis* (PDB:3VYR). Die Bearbeitung der Struktur wurde mit dem Programm Pymol durchgeführt. Hier grau dargestellt ist das Reifungsprotein HypD und grün/blau dargestellt ist das Reifungsprotein HypC. Blau markierte Bereiche in HypC zeigen die Interaktionsfläche mit HypD. Die variablen Bereiche des HypC-Proteins sind mit V1-V3 gekennzeichnet.

3.4.1. Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HybG und deren Auswirkung auf die Hydrogenasereifung

Mittels des Programms Phyre-2 konnte eine theoretische Struktur von HybG aus *E. coli* mit Hilfe von Sequenzvergleichen erstellt werden (Abbildung 17). Die Abbildung zeigt vier β -

Faltblätter (Glycin 7-Glycin 13; Leucin 19-Valin 24; Isoleucin 27- Asparagin 36; Glycin 46-Valin 49) und eine C-terminale α -Helix (ab Glutaminsäure 62). In der Struktur sind der variable Bereich 1 (V1) grau, der variable Bereich 2 (V2) schwarz und der variable Bereich 3 (V3) gelb dargestellt.

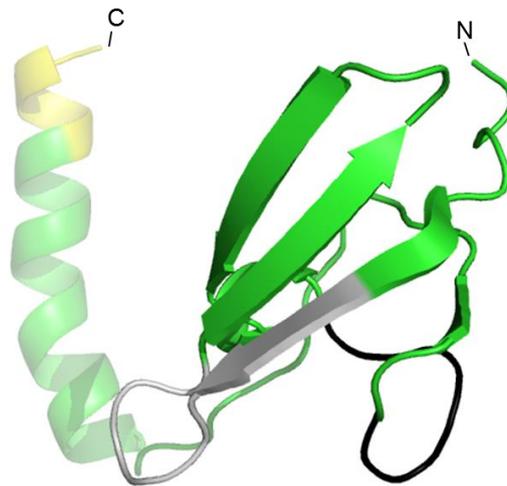


Abbildung 17: Tertiärstruktur des Reifungsproteins HybG. Die Struktur wurde durch das Programm Phyre-2 erstellt. Dafür wurde die Sequenz des Proteins mit bereits kristallisierten Proteinen verglichen. Variable Region 1 (V1) ist grau, Variable Region 2 (V2) ist schwarz und Variable Region 3 (V3) ist gelb dargestellt.

Ausgehend von dem Wildtyp HybG wurden gezielt Aminosäureaustausche in den variablen Bereichen vorgenommen, um die Ähnlichkeit zwischen HybG und HypC zu erhöhen. Unter Abbildung 18 sind alle konstruierten HybG Varianten im Vergleich zu Wildtyp HybG und Wildtyp HypC aufgelistet. Rot markierte Positionen zeigen Insertionen (rot markierte Aminosäuren) und Deletionen (rot markierte --). Die Varianten wurden, wie im Folgenden beschrieben, benannt. HybG^{Strep} +GS enthält Aminosäureinsertionen (+GS) nach Position 36, bei HybG^{Strep} -HQL sind die Aminosäuren (-HQL) von Position 7-9 deletiert, HybG^{Strep} +GS/-HQL enthält eine Kombination aus den beiden vorherigen Aminosäureaustauschvarianten, bei HybG^{Strep} Y_{Stopp} wurde durch Einführung eines Stoppkodons an Position 77 der C-Terminus verkürzt, HybG^{Strep} +GS/-HQL/Y_{Stopp} ist eine Kombination aus den bereits genannten Varianten, HybG^{Strep} -CEGN enthält eine Deletion der Aminosäuren an Position 37-40.

hervorrufen zu können. Einführung des nativen HypC-Proteins liefert hingegen eine starke Hyd-3-Aktivitätsbande. Wie bereits durch Blokesch *et al.*, 2001 bestätigt, aktiviert HypC Hyd-1 und Hyd-3, nicht jedoch Hyd-2. Außerdem war auffällig, dass die -CEGN Variante scheinbar jegliche Funktion, hinsichtlich der Aktivierung der großen Untereinheiten, einstellte. Die Komplementation des Deletionstammes durch diese Variante brachte keine aktiven Hydrogenasen hervor.

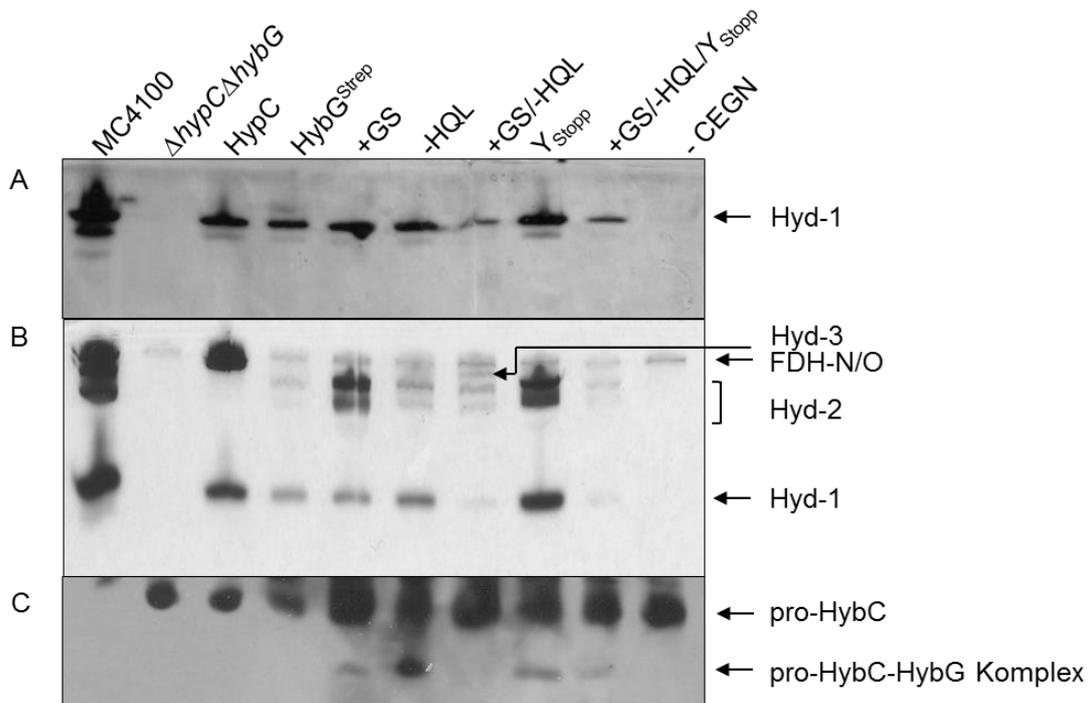


Abbildung 19: Einfluss verschiedener Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HybG und deren Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität. Die verwendeten Stämme sind Wildtyp (MC4100), $\Delta hypC \Delta hybG$, $\Delta hypC \Delta hybG$ komplementiert mit pJA1021 (HypC), phybG^{Strep} (HybG^{Strep}), phybG^{Strep}+GS (+GS), phybG^{Strep}-HQL (-HQL), phybG^{Strep}+GS/-HQL (+GS/-HQL), phybG^{Strep} – Y_{Stopp} (Y_{Stopp}), phybG^{Strep} +GS/-HQL/Y_{Stopp} (+GS/-HQL/Y_{Stopp}), phybG^{Strep} –CEGN (-CEGN). Die Zellanzucht erfolgte anaerob in Minimalmedium. Die Zellernte erfolgte in der stationären Wachstumsphase (OD>1). Nach dem Aufschluss wurden 50 µg Zellextrakt auf ein 6%iges Nativgel geladen. Im Anschluss wurde die Hydrogenaseaktivitätsfärbung mittels PMS/NBT (A) oder BV/TTC (B) durchgeführt. Die gleichen Proben wurden mittels Nativgel gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und diese mit α -HybC-Antikörper (1:20000; C) inkubiert. Die Pfeile bzw. Klammern zeigen das Migrationsverhalten der jeweiligen Hydrogenase bzw. des mutmaßlichen pro-HybC-HybG-Komplexes im Nativgel.

Abbildung 19 C zeigt eine Immunoblotdetektion nach einer Western Blot-Analyse des durch die verschiedenen HybG-Varianten komplementierten *hypC-hybG* Deletionstammes, inkubiert mit einem gegen Hyd-2 gerichteten Antikörper. Das Autoradiogramm detektierte eine schnellmigrierende Bande, die bereits durch Blokesch *et al.*, 2001 als pro-HybC-HybG Komplex identifiziert wurde und nun auch bei den HybG Varianten +GS, -HQL, Y_{Stopp} und +GS/-HQL/Y_{Stopp} in dieser Arbeit detektiert werden konnte. Diese Varianten waren auch funktionsfähig und in der Lage HybC (Hyd-2) zu aktivieren. Allerdings könnte die

Akkumulation des Apo-Reifungskomplexes darauf hindeuten, dass die Übertragung der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe nicht effizient ablief, im Vergleich zum Stamm MC4100 oder der HybG Wildtyp Variante.

3.4.2. Analyse der Auswirkungen der HybG-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität der Deletionsstämme

Alle via Nativgel getesteten Stämme wurden zusätzlich per Gaschromatographie auf ihre Fähigkeit Wasserstoff durch den FHL-Komplex zu produzieren überprüft. Mittels Gaschromatographie konnte der Wasserstoff, den die intakten Zellen via FHL-Komplex aus dem Substrat Formiat in Abhängigkeit von der Zeit bilden, gemessen werden. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse dargestellt. Der Wildtyp (MC4100) erreichte eine Aktivität von $2,1 \text{ mU H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$ und wurde somit als 100 % gesetzt. Im Gegensatz dazu erreichte die Komplementation des $\Delta\text{hypChybG}$ -Deletionsstammes mit dem plasmidkodierten nativen HypC noch ca. 70 % der Aktivität des Wildtyps. Die Komplementation mit plasmidkodiertem HybG diente als Negativkontrolle, da HybG *per se* Hyd-3 nicht aktivieren kann und somit keine Hyd-3 Aktivität messbar sein dürfte. Die HybG-Variante -GS/+HQL, welche im Nativgel zu einer Hyd-3 Aktivitätsbande führte (siehe Abbildung 19), erreichte ca. 15 % der FHL-Aktivität des Wildtyps. Die Komplementation mit den plasmidkodierten Varianten -HQL, Y_{Stopp} und +GS/-HQL/ Y_{Stopp} zeigten zwischen 3 und 10 % der Aktivität des Wildtyps. Die Varianten +GS und -CEGN führten auch in diesem Versuch zu keiner messbaren Aktivität des FHL-Komplexes. Die gaschromatographischen Analysen bestätigten die im Nativgel erzielten Beobachtungen (Abbildung 19), dass Hyd-3 durch die HybG-Variante -GS/+HQL gereift werden konnte. Zusätzlich zeigte es, dass FHL-Aktivitäten, die unter 10 % des Wildtypniveaus erreichen, durch eine via Nativgel vermittelte Hyd-3-Aktivitätsfärbung nicht visualisierbar sind. Diese Ergebnisse bestätigten, dass durch den Austausch gezielter Aminosäurereste in HybG die Hyd-3 teilweise reifen und offensichtlich mit der großen Untereinheit, HycE, interagieren kann.

Tabelle 11: Einfluss der verschiedenen HybG-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität.

Stamm/ HybG Variante	mU H ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein	Standardabweichung mU H ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein	%
MC4100	2,14	0,48	100
$\Delta hypC\Delta hybG$	0	0	0
HypC	1,55	0,38	72,31
HybG ^{Strep}	0,08	0,03	3,96
-HQL	0,08	0,04	3,94
+GS	0	0	0
+GS/-HQL	0,31	0,09	14,63
Y _{Stopp}	0,11	0,08	5,02
+GS/-HQL/Y _{Stopp}	0,21	0,05	10
-CEGN	0	0	0

Die Daten beruhen auf mindestens zwei Wiederholungen. Die spezifische Aktivität des FHL-Komplexes wird in der Tabelle als mU H₂ min⁻¹ mg⁻¹ Protein angegeben.

3.4.3. Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HypC und deren Auswirkung auf die Hydrogenasereifung

HypC ist neben HybG ein wichtiges Reifungsprotein und liefert die Fe(CN)₂CO-Gruppe an die große Untereinheit der Hyd-1 (HyaB) und Hyd-3 (HycE). Nachdem eine HybG-Variante identifiziert wurde, die in der Lage ist Hyd-3 zu aktivieren (siehe Abbildung 19 B, Variante +GS/-HQL), wurde auch HypC durch Austausch von Aminosäureresten modifiziert, um möglicherweise Hyd-2 zu aktivieren. Wang *et al.*, 2007 konnten die Kristallstruktur von HypC aus *E. coli* bereits lösen (Abbildung 20). Die Kristallstruktur zeigt fünf β -Faltblätter (Glycin 4- Isoleucin 12; Glutamin 16- Asparaginsäure 20; Glutamin 25- Asparaginsäure 29; Glutamin 46- Histidin 52; Phenylalanin 54- Isoleucin 59) und zwei α -Helices am C-Terminus (Asparagin 60- Valin 77; Prolin 79- Tyrosin 86). Wie bereits durch die Kristallstrukturaufklärung des HypD-HypC Komplexes aus *T. kodakarensis* (Watanabe *et al.*, 2012, Abbildung 16) ersichtlich, liegen während der Interaktion mit HypD alle variablen Bereiche frei zugänglich vor und könnten potentielle Interaktionsflächen mit den großen Untereinheiten darstellen. In der Kristallstruktur unter Abbildung 20 sind alle variablen Bereiche in dem bereits bekannten Farbkode markiert.

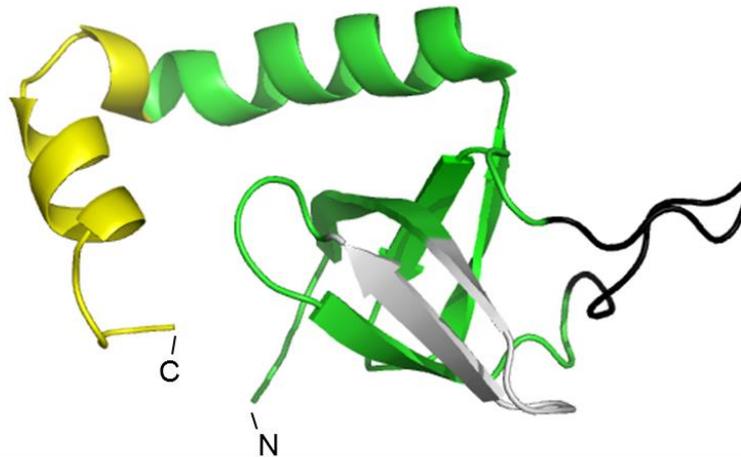


Abbildung 20: Tertiärstruktur des Reifungsproteins HypC aus *E. coli* (PDB:2OT2). Die Bearbeitung der Struktur wurde mit dem Programm Pymol durchgeführt. Variable Region 1 (V1) ist grau, Variable Region 2 (V2) schwarz und Variable Region 3 (V3) gelb dargestellt.

Durch verschiedene Aminosäureaustausche in HypC wurde versucht die Ähnlichkeit zwischen HybG und HypC zu erhöhen und somit Veränderungen in den Affinitäten zu den großen Untereinheiten zu bewirken. Unter Abbildung 21 sind alle konstruierten HypC-Varianten im Vergleich zu Wildtyp HypC und Wildtyp HybG aufgelistet. Rot markierte Positionen zeigen Insertionen (rot markierte Aminosäuren) und Deletionen (rot markierte --). Die Varianten wurden wie folgt benannt. HypC-GS enthält Aminosäuredeletionen (-GS) an Position 34-35, bei HypC+HQL wurden Aminosäuren (+HQL) nach Position 6 inseriert, HypC-GS/+HQL enthält eine Kombination aus den beiden vorherigen Aminosäureaustauschvarianten, bei HypC V_{Stopp} wurde durch die Einführung eines Stoppkodons an Position 77 der C-Terminus auf die Länge von HypC aus *D. mccartyi* verkürzt, und bei HypC G_{Stopp} wurde durch die Einführung eines Stoppkodons an Position 82 der C-Terminus auf die Länge von HybG aus *E. coli* verkürzt. HypC-GS/+HQL/ V_{Stopp} und HypC-GS/+HQL/ G_{Stopp} sind jeweils Kombinationen aus den bereits genannten Varianten. HypC+PAD enthält Aminosäureaustausche an Position 40-42, um HybG an dieser Position ähnlicher zu werden. Weitere Varianten sind Kombinationen aus HypC+PAD/+HQL und den jeweiligen Verkürzungen auf die Länge von HypC aus *D. mccartyi* (HypC+PAD/+HQL/ V_{Stopp}) und auf die Länge von HybG aus *E. coli* (HypC+PAD/+HQL/ G_{Stopp}).

HypC Varianten	V1			V2			V3																																																																																				
	10	20	30	40	50	60	70	80																																																																																			
HypC	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	---	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	G	S	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	G	A	L	L	Y	G	E	E	K			
HypC -GS	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	---	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	---	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	G	A	L	L	Y	G	E	E	K				
HypC +HQL	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	H	Q	L	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	---	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	G	A	L	L	Y	G	E	E	K		
HypC -GS/+HQL	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	H	Q	L	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	---	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	G	A	L	L	Y	G	E	E	K		
HypC V _{Stop}	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	---	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	G	S	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	-----											
HypC G _{Stop}	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	---	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	G	S	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	-----											
HypC -GS/+HQL/V _{Stop}	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	H	Q	L	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	---	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	-----										
HypC -GS/+HQL/G _{Stop}	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	H	Q	L	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	---	C	D	E	N	Q	P	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	-----										
HypC +PAD	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	---	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	G	S	C	D	E	N	P	A	D	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	G	A	L	L	Y	G	E	E	K		
HypC +PAD/+HQL	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	H	Q	L	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	G	S	C	D	E	N	P	A	D	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	G	A	L	L	Y	G	E	E	K
HypC +PAD/+HQL/V _{Stop}	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	H	Q	L	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	G	S	C	D	E	N	P	A	D	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	-----								
HypC +PAD/+HQL/G _{Stop}	M	C	I	G	V	P	G	Q	I	R	T	I	D	G	N	Q	H	Q	L	A	K	V	D	V	C	G	I	Q	R	D	V	D	L	T	L	V	G	S	C	D	E	N	P	A	D	R	V	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	V	I	N	E	A	E	A	R	T	L	D	A	L	Q	N	M	F	D	V	E	P	D	V	-----								
HypbG ^{Strep}	M	C	I	G	V	P	G	Q	V	L	A	V	G	E	D	I	H	Q	L	A	Q	V	E	V	C	G	I	K	R	D	V	N	I	A	L	I	---	C	E	G	N	P	A	D	L	L	G	Q	W	L	V	H	V	G	F	A	M	S	I	I	D	E	E	A	K	A	T	L	D	A	L	R	Q	M	D	Y	D	I	T	S	A	N	S	H	P	Q	F	E	K		

Abbildung 21: Darstellung der unterschiedlich konstruierten HypC-Varianten. Rot markierte Positionen zeigen Insertionen (rot markierte Aminosäuren) oder Deletionen (rot markierte --). Variable Region 1 (V1) ist grau, Variable Region 2 (V2) schwarz und Variable Region 3 (V3) gelb dargestellt.

Die Plasmide, die für alle konstruierten HypC-Varianten kodieren, wurden in den Deletionsstamm $\Delta hypC\Delta hybG$ transformiert und die Genprodukte überproduziert. Nach anaerobem Wachstum wurden die Zellen aufgeschlossen, der Zelleextrakt mittels Nativgel aufgetrennt und via Hydrogenaseaktivitätsfärbung die Hydrogenaseaktivitäten visualisiert (Abbildung 22). Die Abbildung zeigt zwei Nativgele, gefärbt mittels Hyd-1 spezifischer Detektionslösung (PMS/NBT-Abbildung 22 A) und einer für alle Hydrogenasen verwendbare Detektionslösung (BV/TTC-Abbildung 22 B), und ein Autoradiogramm eines Nativgels (Abbildung 22 C), wodurch Hyd-2 mittels spezifischen Antikörpers detektiert wurde. Die eingesetzten Kontrollstämmen waren der Wildtyp (MC4100), welcher die Aktivitäten der drei Hydrogenasen Hyd-1, Hyd-2 und Hyd-3 zeigte, und der Deletionsstamm $\Delta hypC\Delta hybG$ als Negativkontrolle. Weitere wichtige Kontrollstämmen waren, wie bereits für die Experimente der HybG Varianten eingesetzt, der Deletionsstamm $\Delta hypC\Delta hybG$ komplementiert mit plasmidkodierten nativen HypC und komplementiert mit plasmidkodierten Strep-getaggten HybG (HybG^{Strep}). Die Kontrollstämmen wurden immer mitgeführt und zeigten stets das gleiche Ergebnis, werden jedoch in Abbildung 22 nur einmal gezeigt. Zudem sollte erwähnt werden, dass die Banden für Hyd-3 (untere Bande) und die FDH (obere Bande) dicht beieinander liegen und dadurch teilweise schwer zu differenzieren sind.

Alle HypC-Varianten, ausgenommen den Varianten mit den Aminosäureaustauschen an Position 40-42 (+PAD), führten zu Hyd-1 Aktivitäten (Abbildung 22 A). Die +PAD-Variante vermittelte eine schwache Hyd-1 und Hyd-3 Aktivität (Abbildung 22 B). Die Varianten in Kombination mit +PAD brachten keine Hyd-1 Aktivität oder Hyd-3 Aktivität hervor. Sobald die Aminosäuren PAD in Kombination mit HQL bzw. zusätzlich noch den jeweiligen Verkürzungen auf die Länge von HybG aus *E. coli* und HypC aus *D. mccartyi* vorlag, führte keine der Varianten zu Hydrogenaseaktivitäten. Scheinbar sind diese Bereiche essentiell für die Aktivierung von HyaB (Hyd-1) und möglicherweise auch für die Aktivierung von HycE (Hyd-3). Die jeweiligen Austausche in den variablen Bereichen führten einzeln zu keinem Hydrogenaseaktivitätsverlust. Allerdings wurden bereits Unterschiede in den Aktivitäten

detektiert. Die HybG-GS-Variante und die HybG+HQL-Variante zeigten im Vergleich zu den beiden verkürzten Varianten eine deutlich geringere Hyd-3 Aktivität. In Kombination mit Austausch in allen variablen Bereichen, wie beispielsweise -GS/+HQL/V_{Stopp} und -GS/+HQL/G_{Stopp}, wurde ein deutlicher Rückgang der Hyd-1 und Hyd-3 Aktivität beobachtet. Keine der HypC-Varianten führte zu einer Hyd-2-Aktivität.

Alle Proben wurden zusätzlich nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in einem Nativgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, und diese mit Hyd-2 Antikörper inkubiert. Bereits Blokesch *et al.*, 2001 konnten mit dieser Methode einen pro-HybC-HybG-Komplex nachweisen. Da keine der Varianten zu einer Hyd-2-Aktivität führte, konnte mittels dieses Nachweises überprüft werden, ob vielleicht trotzdem eine Interaktion aufgrund der ausgetauschten Aminosäuren möglich wurde und lediglich die Kofaktorinsertion fehlerhaft war. In Abbildung 22 C ist das Autoradiogramm für alle Kontrollstämme und Varianten dargestellt. Es konnte dabei lediglich ein schwaches Signal, welches auf einen pro-HybC-HybG-Komplex hindeutet, bei der Komplementation des Deletionstammes $\Delta hypC\Delta hybG$ mit Wildtyp HybG festgestellt werden. Keine der HypC-Varianten resultierte in einem ähnlichen Signal. Das spricht wiederum gegen die Ausbildung eines pro-HybC-HypC-Komplexes. Dieses Ergebnis korreliert mit den beobachteten Hydrogenaseaktivitätsfärbungen, die zeigten, dass die Varianten zu keiner Hyd-2-Aktivität führten.

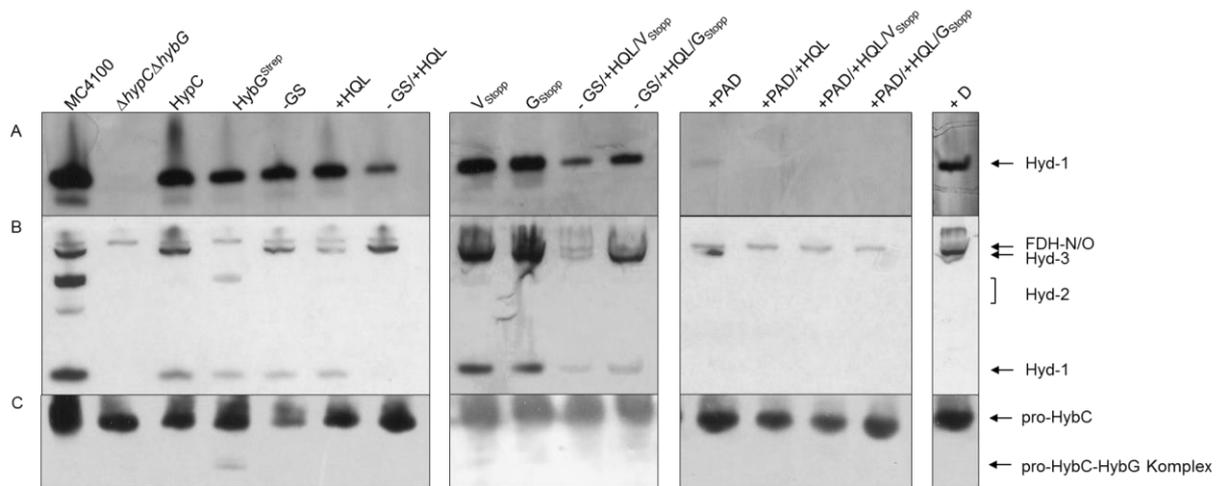


Abbildung 22: Einfluss verschiedener Aminosäureaustausche in dem Reifungsprotein HypC und deren Auswirkung auf die Hydrogenaseaktivität. Die verwendeten Stämme sind Wildtyp (MC4100), $\Delta hypC\Delta hybG$, $\Delta hypC\Delta hybG$ komplementiert mit pJA1021 (HypC), $phybG^{Strep}$ (HybG^{Strep}), pJA1021-GS (-GS), pJA1021+HQL (+HQL), pJA1021-GS/+HQL (-GS/+HQL), pJA1021-V_{Stopp} (V_{Stopp}), pJA1021-G_{Stopp} (G_{Stopp}), pJA1021 -GS/+HQL/V_{Stopp} (-GS/+HQL/V_{Stopp}), pJA1021-GS/+HQL/G_{Stopp} (-GS/+HQL/G_{Stopp}), pJA1021+PAD (+PAD), pJA1021+PAD/+HQL (+PAD/+HQL), pJA1021+PAD/+HQL/V_{Stopp} (+PAD/+HQL/V_{Stopp}), pJA1021+PAD/+HQL/G_{Stopp} (+PAD/+HQL/G_{Stopp}), pJA1021+D(+D). Die Zellanzzucht erfolgte anaerob in Minimalmedium. Die Zellernte erfolgte in der stationären Wachstumsphase (OD>1). Nach dem Aufschluss wurden 50 µg Zellextrakt auf ein 6%iges Nativgel gegeben. Die Kontrollen (MC4100; $\Delta hypC\Delta hybG$; HypC; HybG^{Strep}) wurden immer mitgeführt und zeigten die gleichen Ergebnisse wie hier dargestellt. Zur Vereinfachung wurden diese für die Darstellung der restlichen HypC Varianten weggelassen. Nach der nicht denaturierenden PAGE erfolgte die Hydrogenaseaktivitätsfärbung mittels PMS/NBT (A) und BV/TTC (B). Die gleichen Proben wurden mittels Nativgel gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und diese mit α -HybC-Antikörper (1:20000; C) inkubiert. Die Pfeile bzw. Klammern zeigen das Migrationsverhalten der jeweiligen Hydrogenase bzw. des pro-HybC-HybG Komplexes im Nativgel.

3.4.4. Analyse der Auswirkungen der HypC-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität der Deletionsstämme

Alle via Nativgel getesteten Stämme wurden zusätzlich per Gaschromatographie auf Wasserstoffproduktion überprüft. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Analyse der FHL-Komplex Aktivität dargestellt. Der Wildtyp (MC4100) zeigte eine Aktivität von $1,6 \text{ mU H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$, was 100 % entspricht. Der Kontrollstamm, $\Delta hypC\Delta hybG$, komplementiert mit plasmidkodierten nativen HypC erreichte ca. 65 % der Aktivität des Wildtyps. Wie bereits in dem Nativgel (Abbildung 22) zu beobachten war, führten auch hier alle Varianten, die nur in einem variablen Bereich Aminosäureaustausche enthielten, zu einer messbaren Aktivität des FHL-Komplexes. Auch hier fiel besonders die HypC Variante mit Austausch in allen variablen Bereichen (-GS/+HQL/V_{Stopp}) auf, da dieser Komplementationsstamm nicht einmal 10 % des Wildtypaktivitätsniveaus erreichte. Auch die Varianten -GS/+HQL/G_{Stopp} und +PAD erzielten im Gegensatz zu den übrigen Varianten nur ca. 30 % des Wildtypaktivitätsniveaus. Unterstützend zu den Nativgelen aus Abbildung 22 konnte auch via Gaschromatographie

keine FHL-Aktivität für die Stämme, kodierend für die HypC Varianten +PAD/+HQL, +PAD/+HQL/V_{Stopp} und +PAD/+HQL/G_{Stopp} gemessen werden. Schlussfolgernd können alle Beobachtungen der Hydrogenaseaktivitätsfärbung im Nativgel mittels gaschromatographischer Analysen bestätigt werden.

Tabelle 12: Einfluss der verschiedenen HypC-Varianten auf die Formiat-Hydrogen-Lyase Aktivität.

Stamm/ HypC Variante	mU H ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein	Standardabweichung mU H ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein	%
MC4100	1,64	0,51	100
$\Delta hypC \Delta hybG$	0	0	0
HypC	1,07	0,24	65,21
HybG ^{Strep}	0,08	0,032	5,16
+HQL	1,42	0,49	86,31
-GS	1,16	0,17	70,45
-GS/ +HQL	1,52	0,54	92,81
V _{Stopp}	0,80	0,02	48,94
G _{Stopp}	1,13	0,08	68,78
+HQL/-GS/ V _{Stopp}	0,14	0,03	8,42
+HQL/-GS/G _{Stopp}	0,51	0,12	31,12
+PAD	0,62	0,02	38,01
+PAD/+HQL	0	0	0
+PAD/+HQL/V _{Stopp}	0	0	0
+PAD/+HQL/G _{Stopp}	0	0	0
+D	0,70	0,20	42,48

Die Daten beruhen auf mindestens zwei Wiederholungen. Die spezifische Aktivität des FHL-Komplexes wird in der Tabelle als mU H₂ min⁻¹ mg⁻¹ Protein angegeben.

3.5. Untersuchung der Heterodimerbildung der großen und der kleinen Untereinheit nach der Prozessierung des C-terminalen Peptids

Nachdem ein Komplex, bestehend aus den Reifungsproteinen HypE und HypF (Shomura und Higuchi, 2012), den CN Liganden synthetisiert (Paschos *et al.*, 2002; Reissmann *et al.*, 2003) und auf den HypD-HybG Komplex (Blokesch *et al.*, 2001; Butland *et al.*, 2006) überträgt, wird die Fe(CN)₂CO-Gruppe in das aktive Zentrum der großen Untereinheit, pro-HybC (Hyd-2), inseriert. Abschließend wird durch die Proteine HybF, SlyD und HypB Nickel in die große Untereinheit eingebaut (Winter *et al.* 2005; Magalon und Böck 2000a; Magalon

und Böck 2000b; Maier und Böck, 1996; Menon und Robson, 1994). Damit ist das aktive Zentrum der großen Untereinheit, bestehend aus dem NiFe(CN)₂CO-Kofaktor, vollständig. Die Insertion des Nickels fungiert dabei als Auslöser für die Erkennung durch die Hyd-2-spezifische Protease, HybD, die das C-terminale Peptid der großen Untereinheit abspaltet (Böck *et al.*, 2006). Die Prozessierung erfolgt drei Aminosäuren entfernt von dem 4. Cystein, welches den Kofaktor koordiniert (Rossmann *et al.* 1994; Sorgenfrei *et al.* 1993; Menon *et al.* 1993; Gollin *et al.*, 1992b). Wie bereits durch Drapal und Böck, 1998 für die große Untereinheit HycE (Hyd-3) vermutet und durch diese Arbeit für HybC (Hyd-2) nachgewiesen (siehe 3.3), erfolgt nach der C-terminalen Prozessierung eine Konformationsänderung. Dieser Konformationsänderung folgt die Dimerisierung der gereiften großen Untereinheit HybC mit der kleinen Untereinheit pre-HybO. Die Reifung der kleinen und großen Untereinheit läuft vermutlich parallel ab. Während das aktive Zentrum der großen Untereinheit assembliert wird, werden durch die Isc-Maschinerie die [FeS]-Kluster in pre-HybO inseriert (Pinske und Sawers, 2012b; Pinske und Sawers, 2014). Nach der Dimerisierung der großen (HybC) und der kleinen Untereinheit (pre-HybO) wird der Komplex mittels der Tat-Maschinerie über die Cytoplasmamembran transportiert (Jack *et al.* 2005; Jack *et al.* 2004; Dubini und Sargent 2003). Der Tat-Transport wird durch das Tat-Signalpeptid an der kleinen Untereinheit pre-HybO bedingt (Jack *et al.* 2004; Dubini *et al.* 2002). Dieses wird nach der Dimerisierung und dem Transport über die Cytoplasmamembran abgespalten.

3.5.1. Die Tat-Signalpeptidabspaltung der kleinen Untereinheit erfordert die Prozessierung der großen Untereinheit

In Abbildung 23 ist eine Hyd-2-Western Blot-Analyse verschiedener Hydrogenasedeletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp in unterschiedlichen Wachstumsphasen dargestellt. Die linke Seite der Abbildung zeigt Proben aus der exponentiellen und die rechte Seite der Abbildung aus der stationären Wachstumsphase. Dabei wurden Stämme mit Deletionen in dem *hybO*-Gen, welches für die gleichnamige kleine Untereinheit kodiert, in dem *hybC*-Gen, welches für die gleichnamige große Untereinheit kodiert, und in dem *hypF*-Gen, welches für die Carbamoyltransferase HypF kodiert, verwendet. Die Western Blot Analyse des Wildtyp-Stammes (MC4100) zeigte sowohl eine Bande für pro-HybC als auch prozessiertes HybC und eine Bande für gereiftes HybO (ca. 35 kDa) in der exponentiellen Wachstumsphase. In der stationären Wachstumsphase war kaum noch ungerichtetes HybC vorhanden, da die bevorzugte Reifungsphase der Hyd-2 in der exponentiellen Wachstumsphase liegt (Ballantine und Boxer, 1986; Ballantine und Boxer, 1985). In einem *hybC*-Deletionsstamm verblieb die kleine Untereinheit pre-HybO in einem ungerichteten Zustand im Cytoplasma (siehe exponentielle Wachstumsphase) und wurde bis

zum Erreichen der stationären Wachstumsphase abgebaut (Abbildung 23). Diese Daten unterstützen die bereits postulierten Daten von Pinske und Sawers, 2012b und 2014.

In einem *hybO*-Deletionsstamm konnte gereiftes HybC in beiden Wachstumsphasen nachgewiesen werden. In einem *hypF*-Deletionsstamm konnte die große Untereinheit nur ungeriff (pro-HybC) detektiert werden, da ohne das Reifungsprotein HypF die für das aktive Zentrum wichtigen CN-Liganden nicht synthetisiert werden konnten (Böck *et al.*, 2006). Allerdings scheint es im Gegensatz zu pre-HybO stabiler gegenüber proteolytischem Abbau zu sein, da es sowohl in der exponentiellen als auch der stationären Wachstumsphase detektiert werden konnte. HybO wurde genau wie im Fall für einen *hybC*-Deletionsstamm ohne die korrekte Reifung der großen Untereinheit während der voranschreitenden Wachstumsphasen abgebaut. Die Reifung der kleinen Untereinheit scheint abhängig von der Reifung der großen Untereinheit zu sein. Die Tat-Signalpeptidabspaltung von HybO erfordert die Prozessierung der großen Untereinheit HybC. Im Gegensatz dazu fand die Reifung der großen Untereinheit unabhängig von der kleinen Untereinheit statt, da HybC auch in einer *hybO*-Deletionsmutante gereift vorlag.

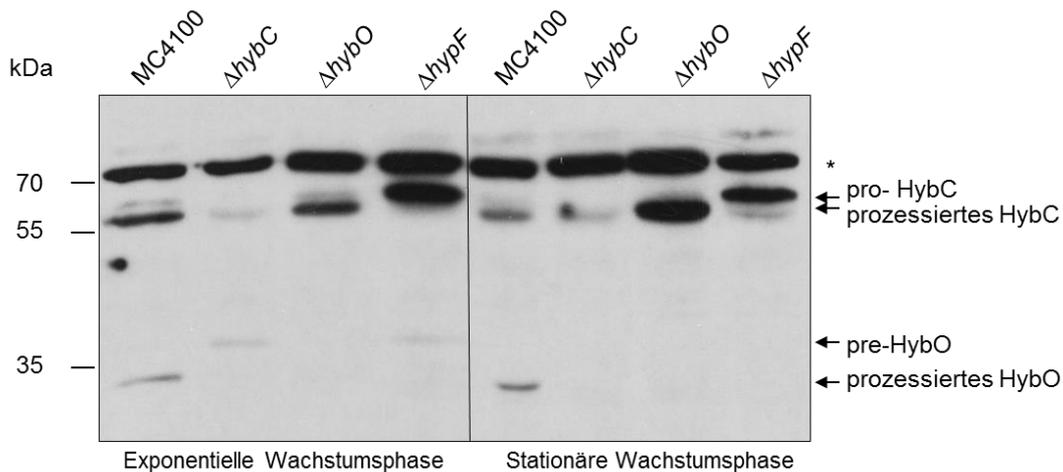


Abbildung 23: Autoradiogramm nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zellextrakte verschiedener Hyd-2 Deletionsstämmen unter denaturierenden Bedingungen. Die Anzucht der Stämme erfolgte anaerob in M9-Minimalmedium. Die Ernte der Zellen fand in der exponentiellen Wachstumsphase, OD_{600} 0,6-0,8 (linke Seite) und in der stationären Wachstumsphase, OD_{600} über 1 (rechte Seite) statt. 50 μ g Zellextrakt wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Der Western Blot wurde mit Anti-Hyd-2 Antikörperserum (1:20000) behandelt. Wildtyp (MC4100); Δ *hybC*, Mutation im *hybC* Gen, kodierend für die große Untereinheit der Hyd-2; Δ *hybO*, Deletion des *hybO*-Gens, kodierend für die kleine Untereinheit der Hyd-2; Δ *hypF*, Deletion des Gens *hypF*, kodierend für das gleichnamige Reifungsprotein HypF. Die * Markierung zeigt eine undefinierbare Kreuzreaktion des HybC Antikörpers. Die schwache Bande, die auf der Höhe von ca. 60 kDa in Extrakten von den *hybC* und *hypF*-Mutanten zu sehen ist, wird durch eine unbekannte kreuz-reagierende Bande verursacht. Rechts ist das jeweilige Migrationsverhalten der ungeriffenen großen Untereinheit (pro-HybC), der prozessierten großen Untereinheit (HybC), der ungeriffenen, Tatsignalpeptid fusionierten kleinen Untereinheit (pre-HybO), und der gereiften kleinen Untereinheit (HybO) beschriftet.

3.5.2. [NiFe]-Kofaktor freies HybC_{proc} verursacht die Abspaltung des Tat-Signalpeptids von HybO

Aus den vorherigen Versuchen geht hervor, dass das Tat-Signalpeptid der kleinen Untereinheit pre-HybO nur bei der gereiften großen Untereinheit prozessiert werden konnte. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die unter Abschnitt 3.1 vorgestellte, genetisch prozessierte HybC-Variante (HybC_{proc}) ebenfalls ein Komplex mit HybO eingeht und die Tat-Signalpeptidabspaltung erfolgt. Diese Variante enthält kein [NiFe]-Kofaktor, liegt jedoch aufgrund von genetischer Manipulation bereits prozessiert vor. Um sicher zu stellen, dass diese Variante keinen [NiFe]-Kofaktor enthielt, wurden die Plasmide, kodierend für pro-HybC und HybC_{proc}, in einen *hybC*- und *hypF*-Deletionshintergrund transformiert. Die Stämme wurden unter den bereits genannten Bedingungen kultiviert und weiter verarbeitet. Unter Abbildung 24 ist das Autoradiogramm der Western Blot-Analyse (A) und die Hydrogenaseaktivitätsfärbung (B) der verschiedenen HybC Varianten in einem *hybC*- und *hypF*-Deletionshintergrund zu sehen. Die ersten drei Spuren unter Abbildung A zeigen die Varianten in einem *hybC*-Deletionsstamm. Eine Komplementation des Stammes mit Plasmiden, kodierend für pro-HybC und HybC_{proc}, führte in beiden Fällen zu prozessierten HybC und auch prozessierten HybO. Das bedeutet, sowohl die Wildtyp pro-HybC- als auch die [NiFe]-Kofaktor-freie HybC_{proc}-Variante begünstigten die Reifung der kleinen Untereinheit HybO. Eine Hydrogenaseaktivität konnte nur durch Komplementation des Stammes mit pro-HybC nachgewiesen werden (Abbildung 24 B).

Um auszuschließen, dass die chromosomal vorhandenen Reifungsproteine, und somit der tatsächlich synthetisierte [NiFe]-Kofaktor, keine Auswirkungen auf die genetisch prozessierte Variante (HybC_{proc}) hat, wurden beide HybC Varianten zusätzlich in einem *hybC hypF*-Deletionshintergrund produziert. HypF ist ein wichtiges Reifungsprotein, welches unabdingbar an der Ligandensynthese beteiligt ist. Somit ist ein solcher Deletionsstamm in jedem Falle inaktiv, da keine Reifung der großen Untereinheit erfolgen kann (Böck et al., 2006). Die letzten drei Spuren in der Abbildung 24 zeigen das Ergebnis dieses Versuches. Wie bereits erwähnt, führte die Komplementation des Stammes $\Delta hybC \Delta hypF$ durch pro-HybC weder zu einer Reifung der großen Untereinheit noch zu einer Reifung der kleinen Untereinheit pre-HybO. Im Gegensatz dazu resultierte die Komplementation durch die plasmidkodierte [NiFe]-Kofaktor-freie HybC_{proc}-Variante in einer Tat-Signalpeptidabspaltung von HybO. Diese Variante zeigte keine Hydrogenaseaktivität (Abbildung 24 B). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass allein durch den fehlenden HybC C-Terminus die Abspaltung des Tat-Signalpeptids an HybO verursacht wurde. Zur Unterstützung dieses Ergebnisses wurden beide Plasmide zusätzlich in einer *hybG*-Deletionsmutante eingeführt.

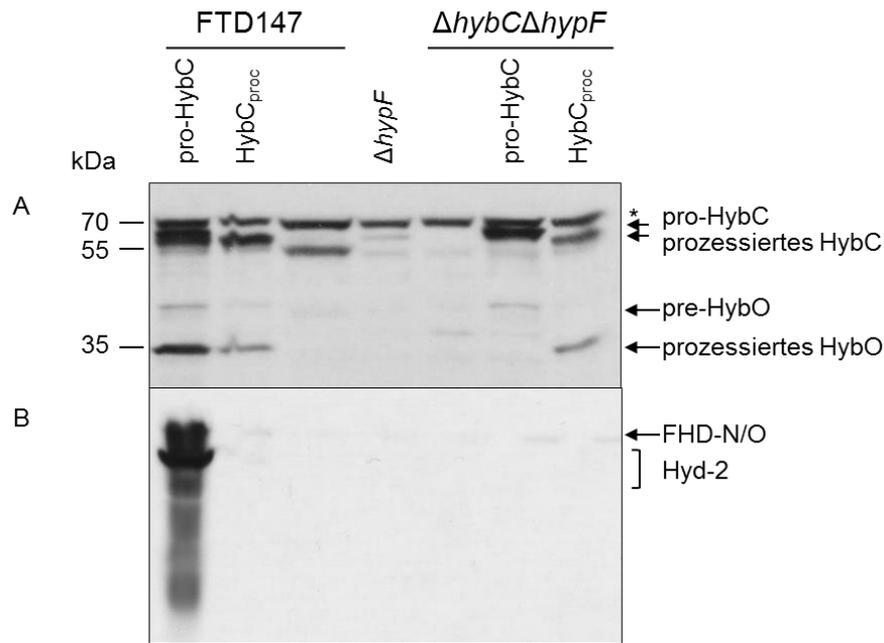


Abbildung 24: Vergleich zwischen den verschiedenen HybC Reifungsformen und deren unterschiedlichen Einfluss auf die Reifung der kleinen Untereinheit (pre-HybO) in einem *hypF*-Deletionshintergrund mittels Western Blot (A) und Nativ-PAGE (B) Analysen. Die Anzucht der Stämme erfolgte anaerob in M9-Minimalmedium. Die Ernte der Zellen fand in der stationären Wachstumsphase, OD_{600} über 1 statt. 60 μ g Zellextrakt wurden in einem 10%igen SDS-Gel (A) und 7,5%igen Nativgel (B) aufgetrennt. Nach dem Transfer des Zellextrakts auf eine Nitrocellulosemembran, fand die Inkubation mit α -Hyd-2-Antikörperserum (1:20000) statt. Die * Markierung zeigt eine uncharakterisierte Kreuzreaktion des α -HybC Antikörpers (A). Das Nativgel wurde mit TTC/BV gefärbt und unter 100 % H_2 inkubiert (B).

HybG ist ein essentielles Reifungsprotein für die Synthese und Übertragung der $Fe(CN)_2CO$ -Gruppe des Kofaktors in das aktive Zentrum der großen Untereinheit der Hyd-2 (HybC). In Abbildung 25 ist die Western Blot Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Zellextrakte der *hybG*-Deletionsstämmen, transformiert mit den für die HybC-Varianten kodierenden Plasmiden, dargestellt. Die HybC-Varianten wurden auch hier mittels α -Hyd-2-Antiserum nachgewiesen. Als Kontrollen dienten die in den ersten drei Spuren aufgetragenen Stämme $\Delta hybO$, $\Delta hybC$ und $\Delta hybG$. Der $\Delta hybO$ Stamm (1. Spur) wies keine Bande für die kleine Untereinheit (HybO) auf, jedoch war eine schwache, aber deutliche Bande für prozessiertes HybC zu erkennen. Der $\Delta hybC$ Deletionsstamm (2. Spur) zeigte, wie auch in Abbildung 23, keine Bande für die kleine Untereinheit (pre-HybO). Der $\Delta hybG$ Deletionsstamm (3. Spur) wies lediglich eine Bande für die ungeriefte große Untereinheit pro-HybC auf, da keine Übertragung der $Fe(CN)_2CO$ -Gruppe ohne HybG erfolgen konnte. Auch hier konnte die kleine Untereinheit nicht nachgewiesen werden. Die Transformation des $\Delta hybG$ Deletionsstammes mit dem für pro-HybC kodierten Plasmid führte weder zu einer Prozessierung von pro-HybC, noch zu einer Tat-Signalpeptidabspaltung von pre-HybO (Abbildung 25, 4. Spur). Ähnlich wie bereits in einem *hypF*-Deletionsstamm (Abbildung 24),

erfolgte auch hier ohne das essentielle Reifungsprotein HybG keine Reifung der Hydrogenase. Indes führte die Transformation durch die plasmidkodierte genetisch prozessierte HybC_{proc}-Variante zu der Tat-Signalpeptidabspaltung an der kleinen Untereinheit HybO (Abbildung 25, 5. Spur).

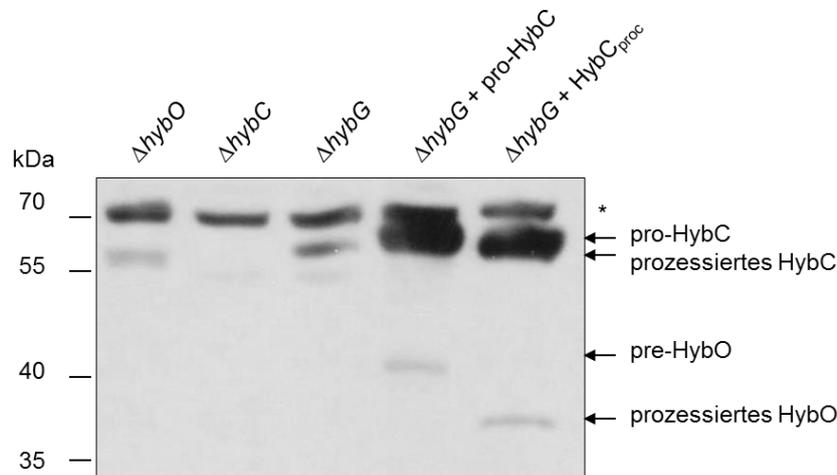


Abbildung 25: Vergleich zwischen den verschiedenen HybC Reifungsformen und deren unterschiedlichen Einfluss auf die Reifung der kleinen Untereinheit (pre-HybO) in einem *hybG*-Deletionshintergrund. Die Anzucht der Stämme erfolgte anaerob in M9-Minimalmedium. Die Ernte der Zellen fand in der stationären Wachstumsphase (OD600 >1) statt. 60 µg Zellextrakt wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Transfer des Zellextrakts auf eine Nitrocellulosemembran, fand die Inkubation mit α-Hyd-2 (1:20000) statt. Die * Markierung zeigt eine undefinierbare Kreuzreaktion des α-HybC Antikörpers.

Sowohl in einem *hypF*- als auch *hybG*-Deletionsstamm war die Hydrogenasereifung nicht möglich, da für die Kofaktorsynthese essentielle Reifungsproteine fehlten. Jedoch führte die Transformation dieser Deletionsstämme durch eine plasmidkodierte genetisch prozessierte Variante (HybC_{proc}) zu einer Tat-Signalpeptidabspaltung von der kleinen Untereinheit HybO. Es scheint, als würde allein die C-terminale Prozessierung, und die damit einhergehende Konformationsänderung der großen Untereinheit die Tat-Signalpeptidabspaltung von der kleinen Untereinheit bedingen. Unabhängig davon, dass die HybC_{proc}-Variante keinen Kofaktor enthielt, erfolgte die Heterodimerisierung mit der kleinen Untereinheit.

3.5.3. Das HybC_{proc}-HybO Heterodimer kann ohne den NiFe(CN)₂CO-Kofaktor Tat-abhängig über die Membran transportiert werden

Die vorherigen Versuche zeigten, dass die [NiFe]-Kofaktor-freie HybC_{proc}-Variante die Reifung der kleinen Untereinheit begünstigt und eine Heterodimerisierung aus großer und kleiner Untereinheit erfolgte. Nun ist es wichtig zu wissen, ob das entstandene Heterodimer mittels Tat-Maschinerie über die Cytoplasmamembran transportiert wurde. Die Abspaltung des Tat-Signalpeptids von der kleinen Untereinheit war ein erstes Indiz für einen solchen Transport. Allerdings war noch unklar, ob die genetisch synthetisierte HybC_{proc}-Variante eine

native Konformation hatte. Wie zahlreiche Forschergruppen berichteten, unter anderen Dubini und Sargent, 2003, wird nur ein korrekt gefaltetes, kofaktor-beinhaltenes Protein über die Cytoplasmamembran durch die Tat-Maschinerie transloziert. Um die Membrantranslokation zu untersuchen, wurde nach dem Zellaufschluss der Stämme eine Ultrazentrifugation des Zellextrakts durchgeführt. Somit wurden cytoplasmatische Fraktion und Membranfraktion voneinander getrennt. Die Polypeptide der jeweiligen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit α -Hyd-2-Antiserum inkubiert. In Abbildung 26 ist das Ergebnis der Überprüfung der Membranlokalisation des HybC_{proc}-HybO Heterodimers dargestellt. Die linke Seite der Abbildung zeigt die Analyse des *hybC*-Deletionsstammes, komplementiert durch jeweils beide plasmidkodierte HybC-Varianten, wobei sowohl die cytoplasmatische Fraktion (CF) als auch die Membranfraktion (MF) analysiert wurden. Die Transformation des *hybC*-Deletionsstammes durch plasmidkodiertes pro-HybC zeigte, dass sowohl HybC (Abbildung 26, Spur 1) als auch HybO (Spur 2) in der Membranfraktion lokalisiert sind. Auch die Komplementation durch plasmidkodiertes HybC_{proc} zeigte HybC_{proc} einerseits in der cytoplasmatischen Fraktion (Spur 3) und andererseits auch zusammen mit HybO in der Membranfraktion (Spur 4). Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die genetisch prozessierte HybC_{proc}-Variante eine native Konformation hat und nach der Dimerisierung mit HybO über die Membran transloziert wurde. Da beide Varianten plasmidkodiert vorlagen und HybO chromosomal kodiert war, könnte die erhöhte Menge der HybC-Varianten in der Cytoplasmafraktion durch einen Überproduktioneffekt zu erklären sein.

Hyd-2 ist ein membrangebundener Komplex und wird wie in der Literatur beschrieben mittels Tat-Maschinerie über die Membran transportiert (Jack *et al.*, 2004). Um auszuschließen, dass die HybC_{proc}-Variante durch einen alternativen Transportweg über die Membran transportiert wurde, wurden beide HybC-Varianten zusätzlich in einem *hybC tat*-Doppeldeletionshintergrund analysiert und deren Membranlokalisation überprüft. Der rechte Teil der Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Die Transformation des Δ *hybC* Δ *tat* Stammes durch die plasmidkodierte pro-HybC und HybC_{proc}-Varianten zeigte, dass beide Varianten nur in der Cytoplasmafraktion detektierbar waren. Das Ergebnis verdeutlicht, dass auch die HybC_{proc} Variante mittels Tat-Maschinerie als Heterodimer mit HybO über die Membran transportiert wurde.

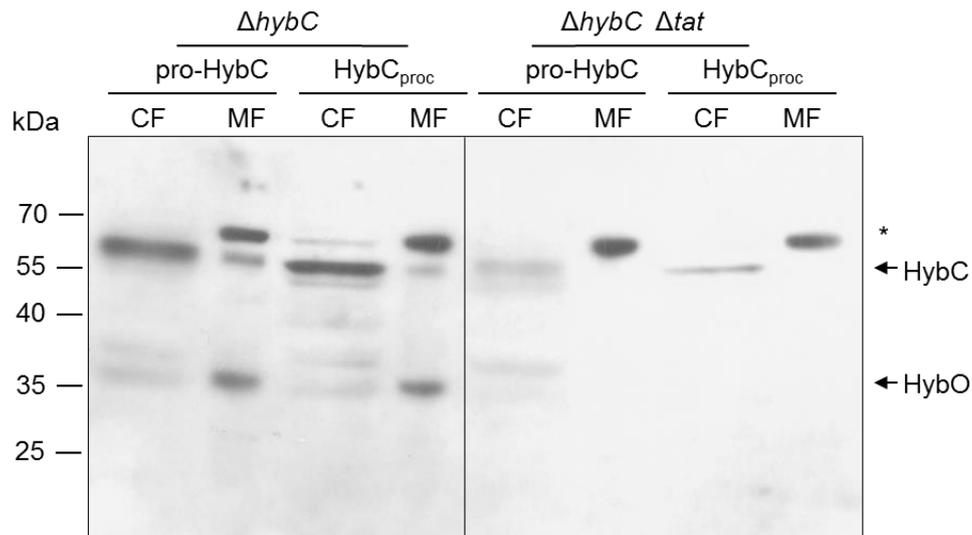


Abbildung 26: Überprüfung der genetisch prozessierten HybC_{proc}-Variante hinsichtlich ihrer Membranlokalisierung. Transformation eines *hybC*-Deletionstammes und eines *hybC tat*-Deletionstammes mit Plasmiden, kodierend für pro-HybC und HybC_{proc}. Die Anzucht der Stämme erfolgte anaerob, in M9-Minimalmedium. Die Ernte der Zellen fand in der stationären Wachstumsphase (OD600 >1) statt. Nach der Membranfraktionierung mittels Ultrazentrifuge wurden 50 µg Zellextrakt auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Transfer des SDS-Gels auf eine Nitrocellulosemembran, fand die Inkubation mit α -Hyd-2-Antiserum (1:20000) statt. Die * Markierung zeigt eine undefinierbare Kreuzreaktion des α -HybC-Antiserums. Die Bezeichnungen CF und MF stehen für cytoplasmatische Fraktion bzw. Membranfraktion.

Die Ergebnisse der Membranfraktionierung lassen vermuten, dass ein [NiFe]-Kofaktor-freies HybC_{proc}-HybO Heterodimer via Tat-Maschinerie über die Cytoplasmamembran transportiert wurde. Trotz ausreichender Waschschriffe während des Versuchs, musste sichergestellt werden, dass das HybC_{proc}-HybO Heterodimer korrekt in die Membran inseriert wurde und HybC_{proc} in das Periplasma gerichtet vorlag. Für diese Untersuchung wurde eine sogenannte Sphäroplastenisolation durchgeführt und diese mit Trypsin behandelt. Sphäroplasten sind Zellen, bei denen die äußere Zellwand durch Behandlung mit Lysin entfernt wurde. Alle in das Periplasma gerichteten Membranproteine konnten dann durch die Behandlung mit Trypsin abgelöst und damit von den Sphäroplasten getrennt werden. Die große Untereinheit der Hyd-2 (HybC) ist auf der Membran, dem Periplasma zugewandt, lokalisiert. Unter Abbildung 27 ist die Western Blot Analyse der Sphäroplastenisolation des Wildtypstammes (MC4100-links), der HybC_{proc}- (Mitte) und der pro-HybC-Wildtyp Variante (rechts) dargestellt. Es wurden jeweils die Cytoplasma- (CF) und Membranfraktion (MF) nach der Sphäroplastenisolation und Trypsinbehandlung analysiert. Zum Vergleich wurden ein Teil der Zellen mit Trypsin (+) inkubiert und der andere nicht (-). Alle Zellen wurden bis auf die Trypsinbehandlung völlig identisch behandelt. Die Pfeile rechts neben den Abbildungen weisen auf das Migrationsverhalten von HybC hin. Die Auswertung des Wildtyps (MC4100) zeigte, dass die Cytoplasmafraktion unabhängig von der Trypsinbehandlung nur wenig pro-

HybC enthielt. Die Analyse der Membranfraktion verdeutlicht, dass durch die Behandlung mit Trypsin die große Untereinheit HybC von der Membran abgelöst wurde und somit nicht mehr detektierbar war. Ohne die Trypsinbehandlung war die große Untereinheit in der Membranfraktion nachweisbar. MC4100 und pro-HybC kodieren beide für natives HybC und unterscheiden sich lediglich in der chromosomalen bzw. plasmidkodierten Anwesenheit der großen Untereinheit. MC4100 kodiert für die chromosomale Form des pro-HybC Proteins und der Stamm mit pro-HybC kodiert für ein plasmidkodiertes pro-HybC Protein. Ähnlich wie bereits bei MC4100 gezeigt, konnte die plasmidkodierte pro-HybC Variante (rechts) nach einer Trypsinbehandlung der Sphäroplasten in der Membranfraktion nicht mehr detektiert werden. Der HybC Nachweis erfolgte nur in der Membranfraktion ohne Trypsinbehandlung. Wie bereits unter Abbildung 26 (links) deutlich gezeigt wurde, führte plasmidkodiertes pro-HybC auch hier zu einer Akkumulation der unprozessierten großen Untereinheit in der Cytoplasmafraktion (Abbildung 27), da HybO nur in einfacher Kopienzahl vorlag und somit pro-HybC im Überschuss vorhanden war. Die Analyse der Sphäroplastenisolierung bei einem Stamm, der für die HybC_{proc}-Variante kodiert (Mitte), zeigte einem dem Wildtyp sehr ähnlichen Ergebnis. Auch hier war HybC_{proc} in größeren Mengen in der Cytoplasmafraktion vorhanden. Genau wie bei MC4100 und pro-HybC ist kein HybC_{proc} in der Membranfraktion mit Trypsinbehandlung detektierbar, jedoch in der Membranfraktion ohne Trypsinbehandlung.

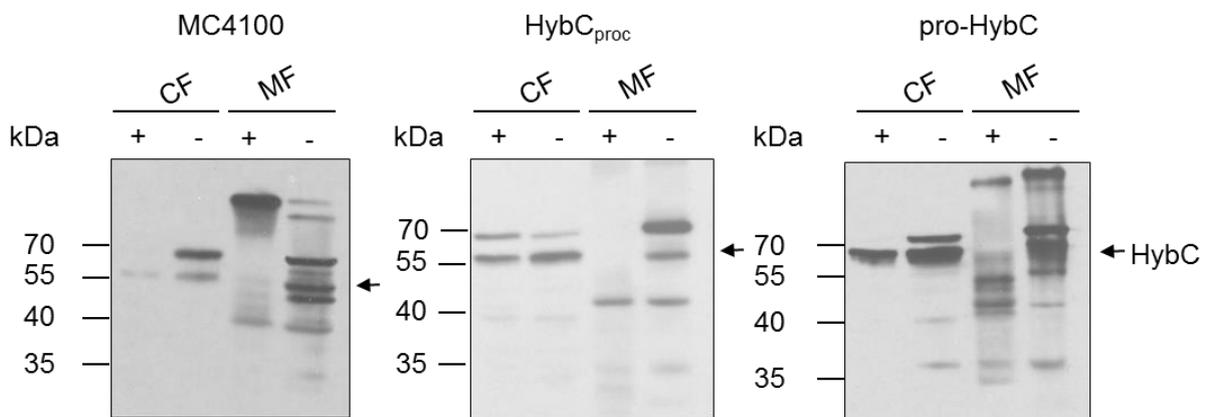


Abbildung 27: Sphäroplasten Isolation mit anschließendem Trypsinverdau als Nachweis für die korrekte Membranlokalisation der genetisch prozessierten HybC-Variante. Die Anzucht der Stämme erfolgte anaerob in M9-Minimalmedium. Die Ernte der Zellen fand in der exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,6) statt. Nach der Sphäroplastenisolierung und der Trypsinbehandlung zur Ablösung der großen Untereinheit wurden die Sphäroplasten mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach der Membranfraktionierung mittels Ultrazentrifugation wurden 50 µg Proteinlösung auf ein 10%iges SDS-Gel geladen. Nach dem Transfer der Polypeptide auf eine Nitrocellulosemembran, fand die Inkubation mit α-Hyb-2 (1:20000) statt. Die Bezeichnungen CF und MF stehen für cytoplasmatische Fraktion und Membranfraktion.

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass ein nativ gefaltetes [NiFe]-Kofaktor-freies HybC_{proc}-HybO Heterodimer Tat-Translocon-abhängig über die Membran transportiert wurde und offensichtlich die große Untereinheit korrekt, dem Periplasma ausgerichtet, vorlag.

4. Diskussion

Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen ist von verschiedenen akzessorischen Proteinen abhängig (Forzi und Sawers, 2007; Böck *et al.*, 2006). Diese Reifungsproteine assemblieren die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe des [NiFe]-Kofaktor (Pinske und Sawers, 2014; Leach *et al.*, 2007; Böck *et al.*, 2006). HybG (Hyd-1 und Hyd-2) bzw. HypC (Hyd-1 und Hyd-3) übertragen die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe im Komplex mit HypD in das aktive Zentrum der großen Untereinheiten (Soboh *et al.*, 2014; Stripp *et al.*, 2013; Bürstel *et al.*, 2012; Soboh, *et al.*, 2012). Nach der sich anschließenden Nickelinsertion (Winter *et al.* 2005; Magalon und Böck 2000b; Maier und Böck 1996; Menon und Robson 1994), wird das C-terminale Peptid der großen Untereinheit durch die spezifischen Proteasen (Hyd-1: HyaD, Hyd-2: HybD, Hyd-3: Hycl) prozessiert (Böck *et al.*, 2006). Bereits Theodoratou *et al.* 2005 vermuteten, dass das C-terminale Peptid eine essentielle Kontrollfunktion im Hydrogenasereifungsmechanismus einnimmt. Dabei steht vor allem die Kontrolle des zeitlich korrekten Ablaufs der Reifung im Fokus. Im Folgenden sollen insbesondere die Ergebnisse der Interaktionsstudien zwischen der großen Untereinheit pro-HybC und dem Reifungsprotein HybG sowie die wichtige Rolle des C-terminalen Peptids im Reifungsmechanismus diskutiert werden.

4.1. Das C-terminale Peptid ist erforderlich für die durch HybG vermittelte Übertragung der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe

Drapal und Böck, 1998 konnten sowohl unter *in vivo* als auch *in vitro* Bedingungen bereits einen Komplex aus dem zu HybG homologen Reifungsprotein HypC und der großen Untereinheit pro-HycE (Hyd-3) identifizieren. Sie postulierten, dass HypC ausschließlich mit der Apoform pro-HycE eine Interaktion eingeht, nicht jedoch mit der gereiften HycE-Variante. Für Drapal und Böck war jedoch noch unbekannt, welche Rolle HypC in der Übertragung des Kofaktors spielt. Spätere Veröffentlichungen zeigten, dass HypC in einem Komplex mit dem Reifungsprotein HypD die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe trägt und diesen vermutlich an die große Untereinheit der Hyd-3 (pro-HycE) liefert (Soboh *et al.*, 2012; Blokesch *et al.*, 2004; Blokesch und Böck, 2002). Auch für *R. eutropha* konnte ein solcher Komplex aus HypD und HypC als $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe übertragendes Intermediat identifiziert werden (Bürstel *et al.*, 2012). Watanabe *et al.*, 2012 konnten unterstützend zu den genannten Studien, die Kristallstruktur des HypD-HypC-Komplexes aus *T. kodakarensis* lösen (Abbildung 16). Allerdings führten die Autoren ihre Versuche aerob durch und daher fehlt die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe in der dargestellten Struktur.

Das zu HypC homologe Protein ist das Reifungsprotein HybG. HybG aktiviert im Gegensatz zu HypC die große Untereinheit der Hyd-2 (Blokesch *et al.*, 2001). Durch meine Masterarbeit konnte mittels *in vitro pull-down* Analysen ein Komplex zwischen pro-HybC und HybG

nachgewiesen werden (Bielak, 2012). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit an Hand von Nativgel-Analysen auch *in vivo* eine Komplexbildung von pro-HybC und HybG^{Strep} nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1, S. 37). Dazu wurde durch einen Hyd-2 Antikörper sowie durch einen Strep-tag Antikörper der Komplex nachgewiesen. Dabei zeigten pro-HybC und HybG eine Migrationsbande auf gleicher Höhe. Jedoch konnte kein gemeinsamer Komplex zwischen genetisch verkürztem HybC (HybC_{proc}) und HybG^{Strep} nachgewiesen werden (Abbildung 6, S.37). Diese Daten unterstützen die bereits von Butland *et al.*, 2006 postulierten Daten. Zusätzlich zu dem Komplexnachweis durch Antikörper konnte auch eine Stabilisierung der Apoform der großen Untereinheit (pro-HybC) durch HybG nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte mittels limitertem Trypsinverdau (Abschnitt 3.3.2, S. 47). Dabei konnte festgestellt werden, dass pro-HybC in kürzester Zeit durch Trypsin abgebaut wurde. Wurde jedoch pro-HybC gemeinsam mit HybG einem Trypsinverdau unterzogen, wurde der Abbau durch Trypsin stark verzögert (Abbildung 14, S.47). Dieser Versuch ist ein weiterer Hinweis für eine pro-HybC-HybG Komplexbildung und für die *in vitro* Stabilisierung pro-HybCs durch HybG. Zudem konnte ein Komplex des Reifungsproteins HypD und HybG identifiziert werden. Beide zeigten eine Migrationsbande auf der gleichen Höhe. Unterstützend zu diesen Daten konnten auch Soboh *et al.*, 2014 eine Fe(CN)₂CO-Gruppe tragenden HypD-HybG Komplex nachweisen. Schlussfolgernd für die Interaktionsstudien kann festgestellt werden, dass das C-terminale Peptid der großen Untereinheiten der Hydrogenasen erforderlich für die Interaktion mit den Reifungsproteinen HybG und HypC ist. In welcher Form der C-Terminus eine Rolle spielt, wird nun weiter erörtert.

4.2. Die Abspaltung des C-terminalen Peptids verursacht eine Konformationsänderung der großen Untereinheit

Da HybG ausschließlich mit pro-HybC und nicht mit der genetisch gereiften HybC_{proc} Variante einen Komplex bildet, könnte der C-Terminus als Interaktionsfläche für die Reifungsmaschinerie bzw. auch für die spezifischen Proteasen fungieren. Um eine solche Funktion zu untersuchen, wurden Konstrukte erstellt, die für C-Termini Austauschvarianten kodieren. Dabei wurde der C-Terminus von HybC (Hyd-2) an HyaB (Hyd-1) fusioniert (pro-HyaB^{HybC}) und *vice versa*, der C-Terminus von HyaB an HybC fusioniert (pro-HybC^{HyaB}). Die plasmidkodierten neuen Konstrukte und die entsprechenden Wildtypvarianten (pro-HyaB und pro-HybC) wurden in verschiedenen Hydrogenasedeleitionsstämmen produziert und weiteren Hydrogenaseaktivitätsstudien unterzogen. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von den C-Termini, beide Fusionsvarianten in einem für die großen Untereinheiten defizienten Stamm zu Hyd-1 und Hyd-2 Aktivitäten führten. Während die Schnittstellen der spezifischen Proteasen hoch konserviert sind, variieren Sequenz und Länge der C-Termini in den unterschiedlichen Hydrogenasen (Maier und Böck, 1996). Unter Abbildung 28 ist ein Sequenzvergleich der C-Termini der großen Untereinheiten von HyaB (Hyd-1), HybC (Hyd-2)

und HycE (Hyd-3) aus *E. coli* dargestellt. Der Primärsequenzvergleich zeigt, dass die C-Termini von HyaB und HybC ähnlich sind, mit 7 von 15 identischen Aminosäuren. Der HycE C-Terminus weist mit 32 Aminosäuren mehr als die doppelte Länge auf. Auch die Schnittstelle der Protease ist für HyaB und HybC identisch (siehe Pfeil, zwischen Histidin und Valin).

```

                ↓
(Hyd-1) HybC-C-Terminus ...H VVDADGNEVSVKVL
(Hyd-2) HyaB-C-Terminus ...H VLGDDGSELISVQVR
(Hyd-3) HycE-C-Terminus ...R MTVVDVRKKKSKVVPYKELERYSIERKNSPLK

```

Abbildung 28: Primärsequenzvergleich der C-Termini von HyaB (Hyd-1), HybC (Hyd-2) und HycE (Hyd-3) aus *E. coli*. Der Pfeil zeigt die Schnittstelle der spezifischen Proteasen.

Theodoratou *et al.*, 2000 versuchten die C-Termini von HybC (Hyd-2) und HycE (Hyd-3) auszutauschen. Jedoch führten die Fusionsvarianten zu einem Hydrogenaseaktivitätsverlust. Weder die Hyd-2 spezifische Protease HybD, noch die Hyd-3 spezifische Protease Hycl war in der Lage die neuen Varianten zu prozessieren. Allerdings zeigten weitere Experimente, dass der HycE C-Terminus um bis zu 26 Aminosäuren verkürzt werden kann ohne einen Verlust der Hyd-3-Aktivität zu erwirken. Demzufolge reichen 6 Aminosäuren für die Erkennung des C-Terminus durch die Hycl Protease und die Prozessierung aus. Theodoratou *et al.*, 2000 schlussfolgerten daraus, dass weder der Hauptteil des Enzyms, noch der C-Terminus *per se* für die Erkennung der Protease verantwortlich sind, sondern die Konformation des Proteins, welche durch den C-Terminus stabilisiert wird. Die Schlussfolgerung von Theodoratou *et al.*, 2000 wird durch einen Versuch, der in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt ist, unterstützt. Dabei wurde der Hauptteil des Proteins und der C-Terminus getrennt voneinander synthetisiert und dann auf Hyd-2 Aktivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Trennung der beiden Proteinsegmente weder zu einer Hydrogenaseaktivität noch zur Prozessierung der kleinen Untereinheit pre-HybO geführt hat (C. Thomas, Daten nicht gezeigt). Scheinbar ist ein direkter Kontakt zwischen C-Terminus und Hauptteil für eine erfolgreiche Reifung der Hydrogenase erforderlich. Zudem könnte daraus geschlossen werden, dass die Prozessierung der großen Untereinheit irreversibel ist.

Entgegengesetzt zu den HybC (Hyd-2) und HycE (Hyd-3) C-Terminiaustausch Varianten von Theodoratou *et al.*, 2000, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Fusionsvarianten mit C-Termini Austausch zwischen den großen Untereinheiten HyaB (Hyd-1) und HybC (Hyd-2) durchaus zu aktiven Hydrogenasen führen. Die pro-HybC^{HyaB}-Variante wird unabhängig vom C-Terminus, weiterhin durch die HybG-Hyp-Maschinerie aktiviert und außerdem auch durch die für die Hyd-2 spezifische Protease HybD prozessiert.

Womöglich sind die Hyd-2 und Hyd-3 C-Termini strukturell zu verschieden, um als Hybridvarianten zu funktionieren. Jedoch könnte die Ähnlichkeit zwischen dem Hyd-1 und Hyd-2 C-Terminus hoch genug sein, um möglicherweise in dem Austauschexperiment keine strukturellen Änderungen hervorzurufen. Allerdings zeigten die Western Blot Analysen eine Akkumulation von pre-HybO (ungereifte kleine Untereinheit der Hyd-2) durch die Komplementation mit der pro-HybC^{HyaB}-Variante (Abschnitt 3.2.1, S. 39). Es scheint also, als würde die Fusionsvariante zu einer Aktivität führen, jedoch die Reifung der großen Untereinheit nicht optimal ablaufen. Zusammenfassend sprechen die mit der pro-HybC^{HyaB}-Variante erzielten Ergebnisse gegen die Funktion des C-Terminus als Hauptkennungsfläche für die Reifungsproteine bzw. die Proteasen, da der fusionierte C-Terminus keine Veränderung in der Aktivierung durch die HybG-Hyp-Maschinerie oder der spezifischen Proteasen hervor bringt.

Allerdings lässt sich im Gegensatz zu der pro-HybC^{HyaB}-Variante die pro-HyaB^{HybC}-Fusionsvariante nicht ausschließlich durch HypC oder HybG aktivieren und durch die Hyd-1 spezifische Protease HyaD oder die Hyd-2 spezifische Protease HybD prozessieren. Die Experimente zeigen, dass sowohl HybG als auch HypC für die Aktivierung, sowie HybD zusammen mit HyaD für die Prozessierung der pro-HyaB^{HybC}-Fusionsvariante benötigt werden. Lediglich in einem Stamm, der für alle Reifungsproteine und spezifischen Proteasen kodiert, konnte eine Hydrogenaseaktivität der pro-HyaB^{HybC}-Fusionsvariante detektiert werden. Es ist bereits bekannt, dass Hyd-1 durch HybG oder HypC in der Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase aktiviert werden kann, jedoch Hyd-2 nur durch HybG in der exponentiellen und Hyd-3 nur durch HypC in der stationären Wachstumsphase aktiviert werden können (Blokesch *et al.*, 2001). Die Ergebnisse der pro-HyaB^{HybC}-Fusionsvariante deuten darauf hin, dass eventuell ein HybG-HypC Heterodimer für die Reifung des Proteins erforderlich sein könnte. Möglicherweise lässt sich die gleiche Interpretation für die beiden Proteasen HyaD und HybD treffen. Allerdings zeigen neue Studien von Kwon *et al.*, 2016, dass HybD als Monomer vorliegt. Demzufolge ist die Interpretation des Ergebnisses schwierig. Zusätzlich zur Funktion die Konformation des aktiven Zentrums offen zu halten, hat der C-Terminus vielleicht doch eine Rolle in der Erkennung der HybG/HypC Proteine sowie der Proteasen. Allerdings zeigte ein Fusionsprotein zwischen GST und dem C-Terminus von HybC keine Komplexbildung mit HybG oder anderen Reifungsproteinen (C. Thomas, Daten nicht gezeigt).

Magalon und Böck, 2000a identifizierten das Cystein 241 der großen Untereinheit der Hyd-3 (HycE) als eine Interaktionsstelle mit dem Reifungsprotein HypC. Dieser Aminosäurerest liegt tief in dem aktiven Zentrum der großen Untereinheit. Diese Interaktion findet nicht statt wenn der C-Terminus des HycE-Proteins fehlt (Drapal und Böck, 1998). Auch Zhang *et al.*, 2003

zeigten, dass der C-Terminus eine essentielle Rolle in der Hydrogenasematurierung spielt. Dabei tauschten sie den HybC C-Terminus gegen einen GFP-*tag* aus und verhinderten damit die Prozessierung durch die spezifische Protease HybD. Zudem konnten die Wissenschaftler den GFP-*tag* nicht nachweisen, was für eine mögliche Fehlfaltung spricht. Diese Untersuchungen geben einen weiteren Hinweis auf die wichtige Rolle des C-Terminus hinsichtlich der Aufrechterhaltung der Konformation der großen Untereinheit.

Nachdem der C-Terminus der großen Untereinheit *per se* wahrscheinlich als hauptsächliche Interaktionsfläche ausgeschlossen werden kann und da eine Konformationsänderung nach der Prozessierung des C-terminalen Peptids postuliert wurde (Theodoratou, 2005; Magalon und Böck, 2000a; Theodoratou *et al.*, 2000; Drapal und Böck, 1998), wurden Experimente zur Charakterisierung dieser möglichen Konformationsänderung der großen Untereinheit der Hyd-2 in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Diese Analyse erfolgte mittels Trypsinverdau. Dabei wurden sowohl pro-HybC als auch genetisch prozessiertes HybC_{proc} einem Trypsinverdau unterzogen. Trypsin schneidet nach jedem Lysin und Arginin. Sollten diese Aminosäurereste frei zugänglich vorliegen, würde eine Trypsinspaltung erfolgen. Es stellte sich heraus, dass pro-HybC binnen zwei Stunden vollständig abgebaut wurde und HybC_{proc} deutlich stabiler gegenüber dem Trypsin war (Abschnitt 3.3.1, S. 45). Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese der Konformationsänderung der großen Untereinheit nach dem erfolgreichen Kofaktoreinbau und der sich anschließenden Prozessierung. Noch unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe, bestätigten mittels CD-Spektroskopie ebenfalls, dass eine deutliche Änderung der Konformation des HybC Proteins nach Abspaltung des C-Terminus stattfindet (unveröffentlichte Daten Dr. B. Soboh). Neben Trypsin konnte auch mit weiteren Proteasen, wie Chymotrypsin und GluC, das gleiche Ergebnis beobachtet werden.

Ein Trypsinverdau der Proteinlösungen bestehend aus pro-HybC und dem Reifungsprotein HypC, sowie pro-HybC und dem Reifungsprotein HybG zeigte eine HybG-abhängige Stabilisierung der pro-HybC Variante. Zusammen mit HypC wurde pro-HybC genauso schnell abgebaut, wie ohne HypC. Diese Kontrolle zeigt, dass nicht interagierende Proteine, wie HypC und pro-HybC gleichermaßen schnell durch Trypsin abgebaut werden. Jedoch scheint ein Komplex aus HybG und pro-HybC deutlich stabiler gegenüber Trypsin zu sein.

Durch die Auswertung der während des Trypsinverdaus entstandenen Fragmente könnten potentielle durch HybG geschützte Bereiche identifiziert werden. Diese ermittelten Bereiche könnten Hinweise für mögliche Interaktionsflächen zwischen pro-HybC und HybG liefern. Abbildung 29 zeigt die theoretisch erstellte Struktur, allerdings basierend auf der HybC_{proc}-Variante, der großen Untereinheit HybC (erstellt mit Phyre). Trypsin spaltet pro-HybC in einem Ansatz mit HypC und im Komplex mit HybG in verschieden große Fragmente

(Abbildung 14, S.47). In der Abbildung 29 sind alle Trypsinschnittstellen in HybC farbig (blau, rot, gelb) markiert (Lysine und Arginine). Alle blau markierten Schnittstellen liegen verdeckt vor und sind somit nicht zugänglich für Trypsin. Da es sich hier um eine theoretisch erstellte Struktur von HybC_{proc} handelt, könnten die blau markierten Bereiche möglicherweise in der pro-HybC Variante freizugänglich für Trypsin vorliegen und zum Abbau des Proteins führen (Abbildung 13, S.46). Die rot und gelb markierten Schnittstellen liegen theoretisch freizugänglich vor. Da aber kaum Abbau der HybC_{proc}-Variante vorlag (Abbildung 13, S.46), könnten diese Bereiche möglicherweise nicht ausreichen, um die kompakte Struktur mittels Trypsin aufzuspalten. Werden nun die verschiedenen Größen der durch Trypsin entstandenen Fragmente in dem Doppel-Trypsin-Verdau zwischen pro-HybC und HypC sowie pro-HybC und HybG verglichen, fällt auf, dass vor allem die 20 kDa Fragmente in der SDS-PAGE Analyse von pro-HybC-HybG fehlen bzw. nur sehr schwach zu sehen waren (Abbildung 14, S. 47). Durch einen Vergleich der Primärstruktur und der Tertiärstruktur von pro-HybC mit den potentiellen Schnittstellen und den tatsächlich entstandenen Fragmenten könnten Bereiche eingegrenzt werden, die durch das Reifungsprotein HybG verdeckt werden. Da es sich in der theoretischen Struktur allerdings um die HybC_{proc}-Variante handelt, ist ein Rückschluss auf tatsächliche Interaktionsstellen zwischen HybG und pro-HybC schwierig. Möglicherweise sind die blauen Schnittstellen potentiell durch HybG geschützte Bereiche in einem pro-HybC-HybG Komplex. Die Auflösung einer Kristallstruktur und massenspektrometrische Analysen von pro-HybC könnten zu einer weiteren Aufklärung beitragen. Zusätzliche wichtige Informationen zu der Konformation des pro-HybC-Proteins könnte durch die Auflösung einer Kristallstruktur des pro-HybC-HybG-Komplexes geliefert werden.

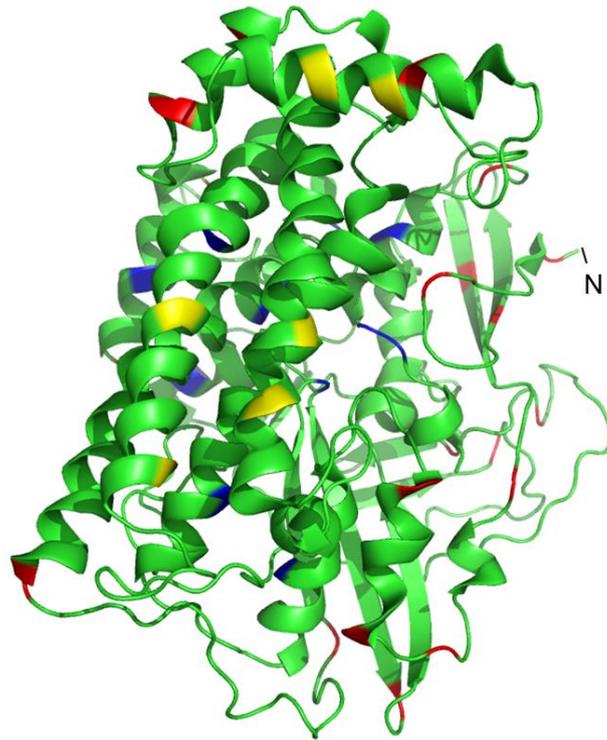


Abbildung 29: Theoretisch erstellte Tertiärstruktur der großen Untereinheit HybC_{proc} mit den Trypsinschnittstellen. Die Struktur wurde durch das Programm Phyre an Hand von Sequenzvergleichen erstellt. Das Protein ist grün markiert. Alle anderen farbigen Bestandteile sind Trypsinschnittstellen (Lysin und Arginin). Die blau markierten Schnittstellen liegen verdeckt vor und somit für Trypsin nicht zugänglich. Die rot und gelb markierten zeigen frei liegende Schnittstellen.

4.3. Welche Aminosäuren in HybG und HypC sind wichtig für die Erkennung der großen Untereinheiten?

Wie bereits durch diese Arbeit mit unterschiedlichen Experimenten gezeigt, interagieren das Reifungsprotein HybG und die Apoform der großen Untereinheit pro-HybC (Hyd-2), sowie HybG und das Reifungsprotein HypD miteinander. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Publikationen von Butland *et al.*, 2006 und Blokesch *et al.*, 2001. Für das zu HybG homologe Reifungsprotein HypC wurde durch Drupal und Böck, 1998 eine Interaktion mit der Apoform der großen Untereinheit der Hyd-3 (pro-HycE) nachgewiesen. Beide Reifungsproteine sind jeweils spezifisch für Hyd-2 (HybG) oder Hyd-3 (HypC). Hyd-1 kann sowohl von HybG als auch HypC aktiviert werden (Blokesch *et al.*, 2001). Diese Entdeckung deutet daraufhin, dass spezifische Aminosäuren in HybG und HypC für die Interaktion mit den großen Untereinheiten verantwortlich sind. Hartwig *et al.*, 2015 haben gezeigt, dass eine heterologe Komplementation eines *hypC hybG*-Deletionsstammes mit einem Plasmid, kodierend für HypC plus HypD aus *D. mccartyi*, Hyd-1, Hyd-2 und Hyd-3 aus *E. coli* aktivieren kann. Vermutlich hat die Kombination von HypC in Verbindung mit HypD aus *D. mccartyi* zu einer erfolgreichen Komplementation des Deletionsstammes geführt. Ein

Primärsequenzvergleich zwischen HybG und HypC aus *E. coli* und HypC aus *D. mccartyi* und HypC aus *T. kodakarensis* (Abbildung 15, S.48) zeigt eine hohe Ähnlichkeit zueinander. Jedoch ergeben sich auch drei variable Bereiche, die durch Aminosäureaustausche näher charakterisiert wurden. Diese Bereiche stellen möglicherweise wichtige Regionen der Proteine für die spezifische Erkennung der großen Untereinheiten der Hydrogenasen dar.

Bisher wurden Aminosäureaustausche in HybG und HypC im N-terminalen Bereich vorgenommen, um die durch die Reifungsproteine vermittelte $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppen Übertragung näher zu untersuchen (Soboh *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2012; Magalon und Böck, 2000a; Blokesch und Böck, 2002; Blokesch *et al.*, 2001). Durch solche Experimente konnten Magalon und Böck (2000a) zeigen, dass das Cystein 2 von HypC wichtig für die Komplexbildung HypC-pro-HycE ist und Disulfidbrücken nicht Ursache der Interaktion sind. Blokesch *et al.* 2001 bewiesen, dass auch das Cystein 2 in HybG eine essentielle Rolle in der Hydrogenaseaktivierung spielt. Des weiteren konnte schließlich das Cysteine 2 und das Histidin 51 des Reifungsproteins HypC für die Koordination der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe identifiziert werden (Watanabe *et al.*, 2012 und Soboh *et al.*, 2013). Nachdem die Koordination der $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe postuliert wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht in den zuvor durch einen Sequenzvergleich zwischen HypC und HybG lokalisierten variablen Bereichen Aminosäurereste zu identifizieren, die für die Interaktion zwischen den Reifungsproteinen und den großen Untereinheiten erforderlich sind. Dabei wurden sowohl in nur einem variablen Bereich Aminosäureaustausche vorgenommen bishin zu Aminosäureaustauschen in allen drei variablen Bereichen gleichzeitig. Ziel war es jeweils HybG dem Hyd-3 Reifungsprotein HypC ähnlicher zu werden und *vice versa* HypC dem Hyd-2 Reifungsprotein HybG ähnlicher zu werden.

4.3.1. Die HybG +GS/-HQL-Variante führte zur Aktivierung von Hyd-3

Unter den verschiedenen HybG-Varianten fielen zwei besonders auf. Zum einen die HybG +GS/-HQL Variante, welche neben Hyd-1 und Hyd-2 auch zu Hyd-3 Aktivitätsbanden im Hydrogenaseaktivitätsgel führte. Durch die Aminosäureaustausche in den variablen Bereichen 1 und 2 scheint HybG dem Reifungsprotein HypC ähnlich genug zu sein, um Hyd-3 zu aktivieren. Auch die Gaschromatographischen Analysen bestätigen, dass die Hyd-3 Wasserstoff bildet und somit durch die HybG +GS/-HQL-Variante aktiviert werden konnte. Die dabei ausgetauschten Aminosäuren scheinen essentiell für die Aktivierung von Hyd-3 zu sein, nicht jedoch für Hyd-1 und Hyd-2. Ein Tertiärstruktur Alignment zwischen HypC-Wildtyp und der HybG +GS/-HQL-Variante zeigt eine hohe Ähnlichkeit zueinander (Abbildung 30). Im Vergleich dazu zeigt das Alignment zwischen Wildtyp HypC und Wildtyp HybG deutlich

weniger Strukturähnlichkeit zueinander. Die Aminosäureaustausche in HybG +GS/-HQL scheinen zu einer Strukturveränderung zu führen, die eine Aktivierung der Hyd-3 ermöglicht.

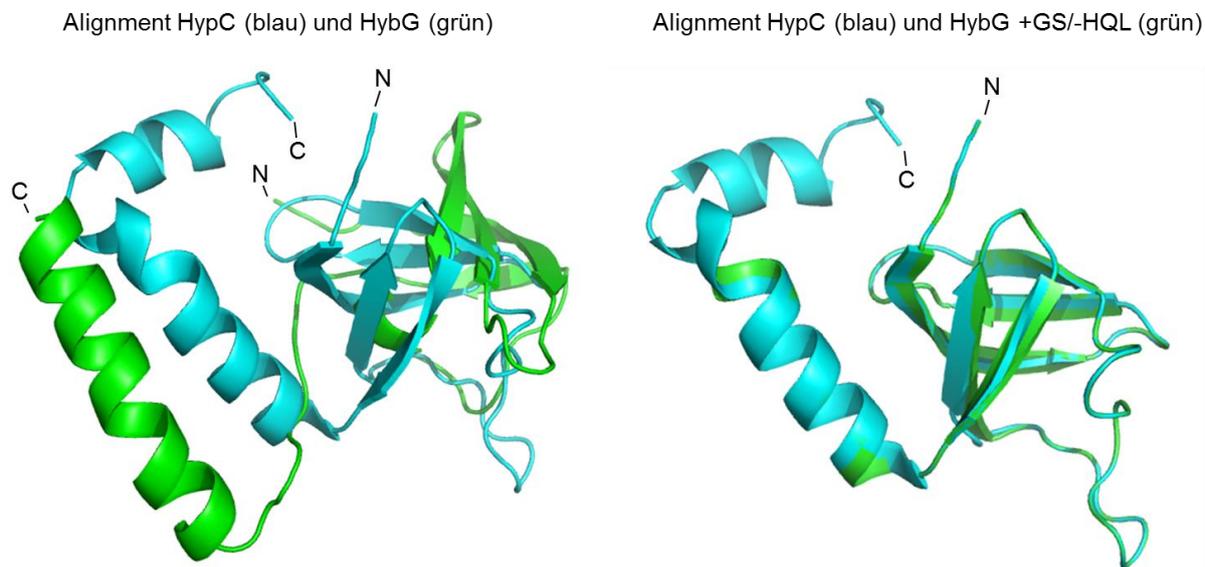


Abbildung 30: Tertiärstruktur Alignment zwischen HypC und Wildtyp HybG und der HybG +GS/-HQL Variante. HypC ist blau und Wildtyp HybG bzw. HybG +GS/-HQL sind grün. Das Tertiärstruktur Alignment wurde mit dem Programm Pymol durchgeführt.

Neben der gerade vorgestellten Variante, ist HybG -CEGN die zweite auffällige Variante, da diese zu einem Verlust aller Hydrogenaseaktivitäten führt. Das CEGN-Motiv scheint essentiell für die Reifung zu sein. In welchem Ausmaß diese Aminosäurereste an der Hydrogenasereifung beteiligt sind, ist unklar. Aus der Kristallstruktur von HypC von Watanabe *et al.*, 2012 geht hervor, dass die Aminosäuren an Position 46-49 die Interaktionsflächen zwischen dem Reifungsprotein HypC und HypD bilden. Im Vergleich zu HypC sind diese Interaktionsregionen in HybG nicht weit von dem CEGN-Motiv entfernt. Möglicherweise ist der Hydrogenaseaktivitätsverlust durch HybG -CEGN ein Hinweis auf den Verlust der Interaktion mit HypD. Ohne die Interaktion mit HypD, kann die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe nicht auf die große Untereinheit übertragen werden. Ein Sequenzvergleich wie unter Abbildung 15 im Anhang, zeigt dass das CEGN-Motiv innerhalb der HypC-Familie nur bei HypC und HybG aus *E. coli* vorkommt. Dies lässt womöglich Rückschlüsse darauf zu, dass das CEGN-Motiv nur bei Organismen vorhanden ist, die für mehr als ein Reifungsprotein aus der HypC Familie kodieren. Im Fall für *E. coli* wird sowohl HypC als auch das Homologon HybG synthetisiert und beide Reifungsproteine enthalten das CEGN- bzw. CDEN-Motiv. Bei Organismen wie beispielsweise *D. mccartyi* und *T. kodakarensis* existiert nur ein HypC und diese Proteine haben kein derartiges Motiv. In der Mehrzahl der Organismen fehlen diese Aminosäurereste. Es sollte vielleicht betont werden, dass es in dieser Arbeit nicht möglich war, eine der HybG Varianten und auch den Wildtyp mit einem spezifischen Antikörper

gegen HybG in den Extrakten nachzuweisen. Dies beutet, dass die Kopienzahl des Proteins niedrig ist. Deshalb kann auch nicht sichergestellt werden, dass die HybG-CEGN-Variante überhaupt synthetisiert wurde und dies womöglich der Grund für den Hydrogenaseaktivitätsverlust war. Allerdings konnte festgestellt werden, dass obwohl eine Überproduktion der HybG-Varianten durch eine Induktion der Genexpression zu nachweisbarem HybG geführt hat, auch gleichzeitig zu jeglichem Hydrogenaseaktivitätsverlust führte. Es scheint, dass eine Überproduktion des HybG-Proteins zu einer Hemmung der Hydrogenasereifung führt. Die mögliche Erklärung für die Hemmung der Hydrogenasereifung bleibt noch offen.

4.3.2. Einfache Aminosäureaustausche in HypC führten nicht zur Aktivierung von Hyd-2

Bei HypC wurden ebenfalls spezifische Aminosäurereste in den per Sequenzvergleich identifizierten variablen Bereichen ausgewählt und entsprechend ausgetauscht, um die Ähnlichkeit zu HybG zu erhöhen und möglicherweise eine Hyd-2 Aktivität zu erwirken. Keine der neu konstruierten HypC-Varianten führte zu Hyd-2 Aktivität. Austausch in nur einem variablen Bereich brachten nahezu keine Veränderungen in der Spezifität des Proteins hervor. Hyd-3 und Hyd-1 Aktivitäten waren immer nachweisbar und auch die gaschromatographischen Messungen zeigten keine Änderungen verglichen mit dem Wildtyp HypC in der Gasproduktion. Die Variante mit Aminosäureaustauschen in dem variablen Bereich 2 (HypC +PAD) war die Einzige, bei der ein Rückgang der Hyd-1 und Hyd-3 Aktivitäten zu verzeichnen waren. Dieses Motiv ist direkt hinter dem CEDN-Motiv, welches im Fall für HybG bei Deletion für den Verlust aller Hydrogenaseaktivitäten verantwortlich war. In Kombination mit einem Aminosäureaustausch im variablen Bereich 1 (HypC +PAD/+HQL) war keine Hydrogenaseaktivität detektierbar. Einerseits könnte dieses Ergebnis dafür sprechen, dass die ausgetauschten Aminosäuren möglicherweise für die Interaktionen mit den großen Untereinheiten der Hyd-1 (HyaB) und Hyd-3 (HycE) wichtig sind, oder dass, ähnlich wie bei HybG, vor allem die Region im variablen Bereich 2 für die Interaktion mit HypD wichtig sind. In jedem Falle scheint die ermittelte Region essentiell für die Hyd-3 und Hyd-1 Aktivierung zu sein.

Im Vergleich zwischen HypC und HybG, war es schwer HypC genetisch so zu manipulieren, dass überhaupt eine Veränderung in den Aktivitäten sichtbar wurde. Lediglich zwei Varianten wurden identifiziert (HypC +PAD und HypC -GS/+HQL/V_{Stopp}), die zu einem Rückgang bzw. Verlust der Hydrogenaseaktivitäten führten. Die beobachteten Ergebnisse lassen vermuten, dass Hyd-3 eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Organismus einnimmt. Hyd-3 scheint gegenüber Hyd-2 deutlich wichtiger zu sein. Für diese These spricht, dass bislang keine der

HypC Varianten zu Hyd-2 Aktivität führte und eine Variante von HybG identifiziert wurde, die Hyd-3 aktivieren konnte. Selbst eine C-terminal getagte HybG-Wildtyp Variante war teilweise in der Lage, Hyd-3 zu aktivieren (Abschnitt 3.4). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der C-Terminus für die Aktivierung der Hyd-3 eine wichtige Rolle spielt. Albareda *et al.*, 2012 konnten für den C-Terminus des in *Rhizobium leguminosarum* zu HypC homologen Proteins HupF eine essentielle Rolle in der Stabilisierung der großen Untereinheit ermitteln. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der C-Terminus von HupF sowohl essentiell für die Prozessierung der großen Untereinheit HupL, als auch für die Stabilisierung der großen Untereinheit in der Anwesenheit von Sauerstoff ist. Die HypC -GS/+HQL/V_{Stopp} Variante mit einem verkürzten C-Terminus scheint maßgeblich zu einem Hyd-3 Aktivitätsverlust beizutragen. Gaschromatographische Analysen wiesen nur noch etwa 8 % des Wildtypsniveaus an Gasproduktion nach. Möglicherweise ist dieses Ergebnis ebenfalls ein Hinweis auf die wichtige Funktion des C-Terminus von HypC für die Erkennung und Aktivierung der großen Untereinheit der Hyd-3 (HycE).

4.4. Das C-terminale Peptid von pro-HybC und dessen essentielle Kontrollfunktion hinsichtlich des Tat-abhängigen Membrantransports des Heterodimers (HybC-HybO)

Nachdem der HybC C-Terminus als essentiell für die durch HybG vermittelte Fe(CN)₂CO-Gruppen Übertragung identifiziert wurde, soll nun in diesem Abschnitt die Auswirkungen des C-terminalen Peptids auf die kleine Untereinheit HybO und dem Membrantransport des Heterodimers (HybC-HybO) mittels der Tat-Maschinerie diskutiert werden.

Wie bereits bekannt, wird der C-Terminus nach der Fe(CN)₂CO-Gruppen Übertragung durch HybG-HypD (Hyd-2) bzw. HypC-HypD (Hyd-3) (Soboh *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2012), und der Nickelinsertion (Magalon und Böck, 2000b; Rossmann *et al.*, 1994), durch eine spezifische Endoprotease abgespalten (Böck *et al.*, 2006). Erstmals wurde eine Prozessierung eines C-Terminus von einer großen Untereinheit in den Organismen *Azotobacter vinelandii* und *Desulfovibrio gigas* nach dem letzten Histidin am C-Terminus beobachtet (Menon *et al.*, 1993; Gollin *et al.*, 1992b). Nach der Prozessierung findet die Heterodimerisierung der gereiften großen Untereinheit mit der gereiften, [FeS]-Klusterhaltigen kleinen Untereinheit statt. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse zeigen, dass die Abspaltung des Tat-Signalpeptids an der kleinen Untereinheit HybO (Hyd-2) von der Interaktion mit der gereiften großen Untereinheit HybC (Hyd-2) abhängig ist. Andererseits findet die HybC-Reifung unabhängig von der kleinen Untereinheit, in einem *hybO*-Deletionsstamm trotzdem statt. Unterstützt werden diese Daten durch Publikationen von Pinske *et al.*, 2011 und Magalon und Böck, 2000b. Beide Forschergruppen konnten

nachweisen, dass die großen Untereinheiten der Hydrogenasen auch in Abwesenheit der kleinen Untereinheiten prozessiert vorliegen. Zudem konnte auch in *R. eutropha* eine gereifte große Untereinheit in Abwesenheit der kleinen Untereinheit detektiert werden (Winter *et al.*, 2005). Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die ungeriffte große Untereinheit der Hyd-2 (pro-HybC), in Abwesenheit wichtiger Reifungsproteine und HybO, im Cytoplasma stabil zu sein scheint, da diese nicht schnell abgebaut wird. Studien von Soboh *et al.*, 2012 zeigten, dass ein [FeS]-Kluster alternativ in das aktive Zentrum der großen Untereinheit inseriert wird, um HybC möglicherweise bis zum [NiFe]-Kofaktor Einbau bzw. bei nicht erfolgter Kofaktorsynthese zu stabilisieren.

Ein an der kleinen Untereinheit (HybO) N-terminal lokalisiertes Tat-Signalpeptid (Berks, 1996) ist unabdingbar für die erfolgreiche Membraninsertion des Hydrogenase Heterodimers. Für Hydrogenasen in *R. eutropha* und *Wolinella succinogenes* wurde ebenfalls dieses wichtige Tat-Motiv identifiziert (Bernhard *et al.*, 1996; Gross *et al.* 1999). Für Hyd-2 aus *E. coli* wurde durch Rodrigue *et al.*, 1999 ein Tat-abhängiger Transport des HybC-HybO Heterodimers durch das an HybO lokalisierten Tat-Signalpeptid entdeckt. Weiterführende Untersuchungen verdeutlichen, dass nur korrekt gefaltete und kofaktor-enthaltene Proteine mittels der Tat-Maschinerie über die Cytoplasmamembran transportiert werden (DeLisa *et al.*, 2003; Yahr und Wickner, 2001). Zudem wurden Chaperone mit möglicher *proof-reading* Funktion für den Tat-abhängigen Transport durch das Tat-Signalpeptid erforscht (Dubini und Sargent, 2003). Dabei wurden HyaE (Hyd-1) und HybE (Hyd-2) als Tat-Signalpeptid maskierende Chaperone identifiziert. Im Jahr 2004 wiesen Jack *et al.* nach, dass nur eine gereifte große Untereinheit zu einer Demaskierung des durch HybE gebundenen Tat-Signalpeptids führt. Sie detektierten die Insertion der kleinen Untereinheit in die Membran ohne die große Untereinheit in einem *hybE*-Deletionsstamm. Diese Tatsachen beweisen, dass HybE und dessen Bindung an das Tat-Signalpeptid der kleinen Untereinheit den vorzeitigen Membrantransport des unvollständigen aktiven Zentrums im HybC-HybO Dimer mittels Tat-Maschinerie verhindert. Ein weiteres Beispiel für Chaperone, die ein Tat-Signalpeptid binden und somit den vorzeitigen Transport via der Tat-Maschinerie inhibieren, ist das DmsD Chaperon, welches an die Tat-Signalpeptide der DMSO- und TMAO-Reduktase bindet (Oresnik *et al.*, 2001).

Entgegengesetzt zu den bisherigen Studien über die Tat-Maschinerie konnte zum ersten Mal in dieser Arbeit ein [NiFe]-Kofaktor-freies HybC_{proc}-HybO Heterodimer via Tat-Translokation über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Diese Versuche wurden mit einer genetisch prozessierten HybC Variante (HybC_{proc}), hervorgerufen durch Insertion eines Stoppkodons vor dem C-terminalen Ende der großen Untereinheit, durchgeführt (Abbildung 5, S.36). Diese Variante der großen Untereinheit führte zu einer Dimerisierung mit der

kleinen Untereinheit, einer Tat-Signalpeptid Abspaltung an HybO und somit zu einer Membrantranslokation durch die Tat-Maschinerie. Als Beweis dafür, dass die HybC_{proc}-Variante keinen [NiFe]-Kofaktor inseriert hatte, wurde ein Plasmid, kodierend für diese Variante, in für verschiedene Reifungsproteine defiziente Stämme eingeführt, synthetisiert und mittels Hyd-2 Antikörper in dem Zellextrakt nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die HybC_{proc}-Variante sowohl in einem *hypF*- als auch *hybG*-defizienten Stamm ein Heterodimer mit HybO bildet und in dessen Tat-Signalpeptid Abspaltung resultiert. Sobald eines der beiden Reifungsgene nicht vorliegt, kann das aktive Zentrum nicht korrekt in die große Untereinheit inseriert werden (Böck *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse beweisen, dass die HybC_{proc} Variante [NiFe]-kofaktorfrei ist. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Variante vollkommen ohne Kofaktor ist, da Studien von Soboh *et al.*, 2012 zeigten, dass möglicherweise zum Schutz vor Abbau der großen Untereinheit, alternativ ein [FeS]-Kluster zur Stabilisierung und korrekter Faltung der Untereinheit inseriert wird. Die Möglichkeit, die Tat-Maschinerie mittels genetisch prozessierten, [NiFe]-kofaktorfreien HybC (HybC_{proc}) zu täuschen, deutet daraufhin, dass diese nicht die Qualitätskontrolle der Substratfaltung übernimmt. Es scheint, dass ausschließlich die Abwesenheit des C-terminalen Peptids der großen Untereinheit die korrekte Konformation signalisiert und der Membrantransport des Heterodimers durch die Tat-Maschinerie eingeleitet wird. Das Tat-System nimmt offensichtlich keine Kontrolle der Kofaktoreninsertion vor, sondern prüft lediglich die korrekte Faltung des Proteins. Das HybC_{proc}-HybO Heterodimer muss eine native Konformation aufweisen, da nur nativ gefaltete Substrate via Tat-Translokation transportiert werden (Jack *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass das HybC_{proc}-HybO Heterodimer membrangebunden vorliegt. Diese Untersuchungen wurden mittels Membranfraktionierung per Ultrazentrifugation durchgeführt. Mehrere Waschschrte mit höheren NaCl-Konzentrationen sollten das fehlerhafte Anhaften an der inneren Seite der Membran verhindern. Der Tat-abhängige Transport des HybC_{proc}-HybO Heterodimers wurde durch die Überprüfung der Membranlokalisation in einem *tat*-Deletionsstamm bestätigt. In diesem Deletionshintergrund liegt weder die HybC-Wildtypvariante, noch die HybC_{proc}-Variante membrangebunden vor. Zudem wurde mittels Sphäroplastenisolierung und anschließender Trypsinbehandlung die korrekte Ausrichtung der großen Untereinheit in das Periplasma untersucht. Dazu wurde die äußere Membran lysiert und durch die Trypsinbehandlung alle in das Periplasma gerichteten Proteine abgelöst. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen mit Trypsin behandelt und der andere nicht. Nach dem Aufschluss der Zellen und der Membranfraktionierung konnte mittels Hyd-2 Antikörper die verschiedenen Varianten der großen Untereinheiten entsprechend lokalisiert werden. Die HybC_{proc}-Variante konnte, genau

wie Wildtyp HybC, ohne Trypsinbehandlung in der Membranfraktionen detektiert werden und mit Trypsinbehandlung nicht. Das bedeutet, die HybC_{proc}-Variante ist korrekt dem Periplasma zugewandt ausgerichtet und somit konnte diese Variante genau wie der Wildtyp durch Trypsin abgelöst werden.

Zusammenfassend zu diesen Untersuchungen konnte eine genetisch prozessierte und nativ gefaltete HybC_{proc}-Variante erstellt werden, die trotz fehlenden [NiFe]-Kofaktor ein Heterodimer mit der kleinen Untereinheit HybO bildet, und dieses mittels Tat-Signalpeptid an HybO über die Cytoplasmamembran transportiert wird und dem Periplasma korrekt ausgerichtet, vorliegt. Auch bei der Molybden-Kofaktorfreen Variante der Dimethylsulfoxidreduktase (DMSO) aus *Rhodobacter sphaeroides* WS8 konnte ein Tat-abhängiger Transport nachgewiesen werden (Buchanan *et al.*, 2001).

Das C-terminale Peptid scheint in der Hydrogenasereifung eine wichtige Kontrollfunktion zu übernehmen. Zum einen ist der C-Terminus der großen Untereinheit wichtig für die Übertragung der Fe(CN)₂CO-Gruppe, dient der Aufrechterhaltung der Konformation während des Kofaktoreinbaus und wird erst abgespalten, wenn der gesamte Kofaktor korrekt inseriert wurde. Zum anderen führt die Abspaltung des C-terminalen Peptids zu einer Konformationsänderung der großen Untereinheit und Initiierung der Dimerisierung mit der kleinen Untereinheit, um anschließend als Heterodimer via dem Tat-Translokon über die Cytoplasmamembran transportiert zu werden.

Auch in anderen Systemen wurde bereits gezeigt, dass C-terminale Peptide wichtige Funktionen übernehmen, wie zum Beispiel die Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation (Talapatra *et al.*, 2015). Dabei handelt es sich um das MCAK Motorprotein, welches durch dessen C-terminales Peptid hinsichtlich Strukturänderungen und Aktivität kontrolliert wird. Wiederum belegen Studien mit der regulatorischen Hydrogenase aus *R. eutropha* und der energie-konservierenden Hydrogenase (Ech) aus extremen Thermophilen und Methanogenen, dass auch Hydrogenasen ohne eine C-terminale Verlängerung maturiert werden können (Friedrich *et al.*, 2005; Soboh *et al.*, 2004). Allerdings ist der [NiFe]-Kofaktoreinbau in diesen Hydrogenasen noch ungeklärt.

4.5. Die essentielle Kontrollfunktion des C-terminalen Peptids im Hydrogenasereifungsmechanismus in einem Modell erklärt

Zusammenfassend für alle erhaltenen Ergebnisse kann die essentielle Kontrollfunktion des C-terminalen Peptids in einem Modell erklärt werden. Abbildung 31 Teil 1 zeigt die Reifung der Wildtyp-Hyd-2. Die Apoform der großen Untereinheit der Hyd-2 (pro-HybC) hat ein durch den C-Terminus vermutlich offen gehaltenes, noch leeres aktives Zentrum. Die Hyp-

Maschinerie, bestehend aus HypF, HypE, HypD und HybG, liefern die $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ -Gruppe des Kofaktors. Die Daten zeigen, dass nur die Apoform der großen Untereinheit mit HybG (und wahrscheinlich dem Komplex bestehend aus D, E und F – aber HybG vermittelt den Kontakt zur großen Untereinheit) interagiert, nicht jedoch die maturierte HybC Variante. Das spricht für die besondere Rolle des C-Terminus in dieser Interaktion. Jedoch wurde auch nachgewiesen, dass der C-Terminus *per se* keine Interaktionsfläche für die Hyp-Maschinerie bzw. Erkennungssequenz für die spezifischen Proteasen darstellt. Dennoch übernimmt der C-Terminus eine wichtige Funktion im Reifungsprozess, welche auch durch die Ergebnisse mit der $\text{HyaB}^{\text{HybC}}$ -Variante unterstützt wurden. Zudem konnte eine Konformationsänderung der großen Untereinheit nach der Insertion des [NiFe]-Kofaktors und der anschließenden Prozessierung durch die spezifische Protease (HypD), detektiert werden. Die vorgestellten Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass der C-Terminus die Konformation der großen Untereinheit bis zur vollständigen Insertion des [NiFe]-Kofaktors offen hält und die Prozessierung den Schließmechanismus des aktiven Zentrums einleitet. In dem Fall würde der C-Terminus eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Reifungsmechanismus einnehmen. Hauptsächlich die Abspaltung des C-terminalen Peptids signalisiert die korrekte Insertion des aktiven Zentrums. Woraufhin auch erst die Heterodimerisierung mit der kleinen Untereinheit HybO und der Tat-abhängige Membrantransport erfolgt. Ergebnisse, die diese Hypothese unterstützen, sind durch die Experimente mit der genetisch prozessierten $\text{HybC}_{\text{proc}}$ Variante geliefert worden. Diese Variante der großen Untereinheit wurde durch eine Stoppkodoninsertion genetisch prozessiert und enthält keinen [NiFe]-Kofaktor. Die genetisch prozessierte $\text{HybC}_{\text{proc}}$ -Variante führte in sämtlichen Hydrogenase defizienten Stämmen zu einer Heterodimerisierung mit HybO und einem sich anschließenden Membrantransport via Tat-Maschinerie (Abbildung 31, Teil 2). Durch die Produktion von $\text{HybC}_{\text{proc}}$ in Stämmen mit Deletionen in Genen, kodierend für essentielle Reifungsproteine, konnte bewiesen werden, dass definitiv kein [NiFe]-Kofaktor enthalten sein konnte. Ob ein alternativer Kofaktor eingebaut wurde, bleibt derzeit noch ungeklärt. Lediglich könnte vermutet werden, dass das aktive Zentrum nicht leer ist, da Studien von Soboh *et al.*, 2012 zeigten, dass möglicherweise einen [FeS]-Kluster als Schutzmaßnahme vor Abbau inseriert werden kann. Zudem scheint die $\text{HybC}_{\text{proc}}$ -Variante eine native Konformation zu haben, da nur nativ gefaltete Substrate durch die Tat-Maschinerie über die Membran transportiert werden (Jack *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 2004). Wiederum ist auch hier allein die Prozessierung des C-Terminus das Signal für den Membrantransport. Es scheint als führe die Tat-Maschinerie nicht wie ursprünglich angenommen (DeLisa *et al.*, 2003; Yahr und Wickner, 2001) eine Qualitätskontrolle des korrekt inserierten aktiven Zentrums durch. Würde diese Kontrolle erfolgen, wäre es nicht möglich eine [NiFe]-kofaktorfreie große Untereinheit in der Membran nachzuweisen.

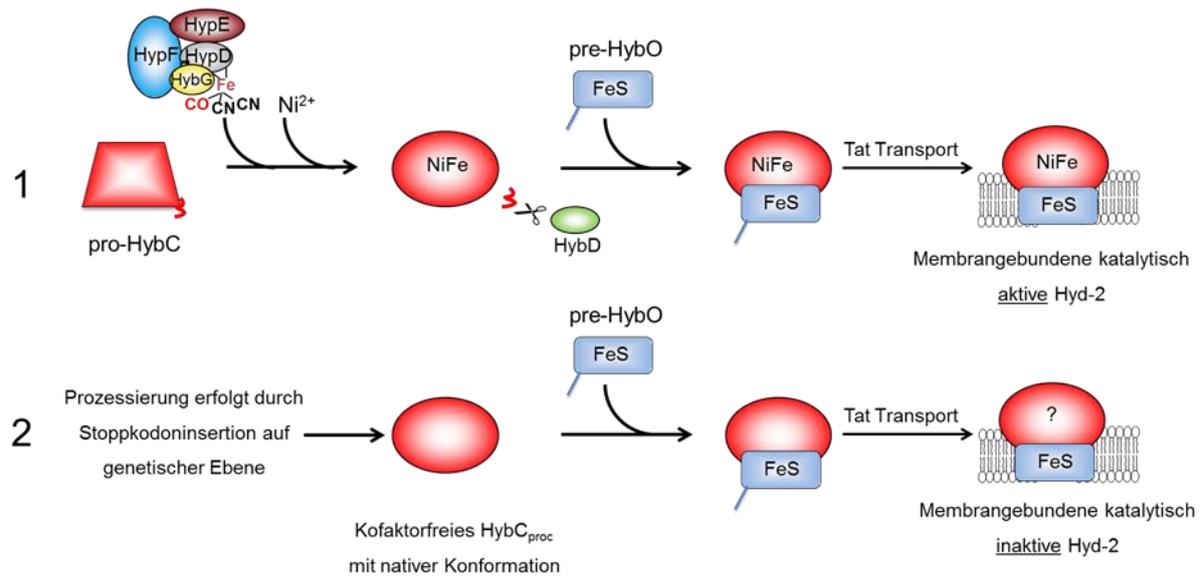


Abbildung 31: Modell zur Veranschaulichung der Kontrollfunktion des C-terminalen Peptids im Hyd-2 Reifungsmechanismus. Modifiziert nach Thomas *et al.*, 2015. Die große Untereinheit der Hyd-2 (HybC) ist rot, die kleine Untereinheit der Hyd-2 (HybO) ist blau dargestellt. Siehe den Text für eine Erklärung.

Für zukünftige wirtschaftliche Interessen hinsichtlich der Einsetzbarkeit der Hydrogenasen als geeigneter Wasserstoffproduzent bzw. auch als Energielieferant aus der Wasserstoffverwertung könnten die vorliegenden Studien von großem Nutzen sein. Hydrogenasen aus *E. coli* werden ausschließlich unter anaeroben Wachstumsbedingungen synthetisiert und aktiviert (Wu und Mandrand, 1993). Von wirtschaftlichem Interesse wäre beispielsweise eine funktionale Hydrogenase unter aeroben Bedingungen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ein aktives Zentrum womöglich zugunsten einer Sauerstoffresistenz verändert werden könnte und somit wirtschaftlich nutzbarer gestaltet werden könnte. Vorbild kann neben den gut charakterisierten [NiFe]-Hydrogenasen aus *E. coli* auch die unter aeroben Bedingungen gebildeten Hydrogenasen aus *R. eutropha* sein (Jones *et al.*, 2004). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass ein Aminosäureaustausch in der großen Untereinheit der Hyd-1 aus *E. coli* bereits zu einer Verdopplung der Wasserstoffproduktion, bei gleichbleibender Sauerstofftoleranz, führt (Flanagan *et al.*, 2016). Die Wissenschaftler wählten dabei eine Aminosäure, die hoch konserviert im aktiven Zentrum der sauerstofftoleranten Hydrogenasen vorkommt (Glutamin E73) und ersetzen diese durch das in sauerstoffsensitiven Hydrogenasen vorkommenden Glutamat (Q). Die Austauschvariante der großen Untereinheit der Hyd-1, E73Q, zeigt im Vergleich zum Wildtyp in elektrochemischen Experimenten gleichbleibende H₂-Oxidation und Sauerstofftoleranz, jedoch eine Verdopplung der H₂-Produktion. Die Studien der vorliegenden Arbeit als auch andere aktuelle Studien leisten einen Beitrag zur Aufklärung der zum Nachbau geeigneten

Modelle der Hydrogenasen, um diese wirtschaftlich als alternative, kostengünstige und ökologische Energiequelle funktional zu produzieren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich auf die Rolle des C-terminalen Peptids an der großen Untereinheit HybC und auf die Interaktion der Reifungsproteine HybG und HypC mit pro-HybC fokussiert. Zunächst konnte eine Interaktion des Reifungsproteins HybG mit der Apoform der großen Untereinheit (pro-HybC) identifiziert werden. Das C-terminale Peptid von HybC schien dabei eine essentielle Rolle zu spielen, da HybG keine Interaktion mit der prozessierten HybC Variante eingeht. Allerdings konnte das C-terminale Peptid durch Terminaustausch Versuche als Interaktionsplattform für die HybG-Hyp-Maschinerie ausgeschlossen werden. Auch für die Proteasen scheint der C-Terminus nicht als einzige Erkennungsequenz zu dienen. Dem C-Terminus muss eine andere essentielle Funktion zukommen. Analysen der Strukturen von pro-HybC und HybC_{proc} (genetisch prozessiert) zeigten markante Unterschiede. Ein limitierter Trypsinverdau zeigte eine deutlich höhere Proteaseresistenz der HybC_{proc} Variante gegenüber der pro-HybC Apoform. Diese Tatsache spricht für eine starke Strukturveränderung nach der C-terminalen Prozessierung. Das wiederum unterstützt eine Konformation-bestimmende Funktion für den C-Terminus während der [NiFe]-Kofaktorinsertion. Möglicherweise hält der C-Terminus die Konformation der großen Untereinheit offen und erleichtert somit die Kofaktorinsertion. Nach abgeschlossener Kofaktorinsertion wird der C-Terminus abgespalten und die Konformation ändert sich, um das aktive Zentrum zu verschließen. Darüber hinaus wurden die Reifungsproteine HybG (Hyd-1 und Hyd-2) und HypC (Hyd-1 und Hyd-3) näher untersucht. Es wurden verschiedene Aminosäureaustausche vorgenommen, um Aminosäurereste zu identifizieren, die für die Aktivierung der jeweiligen großen Untereinheiten der Hydrogenasen verantwortlich sind. Es wurden speziell Aminosäuren ausgetauscht, die zu einer Erhöhung der Ähnlichkeit zwischen HybG und HypC führen. Die Überprüfung der Hydrogenaseaktivitäten zeigte, dass die HybG +GS/-HQL Variante neben der zu erwartenden Hyd-2-Aktivität auch zu einer Hyd-3-Aktivität führte. Die Hyd-3-Aktivität konnte mittels Hydrogenaseaktivitätsfärbung und Gaschromatographischen Studien bestätigt werden. Dieser Aminosäureregion scheint also wichtig für die Hyd-3 Aktivierung zu sein. Im Umkehrschluss konnte keine HypC-Variante identifiziert werden, die in der Lage war neben Hyd-3 auch Hyd-2 zu aktivieren. Nach der Kofaktorinsertion erfolgen die Prozessierung der großen Untereinheit und die Heterodimerisierung mit der kleinen Untereinheit. Untersuchungen zeigten, dass die Reifung der großen Untereinheit unabhängig von der kleinen Untereinheit stattfindet. Jedoch erfolgt die Abspaltung des Tat-Signalpeptids der kleinen Untereinheit nur nach vorangegangener Kofaktorinsertion in die große Untereinheit. Zudem wurde gezeigt, dass eine [NiFe]-kofaktorfreie große Untereinheit (HybC_{proc}) mit der kleinen Untereinheit HybO ein Heterodimer bildet und via die Tat-Maschinerie in die Membran transportiert wird.

6. Ausblick

Mehrere Experimente bzw Fragestellungen stehen noch offen. Die Schlüsselfragestellungen sind folgendermaßen:

1. Interaktionsanalysen des HybG-pro-HybC Komplexes

Chemische Quervernetzungs-Versuche könnten die Interaktion bestätigen und zusätzliche Information über die Interaktionsregionen liefern. Schließlich könnten Kristallstrukturanalysen die genaue Interaktion zwischen beiden Proteinen aufschlüsseln.

2. Konformationsänderung der großen Untereinheit nach der Prozessierung

Zur Bestätigung der Konformationsänderung der großen Untereinheit nach der Prozessierung durch die spezifische Protease könnte ein CD-Spektrum aufgenommen werden. Unterschiede in der Sekundärstruktur könnten mittels Far-UV und Unterschiede in der Tertiärstruktur könnten mittels Near-UV ermittelt werden. Dazu müssen ausreichend pro-HybC und HybC_{proc} gereinigt werden.

3. Analysen der verschiedenen HybG und HypC Varianten hinsichtlich ihrer Interaktion mit den großen Untereinheiten

Die HybG-CEGN Variante verliert die Fähigkeit eine der drei Hydrogenasen zu aktivieren. Um mehr über die Ursache herauszufinden, müsste getestet werden, ob diese Variante noch mit pro-HybC interagiert. Dieser Test kann einerseits mittels gemeinsamer Überproduktion und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung des Zellextraktes unter nicht denaturierenden Bedingungen und dem Nachweis beider Interaktionspartner per Antikörper erfolgen. Andererseits könnten *in vitro* Interaktionsstudien der gereinigten Proteine oder ein gemeinsamer Trypsinverdau Aufschluss über eine vorhandene Interaktion geben. Zudem sollten Interaktionsstudien mit dem Reifungsprotein HypD durchgeführt werden, um eine fehlerhafte Interaktion mit HypD auszuschließen. Darüber hinaus könnte eine Zufallsmutagenese des *hypD*-Gens durchgeführt werden, um nach Hydrogenase-positiven Klonen zu suchen. Solche mutierten *hypD*-Gene würden für HypD Proteine kodieren, welche Aminosäureaustausche, die für die Interaktion mit den Aminosäurereste CEGN in HybG wichtig sind, besitzen.

HypC aus *D. mccartyi* komplementiert alle drei Hydrogenasen in *E. coli*, jedoch nur zusammen mit HypD aus *D. mccartyi*. In der Arbeit ist es nicht gelungen eine HypC Variante zu konstruieren, die Hyd-2 aktivieren kann. Möglicherweise sollten alle konstruierten Varianten gemeinsam mit dem HypD aus *D. mccartyi* in einen *hypC hypG*-defizienten Stamm transformiert und auf Hydrogenaseaktivität untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Adams, M. W. (1990). The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1020, 115-145.
- Adams, M. W., Mortenson, L. E. & Chen, J. S. (1980). Hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 594, 105-176.
- Albareda, M., Palacios, J. M., Imperial, J. & Pacios, L. F. (2013). Computational study of the Fe(CN)₂CO cofactor and its binding to HypC protein. *Journal of Physical Chemistry B*, 117, 13523-13533.
- Albareda, M., Manyani, H., Imperial, J., Brito, B., Ruiz-Argüeso, T., Böck, A. & Palacios, J.-M. (2012). Dual role of HupF in the biosynthesis of [NiFe]-hydrogenase in *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiology*, 12, 256.
- Andrews, S. C., Berks, B. C., Mc Clay, J., Ambler, A., Quail, M. A., Golby, P. & Guest, J. R. (1997). A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*huf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology*, 143, 3633-3647.
- Armstrong, F. A. & Albracht, S. P. (2005). [NiFe]-hydrogenases: spectroscopic and electrochemical definition of reactions and intermediates. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 363, 937-954.
- Atanassova, A. & Zamble, D. B. (2005). *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *Journal of Bacteriology*, 187, 4689-4697.
- Atlung, T., Knudsen, K., Heerfordt, L. & Brøndsted, L. (1997). Effects of sigmaS and the transcriptional activator AppY on induction of the *Escherichia coli* *hya* and *cbdAB-appA* operons in response to carbon and phosphate starvation. *Journal of Bacteriology*, 179, 2141-2146.
- Bagley, K. A., Duin, E. C., Roseboom, W., Albracht, S. P. & Woodruff, W. H. (1995). Infrared-detectable groups sense changes in charge density on the nickel center in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, 34, 5527-5535.
- Bagley, K. A., Van Garderen, C. J., Chen, M., Duin, E. C., Albracht, S. P. & Woodruff, W. H. (1994). Infrared studies on the interaction of carbon monoxide with divalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, 33, 9229-9236.
- Ballantine, S. P. & Boxer, D. H. (1986). Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 156, 277-284.
- Ballantine, S. P. & Boxer, D. H. (1985). Nickel-containing hydrogenase isozymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 163, 454-459.
- Barrett, E. L., Kwan, H. S. & Macy, J. (1984). Anaerobiosis, formate, nitrate, and *pyrA* are involved in the regulation of formate hydrogenlyase in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 158, 972-977.
- Begg, Y. A., Whyte, J. N. & Haddock, B. A. (1977). The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase and nitrate reductase activities using dye indicator plates. *FEMS Microbiology Letters*, 2, 47-50.
- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Molecular Microbiology*, 35, 260-274.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors. *Molecular Microbiology*, 22, 393-404.
- Bernhard, M., Schwartz, E., Rietdorf, J. & Friedrich, B. (1996). The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation

- and electron transport coupling. *Journal of Bacteriology*, 178, 4522-4529.
- Bielak, Claudia (2012). Masterarbeit: Rolle des HybG Proteins im Reifungsprozess der Hydrogenase 2.
- Blokesch, M. & Böck, A. (2006). Properties of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypD. *FEBS Letters*, 580, 4065-4068.
- Blokesch, M., Paschos, A., Bauer, A., Reissmann, S., Drapal, N. & Böck, A. (2004). Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *European Journal of Biochemistry*, 271, 3428-3436.
- Blokesch, M., Rohrmoser, M., Rode, S., Böck, A., & Bo, A. (2004). HybF , a zinc-containing protein involved in [NiFe]-hydrogenase maturation. *Journal of Bacteriology* 186, 2603–2611.
- Blokesch, M., Albracht, S. P., Matzanke, B. F., Drapal, N. M., Jacobi, A. & Böck, A. (2004). The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *Journal of Molecular Biology*, 344, 155-167.
- Blokesch, M. & Böck, A. (2002). Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: The HypC Cycle. *Journal of Molecular Biology*, 324, 287-296.
- Blokesch, M., Magalon, A. & Böck, A. (2001). Interplay between the specific chaperone-like proteins HybG and HypC in maturation of hydrogenases 1, 2, and 3 from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183, 2817-2822.
- Böck, A., King, P. W., Blokesch, M. & Posewitz, M. C. (2006). Maturation of hydrogenases. *Advances in Microbial Physiology*, 51, 1-72.
- Böhm, R., Sauter, M. & Böck, A. (1990). Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Molecular Microbiology*, 4, 231-243.
- Bowman, L., Palmer, T. & Sargent, F. (2013). A regulatory domain controls the transport activity of a twin-arginine signal peptide. *FEBS Letters*, 587, 3365-3370.
- Brøndsted, L. & Atlung, T. (1996). Effect of growth conditions on expression of the acid phosphatase (*cyx- appA*) operon and the *appY* gene, which encodes a transcriptional activator of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178, 1556-1564.
- Brøndsted, L. & Atlung, T. (1994). Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 *hya* operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 176, 5423-5428.
- Buchanan, G., Kuper, J., Mendel, R. R., Schwarz, G. & Palmer, T. (2001). Characterisation of the *mob* locus of *Rhodobacter sphaeroides* WS8: *mobA* is the only gene required for molybdopterin guanine dinucleotide synthesis. *Archives of Microbiology*, 176, 62-68.
- Bürstel, I., Sieberts, E., Winter, G., Hummels, P., Zebgers, I., Friedrich, B. & Lenz, O. (2012). A universal scaffold for synthesis of the Fe(CN)₂(CO) moiety of [NiFe]-hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 38845-38853.
- Butland, G., Zhang, J. W., Yang, W., Sheung, A., Wong, P., Greenblatt, J. F., Emili, A. & Zamble, D. B. (2006). Interactions of the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic proteins: HybG complex formation. *FEBS Letters*, 580, 677-681.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology*, 104, 541–555.
- Chen, J. C. & Mortenson, L. E. (1992). Identification of six open reading frames from a region

- of the *Azotobacter vinelandii* genome likely involved in dihydrogen metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1131, 199-202.
- Cheng, T., Li, H., Yang, X., Xia, W. & Sun, H. (2013). Interaction of SlyD with HypB of *Helicobacter pylori* facilitates nickel trafficking. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 5, 804-807.
- Conrad, R. (1996). Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews*, 60, 609-640.
- Darensbourg, M. Y., Lyon, E. J., Zhao, X. & Georgakaki, I. P. (2003). The organometallic active site of [Fe]hydrogenase: models and entatic states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3683-3688.
- DeLisa, M. P., Tullman, D. & Georgiou, G. (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 6115-6120.
- Dernedde J., Eitinger M. & Friedrich, B. (1993). Analysis of a pleiotropic gene region involved in formation of catalytically active hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Archives of Microbiology*, 6, 545-553.
- Dolla, A., Pohorelic, B. K., Voordouw, J. K. & Voordouw, G. (2000). Deletion of the *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *Hildenborough* hampers hydrogen metabolism and low-redox-potential niche establishment. *Archives of Microbiology*, 174, 143-151.
- Dower, W. J., Miller J.F. & Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16, 6127-6145.
- Drapal, N. & Böck, A. (1998). Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry*, 37, 2941-2948.
- Dubini, A. & Sargent, F. (2003). Assembly of Tat-dependent [NiFe]-hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Letters*, 549, 141-146.
- Dubini, A., Pye, R. L., Jack, R. L., Palmer, T. & Sargent, F. (2002). How bacteria get energy from hydrogen: A genetic analysis of periplasmic hydrogen oxidation in *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1413-1420.
- Enoch, H. G. & Lester, R. L. (1975). The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 6693-6705.
- Flanagan, L., Wright, J., Roessler, M., Moir, J. W. & Parkin, A. (2016). Re-engineering a [NiFe]- hydrogenase to increase the H₂ production bias while maintaining native levels of O₂ tolerance. *Chemical Communications*, 52, 9133-9136.
- Forzi, L. & Sawers, R. G. (2007). Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *BioMetals*, 20, 565-578.
- Friedrich, B., Buhrke, T., Burgdorf, T. & Lenz, O. (2005). A hydrogen-sensing multiprotein complex controls aerobic hydrogen metabolism in *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Society Transactions*, 33, 97-101.
- Fritsche, E., Paschos, A., Beisel, H. G., Böck, A. & Huber, R. (1999). Crystal structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HybD from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 288, 989-998.
- Gasper, R., Scrima, A. & Wittinghofer, A. (2006). Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 27492-27502.

- Gollin, D. J., Mortenson, L. E. & Robson, R. L. (1992a). Carboxyl-terminal processing may be essential for production of active [NiFe]-hydrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *FEBS Letters*, 309, 371-375.
- Gross R., Simon J. & Kroger A. (1999). The role of the twin-arginine motif in the signal peptide encoded by the *hydA* gene of the hydrogenase from *Wolinella succinogenes*. *Archives of Microbiology*, 172, 227-232.
- Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P. & Bagley, K. A. (1997). Biological activation of hydrogen. *Nature*, 385, 126.
- Hartwig, S., Thomas, C., Krumova, N., Quitzke, V., Jehmlich, N., Adrian, L. & Sawers, R. G. (2015). Heterologous complementation studies in *Escherichia coli* with the Hyp accessory protein machinery from *Chloroflexi* provide insight into [NiFe]-hydrogenase large subunit recognition by the HypC protein family. *Microbiology*, 161, 2204-2219.
- 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, 1671-1680.
- Horman, K. & Andreesen, J. R. (1989). Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. *Archives of Microbiology*, 153, 50-59.
- Horner, D. S., Foster, P. G. & Embley, T. M. (2000). Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1695-1709.
- Hube, M., Blokesch, M. & Böck, A. (2002). Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: Role of accessory proteins HypA and HybF. *Journal of Bacteriology*, 184, 3879-3885.
- Jack, R. L., Dubini, A., Palmer, T. & Sargent, F. (2005). Common principles in the biosynthesis of diverse enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 33, 105-107.
- Jack, R. L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. & Sargent, F. (2004). Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *The EMBO Journal*, 23, 3962-3972.
- Jacobi, A., Rossmann, R. & Böck, A. (1992). The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 158, 444-451.
- Jeoung, J.-H. & Dobbek, H. (2007). Carbon dioxide activation at the NiFe-cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase. *Science (New York, N.Y.)*, 318, 1461-1464.
- Jones, A. K., Lenz, O., Strack, A., Buhrke, T. & Friedrich, B. (2004). [NiFe]-hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry*, 43, 13467-13477.
- Korbas, M., Vogt, S., Meyer-Klaucke, W., Bill, E., Lyon, E. J., Thauer, R. K. & Shima, S. (2006). The iron-sulfur cluster-free hydrogenase (Hmd) is a metalloenzyme with a novel iron binding motif. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 30804-30813.
- Kortluke, C. & Friedrich, B. (1992). Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Bacteriology*, 174, 6290-6293.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S. H., Kuhl, H., Reinhardt, R. & Adrian, L. (2005). Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nature Biotechnology*, 23, 1269-1273.
- Kwon, S., Nishitani, Y., Watanabe, S., Hirao, Y., Imanaka, T., Kanai, T., Atomi, H. & Miki, K. (2016). Crystal structure of a [NiFe]-hydrogenase maturation protease HybD from

- Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Proteins*, 84, 1321-1327.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Leach, M. R., Zhang, J. W. & Zamble, D. B. (2007). The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 16177-16186.
- Leach, M. R., Sandal, S., Sun, H. & Zamble, D. B. (2005). Metal binding activity of the *Escherichia coli* hydrogenase maturation factor HypB. *Biochemistry*, 44, 12229-12238.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lukey, M. J., Parkin, A., Roessler, M. M., Murphy, B. J., Harmer, J., Palmer, T., Sargent, F. & Armstrong, F. A. (2010). How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 3928-3938.
- Magalon, A. & Böck, A. (2000a). Analysis of the HypC-HycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 21114-21120.
- Magalon, A. & Böck, A. (2000b). Dissection of the maturation reactions of the [NiFe]-hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. *FEBS Letters*, 473, 254-258.
- Maier, T. & Böck, A. (1996). Nickel incorporation into hydrogenases, in: R.P. Hausinger, G.L. Eichhorn, L.G. Marzilli (Eds.), *Mechanisms of Metallocenter Assembly*, VCH Publishers, Inc., New York, 1996, 173-192.
- Maier, T. & Böck, A. (1996). Generation of active [NiFe]-hydrogenase *in vitro* from a nickel-free precursor form. *Biochemistry*, 35, 10089-10093.
- Maier, T., Jacobi, A., Sauter, M. & Böck, A. (1993). The product of the *hypB* gene, which is required for nickel incorporation into hydrogenases, is a novel guanine nucleotide-binding protein. *Journal of Bacteriology*, 175, 630-635.
- Marusyk, R. & Sergeant, A. (1980). A simple method for dialysis of small-volume samples. *Analytical Biochemistry*, 105, 403-404.
- Melis, A. & Happe, T. (2001). Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. *Plant Physiology*, 127, 740-748.
- Menon, A. L. & Robson, R. L. (1994). *In vivo* and *in vitro* nickel-dependent processing of the [NiFe]-hydrogenase in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 176, 291-295.
- Menon, N. K., Chatelus, C. Y., Dervartanian, M., Wendt, J. C., Shanmugam, K. T., Peck, H. D. & Przybyla, A. E. (1994). Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. *Journal of Bacteriology*, 176, 4416-4423.
- Menon, N. K., Robbins, J., Der Vartanian, M., Patil, D., Peck, H. D., Menon, A. L., Robson, R. L. & Przybyla, A. E. (1993). Carboxy-terminal processing of the large subunit of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Letters*, 331, 91-95.
- Menon, N. K., Robbins, J., Peck, H. D., Chatelus, C. Y., Choi, E. S. & Przybyla, A. E. (1990). Cloning and sequencing of a putative *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase-1 operon containing six open reading frames. *Journal of Bacteriology*, 172, 1969-1977.
- Miller, J. A. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor*

Symposia on Quantitative Biology, 51, 263-273.

- Ogata, H., Nishikama, K. & Lubitz, W. (2015). Hydrogenes detected by subatomic resolution protein crystallography in a [NiFe]-hydrogenase. *Nature*, 520, 571-574.
- Olson, J. W. & Maier, R. J. (1997). The sequences of *hypF*, *hypC* and *hypD* complete the *hyp* gene cluster required for hydrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Gene*, 199, 93-99.
- Oresnik, I. J., Ladner, C. L. & Turner, R. J. (2001). Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Molecular Microbiology*, 40, 323-331.
- Perry, S., Shearer, N., Little, R., & Dixon, R. (2005). Mutational analysis of the nucleotide-binding domain of the anti-activator NifL. *Journal of Molecular Biology*, 346, 935-949.
- Peters, J. W., Schut, G. J., Boyd, E. S., Mulder, D. W., Shepard, E. M., Broderick, J. B., King, P. W. & Adams, M. W. W. (2015). [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853, 1350-1369.
- Petkun, S., Shi, R., Li, Y., Asinas, A., Munger, C., Zhang, L., Waclawek, M., Soboh, B., Sawers, R. G. & Cygler, M. (2011). Structure of hydrogenase maturation protein HypF with reaction intermediates shows two active sites. *Structure*, 19, 1773-1783.
- Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E., & Böck, A. (2002). HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe]-hydrogenase maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 49945-49951.
- Paschos, A., Glass, R. S., & Böck, A. (2001). Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Letters*, 488, 9-12.
- Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A. & Albracht, S. P. (1999). Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 3331-3337.
- Pinske, C., Jaroschinsky, M., Linek, S., Kelly, C. L., Sargent, F. & Sawers, R. G. (2015). Physiology and bioenergetics of [NiFe]-hydrogenase 2-catalyzed H₂-consuming and H₂-producing reactions in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 197, 296-306.
- Pinske, C., Sargent, F. & Sawers, R. G. (2015). SlyD-dependent nickel delivery limits maturation of [NiFe]-hydrogenases in late-stationary phase *Escherichia coli* cells. *Metallomics*, 7, 683-690.
- Pinske, C. & Sawers, R. G. (2014). The importance of iron in the biosynthesis and assembly of [NiFe]-hydrogenases. *Biomolecular Concepts*, 5, 55-70.
- Pinske, C. & Sawers, R. G. (2012a). A-type carrier protein ErpA is essential for formation of an active formate-nitrate respiratory pathway in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 194, 346-353.
- Pinske, C. & Sawers, R. G. (2012b). Delivery of iron-sulfur clusters to the hydrogen-oxidizing [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli* requires the A-type carrier proteins ErpA and IscA. *PLoS ONE*, 7.
- Pinske, C., Krüger, S., Soboh, B., Ihling, C., Kuhns, M., Brausseman, M., Jaroschinsky, M., Sauer, C., Sargent, F., Sinz, A. & Sawers, R. G. (2011). Efficient electron transfer from hydrogen to benzyl viologen by the [NiFe]-hydrogenases of *Escherichia coli* is dependent on the coexpression of the iron-sulfur cluster-containing small subunit. *Archives of Microbiology*, 193, 893-903.
- Pinske, C., Bönn, M., Krüger, S., Lindenstrauß, U. & Sawers, R. G. (2011). Metabolic deficiencies revealed in the biotechnologically important model bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). *PLoS ONE*, 6.

- Pinske, C. & Sawers, R. G. (2011). Iron restriction induces preferential down-regulation of H₂-consuming over H₂-evolving reactions during fermentative growth of *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 11, 196-207.
- Pöritz, M., Goris, T., Wubet, T., Tarkka, M. T., Buscot, F., Nijenhuis, I., Lechner, U. & Adrian, L. (2013). Genome sequences of two dehalogenation specialists - *Dehalococcoides mccartyi* strains BTF08 and DCMB5 enriched from the highly polluted Bitterfeld region. *FEMS Microbiology Letters*, 343, 101-104.
- Rangarajan, E. S., Asinas, A., Proteau, A., Munger, C., Baardsnes, J., Iannuzzi, P., Matte, A. & Cygler, M. (2008). Structure of [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypE from *Escherichia coli* and its interaction with HypF. *Journal of Bacteriology*, 190, 1447-1458.
- Redwood, M. D., Mikheenko, I. P., Sargent, F. & Macaskie, L. E. (2008). Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production. *FEMS Microbiology Letters*, 278, 48-55.
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S. & Böck, A. (2003). Taming of a poison: biosynthesis of the [NiFe]-hydrogenase cyanide ligands. *Science (New York, N.Y.)*, 299, 1067-1070.
- Rey, L., Imperial, J., Palacios, J. M. & Ruiz-Argueso, T. (1994). Purification of *Rhizobium leguminosarum* HypB, a nickel-binding protein required for hydrogenase synthesis. *Journal of Bacteriology*, 176, 6066-6073.
- Rey, L., Murillo, J., Hernando, Y., Hidalgo, E., Cabrera, E., Imperial, J. & Ruiz-Argueso, T. (1993). Molecular analysis of a microaerobically induced operon required for hydrogenase synthesis in *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*. *Molecular Microbiology*, 8, 471-481.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Müller, M. & Wu, L. F. (1999). Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13223-13228.
- Rossmann, R., Maier, T., Lottspeich, F. & Böck, A. (1995). Characterization of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation. *European Journal of Biochemistry*, 227, 545-550.
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. & Böck, A. (1994). Maturation of the large subunit (HycE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 220, 377-384.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sargent, F. (2016). The model [NiFe]-hydrogenases of *Escherichia coli*. *Advances in Bacterial Electron Transport Systems and Their Regulation* 68.
- Sargent, F., Ballantine, S. P., Rugman, P. A., Palmer, T. & Boxer, D. H. (1998). Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit--identification of a soluble precursor of the small subunit in a *hypB* mutant. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 255, 746-754.
- Sawers, R. G. & Clark, D. P. (2004). Fermentative pyruvate and acetyl-coenzyme A metabolism. *EcoSal Plus*, 1, 1-43.
- Sawers, R. G. & Boxer, D. H. (1986). Purification and properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme 1 from anaerobically grown *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 156, 265-275.
- Schwartz, E. & Friedrich, B. (2003). The H₂-metabolizing prokaryotes. In *New York, Springer*.
- Self, W. T., Hasona, A. & Shanmugam, K. T. (2004). Expression and regulation of a silent

- operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186, 580-587.
- Seshadri, R. (2005). Genome Sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science*, 307, 105-108.
- Shima, S., Lyon, E. J., Thauer, R. K., Mienert, B. & Bill, E. (2005). Mössbauer studies of the iron-sulfur cluster-free hydrogenase: the electronic state of the mononuclear Fe active site. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 10430-10435.
- Shomura, Y. & Higuchi, Y. (2012). Structural basis for the reaction mechanism of S-carbamoylation of HypE by HypF in the maturation of [NiFe]-hydrogenases. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 28409-28419.
- Soboh, B., Lindenstrauss, U., Granich, C., Javed, M., Herzberg, M., Thomas, C. & Stripp, S. T. (2014). [NiFe]-hydrogenase maturation *in vitro*: analysis of the roles of the HybG and HypD accessory proteins. *Biochemical Journal*, 464, 169-177.
- Soboh, B., Stripp, S. T., Bielak, C., Lindenstrauss, U., Braussemann, M., Javaid, M., Herzberg, M., Heberle, J. & Sawers, R. G. (2013). The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Letters*, 587, 2512-2516.
- Soboh, B., Kuhns, M., Braussemann, M., Waclawek, M., Muhr, E., Pierik, A. J. & Sawers, R. G. (2012). Evidence for an oxygen-sensitive iron-sulfur cluster in an immature large subunit species of *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424, 158-163.
- Soboh, B., Stripp, S. T., Muhr, E., Granich, C., Braussemann, M., Herzberg, M. & Sawers, R. G. (2012). [NiFe]-hydrogenase maturation: Isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands. *FEBS Letters*, 586, 3882-3887.
- Soboh, B., Linder, D. & Hedderich, R. (2004). A multisubunit membrane-bound [NiFe]-hydrogenase and an NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Microbiology*, 150, 2451-2463.
- Sorgenfrei, O., Linder, D., Karas, M. & Klein, A. (1993). A novel very small subunit of a selenium containing [NiFe]-hydrogenase of *Methanococcus voltae* is postranslationally processed by cleavage at a defined position. *European Journal of Biochemistry*, 213, 1355-1358.
- Stephenson, M. & Stickland, L. H. (1931). Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *The Biochemical Journal*, 25, 205-214.
- Stripp, S. T., Lindenstrauss, U., Sawers, R. G. & Soboh, B. (2015). Identification of an isothiocyanate on the HypEF complex suggests a route for efficient cyanyl-group channeling during [NiFe]-hydrogenase cofactor generation. *Plos One*, 10, e0133118.
- Stripp, S. T., Lindenstrauss, U., Granich, C., Sawers, R. G. & Soboh, B. (2014). The influence of oxygen on [NiFe]-hydrogenase cofactor biosynthesis and how ligation of carbon monoxide precedes cyanation. *PLoS ONE*, 9, e107488.
- Stripp, S. T., Soboh, B., Lindenstrauss, U., Braussemann, M., Herzberg, M., Nies, D. H., Sawers, R. G. & Heberle, J. (2013). HypD is the scaffold protein for Fe-(CN)₂CO cofactor assembly in [NiFe]-hydrogenase maturation. *Biochemistry*, 52, 3289-3296.
- Talapatra, S. K., Harker, B. & Welburn, J. P. I. (2015). The C-terminal region of the motor protein MCAK controls its structure and activity through a conformational switch. *eLife*, 4, 1-21.
- Tard, C., Liu, X., Ibrahim, S. K., Bruschi, M., De Gioia, L., Davies, S. C., Yang, X., Wang, L.

- S., Sawers, R. G. & Pickett, C. J. (2005). Synthesis of the H-cluster framework of iron-only hydrogenase. *Nature*, 433, 610-613.
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T. & Shima, S. (2010). Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 507-536.
- Theodoratou, E. (2005). [NiFe]-hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochemical Society Transactions*, 33, 108-111.
- Theodoratou, E., Paschos, A., Mintz-Weber, S. & Böck, A. (2000). Analysis of the cleavage site specificity of the endopeptidase involved in the maturation of the large subunit of hydrogenase 3 from *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 173, 110-116.
- Thomas, C., Muhr, E. & Sawers, R. G. (2015). Coordination of synthesis and assembly of a modular membrane-associated [NiFe]-hydrogenase is determined by cleavage of the C-terminal peptide. *Journal of Bacteriology*, 197, 2989-2998.
- Tominaga, T., Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. (2013). Crystal structures of the carbamoylated and cyanated forms of HypE for [NiFe]-hydrogenase maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 20485-20490.
- Trchounian, K., Pinske, C., Sawers, R. G. & Trchounian, A. (2012). Characterization of *Escherichia coli* [NiFe]-hydrogenase distribution during fermentative growth at different pHs. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 62, 433-440.
- van der Spek, T. M., Arendsen, A. F., Happe, R. P., Yun, S., Bagley, K. A., Stufkens, D. J., Hagen, W. R. & Albracht, S. P. (1996). Similarities in the architecture of the active sites of Ni-hydrogenases and Fe-hydrogenases detected by means of infrared spectroscopy. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 237, 629-634.
- Vignais, P. M. & Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chemical Reviews*, 107, 4206-4272.
- Vignais, P. M., Billoud, B. & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 455-501.
- Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Lenz, O., Zebger, I., Friedrich, B. & Armstrong, F. A. (2005). Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16951-16954.
- Volbeda, A., Darnault, C., Parkin, A., Sargent, F., Armstrong, F. A. & Fontecilla-Camps, J. C. (2013). Crystal structure of the O₂-tolerant membrane-bound hydrogenase 1 from *Escherichia coli* in complex with its cognate cytochrome b. *Structure*, 21, 184-190.
- Volbeda, A., Amara, P., Darnault, C., Mouesca, J.-M., Parkin, A., Roessler, M. M., Armstrong, F. A. & Fontecilla-Camps, J. C. (2012). X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 5305-5310.
- Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B. W., Roseboom, W., Albracht, S. P. J., Garcin, E., Rousset, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (2005). Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe]-hydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10, 239-249.
- Volbeda, A., Sharon, 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, 580-587.
- Wang, L., Xia, B. & Jin, C. (2007). Solution structure of *Escherichia coli* HypC. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications*, 361, 665-669.
- Watanabe, S., Kawashima, T., Nishitani, Y., Kanai, T., Wada, T., Inaba, K., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. (2015). Structural basis of a Ni acquisition cycle for [NiFe]-hydrogenase by Ni-metallochaperone HypA and its enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 7701-7706.
- Watanabe, S., Matsumi, R., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. (2012). Crystal structures of the HypCD complex and the HypCDE ternary complex: Transient intermediate complexes during [NiFe]-hydrogenase maturation. *Structure*, 20, 2124-2137.
- Watanabe, S., Matsumi, R., Arai, T., Atomi, H., Imanaka, T. & Miki, K. (2007). Crystal structures of [NiFe]-hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: Insights into cyanation reaction by thiol redox signaling. *Molecular Cell*, 27, 29-40.
- Waugh, R. & Boxer, D. H. (1986). Pleiotropic hydrogenase mutants of *Escherichia coli* K12: growth in the presence of nickel can restore hydrogenase activity. *Biochimie*, 68, 157-166.
- Wexler, M., Sargent, F., Jack, R. L., Stanley, N. R., Bogsch, E. G., Robinson, C., Berks, B. C. & Palmer, T. (2000). TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in Sec-independent protein export. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 16717-16722.
- Winter, G., Buhrke, T., Lenz, O., Jones, A. K., Forgber, M. & Friedrich, B. (2005). A model system for [NiFe]-hydrogenase maturation studies: Purification of an active site-containing hydrogenase large subunit without small subunit. *FEBS Letters*, 579, 4292-4296.
- Wu, L. F. & Mandrand, M. A. (1993). Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiology Reviews*, 10, 243-269.
- Wu L. F. & Mandrand-Berthelot M. A. (1986). Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie*, 68, 167-179.
- Yahr, T. L. & Wickner, W. T. (2001). Functional reconstitution of bacterial Tat translocation *in vitro*. *The EMBO Journal*, 20, 2472-2479.
- Zhang, J. W., Butland, G., Greenblatt, J. F., Emili, A. & Zamble, D. B. (2005). A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 4360-4366.
- Zhang, M., Pradel, N., Mandrand-Berthelot, M. A., Yu, Z. & Wu, L. F. (2003). Effect of alteration of the C-terminal extension on the maturation and folding of the large subunit of the *Escherichia coli* hydrogenase-2. *Biochimie*, 85, 575-579.

Anhang

Übersicht über die verwendeten Primer

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendung
Bam-G-AS2for	AAGGATCCTGTATTGGCGTT CCAGGCCAGG	Amplifiziert <i>hybG</i> von 5' und fügt <i>Bam</i> HI Schnittstelle an; zur Klonierung von <i>hybG</i> in pJW234 an das 3' Ende einer Octahistidin kodierenden Gensequenz
XhoI-G-nt249rev	GGCTCGAGTACCGCGCTGGT AATGTCGTAATC	Amplifiziert <i>hybG</i> von 3' und fügt C' <i>Xho</i> I Schnittstelle an; zur Klonierung von <i>HybG</i> in pJW234 Valin statt StopppKodon
Nco-G-AS2for	AACCATGGCGTGTATTGGCG TTCCAGGCCAGG	Amplifiziert <i>hybG</i> Richtung 3' von, einschließlich, AS 92; fügt vor dieser ein für Alanin kodierendes Kodon an (entfernt i.d.R den N-terminalen His-tag raus)
Nde-G-AS2for	AACATATGTGTATTGGCGTTC CAGGCCAGG	Amplifiziert <i>hybG</i> von 5' fügt N <i>Nde</i> I Schnittstelle an; zur Klonierung von <i>hybG</i> in pET-30a ⁺ mit C-terminalen His-tag
hybG-Bsal for	ATGGTAGGTCTCAAATGTGTA TTGGCGTTCCAG	<i>hybG</i> wird vom 5' Ende amplifiziert, um eine N' terminale <i>Bsa</i> I Schnittstelle anzufügen
hybG-Bsal rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTAA TGTCGTAATCCAT	<i>hybG</i> wird vom 3' Ende amplifiziert, um eine C' terminale <i>Bsa</i> I Schnittstelle anzufügen
XhoI-G 249Stopp rev	GGCTCGAGTCACGCGCTGGT AATGTCGTAATC	Amplifiziert <i>hybG</i> von 3' fügt C' <i>Xho</i> I Schnittstelle an; zur Klonierung von <i>hybG</i> in pJW234 StopppKodon
hybC-C-Terminus for	GGGCCCGGATCCGTAGTGG TGCTGACGGCAACGAAGTGG TTTCA	Annealing der Megaprimer und anschließende Klenow Fragment Verlängerung führen zu Erhalt des <i>hybC</i> -C-Terminus mit BamHI und XhoI Schnittstellen an N- und C-Terminus für die Klonierung in den pzl Vektor
hybC-C-Terminus rev	AATTCCTCGAGTTACAGAAC CTTCACTGAAACCACTTCGTT GCC	
hybCproc +AUG for	TGTGCGGTACTAAATGGT AGTGGATGCTGACGGC	Basenaustausch im <i>hybC</i> Gen kodierend für ein StartKodon an Position 553 (ATG) umkloniert, um <i>HybC</i> und <i>HybC</i> -C-Terminus <i>in trans</i> komplementieren zu können
hybCproc +AUG rev	GCCGTCAGCATCCACTACCA TTAGTGTACCGCACA	
hybG+GS for	GGGGAATATCGCCCTGATTG GCAGCTGTGAAGGTAACCCT	Baseninsertion im <i>hybG</i> Gen kodierend für die Aminosäuren GS (Position 34-35)
hybG+GS rev	GGGGAGGGTTACCTTCACAG CTGCCAATCAGGGCGATATT	
hybG-HQL for	GGGGTTCGGTGAAGATATTG CGCAGGTTGAAGTA	Basendeletion im <i>hybG</i> Gen kodierend für die Aminosäuren HQL (Position 17-19)
hybG-HQL rev	GGGGTACTTCAACCTGCGCA ATATCTTCACCGAC	

hybG-CGEN for	GATGTGAATATCGCCCTGATT CCTGCCGATCTACTGGGCCA G	Basendeletion im <i>hybG</i> Gen kodierend für die Aminosäuren CEGN (Position 34-37)
hybG-CGEN rev	CTGGCCCAGTAGATCGGCAG GAATCAGGGCGATATTCACA TC	
hybG Stoppp Y for	CTGCGCCAAATGGATTAGGA CATTACCAGCGCG	Punktmutation im <i>hybG</i> Gen kodierend für ein StopppKodon (Y wurde in StopppKodon umgewandelt TAG)
hybG Stoppp Y rev	CGCGCTGGTAATGTCCTAAT CCATTTGGCGCAG	
hypC+HQL for	ATTGACGGCAACCAGCATC AACTCGCGAAAGTCGACG	Baseninsertion im <i>hypC</i> Gen kodierend für die Aminosäuren HQL (Position 17-19)
hypC+HQL rev	GACGTCGACTTTCGCGAGT TGATGCTGGTTGCCGTCA	
hypC-GS for	GATTTAACGTTAGTCTGCG ATGAAAACGGT	Basendeletion im <i>hypC</i> Gen kodierend für die Aminosäuren GS (Position 34-35)
hypC-GS rev	ACCGTTTTTCATCGCAGACT AACGTTAAATC	
hypC-VStopp for	CAAACATGTTTGACTAAGAG CCGGATGTCGGC	Punktmutation im <i>hypC</i> Gen kodierend für ein StopppKodon (V77 wurde in StopppKodon umgewandelt TAG)
hypC-VStopp rev	GCCGACATCCGGCTCTTAGT CAAACATGTTTTG	
hypC-GStopp for	GTTGAGCCGGATGTCTGAGC GCTGTTGTATGGC	Punktmutation im <i>hypC</i> Gen kodierend für ein StopppKodon (V82 wurde in StopppKodon umgewandelt TAG)
hypC-GStopp rev	GCCATACAACAGCGCTCAGA CATCCGGCTCAAC	
hypC+PAD for	CAGCTGCGATGAAAACCCTG CGGACCGCGTGGGCCAGTG GGTAC	Aminosäureaustausch HypC an Postion 40-42 (GQP gegen PAD)
hypC+PAD rev	GTACCCACTGGCCCACGCGG TCCGCAGGGTTTTTCATCGCA GCTG	
FOR HyaB	CCCGGAGGTCTCCGCGCATG AGCACTCAGTACGAAAC	Amplifiziert <i>hyaB</i> von 5'Ende und fügt N'-Terminal BSAI Schnittstelle an zur Kolnierung in pASK-IBA3.
For HyaB-C- Terminus -Mega	AAATTAGCATGGCCTGTGCG GTACACGTGCTGGGCGACGA CGGTAGCGAG CTGATC	Annealing der Megaprimer mit anschließender Klenow Fragment Verlängerung führt zur Konstruktion des vom 3'Ende amplifizierenden <i>reverse</i> Primer, um den HyaB C-Terminus an HybC zu fusionieren und durch eine BSAI Schnittstelle in pASK- IBA3 zu klonieren
Rev HyaB-C- Terminus-Mega	AACGGGGGTCTCCTATCATT AACGCACCTGCACGGAGATC AGCTCGCTACC	
FOR HybC	CCCCAAGGTCTCCGCGCATG AGCCAGA GAATTACTAT	Amplifiziert <i>hybC</i> von 5'Ende und fügt N'-Terminal BSAI Schnittstelle an zur Kolnierung in pASK-IBA3.
For HybC-C- Terminus -Mega	AAATTAGCCTCGCCTGTTCAA CACACGTAGTGGATGCTGAC GGCAACGAAGTGGTT	Annealing der Megaprimer mit anschließender Klenow Fragment Verlängerung führt zur Konstruktion des vom 3'Ende amplifizierenden <i>reverse</i> Primer, um den HybC C-Terminus an HyaB zu fusionieren und durch
Rev HybC-C- Terminus-Mega	CCCGGGGGTCTCCTATCATT ACAGAACCCTTCACTGAAACCA CTTCGTTGCC	

		eine BSAI Schnittstelle in pASK-IBA3 zu klonieren
hypF-k.o. for	GGGGAACAACCTGAGCGCAGA	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hypF</i> Gens
hypF-k.o. rev	AAAGCTTCGCGCCTTTGTGG	
hybG-k.o. for	AAAGCCACGGAACGGTGGCG	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hybG</i> Gens
hybG-k.o. rev	GGGCCGCTGAATGAGCAGTT	
hypC-k.o. for	GGGCCACTGAAATATCCGCA TAT	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hypC</i> Gens
hypC-k.o. rev	AAACGGACCGTGGATAAACT CAA	
hybC-k.o. for	GGGGCAACCTGGCGTCTGAC	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hybC</i> Gens
hybC-k.o. rev	AAATTTTCGAGACAATGGCAT	
hybD-k.o. for	GGGTCAACCTGGAACCTCTGG T	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hybD</i> Gens
hybD-k.o. rev	AAAGGCCGGGGAAGATAACT G	
hyaD-k.o. for	GGGTTTTTCTACTGGACGGG T	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hyaD</i> Gens
hyaD-k.o. rev	AAAATAGTCGGGAAACTCGC G	
hybE-k.o. for	AAACCTGGCCGACGT	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hybE</i> Gens
hybE-k.o. rev	CCCGGGCGGGTTTAT	
hyaE-k.o. for	AAAGACTACGGCGGT	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hyaE</i> Gens
hyaE-k.o. rev	CCCGCCCAACGGCGG	
hyaF-k.o. for	AAACCCGACTATACA	Kontrollprimer zur Überprüfung der Deletion des <i>hyaF</i> Gens
hyaF-k.o. rev	CCCAAATAAAAAGT	
Strep up	GACGCAGTAGCGGTAAACG	vektorkodierter <i>reverse</i> Primer für pASK-IBA Vektoren
Strep down	AGAGTTATTTTACCCTCCCT	vektorkodierter <i>forward</i> Primer für pASK-IBA Vektoren

Proteaseverdau von pro-HybC und HybC_{proc}

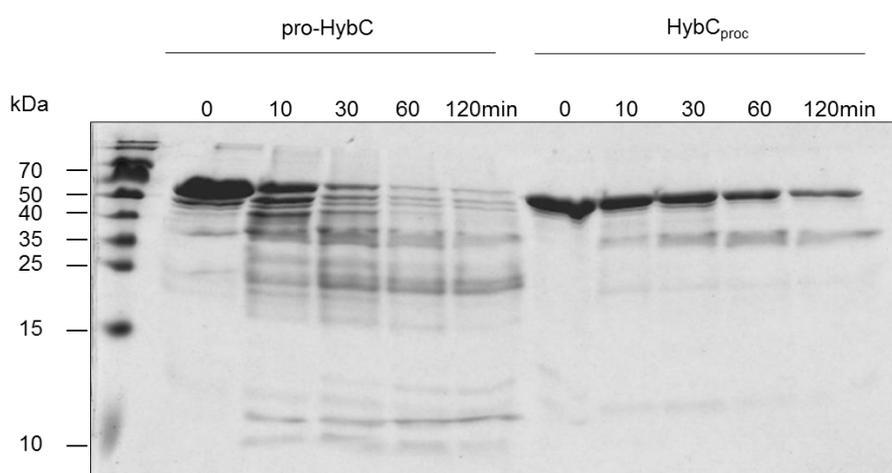


Abbildung 32: SDS-PAGE Analyse der limitierten Proteolyse mittels Chymotrypsin von pro-HybC und HybC_{proc}. Gereinigtes pro-HybC und HybC_{proc} (100 µg Protein) wurden zusammen mit 1 µg Chymotrypsin inkubiert. Die Chymotrypsin-Inkubation erfolgte bei 37 °C. Nach Zugabe von Chymotrypsin wurden in regelmäßigen Abständen 10 µl Probe (10 µg) entnommen, sofort in SDS-Probenpuffer gekocht und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Färbung erfolgte mit PAGE *Blue Protein staining solution* (ThermoFisher Scientific).

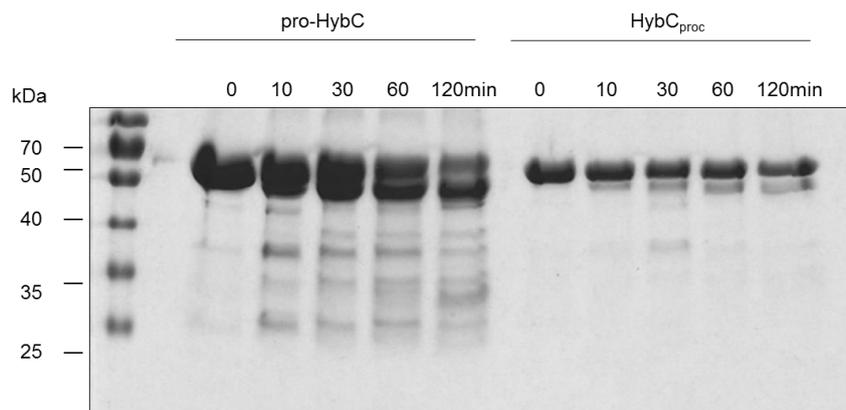


Abbildung 33: SDS-PAGE Analyse der limitierten Proteolyse mittels GluC von pro-HybC und HybC_{proc}. Gereinigtes pro-HybC und HybC_{proc} (100 µg Protein) wurden zusammen mit 1 µg GluC inkubiert. Die GluC-Inkubation erfolgte bei 37 °C. Nach Zugabe von GluC wurden in regelmäßigen Abständen 10 µl Probe (10 µg) entnommen, sofort in SDS-Probenpuffer gekocht und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Färbung erfolgte mit PAGE Blue Protein staining solution (ThermoFisher Scientific).

```

HybG-E.c.      MCIGVPGQVLAVGEDIHQLAQVEVCGIKRDVNIALI--CEGNPADLLGQWVLVHVGAFMS
HypC-E.c.      MCIGVPGQIRTIDGN---QAKVDVCGIQRDVDLTLVGSCDENGQPRVGQWVLVHVGAFMS
HypC-A.v.      MCLAIPVRIEELLDE--QSAVACIGGLRKTINVALL-----DDLKVG DYVILHVGAFALQ
HypC-R.e.      MCLAIPARLVELQAD--QQGVVDLSGVRKTI SLALM-----ADAVVGDYVIVHVG YAIQ
HypC-D.m.      MCLAVPAKI IISLED---SVAEVDLNGTTYKASVMLT-----PEAKVGDYVLLHTG YAIQ
HypC-T.k.      MCLAVPGKVIEVNG---PVAVVDFGGVKREVRLDLM-----PDTKPGDWVIVHTGFAIE
                **:::*  ::  :      . . . *      : *      *::*::*.*.*:

HybG-E.c.      I IDEDEAKATLDALRQMDYDITSA-----
HypC-E.c.      VINEAEARDTLDALQNMFDVEPDVGALLYGEEK-----
HypC-A.v.      KLDEAEAQR TLALLAELGRLAEAEQAAQGEAP-----
HypC-R.e.      KIDPEEAERTLRLFAELERVQPPASEPMHG MNIHQEPA
HypC-D.m.      VIDEKDALETLEIFKQMEML-----
HypC-T.k.      KLDEKKAMEI LEAWAEVEKAMEGF-----
                ::  .*  *      ::

```

Abbildung 34: Sequenzvergleich zwischen verschiedenen HypCs aus der HypC-Familie. E.c. *Escherichia coli*, A.v. *Azotobacter vinelandii*, R.e. *Ralstonia eutropha*, D.m. *Dehalococcoides mccartyi*, T.k. *Thermococcus kodakarensis*.

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Herrn Prof. Dr. G. Sawers für die Übernahme des Erstgutachtens, die Überlassung des sehr interessanten Themas, das stetige Engagement und Interesse am Fortgang der Arbeit, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei fachlichen Problemen und Fragestellungen, die Begeisterung am wissenschaftlichen Arbeiten sowie die Unterstützung meiner beruflichen Zukunft herzlich bedanken.

Bei Prof. Dr. Nies und Prof. Dr. Selmer bedanke ich mich für die Übernahme des Zweit- und Drittgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Kollegen der AG Sawers für die fachliche Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich für die schönen Momente bei Doreen und Kinga bedanken. Ihr habt mich bei fachlichen Fragen immer unterstützt und stets schöne Pausen bereitet.

Besonders möchte ich mich bei den Korrekturlesern Lydia, Doreen und Kinga bedanken. Vielen Dank, dass ihr euch die Zeit genommen habt.

Zudem möchte ich mich bei Linda Nietzsche und Lydia Beyer für die immer wieder erheiternden Mittagessen und aufmunternden Worte bedanken.

Frau Dr. Ute Lechner, Frau Hammerschmidt und Frau Lindenstrauß danke ich für die vielen Tipps im Laboralltag und die immer wieder bereitwillige Diskussionsbereitschaft während der Promotion.

Der größte Dank gebührt meiner Familie und Sascha, die mich in allen Lebenslagen während der Promotion unterstützt haben. Ich danke euch für euer Vertrauen, die starken Nerven und die uneingeschränkte Motivation während der gesamten Promotion.

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name Claudia Thomas (geb. Bielak)
Familienstand verheiratet
Geboren am 30.04.1988 in Merseburg
Anschrift Wenden 16
06249 Mücheln (Geiseltal)

Berufserfahrung

seit Juni 2016

Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei IDT-Biologika
Bereich: Qualitätskontrolle
Tätigkeit: Stabilitätsuntersuchungen von veterinären und humanen Pharmazeutika

05/2013 - 05/2016

Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Bereich: Mikrobiologie
Tätigkeit: Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden, Betreuung von Studenten, Präsentation der eigenen Daten in diversen Meetings und Tagungen

Auslandsaufenthalte

10/2012 – 04/2013

Stipendium an der *University of Oxford*,
Bereich: Department for *Inorganic Chemistry*,
Proteinreinigung/-analytik auf biophysikalischer Ebene,
Betreuung von Studenten, Präsentation der eigenen Daten
in diversen Meetings

02/2010

Praktikum an der *University of Namibia/ Windhoek*
Bereich: Agarwirtschaft
Tätigkeit: Überprüfung von Milchproben auf Keime

Studium

10/2010 - 09/2012

Master of Science an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2007 - 09/2010

Bachelor of Science an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktika

06/2011-08/2011

Praktikum bei ZIK Halomem

Bereich: Biochemie

Tätigkeit: Proteinüberproduktion und -reinigung

10/2010

Praktikum AG Köck im Biozentrum Halle/ Saale

Bereich: Pflanzenbiochemie

Tätigkeit: Umgang mit genmanipulierten Pflanzen, Proteinüberproduktion und -reinigung

06/2009-09/2009

Praktikum im Zentrum für Zell- und Gentherapie

Bereich: Medizin, Universitätsklinikum Kröllwitz

Tätigkeit: Zellkulturhaltung von Krebszellen, Umgang mit Chemotherapeutika, Molekularbiologische Methoden

Schulabschluss

07/2007

Allgemeine Hochschulreife am Geiseltalgymnasium Mücheln (Geiseltal)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Claudia Thomas, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 15.09.2016.....