

Charakterisierung des neuartigen mikrobiellen sHdr-Schwefeloxidationssystems

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Corvin Ernst

aus Bad Neuenahr

Bonn 2022

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl
 2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
- Tag der Promotion: 17.05.2022
Erscheinungsjahr: 2022

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Ernst, C., Kayastha, K., Koch, T., Venceslau, S.S., Pereira, I.A.C., Demmer, U., Ermler, U. & Dahl, C. (2021) Structural and spectroscopic characterization of a HdrA-like subunit from *Hyphomicrobium denitrificans*. *The FEBS Journal* **288**: 1664-1678
<https://doi.org/10.1111/febs.15505>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Schwefelzyklus.....	1
1.2	Der dissimilatorische Schwefelstoffwechsel.....	2
1.3	Die dissimilatorische Schwefeloxidation.....	3
1.3.1	Das Sox-System.....	4
1.3.2	Die reverse dissimilatorische Sulfitreduktase.....	4
1.3.3	Das Heterodisulfidreduktase-ähnliche System aus Schwefeloxidierern.....	5
1.4	Die Modellorganismen <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> und <i>Thioalkalivibrio thiocyanoxydans</i>	11
1.5	Zielsetzungen der Arbeit.....	12
2	Material.....	14
2.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	14
2.2	Geräte.....	14
2.3	Kits.....	15
2.4	Enzyme.....	15
2.5	Antibiotika.....	15
2.6	Antikörper und Antiseren.....	16
2.7	Bakterienstämme.....	17
2.8	Plasmide.....	18
2.9	Oligonukleotide.....	19
2.10	Standards.....	19
2.11	Software und Programme.....	20
3	Methoden.....	21
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	21
3.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	21
3.1.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	21
3.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	21
3.1.4	Kultivierung von <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> X ^T	22
3.1.5	Kultivierung von <i>H. denitrificans</i> in einem Fermenter.....	23
3.1.6	Wachstumsversuche mit <i>H. denitrificans</i>	24

3.1.7	Bestimmung der Wachstumskurven im Plattenlesegerät.....	24
3.1.8	Bestimmung der spezifischen Thiosulfatoxidationsrate	24
3.1.9	Herstellung von elektro-kompetenten <i>H. denitrificans</i>	25
3.1.10	Elektroporation von elektro-kompetenten <i>H. denitrificans</i>	25
3.1.11	Generierung von Mutanten in <i>H. denitrificans</i>	26
3.1.12	Konservierung von <i>H. denitrificans</i> als Kryokulturen	26
3.1.13	Kultivierung von <i>Thioalkalivibrio thiocyanoxydans</i>	27
3.1.14	Anzucht von <i>T. thiocyanoxydans</i> in einem Fermenter.....	28
3.2	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	29
3.2.3	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	30
3.2.4	Restriktionsverdau von DNA	30
3.2.5	Ligation	31
3.2.6	Mini-Preparation von Plasmid DNA.....	31
3.2.7	Isolation genomischer DNA aus <i>H. denitrificans</i>	32
3.2.8	Sequenzierung von DNA.....	32
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	32
3.3.1	Heterologe Proteinproduktion in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	32
3.3.2	Heterologe Proteinproduktion in <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ iscR.....	32
3.3.3	Heterologe Proteinproduktion in <i>E. coli</i> BL21(DE3) pRKISC.....	33
3.3.4	Proteinquantifizierung mittels BCA-Assays	33
3.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	34
3.3.6	Färbung mit Coomassie	35
3.3.7	Schnellfärbung von Gelen	36
3.3.8	Färbung mit Silbernitrat	36
3.3.9	Gewinnung von Zellextrakten für immunologische Proteinnachweise	36
3.3.10	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blots.....	37
3.4	Chromatographische Methoden	39
3.4.1	Strep-Tactin-Affinitätschromatographie	39
3.4.2	Aufreinigung des sHdr-Komplexes mit einer 1 mL HisTrap TM HP-Säule	40
3.4.3	Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ shdrR.....	41
3.5	Spektroskopische Methoden.....	42

3.5.1	Spektroskopische Bestimmung des Proteingehalts	42
3.5.2	UV/VIS-Titration von sHdrA.....	43
3.5.3	Potentiometrische Redoxtitration von sHdrA	43
3.5.4	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie von sHdrA	44
3.5.5	Determination der Thiosulfatkonzentration von <i>H. denitrificans</i> -Kulturen.....	45
3.6	Kristallographie von sHdrA.....	45
3.7	Massenspektrometrie	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Heterologe Überexpression der sHdr-Untereinheiten aus <i>H. denitrificans</i> in <i>E. coli</i>	47
4.1.1	Gesamtstruktur von sHdrA aus <i>H. denitrificans</i>	47
4.1.2	Die Koordination des FAD-Cofaktors in sHdrA aus <i>H. denitrificans</i>	49
4.1.3	Koordination des [4Fe-4S]-Clusters in sHdrA aus <i>H. denitrificans</i>	51
4.1.4	UV/VIS-Spektroskopie des FADs aus sHdrA	52
4.1.5	Potentiometrische Bestimmung des Redoxpotentials von FAD	54
4.1.6	EPR-Titration des [4Fe-4S]-Clusters von sHdrA aus <i>H. denitrificans</i>	58
4.1.7	Erstellung von Expressionsplasmiden	59
4.1.8	Proteinproduktion	60
4.2	Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus <i>H. denitrificans</i>	64
4.2.1	Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Knock In Hden0690-0691	64
4.2.1.1	Erstellung des Stamms <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Knock In Hden0690-0691.....	65
4.2.1.2	Anzucht des Stamms <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Knock In Hden0690-0691 in einem Fermenter	68
4.2.1.3	Affinitätschromatographie des sHdr-Komplexes aus <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Knock In Hden0690-0691.....	70
4.2.2	Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ shdrR.....	72
4.2.2.1	Nachweis der konstitutiven Expression der sHdr-Proteine durch Western Blot	73
4.2.2.2	Fermentation von <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ shdrR.....	74
4.2.2.3	Aufreinigung des sHdr-Komplexes über eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	75
4.2.2.4	Aufreinigung des sHdr-Komplexes über eine Anionenaustauschchromatographie (AEC).....	78
4.2.2.5	Aufreinigung des sHdr-Komplexes über eine keramische Hydroxylapatitsäule (CHT)	82

4.2.2.6	Massenspektrometrische Untersuchung der vereinigten sHdrA enthaltenden Proben	86
4.3	Subzelluläre Lokalisation der sHdr-Untereinheiten A, C1, B1 und B2 in <i>H. denitrificans</i> und <i>T. thiocyanoxidans</i>	88
4.3.1	Generierung von Antiseren gegen sHdrC1, sHdrB1 und sHdrB2	89
4.3.2	Subzelluläre Lokalisation des sHdr-Komplexes mittels Immunoblots.....	91
4.3.3	Fermentation von <i>T. thiocyanoxidans</i>	93
4.4	Lokalisation von sHdrH und phänotypische Charakterisierung einer $\Delta shdrH$ -Mutante	94
4.4.1	Subzelluläre Lokalisation von sHdrH in <i>T. thiocyanoxydans</i>	95
4.4.2	Phänotypische Charakterisierung der Mutante <i>H. denitrificans</i> $\Delta tsdA \Delta shdrH$	97
5	Diskussion.....	100
5.1	Struktur und Redoxeigenschaften der Untereinheit sHdrA	100
5.2	Putative Struktur und Mechanismus des sHdr-Komplex	106
5.3	Subzelluläre Lokalisation der sHdr-Proteine in <i>H. denitrificans</i> und <i>T. thiocyanoxydans</i> ...	119
5.4	Dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel in <i>H. denitrificans</i> und <i>T. thiocyanoxydans</i>	120
6	Zusammenfassung.....	127
7	Literaturverzeichnis.....	129
	Anhang	145
	Danksagung	152
	Publikationsliste	153

Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{H-NMR}$	magnetische Protonen-Kernspinresonanz
ACN	Acetonitril
AEC	Anionenaustauschchromatographie
Ap ^R	Ampicillin Resistenz
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CHT	keramisches Hydroxylapatit
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E ^{0'}	biologisches Standardpotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronenspinresonanz
F	Faraday-Konstante
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBEB	Flavin-basierte Elektronenbifurkation
HF	High-Fidelity
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
mAu	Milliabsorptionseinheit
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
R	allgemeine Gaskonstante
rH ₂ O	Reinstwasser
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHE	Standard-Wasserstoffelektrode
Tc ^R	Tetracyclin-Resistenz
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV/VIS	Ultraviolettes/sichtbares Licht

1 Einleitung

1.1 Der Schwefelzyklus

Das Element Schwefel findet sich in der sechsten Hauptgruppe des Periodensystems und gehört zu den Chalkogenen. In der Natur kann Schwefel Oxidationsformen zwischen -2 und +6 annehmen. Schwefel ist das zehnthäufigste Element auf der Erde (Steudel & Chivers 2019) und Bestandteil einer Vielzahl organischer wie anorganischer Verbindungen, die im globalen biogeochemischen Schwefelkreislauf umgesetzt werden. Zu diesem dynamischen Kreislauf tragen, neben abiotischen Reaktionen und geologischen Prozessen auch Mikroorganismen in verschiedensten Habitaten mit ihrem Energie- und Baustoffwechsel bei (Fike *et al.* 2015). Die größten Schwefelvorkommen auf dem Planeten Erde bilden die Minerale Pyrit (FeS_2) (Muyzer & Stams 2008; Johnson *et al.* 2012) und Gips (CaSO_4) (Sievert *et al.* 2007; Muyzer & Stams 2008) in Sedimenten und Felsen sowie gelöstes Sulfat in den Ozeanen (Muyzer & Stams 2008).

Schwefel ist ein essentieller Nährstoff für Organismen, der z.B. Bestandteil der proteinogenen Aminosäuren Methionin und Cystein und von Cofaktoren wie Eisen-Schwefel-Clustern ist (Dahl 2020b). Die Nutzung anorganischer Schwefelverbindungen als Schwefelquelle zur Biosynthese der zuvor genannten Moleküle wird als Schwefel-Assimilation bezeichnet, zu der neben Prokaryonten auch Eukaryonten wie Pflanzen und Pilze befähigt sind (Kawano *et al.* 2018) (Abbildung 1). Im Gegensatz hierzu sind ausschließlich Prokaryonten dazu in der Lage, Schwefelverbindungen im Rahmen des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels als Elektronendonatoren und -akzeptoren zur Energiekonservierung zu nutzen (Dahl 2020b). Neben der Schwefel-Disproportionierung sind in dieser Hinsicht die Sulfatreduktion und die Sulfidoxidation als die bedeutendsten Prozesse zu nennen.

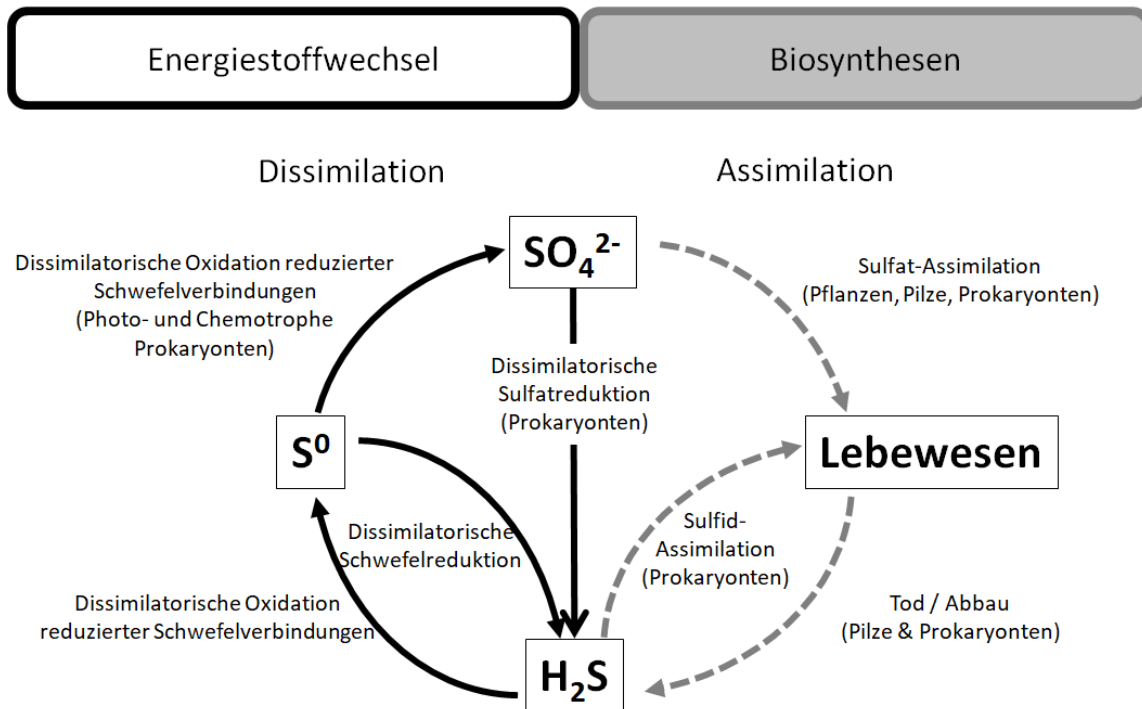


Abbildung 1: Transformationen im Schwefelkreislauf. Schwefel wird als Sulfat von Prokaryonten, eukaryontischen Mikroorganismen, Pflanzen und Pilzen aufgenommen (Sulfat-Assimilation). Sulfatreduzierende Bakterien nutzen Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor beim Abbau organischen Materials, wobei Schwefelwasserstoff entsteht. Das Sulfid wird oxisch oder anoxisch von Prokaryonten zu Schwefel oder Sulfat oxidiert.

1.2 Der dissimilatorische Schwefelstoffwechsel

Die gleichzeitige Nutzung anorganischer Schwefelverbindungen mit intermediärem Redoxzustand wie elementarem Schwefel (0), Thiosulfat (+1/-5) und Sulfid (-3) als Elektronendonoren und Elektronenakzeptoren, ist ein von chemolithotrophen Mikroben katalysierter Vorgang und wird als Schwefeldisproportionierung bezeichnet (Finster 2008). Als Produkte entstehen Schwefelwasserstoff und Sulfat. Dieser Metabolismus zählt zu den ältesten biologischen Prozessen der Erde und kann bis auf 3,5 Milliarden Jahre zurückdatiert werden (Finster 2008).

Aus der Schwefeldisproportionierung entwickelte sich zunächst die dissimilatorische Sulfatreduktion, die ausschließlich von sulfatreduzierenden Prokaryonten durchgeführt wird (Shen *et al.* 2001). Bei den sulfatreduzierenden Prokaryonten handelt es sich um eine physiologisch wie phylogenetisch heterogene Gruppe von anaeroben Mikroorganismen, die in der Lage sind Sulfat zu veratmen (Barton & Fauque 2009; Barton *et al.* 2014; Rabus *et al.* 2015; Dahl 2020b). Als einer der wesentlichen biologischen Prozesse in marinen Sedimenten,

unterhält die mikrobielle Reduktion von Sulfat zu Sulfid ganz maßgeblich den Schwefelkreislauf in der Natur (Jørgensen 1982). Die Sulfatreduktion verläuft nach einem einheitlichen Muster im Cytoplasma der Zelle, in das Sulfat über aktiven Transport gelangt (Kreke & Cypionka 1995). Aus der hohen Stabilität des Sulfatanions resultiert ein sehr negatives Redoxpotential von $E^{0'} = -516 \text{ mV}$ für die Reduktion zu Sulfit (Thauer *et al.* 1977). Daher muss Sulfat vor der Reduktion zuerst mit Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) aktiviert werden. Diese Reaktion wird von dem Enzym Sulfatadenylyltransferase (Sat) katalysiert. Da die Reaktion endergon ist, muss neben der Hydrolyse von Pyrophosphat die Reduktion von APS zu Sulfit erfolgen. Diese Zwei-Elektronen-Reduktion wird von dem Enzym APS-Reduktase (AprAB) katalysiert. Die Elektronen für diese Reduktion liefert der Chinon-reaktive membrangebundene Oxidoreduktase (QmoABC)-Komplex, der die Oxidation von Menachinon katalysiert (Pires *et al.* 2003). Eine Verknüpfung beider Reaktionen führt zu einer chemiosmotischen Energiekonservierung in der Zelle (Ramos *et al.* 2012; Duarte *et al.* 2016). Das Sulfit wird durch die dissimilatorische Sulfitreduktase (DsrAB) und ihren physiologischen Interaktionspartner DsrC weiter reduziert, dabei entsteht ein an DsrC gebundenes Trisulfid (Santos *et al.* 2015). Der Transmembrankomplex DsrMKJOP katalysiert die finale Reduktion dieses Trisulfids zu Sulfid und DsrC. Höchstwahrscheinlich stammen die Elektronen für diese Reaktion ebenfalls aus dem Menachinonpool (Santos *et al.* 2015).

1.3 Die dissimilatorische Schwefeloxidation

Im Gegensatz zum einheitlichen Weg der dissimilatorischen Sulfatreduktion gibt es für die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen keinen einheitlichen mikrobiellen Stoffwechselweg (Dahl *et al.* 2008; Frigaard & Dahl 2008; Dahl 2020b). Unter den schwefeloxidierenden Prokaryonten besteht zudem eine große phylogenetische Diversität. Sie leben in verschiedensten Habitaten, die einen großen Bereich der pH- und Temperaturskala des Planeten abdecken (Dahl *et al.* 2008). Neben einer Vielzahl an heterotrophen Bakterien, die während des organotrophen Wachstums die Oxidation von Schwefelverbindungen als akzessorische Elektronenquelle nutzen (Koch & Dahl 2018), gibt es zwei Arten von lithoautotrophen schwefeloxidierenden Prokaryonten. Photoautotrophe Prokaryonten nutzen die Reduktionsäquivalente aus der Oxidation

reduzierter Schwefelverbindungen für die CO₂-Fixierung, während chemolithoautotrophe Prokaryonten diese sowohl für die Atmung als auch für die CO₂-Fixierung nutzen (Dahl *et al.* 2008). Die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen kann sowohl aerob als auch anaerob stattfinden, wobei Sauerstoff, Nitrat oder Mangan(IV)oxid als terminale Elektronenakzeptoren genutzt werden (Dahl *et al.* 2008; Henkel *et al.* 2019). Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevantesten Wege mikrobieller Schwefeloxidation vorgestellt.

1.3.1 Das Sox-System

Das periplasmatische Sox-System besteht mindestens aus den Proteinen SoxB, SoxXA, SoxYZ sowie SoxCD und oxidiert Thiosulfat komplett zu Sulfat (Friedrich *et al.* 2001). SoxXA ist ein *c*-Typ Cytochrom, das die oxidative Bildung einer Disulfidbindung zwischen dem Sulfanschwefel des Thiosulfats und dem persulfurierten Cystein im aktiven Zentrum von SoxY katalysiert (Ogawa *et al.* 2008; Grabarczyk & Berks 2017). Die anschließende hydrolytische Spaltung der Sulfongruppe zu Sulfat wird von SoxB katalysiert, während der original von Thiosulfat stammende Sulfanschwefel weiter an SoxY gebunden vorliegt (Sauvé *et al.* 2009; Grabarczyk *et al.* 2015). Im letzten Schritt des Zyklus wird der noch an SoxY gebundene Sulfanschwefel durch SoxCD zur Sulfongruppe oxidiert, gefolgt von einer hydrolytischen Freisetzung von Sulfat (Zander *et al.* 2011). In einigen Organismen findet sich ein unvollständiges Sox-System ohne SoxCD, das nicht in der Lage ist den an SoxY gebundenen Sulfanschwefel zu oxidieren und stattdessen diesen auf nullwertigen Schwefel überträgt und extrazellulär oder intrazellulär im Periplasma speichert (Dahl 2017). Organismen mit einem unvollständigen Sox-System müssen dieses mit einem cytoplasmatischen Schwefeloxidationssystem kombinieren, um Thiosulfat komplett zu Sulfat oxidieren zu können (Tanabe *et al.* 2019). Wie der Schwefel ins Cytoplasma transportiert wird, ist noch nicht geklärt (Dahl 2020b). Niedermolekulare Persulfide wie Glutathionpersulfid wurden als Trägermoleküle für Organismen vorgeschlagen, die Schwefel speichern (Frigaard & Dahl 2008; Dahl 2017).

1.3.2 Die reverse dissimilatorische Sulfitreduktase

Die reverse dissimilatorische Sulfitreduktase (rDsr) ist ein Enzymkomplex, der sowohl in diversen photolithotrophen als auch in chemolithotrophen Organismen kodiert wird (Dahl 2017). Im rDsr-Weg wird Schwefel über eine Kaskade von Proteinpersulfiden ins Cytoplasma

transferiert. Den Beginn der Kaskade bildet eine Rhodanese, gefolgt von einem DsrE-ähnlichen Protein und TusA. TusA fungiert als Schwefeldonor für DsrEFH und dieser Komplex überträgt den Schwefel anschließend auf DsrC (Stockdreher *et al.* 2012, 2014). Nach aktuellem Stand der Forschung wird dann persulfuriertes DsrC durch den membrangebundenen DsrMKJOP-Komplex zu einem DsrC-Trisulfid oxidiert, das dann von rDsrAB zu Sulfit und reduziertem DsrC oxidiert wird, was eine genaue Umkehr des in Sulfatreduzierern gefundenen Mechanismus darstellt (Santos *et al.* 2015).

1.3.3 Das Heterodisulfidreduktase-ähnliche System aus Schwefeloxidierern

Bei der Identifikation von Bakterien und Archaeen, die am oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus beteiligt sind, indem sie Sulfanschwefel zu Sulfit oxidieren, wurde bis in die jüngste Vergangenheit nahezu ausschließlich auf das Vorhandensein der *rdsr* Gene geprüft (Loy *et al.* 2009; Anantharaman *et al.* 2016, 2018; Probst *et al.* 2018; Hausmann *et al.* 2018). Dennoch war sowohl für eine Großzahl von chemo- und photolithoautotrophen als auch chemoheterotrophen Schwefeloxidierern der zentrale Schwefeloxidationsmechanismus unbekannt. Zu diesen Organismen zählen biotechnologisch relevante Organismen, wie z.B. *Acidithiobacillus*-Spezies, die bei der mikrobiellen Erzlaugung eingesetzt werden. Die genetische Untersuchung des Heterodisulfidreduktase-ähnlichen Systems aus Schwefeloxidierern (sHDr) schloss diese Wissenslücke (Koch & Dahl 2018).

Das konservierte Gencluster *shdrC1B1AHC2B2* kodiert für einen Komplex, der der namensgebenden Heterodisulfidreduktase aus methanogenen Archaeen (mHDrABC) ähnelt (Auernik & Kelly 2008; Quatrini *et al.* 2009; Venceslau *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014; Dahl 2015; Koch & Dahl 2018). Bis auf wenige Ausnahmen, besitzen Organismen mit *shdr* Genen keine *rdsr* Gene und *vice versa* (Venceslau *et al.* 2014; Koch & Dahl 2018; Berben *et al.* 2019). Die Hypothese einer Beteiligung der *shdr* Gene an der dissimilatorischen Schwefeloxidation, wurde auf der Basis einer Microarray-Transkriptomstudie und quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)-Analysen am Organismus *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC2370 von Quatrini *et al.* aufgestellt (Quatrini *et al.* 2006, 2009). Darauf folgende Transkriptomstudien mit verschiedenen *Acidithiobacillus*-Spezies (Chen *et al.* 2012; Ehrenfeld *et al.* 2013; Latorre *et al.* 2016), dem Gram-positiven Organismus *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Guo *et al.* 2014) und dem thermophilen Archaeon *Metallosphaera*

sedula (Auernik & Kelly 2010) bekräftigten diese These. Zudem wurden in Proteomstudien erhöhte Level an sHdr-Proteinen auf reduzierten Schwefelverbindungen detektiert (Mangold *et al.* 2011; JianPing *et al.* 2013; Osorio *et al.* 2013; Koch & Dahl 2018). Endgültige Bestätigung erhielt die These durch reverse Genetik im fakultativ methylophilen Alphaproteobacterium *Hyphomicrobium denitrificans* X^T (ATCC51888), als die Unentbehrlichkeit des sHdr-Systems für die Oxidation von Thiosulfat und Dimethylsulfid zu Sulfat gezeigt werden konnte (Koch & Dahl 2018). Eine Δ *shdr*-Mutante zeigte einen negativen Phänotyp in Bezug auf die Oxidation der reduzierten Schwefelverbindungen zu Sulfat (Koch & Dahl 2018).

Methanogene Archaeen ohne Cytochrome besitzen einen cytoplasmatischen Hdr (mHdrABC)-[NiFe]-Hydrogenase (MvhAGD)-Komplex, der im finalen Schritt der Methanogenese durch die Oxidation zweier Moleküle Wasserstoff ($E^{0'} = -414$ mV) die Reduktion des Heterodisulfids Coenzym M und Coenzym B (CoM-S-S-CoB) ($E^{0'} = -140$ mV) sowie Ferredoxin ($E^{0'} = \sim -500$) katalysiert (Madadi-Kahkesh *et al.* 2001; Bennati *et al.* 2004; Thauer *et al.* 2008; Kaster *et al.* 2011) (Abbildung 2).

Die Kopplung einer endergonen mit einer exergonen Reduktion mittels eines Flavins wird Flavin-basierte Elektronenbifurkation (FBEB) genannt (Buckel & Thauer 2013, 2018). Bei diesem Prozess wird ein Elektronenpaar über einen Flavin-Cofaktor in zwei einzelne Elektronen aufgeteilt und auf zwei unterschiedliche Ein-Elektron-Akzeptoren geleitet, wovon einer ein höheres Redoxpotential besitzt als das ursprüngliche Elektronenpaar und der andere ein niedrigeres (Buckel & Thauer 2013, 2018). Das bifurkierende Flavin im mHdr-Komplex ist durch die mHdrA-Untereinheit gebunden (Wagner *et al.* 2017). Homologe zu mHdrA finden sich auch in nicht-methanogenen Prokaryonten, z.B. in Schwefeloxidierern, Sulfatreduzierern, anaerob methanotrophen Archaeen, Metallreduzierern, Knallgas-Bakterien und acetogenen Bakterien (Mander *et al.* 2004; Wischgoll *et al.* 2005; Meyerdierks *et al.* 2010; Watanabe *et al.* 2014; Mock *et al.* 2014; Ramos *et al.* 2015; Boughanemi *et al.* 2016; Koch & Dahl 2018). Es wird vermutet, dass mHdrA-Homologe ebenfalls ein bifurkierendes FAD besitzen (Buckel & Thauer 2013). Eine mHdrA-Untereinheit setzt sich aus einer N-terminalen Domäne, einer Thioredoxinreduktase (TrxR)-Domäne, einer inserierten Ferredoxin-Domäne und einer C-terminalen Domäne zusammen. Die N-terminale Domäne

bindet ein [4Fe-4S]-Cluster, die TrxR-Domäne bindet ebenfalls ein [4Fe-4S]-Cluster sowie ein FAD, die inserierte Ferredoxin-Domäne und die C-terminale Domäne binden jeweils zwei [4Fe-4S]-Cluster (Wagner *et al.* 2017). sHdrA besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zur TrxR-Domäne von mHdrA, allerdings fehlen sHdrA sowohl die N- als auch die C-terminale Ferredoxin-Domäne, weshalb sHdrA vermutlich nur ein [4Fe-4S]-Cluster bindet, anstatt sechs wie mHdrA (Koch & Dahl 2018).

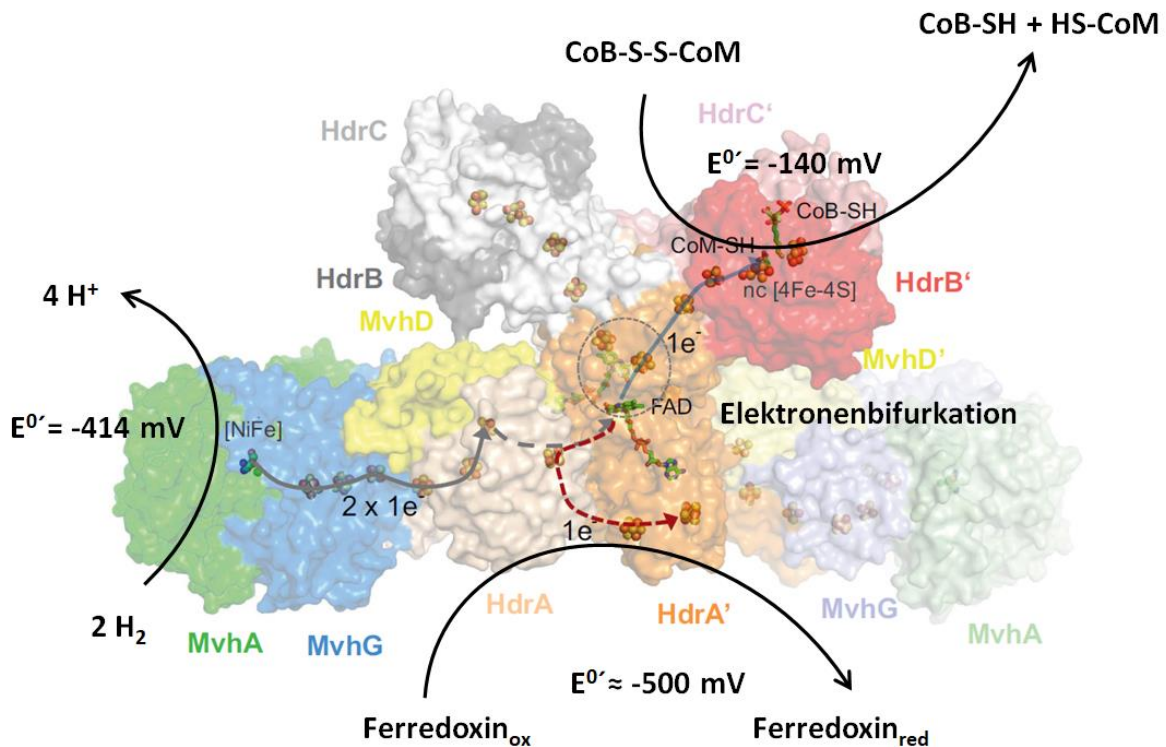


Abbildung 2: Kristallstruktur des MvhAGD-mHdrABC-Komplexes aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus*. Zwei mHdrA-Untereinheiten (weizenfarben und orange) bilden einen Interprotomerkontakt, was eine elektronische Verbindung zwischen beiden FADs und [4Fe-4S]-Clustern mit einschließt (gestrichelter Kreis). Einzelne Elektronen fließen vom [Ni-Fe]-Cluster zum bifurkierenden FAD (grauer Pfeil), von dem ein Elektron mit niedrigem Potential zur Ferredoxin-Domäne weitergeleitet wird (roter Pfeil) und ein Elektron mit hohem Potential zu den non-cubanen [FeS]-Clustern der mHdrB-Untereinheit (blauer Pfeil). (Abbildung modifiziert nach Appel *et al.* 2021).

Der Elektronentransfer zwischen mHdrA und mHdrB wird durch das Eisen-Schwefel-Protein mHdrC koordiniert (Wagner *et al.* 2017). Die Untereinheiten sHdrC1 und sHdrC2 ähneln einander und besitzen beide eine N-terminale Ferredoxin-Domäne, die jeweils Motive zur Bindung von zwei [4Fe-4S]-Clustern besitzt. Eine hohe Ähnlichkeit besteht zwischen sHdrC1 und der zentralen [4Fe-4S]-Domäne von mHdrA. In der Untereinheit mHdrB, die zur CCG-

Proteinfamilie gehört (PFAM PFD02754), befinden sich zwei konservierte Sequenzen mit jeweils fünf Cysteinen ($CX_nCCGX_mCX_2C$). Über das CCG-Motiv werden ungewöhnliche $[4Fe-4S]^{3+}$ -Cluster koordiniert, diese bilden das aktive Zentrum des mHdr-Komplexes und katalysieren in zwei Ein-Elektronen-Schritten die Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB (Wagner *et al.* 2017). Es besteht eine hohe Ähnlichkeit zwischen sHdrB2 und mHdrB. Im Gegensatz dazu, sind die CCG-Motive in sHdrB1 verändert (Koch & Dahl 2018). In der N-terminalen Domäne fehlen das letzte sowie ein weiteres Cystein des CCG-Motivs. In allen sHdrB1-Proteinen befindet sich somit ein konserviertes $C-X_2-C-X_1-C-X_m-C$ -Motiv in der N-terminalen Domäne. In der C-terminalen Domäne von sHdrB1 fehlt das vorletzte Cystein, das essentiell für die Bindung des $[4Fe-4S]^{3+}$ -Clusters ist (Hamann *et al.* 2007). Dafür sind zwei weitere konservierte Cysteine in der C-terminalen Domäne in allen sHdrB1-Homologen vorhanden (Koch & Dahl 2018).

Im Gegensatz zu den *mhdr* Genen, die sich sowohl als Gencluster als auch vereinzelt im Genom befinden können (Sieber *et al.* 2010; Rohlin & Gunsalus 2010), besteht das *shdr* Gencluster *sensu stricto* aus den sechs Kerngenen *shdrC1B1AHC2B2* (Cao *et al.* 2018; Koch & Dahl 2018). Neben diesen Kerngenen wurden weitere Gene identifiziert, die hochkonserviert zusammen mit *shdr* Genen auftreten (Venceslau *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014; Dahl 2015; Koch & Dahl 2018). Das *shdr* Gencluster ist in allen Organismen mit einem *rhd-tusA-dsrE2* oder zumindest einem *tusA-dsrE2* Genset vergesellschaftet, das für Schwefeltransferasen kodiert, wobei TusA als zentraler cytoplasmatischer Schwefelcarrier angesehen wird (Dahl 2015; Tanabe *et al.* 2019). Für Homologe dieser Schwefeltransferasen, wurde bereits die Aufgabe des cytoplasmatischen Substrattransports für den Dsr-Weg beschrieben (Stockdreher *et al.* 2014). Experimentelle Daten weisen auf eine analoge Funktion als Schwefel-Eingangsmodule für das sHdr-System hin (Liu *et al.* 2014). Für das Archaeon *Metalosphaera cuprina*, das ein sHdr-System besitzt, konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Thiosulfat von DsrE auf TusA übertragen wurde, aber nicht *vice versa* (Liu *et al.* 2014). Es wird angenommen, dass DsrE auch *in vivo* den Schwefel auf TusA überträgt (Dahl 2015). Aktuell wird angenommen, dass der Sulfanschwefel von TusA durch den sHdr-Komplex zu Sulfit oxidiert wird (Koch & Dahl 2018). Im *shdr* Operon befindet sich zudem mindestens ein Gen, das für ein Protein kodiert, das dem Lipoat-bindenden Protein H aus dem Glycinspaltungssystem ähnelt (Ehrenfeld *et al.* 2013; Cao *et al.* 2018). Aufgrund der auffallend hohen Sequenzähnlichkeit und einem

hochkonservierten Lysin, das essentiell zur Bindung von Liponsäure ist (Spalding & Prigge 2010) wurde das Protein Lipoat-Bindeprotein A (LbpA) genannt (Cao *et al.* 2018; Koch & Dahl 2018). Eine markerlose Deletion von *lbpA* führte in *H. denitrificans* zu einem Stamm, der nicht in der Lage war Thiosulfat zu oxidieren, womit dieses Protein als essentieller Bestandteil des sHdr-Systems bestätigt wurde (Cao *et al.* 2018).

In einer ersten biochemischen Studie konnte die Lokalisation eines sHdrC1B1AC2B2-Komplexes in der Membranfraktion des Organismus *Aquifex aeolicus* gezeigt werden (Boughanemi *et al.* 2016). Boughanemi *et al.* vermuten, dass der sHdr-Komplex über amphipathische Helices der sHdrB-Untereinheiten mit der Membran verankert ist (Boughanemi *et al.* 2016), wie dies auch für andere membrangebundene Enzyme mit CCG-Domäne und ohne Transmembranhelices vermutet wurde (Lemos *et al.* 2001, 2002; Auernik & Kelly 2008). Eine Beteiligung des durch *shdrH* kodierten Proteins (in früheren Publikationen *hyp* oder *orf2*) am sHdr-Komplex konnte nicht gezeigt werden (Boughanemi *et al.* 2016).

Eine Vielzahl an Organismen, die mit einem sHdr-System ausgestattet sind, ernähren sich lithoautotroph (Koch & Dahl 2018). Die Standardelektronenpotentiale reduzierter Schwefelverbindungen sind mit der Ausnahme von Sulfit/Sulfat (-516 mV, Thauer *et al.* 1977) positiver ($E^{0'}$ Sulfid/Schwefel -270 mV, Sulfit/Sulfid -116 mV, Thauer *et al.* 1977) als das von NAD^+ ($E^{0'} = -320$ mV, Buckel & Thauer 2013), wodurch eine direkte Reduktion von NAD^+ nicht möglich ist. Aus diesem Grund müssen lithoautotrophe Schwefeloxidierer auf Kosten eines Protonengradienten einen reversen Elektronenfluss von Chinol auf NAD^+ betreiben, um NADH zur Fixierung von CO_2 generieren zu können.

Für diese Prokaryonten wäre es ein energetischer Vorteil, die Reduktion von NAD(P)^+ zu NAD(P)H unmittelbar mit der cytoplasmatischen Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen durch das sHdr-System zu kombinieren. Hierfür sind zwei Szenarien denkbar (Abbildung 3).

Bei der Oxidation eines Persulfids zu Sulfit ($\text{R-S-S}^+ + 3 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-SH} + \text{HSO}_3^- + 4 \text{H}^+$) werden vier Elektronen freigesetzt. Bei einem ausreichend negativen Redoxpotential des Substrates des sHdr-Komplexes, könnten die Elektronen die an das LbpA-Protein gebundene Liponsäure ($E^{0'} = -280$ mV, Matthews & Williams 1976) reduzieren (Abbildung 3 A). Die Elektronen würden dann durch eine Dihydrolipoyl-Dehydrogenase auf NAD^+ übertragen werden (Cao *et*

al. 2018). In schwefeloxidierenden Archaeen ist eine *bona fide* Dihydrolipoyl-Dehydrogenase mit dem *shdr* Genset vergesellschaftet (Cao *et al.* 2018). In Organismen in denen keine Dihydrolipoyl-Dehydrogenase mit dem sHdr-System genetisch vergesellschaftet ist, könnte die Funktion durch die E3-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes übernommen werden (Cao *et al.* 2018). Dies wäre vergleichbar zur Situation in *Escherichia coli*, wo sich der Pyruvatdehydrogenase-Komplex und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex dieselbe E3-Untereinheit teilen (Steiert *et al.* 1990). Sollte das Substrat des sHdr-Komplexes elektropositiver als NAD^+ sein, wäre eine zum mHdr-Komplex analoge FBEB vorstellbar (Abbildung 3 B).

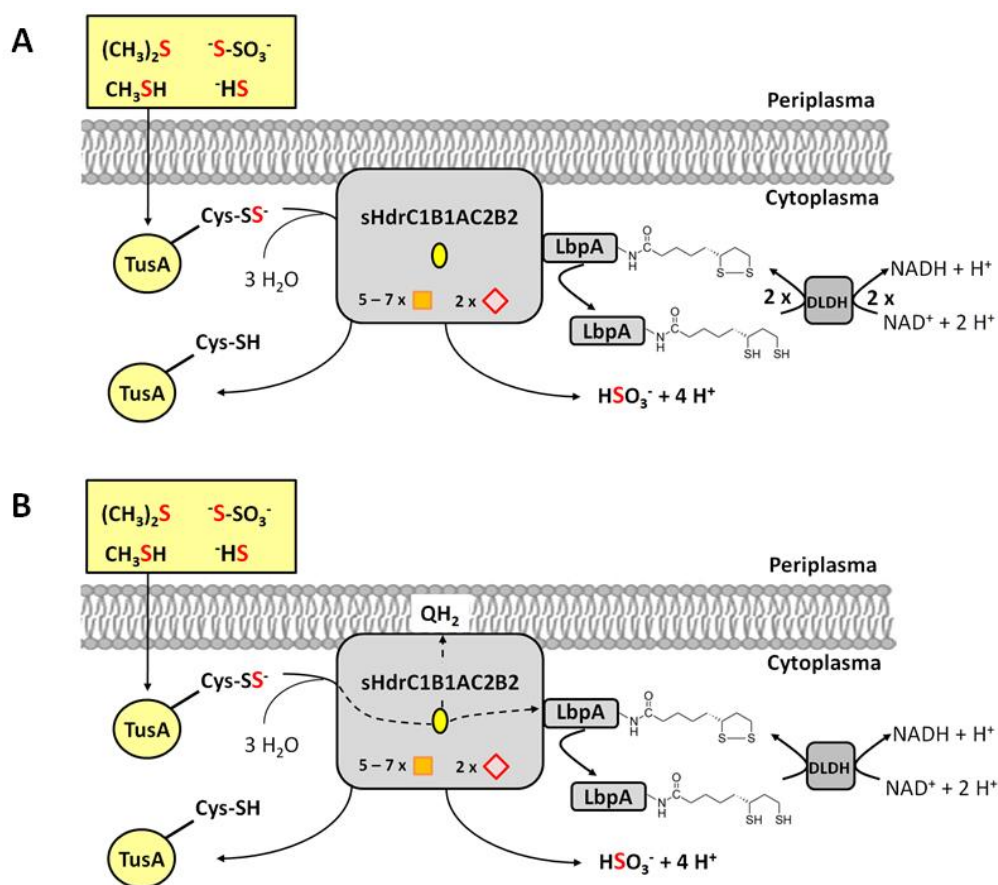


Abbildung 3: Mögliche Mechanismen des sHdr-Systems. Das Protein TusA liefert den Schwefel, der aus der Oxidation organischer und reduzierter anorganischer Schwefelverbindungen stammt, an den sHdr-Komplex. Der sHdr-Komplex oxidiert den proteingebundenen Schwefel zu Sulfid. (A) Die dabei freigesetzten Elektronen werden zur Bildung von Dihydroliponsäure genutzt. (B) Die bei der Oxidation freigesetzten Elektronen werden über das FAD von sHdrA mittels einer Flavin-basierten Elektronenbifurkation auf Liponsäure und den Chinonpool (QH_2) übertragen. Die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) katalysiert die Reoxidation der Dihydroliponsäure zu Liponsäure und reduziert dabei NAD^+ . Folgende prosthetische Gruppen sind angezeigt: [4Fe-4S]-Cluster (orangees Rechteck); non-cubane [4Fe-4S]-Cluster (rote Raute); FAD (gelbes Oval). LbpA, Lipoatbindeprotein A.

Die FBEB würde am FAD der sHdrA-Untereinheit vollzogen, die somit eine bifurkierende Einheit darstellen würde. In diesem Fall würden zwei Elektronen für die endergone Reduktion von proteingebundener Liponsäure als elektronegativerem Elektronenakzeptor genutzt und anschließend durch die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase auf NAD^+ übertragen. Die anderen zwei Elektronen würden für die exergone Reduktion des Chinonpools (z.B. $\text{E}^{0'}$ (Menachinon) = -74 mV; $\text{E}^{0'}$ (Ubichinon) = +113 mV, Thauer *et al.* 1977) als geeignetem elektropositiven Elektronenakzeptor genutzt.

1.4 Die Modellorganismen *Hyphomicrobium denitrificans* und *Thioalkalivibrio thiocyanoxydans*

H. denitrificans X^T ist der Typstamm der Art *Hyphomicrobium denitrificans* und ist ein Gram-negatives Alphaproteobacterium aus der Familie der Hyphomicrobiacea (Urakami *et al.* 1995). Der mesophile Organismus ist ubiquitär verbreitet und besitzt eine obligat chemoorganotrophe sowie eine fakultativ methylo trope Lebensweise (Gliesche *et al.* 2005). Als terminale Elektronenakzeptoren werden Sauerstoff oder Nitrat genutzt (Attwood & Harder 1972). Reduzierte C1-Verbindungen wie das präferierte Methanol, aber auch Formaldehyd, methylierte Amine und methylierte Schwefelverbindungen dienen als Substrate zum Wachstum (Harder & Attwood 1978; Koch & Dahl 2018; Rainey *et al.* 1998). Auch C2-Verbindungen wie Ethanol und Acetat können genutzt werden (Urakami *et al.* 1995). Aufgrund eines unvollständigen Pyruvatdehydrogenase-Komplexes ist *H. denitrificans* nicht zur Verwertung langkettiger (C>2) Kohlenstoffverbindungen fähig (Harder & Attwood 1978). Der Aufbau von Biomasse erfolgt über den Serin-Weg (Harder & Attwood 1978; Meiberg & Harder 1978). *H. denitrificans* ist, wie weitere Vertreter des Genus *Hyphomicrobium*, zu einem oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel fähig (Schäfer *et al.* 2010; Kappler & Schäfer 2014; Cao *et al.* 2018; Koch & Dahl 2018; Rainey *et al.* 1998). Hierfür besitzt der Organismus die Gene für ein sHdr-System sowie für ein unvollständiges Sox-System (Cao *et al.* 2018; Koch & Dahl 2018). Als Substrate dienen hierbei Sulfid, Thiosulfat oder organische Schwefelverbindungen wie Dimethylsulfid oder Methanthiol (Koch & Dahl 2018). Die Induktion der hyphomikrobiellen *shdr* Gene erfolgt vermutlich über einen Repressor der Arsenresistenz (ArsR)-Typ-Regulator Proteinfamilie (sHdrR), der durch das erste Gen des Operons kodiert wird (Hden_0682) (Koch & Dahl 2018).

H. denitrificans ist als Modellorganismus zur Untersuchung des sHdr-Systems geeignet, da es weder thermo-, acido-, alkali- oder halophil ist und sich genetisch manipulieren lässt (Koch & Dahl 2018). Der Organismus besitzt ein Temperaturoptimum von 30 °C und ein pH-Optimum von 6 - 8 (Urakami *et al.* 1995). Das Genom von *H. denitrificans* wurde vollständig sequenziert und kodiert bei einer Größe von 3,64 Mbp für 3524 Gene und 3473 Proteine (Brown *et al.* 2011).

T. thiocyanoxydans ist ein haloalkaliphiler Organismus und gehört zu den γ -Proteobacteria (Sorokin *et al.* 2002). Der Organismus wächst obligat chemolithoautotroph und ist in der Lage reduzierte Schwefelverbindungen wie Thiosulfat zu oxidieren (Sorokin *et al.* 2002). Teile des Genoms konnten sequenziert werden (Berben *et al.* 2015) und es konnte gezeigt werden, dass *T. thiocyanoxidans* *shdr* Gene besitzt (Berben *et al.* 2019). Das Genom von *T. thiocyanoxydans* kodiert bei einer Größe von 2,76 Mbp für 2677 Gene und 2616 Proteine (Berben *et al.* 2015). *T. thiocyanoxidans* besitzt eine hohe Salztoleranz, weshalb das Bakterium in Carbonat gepuffertem Medium bei pH 10 kultiviert werden kann (Sorokin *et al.* 2002). Da der Organismus aerob bei 30 °C kultiviert werden kann, eignet er sich zudem als leicht zu handhabender Modellorganismus.

1.5 Zielsetzungen der Arbeit

Das sHdr-System ist in einer Vielzahl biotechnologisch und ökonomisch relevanter Archaeen und Bakterien enthalten (Koch & Dahl 2018). Durch reverse Genetik im Alphaproteobacterium *Hyphomicrobium denitrificans* konnte die Bedeutung des sHdr-Systems für die dissimilatorische Schwefeloxidation dieser Organismen gezeigt werden (Koch & Dahl 2018). Die Untereinheit sHdrA konnte löslich in *E. coli* produziert werden und weist Sequenzähnlichkeiten zu mHdrA auf (Koch & Dahl 2018). mHdrA bindet ein bifurkierendes FAD als Cofaktor (Wagner *et al.* 2017). Da die FAD-Bindestelle in sHdrA konserviert ist, sollte über kristallographische wie spektroskopische Untersuchungen der sHdrA-Untereinheit aus *H. denitrificans* geprüft werden, ob diese ebenfalls eine Flavin-basierte Elektronenbifurkation betreiben kann. Des Weiteren sollten die restlichen Untereinheiten rekombinant in *E. coli* produziert werden, um gegebenenfalls strukturelle und spektroskopische Daten über diese Proteine zu erhalten.

Zudem sollte der native sHdr-Komplex aus *H. denitrificans* aufgereinigt werden, um die Zusammensetzung des Komplexes zu ermitteln und *in vitro* Analysen zur Bestimmung des eigentlichen Substrates durchführen zu können.

Als weiterer Modellorganismus zur Produktion des sHdr-Systems sollte das obligat schwefeloxidierende Bakterium *Thioalkalivibrio thiocyanoxydans* etabliert werden. Die subzelluläre Lokalisation der sHdr-Untereinheiten sollte in *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans* mit Antiseren per Western Blot bestimmt werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Glas-Verbrauchsmaterialien sowie Chemikalien wurden von den Firmen Alfa Aesar (Haverhill/USA), AppliChem (Darmstadt/Deutschland), Bio-Rad (München/Deutschland), Biotium (Köln/Deutschland), Eppendorf (Hamburg/Deutschland), GE Healthcare (Little Chalfont/Großbritannien), IBA BioTAGnology (Göttingen/Deutschland), Merck (Darmstadt/Deutschland), New England Biolabs (Ipswich/USA), Roche (Mannheim/Deutschland), Roth (Karlsruhe/Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht/Deutschland), Sartorius (Göttingen/Deutschland), Schott (Mainz/Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis/USA), Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA) und VWR (Darmstadt/Deutschland) bezogen.

2.2 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte einschließlich Angabe der Hersteller.

Gerätetyp	Hersteller
Agilent 8453E (Spektrophotometer)	Agilent Technologies (Waldbronn/Deutschland)
Äkta™ start	GE Healthcare (Little Chalfont/Großbritannien)
Anaerobenzelt	Coy Laboratory Products (Grass Lake/USA)
Avanti-J-20 XP (Zentrifuge)	Beckman Coulter (Brea/USA)
Avanti-JXN-26 (Zentrifuge)	Beckman Coulter (Brea/USA)
Bandelin Sonopuls UW 2070	Bandelin electronic (Berlin/Deutschland)
BioPhotometer D30 (Nano Drop)	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
Bio-Rad gene pulser II (Elektroporator)	Bio-Rad (München/Deutschland)
GENESYS 20 Visible (Spektrophotometer)	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
GENESYS 140 Visible (Spektrophotometer)	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
Horizon 50 (Gelelektrophoresekammer)	Biometra (Göttingen/Deutschland)
Mini Trans-Blot Cell (SDS-PAGE-Kammer)	Bio-Rad (München/Deutschland)
Minitron (Schüttelinkubator)	Infors HT (Bottmingen/Schweiz)
My Cycler (PCR-Maschine)	Bio-Rad (München/Deutschland)
Optima LE-80K (Ultrazentrifuge)	Beckman Coulter (Brea/USA)
SONIFIER Cell-disruptor B15 (Ultraschall-Desintegrator)	Branson (Danbury/USA)
Sorvall MX120 (Mikro-Ultrazentrifuge)	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
Specord 210 (UV/VIS-Spektralphotometer)	Analytik Jena (Jena/Deutschland)
Tecan Infinite M Plex (Plattenlesegerät)	Tecan (Männedorf/Schweiz)
Tecan Sunrise (Plattenlesegerät)	Tecan (Männedorf/Schweiz)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München/Deutschland)

2.3 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits einschließlich Angabe der Hersteller und des Verwendungszwecks.

Name	Hersteller	Verwendung
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)	Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)	Quantifizierung des Proteingehalts von Proteinlösungen
SignalFire ECL reagent	Cell Signaling Technology (Danvers/USA)	Immunodetektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz
Simplex Easy DNA-Extraktionskit	GEN-IAL GmbH (Troisdorf/Deutschland)	Extraktion von genomischer DNA aus <i>Hyphomicrobium denitrificans</i>

2.4 Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Enzyme einschließlich Angabe der Hersteller.

Enzym	Hersteller
Deoxyribonuklease I	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
FastAP (wärmeempfindliche alkalische Phosphatase)	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
Lysozym	Roth (Karlsruhe/Deutschland)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich/USA)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Ipswich/USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich/USA)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich/USA)

2.5 Antibiotika

Tabelle 4: Verwendete Antibiotika.

Name	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel
Ampicillin	100 mg/mL	rH ₂ O
Chloramphenicol	25 mg/mL	Ethanol
Kanamycin	50 mg/mL	rH ₂ O
Streptomycin	50 mg/mL	rH ₂ O
Tetracyclin	10 mg/mL	Ethanol

2.6 Antikörper und Antiseren

Tabelle 5: Verwendete Antikörper und Antiseren einschließlich Angabe der Hersteller und des Verwendungszwecks.

Antikörper/Antiserum	Hersteller	Verwendung
α -sHdrC1-Antiserum	Eurogentec (Lüttich/Belgien)	Antiserum aus Kaninchen, das gegen ein Peptid von sHdrC1 (Hden_0689, Peptid: CMQSAKDVLPRPF) immunisiert wurde, zur Detektion von sHdrC1
α -sHdrB1-Antiserum	Eurogentec (Lüttich/Belgien)	Antiserum aus Kaninchen, das gegen ein Peptid von sHdrB1 (Hden_0690, Peptid: CVTKILGKLGRLVDGK) immunisiert wurde, zur Detektion von sHdrB1
α -sHdrA-Antiserum	Eurogentec (Lüttich/Belgien)	Antiserum aus Kaninchen, die gegen rekombinantes sHdrA (Hden_0691) immunisiert wurden, zur Detektion von sHdrA
α -sHdrB2-Antiserum	Eurogentec (Lüttich/Belgien)	Antiserum aus Kaninchen, das gegen ein Peptid von sHdrB2 (Hden_0694, Peptid: CGGAHTLSDS) immunisiert wurde, zur Detektion von sHdrB2
α -sHdrH-Antiserum	Eurogentec (Lüttich/Belgien)	Antiserum aus Kaninchen, das gegen ein Peptid von sHdrH aus <i>Thioalkalivibrio thiocyanoxidans</i> (Peptid: CAFADLAGDDKKLRRG) immunisiert wurde, zur Detektion von sHdrH aus <i>Thioalkalivibrio thiocyanoxidans</i>
Strep-Tactin-HRP-Konjugat	IBA BioTAGnology (Göttingen/Deutschland)	Strep-Tactin mit gekoppelter HRP-Peroxidase, zur Detektion rekombinanter Proteine mit Strep-tag
Ziege α -Kaninchen IgG (ganzes Molekül), HRP-Konjugat	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)	HRP-Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus Ziege, als Sekundärantikörper verwendet

2.7 Bakterienstämme

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstämme	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>-Stämme		
<i>E. coli</i> NEB 10β	$\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta\text{lacX74 galK16 galE15 e14-}$ $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 recA1 relA1}$ <i>endA1 nupG rpsL</i> (SmR) <i>rph</i> <i>spoT1</i> $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$	New England Biolabs (Ipswich/USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen (Darmstadt/Deutschland)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) ΔiscR	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> $\Delta\text{iscR}::\text{Kan}$ (DE3)	Akhtar & Jones 2008
<i>E. coli</i> C43(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Miroux & Walker 1996
<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>- Stämme		
<i>H. denitrificans</i> ΔtsdA	SmR, <i>in frame</i> Deletion von <i>tsdA</i> (Hden_2748) in <i>H. denitrificans</i> Sm200	Koch & Dahl 2018
<i>H. denitrificans</i> ΔtsdA ΔshdrR		Jingjing Li
<i>H. denitrificans</i> ΔtsdA ΔshdrH		Mancoglu 2020
<i>H. denitrificans</i> ΔtsdA Knock In <i>Hden0690-0691</i>		Diese Arbeit
<i>Thioalkalivibrio</i> <i>thiocyanoxidans</i>-Stämme		
<i>Thioalkalivibrio thiocyanoxidans</i> DSM 13541 (ARh2 ^T)	Wildtyp	Sorokin <i>et al.</i> 2002

2.8 Plasmide

Tabelle 7: Verwendete Plasmide einschließlich kodierter Merkmale und Quellenangabe.

Name	Merkmale	Referenz
pASKIBA3+TK90_0635	Ap ^R , <i>XbaI/Eco47III</i> -Fragment der PCR auf <i>shdrH</i> (TK90_0635) in <i>XbaI/Eco47III</i> von pASKIBA3+	Koch 2018
pET-22b(+)	Ap ^R , T7 Promotor, lac Operator, C-terminales His-tag, pelB leader	Merck KGaA (Darmstadt/Deutschland)
pET Hden0691	Ap ^R , <i>NdeI/HindIII</i> -Fragment der PCR auf <i>shdrA</i> (Hden_0691) in <i>NdeI/HindIII</i> von pET-22b(+)	Koch & Dahl 2018
pET Hden_0694	Ap ^R , <i>NdeI/EcoRI</i> -Fragment der PCR auf <i>shdrB2</i> (Hden_0694) in <i>NdeI/EcoRI</i> von pET-22b(+)	Lydia Steffens
pET-22b(+)-Strep	Ap ^R , <i>NdeI/XhoI</i> -Fragment der PCR auf Strep in <i>NdeI/XhoI</i> von pET-22b(+)	Diese Arbeit
pET-22b(+)-Strep_Hden0690	Ap ^R , <i>NdeI/NotI</i> -Fragment der PCR auf <i>shdrB1</i> (Hden_0690) in <i>NdeI/NotI</i> von pET-22b(+)	Diese Arbeit
pET-22b(+)-Strep_Hden0693	Ap ^R , <i>NdeI/NotI</i> -Fragment der PCR auf <i>shdrC2</i> (Hden_0693) in <i>NdeI/NotI</i> von pET-22b(+)	Diese Arbeit
pET22b-TwStrep	Ap ^R , <i>BamHI/EcoRI</i> -Fragment der PCR auf TwinStrep in <i>BamHI/EcoRI</i> von pET-22b(+)	Maria Löffler
pET-22b(+)-TwinStrep_Hden0689	Ap ^R , <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment der PCR auf <i>shdrC1</i> (Hden_0689) in <i>NdeI/BamHI</i> von pET22b-TwStrep	Diese Arbeit
pk18mobsacB-ΔshdrH-ΩTc	Km ^R , Tc ^R , pHP45Ω-Tc Tetracyclin-Kassette ausgeschnitten mit <i>SmaI</i> und eingefügt in <i>pk18mobsacBΔshdrH</i> mit <i>SmaI</i>	Aynur Mancoglu
pk18mobsacBKnockinTc	Km ^R , Tc ^R , pHP45Ω-Tc Tetracyclin-Kassette ausgeschnitten mit <i>SmaI</i> und eingefügt in <i>pk18mobsacBKnockin</i> via <i>AfeI</i>	Koch 2018
pRKISC	Tc ^R , <i>iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-OBF3</i> Gencluster in <i>EcoRI</i> von pBsE40	Takahashi & Nakamura 1999

2.9 Oligonukleotide

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide einschließlich Sequenz- und Referenzangabe. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg/Deutschland) synthetisiert und bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Klammern angegeben und die Restriktionsschnittstellen sind mit fetter Schriftstärke hervorgehoben.

Name	Sequenz (5'→3')	Referenz
Fwd_Hden_0689_NdeI	AGCT CATATG GCGCATAGCGAA	Diese Arbeit
Rev_Hden_0689_BamHI	ATTC GGATCC GTCGTCCTGATCCTCGA	Diese Arbeit
Fwd_Hden_0690_NdeI	CAG CCATATG AAATCAACTGGC	Diese Arbeit
Rev_Hden_0690_NotI	AATT GCGGCCGC CTCCGCCGGCGGGGG	Diese Arbeit
Fwd_Hden0693_NdeI	AAAAA CATATG CCGATCCATGAAAAATC	Tobias Koch
Rev_Hden_0693_NotI	AATT GCGGCCGC TTCCGCAGCTTCGAG	Diese Arbeit
Fwd_pET22b-Strep	GAAGGAGATAT ACATATG AAAT	Diese Arbeit
Rev_pET22b-Strep	TTT CTCGAG TTATTTTTCGAACTGCGGGGTGGCTCCACGCGG CCGCAAGCTTGTGCGAC	Diese Arbeit
Fwd_Knockin_screen	TGATGAGACGGATCAGACGAGCTG	Koch 2018
Rev_Knockin_screen	TCATCGCGGCTGCATTGGCCT	Koch 2018

2.10 Standards

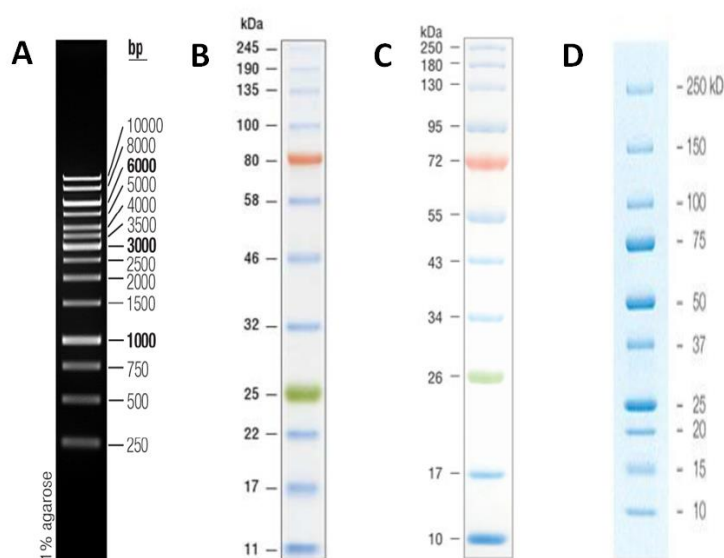


Abbildung 4: Verwendete Elektrophorese-Größenstandards. (A) GeneRuler 1kB DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific/Rockford/USA). (B) Color Prestained Protein Standard, Broad Range 11-245 kDa (New England Biolabs/Ipswich/USA). (C) Color Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa (New England Biolabs/Ipswich/USA). (D) Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standard (Bio-Rad/München/Deutschland).

2.11 Software und Programme

Tabelle 9: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software und Programme.

Name	Hersteller
Clone Manager 9	Sci-Ed Software
ExpASy	https://www.expasy.org/
i-control 2.0	Tecan
Image Lab 6.1	Bio-Rad
KEGG Genome	http://www.genome.jp/kegg/genome.html
Magellan Pro 7.4	Tecan
Office 2010	Microsoft
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
PYMOL	https://pymol.org/2/
R	https://www.r-project.org/
SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/
Unicorn Start 1.1	GE Healthcare
UniProt	http://www.uniprot.org/
UV-visible ChemStation Software	Agilent Technologies
WinASPECT 2.2	Analytik Jena
Zotero 5.0.96.2	Zotero

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Für allgemeine Klonierungsarbeiten und für die Amplifikation von Plasmiden (*E. coli* NEB 10 β , Tabelle 6) sowie für die rekombinante Produktion heterologer Proteine (*E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21 (DE3) Δ *iscR*, Tabelle 6), wurden Stämme des Organismus *Escherichia coli* genutzt.

3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*, wurde die Methode nach Dagert und Ehrlich angewendet (Dagert & Ehrlich 1979). Eine 5 mL Vorkultur (LB-Medium) wurde über Nacht (ü.N.) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 70 mL Hauptkultur (YT-Medium) 1 : 100 mit der Vorkultur beimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,3 – 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min pelletiert. Die Zellen wurden in 10,5 mL einer eiskalten Lösung (70 mM $CaCl_2$, 20 mM $MgSO_4$) resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Erneut wurden die Zellen bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min pelletiert und das erhaltene Pellet in 3,5 mL der eiskalten Lösung resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 40 min auf Eis, wurden 876 μ L Glycerin hinzugegeben. Die so erhaltene Zellsuspension wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

LB-Medium		YT-Medium	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Trypton	10 g/L	Trypton	16 g/L
Hefeextrakt	5 g/L	Hefeextrakt	10 g/L
NaCl	5 g/L	NaCl	5 g/L

3.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*

Plasmide wurden mittels der Hitzeschock-Methode in chemisch kompetente *E. coli* eingebracht (Hanahan 1983). Dazu wurden 100 μ L chemisch kompetenter Zellen für 15 - 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 1 μ L Plasmid-DNA oder 20 μ L eines Ligationsansatzes versetzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 30 min, folgte ein

Hitzeschock bei 42 °C für 45 - 60 s und eine anschließende Inkubation auf Eis für 2 min. Zu dem Transformationsansatz wurden 900 µL LB-Medium gegeben und für 45 - 60 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 4000 rpm pelletiert und das Pellet in 100 µL LB-Medium resuspendiert. Die Resuspension wurde auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und ü.N. bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

3.1.4 Kultivierung von *Hyphomicrobium denitrificans* X^T

Der Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* X^T wurde in Methanol-Medium bei 30 °C und 280 rpm kultiviert. Das Medium enthielt grundsätzlich 0,1 % (v/v) Methanol und das Antibiotikum Chloramphenicol (25 µg/mL). Für die Wachstumsversuche wurde dem Methanol-Medium zusätzlich 100 mM MOPS-Puffer (pH 7,2) sowie das Antibiotikum Streptomycin (50 µg/mL) zugegeben. Weitere Abweichungen sind unter der jeweiligen Methode aufgeführt. Die Supplementierung mit Methanol und den gewünschten Antibiotika erfolgte stets nach dem Autoklavieren unter der Sterilbank.

Tabelle 10: Verwendete Lösungen zur Kultivierung von *H. denitrificans*.

Name	Zusammensetzung	Referenz
Methanol-Medium	NH ₄ Cl	1,00 g/L
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20 g/L
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,50 g/L
	K ₂ HPO ₄	1,55 g/L
	Spurenelemente-Lösung	2 mL/L
	Methanol	0.1 % (v/v)
	pH 7,0	
Spurenelemente-Lösung	Na ₂ -EDTA	5,00 g/L
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2,20 g/L
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,54 g/L
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,50 g/L
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,50 g/L
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	0,1 g/L
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,15 g/L
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,16 g/L
	pH 6,0	
		Modifiziert nach Vishniac & Santer 1957

3.1.5 Kultivierung von *H. denitrificans* in einem Fermenter

Für die Anzucht des Stamms *H. denitrificans* Δ *tsdA Knock In Hden0690-0691*, wurden 100 μ L einer Kryokultur in 50 mL Methanol-Medium gegeben und diese bei 30 °C und 280 rpm für 72 h kultiviert. Die ausgewachsene Vorvorkultur wurde in 500 mL Methanol-Medium mit 100 mM MOPS-Puffer pH 7,2 gegeben und erneut für 24 h bei 30 °C und 280 rpm inkubiert. Ein steriler Fermenter Biostat V mit 5 L Fassungsvermögen (Sartorius/Göttingen/Deutschland), wurde über eine sterile Zulaufflasche mit 4,5 L Methanol-Medium sowie den 500 mL der Vorkultur angeimpft. Zusätzlich wurde zum Start der Fermentation 2 mM Thiosulfat über einen sterilen Filter dazugegeben, um das sHdr-System zu induzieren. Die Thiosulfatkonzentration wurde in regelmäßigen Abständen gemessen und nach vollständigem Verbrauch wurde durch eine frische Thiosulfatlösung erneut eine Konzentration von 2 mM eingestellt. Während der Anzucht im Fermenter, wurden über Elektroden sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch der pH-Wert gemessen. Bei starkem Absinken der Sauerstoffkonzentration, wurde das Medium mit Methanol als Kohlenstoffquelle supplementiert. Der pH-Wert wurde automatisch durch Titration mit 1 M Salzsäure und 1 M Natronlauge auf einen Bereich von 7,0 -7,2 reguliert.

Für die Anzucht des Stamms *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *shdrR*, wurden 100 μ L einer Kryokultur in 50 mL Methanol-Medium gegeben und diese bei 30 °C und 280 rpm für 72 h kultiviert. Die ausgewachsene Vorvorkultur wurde in 500 mL Methanol-Medium mit 100 mM MOPS-Puffer pH 7,2 gegeben und erneut für 24 h bei 30 °C und 280 rpm inkubiert. Ein steriler Fermenter Biostat V (Sartorius/Göttingen/Deutschland) mit 5 L Fassungsvermögen, wurde über eine sterile Zulaufflasche mit 3,5 L Methanol-Medium sowie den 500 mL der Vorkultur angeimpft. Im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Anzucht von *H. denitrificans* Δ *tsdA Knock In Hden0690-0691*, wurde dem Medium kein Thiosulfat beigefügt. Während der Anzucht im Fermenter, wurden über Elektroden sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch der pH-Wert gemessen. Bei starkem Absinken der Sauerstoffkonzentration, wurde das Medium mit Methanol als Kohlenstoffquelle sowie zu geeigneten Zeitpunkten mit Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle und Natriumdihydrogenphosphat als Phosphorquelle supplementiert. Der pH-Wert wurde automatisch durch Titration mit 1 M Salzsäure und 1 M Natronlauge auf einen Bereich von 7,0 -7,2 reguliert.

3.1.6 Wachstumsversuche mit *H. denitrificans*

Eine 50 mL Vorkultur bestehend aus Methanol-Medium mit 50 mM MOPS-Puffer, Chloramphenicol (25 µg/mL) und Streptomycin (200 µg/mL) und 2 mM Thiosulfat, wurde mit Zellmaterial des entsprechenden Stammes angeimpft. Die Vorkultur wurde für 72 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. 10 mL der Vorkultur wurden für 15 min bei 15000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in dem zuvor beschriebenen Medium (inklusive 2 mM Thiosulfat) resuspendiert, um die Hauptkultur auf eine Start-OD von 0,025 anzuimpfen. Die Hauptkulturen wurden je 1 mL/Well in eine durchsichtige 48-Well-Platte gefüllt. Die fertig befüllte Platte wurde mit einem durchsichtigen Deckel verschlossen, mit Parafilm umwickelt und während des Experiments bei 30 °C in einem Tecan Infinite M Plex (Tecan/Männedorf/Schweiz) inkubiert. Während des Experiments wurde vom Plattenlesegerät alle 5 min die OD gemessen (kinetisches Intervall). Während jedem Intervall wurde die Platte für 240 s linear bei einer Amplitude von 4 mm geschüttelt. Für die Messung der OD wurde nach dem Schütteln eine Ruhephase von 500 ms eingestellt und 10 Lichtblitze. Der Versuch wurde beendet, wenn sich die Kulturen in der stationären Phase befanden oder sämtliches Thiosulfat abgebaut war.

3.1.7 Bestimmung der Wachstumskurven im Plattenlesegerät

Da ab einer OD > 0,3 Streuungseffekte auftreten können, die im Plattenlesegerät nicht ausgeglichen werden, wurde in vorherigen Arbeiten ein empirischer Korrekturfaktor ermittelt, der die Streuungseffekte unverdünnter Proben ausgleicht. Der Korrekturfaktor wurde einer Ausgleichsgeraden ($y = 0,3582 X^2 + 0,8189 x$) entnommen, die sich aus der Auftragung der OD im Plattenlesegerät gegen die OD derselben aber verdünnten Probe im Photometer ergab. Durch Auftragung der korrigierten OD-Werte gegen die Zeit ergab sich die Wachstumskurve.

3.1.8 Bestimmung der spezifischen Thiosulfatoxidationsrate

Die nach 3.5.5 gemessenen Thiosulfatkonzentrationen wurden gegen die jeweiligen Zeitpunkte während der unter 3.1.6 beschriebenen Wachstumsversuche aufgetragen. Durch vier Punkte, die im linearen Bereich der Thiosulfatabbaukurve lagen, wurde eine polynomische Anpassung zweiten Grades durchgeführt und von dieser die erste Ableitung

gebildet. In die Formel der Ableitung wurde der jeweilige Zeitpunkt als x-Wert eingesetzt, um somit die Thiosulfatoxidationsrate in mmol/h·L zu erhalten. Aus den Thiosulfatoxidationsraten der verwendeten Messpunkte wurde abschließend der Mittelwert gebildet. Die spezifische Thiosulfatoxidationsrate stellt eine Möglichkeit dar, den Thiosulfatabbau verschiedener Kulturen besser vergleichen zu können. Durch Berücksichtigung des Proteingehalts der jeweiligen Kultur, kann die spezifische Thiosulfatoxidationsrate in nmol/h·mg errechnet werden. Der Proteingehalt wurde durch Verrechnen der OD mit einem, in vorherigen Arbeiten empirisch ermittelten, Faktor von 0,80195 erhalten. Durch abschließende Division der Thiosulfatoxidationsrate durch den Proteingehalt, wurde die spezifische Thiosulfatoxidationsrate bestimmt.

3.1.9 Herstellung von elektro-kompetenten *H. denitrificans*

In einem 2-L-Erlenmeyer-Kolben, wurden 400 mL Methanol-Medium mit 25 µg/mL Chloramphenicol und Zellmaterial von *H. denitrificans* Δ *tsdA*, bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen. Die Zellen wurden bei 4 °C und 4.000 rpm für 10 min pelletiert und das Pellet zwei Mal mit eiskaltem sterilem rH₂O gewaschen. Es folgte ein finaler Waschschrift mit 10 %igem (v/v) eiskaltem Glycerol bei 4.000 rpm und 4 °C für 10 min. Das erhaltene Pellet wurde in 800 µL 10 %igem (v/v) eiskaltem Glycerol resuspendiert und in 50 µL Aliquots bei -70 °C gelagert. Die Zellen wurden innerhalb von 14 Tagen zur Elektroporation verwendet.

3.1.10 Elektroporation von elektro-kompetenten *H. denitrificans*

Zum Einbringen von Plasmiden in elektro-kompetente *H. denitrificans*-Zellen, wurden die Zellen mit bis zu 5 µL der Plasmid-Lösung (enthielt 480 – 500 µg DNA), in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, für 10 min auf Eis inkubiert. Nach direkter Überführung in eine eiskalte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite, Bio-Budget Technologies GmbH/Krefeld/Deutschland), wurden die Zellen sofort mit einem Bio-Rad gene pulser II (Bio-Rad/München/Deutschland) bei 2,4 kV, 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF elektroporiert. Die anschließende Regeneration erfolgte schnellstmöglich durch Zugabe von 900 µL Methanol-Medium mit 25 µg/mL Chloramphenicol und einer Inkubation bei 30 °C für 6 – 8 h und 280 rpm. Die regenerierten Zellen wurden bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 mL frischen Methanol-Medium resuspendiert und 100 µL dezimaler

Verdünnungen (bis 1 zu 10000) auf Agarplatten mit Methanol-Medium und 25 µg/mL Chloramphenicol, sowie 10 µg/mL Tetracyclin ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm umwickelt und für 7 – 10 Tage bei 30 °C in einem Brutschrank inkubiert, bis weiße Kolonien zu sehen waren.

3.1.11 Generierung von Mutanten in *H. denitrificans*

Zur Generierung von *H. denitrificans* Δ *tsdA* Knock In *Hden0690-0691*, wurde das Plasmid *pk18mobsacB*KnockinTc in elektro-kompetente *H. denitrificans* Δ *tsdA* elektroporiert und auf Agarplatten mit Methanol-Medium und den Antibiotika Chloramphenicol (25 µg/mL) sowie Tetracyclin (10µg/mL) ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm umwickelt und 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden sowohl auf eine Masterplatte mit Methanol-Medium und den Antibiotika Chloramphenicol (25 µg/mL) sowie Tetracyclin (10 µg/mL) übertragen als auch auf eine Agarplatte mit Methanol-Medium, Chloramphenicol (25 µg/mL) und Saccharose [10 % (w/v)]. Mutanten, die erfolgreich den ersten homologen Rekombinationsschritt durchgeführt hatten, bildeten auf der saccharosehaltigen Agarplatte Schleim. Die so erkannten Mutanten wurden von der saccharosefreien Masterplatte jeweils in eine 50 mL Flüssigkultur mit Methanol-Medium mit Chloramphenicol (25 µg/mL) überführt und für 72 h bei 30 °C und 280 rpm inkubiert. 2 mL der Kulturen wurden bei 4 °C und 4000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 100 µL auf einer Agarplatte mit Methanol-Medium und Chloramphenicol (25 µg/mL) ausplattiert. Das Pellet wurde in 100 µL des Überstandes resuspendiert und 100 µL hiervon sowie dezimale Verdünnungen (bis 1 zu 1000) jeweils auf Agarplatten mit Methanol-Medium und Chloramphenicol (25 µg/mL) und Saccharose [(10 % (w/v))] ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm umwickelt und solange in einem 30 °C Brutschrank inkubiert bis Kolonien sichtbar wurden. Die nicht schleimbildenden Kolonien wurden auf eine Masterplatte mit Methanol-Medium und Chloramphenicol übertragen und Zellmaterial für eine PCR genutzt, um den Genotyp der Mutante zu verifizieren.

3.1.12 Konservierung von *H. denitrificans* als Kryokulturen

50 mL Methanol-Medium, das Chloramphenicol (25 µg/mL) enthielt, wurde mit Zellmaterial von *H. denitrificans* angeimpft und bei 30 °C und 280 rpm inkubiert. Nach 72 h wurde die entsprechende Menge dieser Vorkultur verwendet, um eine frische 50 mL Kultur, bestehend

aus Methanol-Medium und Chloaramphenicol (25 µg/mL), zu beimpfen. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C und 280 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert und dann für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µL frischem Methanol-Medium resuspendiert und anschließend mit 500 µL 80 %igem (v/v) Glycerin durchmischt. Die Aliquots wurden bei -70 °C gelagert.

3.1.13 Kultivierung von *Thioalkalivibrio thiocyanoxydans*

Der Organismus *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* wurde in Carbonat-Medium bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Das Medium enthielt keine Antibiotika. Die Spurenelemente-Lösung, Magnesiumchlorid, Thiosulfat und Ammoniumchlorid wurden alle separat, nach dem Autoklavieren des Mediums, unter der Sterilbank über einen sterilen Filter in das Carbonat-Medium gegeben.

Tabelle 11: Verwendete Lösungen zur Kultivierung von *T. thiocyanoxidans*.

Name	Zusammensetzung	Menge
Carbonat-Medium	Na ₂ CO ₃	40,00 g/L
	NaHCO ₃	20,00 g/L
	NaCl	5,00 g/L
	K ₂ HPO ₄	1,00 g/L
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,00 mL/L
	NH ₄ Cl	5,00 mL/L
	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	20,00 mL/L
	Hefeextrakt	0.1 % (w/v)
	Spurenelemente-Lösung	2,00 mL/L
	pH 10,0	
Spurenelemente-Lösung	EDTA	5,00 g/L
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,00 g/L
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100,00 mg/L
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30,00 mg/L
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200,00 mg/L
	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20,00 mg/L
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	30,00 mg/L
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10,00 mg/L
	H ₃ BO ₃	300,00 mg/L
	pH 3,0 ; ggf. mit HCl titrieren	
Stammlösung MgCl₂ x 6 H₂O	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	200,00 g/L
Stammlösung NH₄Cl	NH ₄ Cl	53,50 g/L
Stammlösung Na₂S₂O₃ x 5 H₂O	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	496,00 g/L

3.1.14 Anzucht von *T. thiocyanoxidans* in einem Fermenter

Für die Anzucht von *T. thiocyanoxidans* in einem 5 L fassenden Fermenter Biostat V (Sartorius/Göttingen/Deutschland) wurde eine 500 mL Vorkultur Carbonat-Medium mit Zellmaterial von *T. thiocyanoxidans* angeimpft und für 72 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die Vorkultur wurde komplett in 4,5 L Carbonat-Medium überführt und in regelmäßigen Zeitabständen die OD und die Thiosulfatkonzentration gemessen. Nach Aufbrauchen des Thiosulfats wurde die Thiosulfatkonzentration erneut auf 40 mM mit einer frischen Thiosulfatlösung eingestellt, die über einen sterilen Filter zugegeben wurde. Eine pH-Regulation war nicht notwendig.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur gerichteten Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.* 1986) für die Klonierung sowie zur Verifizierung des Genotyps von Mutanten verwendet. Zur Verifizierung des Genotyps von *H. denitrificans*-Mutanten diente genomische DNA als Template. Bei der Kolonie-PCR wurde Zellmaterial einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und die Denaturierung um 15 min verlängert. Für die Klonierungs-PCR wurde die Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs/Ipswich/USA) verwendet, bei der Screening- und Kolonie-PCR die *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs/Ipswich/USA).

Tabelle 12: Zusammensetzung eines Klonierungs-PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen ($\Sigma = 25 \mu\text{L}$)	Finale Konzentration
5x Q5 Reaktionsbuffer	5 μL	1x
10 mM dNTPs	0,5 μL	Jeweils 200 μM
10 μM Vorwärtsprimer	1,25 μL	0,5 μM
10 μM Rückwärtsprimer	1,25 μL	0,5 μM
Template DNA	X μL	< 1000 ng
Q5 [®] HF DNA Polymerase	0,25 μL	0,02 U/ μL
rH ₂ O	Auffüllen auf 25 μL	

Tabelle 13: Programm für eine Klonierungs-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	35
Primerhybridisierung	Primerspezifisch	30 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min	1
Ende	4 – 10 °C	-	

Tabelle 14: Zusammensetzung für Screening- und Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen ($\Sigma = 25 \mu\text{L}$)	Finale Konzentration
10x Standard <i>Taq</i>	2,5 μL	1x
Reaktionsbuffer		
10 mM dNTPs	0,5 μL	Jeweils 200 μM
10 μM Vorwärtsprimer	0,5 μL	0,2 μM
10 μM Rückwärtsprimer	0,5 μL	0,2 μM
Template DNA	2,5 μL gDNA oder Zellmaterial	1 ng – 1 μg
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,125 μL	
rH ₂ O	Auffüllen auf 25 μL	

Tabelle 15: Programm für eine Screening- oder Kolonie-PCR. Bei Verwendung von Zellmaterial von einer Agarplatte, anstelle von extrahierter genomischer DNA, wurde die initiale Denaturierung um 15 min verlängert.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	30
Primerhybridisierung	Primerspezifisch		
Elongation	68 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	68 °C	5 min	1
Ende	4 – 10 °C	-	

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels der Agarose-Gelelektrophorese. In einer Mikrowelle wurden 30 mL 1 % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer gekocht, mit 1 μL GelRed (Biotium/Köln/Deutschland) versetzt und anschließend für etwa 30 min in einer Elektrophoresekammer (Biometra/Göttingen/Deutschland) inkubiert. Das

ausgehärtete Gel wurde mit 1x TAE-Puffer übergossen und die Proben mit 6x Ladepuffer (New England Biolabs/Ipswich/USA) versetzt. Die Proben wurden in die Taschen geladen und die Elektrophorese für 45 – 60 min bei 90 V laufen gelassen. Als Marker wurde die GeneRuler 1 kB DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific/Rockford/USA) genutzt. Die Visualisierung der Banden erfolgte anschließend unter UV-Licht in einem Gel iX Imager (Intas Science Imaging Instruments/Göttingen/Deutschland).

20x TAE-Puffer

Komponente	Menge
Tris/Hcl	96,9 g
EDTA	7,5 g
Essigsäure	22,5 g
	pH 8,5

3.2.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Das GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific/Rockford/USA) wurde zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen, gemäß der Angaben des Herstellers, verwendet. Die extrahierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von DNA erfolgte entweder aus diagnostischen Zwecken, um den Aufbau von DNA-Fragmenten zu überprüfen, oder im Rahmen einer Klonierung, um zirkuläre DNA zu linearisieren und Überhänge zu schaffen, die sich zu einer gerichteten Ligation eignen.

Bei einem diagnostischen Restriktionsverdau wurden 6 µL DNA mit 2 µL 6x Ladepuffer (New England Biolabs/Ipswich/USA), 2 µL CutSmart® Puffer (New England Biolabs/Ipswich/USA), sowie je 1 µL der benötigten Restriktionsenzyme versetzt und mit Wasser auf 20 µL aufgefüllt. Nach Inkubation für 1 Std bei 37 °C wurde der Ansatz auf ein Agarosegel geladen.

Für eine Klonierung wurden separat sowohl die Vektor-DNA als auch die Insert-DNA in 20 µL Ansätzen verdaut. Der Verdau mit HF-Enzymen erfolgte für 15 min bei 37 °C, ansonsten für 1 h bei 37 °C. Nach dem Verdau wurde 1 µL Phosphatase zu dem Reaktionsansatz der Vektor-DNA gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert, um eine Religation zu unterbinden. Vor einer

anschließenden Ligation wurden sowohl die Vektor-DNA als auch die Insert-DNA je nach verwendetem Enzym (siehe Herstellerangaben) bei 65 – 80 °C für 20 min inaktiviert.

Reaktionsansatz → Insert		Reaktionsansatz → Vektor	
Komponente	Volumen	Komponente	Volumen
DNA	10 µL	DNA	5 µL
CutSmart® Puffer	2 µL	CutSmart® Puffer	2 µL
Enzym 1	1 µL	Enzym 1	1 µL
Enzym 2	1 µL	Enzym 2	1 µL
rH ₂ O	6 µL	rH ₂ O	11 µL
Σ = 20 µL		Σ = 20 µL	

3.2.5 Ligation

Die Ligation mittels der T4-Ligase (New England Biolabs/Ipswich/USA) wurde genutzt, um DNA-Fragmente in ein Plasmid einzufügen, wobei Insert und Plasmid zuvor mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut wurden. Für die Reaktion, die durch die Ligase katalysiert wird, ist ATP notwendig, das im 10x T4 DNA Ligasepuffer (New England Biolabs/Ipswich/USA) enthalten war. Das Volumenverhältnis von Insert-DNA zu Plasmid-DNA betrug 4 : 1 oder 8 : 1. In Ansätzen von 20 µL wurde die entsprechende Menge an Insert- und Plasmid-DNA mit 2 µL 10x T4 DNA Ligasepuffer und 1 µL T4 DNA Ligase versetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, anschließend bei 65 °C inaktiviert und anschließend komplett für eine Transformation chemisch kompetenter *E. coli* verwendet. Als Religationskontrolle diente ein gleich behandelter Ansatz, mit Wasser anstelle von Insert-DNA.

3.2.6 Mini-Preparation von Plasmid DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*, wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific/Rockford/USA) gemäß den Angaben des Herstellers genutzt. Die finale Elution der DNA erfolgte mit 50 µL rH₂O. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert. Das benötigte Zellmaterial stammte aus, mit einer Kolonie angeimpften, 5 mL LB-Flüssigkulturen, die ü.N. bei 37 °C in einem Rotationsrad inkubiert und am nächsten Tag bei 13000 rpm pelletiert wurden.

3.2.7 Isolation genomischer DNA aus *H. denitrificans*

Die Gewinnung von gDNA aus *H. denitrificans*, für PCRs zur Genotypisierung, erfolgte mit Hilfe des Simplex Easy DNA-Extraktionskit (GEN-IAL GmbH/Troisdorf/Deutschland), gemäß den Angaben des Herstellers. Das benötigte Zellmaterial stammte aus Flüssigkulturen.

3.2.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung gereinigter DNA erfolgte durch das Unternehmen GATC Biotech (Konstanz/Deutschland). Proben mit einem Volumen von 20 µL und einem DNA-Gehalt von 30 – 100 µg/µL wurden eingeschickt und Standardprimer des Unternehmens oder selbst designte Primer, nach den Anforderungen von GATC Biotech, verwendet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli* BL21(DE3)

Das Protein sHdrH aus *Thioalkalivibrio* sp. K90mix (Locus tag:TK90_0635) wurde heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Das Plasmid pASK-IBA3+TK900635 (Tabelle 7) wurde in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und 5 mL Vorkulturen (LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin) hiervon bei 37 °C und 180 rpm ü.N. angezogen. Die Hauptkultur (1 L LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin in 2-L-Erlenmeyer-Kolben) wurde 1 %ig mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Induktion der Hauptkultur erfolgte mit 200 ng/mL Anhydrotetracyclin und anschließend wurde die Hauptkultur bei 25 °C und 90 rpm üN weiter inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit, erfolgte die Zellernte bei 10.000 rpm und 4 °C für 15 min. Die Expression des pASK-IBA3plus-Leervektors (IBA BioTAGnology/Göttingen/Deutschland), genutzt als Kontrolle für Western Blot Experimente, erfolgte nach dem identischen Protokoll.

3.3.2 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli* BL21(DE3) Δ iscR

Das Plasmid pET Hden0691, das das *shdrA* Gen aus *H. denitrificans* mit einem C-terminalen Strep-tag enthält (Koch & Dahl 2018), wurde im Stamm *E. coli* BL21(DE3) Δ iscR (Akhtar & Jones 2008) exprimiert. Eine 50 mL Vorkultur (LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 50 µg/mL Kanamycin), wurde ü.N. bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Hauptkultur (900 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 50 µg/mL Kanamycin) enthielt 100 mM MOPS-

Puffer (pH 7,4), 25 mM Glucose und 2mM Ammoniumeisen(III)-citrat und wurde mit 5 % (v/v) der Vorkultur angeimpft. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 180 rpm, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6. Die Kultur wurde dann in ein Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products/Grass Lake/USA) geschleust und mit 0,5 mM Cystein, 25 mM Fumarat und mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde im Zelt auf zwei 500 mL Erlenmeyerkolben aufgeteilt und luftdicht mit Stopfen verschlossen. Die Kolben wurden ausgeschleust und für 48-72 h bei 16 °C und 110 rpm inkubiert.

Die Produktion der weiteren Untereinheiten des sHdr-Komplexes aus *H. denitrificans* in *E. coli* BL21(DE3) Δ *iscR* erfolgte, über die Plasmide die für die sHdr-Proteine kodieren (Tabelle 7), unter denselben Bedingungen wie zuvor beschrieben.

Vorkultur		Hauptkultur	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
LB-Medium	50 mL	LB-Medium	900 mL
Ampicillin	100 µg/mL	Ampicillin	100 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL	Kanamycin	50 µg/mL
		MOPS-Puffer pH 7,4	100 mM
		Ammoniumeisen(III)-citrat	2 mM
		Glucose	25 mM
		IPTG	0,1 mM
		Cystein	0,5 mM
		Natriumfumarat	25 mM

Induktion:

3.3.3 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli* BL21(DE3) pRKISC

Das Plasmid pRKISC (Takahashi & Nakamura. 1999) wurde in den Stamm *E. coli* BL21 (DE3) C43 transformiert, um so den Stamm *E. coli* BL21(DE3) C43 pRKISC zu erhalten. In diesen Stamm wurden die Plasmide zur Produktion der sHdr-Proteine (Tabelle 7) transformiert. Das Protokoll für die heterologe Proteinproduktion ist identisch zu dem des Stammes *E. coli* BL21(DE3) Δ *iscR*, mit der Ausnahme, dass zusätzlich 10 µg/mL Tetracyclin in der Vor- als auch der Hauptkultur enthalten waren.

3.3.4 Proteinquantifizierung mittels BCA-Assays

Das BCATM Protein Assay Kit (ThermoScientific) wurde verwendet, um den Proteingehalt von Rohextrakten und resuspendierten Membranfraktionen zu quantifizieren. Die Durchführung

erfolgte, gemäß den Angaben des Herstellers, in einer 96-Well Mikrotiterplatte, bei einer Absorption von 562 nm, mit Hilfe des Tecan Sunrise™.

3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli 1970). Hierfür wurden sowohl selbst gegossene Gele als auch Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gele (Bio-Rad/München/Deutschland) verwendet. In beiden Fällen wurde 1x SDS-Laufpuffer verwendet und die aufzutragenden Proben 1 : 5 mit ROTI®Load 1 (Roth/Karlsruhe/Deutschland) versetzt und für 5-10 min bei 90 °C gekocht. Bei Verwendung der Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gele wurden die Proben, außer Rohextrakte und resuspendierte Membranfraktionen, vorher mit Bio-Spin® P-6 Gel Columns (Bio-Rad/München/Deutschland) entsalzt.

Durch jeweiliges Mischen der Lösungen A und B mit einer Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid/Bisacrylamid) und Zugabe von Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat, zur Polymerisation, wurden sowohl 15 %ige Trenngele als auch 4,5 %ige Sammelgele gegossen. Nach Auftragen der Proben, wurde eine Spannung von 80 V angelegt bis der Marker anfang sich im Trenngel aufzutrennen. Die Spannung wurde auf 120 V erhöht und gewartet bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte (ca. 2 h).

Lösung A		Lösung B	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Tris/HCl	1,5 M	Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,3 % (w/v)	SDS	0,4 % (w/v)
	pH 8,8		pH 6,8

Reagenzien	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4,5 %)
rH ₂ O	3 mL	3 mL
30 % Acrylamid	6 mL	0,75 mL
Lösung A	3 mL	-
Lösung B	-	1,25 mL
10 % Ammoniumperoxodisulfat	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Die Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gele wurden nach Auftragen der Proben bei 200 V gefahren, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte (ca. 40 min). Anschließend

wurden die Gele gefärbt oder im Falle der Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gele direkt mit einer ChemiDoc Station (Bio-Rad/München/Deutschland) belichtet.

3.3.6 Färbung mit Coomassie

Zur Detektion von Proteinbanden wurde das SDS-Gel mit Coomassie gefärbt. Dabei kamen sowohl eine Coomassie-Färbelösung als auch eine kolloidale Coomassie-Färbelösung (Candiano *et al.* 2004) zum Einsatz.

Bei der Verwendung einer Coomassie-Färbelösung wurde das Gel für 1 h in der Färbelösung unter Schütteln in einer Glaswanne inkubiert und nachfolgend in einer Entfärbelösung, bis zum Erreichen der gewünschten Färbung, entfärbt.

Färbelösung		Entfärbelösung	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Methanol	50 % (v/v)	Methanol	20 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)	Eisessig	10 % (v/v)
rH ₂ O	40 % (v/v)	rH ₂ O	70 % (v/v)
Coomassie R-250	0,25 % (w/v)		

Die Färbung eines SDS-Gels mit einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Candiano *et al.* (Candiano *et al.* 2004). Das Gel wurde ü.N. in der Färbelösung geschwenkt und anschließend fünf Mal mit je rH₂O für 20-30 min entfärbt.

Tabelle 16: Rezept für die kolloidale Coomassie-Färbelösung. Zuerst wurden Ammoniumsulfat und Coomassie Brilliant Blue G-250 in 300 ml rH₂O gelöst, dann langsam Methanol hinzugefügt, dann langsam Phosphorsäure hinzugefügt, abschließend wurde mit rH₂O auf 1 L aufgefüllt.

Kolloidale Coomassie-Färbelösung	
Komponente	Menge
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 % (w/v)
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
Phosphorsäure	10 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)

3.3.7 Schnellfärbung von Gelen

Zur schnellen Färbung von SDS-Gelen wurde die ROTI®Blue quick-Färbelösung (Roth/Karlsruhe/Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Alternativ erfolgte eine Entfärbung mit rH₂O.

3.3.8 Färbung mit Silbernitrat

Zur hochsensitiven Visualisierung von Proteinen in SDS-Gelen erfolgte eine Silber-Färbung modifiziert nach Blum *et al.* (Blum *et al.* 1987). Zur Färbung wurde das SDS-Gel für 20 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend 10 min mit 50 % Methanol überschichtet. Es folgte ein Waschschrift für 10 min mit rH₂O sowie eine anschließende Inkubation für 1 min in Thiosulfatlösung zur Sensitivitäts- und Kontrasterhöhung. Nach zwei weiteren Waschschriften für 1 min mit rH₂O erfolgte die Imprägnierung des Gels für 20 min im Dunkeln bei 4 °C mit der Imprägnierlösung. Anschließend wurde das Gel mit Entwicklerlösung überschichtet und final die Reaktion mit der Stopplösung gestoppt.

Fixierlösung		50 % Methanol	
Komponente	Volumen	Komponente	Menge
Methanol	500 mL	Methanol	25 mL
Eisessig	120 mL	rH ₂ O	Auffüllen auf 50 mL
Formaldehyd (37 %)	0,5 mL		
rH ₂ O	Auffüllen auf 1 L		

0,02 % Thiosulfatlösung		Imprägnierlösung	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,01 g	Silbernitrat	0,1 g
rH ₂ O	Auffüllen auf 50 mL	Formaldehyd (37 %)	0,037 mL
		rH ₂ O	Auffüllen auf 50 mL

Entwicklerlösung		Stopplösung	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Na ₂ CO ₃	3,0 g	Eisessig	2,5 mL
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,004 g	rH ₂ O	Auffüllen auf 50 mL
Formaldehyd (37 %)	0,025 mL		
rH ₂ O	Auffüllen auf 50 mL		

3.3.9 Gewinnung von Zellextrakten für immunologische Proteinnachweise

Die folgenden Schritte wurden alle unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. Zur Gewinnung von Zellextrakten von *H. denitrificans*, *T. thiocyanoxidans* und *E. coli*, wurde das Zellpellet

des jeweiligen Organismus bei RT aufgetaut und anschließend mit Resuspensionpuffer, der immer Deoxyribonuklease I (Sigma-Aldrich /St. Louis/USA) und Proteaseinhibitor (Merck/Darmstadt/Deutschland) enthielt, versetzt (2 mL Puffer pro Gramm Zellpellet). Es folgte die vollständige Resuspension der Zellen. Die Zellsuspension wurde 2 min/mL beschallt und danach für 20 min bei 4 °C und 15000 rpm in 2 mL Reaktionsgefäßen abzentrifugiert. Im Falle von *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxidans*, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 45000 rpm für 1 h in speziellen Gefäßen.

Resuspensionspuffer

Komponente	Konzentration
Tris/HCl	50 mM
DTT (nicht bei <i>E. coli</i>)	1 mM
	pH 8,0

3.3.10 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blots

Zum spezifischen Nachweis eines Proteins innerhalb eines Proteingemisches wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden das SDS-Gel und eine passgenau zurechtgeschnittene 0,2 µm Nitrocellulose-Membran (Amersham Protran/GE Healthcare/USA) für 20 min in Towbin-Puffer aktiviert. Anschließend wurden 2 x 3 Whatman-Papiere (Roth/Karlsruhe/Deutschland) mit Towbin-Puffer durchnässt und 1 x 3 dieser Whatman-Papiere auf der Anode platziert. Darüber wurden zuerst die Membran und dann das SDS-Gel gelegt, gefolgt von weiteren 1 x 3 Whatman-Papieren. Die Blotting-Aparatur wurde geschlossen und der Transfer entweder für 20 min bei 15 V in einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad/München/Deutschland) oder für 10 min bei 15 V in einem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad/München/Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde der Blot in einer Blockierlösung ü.N. im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag nach dem spezifischen Blot-Protokoll behandelt.

Towbin-Puffer

Komponente	Menge
Tris	1,52 g
Glycin	7,29 g
Methanol	100 mL
rH ₂ O	400 mL

Die spezifische Detektion von Proteinen mit Strep-tag erfolgte mit dem Strep-Tactin-HRP-Konjugat (IBA BioTAGnology/Göttingen/Deutschland). Die Blockierlösung wurde verworfen und die Membran drei Mal für je 5 min mit 20 mL PBS-T-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 10 mL PBS-T-Puffer von 1 h, mit Zusatz von 2,5 µL des Strep-Tactin-HRP-Konjugats. Danach wurde die Membran zwei Mal für 1 min mit 10 mL PBS-T-Puffer und ein Mal für 1 min mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen. Eine chromogene Detektion erfolgte in 20 mL PBS-Puffer und anschließender Zugabe von 200 µL Chloronaphtol-Lösung und 20 µL 30 % Wasserstoffperoxid. Die Detektion per Chemilumineszenz erfolgte mit dem SignalFire ECL Reagenz (Cell Signaling Technology/Danvers/USA), nach Angaben des Herstellers, und anschließend in einem ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad/München/Deutschland).

PBS-Puffer	
Komponente	Konzentration
KH ₂ PO ₄	4 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
NaCl	115 mM
	pH 7,4

PBS-T-Puffer	
Komponente	Volumen
PBS	variabel
Tween 20	0,1 % (v/v)

PBS-Blockierlösung	
Komponente	Menge
BSA	3 % (w/v)
Tween 20	0,05 % (v/v)

Färbelösung	
Komponente	Volumen
Chloronaphtol (3 % in Methanol)	200 µL
H ₂ O ₂ (30 %)	20 µL
PBS	20 mL

Zur spezifischen Detektion der sHdr-Proteine wurden spezielle Antiseren als Primärantikörper genutzt (Tabelle 5). Nach dem Blockieren der Membran wurde die Blockierlösung verworfen und die Membran drei Mal mit je 20 mL TBS-T-Puffer für je 5 min gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 17) erfolgte, für 3 h unter Schwenken, in 20 mL TBS-T-Puffer mit 0,5 % BSA (w/v). Anschließend wurde die Membran drei Mal mit je 20 mL TBS-T-Puffer gewaschen und danach für 1 h mit dem Sekundärantikörper (1 : 5000) in 25 mL TBS-T-Puffer mit 0,5 % BSA (w/v) geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran zwei Mal mit je 20 mL TBS-T-Puffer und zuletzt ein Mal mit 20 mL TBS-Puffer für je 5 min gewaschen. Die Detektion via Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe des SignalFire ECL Reagenz, nach Angaben des Herstellers. Das Signal wurde entweder auf Fuji Super RX-N Röntgenfilmen (Fuji/Düsseldorf/Deutschland) in einer Röntgenkassette

(A. Hartenstein/Würzburg/Deutschland) festgehalten (1 min-12 h) oder mit einem ChemiDoc Imaging System detektiert (1 min-10 min). Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte unter Rotlicht in einer Dunkelkammer. Der Film wurde, bis zum Erkennen der Signale, in Entwicklerlösung (A. Hartenstein/Würzburg/Deutschland; 1 : 5 in Wasser verdünnt) inkubiert und anschließend die Reaktion in 5 %iger Essigsäure gestoppt. Es folgte eine Inkubation des Films in Fixierlösung (A. Hartenstein/Würzburg/Deutschland; 1 zu 5 in Wasser verdünnt). Zuletzt wurde der Film mit Leitungswasser abgespült und anschließend an der Luft getrocknet. Als Positivkontrollen dienten die jeweils rekombinant in *E. coli* produzierten Proteine.

TBS-Puffer		TBS-Blockierlösung	
Komponente	Konzentration	Komponente	Menge
Tris	100 mM	TBS-Puffer	20 mL
NaCl	0,9 % (w/v)	Milchpulver	5 % (w/v)
	pH 7,6		

TBS-T-Puffer	
Komponente	Volumen
TBS-Puffer	variabel
Tween 20	0,1 % (v/v)

Tabelle 17: In dieser Arbeit verwendete Antikörper und deren eingesetzte Verdünnungen.

Antikörper	Verdünnung	Referenz
α -sHdrC1-Antiserum	1:100	Diese Arbeit
α -sHdrB1-Antiserum	1:400	Diese Arbeit
α -sHdrA-Antiserum	1:400	Koch & Dahl 2018
α -sHdrH-Antiserum	1:100	Diese Arbeit
α -sHdrB2-Antiserum	1:100	Diese Arbeit
Ziege α -Kaninchen IgG (ganzes Molekül), HRP-Konjugat	1:5000	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)

3.4 Chromatographische Methoden

3.4.1 Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung rekombinant in *E. coli* produzierter Proteine, die mit einem Strep-tag fusioniert waren, wurde eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Die zuvor geernteten Zellen wurden mit 2 mL pro Gramm Zellen in Puffer W resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte entweder, unter Sauerstoffausschluss, mit einem Bandelin Sonopuls

UW 2070 (Bandelin electronic/Berlin/Deutschland) für 2 min/mL Zellsuspension, unter Wasserkühlung in einer Stahlmanschette mit einer Intensität von 65 – 80 %, oder mit einem SONIFIER Cell-disruptor B15 (Branson/Danbury/USA), bei gleicher Intensität, ebenfalls in einer gekühlten Stahlmanschette (Glycerol). Die Zellsuspension wurde für 20 min bei 16000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Aufreinigung verwendet. Die Affinitätschromatographie erfolgte mit selbst gegossenen Gravity-Flow-Säulen (bis 3 mL Säulenvolumen) aus Strep-Tactin Sepharose (IBA BioTAGnology/Göttingen/Deutschland). Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert und dann das Zellextrakt auf die Säule geladen. Die Säule wurde mit bis zu 10 Säulenvolumen Puffer W mit Triton X-100 [0,1 % (v/v)] gewaschen und anschließend mit Puffer W mit Triton X-100 [0,1 % (v/v)] und Desthiobiotin (2,5 mM) das Protein eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden mit Amicon Ultracel-10K Filtern (Merck Millipore/Tullagreen/Irland) auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert und zusätzlich, bei der Aufreinigung von sHdrA, zum Umpuffern vom Elutionspuffer auf den Lagerpuffer verwendet. Die gereinigten Proteine wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

Puffer W		Lagerpuffer	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris	100 mM	Tris	20 mM
NaCl	150 mM	Glycerol	10 % (v/v)
	pH 8,0		pH 7,2
Für Waschen und Elution: Triton X-100	0,1 % (v/v)		
Für Elution: Desthiobiotin	2,5 mM		

3.4.2 Aufreinigung des sHdr-Komplexes mit einer 1 mL HisTrap™ HP-Säule

Die Reinigung erfolgte in einem Anaerobenzelt. Aus einer vorangegangenen Fermentation von *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691 wurden 10 g Zellmaterial in 20 mL Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 (mit Deoxyribonuklease I, Proteaseinhibitor, Lysozym) resuspendiert. Nach dem Ultraschall, bei 80 % Intensität für 30 min, folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 16000 rpm für 20 min. Der orange-rötliche Überstand wurde auf eine, zuvor mit Natriumphosphat-Puffer äquilibrierte, 1 mL HisTrap™ HP-Säule (Cytiva/Marlborough/USA) aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 mM Imidazol gewaschen. Es folgten Waschschritte mit 50 mM, 150 mM und 300 mM Imidazol. Die eluierten Fraktionen

wurden, unter Sauerstoffausschluss, bei 4 °C auf Eis gelagert. Die Säule wurde abschließend mit 500 mM Imidazol gespült und bei 4 °C auf 20 % Ethanol gelagert.

Natriumphosphat-Puffer

Komponente	Konzentration
Na ₂ HPO ₄	20 mM
NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	500 mM
Tween 20	2 % (v/v)
	pH 7,4
Für Elution: Imidazol	20 mM – 300 mM

3.4.3 Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus *H. denitrificans* Δ tsdA Δ shdrR

Alle folgenden Schritte wurden unter Sauerstoffausschluss durchgeführt und bei allen chromatographischen Reinigungsschritten betrug die Flussrate 1 mL/min. 30 g Zellmaterial von *H. denitrificans* Δ tsdA Δ shdrR wurden in 40 mL Puffer A (mit Deoxyribonuklease I, Proteaseinhibitor, Lysozym) resuspendiert. Der anschließende Aufschluss per Ultraschall erfolgte bei 80 % Intensität für 2 min/mL. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 17000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde für 45 min bei 45000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurden zu dem Überstand 3 M Ammoniumsulfat in Puffer A hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 500 mM Ammoniumsulfat zu erhalten. Diese Lösung wurde ü.N. auf Eis bei 4 °C langsam gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 20 min bei 4 °C und 17000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine HiPrep Phenyl HP 16/10 Säule (Cytiva/Marlborough/USA) geladen, die zuvor mit 500 mM Ammoniumsulfat in Puffer A äquilibriert worden war. Nach Auftragen des Rohextraktes folgte ein Waschschrift mit 500 mM Ammoniumsulfat. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 300 mM Ammoniumsulfat. Anschließend wurde ein Gradient von 300 – 0 mM Ammoniumsulfat in 30 Fraktionen von je 7 mL gefahren. Nach dem Gradienten wurde die Säule mit Puffer A und anschließend mit 0,01 M NaOH gewaschen. sHdrA eluierte bei 300 mM Ammoniumsulfat und wurde anschließend in einem Dialyseschlauch (Roth/Karlsruhe/Deutschland) für 4 h bei 4 °C in 2 L Puffer A unter Rühren inkubiert, danach folgten Inkubationen ü.N. und für 3 h in jeweils 2 L frischem Puffer A, ebenfalls bei 4 °C. Die dialysierte Probe wurde für 10 min bei 17000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine HiScreen Q HP Säule (Cytiva/Marlborough/USA) geladen, die zuvor mit Puffer A äquilibriert wurde. Nach

Auftragen des Überstandes wurde ein Gradient von 0 – 300 mM NaCl über 30 Fraktionen von je 2 mL angelegt. sHdrA eluierte in zwei Fraktionen bei 170 mM und 180 mM NaCl. Diese Fraktionen wurden separat über eine Bio-Scale CHT Type I Säule (Bio-Rad/München/Deutschland) aufgereinigt. Hierzu wurde die aufzutragende Probe 1 : 5 mit 25 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Ein Gradient von 25 mM – 215 mM Natriumphosphat wurde über 30 Fraktionen von je 2 mL angelegt. sHdrA eluierte in beiden Fällen bei 125 mM Natriumphosphat. Die sHdrA enthaltenden Fraktionen wurden in einem Amicon Ultracel-10K Filtern (Merck Millipore/Tullagreen/Irland) aufkonzentriert und auf ein 12,5 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel (Bio-Rad/München/Deutschland), zur anschließenden massenspektrometrischen Analyse, aufgetragen.

Tabelle 18: Rezeptur für die Puffer, die bei den jeweiligen Chromatographien eingesetzt wurden. Puffer A wurde zur Resuspension und als Ausgangspuffer für die HIC und AEC verwendet. Für die HIC und AEC wurde Puffer A Ammoniumsulfat bzw. Natriumchlorid als Salz beigemischt. In der Tabelle stehen die beiden Konzentrationen die genutzt wurden, um über das Äkta Start-System einen automatischen Gradienten zu erzeugen.

Puffer A

Komponente	Konzentration
Tris	50 mM
DTT	1 mM
	pH 8,0
Für HIC: (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 M / 0 M
Für AEC: NaCl	0 M / 1 M

Natriumphosphat-Puffer

Komponente	Konzentration
Na ₂ HPO ₄	25 mM / 500 mM
DTT	1 mM
	pH 7,4

3.5 Spektroskopische Methoden

3.5.1 Spektroskopische Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt aufgereinigter Proteinlösungen wurde mit einem NanoDrop BioPhotometer D30 (Nano Drop) von Eppendorf (Hamburg/Deutschland) gemessen. Aus der Absorption bei 280 nm (A) und dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) (berechnet von ProtParam),

konnte, mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes, die Proteinkonzentration (c) berechnet werden

$$A = \varepsilon * c * d$$

3.5.2 UV/VIS-Titration von sHdrA

Die UV/VIS-Absorptionsspektroskopie von sHdrA wurde in einem UV/VIS-Spektrophotometer (Analytik Jena/Jena/Deutschland) bei 20 °C durchgeführt. Die Proteinlösung (50 μ M) wurde in 500 μ L 200 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 6,0 in einer Quartzglasküvette (Hellma Analytics/Müllheim/Deutschland) unter Sauerstoffausschluss angesetzt. Die Küvette wurde mit einem luftdichten Septum verschlossen und Titan(III)-citrat als Reduktionsmittel (Zehnder & Wuhrmann 1976) oder Ferricyanid als Oxidationsmittel, über eine luftdichte Hamilton Spritze, hinzugegeben. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Specord 210 UV/Vis-Spektralphotometer (Analytik Jena/Jena/Deutschland), in 0,2-nm-Schritten mit einer Geschwindigkeit von 2 nm/s. Alle Spektren wurden auf 750 nm normiert.

Ammoniumacetat-Puffer

Komponente	Konzentration
Ammoniumacetat	200 mM pH 6,0

3.5.3 Potentiometrische Redox Titration von sHdrA

Die potentiometrische Redox Titration, zur Bestimmung des Redoxpotentials des FADs von sHdrA, wurde in einem Anaerobenzelt bei 25 °C, mit einer InLab Redox Micro Ag/AgCl Elektrode (Mettler-Toledo/Gießen/Germany), durchgeführt. Die Elektrode wurde vor der Messung gegen eine gesättigte Chinhydrone-Lösung pH 7,0 äquilibriert. Alle Werte wurden ein Mal bestimmt und um das Potenzial der Standardwasserstoff-Elektrode (SHE) korrigiert, indem immer +207 mV auf den gemessenen Wert aufaddiert wurden. Zusätzlich wurden die UV-VIS-Spektren mit einem Agilent Technologies 8453E diode array spectrophotometer (Waldbronn/Deutschland) gemessen, sobald der potentiometrische Messwert stabil war (nach 15-30 min). Alle Spektren wurden von 250-800 nm aufgenommen und auf 750 nm

normiert. Die Proteinlösung (50 μM) wurde in 1,5 mL Ammoniumacetat-Puffer pH 6,0 und mit verschiedenen Redoxmediatoren (jeweils 0,5 μM) angesetzt. Folgende Redoxmediatoren wurden verwendet: Dichloroindophenol (+217 mV), Trimethylhydrochinon (+115 mV), Durochinon (+50 mV), 1,4-Naphtochinon (+60 mV), Indigokarmin (-110 mV), Safranin (-280 mV), Natriumanthrachinon-2-sulfonat (-225 mV), Dinatriumanthrachinon-2,6-disulfonat (-182 mV), Neutralrot (-325 mV), Benzylviologen (-360 mV) und Methylviologen (-446 mV). Die Oxidation der Proteinlösung erfolgte mit 2,6-Dichloroindophenol und die Reduktion mit Natriumdithionit.

3.5.4 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie von sHdrA

Das Redoxpotential des [4Fe-4S]-Clusters von sHdrA wurde durch Elektronenspinresonanz (EPR) ermittelt. Alle Spektren auf dem X-Band wurden mit einem Bruker EMX spectrometer (Billerica/USA) und Verwendung eines EPR-900 X-Band Helium Cryostat von Oxford Instruments (Abingdon-on-Thames/Großbritannien) aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte unter folgenden Parametern: Mikrowellenfrequenz 9,39 GHz, Mikrowellenleistung 2,01 mW, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT, Temperatur 5 K. Die EPR-basierte potentiometrische Redoxtitration wurde bei 25 °C in einem Anaerobenzelt durchgeführt. 110 μM sHdrA und 180 μM derselben Redoxmediatoren wie unter 3.5.3 aufgeführt, wurden in 100 mM MOPS-Puffer pH 7,5 mit 5 mM EDTA verwendet. Die Proben wurden unter Sauerstoffausschluss in EPR-Röhrchen überführt, verschlossen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff gefroren. Das Potential der Lösung wurde ebenfalls mit einer kombinierten Ag/AgCl-Elektrode (ebenfalls kalibriert gegen eine gesättigte Chinhydron-Lösung bei pH 7,0) und der SHE als Referenz gemessen.

MOPS-Puffer für die EPR-Spektroskopie

Komponente	Konzentration
MOPS	100 mM
EDTA	5 mM
	pH 7,5

3.5.5 Determination der Thiosulfatkonzentration von *H. denitrificans*-Kulturen

Die Thiosulfatkonzentration von *H. denitrificans*-Kulturen wurde mittels eines kolorimetrischen Nachweises (Urban 1961) aus zellfreien Kulturüberständen bestimmt. Die entnommenen Proben (100 µL) wurden für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Danach wurde für eine Dreifachbestimmung der zellfreie Überstand auf drei 30 µL Aliquots aufgeteilt. Diese Aliquots wurden mit 100 µL rH₂O und 40 µL Natriumacetat (200 mM, pH 4,8) versetzt. Für die Messung wurden nacheinander 10 µL Natriumcyanid (200 mM) und 10 µL Kupferchlorid (40 mM) dazugegeben. Nach dem Vortexen der Probe wurden 10 µL Eisennitrat (300 g/L Fe(NO₃)₃ × 9 H₂O, 22,1 % HNO₃) hinzugegeben. Direkt nach der Zugabe des Eisennitrats wurde die Probe gevortext und die Absorption bei 460 nm gemessen. Als Leerwert diente ein identisches Gemisch mit 30 µL rH₂O statt zellfreiem Kulturüberstand. Thiosulfat enthaltende Proben (5 – 100 nmol) wurden für die Kalibrierung verwendet.

3.6 Kristallographie von sHdrA

Die Kristallisationsversuche wurden mit der Sitting-drop Methode, bei 18 °C in einem Anaerobenzelt, durchgeführt (Gasphase N₂/H₂ [95 : 5 (v/v)]), das mit einem OryxNano crystallization robot (Douglas Instruments Ltd./Hungerford/Großbritannien) ausgestattet war. JBScreen-Pentaerythritol-Gefäße (Jena Bioscience/Jena/Deutschland) wurden verwendet. Die Kristallstrukturanalyse der braun-gelben Kristalle, die bei 1,4 Å gebeugt wurden, erfolgte im Paul Scherrer Institut an der Strahllinie PXIII (Villigen/Schweiz). Die Aufarbeitung der Rohdaten, die bei 1 Å aufgenommen wurden, erfolgte mit XDS (Kabsch 2010). Die Position der Eisenatome der zwei [4Fe-4S]-Cluster in der asymmetrischen Einheit wurden mit SHELXD (Schneider & Sheldrick 2002) identifiziert und die Phasen durch Nutzung des Programms SHARP (de La Fortelle & Bricogne 1997) bestimmt und anschließend mit SOLOMON (Abrahams & Leslie 1996) verfeinert. Das Strukturmodell wurde automatisch durch ARP/wARP (Langer *et al.* 2008) gebildet und manuell durch COOT (Emsley & Cowtan 2004) vervollständigt. Anschließend wurde das Modell mit REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997), PHENIX.refine (Afonine *et al.* 2010) und BUSTER (Global Phasing, Cambridge/Großbritannien) verfeinert. Die Qualität des Modells wurde mit COOT und MOLPROBITY (Davis *et al.* 2007) überprüft. Strukturvergleichskalkulationen wurden mit DALI

(Holm & Laakso 2016) und Oberflächenberechnungen über den PISA-Server (Krissinel & Henrick 2007) durchgeführt. Die Atomkoordinaten und Strukturaktoren von sHdrA wurden in der Protein Data Bank, www.pdb.org, mit dem ID Code 6TJR hinterlegt.

3.7 Massenspektrometrie

Die Gelstücke wurden einem tryptischen Verdau unterzogen (Rosenfeld *et al.* 1992; Jenö *et al.* 1995). Die Gelstücke wurden nacheinander mit Wasser, 50 % (v/v) Acetonitril (ACN) und 100 % ACN gewaschen. Die Proteine wurden mit 20 mM DTT in 50 mM Ammoniumbicarbonat reduziert und mit 40 mM Acrylamid in 50 mM Ammoniumbicarbonat alkyliert. Anschließend wurden die Gelstücke erneut gewaschen und mit ACN dehydriert. Die Proteolyse wurde mit 330 ng Trypsin (Sequenziergrad, von Promega/Mannheim/Deutschland) bei 37 °C ü.N. durchgeführt. Die erhaltenen Peptidextrakte wurden in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und bei -20 °C gelagert. Die Auswertung der Rohdaten und die Analyse per Datenbank wurden mit der Proteome Discoverer software 2.5.0.400 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Peptididentifikation wurde mit einer internen Mascot-Server Version 2.6.1 (Matrix Science Ltd/London/Großbritannien) von Proteome Discoverer durchgeführt. Die MS2-Daten wurden gegen eine Datenbank gängiger Kontaminanten (cRAP of the Global Proteome Machine) und dem Uniprot Referenzproteom von HYPDA (05/2021, 3452 Sequenzen) abgeglichen. Die Vorläuferionentoleranz betrug 10 ppm, die Fragmentionentoleranz 0,5 Da. Tryptische Peptide mit bis zu zwei fehlenden Spaltungen wurden mit Propionamid als statischer Modifikation von Cysteinen und Oxidation von Methioninen als dynamischer Modifikation gesucht. Die Mascot Ergebnisse wurden dem Percolator Algorithmus (Käll *et al.* 2008) Version 3.05 unterworfen, wie er im Proteome Discoverer 2.5 implementiert ist. Spektren ohne zuverlässige Treffer (q-Wert > 0,01) wurden einer zweiten Mascot Suche mit semispezifischen Enzymsspaltungen und dynamischen Modifikationen von Cysteinen mit Propionamid unterzogen. Häufigkeiten wurden als Summe der XIC Bereiche von proteinspezifischen Peptiden und Peptiden, die zwar nicht für das einzelne Protein spezifisch sind aber zur Quantifizierung des dominanten Proteins beitragen, berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Heterologe Überexpression der sHdr-Untereinheiten aus *H. denitrificans* in *E. coli*

Bisher liegen keine publizierten Daten zu den biochemischen Eigenschaften und Strukturen der sHdr-Untereinheiten vor. Das Vorhandensein von [FeS]-Clustern in den sHdr-Untereinheiten wurde bislang aus der Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine abgeleitet. In methanogenen Archaeen wird mittels des FAD-Cofaktors aus der Untereinheit mHdrA eine Flavin-basierte Elektronenbifurkation durchgeführt (Wagner *et al.* 2017). Das zu mHdrA homologe sHdrA besitzt eine große Sequenzähnlichkeit zur TrxR-Domäne von mHdrA, die neben dem bifurkierenden FAD auch ein [4Fe-4S]-Cluster bindet (Wagner *et al.* 2017). Deshalb bestand an der Untersuchung des potentiell bifurkierenden Proteins sHdrA besonderes Interesse. Um ausreichende Mengen der Proteine für strukturelle und biochemische Untersuchungen darstellen zu können, wurden diese unter Ausschluss von Sauerstoff in *E. coli* produziert. Die Struktur von sHdrA und die Koordination seiner Cofaktoren wurden kristallographisch untersucht. Des Weiteren wurden die Cofaktoren spektroskopisch untersucht, um Aussagen über ihre Redoxzustände und den Elektronenfluss innerhalb der sHdrA-Untereinheit treffen zu können.

4.1.1 Gesamtstruktur von sHdrA aus *H. denitrificans*

sHdrA (Hden_0691) aus *H. denitrificans* wurde nach der von Koch und Dahl publizierten Methode rekombinant in *E. coli* Δ iscR produziert (Koch & Dahl 2018). Auf diese Weise wurden 7 - 8 mg sHdrA pro Liter *E. coli*-Kultur produziert und unter Ausschluss von Sauerstoff kristallisiert. Die Kristallisation des Proteins und die Auswertung der Strukturdaten erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch PD Dr. Ulrich Ermler und Kanwal Kayashta, Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt.

Die Struktur von sHdrA wurde mit einer Auflösung von 1,4 Å durch anomale Dispersion bei einer Wellenlänge zur Phasenbestimmung gelöst (Abbildung 5 A). Das sHdrA Monomer nimmt eine TrxR-Faltung an (Kuriyan *et al.* 1991), die sich aus zwei klassischen Dinukleotidbindedomänen (Rossmann) zusammensetzt, wie sie ursprünglich für die

Gluthationreduktase gefunden wurde (Schulz *et al.* 1978). Die FAD-Bindedomäne (2 - 115, 271 - 341) bindet den Flavin-Cofaktor auf klassische Weise am C-terminalen Ende des zentralen β -Faltblatts. Der Isoalloxazinring liegt zwischen den beiden Dinukleotidbindedomänen gepackt vor. Das [4Fe-4S]-Cluster liegt, zwischen dem C-terminalen Ende des zentralen β -Faltblatts und der N-terminalen Seite der α -Helix 180 : 195 eingebettet, in der [4Fe-4S]-Cluster Bindedomäne (116 - 270) vor. Der Kantenabstand der beiden Redoxzentren beträgt 9,4 Å, was einen physiologisch relevanten Elektronentransfer ermöglicht (Page *et al.* 2003). Das zu sHdrA ähnlichste Protein, dessen Struktur gelöst werden konnte, ist mHdrA (Wagner *et al.* 2017). Dieses bildet die Kernuntereinheit des mHdr-Komplexes und bindet FAD und das [4Fe-4S]-Cluster an den zu sHdrA entsprechenden Stellen (Wagner *et al.* 2017). Die Abweichung des gesamten quadratischen Mittelwerts beider Proteine beträgt 1,5 Å (337 von 653 Aminosäuren, 32 % Sequenzübereinstimmung). sHdrA besitzt zudem eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu (niedermolekularem) TrxR (Abbildung 5 B). Die niedrigsten Abweichungen des quadratischen Mittelwerts von 3,4 Å (287 von 305 Aminosäuren, 23 % Sequenzübereinstimmung) und 3,4 Å (287 von 303 Aminosäuren, 19 % Sequenzübereinstimmung) wurden für TrxR aus *Thermoplasma acidophilum* (3cty) (Hernandez *et al.* 2008) beziehungsweise aus *Lactococcus lactis* (5mh4) (Skjoldager *et al.* 2017) bestimmt. TrxR bindet NADP anstelle eines [4Fe-4S]-Clusters, mit Ausnahme des Enzyms aus *Thermoplasma acidophilum*, dessen Elektronendonator unbekannt ist (Hernandez *et al.* 2008). Zwei verschiedene strukturelle Formen von TrxR werden unterschieden, die sich anhand der Orientierung der FAD- und NADPH-Domäne unterscheiden. Im ersten Konformationszustand ist das Hydrochinon (FADH⁻) durch den Hydridtransfer zu einem benachbarten Disulfid oxidiert, während im zweiten Konformationszustand das FAD durch NADPH reduziert vorliegt (Kuriyan *et al.* 1991; Lennon *et al.* 2000). sHdrA aus *H. denitrificans* liegt im zweiten Konformationszustand vor. Genauso wie mHdrA liegt sHdrA als Homodimer vor, mit einer Interphase von 2470 Å² zwischen den FAD-Domänen und [4Fe-4S]-Clustern. In sHdrA liegen die Kantenabstände für die zwei Isoalloxazinringe, die zwei [4Fe-4S]-Cluster und für das FAD und das [Fe-4S]-Cluster der gegenüberliegenden Untereinheit bei respektive 18,8 Å, 11,5 Å und 17,8 Å. TrxR oligomerisiert ebenfalls als Homodimer, wobei es in einer anderen Orientierung als sHdrA vorliegt, da die zweifache Drehspiegelachse um 90 ° verdreht vorliegt. Zudem ist die

Interphase in TrxR mit 1640 \AA^2 kleiner und wird dort maßgeblich durch die FAD-Bindedomänen gebildet.

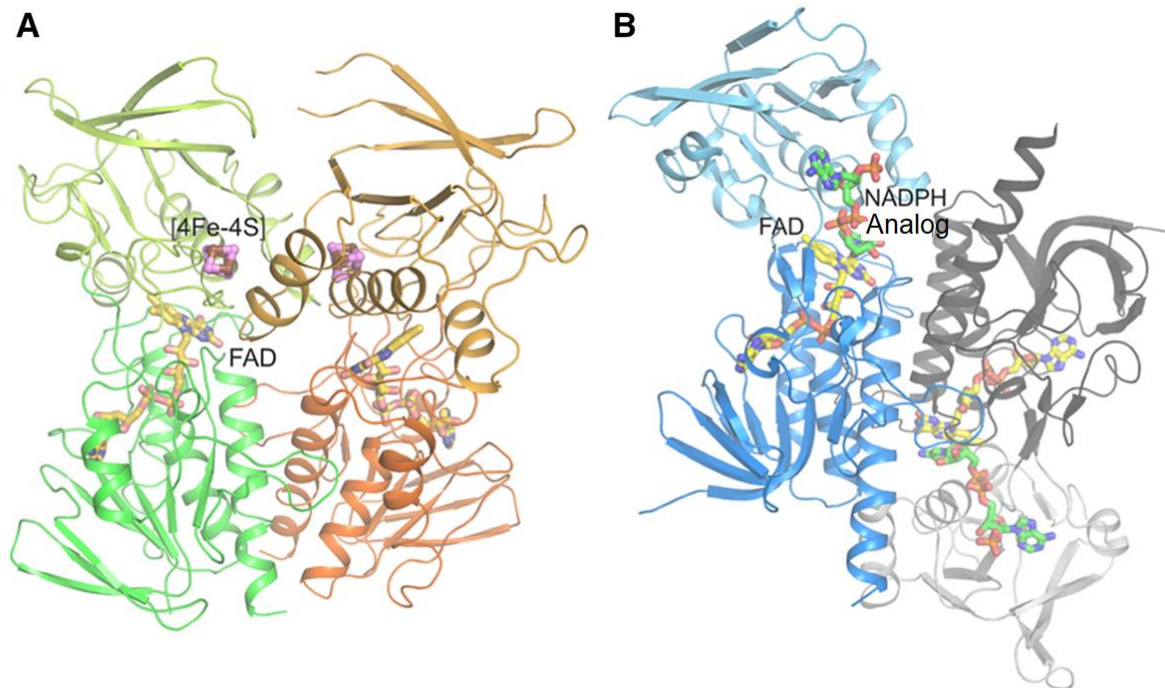


Abbildung 5: Kristallstruktur von sHdrA aus *H. denitrificans*. (A) sHdrA Dimer und (B) TrxR Dimer. Sowohl die FAD-Bindedomäne (grün bzw. orange in sHdrA und blau bzw. grau in TrxR) als auch die [4Fe-4S]-Cluster Domäne (zitronenfarben und hellorange in sHdrA und hellblau und hellgrau die äquivalenten NADPH-Domänen in TrxR) sind aus parallelen sechssträngigen β -Faltblättern aufgebaut, die jeweils von drei α -Helices und dreisträngigen β -Mäandern flankiert sind. Der Kantenabstand zwischen der Benzylmethylgruppe des FADs und Fe1 des [4Fe-4S]-Clusters beträgt im Falle von sHdrA $9,4 \text{ \AA}$. Die Anordnung der Domänen und damit auch die Interphase der Domänen, unterscheidet sich zwischen sHdrA und TrxR. Die Strukturen wurden mit dem Programm PYMOL generiert. (Abbildung modifiziert nach Ernst *et al.* 2021).

4.1.2 Die Koordination des FAD-Cofaktors in sHdrA aus *H. denitrificans*

Obwohl alle Vertreter der TrxR-Familie die gleiche grundlegende Architektur der FAD-Bindedomäne gemeinsam haben (Kuriyan *et al.* 1991), unterscheidet sich die Konformation der Polypeptidsegmente und der relevanten Aminosäuren, die den Isoalloxazinring koordinieren, grundsätzlich in HdrA-Proteinen. Am bemerkenswertesten ist ein verlängertes Segment, das auf Strang 26 : 33 und Segment 131 - 141 folgt und die FAD- und die [4Fe-4S]-Cluster Domäne verbindet. Der Isoalloxazinring ist sowohl in mHdrA als auch in sHdrA tief im Polypeptidrückgrat positioniert. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur NADP-bindenden Konformation von TrxR, in der der Isoalloxazinring von beiden Seiten

zugänglich ist. In sHdrA verursachen die hydrophoben Aminosäuren Valin 183, Isoleucin 179, Isoleucin 322, Tyrosin 45, Leucin 48 und Valin 49 eine leicht gebogene Konformation des Isoalloxazinringes (Abbildung 6 A). Diese Schmetterlingskonformation findet sich nicht in mHdrA.

Zwischen sHdrA und mHdrA ist der eher hydrophobe Charakter der Isoalloxazinbindestelle konserviert, die individuellen Aminosäuren dagegen nicht. In sHdrA kommt es zu polaren Interaktionen zwischen dem Isoalloxazinring und dem Proteinrückgrat. Das Stickstoffatom N5 des Isoalloxazinrings bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül, das wiederum über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lysin 47-O und Glutamat 137-OE1 sowie über ein weiteres Wassermolekül mit Glutamat 190-OE2 verbunden ist (Abbildung 6 B).

In mHdrA ist der Isoalloxazinring dagegen über N5 und O4 über Wasserstoffbrückenbindungen mit Lysin 409-NZ verbunden, das durch Glutamat 356-OE2 in seiner Position verankert ist (Abbildung 6 C). Für TrxR-Proteine sind, anstelle von direkten N5-Polypeptid Wechselwirkungen, variable über Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen zu nicht konservierten polaren Aminosäuren beschrieben (Abbildung 6 D). Die für Vertreter der TrxR-Proteine unveränderlichen Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen O2 und Isoleucin 322-NH, das am N-terminalen Ende von Helix 322 : 340 positioniert ist, und zwischen den N3-C4=O4 Gruppen und den Stickstoff sowie Carbonylgruppen der Hauptkettenpeptide oder Asparaginseitenketten gebildet.

Ein bemerkenswerter Unterschied in der Koordination des FADs zwischen sHdrA und mHdrA, liegt in der Wasserstoffbrückenbindung zwischen O2 und Aspartat 323 in sHdrA und O2 und Lysin 524` in mHdrA (Abbildung 6 B, C). Die Aminosäure Lysin 524` stammt vom gegenüberliegenden mHdrA Monomer (mit einem Apostroph gekennzeichnet), was durch eine andere Konformation von mHdrA im Vergleich zu sHdrA ermöglicht wird.

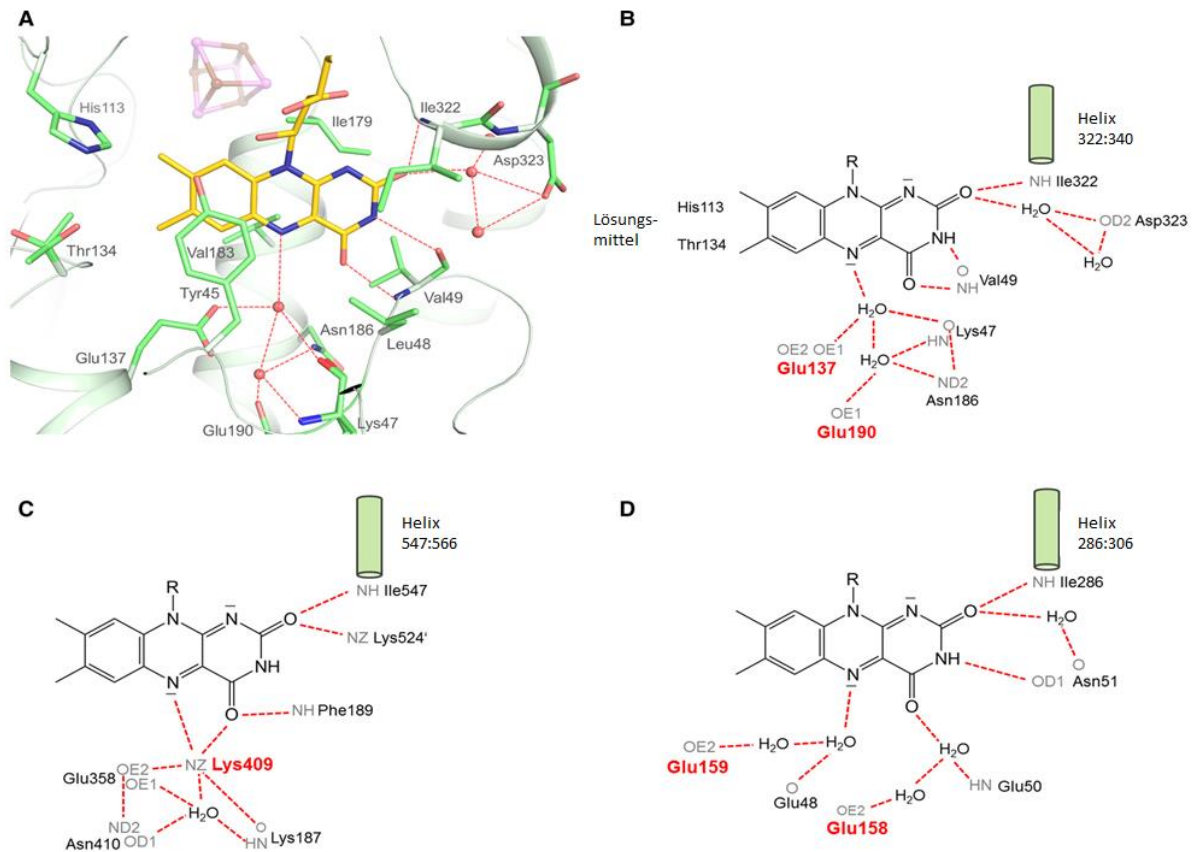


Abbildung 6: Vergleich der FAD-Bindestellen von sHdrA, mHdrA und TrxR. (A) Kristallstruktur und (B) schematische Darstellung der FAD-Bindestelle von sHdrA. (C) Schema der Umgebung des Isoalloxazinrings in mHdrA und (D) in TrxR von *Lactococcus lactis*. Der Isoalloxazinring (Kohlenstoff in gelb) von sHdrA und mHdrA ist im Vergleich zu TrxR eingekapselt. Der Isoalloxazinring wird in den Hdr-Proteinen durch ein Segment der [4Fe-4S]-Cluster Bindedomäne, die kurze domänenverbindende Helix 133 : 142 und das gegenüberliegende HdrA Monomer aus dem Dimer umschlossen. Wasserstoffbrückenbindungen sind als rote, gestrichelte Linien dargestellt. N5 ist sowohl in sHdrA als auch in TrxR in räumlicher Nähe von Wasserstoffdonatoren, was vorzugsweise FADH⁻ und FADH[•] stabilisiert. Im Gegensatz dazu ist N5 in mHdrA über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lysin 409 verbunden, wodurch oxidiertes FAD stabilisiert wird. Die Kristallstruktur wurde mit PYMOL generiert. (Abbildung modifiziert nach Ernst *et al.* 2021).

4.1.3 Koordination des [4Fe-4S]-Clusters in sHdrA aus *H. denitrificans*

Im Gegensatz zur Koordination des FADs, ist die Koordination des [4Fe-4S]-Clusters zwischen sHdrA und mHdrA hoch konserviert und wird über ein vier Cystein-Motiv vermittelt (Abbildung 7 A). Die vier Eisenatome eines Clusters je Monomer werden über die Aminosäuren Cystein 163, Cystein 176, Cystein 180 und Cystein 181 (Positionen in sHdrA) koordiniert und alle Schwefelatome des Clusters interagieren mit mindestens einem Protonendonator. Die positiv geladene [4Fe-4S]-Cluster Bindetasche wird durch die

Aminosäuren Arginin 167, Arginin 208 und die partiell positiv geladenen N-terminalen Enden der Helices 180 : 195 und 212' : 225' gebildet (Abbildung 7 B).

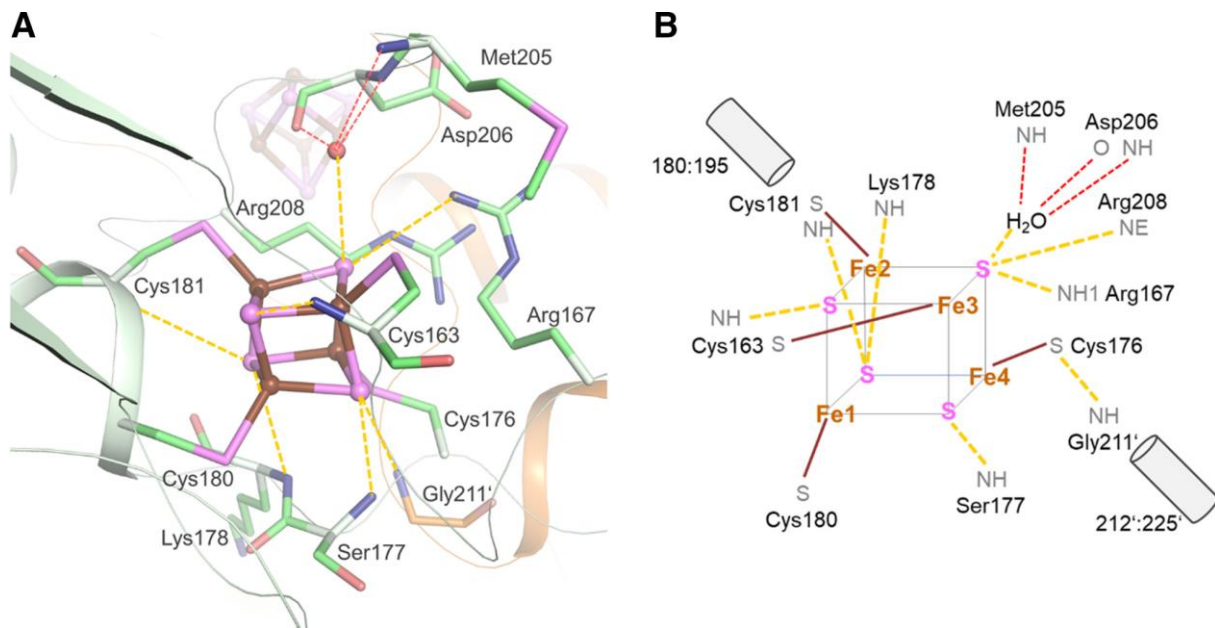


Abbildung 7: [4Fe-4S]-Cluster Bindestelle in sHdrA. (A) Kristallstruktur und (B) schematische Darstellung der Interaktionen des [4Fe-4S]-Clusters mit dem Peptidrückgrat. Das [4Fe-4S]-Cluster (Eisenatome in braun und Schwefelatome in magenta) in sHdrA besetzt die gleiche Position wie NADPH in TrxR. Die Schleife zwischen Strang 199 : 204 und Helix 212' : 225' beider Domänen (grün und orange) umschließt das [4Fe-4S]-Cluster. Das [4Fe-4S]-Cluster besitzt eine räumliche Nähe zu Wasserstoffbrücken bildenden Seitenresten und positiv geladenen Aminosäuren. Diese Wechselwirkungen sind als goldene, gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die Kristallstruktur wurde mit PYMOL generiert. (Abbildung entnommen aus Ernst *et al.* 2021).

4.1.4 UV/VIS-Spektroskopie des FADs aus sHdrA

Das Protein sHdrA aus *H. denitrificans* besitzt wie mHdrA ein FAD als Cofaktor. Das FAD aus mHdrA ist entscheidend für den Mechanismus der FBEB (Wagner *et al.* 2017). Eine ähnliche Funktion des FAD-Cofaktors in zu mHdrA homologen Proteinen wurde vermutet (Buckel & Thauer 2013). Für eine FBEB ist ein hochenergetisches FAD-Semichinon notwendig, das aufgrund seiner Kurzlebigkeit nicht per UV/VIS-Spektroskopie detektierbar ist (Nitschke & Russell 2012). sHdrA wurde schrittweise oxidiert bzw. reduziert, um anhand der dabei auftretenden Absorptionen Aussagen über die FAD-Population innerhalb des Proteins treffen zu können.

Im UV/VIS-Spektrum dominierte die Absorption des FADs, was für ein Protein mit einem FAD und einem [4Fe-4S]-Cluster zu erwarten ist. Ein Absorptionsmaximum bei 456 nm und eine breite Absorptionsbande zwischen 590 – 650 nm, die im Absorptionsspektrum von sHdrA aus *H. denitrificans* beobachtet wurden, sind ein charakteristisches Merkmal für ein stabiles Semichinon (Massey & Palmer 1966; Liu *et al.* 2010; Evans *et al.* 2013). Der weitere Beweis für die Existenz eines stabilen Semichinons in sHdrA wurde durch die Oxidation bzw. Reduktion des Proteins erbracht (Abbildung 8). Das zuvor reduzierte Protein (50 μ M) wurde zuerst schrittweise mit Ferricyanid (O'Reilly 1973) oxidiert. Das im vollständig reduzierten Zustand vorliegende sHdrA zeigte eine nur geringe Absorption bei 610 nm (Abbildung 8 A, dunkelblaues Spektrum). Die Absorption bei 610 nm stieg kontinuierlich mit der Zugabe des Oxidationsmittels (Abbildung 8 A, blaue bis grüne Spektren) bis es ein Maximum nach Zugabe von 50 μ M Ferricyanid erreichte, was einer Äquimolarität des Oxidationsmittels und des FADs entspricht. Das bedeutet, die gesamte FAD-Population hatte ein Elektron aufgenommen und lag als neutral protoniertes Semichinon (FADH \bullet) vor. Bei weiterer Oxidation nahm die Absorption bei 610 nm wieder ab (Abbildung 8 A, rote bis violette Spektren) und blieb bei 80 – 120 μ M Ferricyanid bei einem konstant niedrigen Wert von 0,08. Die Absorption bei 456 nm stieg dagegen kontinuierlich während der Oxidation des Proteins und erreichte ihr Maximum bei einer Zugabe von 120 μ M Ferricyanid.

Das gleiche Bild zeichnete sich ab, wenn zuvor vollständig oxidiertes sHdrA mit Titan(III)-citrat reduziert wurde (Abbildung 8 B). Das vollständig oxidierte Protein wies ein Maximum bei 456 nm auf, das durch die schrittweise Reduktion abnahm, während die niedrige Absorption bei 610 nm für das oxidierte Protein durch Reduktion zunahm und bei äquimolarer Menge des Reduktionsmittels sein Maximum erreichte. Die weitere Reduktion des Proteins führte zur Abnahme des Absorptionwertes bei 610 nm.

Die UV/VIS-spektroskopische Untersuchung des sHdrA-Proteins aus *H. denitrificans* zeigte somit die Ausbildung eines stabilen Semichinons für den FAD-Cofaktor.

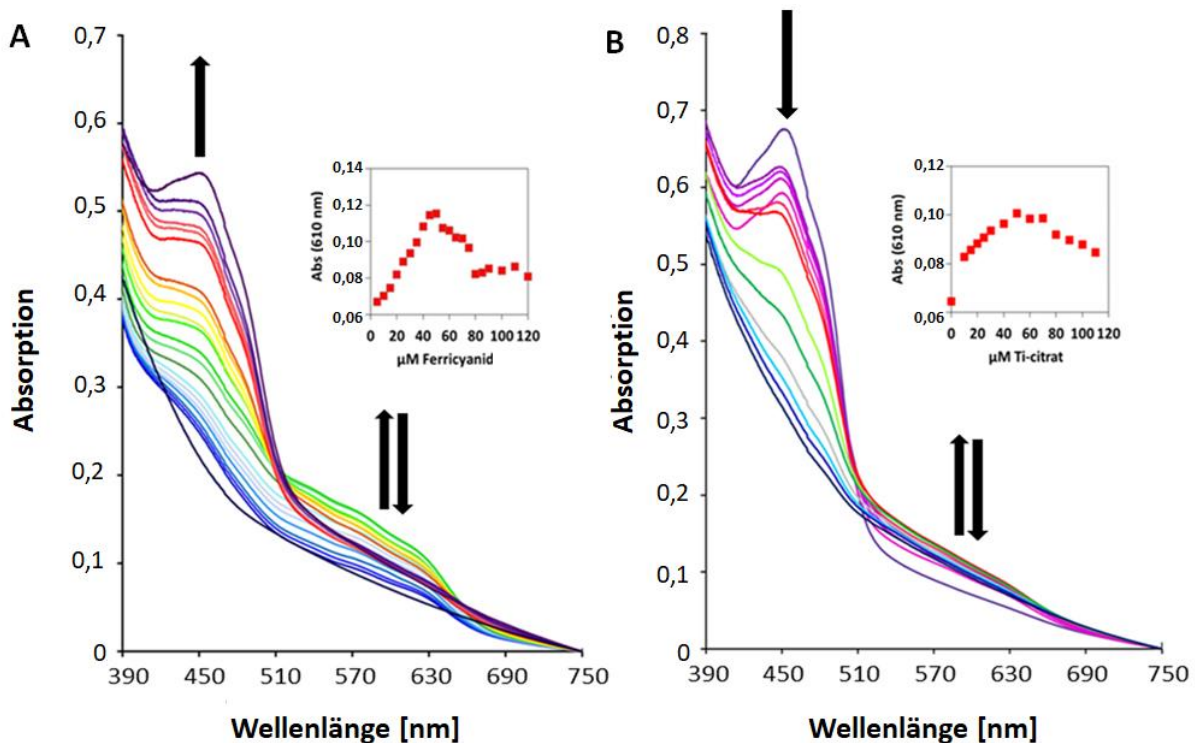


Abbildung 8: UV/VIS-spektroskopische Charakterisierung von sHdrA. (A) Oxidation von komplett reduziertem sHdrA (50 µM) in 5 µM-Schritten durch Zugabe von Ferricyanid als Oxidationsmittel. (B) Reduktion von vollständig oxidiertem sHdrA (50 µM) durch Zugabe von Titan(III)-citrat in 5 µM-Schritten. Die Bildung eines stabilen Semichinons ist als breite Absorptionsbande zwischen 510 - 650 nm zu beobachten und zeigte bei 610 nm die höchste Absorption (grüne Kurven, A+B). Bei Oxidation (violette Kurven, A+B) oder Reduktion (blaue Kurven, A+B) des FADs, sank die Absorption bei 610 nm. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Absorptionsänderung bei 456 nm bzw. 610 nm durch Zugabe des Oxidationsmittels (A) oder des Reduktionsmittels (B) an. Zudem ist die Auftragung der Absorption bei 610 nm gegen die Menge an Oxidations- bzw. Reduktionsmittel gezeigt, um die Menge der Semichinonpopulation darzustellen. (Abbildung modifiziert nach Ernst *et al.* 2021).

4.1.5 Potentiometrische Bestimmung des Redoxpotentials von FAD

Flavin-Cofaktoren decken einen großen Bereich an Redoxpotentialen ab, weshalb das Redoxpotential eines FADs nicht aus der Primärsequenz des Proteins abgeleitet werden kann (Palfey & Massey 1998). Bei der potentiometrischen Redox Titration wird neben der Aufnahme der UV/VIS-Spektren gleichzeitig mit einer Elektrode die Spannung ermittelt. Durch Auftragung der charakteristischen Absorptionen des FADs gegen die gemessene Spannung, kann das Redoxpotential des Cofaktors ermittelt werden.

Isoliertes sHdrA (50 µM) wurde schrittweise mit Natriumdithionit reduziert, um das Potential des Redoxpaares Hydrochinon/Semichinon zu bestimmen (reduktive Hälfte). Das

Redoxpotential dieses Reduktionsmittels liegt unter -550 mV (Mayhew 1978), was eine vollständige Reduktion des FAD-Cofaktors des sHdrA aus *H. denitrificans* erlaubte. In einer separaten Messung wurde dieselbe Menge an isoliertem Protein durch ständige Zugabe des Oxidationsmittels 2,6-Dichloroindophenol, das bei pH 6,0 ein Redoxpotential von +330 mV besitzt (Gavrilenko *et al.* 2010), oxidiert, um das Redoxpotential des Redoxpaares Semichinon/Chinon zu ermitteln (oxidative Hälfte). Durch Aufnahme von UV/VIS-Spektren während der einzelnen Messpunkte und Ermitteln der Absorptionswerte bei 456 nm und 610 nm, konnte das exakte Verhältnis von reduzierten zu oxidierten FAD-Spezies ermittelt werden. Die Absorption bei den zuvor genannten Wellenlängen wurde gegen die jeweils gemessene Spannung aufgetragen und mit Hilfe der Nernst-Gleichung ausgewertet (Abbildung 9 A).

$$E = E^0 + 2,303 \left(\frac{RT}{nF} \right) \cdot \log_{10} \left(\frac{c_{Ox}}{c_{Red}} \right)$$

Der Wert für E ist das gemessene Potential und durch Auftragung dieses Wertes gegen den Logarithmus des Verhältnisses der Konzentration von oxidiertes (c_{Ox}) zu reduzierter (c_{Red}) FAD-Spezies, können die Daten statistisch anhand einer linearen Funktion ausgewertet werden. Aus diesen Auftragungen kann der Wert für E^0 bei $c_{Ox} = c_{Red}$ entnommen werden. Die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Elektronen (n) wird durch das Teilen der Steigung durch die Zahl 59 erhalten.

Ein stabiles Semichinon zeichnet sich in einer Titrationskurve bei 456 nm durch Ausbilden eines Plateaus aus, während es in einer Titrationskurve bei 610 nm das Maximum einer Gaußfunktion darstellt.

Ein stabiles Semichinon zeigte sich in der Titrationskurve bei 456 nm durch Ausbilden eines stabilen Plateaus im Bereich zwischen -104 mV bis -70 mV (Abbildung 9 A). Das Redoxpotential für die reduktive Messung bei 456 nm lag bei $E = -168 \pm 5$ mV und zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit einer Anpassung durch die Nernst-Gleichung ($R^2 = 0,95$) für einen Ein-Elektronen-Übergang ($n = 0,97 \pm 0,07$). Wenn in der Kalkulation der Wert für $n = 1$ festgesetzt wurde, betrug das Redoxpotential $E = -169 \pm 5$ mV ($R^2 = 0,95$) (Abbildung 9 B). Für die reduktive Titration bei 610 nm, wurde ein Redoxpotential von $E = -160 \pm 4$ mV ermittelt und wies ebenfalls eine sehr gute Anpassung mit der Nernst-Gleichung ($R^2 = 0,97$) für einen Ein-Elektronen-Prozess auf ($n = 0,99 \pm 0,06$). In diesem Falle änderte sich das Redoxpotential

durch Festsetzen der Anpassung auf ein Elektron ($n = 1$) nicht und die Anpassung war weiterhin sehr gut ($R^2 = 0,97$) (Abbildung 9 C).

Weniger eindeutig verhielt es sich mit den erhaltenen Werten bei 456 nm und 610 nm für die oxidative Titration. Die für das Semichinon/Chinon Redoxpaar bei 456 nm erhaltenen Datenpunkte ließen sich nicht mit der Nernst-Gleichung für einen 1-Elektronen-Prozess anpassen (Abbildung 9 D). Eine Anpassung für einen 2-Elektronen-Übergang ($n = 2$), resultierte in einem Redoxpotential von -23 ± 4 mV, mit einer schlechteren Anpassung ($R^2 = 0,86$) als für die zuvor beschriebenen reduktiven Titrations. Die beste Übereinstimmung ($R^2 = 0,88$) wurde für eine Anpassung mit mehr als zwei Elektronen ($n = 2,25 \pm 0,30$) verzeichnet.

Für die oxidative Titration bei 610 nm war die Anpassung der Datenpunkte mit der Nernst-Gleichung vergleichsweise schlecht und ergab den höchsten Wert ($R^2 = 0,44$) für eine Reaktion mit mehr als einem involvierten Elektron ($n = 1,58 \pm 0,70$) und einem daraus resultierenden Redoxpotential von $E = -59 \pm 10$ mV (Abbildung 9 E). Da nur eine ganzzahlige Anzahl an Elektronen einen Sinn ergibt, wurden zudem Anpassungen mit einem und zwei Elektronen simuliert. Bei einer festgelegten Anzahl von einem Elektron ($n = 1$), resultierte aus der Anpassung ($R^2 = 0,29$) ein Redoxpotential von $E = -70 \pm 11$ mV. Für eine Anpassung ($R^2 = 0,41$) mit zwei Elektronen ($n = 2$) ergab sich ein Redoxpotential von $E = -54 \pm 10$ mV.

Die Redox Titration von sHdrA aus *H. denitrificans* ergab ein Redoxpotential zwischen -174 mV und -156 mV für das Redoxpaar Hydrochinon/Semichinon für einen Ein-Elektronen-Prozess. Das Redoxpotential für das Redoxpaar Semichinon/Chinon lag zwischen -81 mV und -19 mV, zeigte aber eine schlechte Anpassung für eine Ein-Elektronen-Reaktion.

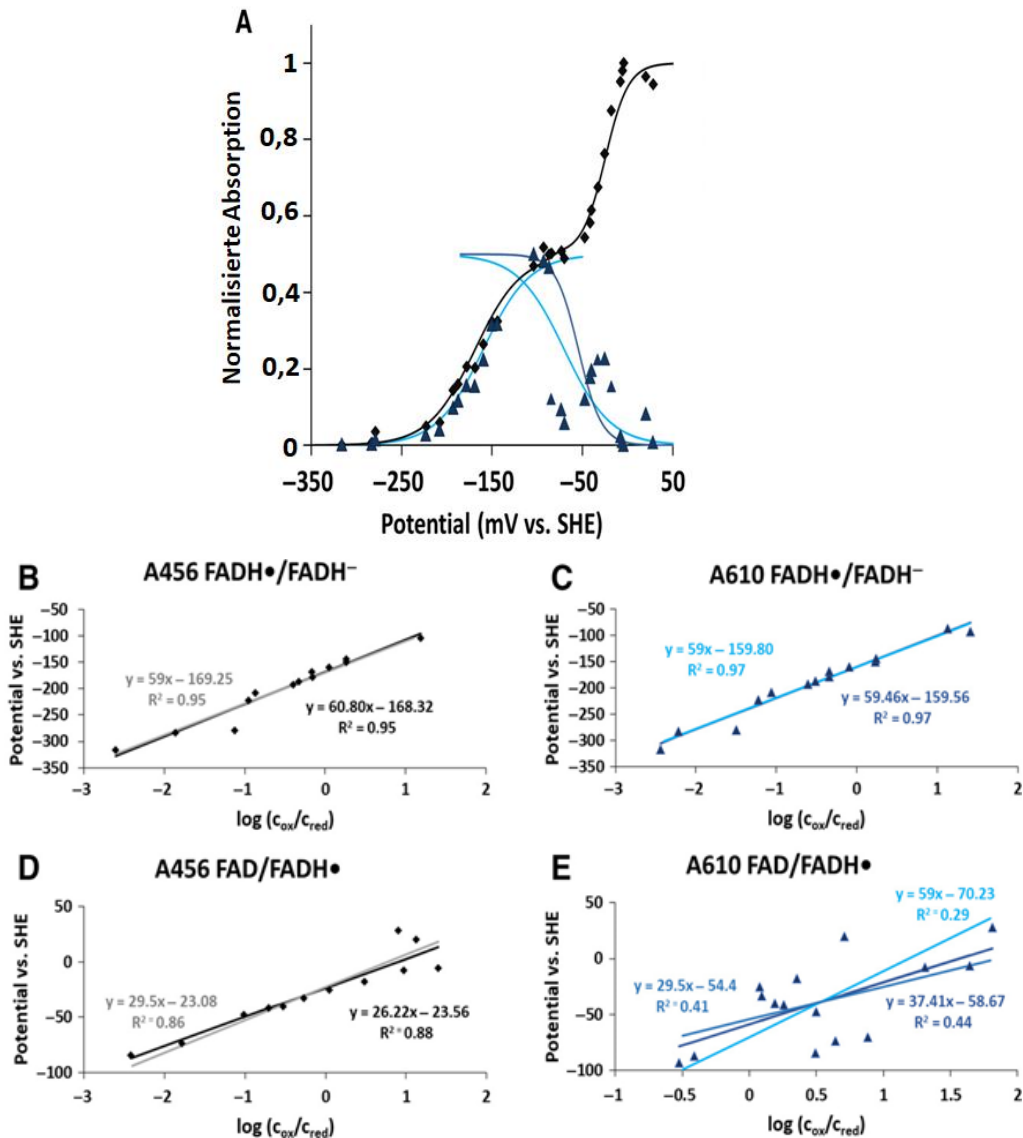


Abbildung 9: Potentiometrische Redox Titration von sHdrA aus *H. denitrificans*. (A) Auftragung der normalisierten Absorption bei 456 nm (schwarze Rauten) bzw. bei 610 nm (blaue Dreiecke) gegen das gemessene Potential von sHdrA. Die Symbole repräsentieren die gemessenen Daten und die durchgezogenen Linien die Anpassungen mittels der Nernst-Gleichung (schwarze Linie für 456 nm und dunkelblaue sowie türkise Linie für 610 nm). Die schwarze Linie (von -350 bis -104 mV) entspricht einem Ein-Elektronen-Übergang für das Redoxpaar Hydrochinon/Semichinon für ein Redoxpotential von -169 mV und einem Zwei-Elektronen-Übergang für das Redoxpaar Semichinon/Chinon (von -104 mV bis +28 mV) mit einem Redoxpotential von -23 mV. Die türkise Linie entspricht einem Ein-Elektronen-Übergang für das Redoxpaar Hydrochinon/Semichinon mit einem Redoxpotential von -160 mV und einem Ein-Elektronen-Übergang für das Redoxpaar Semichinon/Chinon mit einem Redoxpotential von -70 mV. Die dunkelblaue Linie entspricht einem Zwei-Elektronen-Übergang für das Redoxpaar Semichinon/Chinon mit einem Redoxpotential von -54 mV. (B-E) Linearisierte Nernst-Anpassungen, die durch Auftragung der gemessenen Potentiale gegen den Logarithmus des Konzentrationsverhältnisses von oxidiertem (c_{ox}) zu reduziertem (c_{red}) Spezies (c_{red} : schwarze und dunkelblaue Linien für 456 bzw. 610 nm) erhalten wurden. Die Gleichungen der Regressionsgeraden sind in der entsprechenden Farbe in (B-E) angegeben. Aus der Steigung der Gleichungen lässt sich die Anzahl der an der Reaktion beteiligten Elektronen (n) ableiten. (Abbildung modifiziert nach Ernst *et al.* 2021).

4.1.6 EPR-Titration des [4Fe-4S]-Clusters von sHdrA aus *H. denitrificans*

Die Charakterisierung der Redoxeigenschaften des [4Fe-4S]-Clusters von sHdrA erfolgte, unter Ausschluss von Sauerstoff, durch eine Redoxtitration des Proteins mit Natriumdithionit und einer zusätzlichen Elektronenspinresonanzmessung (EPR). Das Signal des Flavinradikals wurde durch die verwendeten Redoxmediatoren maskiert und ausschließlich das [4Fe-4S]-Cluster gemessen. Die Messung und Auswertung der EPR-Daten erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch Dr. Inês Pereira und Dr. Sofia Venceslau vom ITQB der Universidade Nova de Lisboa in Oeiras (Portugal).

Das sHdrA Protein (50 μM) zeigte im isolierten Zustand ein Signal von $g = 2,002$ im EPR-Spektrum (Abbildung 10 A), das ein typisches Signal für FAD darstellt (Schleicher & Weber 2012). Im EPR-Spektrum des vollständig reduzierten sHdrA zeigte sich ein rhombisches Signal mit den Werten $g_{\text{max}} = 2,053$; $g_{\text{med}} = 1,961$ und $g_{\text{min}} = 1,926$ (Abbildung 10 B).

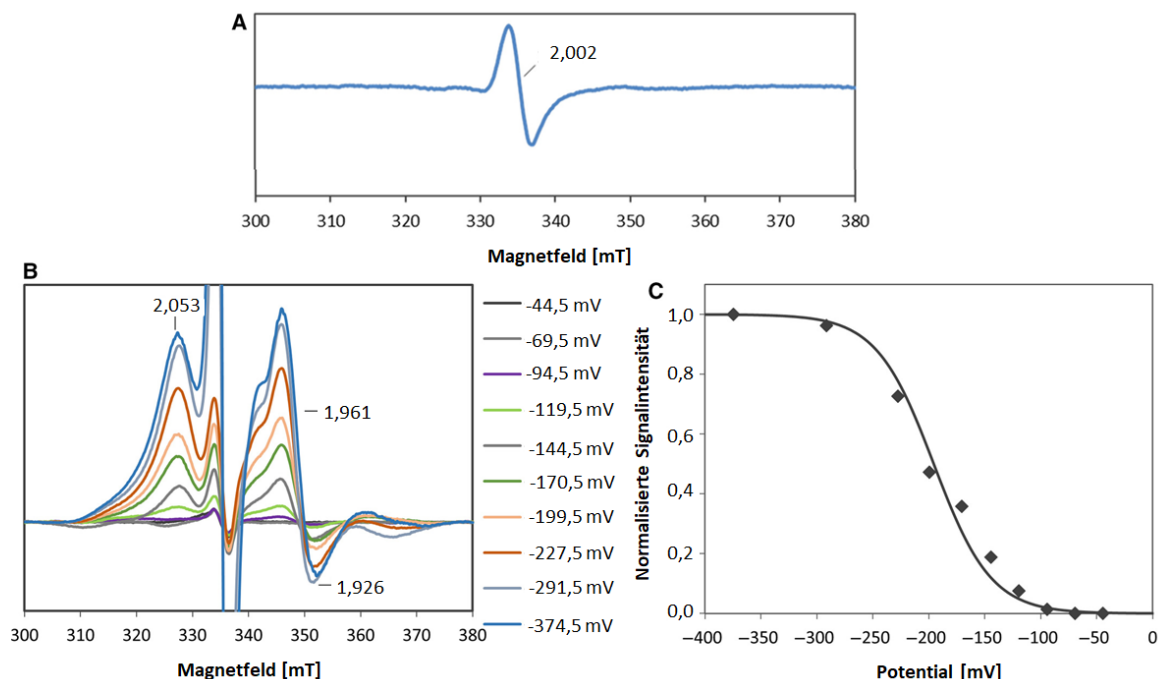


Abbildung 10: EPR-Titration von sHdrA aus *H. denitrificans*. (A) EPR-Spektrum von 180 μM unbehandeltem sHdrA. (B) Aufgenommene EPR-Spektren während der Redoxtitration. (C) Auftragung der gemessenen Potentiale (schwarze Rauten) gegen die normalisierte Signalintensität des g_{max} -Signals bei 2,053. Die Nernst-Anpassung in (C) zeigte die besten Werte unter Annahme einer Ein-Elektronen-Reduktion des [4Fe-4S]-Clusters mit einem Redoxpotential von -197 mV. (Abbildung modifiziert nach Ernst *et al.* 2021).

Diese Werte sind charakteristisch für ein einzelnes [4Fe-4S]-Cluster, was mit der Kristallstruktur und dem konservierten vier Cystein-Motiv der Primärsequenz übereinstimmt. Das Redoxpotential des Clusters wurde durch Auftragung der Signalintensität von g_{\max} bzw. g_{med} während der Titration ermittelt (Abbildung 10 C). Im Falle von g_{\max} wurde ein Redoxpotential von $E = -197 \text{ mV}$ ermittelt und für g_{med} ein nahezu identisches Redoxpotential von $E = -192 \text{ mV}$ (Daten nicht gezeigt). Diese Werte wurden zur Kurvenanpassung mittels der Nernst-Gleichung verwendet und zeigten beide eine sehr hohe Übereinstimmung ($n = 0,96 \pm 0,09$; $R^2 = 0,96$ für g_{\max} und $n = 0,92 \pm 0,07$; $R^2 = 0,98$ für g_{med}) für einen Ein-Elektronen-Prozess.

4.1.7 Erstellung von Expressionsplasmiden

Die Gene die für die sHdr-Untereinheiten C1 (Hden_0689), B1 (Hden_0690), C2 (Hden_0693) und B2 (Hden_0694) kodieren, bilden die Kerneinheit des *shdr* Operons in *H. denitrificans*. Die Gene wurden mit geeigneten Oligonukleotiden (Tabelle 8) via PCR über die genomische DNA von *H. denitrificans* amplifiziert. Alle Gene wurden in das pET22b(+)-System kloniert (Abbildung 11). Diese Vektoren haben einen pBR322 Ursprung und sind in *E. coli* replikativ. Desweiteren besitzen pET22b(+)-Vektoren eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker und exprimieren das Protein von Interesse unter der Kontrolle des mit IPTG induzierbaren T7-Promotors. In einer vorherigen Arbeit wurde sHdrB2 (Hden_0694) mit einem C-terminalen Strep-tag versehen, der über den Rückwärtsprimer der PCR kodiert wurde und anschließend das amplifizierte PCR-Produkt mit *NdeI* und *EcoRI* in die Multiple Cloning Site von pET22b(+) eingebracht (Abbildung 11 D). Im Falle von sHdrB1 (Hden_0690) und sHdrC2 (Hden_0693) wurde der Strep-tag zuerst separat in einer PCR amplifiziert und mit *NdeI* und *XhoI* in den pET22b(+)-Vektor eingebracht, um pET22b(+)-Strep zu erhalten. In pET22b(+)-Strep wurden die amplifizierten Gene *shdrB1* und *shdrC2* jeweils mit *NdeI* und *NotI* in das Vektorrückgrat eingefügt (Abbildung 11 B, C). Das Gen *shdrC1* (Hden_0689) wurde mit *NdeI* und *BamHI* in ein Plasmid eingefügt, in das zuvor ein Twin-Strep-tag mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* in das pET22b(+)-Rückgrat kloniert worden war (Abbildung 11 A). Das Plasmid pET22b(+)-TwinStrep konnte nicht für die anderen *shdr* Gene genutzt werden, weil für die Klonierung *BamHI* benötigt wird, das in allen zuvor erwähnten *shdr* Genen

schneidet. Die in Abbildung 11 dargestellten Plasmide wurden für die Expression in *E. coli* verwendet.

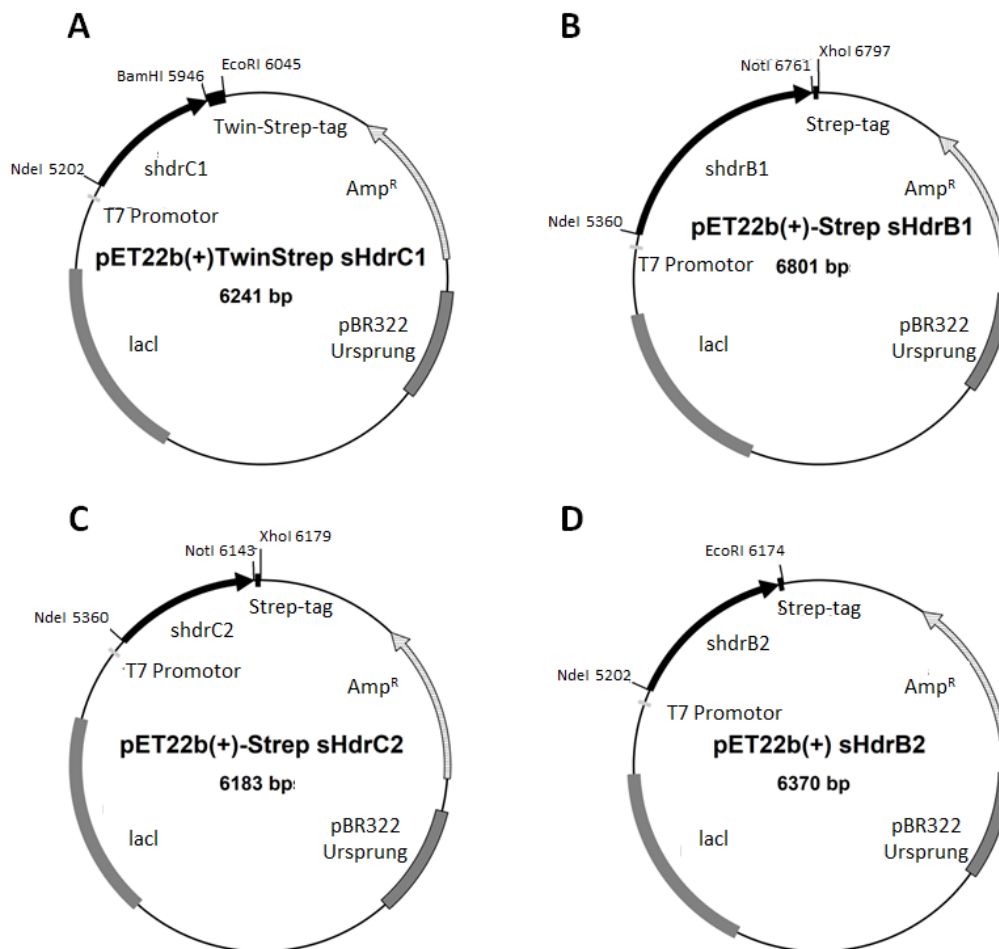


Abbildung 11: Plasmide zur rekombinanten Produktion von sHdr-Untereinheiten aus *H. denitrificans*. (A) pET22b(+)-TwinStrep sHdrC1 enthält das Gen *shdrC1* (Hden_0689) und kodiert für einen C-terminalen Twin-Strep-tag. (B) pET22b(+)-Strep sHdrB1 kodiert für sHdrB1 (Hden_0690) und einen C-terminalen Strep-tag. (C) pET22b(+)-Strep sHdrC2 kodiert für sHdrC2 (Hden_0693) und einen C-terminalen Strep-tag. (D) pET22b(+)-sHdrB2 kodiert für sHdrB2 (Hden_0694) und einen C-terminalen Strep-tag. Für alle Plasmide steht die Genexpression unter der Kontrolle des T7-Promotors (hellgrau). Die Plasmidkarten zeigen zudem die jeweiligen *shdr* Gene (schwarze Pfeile), die C-terminalen tags (schwarze Rechtecke), die Ampicillin-Resistenz (grauer Pfeil), den pBR322 Ursprung (dunkelgraue Rechtecke), *lacI* (graue Rechtecke) und die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme sowie ihre Position im Plasmid.

4.1.8 Proteinproduktion

Die Proteine sHdrC1, sHdrB1, sHdrC2 und sHdrB2 besitzen Sequenzmotive, die die Koordination von [FeS]-Clustern als Cofaktoren nahelegen (Koch & Dahl 2018). Die

Untereinheiten sHdrC1 und sHdrC2 besitzen jeweils eine N-terminale Ferredoxin-Domäne inklusive zweier Motive, die potentiell [4Fe-4S]-Cluster binden. Das Protein sHdrB2 besitzt zwei konservierte CCG-Motive ($CX_nCCGX_mCX_2C$) (Koch & Dahl 2018). Das Homolog mHdrB aus methanogenen Archaeen, koordiniert in der Kristallstruktur zwei ungewöhnliche [4Fe-4S]³⁺-Cluster über die fünf Cysteine der jeweiligen CCG-Domäne (Wagner *et al.* 2017). Im Protein sHdrB1 findet sich ein konserviertes C-X₂-C-X₁-C-X_m-C-Motiv in der N-terminalen Domäne sowie weitere konservierte Cysteine in der C-terminalen Domäne, die ebenfalls eine [FeS]-Cluster Koordination ermöglichen könnten (Koch & Dahl 2018).

Die Plasmide, die für die jeweiligen sHdr-Proteine aus *H. denitrificans* kodieren (Abbildung 11), wurden in geeignete *E. coli*-Produktionsstämme transformiert. In *E. coli* wird die Synthese und der Zusammenbau von [FeS]-Clustern maßgeblich von den Proteinen des *isc* Operons gesteuert (Johnson *et al.* 2005). Eine Überexpression von [FeS]-Cluster koordinierenden Proteinen wird durch das Regulatorgen *iscR* reprimiert (Schwartz *et al.* 2001). Das Ausschalten des *iscR* Gens durch Einfügen einer Kanamycin-Resistenzkassette, führte zu einem optimierten *E. coli*-Stamm (*E. coli* Δ *iscR*) zur Produktion [FeS]-Cluster haltiger Proteine (Akhtar & Jones 2008). Aufgrund der hohen Sauerstoffsensitivität vieler [FeS]-Cluster (Imlay 2006), herrschten während der Produktion und Aufreinigung der Proteine strikt anoxische Bedingungen vor. Zur Produktion wurde ein optimiertes Protokoll von [FeS]-Cluster Proteinen genutzt, das Ammoniumeisen(III)-citrat und Cystein als Eisen- und Schwefelquelle verwendet sowie Fumarat und Glucose, um *E. coli* anaerob zu kultivieren (Kuchenreuther *et al.* 2010).

Eine weitere Strategie bestand darin, anstelle des Δ *iscR*-Stammes, das restliche *isc* Operon über ein weiteres Plasmid zu coexprimieren. Das pRKISC Plasmid kodiert für die Gene *iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx* aus dem *isc* Operon für *E. coli* und besitzt eine Tetracyclin-Resistenz als Selektionsmarker (Takahashi & Nakamura 1999). Dieses Plasmid wurde bereits erfolgreich zur Produktion von [FeS]-Cluster Proteinen verwendet (Nakamura *et al.* 1999). Für die Coexpression zweier Plasmide im selben Expressionsstamm ist es wichtig, dass diese kompatibel zueinander sind (Novick 1987). Das Plasmid pRKISC besitzt einen RK2 Replikationsursprung (IncPI-type vector) und ist somit kompatibel zu pET22b(+), das mit einem pBR322 Replikationsursprung in einer anderen Plasmid-Inkompatibilitätsgruppe liegt.

Für Enzyme mit konservierter CCG-Domäne wurden bereits Membranassoziationen über amphipathische Helices beschrieben (Lemos *et al.* 2001; Hamann *et al.* 2009). Dies könnte auch für sHdrB2, das ebenfalls zwei CCG-Domänen besitzt, der Fall sein. Eine Membranassoziation über amphipathische Helices wurde für sHdrB1 und sHdrC2 aus *A. aeolicus* diskutiert (Boughanemi *et al.* 2016), ebenso wie für die sHdrC1 und sHdrB1 Proteine aus *H. denitrificans* (Koch 2018). Aus diesem Grund wurde der Stamm *E. coli* C43 (DE3), der sich von *E. coli* BL21 (DE3) ableitet, aber besser für die Expression von Membranproteinen geeignet ist (Miroux & Walker 1996), mit dem Plasmid pRKISC transformiert.

Die Plasmide, die die Gene *shdrC1*, *shdrB1*, *shdrC2* und *shdrB2* trugen, wurden entweder im Stamm *E. coli* Δ *iscR* oder zusammen mit pRKISC im Stamm C43 (DE3) (ab hier: C43 + pRKISC) unter Ausschluss von Sauerstoff exprimiert. In beiden Fällen erfolgte die Induktion mit IPTG. Nach der Zellernte wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt und durch Zentrifugation die lösliche Fraktion der Proteine (Überstand) von den unlöslichen Proteinen (Pellet) getrennt. Diese Fraktionen wurden jeweils von den unterschiedlichen Stämmen mit den jeweils verwendeten Expressionsplasmiden generiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend per SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abbildung 12).

Im Falle der Produktion von sHdrC1 (Abbildung 12 A), ist im SDS-Gel eine intensive Bande für die unlösliche Fraktion des Stamms *E. coli* Δ *iscR* zwischen 25 kDa und 32 kDa zu erkennen. Das Protein sHdrC1 mit einem C-terminalen Twin-Strep-tag besitzt eine molekulare Masse von 31 kDa, wobei der fusionierte Affinitätstag 3,2 kDa ausmacht. In den anderen Fraktionen sind die Banden auf dieser Höhe im SDS-Gel deutlich blasser. Im Western Blot wurde ein StrepHRP-Konjugat eingesetzt und ein intensives Signal für die unlösliche Fraktion des Stamms *E. coli* Δ *iscR* erneut zwischen 25 kDa und 32 kDa detektiert, das der zuvor beschriebenen intensiven Bande im SDS-Gel zugeordnet werden kann. In der löslichen Fraktion von *E. coli* Δ *iscR*, sowie in der unlöslichen Fraktion von C43 + pRKISC wurden jeweils zwei schwache Banden zwischen 25 kDa und 32 kDa detektiert.

Für sHdrB1 (Abbildung 12 B), das inklusive C-terminalem Strep-tag eine molekulare Masse von 53,5 kDa besitzt, konnte im SDS-Gel eine prominente Bande zwischen 46 kDa und 58 kDa in der unlöslichen Fraktion des Stamms *E. coli* Δ *iscR* beobachtet werden, die in den übrigen Fraktionen fehlte. Im Western Blot zeigte diese Bande auch als einzige ein Signal.

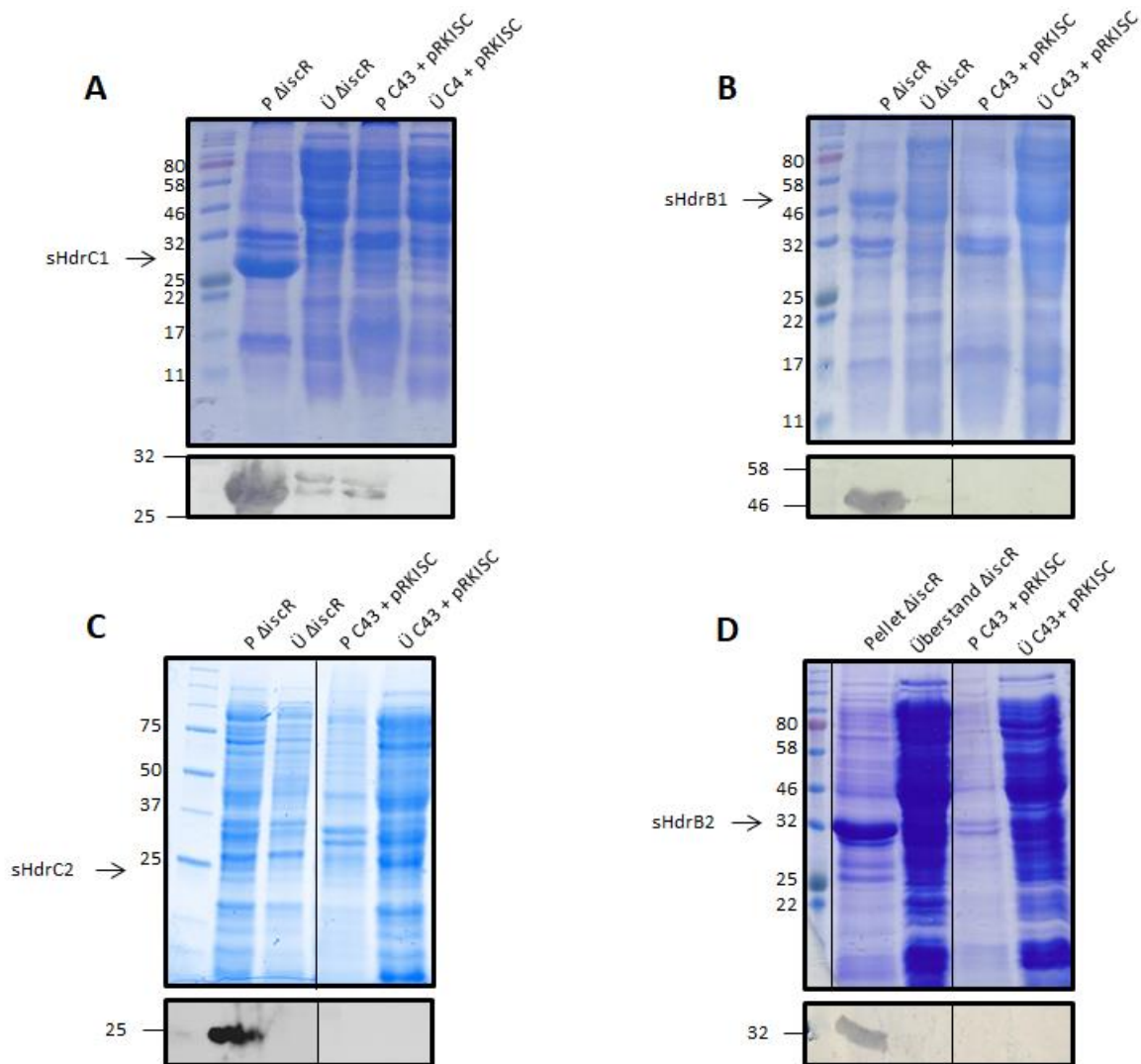


Abbildung 12: SDS-Gele und Western Blots der heterologen Produktion von sHdr-Untereinheiten aus *H. denitrificans* in *E. coli*. SDS-PAGE und Western Blot der Produktion von (A) sHdrC1 (Hden_0689) mit C-terminalem Twin-Strep-tag, (B) sHdrB1 (Hden_0690) mit C-terminalem Strep-tag, (C) sHdrC2 (Hden_0693) mit C-terminalem Strep-tag und (D) sHdrB2 (Hden_0694) mit C-terminalem Strep-tag in *E. coli* Δ iscR und *E. coli* C43 (DE3) mit dem Plasmid pRKISC (C43 + pRKISC). Im Falle von (A), (B) und (D) wurden selbst gegossene 15 % Gele für die SDS-PAGE verwendet, in (C) ein Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel von Bio-Rad. In allen Fällen wurde ein StrepHRP-Konjugat verwendet. In (A), (B) und (D) erfolgte die Detektion durch eine chromogene Reaktion mit Chloronaphtol, in (C) per Chemilumineszenz. In (A), (B) und (D) wurde der Color Prestained Protein Standard Broad Range 11 - 245 kDa von New England Biolabs als Größenstandard verwendet, in (C) der Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standard von Bio-Rad. Die Abbildungen zeigen jeweils das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel und darunter den entsprechenden Ausschnitt des Western Blots.

Im Falle von sHdrC2 (Abbildung 12 C) wurde im Western Blot nur in der unlöslichen Fraktion von *E. coli* Δ iscR ein Signal bei 25 kDa detektiert. Die entsprechende Bande ist im SDS-Gel für die entsprechende Fraktion auf derselben Höhe zu erkennen, gehört dort aber nicht zu den

intensivsten Banden. sHdrC2 mit C-terminalen Strep-tag besitzt eine molekulare Masse von 31,2 kDa, wovon der Strep-tag 1,3 kDa ausmacht.

Das SDS-Gel der Fraktionen aus der Produktion von sHdrB2 (Abbildung 12 D) zeigte eine hohe Beladung mit den löslichen Proteinen von *E.coli* Δ iscR und C43 + pRKISC, weil hier teilweise keine einzelnen Banden mehr unterscheidbar waren. Die intensivste Bande der unlöslichen Fraktion *E.coli* Δ iscR liegt im SDS-Gel auf der Höhe von 32 kDa und zeigte als einzige ein Signal im Western Blot. Das C-terminal mit einem Strep-tag fusionierte sHdrB2 hat eine molekulare Masse von 35,1 kDa, wovon der Strep-tag 1,1 kDa ausmacht.

Es war somit nicht möglich die sHdr-Untereinheiten löslich in *E. coli* zu produzieren, da im Stamm *E. coli* Δ iscR ausschließlich Einschlusskörperchen der Zielproteine gebildet wurden.

4.2 Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus *H. denitrificans*

Um genaue Aussagen über den sHdr-Komplex treffen zu können, sollte dieser aus dem Originalorganismus *H. denitrificans* aufgereinigt werden. Die genetische Manipulierbarkeit dieses Modellorganismus wurde ausgenutzt, um zwei verschiedene Strategien zur Aufreinigung des nativen sHdr-Komplexes zu verfolgen.

Die eine Strategie bestand darin, über eine *in frame* Insertion, dem Ausgangsstamm *H. denitrificans* Δ tsdA durch homologe Rekombination eine für einen His-tag als auch einen Strep-tag kodierende Sequenz einzufügen. So sollte die Möglichkeit geschaffen werden den Komplex über affinitätschromatographische Methoden aufzureinigen zu können.

Die zweite Strategie bestand darin, das Gen *shdrR* durch homologe Rekombination vom Chromosom zu entfernen. Durch die Deletion des Regulatorgens, sollte eine konstitutive Expression der sHdr-Proteine und erhöhte Produktion des sHdr-Komplexes in *H. denitrificans* erreicht werden. Das erhaltene Zellmaterial wurde anschließend klassischen Aufreinigungsmethoden unterzogen und die finale Elution massenspektrometrisch analysiert.

4.2.1 Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691

Über eine *in frame* Insertion wurde dem Ausgangsstamm *H. denitrificans* Δ tsdA durch homologe Rekombination eine Sequenz zwischen die Gene *shdrA* und *shdrB1* inseriert, die

für eine His-tag als auch eine Strep-tag Sequenz kodiert. Die Verwendbarkeit des hierfür genutzten Plasmides wurde bereits in einer vorherigen Arbeit dokumentiert und dort genutzt, um das *Knock In*-Konstrukt im Wildtyp von *H. denitrificans* genetisch zu verankern (Steffens 2018). So sollte die Möglichkeit geschaffen werden den Komplex über affinitätschromatographische Methoden aufzureinigen zu können. Nach Erstellung des Stammes wurde dieser in einem Fermenter angezogen und die Expression des sHdr-Komplexes durch Zugabe von Thiosulfat induziert. Das auf diese Weise erhaltene Zellmaterial wurde anschließend einer His-tag Affinitätschromatographie unterzogen und die erhaltenen Fraktionen per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.2.1.1 Erstellung des Stamms *H. denitrificans* Δ tsdA *Knock In Hden0690-0691*

Das Genom von *H. denitrificans* enthält ein Gen, das für eine Thiosulfatdehydrogenase vom Typ TsdA (Hden_2748) kodiert. Die TsdA aus *H. denitrificans* verstoffwechselt das zur Induktion des sHdr-Systems notwendige Thiosulfat anteilig zum nicht weiter metabolisierbaren Tetrathionat (Koch & Dahl 2018). Damit sämtliches Thiosulfat ausschließlich vom sHdr-System genutzt wird, wurde das für TsdA kodierende Gen mittels homologer Rekombination *in frame* deletiert (Koch & Dahl 2018). Der so erhaltene Stamm *H. denitrificans* Δ tsdA (in der weiteren Arbeit als „Wildtyp“ bezeichnet) wurde als Ausgangsstamm zur Generierung von *H. denitrificans* Δ tsdA *Knock In Hden0690-0691* genutzt. Bei dem zu inserierenden *Knock In*-Konstrukt handelte es sich um ein 2112 bp großes DNA-Fragment, das von der Firma Eurofins (Nantes/Frankreich) synthetisiert wurde. Das Konstrukt umfasst die 1000 bp stromaufwärts des 5'-Endes von *shdrA* bis zum 1000 bp stromabwärts des 3'-Endes von *shdrB1* gelegene Sequenz. Es hat zusätzlich hinter das letzte für Glutamat codierende Triplett von *shdrB1* eine Strep-tag Sequenz, hinter das *shdrB1* Stopcodon eine *NcoI*-Schnittstelle und hinter dem Startcodon von *shdrA* eine His-tag Sequenz gesetzt (Abbildung 13). Zum Einbringen der zuvor beschriebenen Affinitäts-tags, wurde die nicht kodierende Region zwischen *shdrB1* und *shdrA* gewählt, weil diese größer als zwischen den anderen *shdr* Genen ist und somit eine Beeinflussung der Translation bzw. Transkription der Gene und ihrer Genprodukte durch Fusion der Affinitäts-tags unwahrscheinlich ist. Zum Einbringen des *Knock In*-Fragmentes in *H. denitrificans*, wurde dieses in einer vorherigen Arbeit (Koch 2018) in den, in *H. denitrificans* nicht replikativen,

Vektor *pk18mobsacB* kloniert. Dieses Plasmid ist ein *narrow host range* Plasmid und außerhalb der Enterobacteria nicht replikativ (Schäfer *et al.* 1994), wodurch es sich zur homologen *in frame* Rekombination eignete. Des Weiteren wurde eine in 3'-5' Richtung gelegene Tetracyclin-Resistenzkassette aus dem Plasmid *phP45-Ω* (Fellay *et al.* 1987) als Selektionsmarker eingefügt (*pk18mobsacBKnockinTc35*), da *H. denitrificans* eine hohe Spontanmutationsrate gegen die auf dem ursprünglichen *pk18mobsacB* Plasmid kodierte Kanamycin-Kassette entwickelt (Koch 2018). Das Plasmid *pk18mobsacB* kodiert zudem über das Gen *sacB* für eine Levansucrase, die als negativer Selektionsmarker in saccharosehaltigem Medium genutzt werden kann, da *H. denitrificans* nicht in der Lage ist diese zu verstoffwechseln.

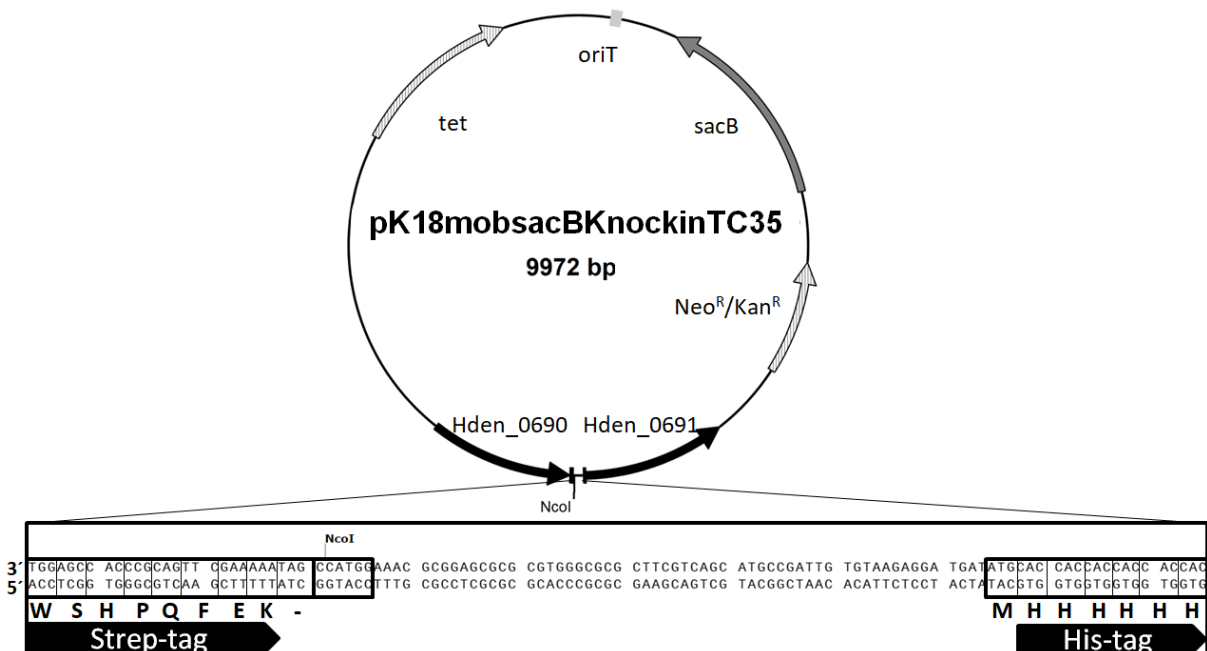


Abbildung 13: Plasmidkarte von *pk18mobsacBKnockinTc35*. Am C-terminalen Ende von *shdrB1* (Hden_0690) befindet sich eine Strep-tag Sequenz und eine *NcoI*-Schnittstelle. Am N-terminalen Ende von *shdrA* (Hden_0691) befindet sich ein His-tag. Im schwarzen Kasten ist die exakte Nukleotidsequenz des *Knock In*-Konstrukts dargestellt. Das Plasmid besitzt eine Tetracyclin-Kassette in 3'-5' Richtung (grau schraffierter Pfeil). Das für eine Levansucrase kodierende Gen *sacB* ist als dunkelgrauer Pfeil dargestellt.

Das Plasmid *pk18mobsacBKnockinTc35* wurde nach einem etablierten Elektroporationsprotokoll (Koch & Dahl 2018) in den Organismus eingebracht und dieser für den ersten homologen Rekombinationsschritt auf Methanol-Medium enthaltenden

Agarplatten mit Chloramphenicol und Tetracyclin ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf eine Methanol-Medium Platte mit 10 % (w/v) Saccharose übertragen und positive Mutanten durch Bildung von Levanschleim verifiziert. Für den zweiten homologen Rekombinationsschritt wurden die positiven Mutanten in eine Flüssigkultur mit Chloramphenicol als einzigem Antibiotikum überführt, um so den Verlust der Tetracyclin-Kassette zu ermöglichen. Die Flüssigkulturen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase auf Platten mit Selektivnährmedium mit Chloramphenicol und 10 % Saccharose (w/v) ausplattiert. Die nicht schleimigen Kolonien wurden anschließend erneut in Flüssigkultur überführt und nach der Ernte ihre genomische DNA extrahiert. Diese wurde in einer PCR als Template mit den Screening-Primern Fwd_Knockin_Screen und Rev_Knockin_Screen (Tabelle 8) verwendet und in einer analog durchgeführten PCR diente die genomische DNA des Wildtyps als Kontrolle. Die durch PCR erhaltenen DNA-Fragmente für die positiven Mutanten (2112 bp) und den Wildtyp (2070 bp) unterscheiden sich nicht genug in ihrer Länge, um anhand einer bloßen elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel unterschieden werden zu können (Abbildung 14 A). In diesem Fall konnte die künstlich hinter der Strep-tag Sequenz eingebrachte *NcoI*-Schnittstelle in einem anschließenden diagnostischen Restriktionsverdau genutzt werden, weil diese im Wildtyp-Fragment nicht vorhanden ist. Der Verdau einer exemplarisch positiven Mutante zeigte nach Verdau mit *NcoI* eine intensive Bande bei 1000 bp und keine Bande bei 2000 bp Länge im Gegensatz zum Wildtyp (Abbildung 14 B). Auf diese Weise konnte der Genotyp der Mutante (Abbildung 14 C) verifiziert werden.

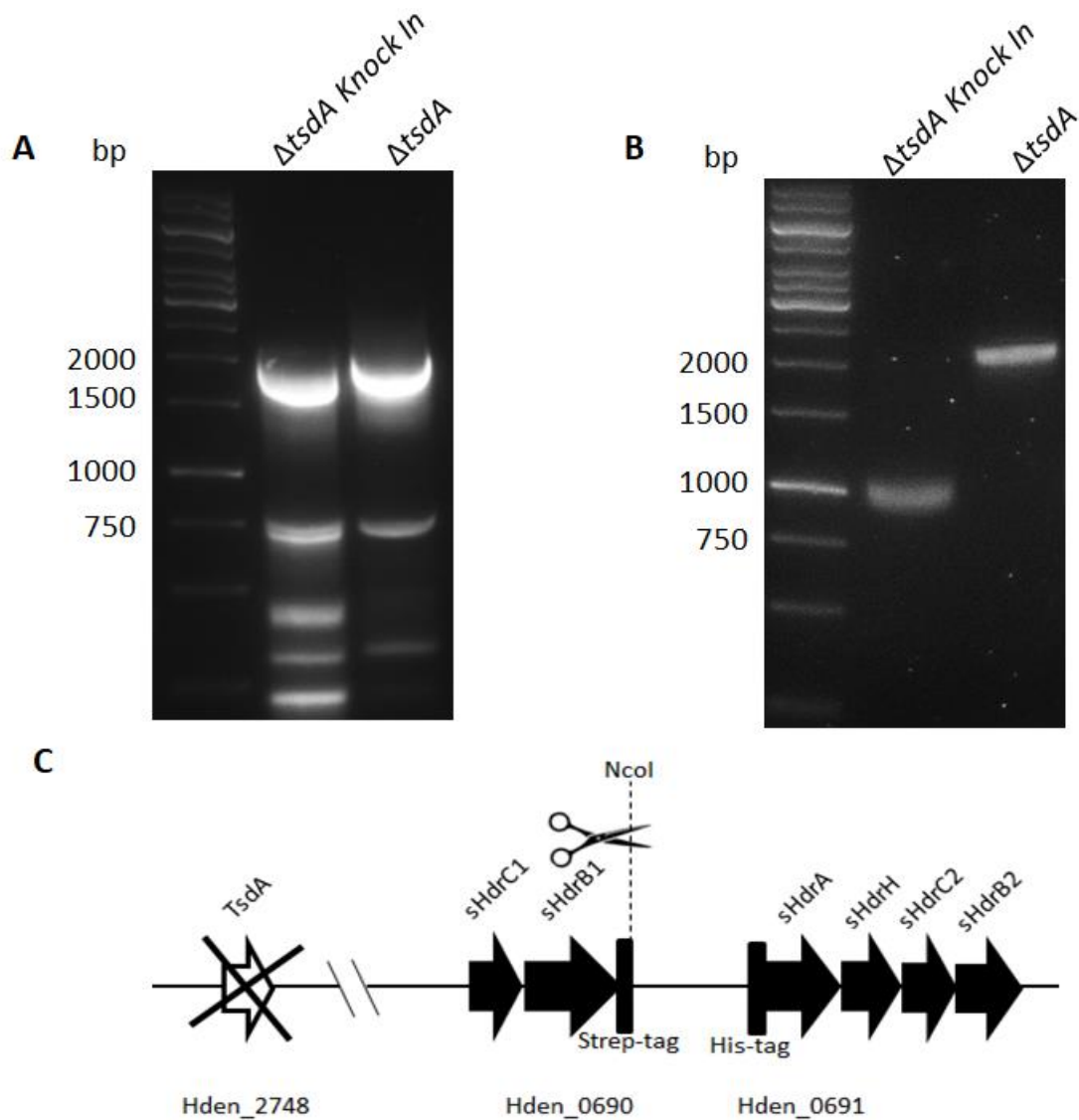


Abbildung 14: Verifizierung des Genotyps von *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691. (A) PCR auf die genomische DNA von *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691 und *H. denitrificans* Δ tsdA. (B) Diagnostischer Restriktionsverdau mit *NcoI* der aus (A) extrahierten Gelstücke auf Höhe von 2000 bp. (C) Schematische Darstellung des durch (B) verifizierten Genotyps von *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691. Der GeneRuler 1kB DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific wurde als Größenstandard verwendet. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit GelRed unter UV-Licht.

4.2.1.2 Anzucht des Stamms *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691 in einem Fermenter

Nachdem der Stamm *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691 erfolgreich generiert werden konnte, wurde dieser in einem Fermenter kultiviert, um Zellmaterial für eine anschließende Affinitätschromatographie zu produzieren (Abbildung 15). Die Vorteile der Anzucht von *H. denitrificans* in einem Fermenter bestehen darin, dass der aerobe

Organismus durch konstant hohe Luftzufuhr im Fermenter besser mit Sauerstoff versorgt wird als z.B. in einem Erlenmeyerkolben und die Sauerstoffsättigung gemessen und der gewünschte pH-Wert automatisch eingestellt werden können. *H. denitrificans* wurde unter chemoorganoheterotrophen Bedingungen mit Methanol als Kohlenstoffquelle angezogen. Als akzessorische Elektronenquelle diente Thiosulfat, das das sHdr-System induziert und im Vergleich zu anderen Schwefelsubstraten weder giftig noch geruchsintensiv ist. Zuerst wurde eine Vorkultur, die durch MOPS-Puffer auf pH 7,2 eingestellt war und kein Thiosulfat enthielt, bis zur stationären Wachstumsphase angezogen (OD = 1,4). Diese Vorkultur wurde als Inokulum für 4,5 L Nährmedium verwendet. Zu Beginn der Fermentation (OD = 0,14) enthielt das Medium 40 mM Methanol und 2 mM Thiosulfat. Innerhalb der ersten 23 h befand sich der Organismus in der lag-Phase, die OD erhöhte sich nur leicht auf 0,18 und die ursprüngliche Thiosulfatkonzentration blieb unverändert. Der vollständige Abbau des Thiosulfats konnte nach 71,5 h und einer OD von 1,46 verzeichnet werden, deshalb wurde erneut eine Thiosulfatkonzentration von 2 mM eingestellt. Da zu diesem Zeitpunkt keine Veratmung des zugeführten Sauerstoffs registriert wurde (Daten nicht gezeigt), wurden zudem 40 mM Methanol gefüttert. Nach 97 h war erneut sämtliches Thiosulfat abgebaut, aber die OD hatte sich mit einem Wert von 1,7 kaum erhöht. Aus diesem Grund wurden neben 40 mM Methanol und 2 mM Thiosulfat auch 1 mM Ammoniumchlorid als Stickstoff- und 0,4 mM Natriumdihydrogenphosphat als Phosphorquelle hinzugefügt, um eine Limitierung des Wachstums durch diese Elemente ausschließen zu können. Gegen Ende der Fermentation (149 - 190 h), blieb die OD konstant bei 2,7, während der Organismus weiter Thiosulfat abbaute. Bei einer finalen Thiosulfatkonzentration von 1,7 mM Thiosulfat, wurde das Zellmaterial (5,5 g/L) geerntet und unter Ausschluss von Sauerstoff bei -20 °C für die anschließende Affinitätschromatographie gelagert. Die Ernte erfolgte während des Thiosulfatabbaus, um eine Expression des sHdr-Komplexes sicher zu stellen.

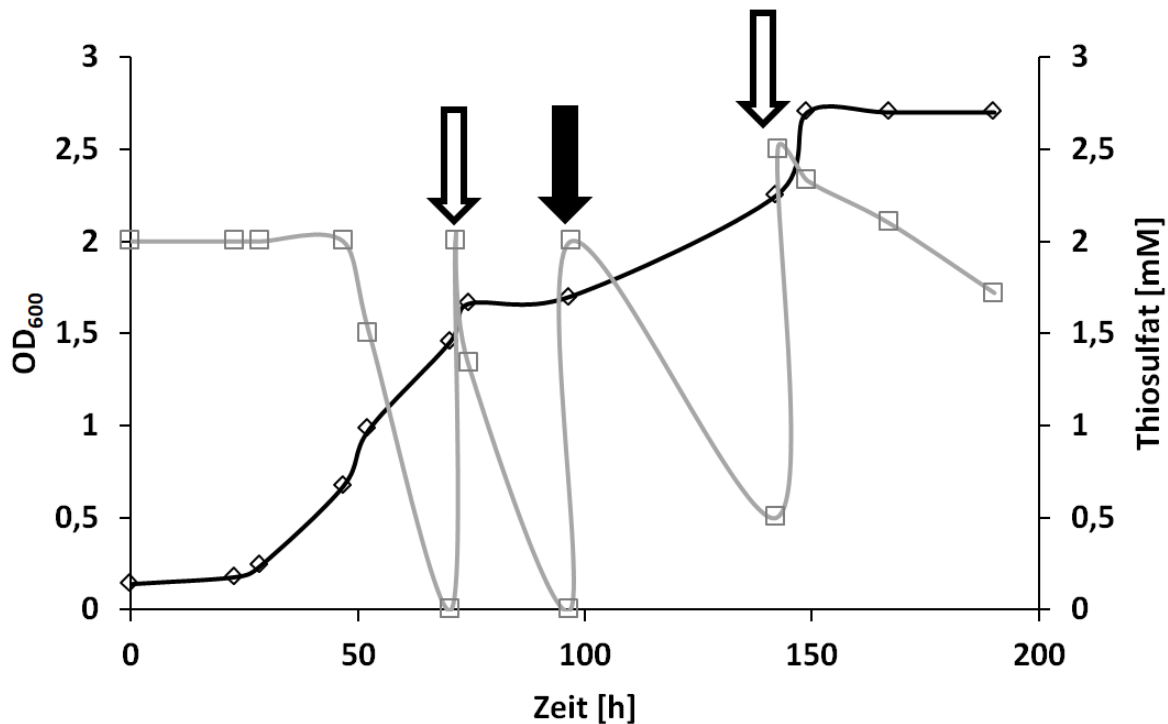


Abbildung 15: Wachstumskurve von *H. denitrificans* Δ *tsdA* Knock In *Hden0690-0691* in einem Fermenter. 4,5 L Methanol-Medium wurden mit einer 500 mL Vorkultur von *H. denitrificans* Δ *tsdA* Knock In *Hden0690-0691* inokuliert. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) und die Thiosulfatkonzentration (mM) wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die OD (weiße Rauten) wurde in regelmäßigen Zeitabständen gemessen, um die Wachstumskurve (schwarz) zu bestimmen. Die Thiosulfatkonzentration (weiße Quadrate) wurde regelmäßig gemessen, um den Thiosulfatabbau (graue Kurve) zu bestimmen. Die weißen Pfeile markieren die Zeitpunkte, wenn dem Medium 40 mM Methanol und 2 mM Thiosulfat zugegeben wurden. Der schwarze Pfeil markiert den Zeitpunkt als 1 mM Ammoniumchlorid und 0,4 mM Natriumdihydrogenphosphat supplementiert wurden.

4.2.1.3 Affinitätschromatographie des sHdr-Komplexes aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Knock In *Hden0690-0691*

Die im *shdr* Operon befindlichen Gene *shdrC1B1AHC2B2* kodieren für Proteine, die in *A. aeolicus* als zusammenhängender sHdrC1B1AC2B2-Komplex aus den Membranen des Organismus solubilisiert wurden (Boughanemi *et al.* 2016). Im Gegensatz zu diesem Befund, wurde in *H. denitrificans* das Protein sHdrA in der löslichen Zellfraktion gefunden (Koch & Dahl 2018), weshalb in dieser Arbeit die lösliche Fraktion von *H. denitrificans* zur Aufreinigung des sHdr-Komplexes verwendet wurde. Der sHdr-Komplex aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Knock In *Hden0690-0691* besitzt einen His-tag, der an den N-Terminus des sHdrA-Proteins fusioniert ist und sich somit für eine Affinitätschromatographie an einer immobilisierten Nickelmatrix eignet. Zu diesem Zweck wurde Zellmaterial verwendet, das in

der zuvor beschriebenen Fermentation mit Thiosulfat zur Expression der sHdr-Proteine induziert wurde. Da die *shdr* Gene mehrere konservierte Cystein-Motive zur Bindung von [4Fe-4S]-Clustern besitzen und für rekombinant produziertes sHdrA aus *H. denitrificans* die Bindung eines [4Fe-4S]-Clusters gezeigt werden konnte (Kapitel 4.1), wurde die Affinitätschromatographie unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt.

Nach dem Aufschluss von 10 g Zellmaterial wurde der Überstand (15 mL) auf eine 1 mL HisTrap-Säule mit Nickelmatrix gegeben. Darauf erfolgte die stufenweise Zugabe höherer Konzentrationen von Imidazol. Zuerst wurde die Säule mit 20 mM Imidazol gewaschen und die Fraktion gesammelt, dasselbe erfolgte nach Zugabe von 50 mM Imidazol. Bei Zugabe von 50 mM Imidazol war in der Säulenmatrix eine rötlich-braune Bande zu erkennen, die langsam eluierte. Als die rötlich-braune Bande das Ende der Säulenmatrix erreicht hatte, wurde die Elution gesammelt (50 mM Elution 1), danach folgte die rötlich-braune Elutionsfraktion der Bande (50 mM Elutionsfraktion 2) und die ersten 500 µL nachdem die Bande eluiert war (50 mM Elution 3). Nach der weiteren Zugabe von 150 mM bzw. 300 mM und 500 mM Imidazol, wurden nur farblose Elutionsfraktionen erhalten. Das resuspendierte Pellet der aufgeschlossenen Zellen, der lösliche Überstand, die Elution nach Zugabe von 20 mM Imidazol und die drei Fraktionen nach Zugabe von 50 mM Imidazol wurden anschließend per SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abbildung 16). Im SDS-Gel wurde für alle aufgetragenen Proben eine Bande bei 72 kDa beobachtet. Alle Proben außer der unlöslichen Fraktion (Pellet) zeigten zudem diffuse Banden unterhalb von 55 kDa sowie auf Höhe von 26 kDa und 10 kDa. Für die Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol wurden zusätzlich eine Bande oberhalb von 43 kDa und mehrere diffuse Banden zwischen 34 kDa und 43 kDa beobachtet, wobei die Intensität der Banden bei der zweiten Elutionsfraktion bei 50 mM Imidazol stärker als bei den anderen Elutionen derselben Imidazolkonzentration zu erkennen war.

Für den korrespondierenden Western Blot wurde ein gegen sHdrA gerichtetes Antiserum (Koch & Dahl 2018) zur Detektion verwendet. Das Protein sHdrA besitzt eine molekulare Masse von 37,7 kDa. In den Elutionsfraktionen bei 50 mM Imidazol ist das Signal für sHdrA unterhalb der Markerbande bei 43 kDa zu erkennen, wobei auch hier die Signalintensität in der zweiten Elutionsfraktion am höchsten ist. In allen anderen Fraktionen war kein Signal

detektierbar. Im SDS-Gel konnte allerdings keine zu diesem Signal korrespondierende prominente Bande identifiziert werden, ebenso wenig Banden für die übrigen sHdr-Untereinheiten, die theoretische molekulare Massen von 28 kDa (sHdrC1), 52,4 kDa (sHdrB1), 30,1 kDa (sHdrC2) und 34,2 kDa (sHdrB2) besitzen. Die Ergebnisse der SDS-PAGE und des Western Blots zeigten, dass sHdrA nur einen geringen Anteil an der Gesamtproteinmenge ausmachte.

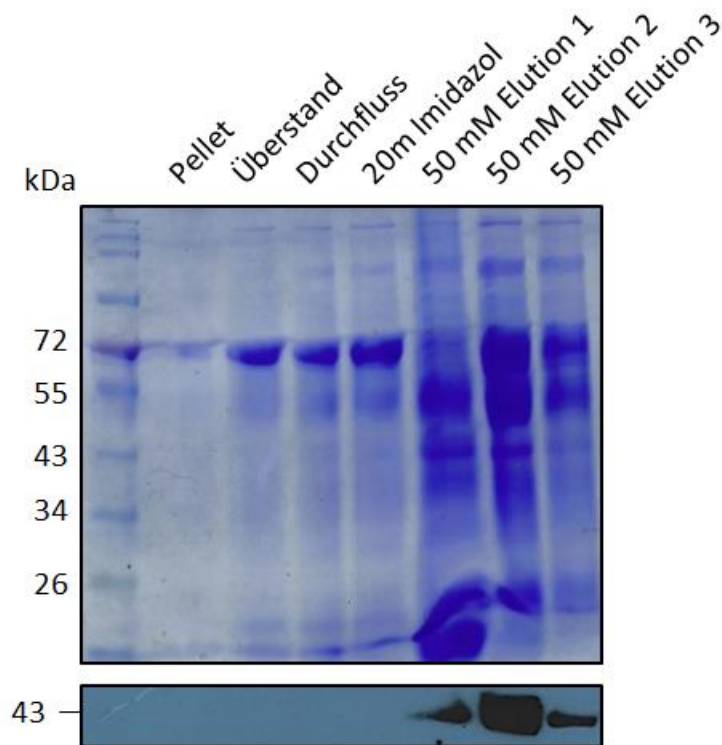


Abbildung 16: SDS-PAGE und Immunoblot der Aufreinigungsfractionen von *H. denitrificans* Δ tsdA Knock In Hden0690-0691. Die Abbildung zeigt das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel und darunter den entsprechenden Abschnitt des Western Blots. Die nach dem Zellaufschluss abzentrifugierten Proteine (Pellet), die löslichen Proteine (Überstand), die nicht an die Nickelmatrix bindenden Proteine (Durchfluss), die Waschfraktion (20 mM Imidazol) und die drei aufgefangenen rötlich-bräunlichen Elutionsfraktionen bei 50 mM Imidazol wurden aufgetragen. Je 150 μ g der Proben wurden aufgetragen. Die Analyse per Immunoblot erfolgte mit gegen sHdrA gerichtetem Antiserum und die Detektion auf einem Röntgenfilm (Auflage des Films für 1 h). Der Color Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa von New England Biolabs wurde als Größenstandard verwendet.

4.2.2 Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus *H. denitrificans* Δ tsdA Δ shdrR

Für wildtypischen *H. denitrificans* konnte durch vergleichende Proteomik gezeigt werden, dass die sHdr-Proteine nur bei Wachstum des Organismus auf einem oxidierbaren

schwefelhaltigen Substrat gebildet wurden (Koch & Dahl 2018). Vermutlich übt ein Regulator vom Arsenresistenz (ArsR)-Typ, der durch das erste Gen des *shdr* Operons kodiert wird (*shdrR*/Hden_0682), die Regulation der *shdr* Gene auf der Transkriptionsebene aus (Koch & Dahl 2018). Ein geeigneter Ansatzpunkt zu einer erhöhten und vereinfachten Produktion der sHdr-Proteine in *H. denitrificans* wurde darin gesehen, das *shdrR* Gen durch homologe Rekombination aus dem Chromosom zu entfernen und somit eine konstitutive Expression der sHdr-Proteine ohne die Supplementation mit Thiosulfat zu erreichen. Dazu wurde der Stamm $\Delta tsdA \Delta shdrR$ zusammen mit dem Wildtyp per Immunoblot untersucht, dabei diente sHdrA als Markerprotein zur Bildung des sHdr-Komplexes. Anschließend erfolgte die Produktion von Zellmaterial in einem Fermenter.

4.2.2.1 Nachweis der konstitutiven Expression der sHdr-Proteine durch Western Blot

Der Stamm $\Delta tsdA \Delta shdrR$ wurde mittels *in frame* Deletion des Gens *shdrR* durch homologe Rekombination erstellt (von Jingjing Li, schematische Darstellung des Genotyps in Abbildung 17 A). Um zu überprüfen, ob die markerlose Deletion des Gens *shdrR* wirklich zu einer konstitutiven Expression des sHdr-Komplexes führt, wurde eine Immunoblotanalyse durchgeführt (Abbildung 17 B).

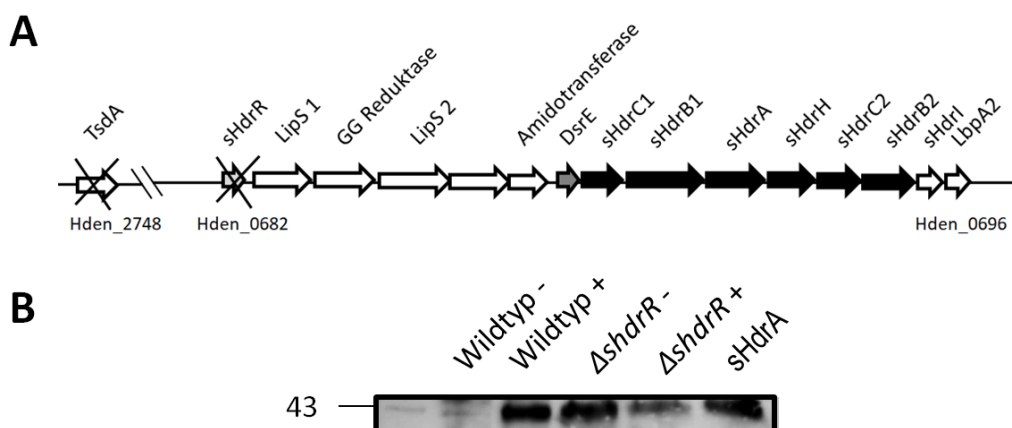


Abbildung 17: Analyse der Expression von sHdrA in *H. denitrificans* $\Delta tsdA \Delta shdrR$ und im Wildtyp per Immunoblot. (A) Schematische Darstellung des Genotyps von *H. denitrificans* $\Delta tsdA \Delta shdrR$. (B) Western Blot Analyse der Rohextrakte von wildtypischem *H. denitrificans* und *H. denitrificans* $\Delta tsdA \Delta shdrR$ mit Antiserum, das gegen sHdrA gerichtet ist. Das Zellmaterial stammte von Zellen, die in Methanol-Medium kultiviert wurden. +: Zugabe von 2 mM Thiosulfat zur Induktion des sHdr-Systems, -: ohne Zugabe von Thiosulfat. Rekombinant produziertes sHdrA diente als Kontrolle. Je 10 μ g der Proben und 2 μ g der Kontrolle wurden aufgetragen. Der Color Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa von New England Biolabs wurde als Größenstandard verwendet. Die Detektion erfolgte per Chemilumineszenz und die Membran wurde für 5 min belichtet.

Jeweils zwei 50 mL Flüssigkulturen des Wildtyps und des Stamms *ΔtsdA ΔshdrR* wurden angezogen, dabei wurde eine Flüssigkultur mit 2 mM Thiosulfat versetzt (+), die andere nicht (-). Die Kulturen wurden für 72 h angezogen, bis sie die stationäre Phase erreicht hatten (OD = 0,8); eine Ausnahme bildete der Stamm *ΔtsdA ΔshdrR*, der mit 2 mM Thiosulfat versetzt worden war, denn dieser hatte nach 72 h nur eine OD von 0,2 erreicht (Daten nicht gezeigt).

Die Kulturen wurden geerntet und das Zellmaterial per Ultraschall aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation, wurde die Proteinmenge der Überstände quantifiziert und jeweils 10 µg auf ein SDS-Gel geladen. Das Gel wurde anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und ein gegen sHdrA gerichtetes Antiserum (Koch & Dahl 2018) verwendet. Im Western Blot konnte für rekombinant in *E. coli* produziertes sHdrA, das als Kontrolle diente, ein Signal unterhalb der Bande bei 43 kDa beobachtet werden. Ein Signal auf der gleichen Höhe konnte auch für den *ΔtsdA ΔshdrR* Stamm, sowohl mit als auch ohne Zugabe von Thiosulfat und für den mit Thiosulfat induzierten Wildtyp beobachtet werden. Der Wildtyp, der ohne Thiosulfat angezogen worden war, zeigte kein entsprechendes Signal im Immunoblot. Die Immunoblotanalyse zeigte, dass das sHdr-System im Stamm *ΔtsdA ΔshdrR* konstitutiv gebildet wurde.

4.2.2.2 Fermentation von *H. denitrificans ΔtsdA ΔshdrR*

Der Stamm *H. denitrificans ΔtsdA ΔshdrR* wurde in einer 500 mL Flüssigkultur, die mit MOPS-Puffer auf pH 7,2 eingestellt war, für drei Tage angezogen. Die gesamte Vorkultur diente zur Inokkulation von 3,5 L Methanol-Medium. Zu Beginn der Fermentation wurde eine OD von 0,2 gemessen und das Medium enthielt 49 mM Methanol (Abbildung 18). Eine Zugabe von 49 mM Methanol erfolgte nach 24,5 h bei einer OD von 1,5. Die OD hatte sich beim Zeitpunkt 45 h verdoppelt und neben 49 mM Methanol als Kohlenstoffquelle wurden auch 49,5 mM Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle hinzugegeben. Nach 51 h war eine OD von 3,8 erreicht und 49 mM Methanol, 16 mM Natriumdihydrogenphosphat sowie 0,8 mM Magnesiumsulfat wurden supplementiert, um eine Limitierung des Wachstums aufgrund eines Mangels an Phosphor bzw. Schwefel auszuschließen. Eine weitere Supplementation mit 49 mM Methanol erfolgte nach 69,5 h bei einer OD von 5,0. Eine OD von 5,35 war nach 76,5 h erreicht und es erfolgte eine erneute Zugabe von 49 mM Methanol. Die letzte Zugabe

von Methanol erfolgte nach 83,5 h bei einer OD von 6,75. Nach 89,5 h war eine OD von 7,0 erreicht und die Zellen wurden geerntet. 12 g/L Zellmaterial (Feuchtmasse) wurden gewonnen und unmittelbar nach der Zentrifugation unter Ausschluss von Sauerstoff bei -20 °C gelagert.

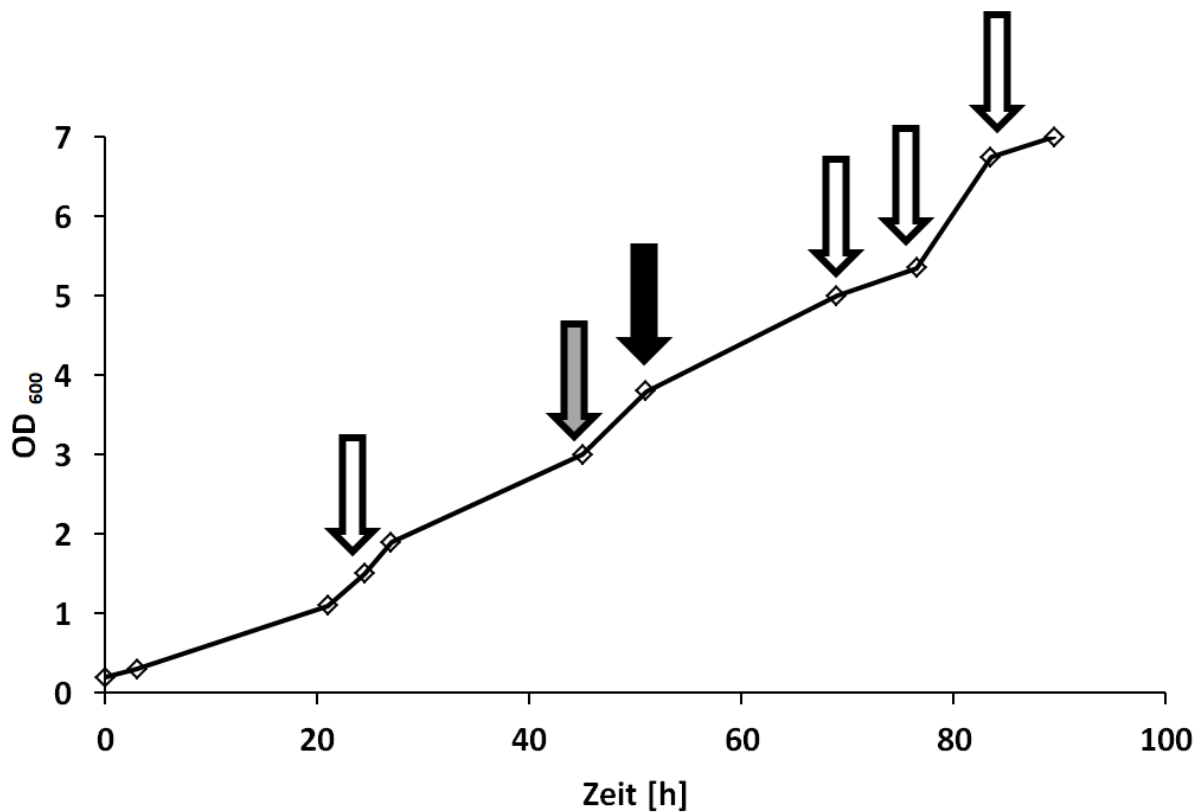


Abbildung 18: Wachstumskurve von *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta shdrR$ in einem Fermenter. 3,5 L Methanol-Medium wurden mit 500 mL einer Vorkultur von *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta shdrR$ angeimpft. In regelmäßigen Abständen wurde die OD bei 600 nm (weiße Rauten) gemessen und gegen die Zeit aufgetragen, um die Wachstumskurve (schwarze Linie) zu bestimmen. Die weißen Pfeile markieren die Zeitpunkte als 49 mM Methanol supplementiert wurden, der graue Pfeil den Zeitpunkt der Zugabe von 49,5 mM Ammoniumchlorid und der schwarze Pfeil den Zeitpunkt der Zugabe von 16 mM Natriumdihydrogenphosphat und 0,8 mM Magnesiumsulfat.

4.2.2.3 Aufreinigung des sHdr-Komplexes über eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Aufreinigung des sHdr-Komplexes erfolgte zuerst mittels einer HIC. Bei diesem bioanalytischen Separationsverfahren werden die Proteine in ihrer nativen Form anhand der Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Bereichen der Proteine mit den hydrophoben Phenylresten der stationären Phase voneinander getrennt. Als Eluent diente

das Salz Ammoniumsulfat, das aufgrund eines hohen kosmotropen Effekts die hydrophoben Bereiche der Proteine freilegt. 30 g Zellmaterial des Stamms *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta shdrR$ wurden per Ultraschall aufgeschlossen und durch einen Zentrifugationsschritt die Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wurde ein weiteres Mal in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert und der Überstand mit 0,5 M Ammoniumsulfat inkubiert, da sich in vorherigen Versuchen gezeigt hatte, dass sHdrA bei dieser Konzentration an Ammoniumsulfat nicht präzipitiert (Daten nicht gezeigt). Nach der Inkubation wurden die präzipitierten Proteine (Pellet) durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand auf eine mit 0,5 M Ammoniumsulfat äquilibrierte HiPrep Phenyl HP 16/10 Säule aufgetragen (Abbildung 19 A). Der Durchfluss zeigte eine Absorption bei 280 nm oberhalb der Detektionsgrenze (> 2000 mAu). Es folgte ein Waschschrift mit 0,3 M Ammoniumsulfat und der Detektion eines distinkten Peaks bei ca. 900 mAU. Nach Abklingen des Peaks wurde ein linearer Gradient bis 0 mM Ammoniumsulfat gefahren. Während dieses Gradienten konnten keine größeren Absorptionen detektiert werden. Eine Analyse der verschiedenen Proben erfolgte mittels einer SDS-PAGE und eines Western Blots (Abbildung 19 B). Die Proben der Zelltrümmer (Pellet Schall), der unlöslichen Proteine nach der Ultrazentrifugation (Pellet UZ) und der unlöslichen Proteine nach dem Aussalzen (Pellet Aussalzen) zeigten im SDS-Gel ein sehr blasses und heterogenes Bandenmuster. Intensive Banden auf Höhe von 55 kDa, 43 kDa und 17 kDa konnten für den Überstand nach dem Aussalzen und den Durchfluss der HIC beobachtet werden. Ein ähnliches aber deutlich blasseres Bandenmuster zeigten der Rest des Durchflusses und die Fraktion bei 0,3 M Ammoniumsulfat. Für die Fraktionen des linearen Gradienten konnten keine Banden im SDS-Gel beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Analyse der Proben im Western Blot zeigte ein Signal für sHdrA im Überstand nach dem Aussalzen (entspricht der aufgetragenen Probe) und im Peak der Elutionsfraktion mit 0,3 M Ammoniumsulfat. Letztere Probe wurde, unter Ausschluss von Sauerstoff, ü.N. auf Eis bei 4 °C gelagert und für die anschließende Anionenaustauschchromatographie verwendet.

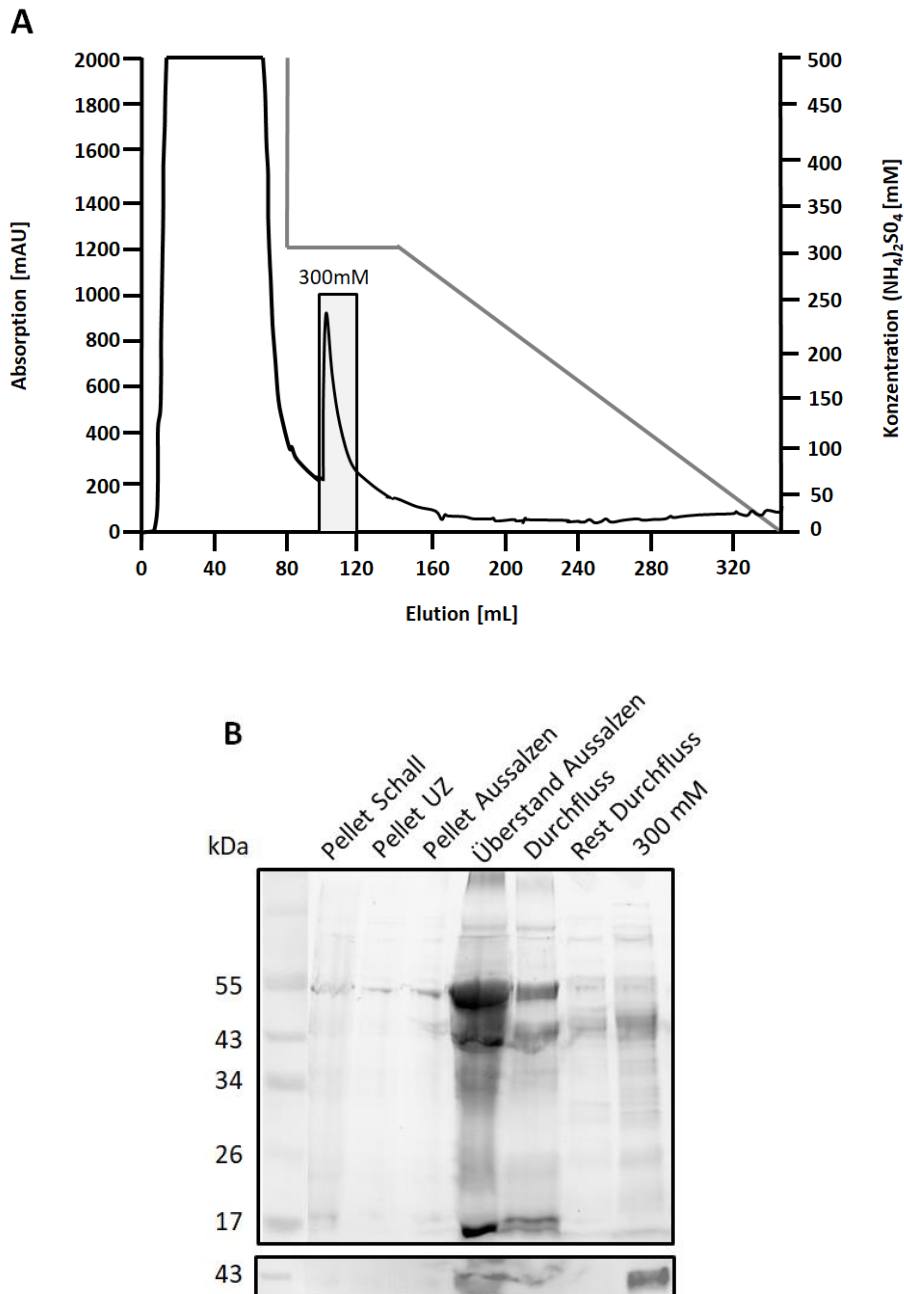


Abbildung 19: Elutionsprofil und anschließende SDS-PAGE sowie Immunoblot der Fraktionen einer HIC (HiPrep Phenyl HP 16/10). (A) Die Absorption bei 280 nm (schwarze Linie) und die Konzentration von Ammoniumsulfat (graue Linie) wurden gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die sHdrA enthaltende Fraktion ist durch einen hellgrauen Kasten gekennzeichnet. (B) Im SDS-Gel sind die Zelltrümmer (Pellet Schall), die Membranfraktion (Pellet UZ), die mit 500 mM Ammoniumsulfat ausgefällten Proteine (Pellet Aussalzen), der Überstand nach dem Aussalzen, der Durchfluss der HIC und die 300 mM Elutionsfraktion aufgetragen, darunter angezeigt ist der Abschnitt des Immunoblots der entsprechenden Proben. Zur Detektion wurde gegen sHdrA gerichtetes Antiserum verwendet. Die Visualisierung des SDS-Gels erfolgte mit der StainFree Methode, die Visualisierung des Blots erfolgte durch Chemilumineszenz. Der Color Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa von New England Biolabs wurde als Größenstandard verwendet.

Sowohl der rot-orange Überstand nach der Ultrazentrifugation als auch der rötliche Durchfluss der HIC und die sHdrA enthaltende 300 mM Elutionsfraktion wurden einer Analyse durch UV/VIS-Spektroskopie unterzogen (Abbildung 20). Für alle drei Proben konnten, für reduzierte c-Typ Cytochrome charakteristische, Absorptionen bei 417 nm sowie bei 522 und 551 nm beobachtet werden. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation und die 300 mM Waschfraktion zeigten zudem eine Absorption bei 340 nm, die typisch für Pyrrolochinolinchinon (PQQ) bei einem pH-Wert von 7-8 ist (Suzuki *et al.* 1988; Dijkstra *et al.* 1989).

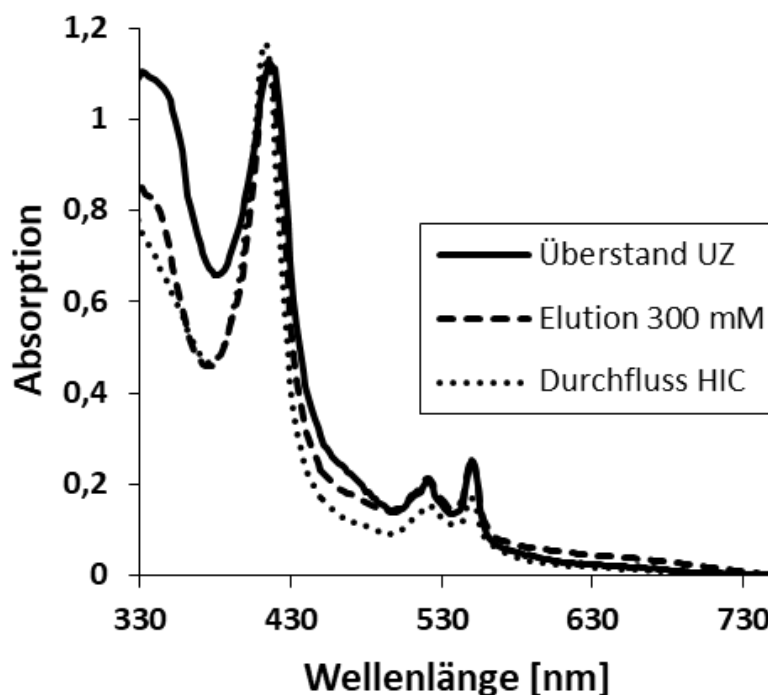


Abbildung 20: UV/VIS-Absorptionsspektrum ausgewählter Proben der HIC. Die Absorption wurde gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Spektren des Überstandes nach der Ultrazentrifugation (schwarze Linie), der Elutionsfraktion bei 300 mM Ammoniumsulfat (gestrichelte Linie) und des Durchflusses (gepunktete Linie) wurden in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und auf die Absorptionen bei 417 nm und 750 nm normiert.

4.2.2.4 Aufreinigung des sHdr-Komplexes über eine Anionenaustauschchromatographie (AEC)

Bei der AEC binden negativ geladene Proteine an die positiv geladenen quartären Ammoniumgruppen der stationären Phase, anschließend erfolgt durch eine steigende Konzentration von Natriumchlorid die Elution der gebundenen Proteine. Damit der

sHdr-Komplex an die Säule bindet, muss er mit einer negativen Nettoladung versehen sein; um dies sicher zu stellen, wurden die theoretischen isoelektrischen Punkte (pI) der einzelnen Untereinheiten bestimmt und in die Kalkulation entsprechend ihrer Stöchiometrie berücksichtigt (Tabelle 19). Die Kalkulation basierte auf einem heterohexameren sHdr-Komplex der Zusammensetzung sHdrAA'B1C1B2C2 (Diskussion, Kapitel 5.1). Unter diesem Gesichtspunkt ergibt sich ein pI von 6,70 für den sHdr-Komplex. Aus diesem Grund wurde ein 50 mM Tris-Puffer mit einem pH von 8,0 für das folgende Experiment verwendet.

Tabelle 19: Locus tag (KEGG) und theoretischer isoelektrischer Punkt (pI) der sHdr-Untereinheiten aus *H. denitrificans*, inklusive des postulierten heterohexameren Komplexes. Der pI wurde basierend auf der Primärsequenz aus KEGG durch ProtParam berechnet.

Untereinheit (Locus tag)	Theoretischer pI
sHdrC1 (Hden_0689)	4,55
sHdrB1 (Hden_0690)	6,81
sHdrA (Hden_0691)	6,40
sHdrC2 (Hden_0693)	8,08
sHdrB2 (Hden_0694)	7,98
sHdrAA'B1C1B2C2	6,70

Die sHdrA enthaltende Fraktion aus der HIC wurde gegen einen salzfreien Tris-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse zeigte die blass rosa Probe eine Trübung, woraufhin die präzipitierten Proteine abzentrifugiert wurden (Pellet). Der Überstand wurde auf eine HiScreen Q HP Säule aufgetragen und ein linearer Gradient von 0 mM – 300 mM Natriumchlorid gefahren (Abbildung 21 A). Nach dem Auftragen der Probe war eine rosafarbene Bande auf der Säulenmatrix zu erkennen, die bei 170 mM – 180 mM Natriumchlorid eluierte. Farblich auffällig war ebenfalls die Elutionsfraktion bei 150 mM Natriumchlorid, die eine gelbe Färbung aufwies. Die Immunoblotanalyse zeigte, dass während der Dialyse kein sHdrA präzipitiert war. Es konnte ein Signal für sHdrA unterhalb von 43 kDa in den Elutionsfraktionen mit 170 mM – 180 mM Natriumchlorid detektiert werden (Abbildung 21 B). Die gelbe Elutionsfraktion bei 150 mM Natriumchlorid zeigte im SDS-Gel, neben blassen Banden bei 72 kDa und zwischen 26 kDa und 34 kDa, eine intensivere Bande bei 55 kDa. Die laut Western Blot sHdrA enthaltenden Fraktionen zeigten

im SDS-Gel neben Banden bei 72 kDa und unterhalb von 55 kDa eine intensive Bande oberhalb von 17 kDa.

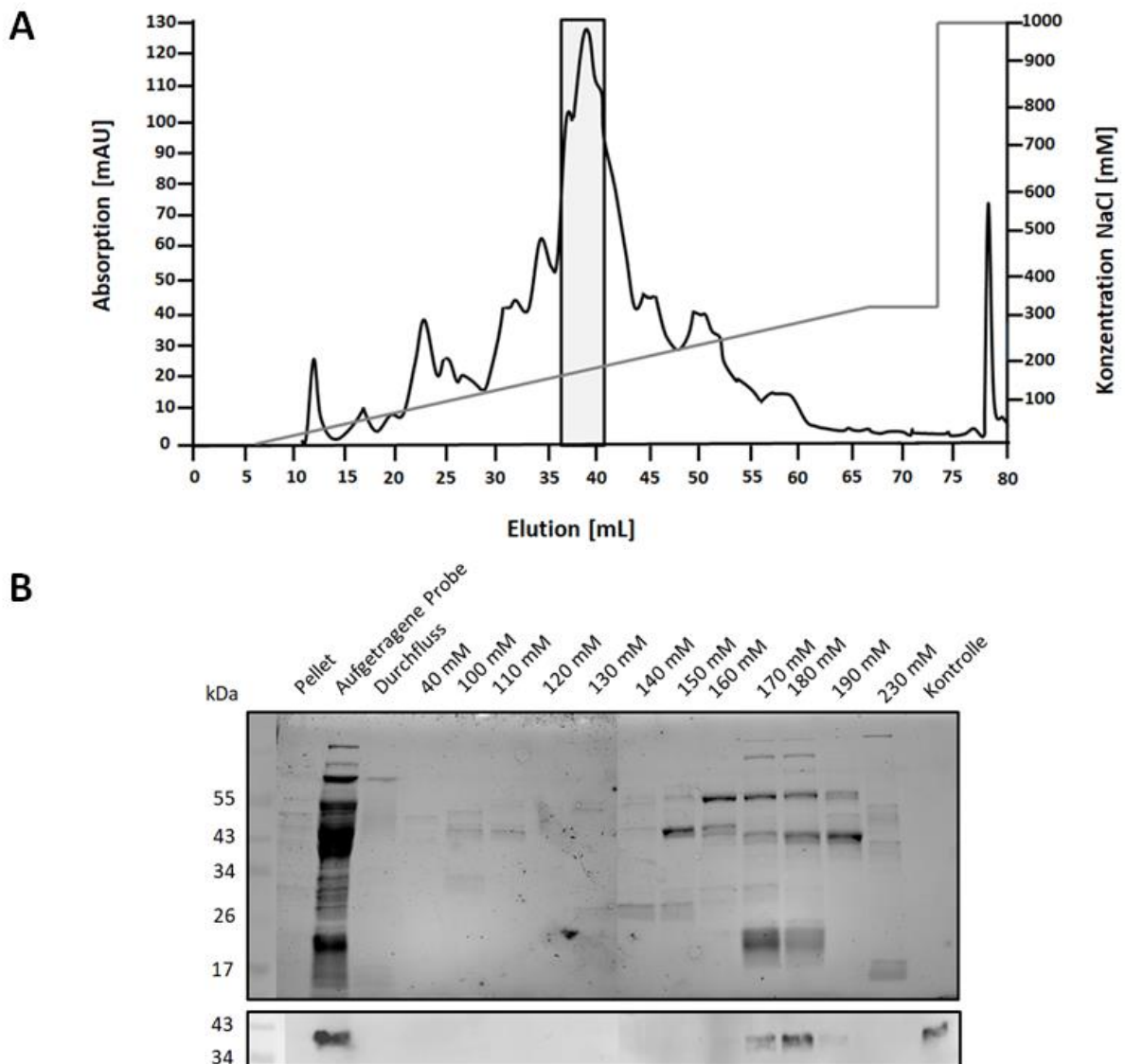


Abbildung 21: Elutionsprofil und anschließende SDS-PAGE sowie Immunoblot der Fraktionen einer AEC (HiScreen Q HP Säule). (A) Die Absorption bei 280 nm (schwarze Linie) und die Konzentration von Natriumchlorid (graue Linie) wurden gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die sHdrA enthaltenden Fraktionen sind durch einen hellgrauen Kasten gekennzeichnet. (B) Die während der Dialyse präzipitierten Proteine (Pellet), die löslichen Proteine nach der Dialyse (Überstand), der Durchfluss sowie verschiedene Proben des Gradienten der AEC wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (je 22,5 μ L). Darunter angezeigt ist der Immunoblot der entsprechenden Proben. Gegen sHdrA gerichtetes Antiserum wurde zur Detektion verwendet. Die Visualisierung des SDS-Gels erfolgte mit der StainFree Methode, die Visualisierung des Blots erfolgte durch Chemilumineszenz. Als Kontrolle wurde 1 μ g rekombinantes sHdrA verwendet. Der Color Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa von New England Biolabs wurde als Größenstandard verwendet.

Ein UV/VIS-Spektrum wurde von der gelben Elutionsfraktion bei 150 mM Natriumchlorid, sowie den vereinigten sHdrA enthaltenden, rosa farbigen Fraktionen bei 170 und 180 mM Natriumchlorid aufgenommen (Abbildung 22). Die gelbe Fraktion zeigte ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und eine Absorptionsschulter bei 370-420 nm. Diese charakteristischen Absorptionen wurden für die Methanoldehydrogenase aus *H. denitrificans* zusammen mit ihrem *in vivo* Elektronenakzeptor Cytochrom c_L gemessen (Dijkstra *et al.* 1989). Die rosa farbige Probe, die laut Immunoblot, sHdrA enthielt, zeigte ausschließlich die charakteristischen Absorptionen für ein reduziertes Cytochrom c_{551} bei 417 nm und 522 bzw. 551 nm. Die Elutionsfraktionen bei 170 – 180 mM Natriumchlorid der AEC wurden, aufgrund des Nachweises von sHdrA im Immunoblot, für die weitere Aufreinigung verwendet.

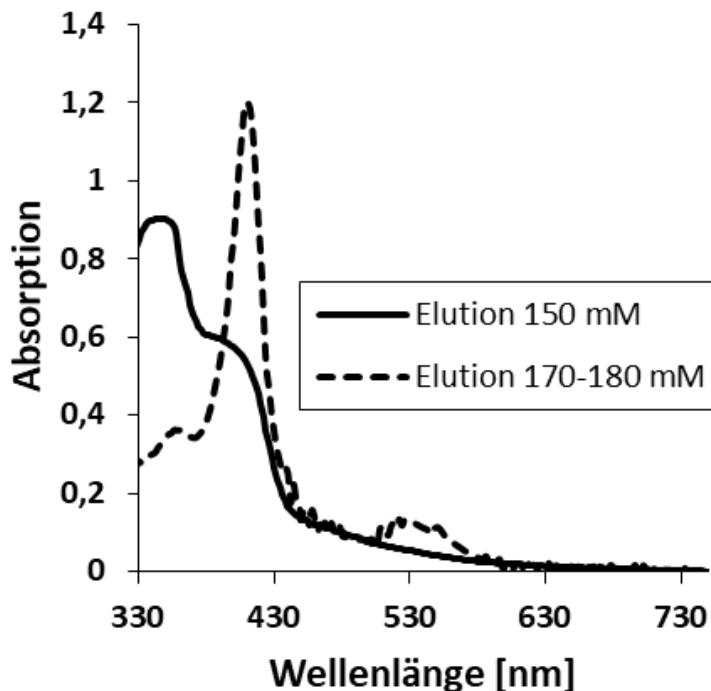


Abbildung 22: UV/VIS-Absorptionsspektrum der gefärbten Elutionsfraktionen der AEC. Spektren der gelblichen Fraktion bei 150 mM Natriumchlorid (schwarze Linie) und der vereinigten, sHdrA enthaltenden Fraktionen bei 170 und 180 mM Natriumchlorid (gestrichelte Linie) wurden aufgenommen. Die Spektren wurden in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und auf 750 nm normiert.

4.2.2.5 Aufreinigung des sHdr-Komplexes über eine keramische Hydroxylapatitsäule (CHT)

Zur weiteren Auftrennung der sHdrA enthaltenden Elutionsfraktionen wurde nach der AEC eine CHT-Chromatographie durchgeführt. Da die Elutionsfraktionen bei 170 mM Natriumchlorid (Probe1) und bei 180 mM Natriumchlorid (Probe 2) einen unterschiedlichen Grad an Heterogenität im SDS-Gel zeigten (Abbildung 21 B), wurden beide Fraktionen jeweils separat über eine Bio-Scale CHT Type I Säule aufgereinigt. Vor dem Auftragen wurden die Proben jeweils 1 : 5 mit 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt. Nach dem Durchfluss der nicht an die Säule bindenden Proteine, wurde ein linearer Gradient von 25 mM – 215 mM Natriumphosphat gefahren.

Der blassrosa farbene Durchfluss von Probe 1 zeigte zwei Absorptionsmaxima zwischen 12 und 16 mAU (Abbildung 23 A). Absorptionsmaxima bei 68, 110, 134 und 153 mM Natriumphosphat wurden im linearen Gradienten beobachtet. Im Western Blot zeigte die Elutionsfraktion bei 125 mM Natriumphosphat das stärkste Signal für sHdrA, zudem konnte ein schwaches Signal für sHdrA in den Elutionsfraktionen bei 115 mM und 134 mM Natriumphosphat beobachtet werden (Abbildung 23 B). Im SDS-Gel zeigte die 125 mM Elutionsfraktion von Probe 1 eine intensivere Bande bei 55 kDa. Eine, für sHdrA zu erwartende, Bande auf Höhe von 34 kDa, wie für die Positivkontrolle, war in den beschriebenen Elutionsfraktionen sehr blass zu erkennen.

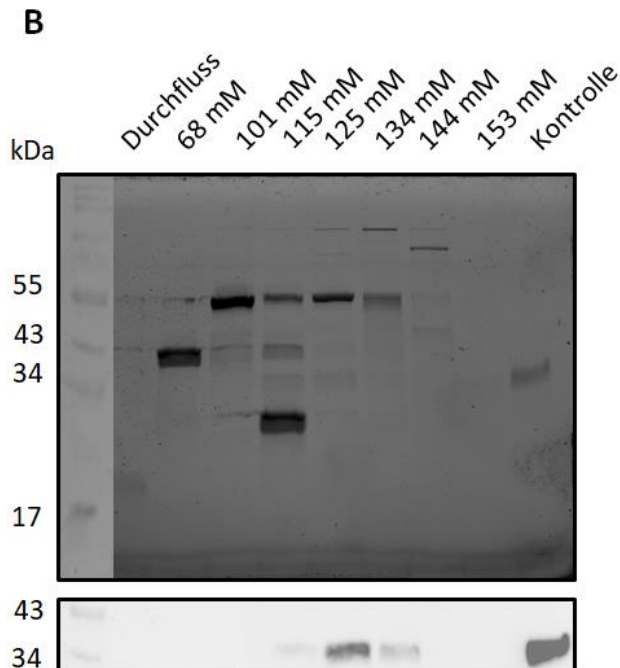
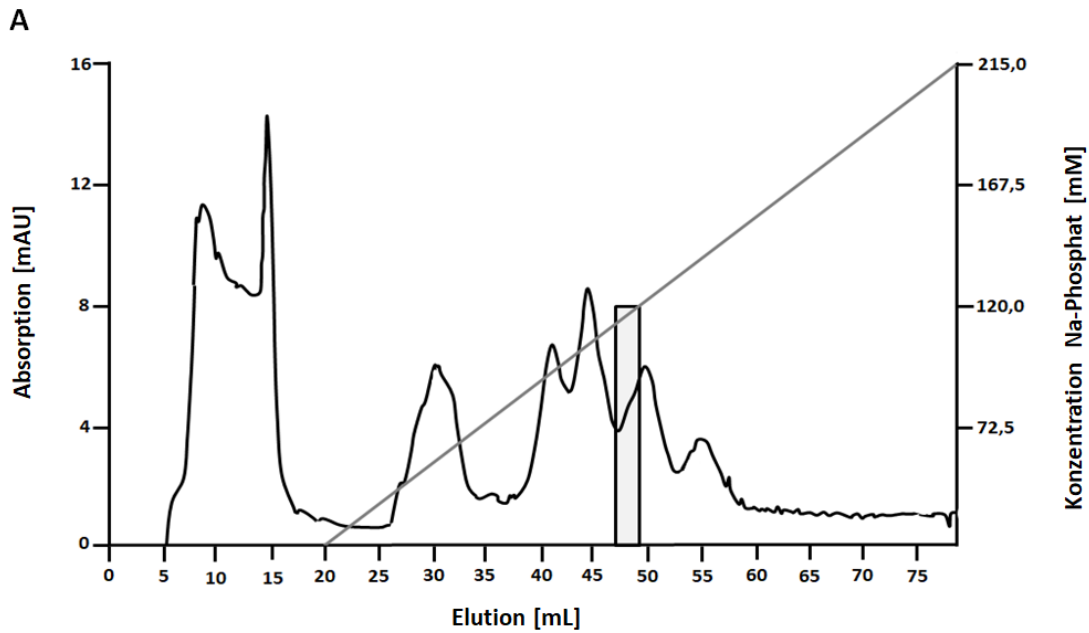


Abbildung 23: Elutionsprofil und anschließende SDS-PAGE sowie Immunoblot der Fraktionen der CHT-Chromatographie von Probe 1. (A) Elutionsprofil von Probe 1. Die Absorption bei 280 nm (schwarze Linie) und die Konzentration von Natriumphosphat (graue Linie) wurden gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die sHdrA enthaltenden Fraktionen sind durch einen hellgrauen Kasten gekennzeichnet. (B) SDS-Gel und Immunoblot von Probe 1. Im SDS-Gel sind der Durchfluss und die verschiedenen Proben des Gradienten aufgetragen (je 22,5 μ L), darunter angezeigt ist der Immunoblot der entsprechenden Fraktionen. Gegen sHdrA gerichtetes Antiserum wurde verwendet. Die Visualisierung des SDS-Gels erfolgte mit der StainFree Methode, die Visualisierung des Blots erfolgte durch Chemilumineszenz. Als Kontrolle wurden 2 μ g rekombinantes sHdrA verwendet. Der Color Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa von New England Biolabs wurde als Größenstandard verwendet.

Ein Absorptionsmaximum mit Schulter, wurde bei 14 mAU für den blassrosa gefärbten Durchfluss von Probe 2 detektiert (Abbildung 24 A). Das Chromatogramm zeigte im linearen Natriumphosphatgradienten nur ein prominentes Absorptionsmaximum im Elutionsbereich von 95–134 mM Natriumphosphat. Nach Durchführung der Chromatographie wurden der Durchfluss und ausgewählte Fraktionen der Aufreinigung jeweils per SDS-Gel und Western Blot untersucht (Abbildung 24 B). Im Western Blot zeigte die Elutionsfraktion bei 125 mM Natriumphosphat jeweils das stärkste Signal für sHdrA. Der Durchfluss zeigte im SDS-Gel eine auffällige Bande bei 17 kDa. Die laut Western Blot sHdrA enthaltenden Fraktionen von Probe 2 zeigten im SDS-Gel Banden bei 72 kDa und 55 kDa, wohingegen eine Bande auf Höhe der Positivkontrolle nicht beobachtet werden konnte.

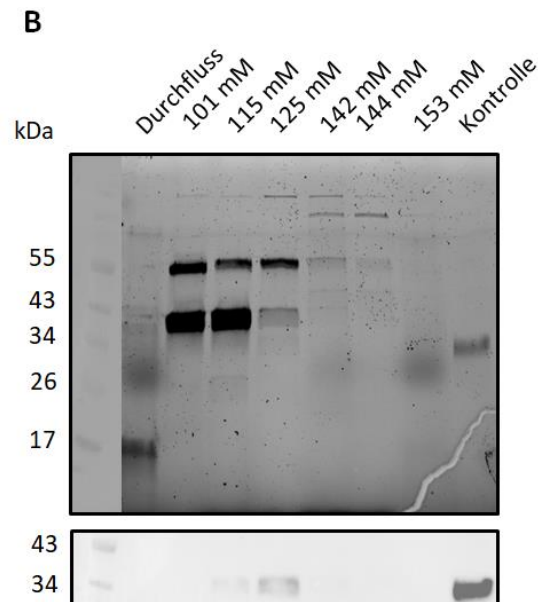
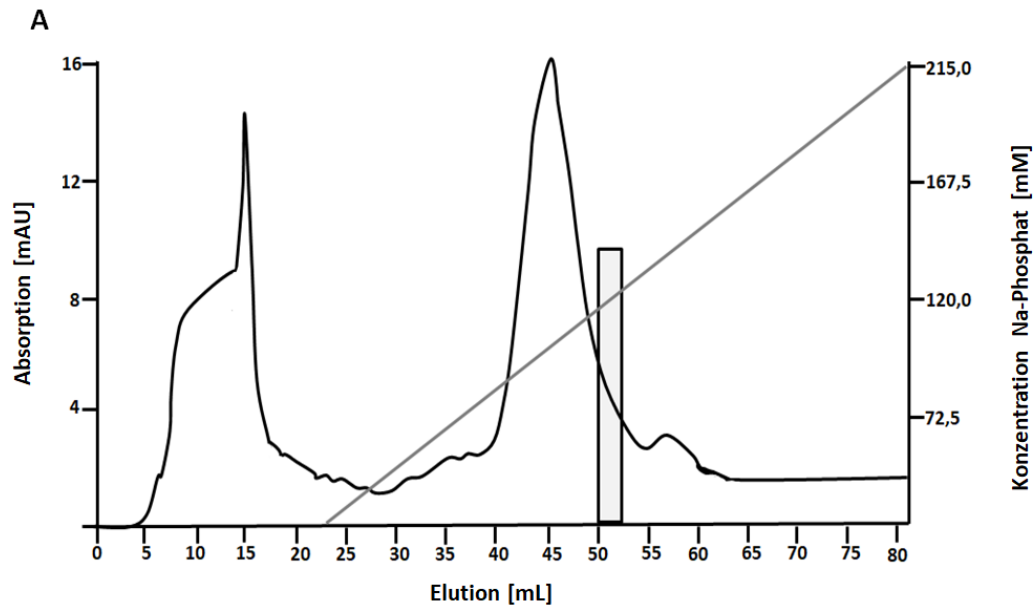


Abbildung 24: Elutionsprofil und anschließende SDS-PAGE sowie Immunoblot der Fraktionen der CHT-Chromatographie von Probe 2. (A) Elutionsprofil von Probe 2. Die Absorption bei 280 nm (schwarze Linie) und die Konzentration von Natriumphosphat (graue Linie) wurden gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die sHdrA enthaltenden Fraktionen sind durch einen hellgrauen Kasten gekennzeichnet. (B) SDS-Gel und Immunoblot von Probe 2. Im SDS-Gel sind die verschiedenen Proben des Gradienten aufgetragen (je 22,5 μ L), darunter angezeigt ist der Immunoblot der entsprechenden Fraktionen. Gegen sHdrA gerichtetes Antiserum verwendet. Die Visualisierung des SDS-Gels erfolgte mit der StainFree Methode, die Visualisierung des Blots erfolgte durch Chemilumineszenz. Als Kontrolle wurden 2 μ g rekombinantes sHdrA verwendet. Der Color Protein Standard, Broad Range 10-250 kDa von New England Biolabs wurde als Größenstandard verwendet.

Da die Durchflüsse von Probe 1 und 2 die einzigen Fraktionen mit Färbung während der CHT darstellten, wurde von diesen jeweils ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen (Abbildung 25). Das Spektrum des Durchflusses von Probe 1 zeigte charakteristische Absorptionen für ein c-Typ Cytochrom bei 417, 522 und 551 nm. Die gleichen Absorptionen, aber weniger ausgeprägt, zeigte der Durchfluss von Probe 2.

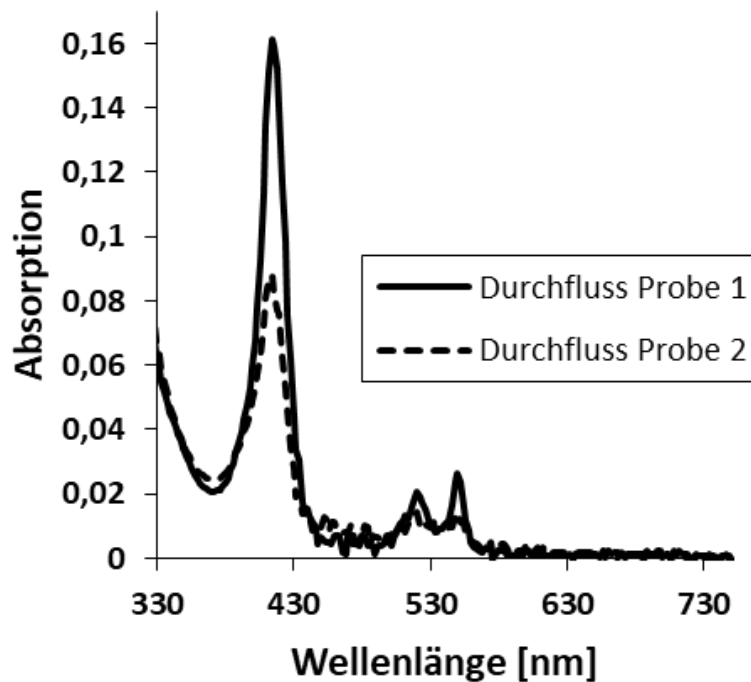


Abbildung 25: UV/VIS-Absorptionsspektren der Durchflüsse der CHT-Chromatographie. Die Spektren des Durchflusses von Probe 1 (schwarze Linie) und des Durchflusses von Probe 2 (gestrichelte Linie) wurden in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und auf 750 nm normiert.

Da die Fraktionen bei 125 mM – 134 mM Natriumphosphat der Probe 1 und die Elutionsfraktion bei 125 mM Natriumphosphat der Probe 2 die intensivsten Signale für sHdrA im Immunoblot zeigten (Abbildungen 23 B und 24 B), wurden diese vereinigt und unter Ausschluss von Sauerstoff auf ca. 50 μ L aufkonzentriert.

4.2.2.6 Massenspektrometrische Untersuchung der vereinigten sHdrA enthaltenden Proben

Etwa 30 μ L der aufkonzentrierten sHdrA enthaltenden Proben nach der CHT-Chromatographie, wurden entsalzt und anschließend jeweils 15 μ L auf ein SDS-Gel

geladen (Abbildung 26). Ein Gel wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt (Abbildung 26 A) und fünf Gelstücke herausgeschnitten, die anschließend tryptisch verdaut und per Massenspektrometrie untersucht wurden. Das andere Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt, um das Bandenmuster der Probe noch deutlicher sehen zu können (Abbildung 26 B). Gelstück 1 wurde unterhalb von 75 kDa ausgeschnitten und enthielt eine intensive Bande, die sowohl mit der Coomassie als auch der Silberfärbung zu beobachten war. Gelstück 2 wurde auf Höhe von 50 kDa ausgeschnitten, da sHdrB1 eine theoretische Größe von 52,3 kDa besitzt und eine blasse Bande für die Coomassiefärbung beobachtet werden konnte, die in der Silberfärbung deutlicher hervortrat. Gelstück 3 wurde zwischen 50 kDa und 37 kDa ausgeschnitten, da hier eine intensivere Bande im coomassiegefärbten Gel beobachtet werden konnte. Auf Höhe der 37 kDa Markerbande wurde Gelstück 4 ausgeschnitten, da sHdrA eine theoretische Größe von 37,7 kDa besitzt und für die geladene Kontrolle im silbergefärbten Gel eine Bande auf dieser Höhe beobachtet werden konnte. Gelstück 5 grenzte direkt an Gelstück 4 und umfasste den Bereich von 37 kDa bis knapp oberhalb von 25 kDa, denn hier wären sHdrC1, sHdrC2 und sHdrB2 mit jeweiligen molekularen Massen von 27,9 kDa, 29,9 kDa und 34,7 kDa zu erwarten.

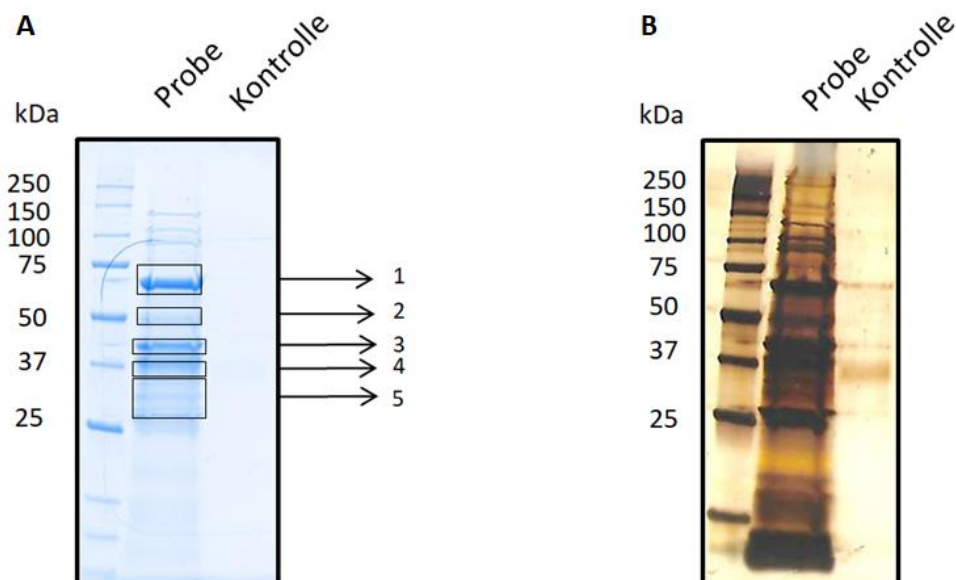


Abbildung 26: SDS-PAGE der vereinigten sHdrA enthaltenden Fraktionen der CHT. (A) Mit kolloidalem Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Die nummerierten Kästen markieren die für die Massenspektrometrie ausgeschnittenen Gelstücke. (B) Zu (A) analog beladenes, aber mit Silbernitrat gefärbtes SDS-Gel. Als Kontrolle wurde 1 µg rekombinantes sHdrA auf die Gele geladen. Der Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standard von Bio-Rad diente als Größenstandard.

Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass nicht alle sHdr-Untereinheiten detektiert werden konnten (Tabelle 20). Lediglich sHdrA wurde in den Gelstücken 4 und 5 gefunden, sowie sHdrB2 in Gelstück 5. Dies zeigte, dass kein vollständiger sHdr-Komplex aus *H. denitrificans* aufgereinigt werden konnte. Neben vielen anderen Proteinen (Anhang, Tabelle 1), wurde in den Gelstücken 1, 4 und 5 die Coenzym A Transferase (Hden_2747) mit einer theoretischen molekularen Masse von 69,8 kDa am häufigsten gefunden. Das häufigste Protein in Gelstück 2 war das Distickstoffmonoxid Helferprotein (Hden_2570) mit einer theoretischen Masse von 46,7 kDa. In Gelstück 3 wurde die Citrat-Synthase (Hden_1904) mit einer theoretischen molekularen Masse von 49,2 kDa am häufigsten gefunden.

Tabelle 20: Ausschnitt der massenspektrometrischen Analyse der unter 4.2.2.6 ausgeschnittenen Gelstücke. Für die Gelstücke 1-3 wurde das jeweils am häufigsten detektierte Protein angegeben, für die Gelstücke 4-5 zusätzlich die Häufigkeit der gefundenen sHdr-Untereinheiten.

Gelstück	Name Protein	Locus tag	Häufigkeit
1	Coenzym A Transferase	Hden_2747	$2,7 \times 10^{11}$
2	Distickstoffmonoxid Helferprotein	Hden_2570	$1,5 \times 10^{10}$
3	Citrat-Synthase	Hden_1904	$8,0 \times 10^{10}$
4	Coenzym A Transferase	Hden_2747	$3,7 \times 10^{10}$
4	sHdrA	Hden_0691	$3,6 \times 10^9$
5	Coenzym A Transferase	Hden_2747	$7,1 \times 10^{10}$
5	sHdrA	Hden_0691	$1,0 \times 10^{10}$
5	sHdrB2	Hden_0694	$1,6 \times 10^7$

Das in den Immunoblots detektierte sHdrA konnte durch Massenspektrometrie verifiziert werden sowie in geringerer Häufigkeit sHdrB2. Keine weiteren sHdr-Untereinheiten konnten in der Massenspektrometrie detektiert werden, sodass kein vollständiger sHdr-Komplex aus *H. denitrificans* Δ tsdA Δ shdrR aufgereinigt wurde.

4.3 Subzelluläre Lokalisation der sHdr-Untereinheiten A, C1, B1 und B2 in *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxidans*

Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass kein sHdr-Komplex aus *H. denitrificans* aufgereinigt werden konnte. Als alternativer Modellorganismus zum Erreichen dieses Ziels wurde *Thioalkalivibrio thiocyanoxydans* bestimmt. Dieser Organismus wächst obligat

chemolithoautotroph, ist genetisch mit einem sHdr-System ausgestattet und ist in der Lage reduzierte Schwefelverbindungen wie Thiosulfat zu oxidieren (Berben *et al.* 2019). Antiseren sollten gegen weitere sHdr-Untereinheiten generiert werden, um zum einen die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Untereinheiten in *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxidans* zu bestimmen und zum anderen bei zukünftigen Aufreinigungen des Komplexes die Möglichkeit zu besitzen bei jedem Reinigungsschritt zu prüfen, ob die Untereinheiten zusammen in einer Fraktion vorliegen.

4.3.1 Generierung von Antiseren gegen sHdrC1, sHdrB1 und sHdrB2

Wie unter Kapitel 4.1.9 beschrieben, war es nicht möglich die Proteine sHdrC1, sHdrB1 und sHdrB2 aus *H. denitrificans* heterolog in *E. coli* zu produzieren, wodurch es nicht möglich war entsprechende Antikörper gegen die aufgereinigten Proteine zu bilden, so wie es bei sHdrA der Fall ist (Koch & Dahl 2018). Eine weitere Möglichkeit Antiseren gegen die gewünschten Proteine aus verschiedenen Organismen zu bilden ist, statt eines gereinigten Proteins ein synthetisches Peptid zu verwenden. Durch ein Sequenzalignment wurden konservierte Aminosäuresequenzen zwischen den gewünschten Proteinen identifiziert, die lang genug (im Idealfall mindestens 10 Aminosäuren) und immunogen sind. Die Aminosäuresequenzen von sHdrC1, sHdrB1 und sHdrB2 aus *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxidans* wurden mit Clustal Omega abgeglichen und die Sequenzen mit geeigneter Länge wurden durch die Firma Eurogentec (Lüttich/Belgien) auf ihre Immunogenität geprüft.

Das Alignment von sHdrC1 lieferte zwei potentielle Sequenzen, von denen die Sequenz MQSAKDVL RPF als synthetisches Peptid genutzt wurde (Abbildung 27).

Hden_sHdrC1	MAHSETSRVQDFIGDPISEKPVVDRAELESIFNDIQTDIMRFDHELNGCLNCGICTATCPA	60
Tcyan_sHdrC1	-----MQQIFDDIRGDFRYDHELNGCLNCGICTATCPS .:.***:*. :*. :*****:	33
Hden_sHdrC1	AHYDFSPREIVQLLWTENLEGIYDAMQEKIWSCAQCYTCAARC PFNGSPGGLVMLMREV	120
Tcyan_sHdrC1	AQFYDYSPREIVQLLWTENVEQIYDAMQEKIWACAQCMTCARC PFKNSPGGLVAIMREV *.:.*. :*****. * *****. :***** ***** :****	93
Hden_sHdrC1	AIKHQMQSAKDVLRFPSRVMLKLITSTGNQLSPDMINPQHFA DWGPNISKVDAPLKVLRKA	180
Tcyan_sHdrC1	AIKHEMQSAKDVLRFPSRVMLKLITSTGNQLSPDMIQPDHF PDWGPNIQKVEGDLRILRKA *****. *****. *****. :*. * *****. *.:. :*****	153
Hden_sHdrC1	IPMATLNTTDTAWEVNLTSTVELYTIWEMSGVVNQLEGIDENLFDVISDIMSEKREDWKD	240
Tcyan_sHdrC1	IPVKTLQTVETAWEVSLKTSEVEMYTIWEMTGVLKSLELMDENLFDVIEDFIDEKREDYED ** : *.* :*****. *****. :*****. *.:. :*****. *.:. :*****. :*	213
Hden_sHdrC1	FLEDQDD----	247
Tcyan_sHdrC1	WLEEQEEDDE :***:*	224

Abbildung 27: Alignment der sHdrC1-Proteine von *H. denitrificans* (Hden) und *T. thiocyanoxydans* (Tcyan). Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt und mit einem Stern markiert. Die als synthetisches Peptid genutzte Sequenz ist eingerahmt. Zeichenerklärung: (:) chemisch vergleichbare Aminosäuren, (.) Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, () Aminosäuren ohne Ähnlichkeiten.

Für sHdrB1 konnten drei potentielle Sequenzen identifiziert werden, zwei mit einer Länge von 15 Aminosäuren und eine mit einer Länge von neun Aminosäuren. Die Sequenz VTKILGKLGRLVDGK wurde als synthetisches Peptid verwendet (Abbildung 28).

Hden_sHdrB1	-----MKSTGEPTGVGENDERFTGHGSEWRPTOLSPTQAQLATSWVEQK	44
Tcyan_sHdrB1	MSEQTPGNHNGEGAGACTMKPGFHNTDQGQIAGHGSFFQATDLSKEDAIKATDWRKH . * : ** . : * : : **** : : * : * * : * * . * . :	60
Hden_sHdrB1	IDRRSMLTSDKRVQVVRDAMWBLEKDGQIVVHRITDAHKPRMAKTL YGWDKKIPTNQLWH	104
Tcyan_sHdrB1	VDRRTI-DLGDTRMDIREHMYELEKDGQIIHRINDEHEPATVNTLFGWEKVPKQLWH :***: . * : * : * : : ***** : * * . * : * . : * : * : * : * : * : *	119
Hden_sHdrB1	HKSCGCGNIPGYEVSLLWLQNKLGI---SYLDETDQTSCTAWNYHSGGIGNIESLAAV	160
Tcyan_sHdrB1	HKSCGCGNIPGYETSLLWFMNKFGEFPGKDYLDETDQTSCTAWNYHSGGIGNIESLAAV *****. * : * : * . : *****. *****. *****	179
Hden_sHdrB1	FLRNFHQAAYVSAKALGLDPGHFPLVHCSTSFNGYKEVRYLLSSKLRES	220
Tcyan_sHdrB1	FLRNFHQAAYVSGKQHGHGHELGHFYPLVHCSTSFNGYKIRKYLVEVAELREK *****. * * : *****. *****. : * : * : * : * : * : * : * : *	239
Hden_sHdrB1	RLVDGKLLIPEEVHYSEWLHVRRDQV-NHQVLDCNSIRATIHFPACHYKMPQDVIYD	279
Tcyan_sHdrB1	RLVDGKLVIPPEIHYSEWVHVMRNRIASELQTIDVSNIRTTSHVACHYKMHEDAVYD *****. : * : * : * : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	299
Hden_sHdrB1	DEVLDGNRVAVSTGIVQALGANVIDYKTYDCCGFGFRHII SEREFTRSFARDRIKQVAV	339
Tcyan_sHdrB1	PSVLGGRNTAIIITTAQALGAQVIDYSTWYDCCGFGFRHII SEREFTRSFMTDRKIRVAR . * : * : * : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	359
Hden_sHdrB1	QEAKSDVMIGHDTGCITLTDKNQWISKAKGGAGYELFMADCF AALVCGADPYRIVQTH	399
Tcyan_sHdrB1	EEANADVMLANDTGCVTMDKNQWIKAHN-QNFQIPIMAEVQFAALVCGADPKIVQLQ : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	418
Hden_sHdrB1	WHASEIQLEKLGVDNQAkkADFEAYVEGIGQATPEQLYDRLRITSGPGFQPIRREV	459
Tcyan_sHdrB1	WHASECDLVEKMGISWDEAKKTFQEYLYLKEVEAGNI-EYLYNPELAYGKV----- ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	468
Hden_sHdrB1	IPPPPAE	466
Tcyan_sHdrB1	-----	468

Abbildung 28: Alignment der sHdrB1-Proteine von *H. denitrificans* (Hden) und *T. thiocyanoxydans* (Tcyan). Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt und mit einem Stern markiert. Die als synthetisches Peptid genutzte Sequenz ist eingerahmt. Zeichenerklärung: (:) chemisch vergleichbare Aminosäuren, (.) Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, () Aminosäuren ohne Ähnlichkeiten.

Zwei potentielle Sequenzen lieferte das Alignment für sHdrB2. Eine Sequenz hatte eine Länge von 10 konservierten Aminosäuren, die andere hatte eine Länge von 11 konservierten Aminosäuren. Zur Bildung des synthetischen Peptids wurde die längere Sequenz CGGAHTLSDS genutzt (Abbildung 29).

Hden_sHdrB2	MVDVTDKIMKYRDVAYYSGCALEGSANGYDVSTRAVAKSLGLRIKDVTWNCCGAMEVKN	60
Tcyan_sHdrB2	-----MAKVAYYPGCALEGSGGPYDRSTRVLVKALGLEMENLRDWNCCGAMEVKN	50
	.**** *..... . ** **..*:*:*:*:..: *****	
Hden_sHdrB2	IDPGLQTYLSSRVLSNAVNIDHANVVMAPCNGCYHNLKKAEDLTNDPKSKETVDRLSAK	120
Tcyan_sHdrB2	IHPMLQTYLSARNMAIASEQMGMDTVMAPCNGCYHNLKKAETATSQDAMNTVQDLARK	110
	. *.....* : : * : : .*****: :.. .: :*: * : *	
Hden_sHdrB2	AGHEAYQAGQAETIHALDWIKAAIGEEGLRKRKTGRLAGLKVANYGCMYVRPHIFPEK	180
Tcyan_sHdrB2	SDDP-VYTG DVRTLHLLEWLMEEELGPEGIKQKMTKSLNGIKIANYYGCMYTRPRQIFPEK	169
	:.. :*:.** *:* : * **::: . * *:*:*****.***:*****	
Hden_sHdrB2	DKGPGSESTSRPHFMDLLAAAGAENVEFPLKTACCGGAHTLSDSDTSTKLVLNIIQAAE	240
Tcyan_sHdrB2	DNGPGSDSSYQPHFMDLLGAAGAVNVDPYPLKTSCTCGGAHTLSDSDTSTQLVLNLLQSAE	229
	*:***:* : :*****.**** **::***:*****:*****:***:***:	
Hden_sHdrB2	ASGADVIA TECPTCHSGLEMHQVRAEKRFGKTRITMLYFTQLLGLLALGIGPRLGIHTN	300
Tcyan_sHdrB2	DSGAEVIA TECPTCHSGLEMHQVRAETEFGIKTDVKVLYFTQLLGLLGLAMGLSPRKLGIHEN	289
	:**:*****.*** ** :.:*****:*.**:*:* *	
Hden_sHdrB2	ISDSTDLIIDKRLT 314	
Tcyan_sHdrB2	VSDSIGLLKEKGI 303	
	:*** .*: :* :	

Abbildung 29: Alignment der sHdrB2-Proteine von *H. denitrificans* (Hden) und *T. thiocyanoxydans* (Tcyan). Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt und mit einem Stern markiert. Die als synthetisches Peptid genutzte Sequenz ist eingerahmt. Zeichenerklärung: (:) chemisch vergleichbare Aminosäuren, (.) Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, () Aminosäuren ohne Ähnlichkeiten.

Für sHdrC2 (Hden_0693) konnte keine immunogene Aminosäuresequenz identifiziert werden (Daten nicht gezeigt), weshalb für dieses Protein kein Antiserum gebildet wurde.

4.3.2 Subzelluläre Lokalisation des sHdr-Komplexes mittels Immunoblots

Bislang konnte einzig aus dem Organismus *Aquifex aeolicus* der sHdr-Komplex aufgereinigt werden und zeigte in diesem Organismus eine Membranassoziation (Boughanemi, 2016). Ein immunologischer Nachweis mit einem gegen sHdrA gerichteten Antikörper zeigte, dass dieses Protein in *H. denitrificans* löslich vorliegt (Koch & Dahl 2018). Im photolithotrophen Organismus *Thiorhodospira sibirica* dagegen wurde das sHdrA-Protein in der Membranfraktion detektiert (Löckener 2016). Mit den unter 4.3.1 gebildeten Antiseren, sollte die subzelluläre Lokalisation der Proteine sHdrA, sHdrC1, sHdrB1 und sHdrB2 in den Organismen *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans* bestimmt werden. Dazu wurden die

Zellen per Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Durch einen anschließenden Ultrazentrifugationsschritt wurde die Membranfraktion von den löslichen Proteinen abgetrennt. Die resuspendierten Membranen und der lösliche Überstand wurden zusammen mit den resuspendierten *E. coli* Pellets der jeweiligen rekombinanten Produktionen von sHdrC1, sHdrB1 und sHdrB2 (Kapitel 4.1.9) bzw. aus *E. coli* aufgereinigtem sHdrA als Positivkontrollen, auf ein SDS-Gel geladen und anschließend geblottet.

Der Western Blot zeigte für sHdrA aus *H. denitrificans* ausschließlich in der löslichen Fraktion ein Signal auf Höhe der Positivkontrolle (Abbildung 30). Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis aus Kapitel 4.2.2.1 und der Literatur (Koch & Dahl 2018).

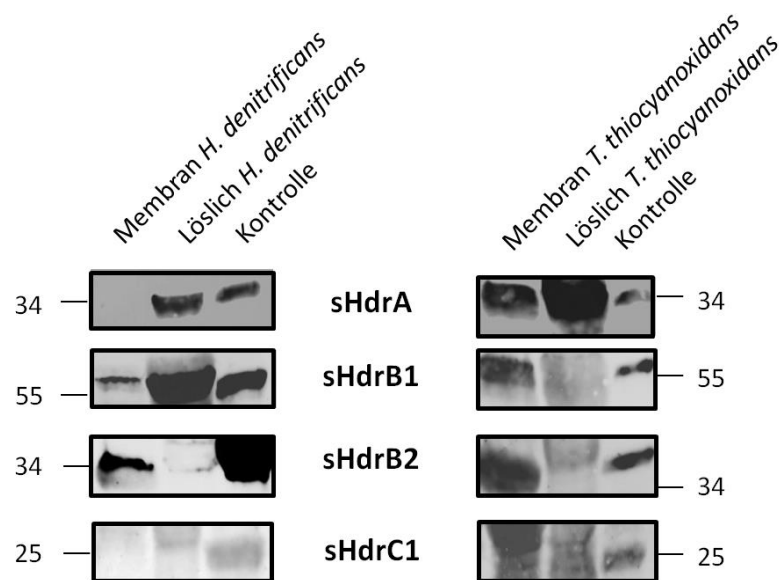


Abbildung 30: Western Blot zur subzellulären Lokalisation von sHdrA, sHdrB1, sHdrB2 und sHdrC1 aus *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans*. Jeweils 98 µg der resuspendierten Membranen von *H. denitrificans* und 74 µg der resuspendierten Membranen von *T. thiocyanoxydans* wurden aufgetragen. Jeweils 26 µg der löslichen Fraktion von *H. denitrificans* und 23,5 µg der löslichen Fraktion von *T. thiocyanoxydans* wurden aufgetragen. Als Kontrolle dienten im Falle von sHdrB1, sHdrB2 und sHdrC1 die resuspendierten Membranen der rekombinanten Produktionsansätze aus *E. coli*. Die Positivkontrolle für sHdrA war das aufgereinigte Protein, das rekombinant in *E. coli* produziert wurde. Die Detektion erfolgte per Chemilumineszenz. Die Membranen wurden für 5 min belichtet.

Für *T. thiocyanoxydans* wurden für sHdrA sowohl in der Membran als auch in der löslichen Fraktion Signale detektiert. Für sHdrB1 wurde für *H. denitrificans* ein starkes Signal in der löslichen Fraktion sowie ein schwächeres Signal in der Membranfraktion detektiert. Dagegen wurde in *T. thiocyanoxydans* ausschließlich in der Membranfraktion ein Signal für sHdrB1

beobachtet. Die Untereinheit sHdrB2 zeigte sowohl für *H. denitrificans* als auch *T. thiocyanoxydans* ein Signal in der Membranfraktion. Im Fall von sHdrC1 konnten keine eindeutigen Signale für *T. thiocyanoxydans* detektiert werden und für *H. denitrificans* wurde in beiden Fraktionen kein Signal auf Höhe der entsprechenden Positivkontrolle beobachtet. Stattdessen wurden mit dem, gegen ein immunogenes Peptid aus sHdrC1 gerichteten, Antiserum mehrere unspezifische Signale ober- und unterhalb der Positivkontrolle detektiert (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Fermentation von *T. thiocyanoxidans*

Um zukünftig den nativen sHdr-Komplex aus *T. thiocyanoxydans* aufzureinigen zu können, müssen größere Mengen an Zellmaterial generiert werden. Hierfür wurde ein Protokoll zur Fermentation des Modellorganismus *T. thiocyanoxydans* etabliert. Der haloalkaliphile Organismus wurde in Carbonat gepuffertem Medium bei pH 10 kultiviert und Thiosulfat wurde als Elektronenquelle genutzt.

Eine 500 mL Vorkultur von *T. thiocyanoxidans* wurde genutzt um 4,5 L in einem 5L fassenden Fermenter zu beimpfen (Abbildung 31). Dem Medium wurde zusätzlich Hefeextrakt zugefügt, weil sich dieses wie in der Literatur beschrieben (Sorokin *et al.* 2002) als stimulierend für den Organismus bestätigte (Daten nicht gezeigt). Das Wachstum startete mit einer OD von 0,08 und einer Thiosulfatkonzentration von 40 mM. Nach 27 h und einer OD von 0,48, war die anfängliche Thiosulfatkonzentration bis auf 2mM abgebaut und es erfolgte eine erneute Zugabe von 40 mM Thiosulfat. Nach 50 h war die Thiosulfatkonzentration bis auf 2 mM verbraucht, bei einer OD von 0,71. Es folgte eine Zugabe von 40 mM Thiosulfat, das nach 73 h und einer OD von 1,25 auf 18,4 mM abgebaut war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und die 10 g Zellmaterial unter Sauerstoffausschluss bei -20 °C gelagert. In weiteren Fermentationen des Organismus, bildete dieser unter dem Mikroskop sichtbare, externe Schwefelkugeln (Daten nicht gezeigt), wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Sorokin *et al.* 2002).

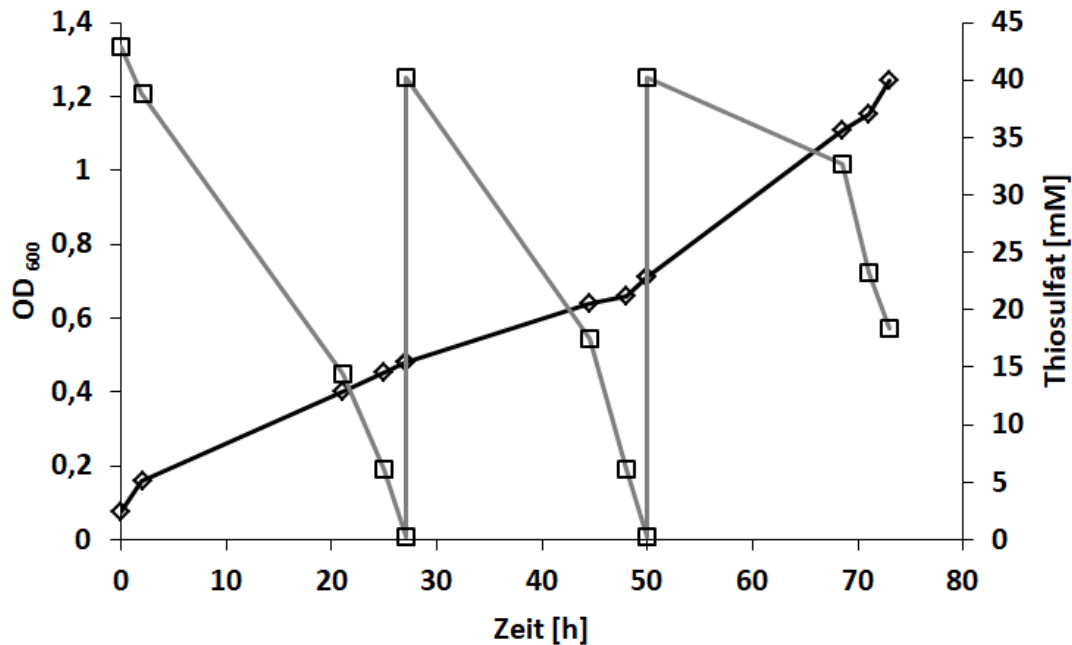


Abbildung 31: Wachstumskurve von *T. thiocyanoxidans* in einem Fermenter. 4,5 L Carbonat-Medium wurden mit 500 mL einer *T. thiocyanoxydans*-Vorkultur angeimpft. Die OD und die Thiosulfatkonzentration wurden gegen die Zeit aufgetragen. Die OD bei 600 nm (weiße Raute) wurde in regelmäßigen Zeitpunkten gemessen, um die Wachstumskurve (schwarze Linie) zu bestimmen. Die Thiosulfatkonzentration (weiße Quadrate) wurde ebenfalls regelmäßig gemessen, um den Thiosulfatverbrauch (graue Linie) zu bestimmen.

4.4 Lokalisation von sHdrH und phänotypische Charakterisierung einer $\Delta shdrH$ -Mutante

Das konservierte sHdr-Gencluster enthält das Gen *shdrH*, das zwischen den Genen *shdrA* und *shdrC2* vorliegt (Quatrini *et al.* 2009; Koch & Dahl 2018). Das darüber kodierte Protein sHdrH ist in der Datenbank KEGG als hypothetisches Protein annotiert und weist keine größeren Ähnlichkeiten zu bisher charakterisierten Proteinen auf. Bei der Aufreinigung des sHdr-Komplexes aus *A. aeolicus*, stellte sHdrH keinen Bestandteil des selbigen dar (Boughanemi *et al.* 2016). Proteomanalysen verschiedener Organismen führten zu gegensätzlichen Ergebnissen, ob sHdrH beim Wachstum auf schwefelhaltigen Komponenten verstärkt exprimiert wird (Koch & Dahl 2018; Watanabe *et al.* 2019). Da bislang keinerlei Informationen zur Bedeutung des Gens *shdrH* und kaum biochemische Daten zu dem Protein sHdrH vorliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Phänotyp der *in frame*

Deletionsmutante *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *sHdrH* untersucht und die subzelluläre Lokalisation des Proteins sHdrH im obligaten Schwefeloxidierer *T. thiocyanoxydans* ermittelt.

4.4.1 Subzelluläre Lokalisation von sHdrH in *T. thiocyanoxydans*

Die Aminosäuresequenzen von sHdrH aus *H. denitrificans*, *T. thiocyanoxidans* und *Thioalkalivibrio* sp. K90mix (*T. K90mix*) wurden durch Clustal Omega abgeglichen. *T. K90mix* wurde ebenfalls ins Alignment mit einbezogen, da bereits ein Plasmid zur rekombinanten Produktion dieses Proteins vorlag (pASKIBA3+TK90_0635, Tabelle 7). Das rekombinant produzierte sHdrH aus *T. K90mix* diente im Folgenden als Positivkontrolle. Die anschließende subzelluläre Lokalisation des Proteins in *T. thiocyanoxydans* erfolgte durch immunologische Analyse des Proteinextrakts und der abzentrifugierten Membranfraktion.

Aufgrund einer sehr geringen Sequenzübereinstimmung zwischen sHdrH aus *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans* von 25 %, konnte kein konserviertes Peptid mit ausreichender Länge (mindestens 10 Aminosäuren) identifiziert werden, um ein Antiserum für beide Proteine zu erstellen (Abbildung 32). Da in Zukunft der sHdr-Komplex aus *T. thiocyanoxydans* aufgereinigt werden soll, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Eurogentec (Lüttich/Belgien) ein Antiserum erstellt, das gegen sHdrH aus *T. thiocyanoxydans* gerichtet ist. Das Alignment zeigte eine große Übereinstimmung zwischen den Sequenzen von *T. thiocyanoxydans* und *T. K90Mix*. Das synthetische Peptid AFADLAGDDKKLRRG wurde zur Generierung des Antiserums verwendet, um es ebenfalls gegen sHdrH aus *T. K90Mix* verwenden zu können.

Hden_sHdrH	-----MVL _S SVATNTPESLSRP-SLELSG E KLRLAVDALVHA---C	36
Tcyan_sHdrH	MPPPVVAR S RTC M RWFRKPAE V VSD- E AAPGVNPEPLQVTFDQ E ILATKLNSLNEAIAEA	59
Tk90_sHdrH	----- M RWFRKPAE V VSD- E AASGVNPEPLQVTFDQ E ILATKLNSLNEAIAEA	47
	*: * : .* .: .: * * :::* .* .	
Hden_sHdrH	EEIGGI E RFAAAVQLKSDVFRERLAAGAAERLELTA F DEL T PLMATV R TRIGKQIEQQGW	96
Tcyan_sHdrH	GGVDG L ET F IEALRSKHEV F AGV V AKGDDM--DAEDL R TLAGLV F AVRRKLAS V MGERQG	117
Tk90_sHdrH	GGVDG L ET F IEALRA K HEV F AAT V AKGDEM--DAEDL R I L GG L V F AVRRKL A G V MAERQG	105
	:.:* * *:.: * ::* * * : : * *: ::* :.: : ::	
Hden_sHdrH	NKIRSAIAE L LADAHV P DTGDARIAR F CKH F VPV-GKD T R F VR D FA S ELLHN V Y P ELY P LM	155
Tcyan_sHdrH	A-LVDG M RALV---RPDAD L D S RLA A FADLAGDD K KLRR G F W DF G AEILHFAD P ET V PLA	173
Tk90_sHdrH	A-LVDG M RALV---RPD T DLAS R LT A FADLAGDD K KLRR G I W DF G AEILHFAD P ET V PLA	161
	: .: * : : : : * . * * * . * * : * * * * * **	
Hden_sHdrH	SRWV D AKVNT G VLREI W HAENVDH V VID I PD N Q S T F L C LR E EL S Q F LS G Y G IF R D M LW Y	215
Tcyan_sHdrH	TRW V DT G TT G AL R E F IR G ND T LR-S I PI G ET V GA I E G ARR W F Y DALAE E G F Y R DL P FW	232
Tk90_sHdrH	TRW V DT G TT G AL R E F IR G ND T LR-S I PI G ET V GA I E G ARR W F Y EALAE E G F Y R DL P FW	220
	:*****: ..**.****: :.:. : * * .: .: * . : : * : *: :*****: :	
Hden_sHdrH	V D LLCAQ I Y G DY I NAQ G S--Y L RS D F S SAP N PLE Q TR R I L GL D RVGR S PD R GN V ID A VT	273
Tcyan_sHdrH	T D LV W VQ A Y S D Y AR S LS M SL G MI D N Q FG A K Q D P LE L GV K LL G IDS P E G RL K G---H D AS L	289
Tk90_sHdrH	T D LV W VQ A Y S D Y AR S LS M SL G MI D N Q FG A K Q D P LE L GV K LL G IDS S E G RL K G---H D AS L	277
	.**: .* *.*** .: . * : .:*.: :*** ::**:* . **	
Hden_sHdrH	HPLAIKH I H 282	
Tcyan_sHdrH	H----- 290	
Tk90_sHdrH	H----- 278	
	*	

Abbildung 32: Alignment der sHdrH-Proteine von *H. denitrificans* (Hden), *T. thiocyanoxydans* (Tcyan) und *Thioalkalivibrio* K90 Mix (Tk90). Konservierte Aminosäuren sind grau hinterlegt und mit einem Stern markiert. Die als synthetisches Peptid genutzte Sequenz ist eingerahmt. Zeichenerklärung: (:) chemisch vergleichbare Aminosäuren, (.) Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, () Aminosäuren ohne Ähnlichkeiten.

Zellmaterial aus der Fermentation von *T. thiocyanoxydans* wurde per Ultraschall aufgeschlossen und unter Sauerstoffausschluss durch Zentrifugation von den Zelltrümmern getrennt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Membranen und der löslichen Proteinfraktion durch Ultrazentrifugation. Sowohl die resuspendierten Membranen als auch der lösliche Überstand wurden auf ein SDS-Gel geladen und anschließend per Western Blot analysiert. Als Positivkontrolle diente rekombinant in *E. coli* produziertes sHdrH aus *T. K90mix*. Zur Detektion von sHdrH wurde das zuvor erstellte Antiserum aus Kaninchen verwendet. Der Immunoblot zeigte ein Signal für sHdrH unterhalb von 34 kDa, auf Höhe der Positivkontrolle, in der Membranfraktion, aber kein Signal für die lösliche Fraktion (Abbildung 33).

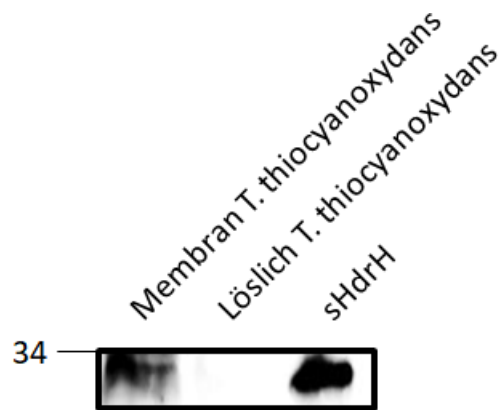


Abbildung 33: Immunoblot zur subzellulären Lokalisation von sHdrH aus *T. thiocyanoxydans*. 74 µg der resuspendierten Membranen nach der Ultrazentrifugation und 23,5 µg des löslichen Überstandes wurden aufgetragen. Als Kontrolle diente rekombinant in *E. coli* produziertes sHdrH aus *T. K90mix*. Die Detektion erfolgte per Chemilumineszenz. Die Membran wurde für 5 min belichtet.

4.4.2 Phänotypische Charakterisierung der Mutante *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *shdrH*

Das Protein sHdrH aus *T. thiocyanoxydans* konnte durch einen Immunoblot in der Membran des chemolithotrophen Organismus nachgewiesen werden. Als nächstes wurde die Frage adressiert, ob eine *in frame* Deletion des hochkonservierten *shdrH* Gens eine phänotypische Auswirkung auf die Thiosulfatoxidationskapazität des Organismus *H. denitrificans* hat. Die Erstellung der Mutante erfolgte durch homologe Rekombination, unter Verwendung des Plasmids pK18*mobsacB* Δ *shdrHTc* durch Frau Aynur Mancoglu. Wie bereits zuvor erwähnt, handelt es sich bei *H. denitrificans* um einen Organismus, dessen sHdr-System über Thiosulfat gezielt induziert werden kann (Koch & Dahl 2018). Die phänotypische Charakterisierung des Stamms *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *shdrH* erfolgte deshalb durch einen Wachstumsversuch mit Thiosulfat. Als Referenz wurde der Phänotyp des Wildtyps unter gleichen Bedingungen untersucht (in derselben Platte, gemessen und ausgewertet von Frau Alina Ballas). Die Stämme wurden bereits in der Vorkultur mit 2 mM Thiosulfat vorinduziert und auch das Medium der Hauptkultur enthielt 2 mM Thiosulfat. Die OD der Hauptkultur wurde automatisch durch das Plattenlesegerät gemessen (Abbildung 34 A) und zu definierten Zeitpunkten erfolgte die Messung der Thiosulfatmenge mittels eines kolorimetrischen Assays (Abbildung 34 B).

Beide Stämme besaßen eine Start-OD von 0,025. Die Wachstumskurven zeigten, dass beide Stämme sich von Beginn des Versuches an in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und nach 27 h die stationäre Wachstumsphase erreichten. Die $\Delta shdrH$ -Mutante erreichte eine finale OD von 0,52 und der Wildtyp eine OD von 0,39. Zur Untersuchung der Thiosulfatoxidationskapazität wurden über einen Zeitraum von 90 h Proben entnommen und die Thiosulfatkonzentration bestimmt. Beide Stämme fingen erst nach 16 h an, das Thiosulfat zu oxidieren. Der Wildtyp oxidierte die Hälfte der ursprünglichen Thiosulfatmenge nach 22 h und hatte nach 48 h sämtliches Thiosulfat abgebaut. Ein vollständig anderes Oxidationsverhalten zeigte die $\Delta shdrH$ -Mutante. Diese benötigte 40 h, um die Hälfte des Thiosulfats abzubauen. Nach 64 h verblieb eine Endkonzentration von ca. 0,49 mM Thiosulfat bis zum Versuchsende im Medium.

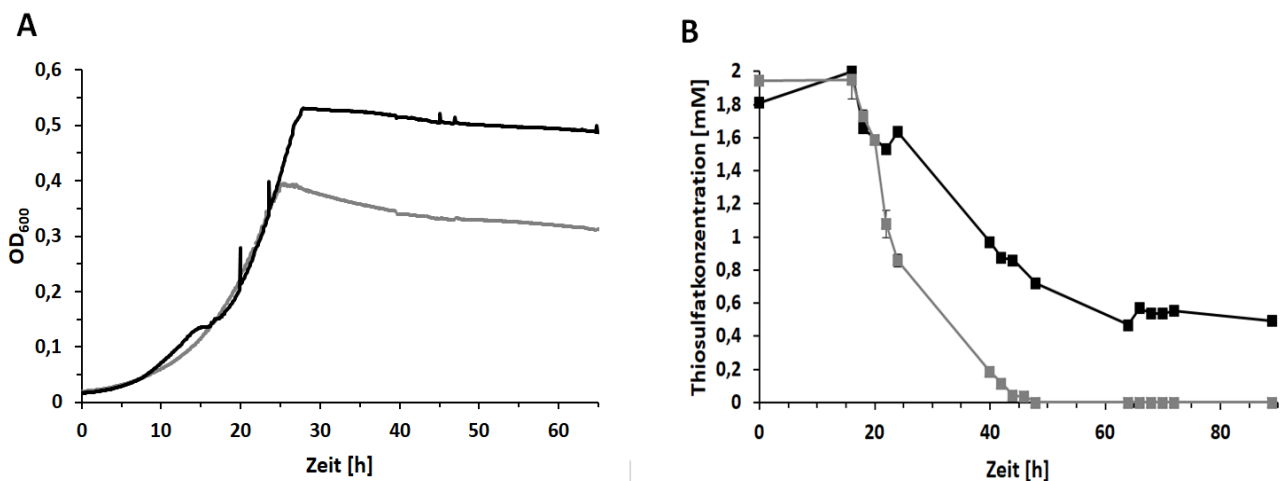


Abbildung 34: Phänotypische Charakterisierung des Wildtyps und der Mutante $\Delta shdrH$. (A) Vergleich der Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutante. Die OD wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Wachstumskurve des Wildtyps ist in grau und die Wachstumskurve der Mutante ist in schwarz dargestellt (B) Vergleich des Thiosulfatabbaus des Wildtyps und der Mutante. Die gemessene Thiosulfatkonzentration wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Abbaukurve des Wildtyps ist in grau dargestellt, die der Mutante in schwarz. Die Messung und Auswertung der Wildtyp-Daten erfolgte durch Frau Alina Ballas.

Für einen quantitativen Vergleich der Thiosulfatoxidationskapazität des Wildtyps (Ballas 2021) und der Mutante, wurde die spezifische Thiosulfatoxidationsrate berechnet, in die der Proteingehalt der Zellen mit einbezogen wird. Die spezifische Thiosulfatoxidationsrate lag beim Wildtyp bei $766,2 \pm 281,9$ [nmol/(mg*h)] und für die Mutante bei $71,96 \pm 0,77$ [nmol/(mg*h)].

Die Deletion des Gens *shdrH* hatte somit in *H. denitrificans* einen erheblichen Einfluss auf die Thiosulfatoxidationsfähigkeit des Organismus.

5 Diskussion

Die mikrobiologische Dissimilation von Schwefelverbindungen ist einer der evolutionär ältesten Stoffwechsel und von größter Bedeutung für den globalen biogeochemischen Schwefelkreislauf (Shen *et al.* 2001). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein Heterodisulfidreduktase-ähnlicher (sHdr)-Komplex essentiell für die Schwefeloxidation in einer Vielzahl ökonomisch und biotechnologisch relevanter Bakterien und Archaeen ist (Quatrini *et al.* 2009; Boughanemi *et al.* 2016; Koch & Dahl 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur der FAD und [4Fe-4S]-Cluster enthaltenden Untereinheit sHdrA gelöst und die Redoxpotentiale der Cofaktoren bestimmt. Zudem konnte der erste direkte Nachweis des Proteins sHdrH in dem chemolithoautotrophen Organismus *Thioalkalivibrio thiocyanoxydans* erbracht und die Bedeutung des Gens *shdrH* durch Wachstumsversuche in *Hyphomicrobium denitrificans* gezeigt werden.

5.1 Struktur und Redoxeigenschaften der Untereinheit sHdrA

Das Protein sHdrA zeigt hohe Ähnlichkeiten zur mHdrA-Untereinheit, die das Herzstück des bifurkierenden mHdr-Komplexes ausmacht. Im Folgenden werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen sHdrA und mHdrA erläutert. Anschließend wird anhand der Proteinstruktur und Redoxpotentiale der Cofaktoren diskutiert, ob es sich bei sHdrA ebenfalls um ein bifurkierendes Enzym handelt.

Die über ein FAD koordinierte Kopplung einer exergonen mit einer endergonen Reaktion, um die thermodynamische Barriere der endergonen Reaktion zu überwinden, wird FBEB genannt (Buckel & Thauer 2018). Die FBEB stellt neben der Substratphosphorylierung und der Elektronentransportphosphorylierung eine weitere Form der biologischen Energiekonservierung dar (Peters *et al.* 2016). Bifurkierende Enzyme koppeln die Reduktion eines Elektronenakzeptors mit niedrigem und eines weiteren Elektronenakzeptors mit hohem Redoxpotential, mit der Oxidation eines Elektronendonators mit intermediärem Redoxpotential (Peters *et al.* 2016). Wie der Name bereits zeigt, spielt FAD als Cofaktor bei dieser Form der Energiekonservierung eine zentrale Rolle. Dies erklärt sich damit, dass FAD als Zwei-Elektronen-Akzeptor/Donator auftreten und drei verschiedene Oxidationstufen

einnehmen kann. Die höchst oxidierte Form stellt Flavochinon dar ($Ox = 0$), gefolgt vom partiell reduzierten Semichinon ($Ox = -1$) und dem vollständig reduzierten Hydrochinon ($Ox = -2$). Entscheidend für die FBEB ist, dass das Redoxpotential des Redoxpaares Flavochinon/Semichinon deutlich negativer ist als das Redoxpotential des Redoxpaares Semichinon/Hydrochinon. Diese gekreuzten Redoxpotentiale führen zu einer thermodynamischen Instabilität des Semichinons (Nitschke & Russell 2012). Die daraus resultierende Konsequenz ist, dass das Reduktionspotential des Hydrochinons niedriger als die des Semichinons ist (Nitschke & Russell 2012). Das erste, vom Hydrochinon stammende, Elektron fließt in einer exergonen Reaktion zum Elektronenakzeptor mit hohem Redoxpotential. Das zweite Elektron, vom instabilen Semichinon stammend, fließt zum Elektronenakzeptor mit niedrigem Redoxpotential. Um einen Kurzschluss zu vermeiden, müssen die Akzeptoren der energetisch unterschiedlichen Elektronen räumlich weit genug entfernt sein (Kayastha *et al.* 2021).

In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass der mHdr-Komplex die exergone Oxidation zweier Moleküle Wasserstoff ($E^{0'} = -414 \text{ mV}$) und die Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB ($E^{0'} = 140 \text{ mV}$) mit der endergonen Reduktion von Ferredoxin ($E^{0'} = \sim -500$) koppelt (Kaster *et al.* 2011). Für die FBEB im mHdr-Komplex ist das durch mHdrA gebundene FAD entscheidend, denn an diesem Cofaktor erfolgt die Aufspaltung eines hochenergetischen Elektrons und eines niederenergetischen Elektrons (Buckel & Thauer 2013, 2018; Wagner *et al.* 2017). HdrA Homologe sind in der Natur weit verbreitet und finden sich nicht nur in methanogenen Archaeen und schwefeloxidierenden Prokaryonten sondern auch in Sulfatreduzierern, anaerob methanotropen Archaeen, Metallreduzierern, Knallgas-Bakterien und acetogenen Bakterien (Wischgoll *et al.* 2005; Meyerdierks *et al.* 2010; Mock *et al.* 2014; Ramos *et al.* 2015; Boughanemi *et al.* 2016). Es wurde vermutet, dass auch die zu mHdrA homologen Proteine eine FBEB katalysieren (Buckel & Thauer 2013). Ein Vergleich dieser HdrA Homologe zeigt, dass sHdrA mit einem FAD und einem [4Fe-4S]-Cluster die kleinstmögliche Variante unter den genannten Proteinen darstellt (Appel *et al.* 2021).

Rekombinant produziertes sHdrA aus *H. denitrificans* wurde erfolgreich kristallisiert (Abbildung 5). Das Protein kristallisierte als Homodimer und enthielt pro Monomer ein FAD

und ein [4Fe-4S]-Cluster. Dies entsprach den Erwartungen, da sHdrA eine große Sequenzähnlichkeit zu der TrxR-Domäne von mHdrA aufweist und diese ebenfalls in der Kristallstruktur ein FAD und ein [4Fe-4S]-Cluster beinhaltet (Wagner *et al.* 2017). sHdrA besitzt laut Kristallstruktur eine TrxR-Faltung, zeigt aber gravierende Unterschiede zu den strukturell ähnlichsten Vertretern dieser Proteinfamilie (Abbildung 5). Sowohl in mHdrA als auch in sHdrA werden die Monomere durch die FAD- und die [4Fe-4S]-Cluster Domänen zusammengehalten und schirmen die jeweiligen Cofaktoren von einer Seite ab. Die räumliche Distanz zwischen den [4Fe-4S]-Clustern der jeweiligen Monomere ist kurz genug, um einen physiologisch relevanten Elektronentransfer zu gewährleisten (Page *et al.* 2003). Durch diese räumliche Nähe wird eine Elektronen weiterleitende und speichernde Einheit zwischen den beiden FADs und den beiden [4Fe-4S]-Clustern geformt. Die NADP bindende Domäne aus TrxR ist in HdrA in eine [4Fe-4S]-Cluster Domäne umgewandelt, was sich durch Verlängerung der Helix 180 : 195 um eine Windung, sowie die Umgestaltung der vorhergehenden Schleife erklären lässt. Im Gegensatz hierzu, besteht die Schnittstelle des TrxR Dimers nur aus zwei FAD-Domänen, wodurch eine Rotation um 67° der NADP-Domäne zwischen der FAD-reduzierten und FAD-oxidierten Konformation ermöglicht wird (Lennon *et al.* 2000). Des Weiteren liegt der Isoalloxazinring sowohl in sHdrA als auch in mHdrA tief im Protein, was impliziert, dass kein direkter Kontakt zu einer externen Hydrid-transferierenden Komponente möglich ist.

Ein Vergleich der Kristallstrukturen von sHdrA und mHdrA zeigte ebenfalls Unterschiede in der Koordination des FAD-Cofaktors. Die Isoalloxazinbindestelle besitzt sowohl in sHdrA als auch in mHdrA einen eher hydrophoben Charakter, allerdings gibt es entscheidende Unterschiede zwischen der Polarität der Aminosäuren, die FAD koordinieren. In sHdrA bildet der Stickstoff N5 des Isoalloxazinrings eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül, das durch das negativ geladene Glutamat 137 deprotoniert vorliegt. Dieser Effekt wird durch ein angrenzendes Wassermolekül, das durch Glutamat 190 deprotoniert wird, verstärkt (Abbildung 6 A und B). Dagegen werden N5 und O4 des Isoalloxazinrings in mHdrA über Wasserstoffbrückenbindungen mit der positiv geladenen Aminosäure Lysin 409 gebunden (Abbildung 6 C). Diese gegensätzliche Polarität der FAD-bindenden Aminosäuren in sHdrA und mHdrA zeigt sich auch bei der Koordination des O2 Atoms. In sHdrA ist O2 über eine Wasserstoffbrücke mit der negativ geladenen Aminosäure Aspartat 323 verbunden, in

mHdrA dagegen erfolgt die Koordination von O₂ über Lysin 524' des gegenüberliegenden Monomers. Die räumliche Nähe von N5 in sHdrA zu Wasserstoffdonatoren stabilisiert den Hydrochinon und Semichinon Zustand des FADs, wohingegen die oxidiert deprotonierte Flavochinon Form in mHdrA durch den Wasserstoffakzeptor Lysin 409 stabilisiert wird.

Neben der Struktur von mHdrA (Wagner *et al.* 2017) ist nur die im Rahmen dieser Arbeit gelöste Struktur von sHdrA bekannt (Ernst *et al.* 2021). Zu den meisten HdrA Homologen ist außer der Primärsequenz nichts bekannt. Experimentelle Daten liegen zu den Chinon-reaktiven membrangebundenen Oxidoreduktasen QmoA und QmoB und dem am Benzoessäuremetabolismus beteiligten Protein BamE vor. QmoA und QmoB sollen in einer Flavin-basierten Elektronenkonfuration APS über Elektronen aus dem Chinonpool reduzieren (Meyer *et al.* 2013). Das Protein BamE ist eine Untereinheit des Benzoyl-CoA-Reduktase-Komplexes Bam[(BC)₂DEFGHI]₂, der eine entscheidende Rolle im mikrobiellen Abbau aromatischer Verbindungen spielt (Fuchs *et al.* 2011; Boll *et al.* 2014; Huwiler *et al.* 2019). Ein Vergleich dieser HdrA Homologe zeigt, dass sHdrA mit einem FAD und einem [4Fe-4S]-Cluster die kleinstmögliche Variante unter den genannten Proteinen darstellt (Appel *et al.* 2021). Eine phylogenetische Analyse der zuvor beschriebenen kanonischen HdrA Module zeigte, dass das zuvor beschriebene Lysin 409 in allen HdrA Homologen konserviert ist, im Gegensatz zu fast allen sHdrA Proteinen. Eine Ausnahme bilden sHdrAs aus den Archaeen *Metallosphaera cuprina* und *Sulfolobus acidocaldarius* (Abbildung 35). Dieses Lysin wird als essentiell für die FBEB angenommen, da es zur Stabilisierung des deprotonierten oxidierten FADs beiträgt (Wagner *et al.* 2017). Die Tatsache, dass dieses Lysin in fast allen sHdrAs nicht vorhanden ist und stattdessen, wie in der Kristallstruktur von sHdrA aus *H. denitrificans* gezeigt, das FAD über Glutamat 158 in einem Semichinon Zustand stabilisiert wird, spricht gegen eine bifurkierende Eigenschaft des FADs aus sHdrA (Ernst *et al.* 2021).

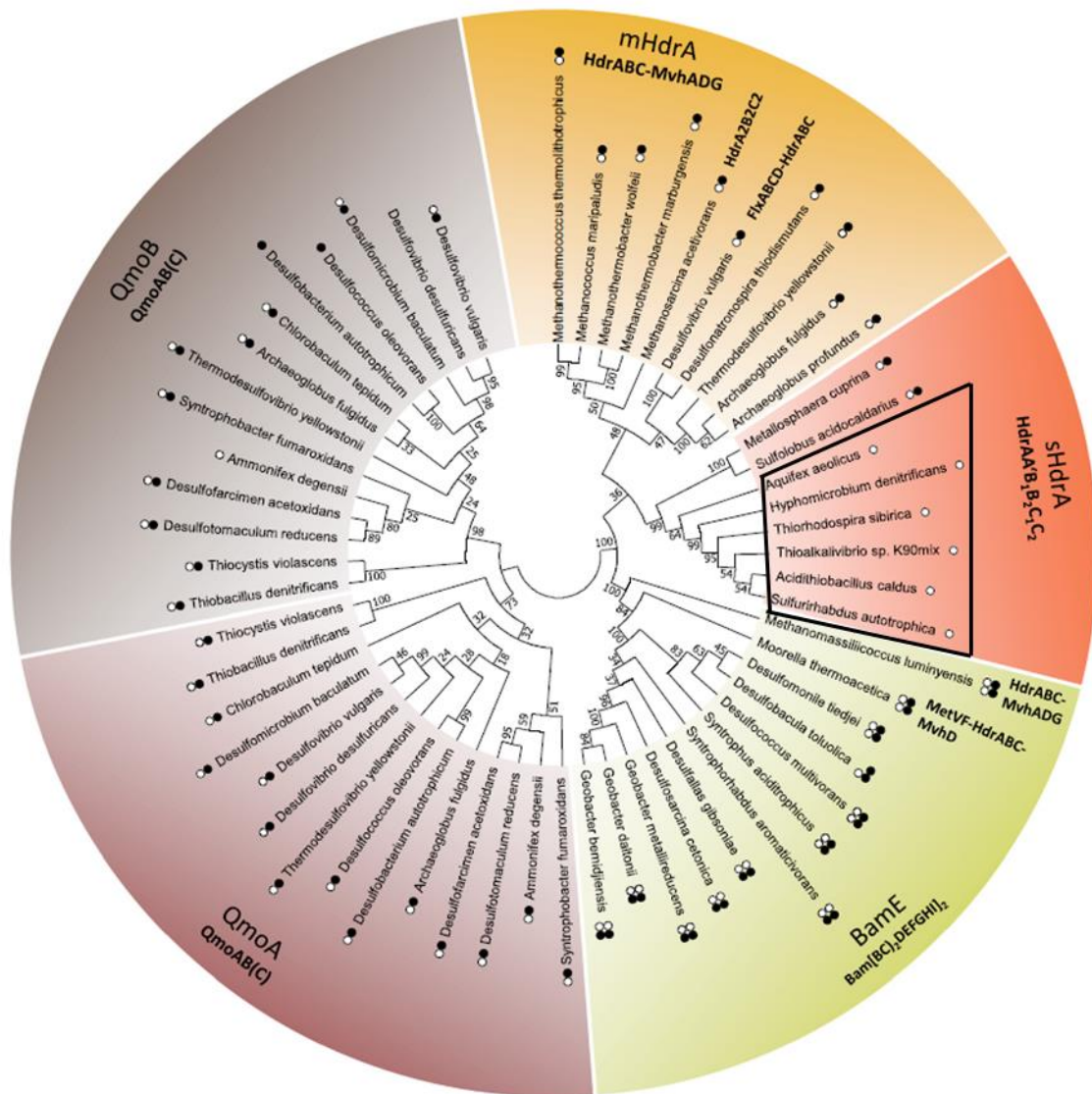


Abbildung 35: Phylogenetische Analyse homologer HdrA Proteine. Die fünf verschiedenen HdrA Klassen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Es sind die für eine FBEB essentiellen Aminosäuren (Position in *Methanothermococcus thermolithotrophicus*) Lysin 409 (schwarze Kreise) und Glutamat 356 (weiße Kreise) dargestellt. Die bakteriellen sHdrA-Proteine sind durch einen schwarzen Kasten eingrahmt. (Abbildung modifiziert nach Appel *et al.* 2021).

Diese These wird dadurch untermauert, dass sHdrA aus *H. denitrificans* ein stabiles und in der UV/VIS-Spektroskopie beobachtbares Semichinon ausbildet. Dieses konnte durch eine für ein protoniertes FAD-Semichinonradikal charakteristische Absorptionsbande von 610-650 nm (Massey & Palmer 1966; Liu *et al.* 2010; Evans *et al.* 2013), die durch weitere Oxidation bzw. Reduktion verschwand, beobachtet werden (Abbildung 8). Dagegen wird ein hochenergetisches und äußerst kurzlebige Semichinon als Voraussetzung einer FBEB gesehen (Nitschke & Russell 2012; Buckel & Thauer 2013, 2018). Diese kurzlebige

Übergangsstufe des FADs konnte im bifurkierenden Enzym NADH-abhängige Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase I (NfnI) durch transiente UV/VIS-Absorption beobachtet werden, wo sie eine Halbwertszeit von 10 ps besaß (Lubner *et al.* 2017). Interessanterweise wird N5 des bifurkierenden FADs in NfnI durch ein Arginin im deprotonierten Zustand stabilisiert, was eine vergleichbare Situation zur Koordination des FADs in mHdrA darstellt. Im Gegensatz dazu wird N5 des zweiten nicht bifurkierenden FADs in diesem Enzym durch ein Glutamat koordiniert (Lubner *et al.* 2017), was eine zu sHdrA vergleichbare Koordination des FADs darstellt. Das nicht bifurkierende FAD in NfnI zeigte im EPR-Spektrum ein für Flavosemichinone typisches Signal ($g = 2,004$) (Lubner *et al.* 2017), was vergleichbar mit der Situation in sHdrA ist ($g = 2,002$) (Abbildung 10). Durch potentiometrische Redoxtitration wurden die Redoxpotentiale der FAD-Spezies aus sHdrA gemessen (Abbildung 9). Eine sehr gute Übereinstimmung wurde für das Redoxpotential des Hydrochinon/Semichinon-Paares sowohl bei 456 als auch bei 610 nm analysiert (Abbildung 9 B, C). Eine gewisse Unsicherheit verbleibt bezüglich des Wertes für das Semichinon/Flavochinon-Paar. Die Titrationskurve zeigte insbesondere bei 456 nm für die Oxidation des Semichinons zum Flavochinon einen Zwei-Elektronen-Übergang (Abbildung 9 D). Der Ursprung eines potentiell zweiten Elektrons für die Oxidation des Semichinons zum Flavochinon bleibt unklar, gleichwohl ist das ermittelte Potential für dieses Redoxpaar deutlich positiver. Die potentiometrische Redoxtitration für das FAD von sHdrA aus *H. denitrificans* zeigte, dass $E^{0'}_{\text{FAD}/\text{FADH}\cdot} > E^{0'}_{\text{FADH}\cdot/\text{Eo}'\text{FADH-}}$ ist, mit ermittelten Redoxpotentialen von -174 bis -156 mV für das Redoxpaar Hydrochinon/Semichinon und einem Wert von -81 bis -19 mV für das Redoxpaar Semichinon/Flavochinon (Ernst *et al.* 2021). Diese Werte weichen erheblich von denen des bifurkierenden FADs in NfnI ab, dort lauten die Redoxpotentiale für die Redoxpaare Semichinon/Flavochinon -911 mV und für das Redoxpaar Hydrochinon/Semichinon +359 mV (Lubner *et al.* 2017).

Auch während der potentiometrischen Redoxtitration zeigte sich ein stabiles Semichinon durch Ausbildung eines Plateaus bei 456 nm (Abbildung 9). Des Weiteren spricht gegen sHdrA als potentiell bifurkierendes Enzym, dass es im Vergleich zu mHdrA weder eine N-terminale, noch eine inserierte Ferredoxin-Domäne, noch eine C-terminale Ferredoxin-Domäne besitzt (Koch & Dahl 2018). Daraus resultiert, dass sHdrA nur ein [4Fe-4S]-Cluster bindet, wohingegen mHdrA sechs dieser Cofaktoren besitzt (Koch & Dahl 2018; Ernst *et al.*

2021; Appel *et al.* 2021). Die Ferredoxin-Domänen, die in sHdrA nicht vorhanden sind, wurden aber als essentiell für die FBEB im mHdr-Komplex beschrieben (Wagner *et al.* 2017).

Analog zur TrxR-Domäne von mHdrA bindet sHdrA ein [4Fe-4S]-Cluster (Ernst *et al.* 2021). Das [4Fe-4S]-Cluster aus sHdrA liegt in einer Bindetasche des Proteins, die durch eine elektrostatisch positiv geladene Oberfläche charakterisiert ist (Abbildung 7). Dies führt dazu, dass der reduzierte $[2 \text{ Fe}^{2+}, 2 \text{ Fe}^{2,5+}]$ Zustand des Clusters stabilisiert wird. Die Stabilisierung des reduzierten Zustandes erklärt das verhältnismäßig hohe Redoxpotential des [4Fe-4S]-Cluster in sHdrA, das zwischen -203 und -188 mV liegt (Ernst *et al.* 2021). Die Redoxpotentiale von [4Fe-4S]-Clustern liegen meist unterhalb von -300 mV (Langen *et al.* 1992; Chen *et al.* 2002; Brzóška *et al.* 2006).

Die Redoxpotentiale des [4Fe-4S]-Clusters und des FADs geben einen ersten Hinweis auf die Richtung des Elektronenflusses zwischen diesen Cofaktoren, auch wenn ihre Abstände und Redoxpotentiale bis zu einem gewissen Grad im *in vivo*-Komplex verschoben zu den ermittelten Werten von rekombinantem sHdrA sein könnten. Die gemessenen Redoxpotentiale der Cofaktoren von sHdrA ergeben, dass die Elektronen vom [4Fe-4S]-Cluster zum FAD fließen, was einen inversen Elektronenfluss zu mHdrA darstellt (Ernst *et al.* 2021). Die daraus resultierende mechanistische Konsequenz für den putativen sHdr-Komplex wird im folgenden Kapitel diskutiert.

5.2 Putative Struktur und Mechanismus des sHdr-Komplex

Die aus der Struktur und den spektroskopischen Daten von sHdrA aus *H. denitrificans* gewonnen Erkenntnisse werden im Folgenden genutzt, um eine plausible Struktur des putativen sHdr-Komplexes aus schwefeloxidierenden Prokaryonten zu postulieren. In allen Mikroorganismen, die *shdr* Gene enthalten, liegen die für sHdrC1, sHdrB1, sHdrC2 und sHdrB2 kodierenden Gene in der selben Reihenfolge in einem Operon vor (Liu *et al.* 2014; Dahl 2015; Cao *et al.* 2018; Koch & Dahl 2018). Basierend auf der heterohexameren Struktur des mHdr(ABC)₂-Komplexes (Wagner *et al.* 2017), wurde für den sHdr-Komplex eine sHdr(AA'B1B2C1C2) Stöchiometrie angenommen (Abbildung 36). Dieses Model wird durch die Tatsache gestützt, dass die Schnittstellen von HdrA und HdrC sowie von HdrB und HdrC eine hohe Ähnlichkeit zwischen den sHdr und mHdr Hexameren aufweisen. So sind z.B. die

Aminosäuren Arginin167, Aspartat168, Lysin231 (Arginin in mHdrA), Alanin232 (Glycin in mHdrA), Arginin233, Glycin248 (Alanin in mHdrA), Glutamat249, Aspartat250 und Threonin251 hoch konserviert. Zusätzlich stimmt der postulierte asymmetrische sHdr(AA'B1B2C1C2)-Komplex mit der Zusammensetzung der Untereinheiten des sHdr-Komplexes aus *Aquifex aeolicus* überein (Boughanemi *et al.* 2016). Für diesen Komplex wurde in einem nativen Gel eine Masse von 240 kDa ermittelt (Boughanemi *et al.* 2016), die mit einer, auf den Genomsequenzen basierenden, kalkulierten Masse von 225,3 kDa für den *H. denitrificans* Komplex vergleichbar ist.

Der SwissModel Server (Waterhouse *et al.* 2018) wurde genutzt, um anhand der Primärsequenz die Strukturen der einzelnen Untereinheiten zu modellieren. Die modellierten sHdr-Untereinheiten wurden anschließend in die hexamere mHdr-Struktur (die als Template diente) eingesetzt (Abbildung 36). In dieser hexameren sHdr Architektur nehmen die Untereinheiten sHdrC1/2 eine zu mHdrC vergleichbare Funktion als elektronische Verbindungsmodule zwischen den Untereinheiten sHdrA und sHdrB1/2 ein. mHdrC koordiniert zwei [4Fe-4S]-Cluster, was aufgrund der strikten Konservierung der acht Cysteine ebenfalls für sHdrC1/2 angenommen wird (Koch & Dahl 2018; Ernst *et al.* 2021). In mHdrB werden zwei non-cubane [4Fe-4S]-Cluster über je fünf Cysteine gebunden, die in den CCG-Domänen liegen (Wagner *et al.* 2017). Jeweils vier Cysteine binden die Eisenatome pro Cluster und der Schwefel des fünften Cysteins dient der Verbrückung der [2Fe-2S]- und [3Fe-4S]-Subcluster (Wagner *et al.* 2017). In sHdrB2 sind alle zehn Cysteine der beiden CCG-Domänen konserviert, was die Bindung zweier non-cubaner [4Fe-4S]-Cluster wie in mHdrB sehr wahrscheinlich macht. In sHdrB2 ist die Schleife vor der Helix 223 : 236 im Vergleich zu mHdrB verkürzt, was im Modell zu einer Vergrößerung der Substratbindetasche in sHdrB2 führt. Für sHdrB1 gestaltet sich die Situation deutlich komplizierter, da in dieser Untereinheit beide CCG-Domänen modifiziert vorliegen (Koch & Dahl 2018; Ernst *et al.* 2021). Aus der CCG-Domäne, die in mHdrB das proximale non-cubane Cluster bindet (C153, C193, C194, C231, C234), sind in sHdrB1 vier der fünf Cysteine konserviert und das vorletzte Cystein (C231 in mHdrB) ist in Schwefeloxidierern durch ein konserviertes Aspartat ersetzt.

Aspartat ist eine ungewöhnliche Aminosäure, um [FeS]-Cluster zu binden, allerdings konnte in einzelnen Fällen die Koordination von [4Fe-4S]-Clustern durch Aspartat gezeigt werden (Bak & Elliott 2014). Das Ferredoxin aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus*

furiosus zeigte sowohl im H^1 -NMR als auch in der Kristallstruktur die Ligation eines [4Fe-4S]-Clusters über drei Cysteine und ein Aspartat (Calzolari *et al.* 1995; Nielsen *et al.* 2004). Eine Aminosäureaustauschmutante des Proteins mit Cystein als viertem Liganden des Clusters zeigte ein negativeres Redoxpotential als das wildtypische Protein (Zhou & Adams 1997).

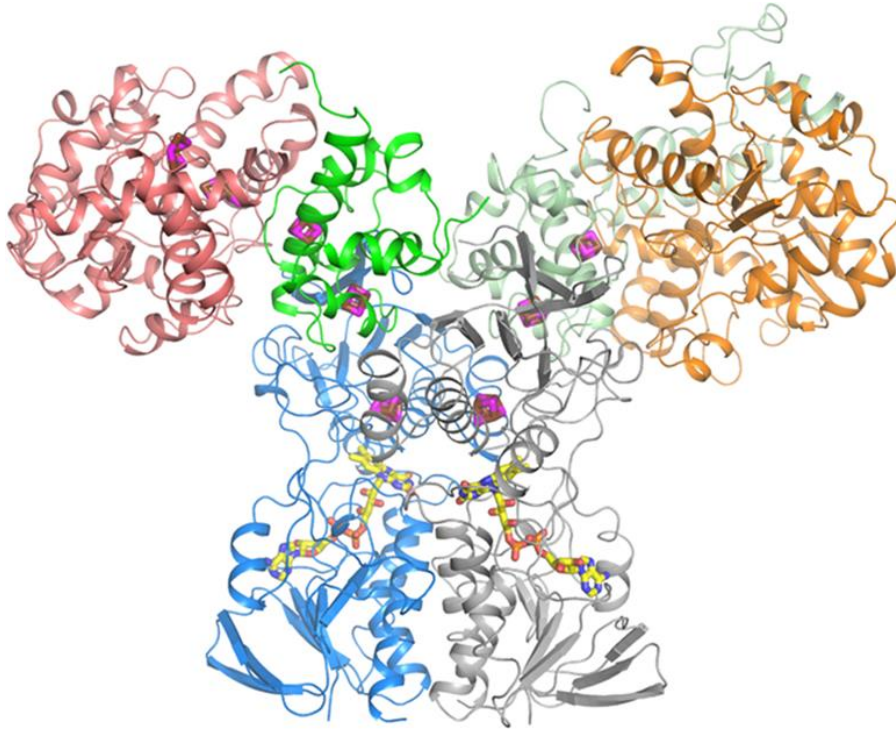


Abbildung 36: Modell des hexameren sHdrAA'B1B2C1C2-Komplexes. Zur Modellierung des sHdr-Komplexes, wurden die Strukturen von sHdrA (grau) sHdrA'(blau), sHdrC1 (palegrün), sHdrB1 (orange), sHdrC2 (grün) und sHdrB2 (lachsfarben) mit dem SwissProt Server auf dem Template von mHdrBC berechnet. Die Sequenzübereinstimmungen von sHdrC1(C2) und mHdrC betragen 18,7 (34,7) % und die von sHdrB1(B2) und mHdrB betragen 21,5 (32,4) %. Die mHdr-Untereinheiten wurden gegen die korrespondierenden sHdr-Untereinheiten ausgetauscht, um das hexamere sHdr-Strukturmodell zu erhalten. Die sHdrA-sHdrC und die mHdrA-mHdrC Schnittstellen sind sich sehr ähnlich und beinhalten nicht die in sHdrA fehlenden Ferredoxin-Domänen aus mHdrA als Kontaktflächen. Neben Unterschieden in der Sequenz, besitzt sHdrB1 im Vergleich zu mHdrB N- und C-terminale Überhänge von ca. 100 bzw. 50 Aminosäuren. Die Modellierung der letzten 70 Aminosäuren von sHdrC2 in mHdrC war nicht möglich, wohingegen die Modellierung von sHdrC1 in mHdrC funktionierte. Die letzten 70 Aminosäuren von sHdrC2 liegen benachbart zum aktiven Zentrum von sHdrB2 und sind möglicherweise für die Erkennung und Bindung des spezifischen Substrats von Bedeutung. Es wird angenommen, dass ,aufgrund der höheren Ähnlichkeit zu mHdrB, sHdrC2 und sHdrB2 zusammen einen Ast des Komplexes bilden. (Abbildung entnommen aus Ernst *et al.* 2021).

Des Weiteren koordinierten ein Aspartat und drei Cysteine das [4Fe-4S]-Cluster aus dem Sulfatreduzierer *Desulfovibrio africanus* (Busch *et al.* 1997). Dieses labile Cluster verlor unter

oxidativen Bedingungen reversibel ein Eisenatom, was auf das ligierende Aspartat zurück geführt wurde (Busch *et al.* 1997). In der Kristallstruktur des „Nitrogenase-like dark operative photochlorophyllide oxidoreductase complex“ aus *Thermosynechococcus elongatus* und *Rhodobacter capsulatus*, wurde die Ligation eines [4Fe-4S]-Clusters über ein Aspartat gezeigt, das in beiden Fällen eine wichtige Rolle für die enzymatische Aktivität des Proteins spielte (Muraki *et al.* 2010; Bröcker *et al.* 2010).

Das Protein Hdr-ähnliches Menachinon-oxidierendes Enzym D (HmeD) aus den Sulfat reduzierenden Archaeen *Archaeoglobus fulgidus* und *Archaeoglobus profundus* besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu mHdrB und beinhaltet ein CCG-Motiv, bei dem allerdings das letzte Cystein gegen ein konserviertes Aspartat ausgetauscht ist (Mander *et al.* 2002, 2004). Aufgrund ähnlicher EPR-Signale wie in mHdr wurde ebenfalls die Bindung gleichartiger Cofaktoren postuliert (Mander *et al.* 2002, 2004). Diese Daten zeigen, dass die Bindung eines über Aspartat koordinierten [4Fe-4S]-Clusters nicht ausgeschlossen werden kann.

Aus der CCG-Domäne die das distale non-cubane [4Fe-4S]-Cluster in mHdrB bindet (C9, C41, C42, C78, C81), sind drei Cysteine in sHdrB1 konserviert, während die Cysteine 41 und 81 durch konservierte Serine ersetzt sind. Serin stellt eine isosterische Alternative zu Cystein dar, aber aufgrund der schwächeren Wechselwirkungen des Hydroxylats im Falle von Serin im Vergleich zur Thiolatgruppe in Cystein, sollte die Bindung eines serinkomplexierten Clusters schwächer sein. Tatsächlich wurde in der Kristallstruktur des Enzyms Lipoyl-Synthase aus *Mycobacterium tuberculosis* die Koordination eines [4Fe-4S]-Clusters über drei Cysteine und ein Serin gezeigt (McLaughlin *et al.* 2016). Dieses Cluster dient dort als Schwefeldonor für das Substrat Lipoat und dissoziiert im Rahmen der katalysierten Reaktion, wobei das koordinierende Serin eine essentielle Rolle spielt (McLaughlin *et al.* 2016). Weitere Kristallstrukturen von Proteinen, die [4Fe-4S]-Cluster über Serin koordinieren, gibt es bislang nicht, allerdings wurde für das Protein BamD, das als Fusion aus mHdrBC betrachtet wird, über die Koordination eines non-cubanen [4Fe-4S]-Clusters mit einem Serin-Liganden spekuliert (Huwiler *et al.* 2019). Allerdings muss beachtet werden, dass im Falle von BamD das Cystein 78 des distalen Clusters durch ein Serin ersetzt würde, wohingegen in einem putativen non-cubanen [4Fe-4S]-Cluster in sHdrB1 sowohl C41 als auch C81 durch ein Serin ersetzt würden. Diese Situation erscheint sehr unwahrscheinlich, da C81 den Schwefel zur Verfügung stellt, der die Subcluster des non-cubanen [4Fe-4S]-Clusters verbrückt und

sich als unverzichtbar für deren Koordination zeigte (Hamann *et al.* 2007). Abschließend muss festgehalten werden, dass im Falle der proximalen CCG-Domäne vier der fünf Cysteine konserviert sind und in der distalen CCG-Domäne drei von fünf Cysteinen sowie ein weiteres nicht zur CCG-Domäne gehörendes Cystein, sodass selbst unter der Annahme, dass die konservierten Aspartat und Serin Aminosäuren in den jeweiligen CCG-Domänen keine Rolle spielten, trotzdem acht konservierte Cysteine in sHdrB1 vorliegen und die Möglichkeit zur Bindung von zwei potentiellen [4Fe-4S]-Clustern besteht. Aus diesem Grund wird im folgenden Kapitel von zwei [4Fe-4S]-Clustern in sHdrB1 ausgegangen. Die putative Substratbindetasche ist in sHdrB1 im Vergleich zu mHdrB deutlich kleiner.

Die begrenzte Menge an Informationen zum exakten Mechanismus lässt den Raum offen, um über verschiedene mögliche Szenarien zu spekulieren und ihre theoretischen Wahrscheinlichkeiten auszuleuchten. Im Folgenden werden zwei verschiedene Reaktionsmechanismen für den putativen sHdr-Komplex skizziert, die sich auf die unter 5.1 und 5.2 erläuterten Daten und Postulationen beziehen. Das in Archaeen auftretende Heterodisulfid CoM-S-S-CoB ist in bakteriellen Schwefeloxidierern wie *H. denitrificans* nicht vorhanden, weshalb für die Reaktion des sHdr-Komplexes ein anderes Substrat angenommen werden kann. In beiden postulierten Mechanismen wird der Tatsache Rechnung getragen, dass sich der putative sHdr-Komplex im Cytoplasma befindet, in dem reduzierter Schwefel nicht frei vorliegt, sondern eher als proteingebundenes Persulfid (Dahl 2015; Tanabe *et al.* 2019). Der Schwefel stammt aus der Oxidation eines anorganischen Schwefelsubstrates, im Fall von *H. denitrificans* z.B. Thiosulfat, und wird über eine Kaskade von Schwefeltransferreaktionen in Form eines proteingebundenen Persulfids an den sHdr-Komplex geliefert (Dahl 2015; Tanabe *et al.* 2019; Ernst *et al.* 2021). Am wahrscheinlichsten ist, dass der sHdr-Komplex den angelieferten Sulfanschwefel letztlich zu Sulfit oxidiert (Koch & Dahl 2018). Die Proteine TusA, DsrE und LbpA werden zuerst detailliert beschrieben, da sie für die im späteren Verlauf des Kapitels skizzierten Reaktionsmechanismen von großer Relevanz sind.

Das Protein TusA ist eine Schwefeltransferase, die diverse Funktionen in der Zelle übernimmt (Tanabe *et al.* 2019). Der Name leitet sich vom ersten biochemisch charakterisierten Stoffwechselweg ab, an dem TusA beteiligt ist, der tRNA 2-Thiouridin Synthese in *E. coli*

(Ikeuchi *et al.* 2006). Alle TusA Proteine besitzen ein N-terminales CPXP-Motiv (Katoh *et al.* 2000), das das Sulfanschwefel bindende Cystein als zentrales Element enthält (Shi *et al.* 2010; Dahl *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014). In diversen Schwefeloxidierern wie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Methallosphaera sedula* und *Allochromatium vinosum*, konnten erhöhte mRNA-Level für TusA unter schwefeloxidierenden Bedingungen gemessen werden (Quatrini *et al.* 2009; Ehrenfeld *et al.* 2013; Weissgerber *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014). TusA wird somit als zentrales Schwefeltransportprotein im Cytoplasma angesehen (Dahl 2015; Tanabe *et al.* 2019). In vielen schwefeloxidierenden Prokaryonten ist das *tusA* Gen mit dem Gen für die Schwefeltransferase DsrE verknüpft, weshalb von einer essentiellen Bedeutung dieser Proteine im Transport des Schwefelsubstrates zum schwefeloxidierenden Komplex in der Zelle ausgegangen wird (Venceslau *et al.* 2014; Dahl 2015). Für das DsrE-Homolg im, *shdr* Gene enthaltenden, Archaeon *M. cuprina* konnte *in vitro* die Übertragung von Thiosulfat auf TusA gezeigt werden, diese Reaktion war nicht reversibel (Liu *et al.* 2014). In *H. denitrificans* wurden sowohl DsrE (Hden_0688) als auch TusA (Hden_0698) signifikant erhöht im Proteom gefunden, wenn der Organismus auf Dimethylsulfid statt auf dem schwefelfreien Substrat Dimethylamin wuchs (Koch & Dahl 2018). Es wurde postuliert, dass TusA den Substratschwefel an den sHdr-Komplex liefert (Koch & Dahl 2018) und der sHdr-Komplex aus *A. aeolicus* war lose mit DsrE assoziiert (Boughanemi *et al.* 2016).

Als mögliches Elektrophil oder auch Substrat für den sHdr-Komplex wurde LbpA diskutiert (Cao *et al.* 2018; Tanabe *et al.* 2019; Dahl 2020b). Lipoat bindende Proteine bilden über die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysins eine Amidbindung zu der Carbonylgruppe ihres Substrats Liponsäure aus (Spalding & Prigge 2010). Die *shdr* Gene treten immer mit dem *lbpA* Gen genetisch vergesellschaftet auf (Ehrenfeld *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014; Cao *et al.* 2018; Koch & Dahl 2018) und die Deletion dieses Gens führte in *H. denitrificans* zu einem negativen Phänotyp im Bezug auf die Oxidation von Thiosulfat (Cao *et al.* 2018). Eine für den sHdr-Weg spezielle Funktion konnte dadurch gezeigt werden, dass sowohl die *lbpA* Gene aus *H. denitrificans* als auch *Thiorhodospira sibirica* nicht in der Lage waren den Phänotyp des Δ *gcvH*-Stammes aus *Bacillus subtilis* zu komplementieren (Cao *et al.* 2018).

Im ersten Reaktionsmechanismus wird die mehrstufige Oxidation des proteingebundenen Persulfids zu Sulfit durch eine konzertierte Abfolge von Reaktionen an den [FeS]-Clustern von

sHdrB1 und sHdrB2 postuliert (Abbildung 37). Zuerst kommt es durch die Reaktion proteingebundenen Sulfanschwefels ($R_1\text{-CysS-S}$) und eines Cysteinthiolats ($R_2\text{-CysS}^-$), die jeweils über ein Schwefelatom an ein Eisenatom der postulierten non-cubanen [4Fe-4S]-Cluster in sHdrB2 binden, zur Ausbildung eines proteinogenen Heterotrisulfids $R_1\text{-CysS-S-SCys-R}_2$. Dieses Szenario wäre analog zur Funktion von DsrC, das ein Trisulfid ausbildet und als Substrat des rDsr-Komplexes fungiert, der alternativ zum sHdr-System in Schwefeloxidierern vorkommt (Santos *et al.* 2015). LbpA könnte als schwefelbindendes Substrat von sHdrB2 zur Ausbildung eines Trisulfids dienen, denn die mit dem sHdr-System auftretenden LbpA Homologe weisen zwei konservierte Cysteine auf, die in anderen LbpA Homologen fehlen (Cao *et al.* 2018). Das eine Cystein befindet sich am N-Terminus, das andere am äußersten C-Terminus. Das am C-terminus gelegene Cystein liegt mit Glycin als GGC, GCG, GCX oder CG Motiv vor. Die Kombination aus Glycin und Cystein erinnert an die C-terminale GGCGG Sequenz aus dem Protein SoxY, in dem diese Sequenz eine schwefelbindende Funktion erfüllt (Sauvé *et al.* 2007). Dihydrolipoat stellte *in vitro* einen Sulfanschwefelakzeptor in einer Rhodanese katalysierten Reaktion dar (Cianci *et al.* 2000; Silver & Kelly 1976). Eine ähnliche Situation könnte *in vivo* angenommen werden, weil Rhodanese-ähnliche Proteine oft mit den *shdr* Genen genetisch vergesellschaftet sind (Venceslau *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014).

Basierend auf dem Gesamtmodell des sHdr-Komplexes (Abbildung 36) liegen die aktiven Zentren der beiden Untereinheiten sHdrB1 und sHdrB2 60 Å auseinander. Das Intermediat müsste also diese räumliche Distanz zurücklegen und dementsprechend ausreichend stabil in Lösung sein. Das Heterotrisulfid könnte anschließend an den [FeS]-Clustern von sHdrB1 erst zu einem an einem Eisenatom ligierten Sulfenat (-S-OH) und/oder Sulfinat (-S-O_2^-) und abschließend zu Sulfit oxidiert werden, um am Ende Bisulfit und die regenerierten Thiole der Reaktionspartner zu erhalten ($R_1\text{-CysH}$ und $R_2\text{-CysH}$). Je zwei Elektronen würden an den aktiven Zentren generiert, die dann über die jeweiligen sHdrC-Untereinheiten und die Cofaktoren der sHdrA-Untereinheiten zu einem geeigneten, bisher unbekanntem, Elektronenakzeptor und final zu NAD^+ geleitet werden könnten. Bei diesem Mechanismus sind mehrere Punkte zu beachten. Erstens, wurde noch nie ein über Liponsäure gebundenes Trisulfid beobachtet, zweitens hätte in diesem Mechanismus die sHdrB2-Untereinheit keine zu mHdrB analoge Funktion als Heterodisulfidreduktase, obwohl sie die gleichen non-

cubanen [4Fe-4S]-Cluster zu binden scheint, drittens ist der finale Elektronenakzeptor unbekannt und viertens ist das FAD von sHdrA laut Kristallstruktur tief im Protein lokalisiert (Abbildung 5) und somit nicht für ein Akzeptormolekül direkt zugänglich (Ernst *et al.* 2021).

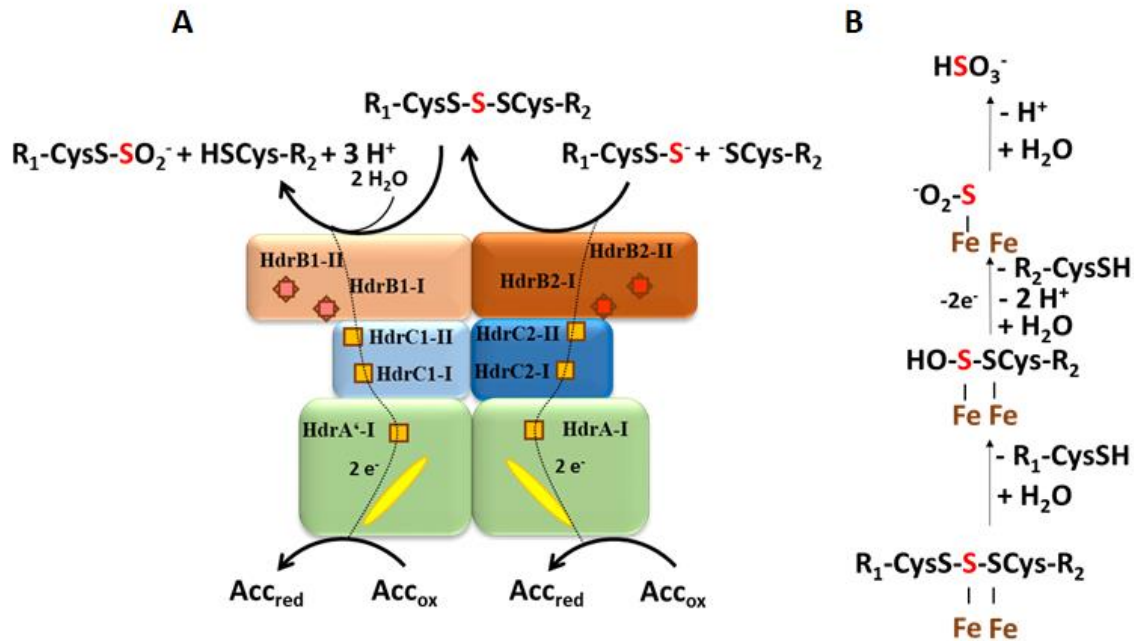


Abbildung 37: Postulierter Reaktionsmechanismus 1 des sHdr-Komplexes. (A) Bildung eines proteingebundenen Heterotrissulfids $R_1\text{-CysS-S-SCys-R}_2$ durch die Reaktion zwischen einem Cysteinthiol ($R_2\text{-CysSH}$) und einem durch Cystein gebundenen Sulfanschwefel ($R_1\text{-CysS-S-}$) am aktiven Zentrum von sHdrB2. Im zweiten Schritt wird das Heterotrissulfid an sHdrB1 oxidativ gespalten, wodurch Bisulfit und die Thiole der Reaktionspartner regeneriert werden ($R_1\text{-CysSH}$ und $R_2\text{-CysSH}$). In diesem Reaktionsmechanismus werden an jedem aktiven Zentrum zwei Elektronen freigesetzt, die über die [4Fe-4S]-Cluster der sHdrC-Untereinheiten und die [4Fe-4S]-Cluster von sHdrA und sHdrA' auf die in sHdrA/A' enthaltenden FADs geleitet werden. Der finale Elektronenakzeptor ist unbekannt. (B) Detaillierter Mechanismus der Reaktion des proteinogenen Trissulfids an den putativen [FeS]-Clustern von sHdrB1. Folgende prosthetische Gruppen sind dargestellt: [4Fe-4S]-Cluster (orange Quadrate), non-cubane [4Fe-4S]-Cluster (dunkelrote Rauten), unbestimmte [FeS]-Cluster (hellrote Rauten), FAD (gelbe Ovale).

Im zweiten postulierten Mechanismus wird der proteingebundene Sulfanschwefel an den [FeS]-Clustern von sHdrB1 oxidiert (Abbildung 38). Die freigesetzten Elektronen fließen über sHdrC1 zum sHdrA Dimer und über dessen [4Fe-4S]-Cluster über sHdrC2 zu sHdrB2. Der Abstand zwischen beiden [4Fe-4S]-Clustern des sHdrA Dimers beträgt 11,5 Å und ist damit kurz genug für einen physiologisch relevanten Elektronentransfer (Page *et al.* 2003), weshalb

in diesem Mechanismus die genannten Cluster als Elektronen leitende Module angesehen werden, wohingegen die FADs des sHdrA Dimers nur als Elektronensenke dienen. Als Substrat der sHdrB2-Untereinheit würde Liponsäure genutzt, die über das LbpA angeliefert würde. Oxidierte Liponsäure bildet ein intramolekulares Disulfid in Form eines Dithiolanrings, der analog zur Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB in mHdrB, in zwei aufeinanderfolgenden Ein-Elektronen-Schritten an den jeweiligen non-cubanen [4Fe-4S]-Clustern von sHdrB2 reduziert würde. Das dabei entstehende Dihydroliponamid würde dann als Substrat für die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase fungieren, die die Elektronen nutzen könnte, um zwei Moleküle NAD^+ zu reduzieren. Es konnte im Rahmen der Glycin-Degradation gezeigt werden, dass proteingebundene Liponsäure ausreichend negativ ist, um NAD^+ zu reduzieren (Kikuchi & Hiraga 1982). In schwefeloxidierenden Archaeen liegt das für die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase kodierende Gen in der Nähe der *shdr* Gene (Liu *et al.* 2014). In anderen *shdr* Gene enthaltenden Organismen wie *H. denitrificans* ist die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase nicht mit dem sHdr-System genetisch vergesellschaftet, aber hier wäre es denkbar, dass die E3-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes diese Funktion übernehmen könnte (Cao *et al.* 2018); wie in *Escherichia coli*, wo sich auch der Pyruvatdehydrogenase-Komplex und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex dieselbe E3-Untereinheit teilen (Steiert *et al.* 1990). Dieser Mechanismus hätte den Vorteil, dass die Elektronen aus der Schwefeloxidation durch das sHdr-System zum NAD-Pool transferiert werden könnten. Dies würde einen substantziellen Vorteil für schwefeloxidierende Prokaryonten mit diesem Enzymkomplex bedeuten, weil die Notwendigkeit des energetisch aufwendigen reversen Elektronenflusses zur Generierung von Reduktionsäquivalenten deutlich reduziert werden könnte (Ernst *et al.* 2021). Allerdings gibt es auch bei diesem Szenario noch offene Fragen bezüglich des Reaktionsmechanismus des sHdr-Systems. Das Standardredoxpotential von Sulfid/Sulfit beträgt -116 mV (Thauer *et al.* 1977), wodurch eine direkte Reduktion von NAD^+ ($E^0 = -320$ mV, Buckel & Thauer 2013) ausgeschlossen werden kann. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Redoxpotential der durch sHdrB1 katalysierten Reaktion nicht bekannt ist und möglicherweise ähnlich oder niedriger ist als das für das Redoxpaar Liponamid/Dihydroliponamid, das -280 mV beträgt (Matthews & Williams 1976). Es sind keine Redoxpotentiale für die Reaktion eines Persulfids zu einem Thiol und Sulfensäure bekannt, allerdings liegt das Redoxpotential für

Cystein/Cysteinsulfonat unterhalb des Redoxpotentials von Glutathion (-240 mV) und oberhalb des Redoxpotentials von Thioredoxin (-270 mV) (Nagahara & Katayama 2005).

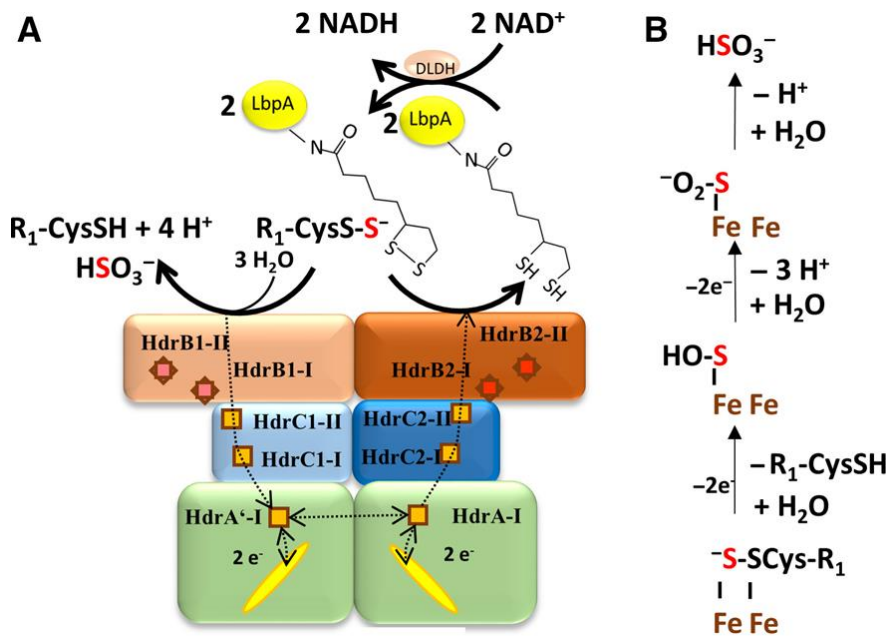


Abbildung 38: Postulierter Reaktionsmechanismus 2 des sHdr-Komplexes. (A) Die Reaktion eines durch Cystein gebundenen Persulfids (R₁-CysS-S⁻; R₁ = TusA oder DsrE) an der Untereinheit sHdrB1 führt zur Generierung von Sulfit (HSO₃⁻). Bei dieser Reaktion werden vier Elektronen freigesetzt, die über die Cluster von sHdrC1 zu sHdrA' weitergeleitet werden. Zwischen den [4Fe-4S]-Clustern des sHdrA Dimers kommt es zum Austausch von Elektronen, die über sHdrC2 auf die Untereinheit sHdrB2 geleitet werden. An den non-cubanen Clustern von sHdrB2 wird die Reduktion des Dithiolanrings von Liponsäure durchgeführt, die dabei freigesetzten Elektronen werden genutzt, um NAD⁺ mit der DLDH zu reduzieren. Die FADs des HdrA Dimers dienen ausschließlich als Elektronensenke. Folgende prosthetische Gruppen sind dargestellt: [4Fe-4S]-Cluster (orange Quadrate), non-cubane [4Fe-4S]-Cluster (dunkelrote Rauten), unbestimmte [FeS]-Cluster (hellrote Rauten), FAD (gelbe Ovale). Thiolgruppen und Persulfide sind entsprechend ihrer angenommenen pKa-Werte von 8,5 (Riederer, 2009) bzw. 6,2 (Everett *et al.* 1994) protoniert oder als Ion dargestellt. Der pKa-Wert von Sulfensäure liegt zwischen 6-10 und der pKa-Wert für Cystein gebundene Sulfensäure beträgt 7,6 (Nagy *et al.* 2007; Enami *et al.* 2009). Sulfinsäure (pKa = 2) liegt unter physiologischen Bedingungen immer deprotoniert vor (Nagy & Winterbourn 2010). (B) Detaillierte Darstellung der Oxidation an den [FeS]-Clustern von sHdrB1. Die freigesetzten Elektronen werden über die Eisenatome der Cluster an die nächste Untereinheit weitergeleitet.

Sowohl die vorgeschlagene Gesamtstruktur des sHdr-Komplexes als auch die vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen bedürfen in der Zukunft weiterer biochemischer Untersuchungen. Informationen über die Redox Eigenschaften der Cofaktoren könnten per

EPR- und UV/VIS-Spektroskopie der einzelnen sHdr-Untereinheiten erhalten werden, da sich im Falle des Gesamtkomplexes die Signale der Cofaktoren überlagern würden.

Der Versuch die Untereinheiten sHdrB1, sHdrB2, sHdrC1 und sHdrC2 aus *H. denitrificans* heterolog rekombinant in *E. coli* zu produzieren war nicht erfolgreich (Abbildung 12). Alle Untereinheiten wurden im Stamm *E. coli* BL21(DE3) Δ iscR als Einschlusskörperchen produziert und lagen somit nicht löslich vor.

Die rekombinanten sHdrC1- und sHdrC2-Untereinheiten aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 wurden in *E. coli* ebenfalls als Einschlusskörperchen gebildet (Liu et al. 2012; 2013; Ossa et al. 2011). In diesen Versuchen wurden die Proteine aerob in *E. coli* BL21(DE3) produziert und nach dem Zellaufschluss durch Renaturierung mit 8 M Harnstoff wieder in Lösung gebracht. Die Untersuchung der Proteine per EPR-Spektroskopie zeigte in allen Fällen die Bindung eines [4Fe-4S]-Clusters an. Dieses Ergebnis ist fragwürdig, da sowohl sHdrC1 als auch sHdrC2 acht konservierte Cysteine besitzen, die in der Theorie zwei [4Fe-4S]-Cluster binden müssten. mHdrC besitzt die analogen konservierten acht Cysteine und es konnte in der Kristallstruktur des mHdr-Komplexes gezeigt werden, dass mHdrC zwei [4Fe-4S]-Cluster bindet (Wagner et al. 2017).

Die bisher einzig erfolgreich produzierten Proteine des sHdr-Systems sind sHdrA aus *A. aeolicus* und sHdrA aus *H. denitrificans* (Boughanemi et al. 2016; Koch & Dahl 2018; Ernst et al. 2021). Die sHdrA-Untereinheit aus *A. aeolicus* wurde zur Generierung eines gegen das Protein gerichteten Antikörpers genutzt, aber genauere Informationen über das Protein wurden nicht publiziert (Boughanemi et al. 2016). Es existieren bisher keine Publikationen über die heterologe Expression einer sHdrB-Untereinheit in *E. coli*. In dieser Arbeit konnten unter Verwendung des für [FeS]-Cluster optimierten Stamms Δ iscR keine löslichen Proteine produziert werden (Abbildung 12). Die Coexpression des *isc* Operons aus *E. coli* führte zu keiner Produktion der sHdr-Untereinheiten, da weder im SDS-Gel noch im Western Blot entsprechende Banden detektiert werden konnten (Abbildung 12).

Die Anzahl erfolgreicher Produktionen Hdr-ähnlicher Proteine in *E. coli* ist begrenzt. Ein Beispiel stellt das Protein HdrD aus *Methanomassiliicoccus luminiyensis* dar, das ein Homolog zu mHdrB ist. Dieses Protein wurde löslich in *E. coli* BL21(DE3) Δ iscR produziert,

unter vergleichbaren Expressionsbedingungen wie in dieser Arbeit (Kröniger *et al.* 2016). Die Expressionen weiterer Hdr-Untereinheiten aus diesem Organismus waren bislang allerdings nicht erfolgreich (persönliche Kommunikation Fabian Steiniger).

Des Weiteren konnten die Untereinheiten HdrA und HdrB aus *Methanosarcina acetivorans* in *E. coli* BL21(DE3) Δ *iscR* löslich produziert werden, die HdrC-Untereinheit nur in einer Coexpression mit HdrB (Yan *et al.* 2017). Für eine vergleichbare Strategie böte sich im Falle der sHdr-Untereinheiten nur sHdrA an, da alle anderen Untereinheiten Einschlusskörperchen bildeten. Eine Produktion des gesamten sHdr-Komplexes in *E. coli* war bislang nicht erfolgreich (Koch 2018). Um in Zukunft die gewünschten sHdr-Untereinheiten löslich in *E. coli* produzieren zu können, könnte über die Fusion mit einem die Löslichkeit verbessernden Protein nachgedacht werden. Das Small Ubiquitin-Related Modifier Protein ist kommerziell erhältlich und ist dafür bekannt, die Löslichkeit des fusionierten Proteins zu erhöhen (Butt *et al.* 2005).

Eine weitere Aufgabe wird in Zukunft sein, die exakte Zusammensetzung und Funktion des sHdr-Komplexes zu ermitteln. Diese Arbeit stellt einen ersten Versuch dar, dieses Problem zu lösen. Ein Stamm mit integrierten Affinitätschromatographie-tags wurde erstellt und über eine Nickelmatrix gereinigt. Nach der Chromatographie zeigte die Probe allerdings immer noch eine große Heterogenität, sodass weitere chromatographische Schritte nötig gewesen wären, um den sHdr-Komplex aufzureinigen (Abbildung 16). Da das sHdrA-Protein nur einen geringen Teil an der Gesamtproteinmenge im Zellextrakt ausmachte, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das sHdr-System konstitutiv zu produzieren. Die konstitutive Produktion des sHdr-Systems war im Stamm Δ *tsdA* Δ *shdrR* möglich, da dieser, auch ohne Induktion durch Thiosulfat, ein sHdrA-Signal im Immunoblot zeigte (Abbildung 17). Der Versuch das *Knock In*-Konstrukt in diesen Stamm zu rekombinieren, um die konstitutive Expression eines sHdr-Komplexes mit Affinitäts-tags zu ermöglichen, war bislang nicht erfolgreich. Ebenso blieben bislang alle Versuche, das *shdr* Gen im *Knock In*-Stamm zu deletieren, erfolglos.

Ein weiterer Versuch Informationen über den nativen sHdr-Komplex zu erhalten, bestand darin, diesen aus dem Zellextrakt von *H. denitrificans* über klassische chromatographische Methoden aufzureinigen und dabei das Vorhandensein des Komplexes durch sHdrA als Markerprotein im Immunoblot zu verfolgen. Zuerst wurde der Zellextrakt über eine HIC

aufgereinigt, gefolgt von einer AEC und einer CHT-Chromatographie (Abbildungen 19-24). Nach diesen chromatographischen Reinigungsschritten, wurde eine Probe erhalten, die im SDS-Gel Banden auf den Höhen der einzelnen sHdr-Untereinheiten, aber auch diverse weitere Proteinbanden zeigte (Abbildung 26). Das Vorhandensein von sHdrA konnte durch einen Immunoblot und Massenspektrometrie verifiziert werden (Tabelle 20). Die massenspektrometrische Analyse zeigte allerdings auch, dass eine Vielzahl weiterer Proteine in den untersuchten Proben enthalten waren (Tabelle 20 und Anhang Tabelle 1) und dass außer sHdrA nur die sHdrB2-Untereinheit in geringerer Menge detektiert werden konnte. Ob die sHdr-Proteine aus *H. denitrificans* keinen Komplex bilden oder dieser während der Reinigungsschritte dissoziiert ist, ist im Nachhinein nicht zu beantworten. Dass neben sHdrA auch sHdrB2 per Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte, kann als Indiz dafür gewertet werden, dass der sHdr-Komplex während der verschiedenen Reinigungsschritte dissoziiert ist. Um diese Frage adressieren zu können, wurden Antiseren generiert, die gegen die sHdrC1-, sHdrB1- und sHdrB2-Untereinheiten gerichtet sind (Abbildungen 29-31). Diese können in Zukunft genutzt werden, um zu überprüfen ob die sHdr-Untereinheiten während einer Chromatographie gemeinsam in einer Probe eluieren.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Probleme den nativen sHdr-Komplex aus *H. denitrificans* aufzureinigen, wurde ein weiterer *shdr* Gene enthaltender Organismus im Labor etabliert. *T. thiocyanoxydans* ist ein chemolithoautotropher Organismus (Berben *et al.* 2019). Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Organismus mehr sHdr-Proteine produziert, weil er im Gegensatz zu *H. denitrificans* obligat auf die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen angewiesen ist. Ein erster Hinweis auf diese These kann darin gesehen werden, dass *T. thiocyanoxydans* 40 mM Thiosulfat in ca. 25 h oxidierte (Abbildung 31), wohingegen *H. denitrificans* mindestens dieselbe Zeit zur Oxidation von 2 mM Thiosulfat benötigte (Abbildung 15).

Sollte eine ausreichende Menge an sHdr-Komplex aufgereinigt werden können, könnte dessen Struktur per Proteinkristallographie ermittelt werden. Eine alternative Methode, die weniger Protein benötigt und zudem Aufschlüsse über die Dynamik des Komplexes geben kann, ist die Kryoelektronenmikroskopie (Kühlbrandt 2014).

5.3 Subzelluläre Lokalisation der sHdr-Proteine in *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans*

Die bisher einzige in der Literatur beschriebene subzelluläre Lokalisation für einen sHdr-Komplex stammt aus *A. aeolicus* (Boughanemi *et al.* 2016). Dort wurde ein Komplex bestehend aus den Untereinheiten sHdrAB1B2C1C2 sowohl per Immunoblot als auch mikroskopisch per Immunogold-Labeling als membranassoziiert bestätigt (Boughanemi *et al.* 2016). Es wurde spekuliert, dass das lose mit dem Komplex interagierende Protein DsrE für die Membranassoziation eine Rolle spielt (Boughanemi *et al.* 2016). Für *H. denitrificans* konnte die sHdrA-Untereinheit im Western Blot in der löslichen Fraktion detektiert werden (Koch & Dahl 2018). Weitere Informationen waren für *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans* nicht vorhanden. Durch die Generierung geeigneter Antiseren konnten per Immunoblot die Membranen und die löslichen Überstände beider Organismen auf das Vorhandensein der Untereinheiten sHdrA, sHdrB1 und sHdrB2 untersucht werden (Abbildung 32). Für sHdrA aus *H. denitrificans* konnte die Lokalisation in der löslichen Fraktion bestätigt werden, dagegen zeigte das Antiserum im Falle von sHdrA aus *T. thiocyanoxydans* sowohl ein Signal in der löslichen als auch der Membranfraktion. Die Beobachtung für *T. thiocyanoxydans* stimmt mit der Beobachtung von Boughanemi *et al.* in *A. aeolicus* überein, denn auch dort konnte sHdrA in beiden Fraktionen detektiert werden (Boughanemi *et al.* 2016).

Eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation der sHdrB2-Untereinheit ergab für *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans* ein Signal in der Membranfraktion. In der Vergangenheit wurde für Enzyme mit konservierter CCG-Domäne eine Membranassoziation über amphipathische Helices beschrieben (Lemos *et al.* 2001). Eine Vorhersage der Sekundärstruktur zeigte, dass die CCG-Domäne in einer Schleife lokalisiert ist, die die amphipathischen Helices verbindet (Lemos *et al.* 2002). Die Untereinheit sHdrB2 besitzt zwei konservierte CCG-Domänen mit jeweils fünf konservierten Cysteinen (Koch & Dahl 2018), weshalb eine Membranassoziation über amphipathische Helices für sHdrB2 denkbar wäre.

Eine ähnliche Membranassoziation wurde für die Untereinheiten sHdrB1 und sHdrC2 aus *A. aeolicus* vorgeschlagen (Boughanemi *et al.* 2016). Im Immunoblot wurde sHdrB1 im Falle von *H. denitrificans* vornehmlich in der löslichen Fraktion detektiert, dagegen für *T. thiocyanoxydans* in der Membranfraktion. Aufgrund von Vorhersagen von *in plane*

Membranankern für sHdrB1 aus *H. denitrificans*, wurde in der Vergangenheit eine mögliche Membranassoziation dieser Untereinheit vermutet (Koch 2018). Das Ergebnis des Immunoblots schließt eine solche Situation nicht aus, denn obwohl das stärkere Signal für sHdrB1 in der löslichen Fraktion detektiert wurde, war auch ein Signal auf Höhe der Positivkontrolle in der Membranfraktion zu erkennen.

Für sHdC1 aus *A. aeolicus* und aus *H. denitrificans* wurde ebenfalls über eine Assoziation mit der Membran nachgedacht (Boughanemi 2016; Koch, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Informationen bezüglich dieser Fragestellung erhalten werden, da das Antiserum im Immunoblot von *H. denitrificans* keine und im Immunoblot von *T. thiocyanoxydans* keine eindeutigen Signale lieferte (Abbildung 30). Stattdessen wurden unspezifische Signale sowohl oberhalb als auch unterhalb der erwarteten Größe detektiert (Daten nicht gezeigt). Gründe hierfür zu nennen ist schwierig, da das Antiserum aus einem einzelnen immunisierten Kaninchen stammte. Es ist möglich, dass der polyklonale Antikörper unspezifisch an Proteine mit höherer Häufigkeit in der Probe gebunden hat und somit eine Detektion der sHdC1-Untereinheit nicht möglich war.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der sHdr-Komplex in *T. thiocyanoxydans* eindeutig an der Membran assoziiert vorliegt. Bei *H. denitrificans* sprechen die Detektion von Signalen für sHdrB1 und sHdrB2 in der Membran ebenfalls für eine mögliche Verankerung mit der Membran.

Die Zellextrakte und resolubilisierten Membranen von *T. Thiocyanoxydans* und *H. denitrificans* könnten zukünftig in einer 2D Blue Native PAGE aufgetrennt werden, um mit anschließendem Immunoblot und Massensepektrometrie das Vorhandensein eines sHdr-Komplexes und dessen Zusammensetzung in den Proben zu ermitteln (Wittig *et al.* 2006). Solche Experimente wurden u.a. bereits für die Analyse des Complexosoms des Sulfatreduzierers *Desulfobacula toluolica* durchgeführt (Wöhlbrand *et al.* 2016).

5.4 Dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel in *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans*

In dieser Arbeit wurden *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans* als Modellorganismen verwendet, da beide über ein sHdr-System verfügen (Koch & Dahl 2018; Berben *et al.* 2019). Allerdings handelt es sich bei *H. denitrificans* um einen fakultativ methylophilen

Organismus, der reduzierte Schwefelverbindungen als akzessorische Elektronenquelle nutzt, wohingegen *T. thiocyanoxydans* als chemolithotropher Organismus zwingend auf reduzierte Schwefelverbindungen als Energiequelle angewiesen ist. Im folgenden Kapitel werden die Unterschiede in der dissimilatorischen Schwefeloxidation in den Modellorganismen *H. denitrificans* und *T. thiocyanoxydans* unter Einbezug des sHdr-Systems erläutert.

H. denitrificans kann auf Dimethylsulfid als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, wobei Thiosulfat als Intermediat entsteht, oder beim Wachstum auf Methanol Thiosulfat als zusätzliche Elektronenquelle nutzen (Koch & Dahl 2018). Die initiale Thiosulfatoxidation von *H. denitrificans* startet im Periplasma. *H. denitrificans* besitzt zwei verschiedene periplasmatische Systeme um Thiosulfat zu oxidieren (Abbildung 39). Ein System stellt das Enzym TsdA (Hden_2748) dar, das zwei Thiosulfatmoleküle zu Tetrathionat kondensiert (Denkmann *et al.* 2012). Es konnte in Wachstumsversuchen mit einer Δ tsdA-Mutante gezeigt werden, dass Tetrathionat nicht weiter vom Organismus verstoffwechselt wird (Koch & Dahl 2018). Des Weiteren wurde die TsdA signifikant weniger im DMS-Proteom von *H. denitrificans* gefunden, weshalb diesem Enzym keine vorrangige Funktion für die Oxidation von Thiosulfat einzuräumen ist (Koch & Dahl 2018).

Das zweite periplasmatische Thiosulfatoxidationssystem bildet der SoxXABYZ-Komplex, der in *H. denitrificans* durch die Gene Hden_0702-0706 kodiert wird. Das c-Typ Cytochrom SoxXA (Hden_0702/3) katalysiert zuerst die oxidative Verknüpfung des Sulfanschwefels des Thiosulfatmoleküls mit dem persulfurierten Cystein im aktiven Zentrum von SoxY, durch Ausbildung einer Disulfidbrücke (Ogawa *et al.* 2008; Grabarczyk & Berks 2017). Die entstandene Sulfongruppe wird danach durch SoxB hydrolysiert, wobei Sulfat entsteht und ein an SoxY gebundenes Sulfanaddukt (Sauvé *et al.* 2009; Grabarczyk *et al.* 2015). Da *H. denitrificans* nicht über das tetramere Sox(CD)₂ verfügt, erfolgt die weitere Oxidation zu Sulfid über ein weiteres System im Cytoplasma (Tanabe *et al.* 2019; Dahl 2020b). Der Transport des Sulfanschwefels ins Cytoplasma erfolgt wahrscheinlich über das im *sox* Gencluster kodierte membrangebundene Transporterprotein SoxT (Hden_0699) (Koch & Dahl 2018). Dieses Protein weist große Ähnlichkeiten zu Thiosulfattransportern aus *E. coli* und *Spirochaeta thermophila* auf (Tanaka *et al.* 2020). Ein zur Thiosulfatoxidation unfähiger Phänotyp wurde für eine Δ tsdA Δ soxT-Doppelmutante in *H. denitrificans* erhalten (Hager 2020; Göbel 2021). Eine Deletion von *soxT* führte in *Pseudaminobacter salicylatoxydans*

KCT001 ebenfalls zu einem Ausbleiben der Thiosulfatoxidation (Lahiri *et al.* 2006). Diese Erkenntnisse untermauern die zuvor geäußerte Hypothese, dass Hden_0699 am Transport des Sulfanschwefels ins Cytoplasma beteiligt ist. Mit *soxT* liegen zudem Gene für die putativen Proteine SoxR und SoxS vergesellschaftet in einem Operon vor. Eine vergleichbare Situation liegt in *P. salicylatoxydans* vor (Lahiri *et al.* 2006). Der Regulator SoxR (Hden_0700) ist ein Protein aus der ArsR-Familie, dem eine regulatorische Funktion für die Transkription des *sox* Operons zugesprochen wird (Mandal *et al.* 2007). Das Thioredoxin SoxS (Hden_0701) soll ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung des Sox-Systems spielen (Bagchi & Ghosh 2006; Orawski *et al.* 2007).

Der ins Cytoplasma transportierte Sulfanschwefel wird daraufhin als Persulfid an konservierte Cysteine der Schwefeltransferasen DsrE bzw. TusA übertragen, die den Schwefel gezielt an den Enzymkomplex liefern, der diesen anschließend zu Sulfid oxidiert (Tanabe *et al.* 2019; Dahl 2020b; Ernst *et al.* 2021). Im schwefeloxidierenden Archaeon *M. cuprina* konnte *in vitro* die Übertragung von Thiosulfat von DsrE auf TusA gezeigt werden aber nicht umgekehrt (Liu *et al.* 2014). Eine Übertragung des Persulfidschwefels von DsrE auf TusA wird auch in *H. denitrificans* angenommen (Koch & Dahl 2018; Ernst *et al.* 2021) und massenspektrometrische Untersuchungen stützen diese These (persönliche Kommunikation Sebastian Tanabe). Persulfuriertes TusA dient dann als Substrat des cytoplasmatischen sHdr-Komplexes, der die Oxidation zu Sulfid oxidiert und die dabei gewonnen vier Elektronen nutzt, um die über LbpA gebundene Liponsäure zu reduzieren (Tanabe *et al.* 2019; Dahl 2020b; Ernst *et al.* 2021). Eine Reduktion von NAD^+ über die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase würde die Elektronen aus der Schwefeloxidation in den NAD-Pool einspeisen, was die Vermeidung des reversen Elektronenflusses als Vorteil brächte (Ernst *et al.* 2021). Die zentrale Rolle des sHdr-Komplexes konnte durch reverse Genetik in *H. denitrificans* gezeigt werden. Die ΔsHdr -Mutante des Organismus war nicht in der Lage Thiosulfat abzubauen, wohingegen eine *in trans* Komplementation den wildtypischen Phänotyp wieder herstellte (Koch & Dahl 2018). Ein zu ΔsHdr vergleichbarer Phänotyp wurde für die ΔlbpA -Mutante beobachtet (Cao *et al.* 2018).

Eine besondere Stellung nimmt das Gen *sHdrH* ein, das hochkonserviert in einem *sHdrC1B1AHC2B2* Gencluster zwischen den Genen *sHdrA* und *sHdrC2* vorliegt (Boughanemi *et al.* 2016; Koch & Dahl 2018). Die Deletion des Gens *sHdrH* führte zu einem Phänotyp, dessen

spezifische Thiosulfatoxidationsrate mit $71,96 \pm 0,77$ [nmol/(mg*h)] ca. 90 % niedriger war als die des Wildtyps mit $766,2 \pm 281,9$ [nmol/(mg*h)] (Abbildung 34). Vergleichbare Resultate wurden für dieselbe Mutante in einem modifizierten Versuchsaufbau, in einer im Rahmen dieser Dissertation betreuten Bachelorarbeit, gemessen (Mancoglu, 2020). Die *in frame* Deletion der Schwefeltransferase DsrE führte zu einem Phänotypen mit einem vergleichbaren Thiosulfatabbau (Ballas 2021). Für den Stamm $\Delta tsdA \Delta dsrE$ wurde, bei einer Induktion der Vorkultur mit Thiosulfat, mit einem Wert von $58,4 \pm 0,37$ [nmol/(mg*h)] eine spezifische Thiosulfatoxidationsrate in der gleichen Größenordnung wie für die $\Delta shdrH$ -Mutante gemessen (Ballas 2021). Diese Ergebnisse zeigen, dass sHdrH eine wichtige Rolle für die Thiosulfatoxidation durch das sHdr-System spielt. Als weiteres Indiz für die wichtige Rolle dieses Proteins im Zusammenhang mit dem sHdr-System kann die Lokalisation von sHdrH in *T. thiocyanoxydans* betrachtet werden. In diesem Organismus wurde das Protein, genauso wie die sHdr-Untereinheiten, in der Membranfraktion nachgewiesen (Abbildung 33). Durch diesen Immunoblot gelang es zudem das erste Mal sHdrH direkt in einem Schwefeloxidierer nachzuweisen. Obwohl die Deletion der Gene *shdrH* und *dsrE* vergleichbare Effekte auf das Thiosulfatoxidationsverhalten von *H. denitrificans* zeigt, wird sHdrH vermutlich keine Schwefeltransferase sein, da keine konservierten Cysteine wie in klassischen Schwefeltransferasen in sHdrH vorliegen. Da sHdrH als hypothetisches Protein annotiert ist und keine bekannten Struktur- oder Bindedomänen in seiner Primärsequenz aufweist, bleibt die genaue Funktion weiter unbekannt.

Ein alternatives System zur cytoplasmatischen Sulfanschwefeloxidation bietet die Persulfiddioxygenase (PDO) (Hden_740). PDO ist ein lösliches Enzym und interagiert mit der Sulfid : Chinon Reduktase (SQR), die an der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist (Gao *et al.* 2017). In heterotrophen Bakterien sind die Gene für SQR und PDO genetisch vergesellschaftet (Guimarães *et al.* 2011; Shen *et al.* 2015; Xia *et al.* 2017). *H. denitrificans* kodiert für SQRB (Hden_0718), die in derselben Leserichtung mit einer Rhodanese (Hden_0719), einem TauE-Sulfitexporter (Hden_0720) und einem Protein mit β -Lactamasemotiv (Hden_0721) genetisch vergesellschaftet ist. Eine ähnliche Anordnung von Genen findet sich im *cst* Operon von *Staphylococcus aureus* und dient dort als System zur Detoxifikation von Sulfid (Shen *et al.* 2015, 2016). Da eine Disruption des sHdr-Systems zu einer vollständigen Unfähigkeit des Organismus führte Thiosulfat zu oxidieren, obwohl

PDO und SQR funktionsfähig waren, wurde indirekt gezeigt, dass diese Enzyme keine entscheidende Rolle bei der cytoplasmatischen Schwefeloxidation spielen (Koch & Dahl 2018).

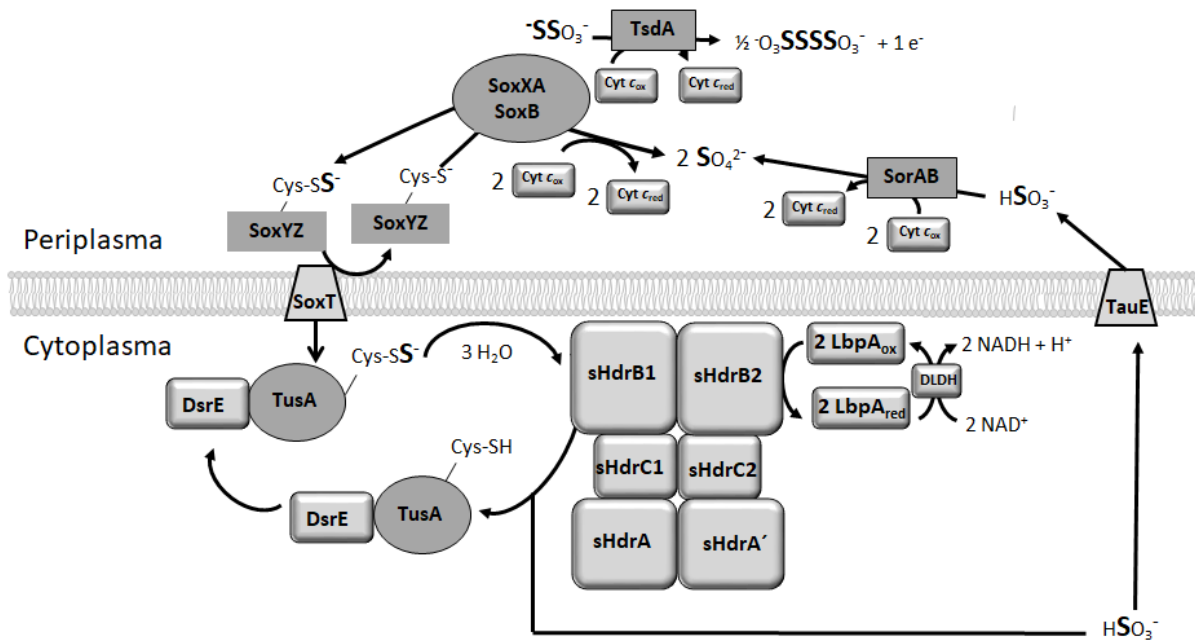


Abbildung 39: Modell der Thiosulfatoxidation in *H. denitrificans*. Die aus Thiosulfat stammenden Schwefelatome sind in größerer und fetter Schriftstärke hervorgehoben. Abkürzungen: cyt $c_{red/ox}$: reduziertes/oxidiertes c-Typ Cytochrom, DLDH: Dihydrolipoyl-Dehydrogenase, LbpA: Lipoatbindepotein A, Sox-System: Schwefeloxidationssystem, TauE: Sulfitexporter mit Motiv des Taurinexkretionssystems.

Eine Besonderheit des sHdr-Systems in *H. denitrificans* ist, dass das erste Gen (Hden_0682) des *shdr* Operons für ein Protein der ArsR-Proteinfamilie kodiert (sHdrR) (Koch & Dahl 2018). Da die sHdr-Proteine signifikant häufiger gefunden wurden wenn *H. denitrificans* auf Dimethylsulfid anstatt auf dem schwefelfreien Substrat Dimethylamin wuchs, wurde eine Regulation der Transkription der *shdr* Gene durch sHdrR postuliert (Koch & Dahl 2018). Diese Hypothese konnte durch einen vergleichenden Immunoblot bestätigt werden (Abbildung 17). Während der Wildtyp nur eine nachweisbare Expression von sHdrA nach Induktion mit Thiosulfat zeigte, konnte ein sHdrA Signal im Western Blot für den $\Delta tsdA \Delta shdrR$ -Stamm sowohl mit als auch ohne Thiosulfatinduktion beobachtet werden. Somit konnte eine konstitutive Expression des sHdr-Systems im *shdrR*-Deletionsstamm bestätigt werden. Das durch die Reaktion des sHdr-Komplexes gebildete Sulfit wird anschließend über einen Sulfitexporter mit TauE-Motiv (Hden_0720) (Weinitschke *et al.* 2007) ins Periplasma

transportiert. Dort könnte die durch Hden_1145/46 kodierte Sulfitdehydrogenase SorAB periplasmatisch das Sulfit zu Sulfat umsetzen und die dabei gewonnenen zwei Elektronen auf *c*-Typ Cytochrome als Elektronenakzeptor übertragen (Kappler & Enemark 2015). SorAB besteht aus dem katalytischen Molybdoprotein SorA und dem kleineren *c*-Typ Cytochrom SorB (Kappler & Enemark 2015). Eine weitere Möglichkeit bietet die spontane abiotische Oxidation von Sulfit mit Sauerstoff zu Sulfat oder die Reaktion von Hydrogensulfit mit Schwefelwasserstoff zu Thiosulfat (Heunisch 1977), das dann erneut als Substrat des unvollständigen Sox-Komplexes dienen könnte (Abbildung 39).

Der Organismus *T. thiocyanoxydans* kann chemolithoautotroph auf anorganischem Carbonat als Kohlenstoffquelle wachsen und u.a. Thiosulfat als Elektronenquelle nutzen (Sorokin *et al.* 2002). Das Thiosulfat wird in *T. thiocyanoxydans* durch einen unvollständigen Sox-Komplex oxidiert (Berben *et al.* 2017, 2019), wie es in schwefeloxidierenden chemolithotrophen γ -Proteobakterien üblich ist (Ghosh & Dam 2009). *T. thiocyanoxydans* ist in der Lage, Thiocyanat durch das Enzym Thiocyanat-Dehydrogenase zu nullwertigen Schwefel zu oxidieren (Berben *et al.* 2017, 2019). *T. thiocyanoxydans* kann zudem extrazelluläre Schwefelkugeln bilden (Sorokin *et al.* 2002), was typisch für Vertreter der Ectothiorhodospiraceae ist (Dahl 2020a). Wie der Schwefel aus den extrazellulären Kugeln zur weiteren Oxidation zu Sulfit bereit gestellt wird ist nicht bekannt (Berben *et al.* 2019). Im Cytoplasma stellt erneut der sHdr-Komplex das Sulfit generierende System dar (Abbildung 40). Für die Oxidation von Sulfit besitzt *T. thiocyanoxydans* zwei verschiedene Systeme (Berben *et al.* 2019). Das direkte System bildet der cytoplasmatische membrangebundene Polysulfidreduktase-ähnliche [FeS]-Molybdoprotein Komplex SoeABC (Boughanemi *et al.* 2020). Der zweite indirekte Weg verläuft über die APS-Reduktase und Sat, die die Elektronen über AprM in die Elektronentransportkette einspeisen (Meyer & Kuever 2007; Dahl 2020b). Vermutlich wird Sulfit durch die Sulfit: Cytochrom *c* Oxidoreduktase zu Sulfat oxidiert (Berben *et al.* 2017).

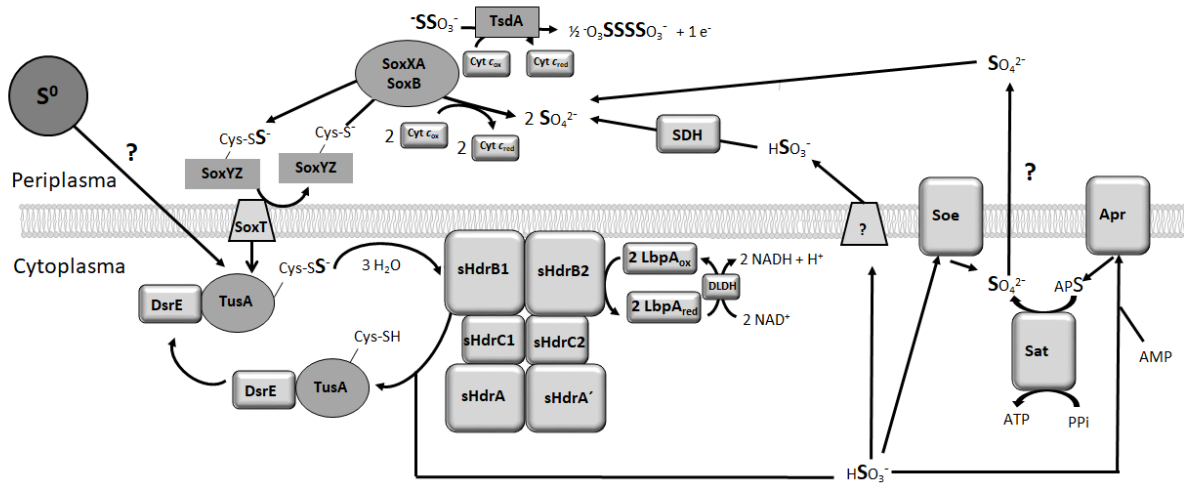


Abbildung 40: Modell der Thiosulfatoxidation in *T. thiocyanoxydans*. Die aus Thiosulfat stammenden Schwefelatome sind in größerer und fatter Schriftstärke hervorgehoben. Abkürzungen: Apr: APS-Reduktase, cyt $c_{red/ox}$: reduziertes/oxidiertes c-Typ Cytochrom, DLDH: Dihydrolipoil-Dehydrogenase, LbpA: Lipoatbindeprotein, Sat: Sulfatadenylyltransferase, SDH: Sulfit-Dehydrogenase, Sox-System: Schwefeloxidationssystem, Soe: Sulfitoxidierendes Enzym.

6 Zusammenfassung

Viele Archaeen und Bakterien von ökologischer Relevanz für den globalen Schwefelkreislauf enthalten ein neuartiges Schwefeloxidationssystem (sHdr), das Ähnlichkeiten zur Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaeen ohne Cytochrome aufweist (mHdr). In dieser Arbeit wurde ein erster Schritt zur biochemischen Charakterisierung des sHdr-Systems unternommen, indem die Untereinheit sHdrA aus *Hyphomicrobium denitrificans* kristallisiert und ihre Cofaktoren biophysikalisch untersucht wurden. sHdrA besitzt eine ähnliche Struktur wie die Thioredoxinreduktase-Domäne aus mHdrA. Diese Domäne bindet im mHdr-Komplex das bifurkierende FAD. Die Kristallstruktur von sHdrA zeigte, dass dieses Protein als Homodimer vorliegt und je Monomer ein [4Fe-4S]-Cluster und ein FAD bindet. Eine durch Elektronenspinresonanz—Spektroskopie verfolgte Redox Titration ergab ein Redoxpotential zwischen -203 und -188 mV für das [4Fe-4S]-Cluster. Für die Redoxpaare des FAD-Cofaktors wurden in einer Redox Titration Werte zwischen -174 und -156 mV für das Redoxpaar Hydrochinon/Semichinon und ein Redoxpotential zwischen -81 mV und -19 mV für das Redoxpaar Semichinon/Flavochinon gemessen. Daraus resultiert ein inverser Elektronenfluss in sHdrA im Vergleich zu mHdrA. Die Beobachtung eines stabilen Semichinons in sHdrA, was durch die unterschiedliche Polarität der FAD-koordinierenden Aminosäuren im Vergleich zu mHdrA erklärt werden kann, spricht gegen eine bifurkierende Eigenschaft von sHdrA. Basierend auf der Struktur von sHdrA wurden eine hexamere Struktur für einen sHdrA²B¹B²C¹C²-Komplex und zwei mögliche Reaktionsmechanismen postuliert.

Antiseren wurden gegen die Untereinheiten sHdrB1 und sHdrB2 generiert, um in zukünftigen chromatographischen Aufreinigungsversuchen, diese Proteine detektieren zu können. Die Antiseren wurden zudem genutzt, um die subzelluläre Lokalisation der sHdr-Untereinheiten in den Modellorganismen *Hyphomicrobium denitrificans* und *Thioalkalivibrio thiocyanoxydans* zu ermitteln.

Das bisher als hypothetisches Protein annotierte sHdrH konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal durch einen Immunoblot im Zellextrakt des chemolithoautotrophen Organismus *Thioalkalivibrio thiocyanoxydans* nachgewiesen werden. Im erweiterten Rahmen dieser

Arbeit wurde zudem durch reverse Genetik die Wichtigkeit des Gens *shdrH* für die Thiosulfatoxidation in *H. denitrificans* gezeigt.

7 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. W. (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **52**: 30–42.
- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Chen, V. B., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Richardson, J. S., Richardson, D. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H. & Adams, P. D. (2010) phenix.model_vs_data: A high-level tool for the calculation of crystallographic model and data statistics. *Journal of Applied Crystallography* **43**: 669–676.
- Akhtar, M. K. & Jones, P. R. (2008) Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe–Fe hydrogenase activity and H₂-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**: 853–862.
- Anantharaman, K., Brown, C. T., Hug, L. A., Sharon, I., Castelle, C. J., Probst, A. J., Thomas, B. C., Singh, A., Wilkins, M. J., Karaoz, U., Brodie, E. L., Williams, K. H., Hubbard, S. S. & Banfield, J. F. (2016) Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nature Communications* **7**: 13219.
- Anantharaman, K., Hausmann, B., Jungbluth, S. P., Kantor, R. S., Lavy, A., Warren, L. A., Rappé, M. S., Pester, M., Loy, A., Thomas, B. C. & Banfield, J. F. (2018) Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. *The ISME Journal* **12**: 1715–1728.
- Appel, L., Willistein, M., Dahl, C., Ermler, U. & Boll, M. (2021) Functional diversity of prokaryotic HdrA(BC) modules: Role in flavin-based electron bifurcation processes and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1862**: 148379.
- Attwood, M. M. & Harder, W. (1972) A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* **38**: 369–377.
- Auernik, K. S. & Kelly, R. M. (2008) Identification of components of electron transport chains in the extremely thermoacidophilic crenarchaeon *Metallosphaera sedula* through iron and sulfur compound oxidation transcriptomes. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 7723–7732.
- Auernik, K. S. & Kelly, R. M. (2010) Physiological versatility of the extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* supported by transcriptomic analysis of heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic growth. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 931–935.
- Bagchi, A. & Ghosh, T. C. (2006) Structural identification of a novel thioredoxin SoxS: Prediction of the function in the process of transport of reductants during sulfur oxidation by the novel global sulfur oxidation reaction cycle. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **758**: 113–118.
- Bak, D. W. & Elliott, S. J. (2014) Alternative FeS cluster ligands: Tuning redox potentials and chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **19**: 50–58.
- Ballas, A. (2021) *Analyse von konservierten Cysteinen und Interaktionspartnern der bakteriellen Schwefeltransferase DsrE3C*. Bachelorarbeit. Universität Bonn.

- Barton, L. L. & Fauque, G. D. (2009) Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-Reducing Bacteria. *Advances in Applied Microbiology* **68**: 41-98.
- Barton, L. L., Fardeau, M.-L. & Fauque, G. D. (2014) Hydrogen sulfide: A toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation. *Metal Ions in Life Sciences* **14**: 237-277.
- Bennati, M., Weiden, N., Dinse, K.-P. & Hedderich, R. (2004) ^{57}Fe ENDOR spectroscopy on the iron-sulfur cluster involved in substrate reduction of heterodisulfide reductase. *Journal of the American Chemical Society* **126**: 8378–8379.
- Berben, T., Sorokin, D. Y., Ivanova, N., Pati, A., Kyrpides, N., Goodwin, L. A., Woyke, T. & Muyzer, G. (2015) Partial genome sequence of the haloalkaliphilic soda lake bacterium *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh 2^T. *Standards in Genomic Sciences* **10**: 85.
- Berben, T., Overmars, L., Sorokin, D. Y. & Muyzer, G. (2017) Comparative genome analysis of three thiocyanate oxidizing *Thioalkalivibrio* species isolated from soda lakes. *Frontiers in Microbiology* **8**: 254.
- Berben, T., Overmars, L., Sorokin, D. Y. & Muyzer, G. (2019) Diversity and distribution of sulfur oxidation-related genes in *Thioalkalivibrio*, a genus of chemolithoautotrophic and haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria. *Frontiers in Microbiology* **10**: 160.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *ELECTROPHORESIS* **8**: 93–99.
- Boll, M., Löffler, C., Morris, B. E. L. & Kung, J. W. (2014) Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: Organisms, strategies and key enzymes. *Environmental Microbiology* **16**: 612–627.
- Boughanemi, S., Lyonnet, J., Infossi, P., Bauzan, M., Kosta, A., Lignon, S., Giudici-Orticoni, M.-T. & Guiral, M. (2016) Microbial oxidative sulfur metabolism: Biochemical evidence of the membrane-bound heterodisulfide reductase-like complex of the bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEMS Microbiology Letters* **363**.
- Boughanemi, S., Infossi, P., Giudici-Orticoni, M.-T., Schoepp-Cothenet, B. & Guiral, M. (2020) Sulfite oxidation by the quinone-reducing molybdenum sulfite dehydrogenase SoeABC from the bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1861**: 148279.
- Bröcker, M. J., Schomburg, S., Heinz, D. W., Jahn, D., Schubert, W.-D. & Moser, J. (2010) Crystal structure of the nitrogenase-like dark operative protochlorophyllide oxidoreductase catalytic complex (ChlN/ChlB)₂. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 27336–27345.
- Brown, P. J. B., Kysela, D. T., Buechlein, A., Hemmerich, C. & Brun, Y. V. (2011) Genome sequences of eight morphologically diverse Alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology* **193**: 4567–4568.
- Brzóška, K., Meczyńska, S. & Kruszewski, M. (2006) Iron-sulfur cluster proteins: Electron transfer and beyond. *Acta Biochimica Polonica* **53**: 685–691.

- Buckel, W. & Thauer, R. K. (2013) Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1827**: 94–113.
- Buckel, W. & Thauer, R. K. (2018) Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews* **118**: 3862–3886.
- Busch, J. L. H., Breton, J. L., Bartlett, B. M., Armstrong, F. A., James, R. & Thomson, A. J. (1997) [3Fe-4S]↔[4Fe-4S] cluster interconversion in *Desulfovibrio africanus* ferredoxin III: Properties of an Asp¹⁴→Cys mutant. *Biochemical Journal* **323**: 95–102.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. & Mattern, M. R. (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expression and Purification* **43**: 1–9.
- Calzolari, L., Gorst, C. M., Zhao, Z.-H., Teng, Q., Adams, M. W. W. & La Mar, G. N. (1995) ¹H NMR investigation of the electronic and molecular structure of the four-iron cluster ferredoxin from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. Identification of Asp 14 as a cluster ligand in each of the four redox states. *Biochemistry* **34**: 11373–11384.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. & Righetti, P. G. (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *ELECTROPHORESIS* **25**: 1327–1333.
- Cao, X., Koch, T., Steffens, L., Finkensieper, J., Zigann, R., Cronan, J. E. & Dahl, C. (2018) Lipoate-binding proteins and specific lipoate-protein ligases in microbial sulfur oxidation reveal an atypical role for an old cofactor. *eLife* **7**: e37439.
- Chen, K., Bonagura, C. A., Tilley, G. J., McEvoy, J. P., Jung, Y.-S., Armstrong, F. A., Stout, C. D. & Burgess, B. K. (2002) Crystal structures of ferredoxin variants exhibiting large changes in [Fe-S] reduction potential. *Nature Structural Biology* **9**: 188–192.
- Chen, L., Ren, Y., Lin, J., Liu, X., Pang, X. & Lin, J. (2012) *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant. *PLOS ONE* **7**: e39470.
- Cianci, M., Gliubich, F., Zanotti, G. & Berni, R. (2000) Specific interaction of lipoate at the active site of rhodanese. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1481**: 103–108.
- Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23–28.
- Dahl, C. (2015) Cytoplasmic sulfur trafficking in sulfur-oxidizing prokaryotes. *IUBMB Life* **67**: 268–274.
- Dahl, C. (2017) Sulfur metabolism in phototrophic bacteria. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics*, Hallenbeck, P.C. (ed.) Cham, Springer International Publishing, pp. 27-66.
- Dahl, C. (2020a) Bacterial intracellular sulphur globules. In *Bacterial Organelles and Organelle-like Inclusions*, Jendrossek, D. (ed.) Cham, Springer International Publishing, pp. 19-51.

- Dahl, C. (2020b) A biochemical view on the biological sulfur cycle. In *Environmental technologies to treat sulfur pollution*, Lens, P.N.L. (ed.) London, IWA Publishing, pp. 55-96.
- Dahl, C., Friedrich, C. & Kletzin, A. (eds.) (2008) Sulfur oxidation in prokaryotes. In *Encyclopedia of life sciences*, Chichester, John Wiley & Sons.
- Dahl, J.-U., Radon, C., Bühning, M., Nimtz, M., Leichert, L. I., Denis, Y., Jourlin-Castelli, C., Iobbi-Nivol, C., Méjean, V. & Leimkühler, S. (2013) The sulfur carrier protein TusA has a pleiotropic role in *Escherichia coli* that also affects molybdenum cofactor biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **288**: 5426–5442.
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., III, Snoeyink, J., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2007) MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research* **35**: W375–W383.
- Denkman, K., Grein, F., Zigann, R., Siemen, A., Bergmann, J., van Helmont, S., Nicolai, A., Pereira, I. A. C. & Dahl, C. (2012) Thiosulfate dehydrogenase: A widespread unusual acidophilic c-type cytochrome. *Environmental Microbiology* **14**: 2673–2688.
- Dijkstra, M., Frank, J., Jr & Duine, J. A. (1989) Studies on electron transfer from methanol dehydrogenase to cytochrome c_L , both purified from *Hyphomicrobium X*. *Biochemical Journal* **257**: 87–94.
- Duarte, A. G., Santos, A. A. & Pereira, I. A. C. (2016) Electron transfer between the QmoABC membrane complex and adenosine 5'-phosphosulfate reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1857**: 380–386.
- Ehrenfeld, N., Levicán, G. J. & Parada, P. (2013) Heterodisulfide reductase from *Acidithiobacilli* is a key component involved in metabolism of reduced inorganic sulfur compounds. *Advanced Materials Research* **825**: 194–197.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **60**: 2126–2132.
- Enami, S., Hoffmann, M. R. & Colussi, A. J. (2009) Simultaneous detection of cysteine sulfenate, sulfinate, and sulfonate during cysteine interfacial ozonolysis. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**: 9356–9358.
- Ernst, C., Kayastha, K., Koch, T., Venceslau, S. S., Pereira, I. A. C., Demmer, U., Ermler, U. & Dahl, C. (2021) Structural and spectroscopic characterization of a HdrA-like subunit from *Hyphomicrobium denitrificans*. *The FEBS Journal* **288**: 1664–1678.
- Evans, E. W., Dodson, C. A., Maeda, K., Biskup, T., Wedge, C. J. & Timmel, C. R. (2013) Magnetic field effects in flavoproteins and related systems. *Interface Focus* **3**: 20130037.
- Everett, S. A., Folkes, L. K., Wardman, P. & Asmus, K.-D. (1994) Free-radical repair by a novel perthiol: Reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation. *Free Radical Research* **20**: 387–400.

- Fellay, R., Frey, J. & Krisch, H. (1987) Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: A family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* **52**: 147–154.
- Fike, D. A., Bradley, A. S. & Rose, C. V. (2015) Rethinking the ancient sulfur cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **43**: 593–622.
- Finster, K. (2008) Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds. *Journal of Sulfur Chemistry* **29**: 281–292.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. & Fischer, J. (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: Emergence of a common mechanism? *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2873–2882.
- Frigaard, N.-U. & Dahl, C. (2008) Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **54**: 103-200.
- Fuchs, G., Boll, M. & Heider, J. (2011) Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 803–816.
- Gao, R., Liu, H. & Xun, L. (2017) Cytoplasmic localization of sulfide:quinone oxidoreductase and persulfide dioxygenase of *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. *Applied and Environmental Microbiology* **83**: e01820-17.
- Gavrilenko, N. A., Sukhanov, A. V. & Mokhova, O. V. (2010) Redox and acid-base properties of 2,6-dichlorophenolindophenol immobilized on a polymethacrylate matrix. *Journal of Analytical Chemistry* **65**: 17–20.
- Ghosh, W. & Dam, B. (2009) Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS microbiology reviews* **33**: 999–1043.
- Gliesche, C., Fesefeldt, A. & Hirsch, P. (2005) *Hyphomicrobium* Stutzer and Hartleb 1898, 76^{AL}. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* **2**: 476-494.
- Göbel, F. (2021) *Die YeeE/YedE-Proteinfamilie in Hyphomicrobium denitrificans und ihre Rolle im Schwefelstoffwechsel*. Bachelorarbeit. Universität Bonn.
- Grabarczyk, D. B. & Berks, B. C. (2017) Intermediates in the Sox sulfur oxidation pathway are bound to a sulfane conjugate of the carrier protein SoxYZ. *PLOS ONE* **12**: e0173395.
- Grabarczyk, D. B., Chappell, P. E., Johnson, S., Stelzl, L. S., Lea, S. M. & Berks, B. C. (2015) Structural basis for specificity and promiscuity in a carrier protein/enzyme system from the sulfur cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: E7166–E7175.
- Guimarães, B. G., Barbosa, R. L., Soprano, A. S., Campos, B. M., Souza, T. A. de, Tonoli, C. C. C., Leme, A. F. P., Murakami, M. T. & Benedetti, C. E. (2011) Plant pathogenic bacteria utilize biofilm growth-associated repressor (BigR), a novel winged-helix redox switch, to control hydrogen sulfide detoxification under hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 26148–26157.

- Guo, X., Yin, H., Liang, Y., Hu, Q., Zhou, X., Xiao, Y., Ma, L., Zhang, X., Qiu, G. & Liu, X. (2014) Comparative genome analysis reveals metabolic versatility and environmental adaptations of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* strain ST. *PLOS ONE* **9**: e99417.
- Hager, N. (2020) *Eigenschaften und Funktionen von Cytochrom P450 und dem potentiellen Schwefeltransporter YedE/YeeE in Hyphomicrobium denitrificans*. Bachelorarbeit. Universität Bonn.
- Hamann, N., Mander, G. J., Shokes, J. E., Scott, R. A., Bennati, M. & Hedderich, R. (2007) A cysteine-rich CCG Domain contains a novel [4Fe-4S] Cluster binding motif as deduced from studies with subunit B of heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis*. *Biochemistry* **46**: 12875–12885.
- Hamann, N., Bill, E., Shokes, J. E., Scott, R. A., Bennati, M. & Hedderich, R. (2009) The CCG-domain-containing subunit SdhE of succinate:quinone oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus* P2 binds a [4Fe-4S] cluster. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **14**: 457–470.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557–580.
- Harder, W. & Attwood, M. M. (1978) Biology, physiology and biochemistry of *Hyphomicrobia*. *Advances in Microbial Physiology* **17**: 303–359.
- Hausmann, B., Pelikan, C., Herbold, C. W., Köstlbacher, S., Albertsen, M., Eichorst, S. A., Glavina del Rio, T., Huemer, M., Nielsen, P. H., Rattei, T., Stingl, U., Tringe, S. G., Trojan, D., Wentrup, C., Wobken, D., Pester, M. & Loy, A. (2018) Peatland *Acidobacteria* with a dissimilatory sulfur metabolism. *The ISME Journal* **12**: 1729–1742.
- Henkel, J. V., Dellwig, O., Pollehne, F., Herlemann, D. P. R., Leipe, T. & Schulz-Vogt, H. N. (2019) A bacterial isolate from the Black Sea oxidizes sulfide with manganese(IV) oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 12153–12155.
- Hernandez, H. H., Jaquez, O. A., Hamill, M. J., Elliott, S. J. & Drennan, C. L. (2008) Thioredoxin reductase from *Thermoplasma acidophilum*: A new twist on redox regulation. *Biochemistry* **47**: 9728–9737.
- Heunisch, G. W. (1977) Stoichiometry of the reaction of sulfites with hydrogen sulfide ion. *Inorganic Chemistry* **16**: 1411–1413.
- Holm, L. & Laakso, L. M. (2016) Dali server update. *Nucleic Acids Research* **44**: W351–W355.
- Huwiler, S. G., Löffler, C., Anselmann, S. E. L., Stärk, H.-J., Bergen, M. von, Flechsler, J., Rachel, R. & Boll, M. (2019) One-megadalton metalloenzyme complex in *Geobacter metallireducens* involved in benzene ring reduction beyond the biological redox window. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 2259–2264.
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A. & Suzuki, T. (2006) Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Molecular Cell* **21**: 97–108.

- Imlay, J. A. (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular Microbiology* **59**: 1073–1082.
- Jeno, P., Mini, T., Moes, S., Hintermann, E. & Horst, M. (1995) Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **224**: 75–82.
- JianPing, O., Qian, L., Bo, L., JingQun, A. & XinHua, C. (2013) Proteomic analysis of differential protein expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown on ferrous iron or elemental sulfur. *Indian Journal of Microbiology* **53**: 56–62.
- Johnson, D. B., Kanao, T. & Hedrich, S. (2012) Redox transformations of iron at extremely low pH: Fundamental and applied aspects. *Frontiers in Microbiology* **3**: 96.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 247–281.
- Jørgensen, B. B. (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction. *Nature* **296**: 643–645.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**: 125–132.
- Käll, L., Storey, J. D., MacCoss, M. J. & Noble, W. S. (2008) Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *Journal of Proteome Research* **7**: 29–34.
- Kappler, U. & Enemark, J. H. (2015) Sulfite-oxidizing enzymes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **20**: 253–264.
- Kappler, U. & Schäfer, H. (2014) Transformations of dimethylsulfide. *Metal Ions in Life Sciences* **14**: 279–313.
- Kaster, A.-K., Moll, J., Parey, K. & Thauer, R. K. (2011) Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 2981–2986.
- Katoh, E., Hatta, T., Shindo, H., Ishii, Y., Yamada, H., Mizuno, T. & Yamazaki, T. (2000) High precision NMR structure of YhhP, a novel *Escherichia coli* protein implicated in cell division. *Journal of Molecular Biology* **304**: 219–229.
- Kawano, Y., Suzuki, K. & Ohtsu, I. (2018) Current understanding of sulfur assimilation metabolism to biosynthesize L-cysteine and recent progress of its fermentative overproduction in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**: 8203–8211.
- Kayastha, K., Vitt, S., Buckel, W. & Ermler, U. (2021) Flavins in the electron bifurcation process. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **701**: 108796.
- Kikuchi, G. & Hiraga, K. (1982) The mitochondrial glycine cleavage system. *Molecular and Cellular Biochemistry* **45**: 137–149.
- Koch, T. (2018) *Ein neuer Weg der mikrobiellen Schwefeloxidation: Das Heterodisulfidreduktase-ähnliche System*. Dissertation. Universität Bonn.

- Koch, T. & Dahl, C. (2018) A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. *The ISME Journal* **12**: 2479–2491.
- Kreke, B. & Cypionka, H. (1995) Energetics of sulfate transport in *Desulfomicrobium baculatum*. *Archives of Microbiology* **163**: 307–309.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology* **372**: 774–797.
- Kröniger, L., Berger, S., Welte, C. & Deppenmeier, U. (2016) Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *The FEBS Journal* **283**: 472–483.
- Kuchenreuther, J. M., Grady-Smith, C. S., Bingham, A. S., George, S. J., Cramer, S. P. & Swartz, J. R. (2010) High-yield expression of heterologous [FeFe] hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* **5**: e15491.
- Kühlbrandt, W. (2014) Cryo-EM enters a new era. *eLife* **3**: e03678.
- Kuriyan, J., Krishna, T. S. R., Wong, L., Guenther, B., Pahler, A., Williams, C. H. & Model, P. (1991) Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* **352**: 172–174.
- de La Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods in Enzymology* **276**: 472–494.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lahiri, C., Mandal, S., Ghosh, W., Dam, B. & Roy, P. (2006) A novel gene cluster *soxSRT* is essential for the chemolithotrophic oxidation of thiosulfate and tetrathionate by *Pseudaminobacter salicylatoxidans* KCT001. *Current Microbiology* **52**: 267–273.
- Langen, R., Jensen, G. M., Jacob, U., Stephens, P. J. & Warshel, A. (1992) Protein control of iron-sulfur cluster redox potentials. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 25625–25627.
- Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. (2008) Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nature Protocols* **3**: 1171–1179.
- Latorre, M., Ehrenfeld, N., Cortés, M. P., Travisany, D., Budinich, M., Aravena, A., González, M., Bobadilla-Fazzini, R. A., Parada, P. & Maass, A. (2016) Global transcriptional responses of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Wenelen under different sulfide minerals. *Bioresource Technology* **200**: 29–34.
- Lemos, R. S., Gomes, C. M. & Teixeira, M. (2001) *Acidianus ambivalens* complex II typifies a novel family of succinate dehydrogenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **281**: 141–150.
- Lemos, R. S., Fernandes, A. S., Pereira, M. M., Gomes, C. M. & Teixeira, M. (2002) Quinol:fumarate oxidoreductases and succinate:quinone oxidoreductases: Phylogenetic relationships, metal

- centres and membrane attachment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1553**: 158–170.
- Lennon, B. W., Williams, C. H. & Ludwig, M. L. (2000) Twists in catalysis: Alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science* **289**: 1190–1194.
- Liu, B., Liu, H., Zhong, D. & Lin, C. (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 578–586.
- Liu, L.-J., Stockdreher, Y., Koch, T., Sun, S.-T., Fan, Z., Josten, M., Sahl, H.-G., Wang, Q., Luo, Y.-M., Liu, S.-J., Dahl, C. & Jiang, C.-Y. (2014) Thiosulfate transfer mediated by DsrE/TusA homologs from acidothermophilic sulfur-oxidizing archaeon *Metallosphaera cuprina*. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 26949–26959.
- Löckener, I. (2016) *Reinigung und Charakterisierung des membranständigen Hdr-Komplexes aus dem Schwefelpurpurbakterium Thiorhodospira sibirica*. Bachelorarbeit. Universität Bonn.
- Loy, A., Duller, S., Baranyi, C., Mußmann, M., Ott, J., Sharon, I., Béjà, O., Paslier, D. L., Dahl, C. & Wagner, M. (2009) Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. *Environmental Microbiology* **11**: 289–299.
- Lubner, C. E., Jennings, D. P., Mulder, D. W., Schut, G. J., Zadvornyy, O. A., Hoben, J. P., Tokmina-Lukaszewska, M., Berry, L., Nguyen, D. M., Lipscomb, G. L., Bothner, B., Jones, A. K., Miller, A.-F., King, P. W., Adams, M. W. W. & Peters, J. W. (2017) Mechanistic insights into energy conservation by flavin-based electron bifurcation. *Nature Chemical Biology* **13**: 655–659.
- Madadi-Kahkesh, S., Duin, E. C., Heim, S., Albracht, S. P. J., Johnson, M. K. & Hedderich, R. (2001) A paramagnetic species with unique EPR characteristics in the active site of heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry* **268**: 2566–2577.
- Mancoglu, A. (2020) *Eigenschaften und Funktion des Proteins sHdrH (Hden0692) aus Hyphomicrobium denitrificans*. Bachelorarbeit. Universität Bonn.
- Mandal, S., Chatterjee, S., Dam, B., Roy, P. & Gupta, S. K. D. (2007) The dimeric repressor SoxR binds cooperatively to the promoter(s) regulating expression of the sulfur oxidation (*sox*) operon of *Pseudaminobacter salicylatoxidans* KCT001. *Microbiology* **153**: 80–91.
- Mander, G. J., Duin, E. C., Linder, D., Stetter, K. O. & Hedderich, R. (2002) Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry* **269**: 1895–1904.
- Mander, G. J., Pierik, A. J., Huber, H. & Hedderich, R. (2004) Two distinct heterodisulfide reductase-like enzymes in the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus profundus*. *European Journal of Biochemistry* **271**: 1106–1116.
- Mangold, S., Valdés, J., Holmes, D. & Dopson, M. (2011) Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus Caldus*. *Frontiers in Microbiology* **2**: 17.
- Massey, V. & Palmer, G. (1966) On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones. *Biochemistry* **5**: 3181–3189.

- Matthews, R. G. & Williams, C. H. (1976) Measurement of the oxidation-reduction potentials for two-electron and four-electron reduction of lipoamide dehydrogenase from pig heart. *The Journal of Biological Chemistry* **251**: 3956–3964.
- Mayhew, S. G. (1978) The redox potential of dithionite and SO_2 from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *European Journal of Biochemistry* **85**: 535–547.
- McLaughlin, M. I., Lanz, N. D., Goldman, P. J., Lee, K.-H., Booker, S. J. & Drennan, C. L. (2016) Crystallographic snapshots of sulfur insertion by lipoyl synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: 9446–9450.
- Meiberg, J. B. M. & Harder, W. Y. (1978) Aerobic and anaerobic metabolism of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in *Hyphomicrobium* X. *Microbiology* **106**: 265–276.
- Meyer, B. & Kuever, J. (2007) Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes - origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. *Microbiology* **153**: 2026–2044.
- Meyer, B., Kuehl, J., Deutschbauer, A. M., Price, M. N., Arkin, A. P. & Stahl, D. A. (2013) Variation among *Desulfovibrio* species in electron transfer systems used for syntrophic growth. *Journal of Bacteriology* **195**: 990–1004.
- Meyerdierks, A., Kube, M., Kostadinov, I., Teeling, H., Glöckner, F. O., Reinhardt, R. & Amann, R. (2010) Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environmental Microbiology* **12**: 422–439.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* **260**: 289–298.
- Mock, J., Wang, S., Huang, H., Kahnt, J. & Thauer, R. K. (2014) Evidence for a hexaheteromeric methylenetetrahydrofolate reductase in *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bacteriology* **196**: 3303–3314.
- 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.
- Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G. & Fujita, Y. (2010) X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase. *Nature* **465**: 110–114.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **53**: 240–255.
- Muyzer, G. & Stams, A. J. M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 441–454.

- Nagahara, N. & Katayama, A. (2005) Post-translational regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase via a low redox potential cysteine-sulfenate in the maintenance of redox homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 34569–34576.
- Nagy, P. & Winterbourn, C. C. (2010) Redox chemistry of biological thiols. *Advances in Molecular Toxicology* **4**: 183–222.
- Nagy, P., Lemma, K. & Ashby, M. T. (2007) Reactive sulfur species: Kinetics and mechanisms of the reaction of cysteine thiosulfinate ester with cysteine to give cysteine sulfenic acid. *The Journal of Organic Chemistry* **72**: 8838–8846.
- Nakamura, M., Saeki, K. & Takahashi, Y. (1999) Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the *orf1-orf2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-orf3* gene cluster. *The Journal of Biochemistry* **126**: 10–18.
- Nielsen, M. S., Harris, P., Ooi, B. L. & Christensen, H. E. M. (2004) The 1.5 Å resolution crystal structure of [Fe₃S₄]-ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **43**: 5188–5194.
- Nitschke, W. & Russell, M. J. (2012) Redox bifurcations: Mechanisms and importance to life now, and at its origin. *BioEssays* **34**: 106–109.
- Novick, R. P. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews* **51**: 381–395.
- Ogawa, T., Furusawa, T., Nomura, R., Seo, D., Hosoya-Matsuda, N., Sakurai, H. & Inoue, K. (2008) SoxAX binding protein, a novel component of the thiosulfate-oxidizing multienzyme system in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Journal of Bacteriology* **190**: 6097–6110.
- Orawski, Grazyna., Bardischewsky, Frank., Quentmeier, Armin., Rother, Dagmar. & Friedrich, C. G. Y. (2007) The periplasmic thioredoxin SoxS plays a key role in activation *in vivo* of chemotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. *Microbiology* **153**: 1081–1086.
- O'Reilly, J. E. (1973) Oxidation-reduction potential of the ferro-ferricyanide system in buffer solutions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **292**: 509–515.
- Osorio, H., Mangold, S., Denis, Y., Nancucheo, I., Esparza, M., Johnson, D. B., Bonnefoy, V., Dopson, M. & Holmes, D. S. (2013) Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 2172–2181.
- Page, C. C., Moser, C. C. & Dutton, P. L. (2003) Mechanism for electron transfer within and between proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* **7**: 551–556.
- Palfey, B. A. & Massey, V. (1998) Flavin-dependent enzymes. In *Comprehensive Biological Catalysis*, Sinnott, M. (ed.) New York, Academic Press, pp. 83–154.
- Peters, J. W., Miller, A.-F., Jones, A. K., King, P. W. & Adams, M. W. (2016) Electron bifurcation. *Current Opinion in Chemical Biology* **31**: 146–152.
- Pires, R. H., Lourenço, A. I., Morais, F., Teixeira, M., Xavier, A. V., Saraiva, L. M. & Pereira, I. A. C. (2003) A novel membrane-bound respiratory complex from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1605**: 67–82.

- Probst, A. J., Ladd, B., Jarett, J. K., Geller-McGrath, D. E., Sieber, C. M. K., Emerson, J. B., Anantharaman, K., Thomas, B. C., Malmstrom, R. R., Stieglmeier, M., Klingl, A., Woyke, T., Ryan, M. C. & Banfield, J. F. (2018) Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nature Microbiology* **3**: 328–336.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Ratouchniak, J., Veloso, F., Valdes, J., Lefimil, C., Silver, S., Roberto, F., Orellana, O., Denizot, F., Jedlicki, E., Holmes, D. & Bonnefoy, V. (2006) Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* **83**: 263–272.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D. S. & Bonnefoy, V. (2009) Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics* **10**: 394.
- Rabus, R., Venceslau, S. S., Wöhlbrand, L., Voordouw, G., Wall, J. D. & Pereira, I. A. C. (2015) A post-genomic view of the ecophysiology, catabolism and biotechnological relevance of sulphate-reducing prokaryotes. *Advances in Microbial Physiology* **66**: 55–321.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Gliesche, C. G. & Stackebrandt, E. (1998) Phylogenetic analysis and intrageneric structure of the genus *Hyphomicrobium* and the related genus *Filomicrobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **48**: 635–639.
- Ramos, A., Keller, K., Wall, J. & Pereira, I. A. (2012) The membrane QmoABC complex interacts directly with the dissimilatory adenosine 5'-phosphosulfate reductase in sulfate reducing bacteria. *Frontiers in Microbiology* **3**: 137.
- Ramos, A. R., Grein, F., Oliveira, G. P., Venceslau, S. S., Keller, K. L., Wall, J. D. & Pereira, I. A. C. (2015) The FlxABCD-HdrABC proteins correspond to a novel NADH dehydrogenase/heterodisulfide reductase widespread in anaerobic bacteria and involved in ethanol metabolism in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Environmental Microbiology* **17**: 2288–2305.
- Riederer, B. M. (2009) Oxidation proteomics: The role of thiol modifications. *Current Proteomics* **6**: 51-62.
- Rohlin, L. & Gunsalus, R. P. (2010) Carbon-dependent control of electron transfer and central carbon pathway genes for methane biosynthesis in the Archaeon, *Methanosarcina acetivorans* strain C2A. *BMC Microbiology* **10**: 62.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. & Ferrara, P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **203**: 173–179.
- Santos, A. A., Venceslau, S. S., Grein, F., Leavitt, W. D., Dahl, C., Johnston, D. T. & Pereira, I. A. C. (2015) A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. *Science* **350**: 1541–1545.
- Sauvé, V., Bruno, S., Berks, B. C. & Hemmings, A. M. (2007) The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 23194–23204.

- Sauvé, V., Roversi, P., Leath, K. J., Garman, E. F., Antrobus, R., Lea, S. M. & Berks, B. C. (2009) Mechanism for the hydrolysis of a sulfur-sulfur bond based on the crystal structure of the thiosulfohydrolase SoxB. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 21707–21718.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69–73.
- Schäfer, H., Myronova, N. & Boden, R. (2010) Microbial degradation of dimethylsulphide and related C1-sulphur compounds: Organisms and pathways controlling fluxes of sulphur in the biosphere. *Journal of Experimental Botany* **61**: 315–334.
- Schleicher, E. & Weber, S. (2012) Radicals in flavoproteins. *Topics in Current Chemistry* **321**: 41–65.
- Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **58**: 1772–1779.
- Schulz, G. E., Schirmer, R. H., Sachsenheimer, W. & Pai, E. F. (1978) The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* **273**: 120–124.
- Schwartz, C. J., Giel, J. L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F. J., Beinert, H. & Kiley, P. J. (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 14895–14900.
- Shen, J., Keithly, M. E., Armstrong, R. N., Higgins, K. A., Edmonds, K. A. & Giedroc, D. P. (2015) *Staphylococcus aureus* CstB is a novel multidomain persulfide dioxygenase-sulfurtransferase involved in hydrogen sulfide detoxification. *Biochemistry* **54**: 4542–4554.
- Shen, J., Peng, H., Zhang, Y., Trinidad, J. C. & Giedroc, D. P. (2016) *Staphylococcus aureus* *sqr* encodes a type II sulfide:quinone oxidoreductase and impacts reactive sulfur speciation in cells. *Biochemistry* **55**: 6524–6534.
- Shen, Y., Buick, R. & Canfield, D. E. (2001) Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature* **410**: 77–81.
- Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.-F., Matte, A., Armengod, M. E. & Cygler, M. (2010) Structural basis for Fe–S Cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS Protein–Protein Interactions. *PLOS Biology* **8**: e1000354.
- Sieber, J. R., Sims, D. R., Han, C., Kim, E., Lykidis, A., Lapidus, A. L., McDonald, E., Rohlin, L., Culley, D. E., Gunsalus, R. & McInerney, M. J. (2010) The genome of *Syntrophomonas wolfei*: New insights into syntrophic metabolism and biohydrogen production. *Environmental Microbiology* **12**: 2289–2301.
- Sievert, S. M., Kiene, R. P. & Schulz-Vogt, H. N. (2007) The sulfur cycle. *Oceanography* **20**: 117–123.
- Silver, M. & Kelly, D. P. Y. (1976) Rhodanese from *Thiobacillus* A2: Catalysis of reactions of thiosulphate with dihydrolipoate and dihydrolipoamide. *Microbiology* **97**: 277–284.

- Skjoldager, N., Blanner Bang, M., Rykær, M., Björnberg, O., Davies, M. J., Svensson, B., Harris, P. & Hägglund, P. (2017) The structure of *Lactococcus lactis* thioredoxin reductase reveals molecular features of photo-oxidative damage. *Scientific Reports* **7**: 46282.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L. & Kuenen, J. G. (2002) *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 657–664.
- Spalding, M. D. & Prigge, S. T. (2010) Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**: 200–228.
- Steffens, L. (2018) *The Sulfur-Oxidizing Heterodisulfide Reductase (Hdr)-like Protein Complex from Hyphomicrobium denitrificans*. Masterarbeit. Universität Bonn.
- Steiert, P. S., Stauffer, L. T. & Stauffer, G. V. (1990) The *lpd* gene product functions as the L protein in the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *Journal of Bacteriology* **172**: 6142–6144.
- Steudel, R. & Chivers, T. (2019) The role of polysulfide dianions and radical anions in the chemical, physical and biological sciences, including sulfur-based batteries. *Chemical Society Reviews* **48**: 3279–3319.
- Stockdreher, Y., Venceslau, S. S., Josten, M., Sahl, H.-G., Pereira, I. A. C. & Dahl, C. (2012) Cytoplasmic sulfurtransferases in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: Evidence for sulfur transfer from DsrEFH to DsrC. *PLOS ONE* **7**: e40785.
- Stockdreher, Y., Sturm, M., Josten, M., Sahl, H.-G., Dobler, N., Zigann, R. & Dahl, C. (2014) New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochromatium vinosum*. *Journal of Biological Chemistry* **289**: 12390–12403.
- Suzuki, S., Sakurai, T., Itoh, S. & Ohshiro, Y. (1988) Preparation and characterization of ternary copper(II) complexes containing coenzyme PQQ and bipyridine or terpyridine. *Inorganic Chemistry* **27**: 591–592.
- Takahashi, Y. & Nakamura, M. (1999) Functional Assignment of the *orf2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-orf3* gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry* **126**: 917–926.
- Tanabe, T. S., Leimkühler, S. & Dahl, C. (2019) The functional diversity of the prokaryotic sulfur carrier protein TusA. *Advances in Microbial Physiology* **75**: 233–277.
- Tanaka, Y., Yoshikaie, K., Takeuchi, A., Ichikawa, M., Mori, T., Uchino, S., Sugano, Y., Hakoshima, T., Takagi, H., Nonaka, G. & Tsukazaki, T. (2020) Crystal structure of a YeeE/YedE family protein engaged in thiosulfate uptake. *Science Advances* **6**: eaba7637.
- Tauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**: 100–180.
- Tauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W. & Hedderich, R. (2008) Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 579–591.

- Urakami, T., Sasaki, J., Suzuki, K.-I. & Komagata, K. (1995) Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **45**: 528–532.
- Urban, P. J. (1961) Colorimetry of sulphur anions. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* **179**: 415–422.
- Venceslau, S. S., Stockdreher, Y., Dahl, C. & Pereira, I. A. C. (2014) The “bacterial heterodisulfide” DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1837**: 1148–1164.
- Vishniac, W. & Santer, M. (1957) The thiobacilli. *Bacteriological Reviews* **21**: 195–213.
- Wagner, T., Koch, J., Ermler, U. & Shima, S. (2017) Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane [4Fe-4S] clusters for reduction. *Science* **357**: 699–703.
- Watanabe, T., Kojima, H. & Fukui, M. (2014) Complete genomes of freshwater sulfur oxidizers *Sulfuricella denitrificans* skB26 and *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H: Genetic insights into the sulfur oxidation pathway of betaproteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **37**: 387–395.
- Watanabe, T., Kojima, H., Umezawa, K., Hori, C., Takasuka, T. E., Kato, Y. & Fukui, M. (2019) Genomes of neutrophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotrophs representing 9 proteobacterial species from 8 genera. *Frontiers in Microbiology* **10**: 316.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. & Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**: W296–W303.
- Weinitschke, S., Denger, K., Cook, A. M. & Smits, T. H. M. Y. (2007) The DUF81 protein TauE in *Cupriavidus necator* H16, a sulfite exporter in the metabolism of C₂ sulfonates. *Microbiology* **153**: 3055–3060.
- Weissgerber, T., Dobler, N., Polen, T., Latus, J., Stockdreher, Y. & Dahl, C. (2013) Genome-wide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180^T during growth on different reduced sulfur compounds. *Journal of Bacteriology* **195**: 4231–4245.
- Wischgoll, S., Heintz, D., Peters, F., Exleben, A., Sarnighausen, E., Reski, R., Dorselaer, A. V. & Boll, M. (2005) Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Molecular Microbiology* **58**: 1238–1252.
- Wittig, I., Braun, H.-P. & Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nature Protocols* **1**: 418–428.
- Wöhlbrand, L., Ruppertsberg, H. S., Feenders, C., Blasius, B., Braun, H.-P. & Rabus, R. (2016) Analysis of membrane–protein complexes of the marine sulfate reducer *Desulfobacula toluolica* Tol2 by 1D blue native-PAGE complexome profiling and 2D blue native-/SDS-PAGE. *PROTEOMICS* **16**: 973–988.
- Xia, Y., Lü, C., Hou, N., Xin, Y., Liu, J., Liu, H. & Xun, L. (2017) Sulfide production and oxidation by heterotrophic bacteria under aerobic conditions. *The ISME Journal* **11**: 2754–2766.

- Yan, Z., Wang, M. & Ferry, J. G. (2017) A ferredoxin- and $F_{420}H_2$ -dependent, electron-bifurcating, heterodisulfide reductase with homologs in the domains *Bacteria* and *Archaea*. *mBio* **8**: e02285-16.
- Zander, U., Faust, A., Klink, B. U., Sanctis, D. de, Panjikar, S., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Friedrich, C. G. & Scheidig, A. J. (2011) Structural basis for the oxidation of protein-bound sulfur by the sulfur cycle molybdohemo-enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 8349–8360.
- Zehnder, A. J. B. & Wuhrmann, K. (1976) Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**: 1165–1166.
- Zhou, Z. H. & Adams, M. W. W. (1997) Site-directed mutations of the 4Fe-ferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: Role of the cluster-coordinating aspartate in physiological electron transfer reactions. *Biochemistry* **36**: 10892–10900.

Anhang

Anhang Tabelle 1: Gemessene Proteine in der Massenspektrometrie. Aus Übersicht werden Kontaminanten nicht gezeigt.

Gene ID	Beschreibung	Abundanz Probe 1	Abundanz Probe 2	Abundanz Probe 3	Abundanz Probe 4	Abundanz Probe 5
D8JTZ5; hdn:Hden_2747	Coenzyme A transferase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2747 PE=4 SV=1	2,7E+11	6,4E+09	1,1E+10	3,7E+10	7,1E+10
D8JPIO; hdn:Hden_0044	Alpha-2-macroglobulin domain protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0044 PE=3 SV=1	5,9E+09	4,5E+08	5,3E+08	3,3E+08	2,1E+09
D8JZ83; hdn:Hden_1882	Nitrous-oxide reductase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=nosZ PE=3 SV=1	3,6E+09	2,1E+08	8,9E+08	9,3E+07	7,8E+07
D8JPR6; hdn:Hden_1999	L-aspartate oxidase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1999 PE=3 SV=1	2,8E+09	2,0E+08	3,3E+09	2,9E+08	4,8E+08
D8JWZ9; hdn:Hden_1323	PQQ-dependent dehydrogenase, methanol/ethanol family OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1323 PE=3 SV=1	6,0E+08	2,4E+07	1,7E+07	1,6E+08	5,6E+07
D8JSS7; hdn:Hden_0591	Copper-containing nitrite reductase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0591 PE=3 SV=1	5,9E+08	4,6E+09	3,9E+08	2,2E+08	4,4E+09
D8JUM7; hdn:Hden_2861	Glycine--tRNA ligase beta subunit OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=glyS PE=3 SV=1	4,1E+08	4,4E+06	2,0E+08	3,3E+05	1,0E+07
D8JYK9; hdn:Hden_1654	Transcription-repair-coupling factor OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=mfd PE=3 SV=1	3,6E+08	5,4E+09	2,2E+08	2,5E+08	2,9E+08
D8JRQ4; hdn:Hden_2325	30S ribosomal protein S1 OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2325 PE=3 SV=1	3,2E+08	2,2E+08	1,4E+09	3,3E+10	3,8E+10
D8JT48; hdn:Hden_2570	Nitrous oxidase accessory protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2570 PE=4 SV=1	3,0E+08	1,5E+10	5,4E+08	1,3E+08	4,8E+08
D8JZA3; hdn:Hden_1904	Citrate synthase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1904 PE=3 SV=1	2,4E+08	1,0E+09	8,0E+10	1,6E+10	3,9E+09

D8JY89; hdn:Hden_3502	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=pnp PE=3 SV=1	1,3E+08	2,0E+06	6,3E+06	2,0E+05	1,6E+06
D8JV39; hdn:Hden_1041	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=rpoA PE=3 SV=1	9,0E+07	1,1E+06	1,3E+07	1,7E+07	1,2E+07
D8JRF0; hdn:Hden_0356	N-6 DNA methylase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0356 PE=3 SV=1	6,0E+07	4,7E+07	9,9E+06	4,8E+06	6,7E+07
D8JXJ6; hdn:Hden_3384	Chaperone protein DnaK OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=dnaK PE=2 SV=1	4,0E+07	1,2E+07	2,2E+08	1,1E+08	8,4E+06
D8JS93; hdn:Hden_0531	Glutamate dehydrogenase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0531 PE=3 SV=1	2,3E+07	7,4E+08	6,3E+07	4,8E+07	2,9E+07
D8JY42; hdn:Hden_3455	Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=acsA PE=3 SV=1	2,2E+07	2,6E+05	4,0E+05		
D8JT26; hdn:Hden_0691	Fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein domain protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0691 PE=1 SV=1	2,0E+07	7,0E+07	1,7E+08	3,6E+09	1,0E+10
D8JXV4; hdn:Hden_1501	Carboxyl transferase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1501 PE=4 SV=1	1,5E+07	5,8E+07	3,0E+07	9,6E+06	1,2E+09
D8JQ92; hdn:Hden_0187	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0187 PE=3 SV=1	1,2E+07	9,1E+07	5,3E+09	3,1E+08	3,1E+08
D8JZ40; hdn:Hden_1839	Glutamate--tRNA ligase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=gltx PE=3 SV=1	4,6E+06	2,7E+08	1,8E+07	4,6E+07	1,0E+08
D8JRP8; hdn:Hden_2319	Tryptophan synthase beta chain OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=trpB PE=3 SV=1	4,2E+06	7,5E+05	7,4E+07	1,1E+06	5,2E+06
D8JRC7; hdn:Hden_2315	Aldehyde Dehydrogenase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2315 PE=3 SV=1	2,6E+06	4,4E+07	1,0E+06	7,6E+05	2,9E+06
D8JWF2; hdn:Hden_1253	Dihydroxy-acid dehydratase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=ilvD PE=3 SV=1	2,6E+06	5,7E+06	3,4E+07	2,6E+07	2,7E+06
D8JSP8; hdn:Hden_2546	60 kDa chaperonin OS=Hyphomicrobium denitrificans	2,1E+06	3,8E+06	1,7E+05	7,8E+05	2,3E+06

	(strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=grl PE=3 SV=1					
D8JRW2; hdn:Hden_2383	Phosphomethylpyrimidine synthase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=thiC PE=3 SV=1	1,6E+06	3,5E+06			
D8JQ0; hdn:Hden_0794	Phosphomethylpyrimidine synthase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=thiC PE=3 SV=1	1,6E+06	3,5E+06			
D8JQD7; hdn:Hden_2092	Adenylosuccinate lyase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2092 PE=3 SV=1	1,3E+06	2,5E+07	1,5E+07	3,4E+07	1,9E+08
D8JPS4; hdn:Hden_2007	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2007 PE=4 SV=1	1,2E+06	2,9E+05	2,5E+04	1,3E+05	4,0E+08
D8JQG9; hdn:Hden_2124	Alanine--tRNA ligase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=alaS PE=3 SV=1	1,2E+06	1,2E+06	5,6E+06	6,2E+08	1,6E+08
D8JZ54; hdn:Hden_1853	Orn/DAP/Arg decarboxylase 2 OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1853 PE=3 SV=1	1,1E+06	1,4E+06		2,0E+05	
D8JXL3; hdn:Hden_3401	ATP synthase subunit alpha OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=atpA PE=3 SV=1	1,0E+06	8,2E+06	3,5E+05	9,3E+05	1,0E+06
D8JU18; hdn:Hden_2770	Acetoacetyl-CoA reductase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2770 PE=3 SV=1	9,9E+05				8,3E+06
D8JRY5; hdn:Hden_2406	Uncharacterized protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2406 PE=4 SV=1	9,5E+05		1,5E+05	1,4E+06	1,0E+08
D8JZ35; hdn:Hden_1834	Beta-ketoacyl synthase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1834 PE=3 SV=1	7,2E+05	5,6E+07		1,4E+06	5,9E+06
D8JQW3; hdn:Hden_0290	Aminotransferase class V OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0290 PE=4 SV=1	5,7E+05		2,7E+07	1,4E+06	
D8JRP7; hdn:Hden_2318	Tryptophan synthase alpha chain OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=trpA PE=3 SV=1	3,9E+05	4,0E+05	1,3E+06	9,4E+04	1,0E+08
D8JXV1; hdn:Hden_1498	ATP12 ATPase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1498 PE=3 SV=1	3,1E+05				1,0E+08
D8JU67; hdn:Hden_0840	DSBA oxidoreductase OS=Hyphomicrobium denitrificans	2,9E+05	2,9E+06	2,5E+06	5,5E+06	3,8E+08

	(strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0840 PE=4 SV=1						
D8JXP9; hdn:Hden_3439	Beta-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase III OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3439 PE=4 SV=1	2,7E+05	1,1E+07	5,4E+07	2,3E+09	2,4E+08	
D8JZA8; hdn:Hden_1909	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=lpxD PE=3 SV=1	2,6E+05	2,4E+06	2,0E+06	2,4E+07	5,3E+08	
D8JPG0; hdn:Hden_0023	Acetylornithine deacetylase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0023 PE=3 SV=1		4,9E+05				
D8JPG8; hdn:Hden_0032	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=dapD PE=3 SV=1		1,0E+05			3,3E+06	
D8JPM3; hdn:Hden_1956	Lon protease OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=lon PE=2 SV=1					1,3E+06	
D8JPM4; hdn:Hden_1957	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=clpX PE=3 SV=1		3,4E+05	4,4E+05			
D8JPX5; hdn:Hden_2058	Isocitrase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2058 PE=4 SV=1		5,7E+06				
D8JQ02; hdn:Hden_0096	Alcohol dehydrogenase GroES domain protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0096 PE=3 SV=1			3,2E+05	6,4E+05		
D8JQF1; hdn:Hden_2106	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurL OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=purL PE=3 SV=1					2,3E+06	
D8JQL3; hdn:Hden_2168	Queuine tRNA-ribosyltransferase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=tgt PE=3 SV=1			1,8E+06			
D8JQX3; hdn:Hden_0300	Phosphate-binding protein PstS OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0300 PE=3 SV=1			3,4E+05	7,3E+05	5,3E+07	
D8JQX6; hdn:Hden_0303	Peptidase M75, Imelysin OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0303 PE=4 SV=1		4,5E+05				
D8JR50; hdn:Hden_2237	Propionyl-CoA carboxylase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2237 PE=4 SV=1		9,8E+05				

D8JR73; hdn:Hden_2260	Uncharacterized protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2260 PE=4 SV=1						3,4E+06
D8JRE9; hdn:Hden_0355	Uncharacterized protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0355 PE=4 SV=1						1,8E+07
D8JS81; hdn:Hden_0519	DUF2470 domain-containing protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0519 PE=4 SV=1						1,0E+08
D8JSB8; hdn:Hden_0556	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0556 PE=4 SV=1					3,9E+05	1,7E+06
D8JSE9; hdn:Hden_2446	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2446 PE=3 SV=1						8,6E+05
D8JT29; hdn:Hden_0694	CoB--CoM heterodisulfide reductase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0694 PE=4 SV=1						1,6E+07
D8JT68; hdn:Hden_2590	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=xseA PE=3 SV=1			1,9E+07		4,5E+05	1,2E+06
D8JT81; hdn:Hden_2603	Processing peptidase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2603 PE=3 SV=1			1,4E+07	1,4E+06	8,0E+06	3,4E+07
D8JTC2; hdn:Hden_2644	Pyruvate kinase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2644 PE=3 SV=1				1,3E+06	2,5E+05	
D8JTN0; hdn:Hden_0774	FAD dependent oxidoreductase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0774 PE=4 SV=1			6,5E+05			
D8JUC1; hdn:Hden_0894	Pyruvate dehydrogenase E1 component OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0894 PE=4 SV=1			1,6E+05			3,7E+06
D8JUK4; hdn:Hden_2838	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=aspS PE=3 SV=1				1,4E+07	4,7E+06	9,8E+05
D8JUL2; hdn:Hden_2846	Uncharacterized protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_2846 PE=4 SV=1			7,7E+05			3,9E+07
D8JUX0; hdn:Hden_0972	4-aminobutyrate aminotransferase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_0972 PE=3 SV=1					8,1E+05	

D8JV05; hdn:Hden_1007	50S ribosomal protein L1 OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=rpIA PE=3 SV=1						5,4E+06
D8JV13; hdn:Hden_1015	Elongation factor Tu OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=tuf PE=3 SV=1		2,7E+05	2,7E+07	5,7E+05		1,9E+06
D8JV15; hdn:Hden_3044	Transcriptional regulator, LysR family OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3044 PE=3 SV=1						2,3E+06
D8JW46; hdn:Hden_3130	Phosphoribulokinase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3130 PE=3 SV=1						4,1E+06
D8JW69; hdn:Hden_3153	Citryl-CoA lyase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3153 PE=3 SV=1						8,0E+06
D8JW70; hdn:Hden_3154	Aminotransferase class V OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3154 PE=4 SV=1			2,5E+05			
D8JWM1; hdn:Hden_1322	Extracellular solute-binding protein family 3 OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1322 PE=4 SV=1						9,0E+07
D8JWR4; hdn:Hden_3228	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=sucD PE=3 SV=1		4,0E+05	9,5E+05	2,9E+07		1,2E+08
D8JWR5; hdn:Hden_3229	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=sucC PE=3 SV=1		1,1E+05	4,5E+06			2,9E+05
D8JWR7; hdn:Hden_3231	Malate dehydrogenase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=mdh PE=3 SV=1				2,0E+06		1,5E+07
D8JWS6; hdn:Hden_3241	Beta-methylalyl-CoA dehydratase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3241 PE=4 SV=1			8,7E+06	5,0E+06		
D8JX66; hdn:Hden_1390	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1390 PE=3 SV=1				6,7E+05		3,8E+06
D8JX87; hdn:Hden_1411	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1411 PE=4 SV=1		4,0E+05	3,0E+05	2,4E+06		2,9E+08
D8JXA1; hdn:Hden_1425	Putrescine-binding periplasmic protein OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1425 PE=3 SV=1				1,7E+06		1,3E+06

D8JXC3; hdn:Hden_1447	Parvulin-like PPlase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1447 PE=3 SV=1					
D8JXD3; hdn:Hden_3321	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=asd PE=3 SV=1		7,2E+05	4,6E+05	6,2E+06	5,5E+05
D8JXL6; hdn:Hden_3404	ATP synthase subunit beta OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=atpD PE=3 SV=1		1,9E+07		7,6E+05	2,8E+06
D8JXM5; hdn:Hden_3413	Electron transfer flavoprotein alpha/beta-subunit OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3413 PE=3 SV=1		1,6E+05	1,2E+07	5,0E+06	4,3E+06
D8JXT9; hdn:Hden_1486	Pyroloquinoline-quinone synthase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=pqqC PE=3 SV=1					1,2E+06
D8JXW7; hdn:Hden_1514	DNA topoisomerase 4 subunit A OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=parC PE=3 SV=1					1,1E+06
D8JY99; hdn:Hden_3512	Cysteine synthase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_3512 PE=4 SV=1					5,6E+06
D8JYH2; hdn:Hden_1617	PQQ-dependent dehydrogenase, methanol/ethanol family OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1617 PE=3 SV=1				7,9E+05	8,1E+05
D8JYN7; hdn:Hden_1682	Bifunctional enzyme IspD/IspF OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=ispDF PE=3 SV=1				1,6E+07	1,4E+06
D8JYR4; hdn:Hden_1709	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=Hden_1709 PE=3 SV=1		2,3E+06	7,5E+05		
D8JYW9; hdn:Hden_1768	Enolase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=eno PE=3 SV=1			2,3E+06		
D8JYY2; hdn:Hden_1781	Threonine--tRNA ligase OS=Hyphomicrobium denitrificans (strain ATCC 51888 / DSM 1869 / NCIB 11706 / TK 0415) OX=582899 GN=thrS PE=3 SV=1					1,5E+06

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bei denen bedanken, ohne deren Mitwirkung die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich mich bei PD Dr. Christiane Dahl, für die Möglichkeit an diesem spannenden und herausfordernden Thema zu arbeiten und dabei fortlaufend durch wissenschaftliche Expertise unterstützt worden zu sein, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber und Herrn Prof. Dr. Sigurd Höger für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission als fachnahes und fachfremdes Mitglied.

Herrn Dr. Ulrich Ermler sowie Kanwal Kayashta und Ulrike Demmer vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt für die Zusammenarbeit im Rahmen der Aufklärung der Struktur von HdrA und die Simulation einer Gesamtstruktur des sHdr-Komplexes.

Danke an Dr. Inês Pereira und Dr. Sofia Venceslau vom ITQB der Universidade Nova de Lisboa in Oeiras (Portugal) für die Durchführung der EPR-Analysen des Proteins sHdrA.

Herrn Dr. Marc Sylvester für die Massenspektrometrie-Messung und Herrn Dr. Toni Kühl für den Tipp mit der kolloidalen Coomassie-Färbung.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dahl für die gute Arbeitsatmosphäre über die Jahre und die herzliche Aufnahme. Danke an Julia, Sebastian, Maria, Tomohisa, Jingjing, Martina und Carolin. Aynur Mancoglu gilt mein besonderer Dank für die Erstellung und erste Messungen der sHdrH-Mutante sowie für das Korrekturlesen einzelner Abschnitte dieser Arbeit. Julia Lofi sei ebenfalls für das Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt. Danke an alle Studierenden der letzten Jahre für die witzigen Momente. Besonderer Dank gilt Alina Ballas zum einen für die Messung des Wildtyps und zum anderen mit Fabienne Göbel für die Hilfe bei der Auswertung der spezifischen Thiosulfatoxidationsrate.

Danke an Elisabeth für den Überblick im Labor bzw. Institut und die ständige Hilfe.

Danke an Marlene für die Hilfe mit den Fermentern.

Allen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts sei für die kollegiale Atmosphäre und die unkomplizierte Zusammenarbeit gedankt.

Zuletzt danke ich meiner Familie für ALLES.

Publikationsliste

Artikel

Ernst, C., Kayastha, K., Koch, T., Venceslau, S.S., Pereira, I.A.C., Demmer, U., Ermler, U. & Dahl, C. (2021) Structural and spectroscopic characterization of a HdrA-like subunit from *Hyphomicrobium denitrificans*. *The FEBS Journal* **288**: 1664-1678.

Oecal, S., Socher E., Uthoff M., **Ernst C.**, Zaucke F., Sticht H., Bauman, U., & Gebauer, J.M. (2016) The pH-dependent client release from the collagen-specific chaperone HSP47 is triggered by a tandem histidine pair. *Journal of Biological Chemistry* **291**: 12612–26.

Poster

Ernst, C., Kayastha, K., Koch, T., Venceslau, S.S., Pereira, I.A.C., Demmer, U., Ermler, U. & Dahl, C. (2019) Structural and spectroscopic characterization of a HdrA-like subunit from *Hyphomicrobium denitrificans*. EMBO Practical Course. Wageningen, Netherlands.

Koch, T., Kayastha, K., Ernst, C., Venceslau, S.S., Pereira, I.A.C., Demmer, U., Ermler, U. & Dahl, C. (2019) Structural and spectroscopic characterization of a HdrA-like subunit from *Hyphomicrobium denitrificans*. VAAM Jahrestagung 2019, Mainz.