

**Untersuchung der Liponsäureassemblierung
an LbpA in schwefeloxidierenden Bakterien:
Aufklärung der Substratspezifität der
Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Carolin Kümpel
aus Bad Honnef

Juli 2024

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

Gutachterin/Betreuerin: Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

Tag der Promotion: 23.09.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kümpel, C., Grosser, M., Tanabe, T. S., & Dahl, C. (2024). Fe/S proteins in microbial sulfur oxidation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 119732. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2024.119732>

Tanabe, T. S., Grosser, M., Hahn, L., **Kümpel, C.**, Hartenfels, H., Vtulkin, E., Flegler, W., & Dahl, C. (2023). Identification of a novel lipoic acid biosynthesis pathway reveals the complex evolution of lipoate assembly in prokaryotes. *PLoS biology*, 21(6), e3002177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002177>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Einführung in den biogeochemischen Schwefelkreislauf	1
1.2. <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> ATCC 51888 ^T als Vertreter schwefeloxidierender Bakterien	2
1.3. Das Liponsäure-bindende Protein LbpA als essentieller Bestandteil des sHdr-Systems zur dissimilatorischen Schwefeloxidation in <i>H. denitrificans</i>	3
1.4. Vorkommen von α -Liponsäure als universeller Kofaktor	6
1.5. Liponsäureassemblierung in Prokaryoten	9
1.5.1. Kanonische Liponsäureassemblierung.....	9
1.5.2. Liponsäureassemblierung an LbpA	10
1.6. CRISPR/Cas9 als Werkzeug zur Genmanipulation in Prokaryoten.....	13
1.7. Ziele dieser Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Materialien und Chemikalien	18
2.1.1. Standard-Materialien und -Chemikalien	18
2.1.2. Größenstandards.....	18
2.1.3. Software-/ Datenbanken und Internet-Tools	19
2.1.4. Verwendete Enzyme	19
2.1.5. Oligonukleotide und Plasmide	20
2.1.6. Bakterienstämme.....	30
2.2. Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.2. Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	31
2.2.3. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.2.4. Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	32
2.2.5. Kultivierung von <i>H. denitrificans</i>	32
2.2.6. Herstellung elektrokompetenter <i>H. denitrificans</i> -Zellen	33
2.2.7. Generierung von <i>H. denitrificans</i> -Mutanten	33
2.2.7.1. Konventionelle Mutagenese in <i>H. denitrificans</i>	33
2.2.7.2. CRISPR/Cas9-basierte Mutagenese in <i>H. denitrificans</i>	34
2.2.8. Wachstumsexperimente mit <i>H. denitrificans</i> -Mutanten	34
2.3. Molekularbiologische Methoden	35
2.3.1. DNA-Amplifikationen mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	35
2.3.2. Enzymatischer Restriktionsverdau	36
2.3.3. Alkalische Phosphorylierung	36
2.3.4. Ligation	36
2.3.5. Agarosegelelektrophorese	36
2.3.6. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	36

2.3.7.	Plasmidpräparation.....	37
2.3.8.	Isolation genomischer DNA aus <i>H. denitrificans</i>	37
2.3.9.	Golden Gate Assembly	37
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	38
2.4.1.	Chromatographische Methoden	38
2.4.1.1.	Strep-Tag Affinitätschromatographie	38
2.4.1.2.	His-Tag Affinitätschromatographie	38
2.4.1.3.	Anionenaustauschchromatographie	39
2.4.1.4.	Größenausschlusschromatographie.....	39
2.4.2.	Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinen	40
2.4.3.	Chemische Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern.....	41
2.4.4.	Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.4.5.	Native PAGE	42
2.4.6.	Native PAGE Mobility Gel Shift Assay	43
2.4.7.	Western Blot	44
2.4.7.1.	Western Blot aus Tricin-SDS-PAGEs	44
2.4.7.2.	Western Blot aus Native PAGEs	44
2.4.8.	Dot Blot.....	45
2.4.9.	Schwefeltransferassays	45
2.4.10.	MALDI-TOF Massenspektrometrie	45
2.5.	Spektroskopische Methoden	46
2.5.1.	Quantifizierung von DNA und Proteinen	46
2.5.2.	Quantifizierung der Thiosulfatkonzentration.....	47
2.5.3.	Quantifizierung der Sulfitkonzentration	48
2.5.4.	Quantifizierung der Eisenkonzentration	49
2.5.5.	Bestimmung der Sulfidkonzentration	50
2.5.6.	UV-Vis Spektroskopie	51
2.5.7.	UV-Vis Titration.....	51
2.5.8.	Messung der Diaphoraseaktivität von TK90LipT.....	52
2.6.	Bioinformatische Methoden.....	53
2.6.1.	Aminosäuren-Sequenzvergleich	53
2.6.2.	Vorhersage der Proteinstruktur	53
3.	Ergebnisse	54
3.1.	<i>In vitro</i> Erforschung der Liponsäureassemblierung an dem Liponsäure-bindenden Protein LbpA	54
3.1.1.	Liponsäure-bindende Proteine LbpA.....	56
3.1.2.	Lipoat:Protein-Ligasen sLpl(AB)	62
3.1.3.	Lipoat-Synthasen LipS1 und LipS2.....	79

3.1.4.	LipT.....	82
3.2.	<i>In vivo</i> Erforschung der Liponsäureassemblierung an LbpA2 in <i>H. denitrificans</i>	89
3.3.	Funktion von LbpA in der dissimilatorischen Schwefeloxidation.....	96
3.4.	Etablierung eines CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesewerkzeugs für <i>H. denitrificans</i>	98
3.4.1.	Konstruktion des Plasmids pHD_Cas9_NT als Grundlage des CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesesystems für <i>H. denitrificans</i>	98
3.4.2.	Konstruktion von pHD_Cas9-Plasmidvarianten zur gezielten Mutagenese in <i>H. denitrificans</i>	102
3.4.3.	Ablauf der gezielten Mutagenese in <i>H. denitrificans</i> mittels Elektroporation der generierten pHD_Cas9-Plasmide	103
4.	Diskussion	105
4.1.	Neue Erkenntnisse zu spezifischen Eigenschaften der beiden Liponsäure-bindenden Proteintypen GcvH und LbpA	105
4.2.	Interaktion zwischen Liponsäure-bindenden Proteinen und Lipoat:Protein-Ligasen durch die Anziehungskraft komplementärer Oberflächenladungen.....	107
4.3.	Aufstellung einer Hypothese zur differenzierten Liponsäureassemblierung von GcvH und LbpA im schwefeloxidierenden Bakterium <i>H. denitrificans</i>	110
4.4.	Anpassungen der Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 an ihr Substrat LbpA.....	113
4.5.	LipT als potentieller Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Kandidat für LbpA.....	118
4.6.	Informationen über weitere mit dem sHdr-LbpA-System assoziierte Enzyme: LipX und LipY	120
4.7.	Untersuchungen zur Funktion des Liponsäure-bindenden Proteins innerhalb des sHdr-LbpA-Systems in <i>H. denitrificans</i>	122
4.8.	Erfolgreiche Konzeption und Etablierung eines CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesesystems für <i>H. denitrificans</i>	125
5.	Zusammenfassung.....	130
	Literaturverzeichnis	132
	Anhang.....	146
	Danksagung.....	150

Abkürzungverzeichnis

[4Fe-4S]-Cluster	Eisenschwefelcluster mit 4 Eisen- und 4 Schwefelatomen
[v/v]	Volumen pro Volumen
[w/v]	Gewicht pro Volumen
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäuren
<i>A. aeolicus</i> (Aq)	<i>Aquifex aeolicus</i>
BA	Bachelorarbeit
Bp	Basenpaare von Desoxyribonukleinsäuren
Chl ^R	Chloramphenicolresistenz
DLDH	Dihydroliponamid-Dehydrogenase
DTT	Dithiothreitol
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i> (Ec)	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GcvH	Protein H des Glycin-spaltenden Systems
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FeS-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
<i>H. denitrificans</i> (Hd)	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km ^R	Kanamycinresistenz
LbpA	Liponsäure-bindendes Protein A
LipA / LipS1 / LipS2	Lipoylsynthasen
LipT	FAD-abhängige Oxidoreduktase
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
N-/C-terminal	Amino-/Carboxyterminal am Polypeptid
OD _{xx}	Optische Dichte bei angegebener Wellenlänge in nm
PA	Projektarbeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rH ₂ O	Reinstwasser
<i>R. mucosus</i> (Rm)	<i>Roseovarius mucosus</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHdr-LbpA-System	Schwefeloxidierendes Heterodisulfidreduktase ähnliches System in Assoziation mit dem Liponsäure-bindenden Protein LbpA
(s)Lpl(AB)	Lipoat:Protein-Ligasen
SOE-PCR	Splicing by Overlap Extension Polymerase-Kettenreaktion
Str ^R	Streptomycinresistenz
Tc ^R	Tetracyclinresistenz
<i>T. sp. K90mix</i> (TK90)	<i>Thioalkalivibrio sp. K90mix</i>
<i>T. sibirica</i> (Ts)	<i>Thiorhodospira sibirica</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
x g	Relative Zentrifugalkraft

1. Einleitung

1.1. Einführung in den biogeochemischen Schwefelkreislauf

Schwefel ist das zehnthäufigste Element auf der Erde (Stedel & Chivers, 2019) und wechselt innerhalb seiner großen Spannweite an Oxidationszuständen dynamisch zwischen der Geosphäre und der Biosphäre hin- und her, wobei Sulfat die höchst oxidierte Form (+VI) und Sulfid mit einer Oxidationsstufe von -II die höchst reduzierte Form darstellt (Abb. 1). Der Ozean ist hierbei das Hauptreservoir von Schwefelverbindungen (Middelburg, 2000). Schwefel weist in reduzierten, anorganischen Formen wie Schwefelwasserstoff (-II) und elementarem Schwefel (0) eine hohe Reaktivität auf, weshalb sie in anoxischen Umgebungen dominieren. Die stabilste Form von Schwefel in Gegenwart von Sauerstoff ist hingegen Sulfat (SO_4^{2-}). Schwefelverbindungen gemischter Wertigkeitszustände wie Sulfit (SO_3^{2-}), Thiosulfat ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) oder Tetrathionat ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) spielen ebenfalls eine große Rolle im Schwefelkreislauf (Christiane Dahl, 2020).

Neben der chemischen Umwandlung von Schwefel und schwefelhaltigen Verbindungen in Lithosphäre, Hydrosphäre und Erdatmosphäre nehmen Organismen auf zwei grundsätzlich verschiedene Arten am Schwefelkreislauf teil: Die Assimilation von Schwefelverbindungen dient der Biosynthese schwefelhaltiger Zellbestandteile, während bei der Dissimilation Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren oder -akzeptoren für energieerhaltende Prozesse dienen (Christiane Dahl, 2020). Schwefel als Komponente vieler Moleküle ist unabdingbar für alle Lebewesen; Als Beispiele seien hier die Aminosäuren Methionin und Cystein genannt als Bestandteil vieler Proteine und Enzyme, Enzym-Kofaktoren wie Eisen-Schwefel-Cluster oder redoxaktive Moleküle wie Glutathion (Christiane Dahl, 2020). Neben der Assimilation von Schwefel, die von vielen Prokaryoten wie auch Pilzen und Pflanzen durchgeführt werden kann, sind zum dissimilatorischen Schwefelmetabolismus fast ausschließlich Prokaryoten befähigt (Christiane Dahl, Prange & Stedel, 2005). Bereits 1996 wurde postuliert, dass einige der frühesten Mikroorganismen der Erde Energie aus dem Stoffwechsel von Schwefelverbindungen gewannen (Canfield & Raiswell, 1999; Stetter, 1996). Hierbei wird zwischen Mikroorganismen unterschieden, die eine dissimilatorische Sulfatreduktion (Sulfatatmung) durchführen mit Schwefelwasserstoff als Endprodukt, und solchen, die sich die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen zu Nutzen machen (dissimilatorische Schwefeloxidation). Sowohl die Reduktion als auch die Oxidation sowie die komplexe Disproportionierung dieser Schwefelverbindungen erfordert größtenteils einzigartige

enzymatische Aktivitäten mit Metall-Cofaktoren wie Cytochrome, Eisen-Schwefel-Cluster und Siroheme, die am Elektronentransfer beteiligt sind (Hay Mele et al., 2023).

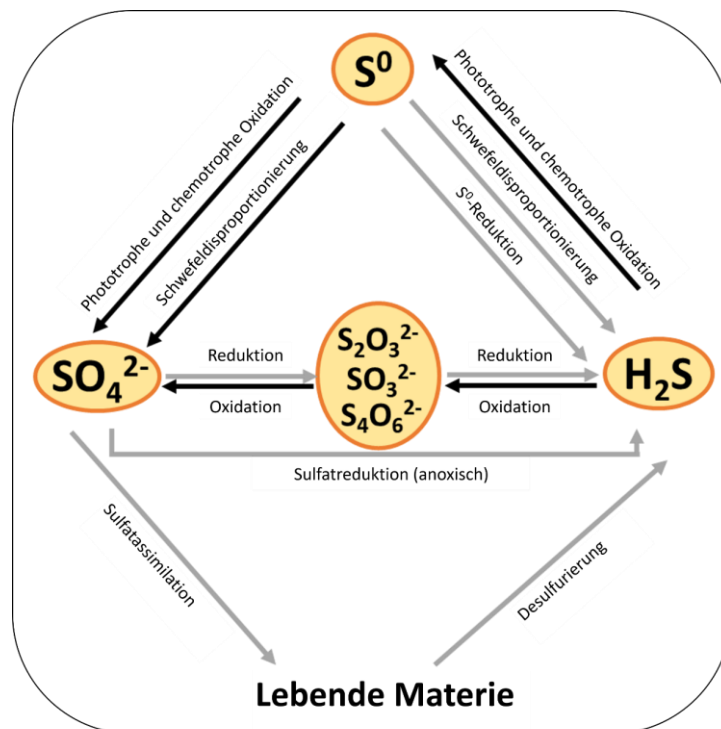


Abbildung 1: Ein schematischer Überblick über den biologischen Schwefelkreislauf. Oxidative Schritte sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Reduktive Schritte sind durch graue Pfeile gekennzeichnet. Schwefel wird als Sulfat von Prokaryoten, eukaryotischen Mikroorganismen, Pflanzen und in reduzierter Form von Tieren aufgenommen. Bei der Zersetzung von organischem Material wird der Schwefel in reduzierter Form als Sulfid freigesetzt. Sulfatreduzierende Prokaryoten nutzen Sulfat als respiratorischen Elektronenakzeptor und produzieren große Mengen an Sulfid, das wiederum von anaeroben phototrophen oder chemotrophen Schwefeloxidierern unter oxidischen oder anoxischen Bedingungen oxidiert werden kann. Spezialisiertere Gruppen können elementaren Schwefel und/oder Schwefelverbindungen mittlerer Oxidationsstufen wie Sulfit (SO_3^{2-}), Thiosulfat ($S_2O_3^{2-}$) und Tetrathionat ($S_4O_6^{2-}$) reduzieren, oxidieren oder disproportionieren. (Modifiziert nach Kümpel et al., 2024).

1.2. *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888^T als Vertreter schwefeloxidierender Bakterien

Schwefelwasserstoff dient einer Vielzahl von chemo- und photolithotrophen Bakterien und Archaeen als Elektronendonator. Das gramnegative, stäbchenförmige Alphaproteobakterium *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888^T (DSMZ 1869^T) wurde 1995 erstmals beschrieben (Urakami et al., 1995) und gehört zu den chemolithotrophen Vertretern. Die Stäbchen aus der Familie Hyphomicrobiaceae (Ordnung Hyphomicrobiales) haben einen Durchmesser von 0,3 bis 0,6 μm und werden 1 bis 3 μm lang. An den Enden der mono- oder bipolaren Hyphen bilden sich in der reproduktiven Lebensphase Knospen aus, die zur Tochterzelle auswachsen. Diese Tochterzellen sind zunächst motil, verlieren diese Fähigkeit jedoch im Laufe der Zeit und werden sessil, indem sie sich an Oberflächen oder aneinander fixieren, um sich selbst erneut

durch Knospung zu replizieren. *H. denitrificans* kommt ubiquitär in Böden, Süß- und Brackwasser vor und zählt zu den mesophilen Mikroorganismen (Temperaturoptimum 30°C), die unter neutralen pH-Bedingungen wachsen (pH 6 bis 8). Das Bakterium ist fakultativ methylotroph und nicht nur in der Lage, verschiedene C1-Quellen wie Methanol, Monomethylamin (MMA) und Formiat aerob über den Serinweg zu metabolisieren, sondern auch anaerob mittels Denitrifikation (Martineau et al., 2015; Urakami et al., 1995). Acetat, Dimethylamin (DMA) und Ethanol als C2-Verbindungen, aber auch Trimethylamin (TMA) können ebenfalls als Substrate für das Wachstum von *H. denitrificans* dienen (Christian G. Gliesche et al., 2015). Neben organischen Molekülen kann *H. denitrificans* zudem sowohl Organoschwefelverbindungen wie DMS oder DMSO als auch fakultativ anorganische Schwefelverbindungen verstoffwechseln; Durch seine Fähigkeit, parallel zu Methanol Thiosulfat als reduzierte, anorganische Elektronenquelle zu nutzen, gehört *H. denitrificans* zu den fakultativ chemolithoheterotrophen (mixotrophen) Organismen (Anandham et al., 2009), wobei sowohl Tetrathionat als auch Sulfat als Endprodukte entstehen (Koch & Dahl, 2018; J. Li, Koch et al., 2023).

1.3. Das Liponsäure-bindende Protein LbpA als essentieller Bestandteil des sHdr-Systems zur dissimilatorischen Schwefeloxidation in *H. denitrificans*

In Abbildung 2(A) wurden die Schritte der dissimilatorischen Schwefeloxidation in *H. denitrificans* schematisch dargestellt. Im Periplasma befindet sich die Thiosulfatdehydrogenase TsdA, ein c-Typ-Cytochrom, das die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat katalysiert (Brito et al., 2015; Denkmann et al., 2012; Kurth et al., 2016). *H. denitrificans* besitzt jedoch noch eine weitere Möglichkeit der Oxidation über das Schwefeloxidierende (Sox-) System (Christiane Dahl, 2020; Friedrich et al., 2001); Die oxidative Bildung einer Disulfidbindung zwischen dem Sulfanschwefel von Thiosulfat und einem persulfidierten Cystein-Rest von SoxY wird durch das c-Typ-Cytochrom SoxAX katalysiert (Grabarczyk & Berks, 2017). Anschließend katalysiert SoxB die hydrolytische Freisetzung der Sulfongruppe als Sulfat, wobei der ursprüngliche Sulfanschwefel des Thiosulfats an SoxY gebunden bleibt (Grabarczyk et al., 2015; Sauvé et al., 2009). Organismen, die das Hämomolybdo-Protein SoxCD besitzen, können den Reaktionszyklus vollständig im Periplasma ablaufen lassen, wobei SoxCD dabei die Oxidation des an SoxY gebundenen Sulfans zu Sulfon katalysiert. Die hydrolytische Freisetzung von Sulfat wird wiederum von SoxB katalysiert (Zander et al., 2011). *H. denitrificans* besitzt ein „trunkiertes“ Sox-System ohne SoxCD, sodass der Sulfanschwefel auf SoxY im Periplasma nicht weiter verstoffwechselt werden kann. Stattdessen wird er ins Zytoplasma transportiert und über ein aus Rhodanese-,

Einleitung

DsrE- und TusA-ähnlichen Schwefeltransferasen zusammengesetztes Persulfid-Transport-System (Schwefel-bindende Proteine, SBP) an das zytoplasmatische, schwefeloxidierende Heterodisulfidreduktase-ähnliche (sHdr-) System herangetragen (Christiane Dahl, 2015; Liu et al., 2014; Tanabe et al., 2019; Venceslau et al., 2014). An diesem Multienzymkomplex, an dem Polypeptide beteiligt sind, die den HdrA-, HdrB- und HdrC-Untereinheiten der Heterodisulfidreduktase (Hdr) aus methanogenen Archaeen ähneln, findet die Oxidation zu Sulfit statt (Berben et al., 2019; Cao et al., 2018; Koch & Dahl, 2018). Neben dem sHdr-System gibt es in anderen Organismen ein alternatives, zytoplasmatisches Persulfid-Oxidationssystem, namentlich das revers agierende dissimilatorische Sulfitreduktase (rDsr)-System (Christiane Dahl, Engels et al., 2005; Löffler, Feldhues et al., 2020; Löffler, Wallerang et al., 2020; Pott & Dahl, 1998). Eine ausgedehnte phylogenetische Analyse des rDsr- und sHdr-Systems innerhalb schwefeloxidierender Bakterien und Archaeen brachte die Erkenntnis, dass letzteres wesentlich verbreiteter ist und zudem in zwei Subtypen unterteilt werden kann (Kümpel et al., 2024; Tanabe et al., 2023). Die Gemeinsamkeiten der beiden Systeme bestehen darin, dass die *shdr*-Gene typischerweise mit Genen assoziiert sind, die für Schwefel-Transportproteine kodieren, sowie ein bis drei Gene für Liponsäure-bindende Proteine (LbpA) und Gene für Enzyme, die an der Liponsäureassemblierung beteiligt sind. Beide Systeme teilen zentrale Proteine des sHdr-Multienzymkomplexes, nämlich sHdrA, sHdrB1 und sHdrC1. Zusätzlich zu den zentralen Proteinen kodiert das *shdr*-Gencluster vom Typ I zusätzlich die Polypeptide HdrC2 und sHdrB2. Das Gencluster Typ II ersetzt die Gene für sHdrC2 und sHdrB2 durch ein einzelnes Gen, *shdrB3*. Dieses Gen kodiert für eine Fusion aus sHdrC2 und einem sHdrB2-ähnlichen Polypeptid. Das sHdr-System von *H. denitrificans* kann hierbei Typ I zugeordnet werden (Kümpel et al., 2024). Die genaue Funktion eines Liponsäure-bindenden Proteins (LbpA) innerhalb des katalytischen Zyklus der sHdr-LbpA-basierten Schwefeloxidation ist derzeit unklar. Es ist bekannt, dass LbpA für die dissimilatorische Schwefeloxidation von *H. denitrificans* essentiell ist (Cao et al., 2018). Ernst et al. Postulierten in dem Zusammenhang, dass LbpA als Redox-System fungieren könnte, indem die im Rahmen der Persulfid-Oxidation freigesetzten Elektronen vom sHdr-Multienzymkomplex auf die Liponsäure übertragen werden (Ernst et al., 2021). Bewiesenermaßen ist LbpA ohne seinen Kofaktor katalytisch inaktiv (Tanabe et al., 2023). Die Reoxidation des Dihydroliponamids wäre mittels einer Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) möglich, wobei NADH als Reduktionsäquivalent gewonnen werden könnte (Argyrou & Blanchard, 2004). Die für den Organismus toxische Schwefelverbindung Sulfit wird höchstwahrscheinlich durch einen TauE-ähnlichen Sulfit-

Exporter über die Zytoplasmamembran transportiert (J. Li, Koch et al., 2023), wo die vollständige Oxidation zu Sulfat in bisher ungeklärter Weise stattfindet.

H. denitrificans zeigt wie die Mehrheit aller Organismen, die das sHdr-System besitzen, dass die *shdr*-Gene mit Genen für Schwefeltransferasen wie *rhd* (Rhodanese-Gen), *dsrE3C* und *tusA* assoziiert sind sowie ein Gen für ein Liponsäure-bindendes Protein (*lbpA*) und Genen für Enzyme, die an der Liponsäureassemblierung an LbpA beteiligt sind. Dazu zählen vor Allem eine Lipotat:Protein-Ligase sLpl(AB) sowie zwei Lipoatsynthasen, LipS1 und LipS2 (Abb. 2(B)). Die Funktion von LbpA innerhalb des sHdr-Systems sowie die charakteristischen Eigenschaften dieses Proteins mit seinem besonderen Cofaktor Liponsäure sowie dessen Assemblierung ist bisher unbekannt.

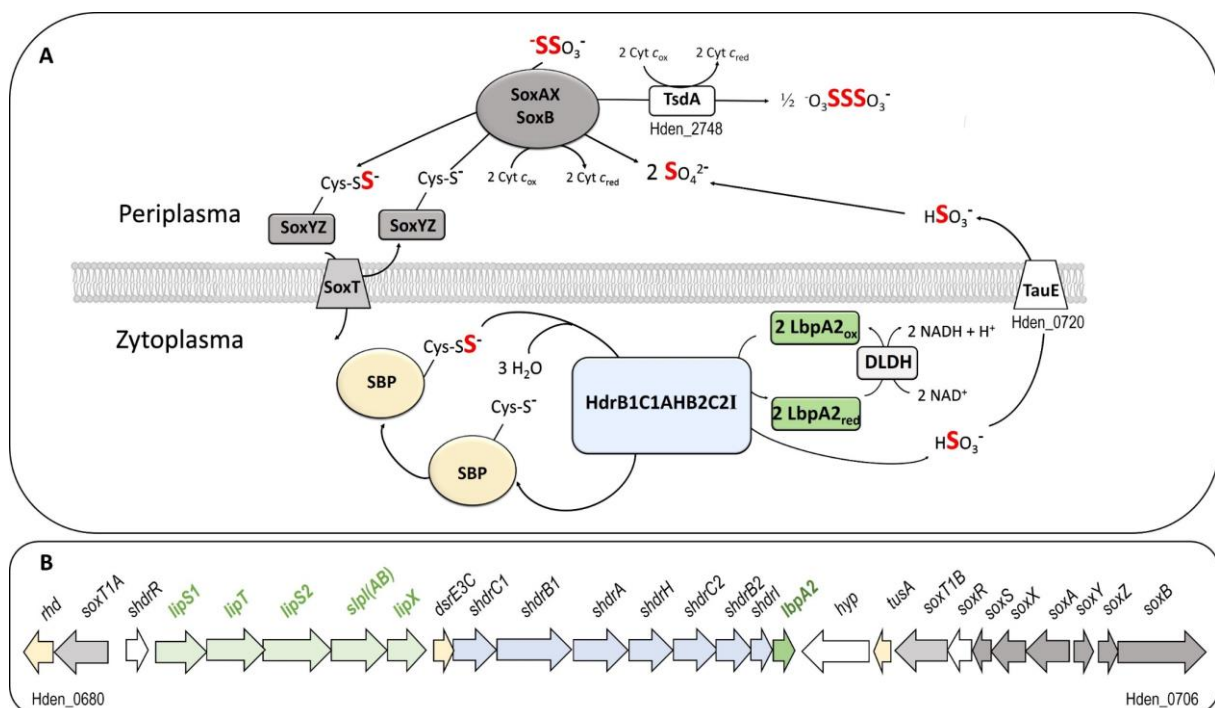


Abbildung 2: (A) Schematisches Modell der dissimilatorischen Thiosulfat-Oxidation in *H. denitrificans*. Die Dihäm-Cytochrom-c-Thiosulfatdehydrogenase TsdA im Periplasma katalysiert die oxidative Kondensation von zwei Thiosulfatmolekülen zu Tetrathionat. Eine zusätzliche Möglichkeit der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat beginnt ebenfalls im Periplasma, wo die Enzyme SoxXA (1-Cystein-S-Thiosulfotransferase) und SoxB (S-Sulfosulfanyl-l-Cystein-Sulfohydrolase) bei der oxidativen Bindung von Thiosulfat an das Schwefelträgerprotein SoxYZ und der anschließenden hydrolytischen Freisetzung von Sulfat aus dem Thiosulfonat-Addukt zusammenwirken. Der aus dem Thiosulfat stammende Sulfanschwefel wird ins Zytoplasma transloziert, dort über Rhodanese-, DsrE3C- und TusA-ähnliche Schwefeltransferasen (Schwefel-bindende Proteine, SBP) an den sHdr-Multienzymkomplex herangetragen, wo er in Verbindung mit dem Liponsäure-bindenden Protein LbpA weiter oxidiert wird. Die Reoxidation des an LbpA gebundenen Lipoylrests kann von einer Dihydroliponamid-Dehydrogenase (DLDH) katalysiert werden. Das resultierende Sulfat wird zurück ins Periplasma transportiert und wird auf bisher ungeklärte Weise zu Sulfat oxidiert. Für die Proteine, die von keinem der in (B) gezeigten Gene kodiert werden, sind Locus-Tags angegeben. Für DLDH gibt vier verschiedene Gene, die für dieses Enzym kodieren (Hden_0791, Hden_0896, Hden_1300, Hden_3225). **(B) Das *shdr*-Gencluster aus *H. denitrificans* und seine Umgebung.** Angegeben sind die kodierten Proteine oder Funktionen sowie die Locus-Tags. Die Farbkodierung der Gene entspricht den in (A) dargestellten Proteinen. Die Gene, die mit der Liponsäureassemblierung an LbpA assoziiert sind, sind in Hellgrün dargestellt. (Modifiziert nach J. Li, Koch et al., 2023).

1.4. Vorkommen von α -Liponsäure als universeller Kofaktor

α -Liponsäure, auch Thioctsäure genannt, ist ein acht Kohlenstoffatome umfassendes, gesättigtes Fettsäuremolekül, an dessen Acylkette zwei Schwefelatome an den Kohlenstoffatomen C₆ und C₈ gebunden sind. Als Kofaktor kovalent an katalytisch aktive Enzyme gebunden, stellt sie ein biochemisches Redoxsystem dar; Im oxidierten Zustand bildet die Liponsäure eine intramolekulare Disulfidbrücke aus, das reduzierte Molekül Dihydroliponsäure besitzt hingegen zwei Mercaptogruppen, die nicht miteinander verbunden sind (Abb. 3).

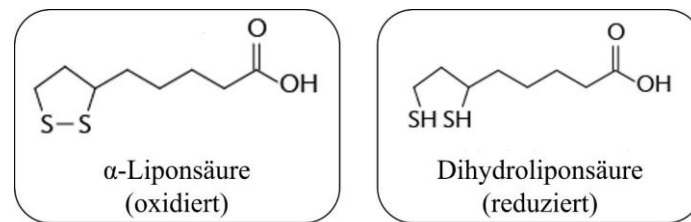


Abbildung 3: Strukturformeln von α -Liponsäure und seiner reduzierten Form Dihydroliponsäure.

Frei vorliegende, nicht kovalent an ein Protein gebundene α -Liponsäure bzw. Dihydroliponsäure besitzt ein hohes Maß an antioxidativem Potenzial, sodass reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies wie Hydroxylradikale, Peroxylradikale, Superoxid und hypochlorige Säure abgefangen werden können. Darüber hinaus kann Liponsäure mit anderen Antioxidantien wie Glutathion oder Vitamin C in der Zelle interagieren (Packer et al., 1995). Zudem ist bekannt, dass sowohl α -Liponsäure als auch Dihydroliponsäure redoxaktive Metalle *in vitro* und *in vivo* chelatieren können (Ou et al., 1995; Suh et al., 2004). Mit diesen genannten Eigenschaften spielt Liponsäure ebenso eine Rolle in der zellulären Signaltransduktion, indem es die Aktivität verschiedener Zellsignalmoleküle und Transkriptionsfaktoren modulieren kann.

Natürlicherweise kommt α -Liponsäure jedoch nicht ungebunden vor, sondern ist ein universeller Kofaktor weniger, aber essentieller Enzyme, die im Metabolismus von Bakterien und Archaeen, aber auch in Eukaryoten unabdingbar sind. Neben dem bereits zuvor beschrieben Liponsäure-bindenden Protein LbpA, das als essentielle Komponente des sHdr-Systems in vielen bakteriellen und archaealen dissimilatorischen Schwefeloxidierern vorkommt (Cao et al., 2018; Tanabe et al., 2023), katalysieren diese Enzyme vor Allem Reaktionen des zentralen Stoffwechsels (Abb. 4). Dazu gehören drei α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexe, namentlich der Pyruvatdehydrogenase-, der α -Ketoglutaratdehydrogenase- und der verzweigtkettige α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex, sowie der Acetoindehydrogenase-

Komplex, deren E2-Untereinheiten Lipoylreste binden (Cronan, 2016; Perham, 2000; Spalding & Prigge, 2010). Der Kofaktor ist in Form eines Säureamids durch die kovalente Bindung der Carboxygruppe an die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysinrestes an die E2-Untereinheiten gebunden (Cronan, 2016). Bei der Untereinheit E1 handelt es sich immer um eine Substratdehydrogenase (namentlich identisch mit dem entsprechenden Enzymkomplex). Die E2-Untereinheit stellt eine Transferase dar, mit Liponsäure als elementarer, essentieller Komponente, die mit Hilfe der E3-Untereinheit, der Dihydroliponamid-Dehydrogenase, wieder reoxidiert wird (Perham, 2000).

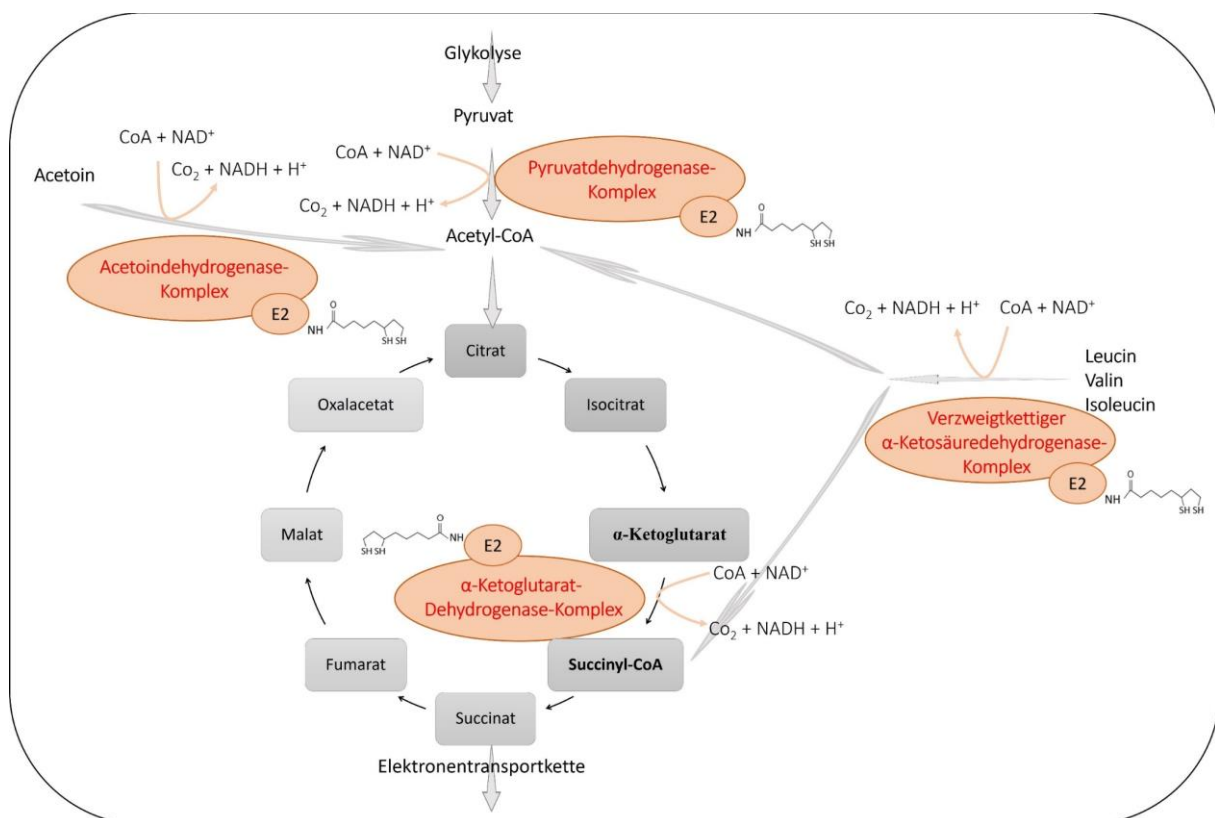


Abbildung 4: Einordnung der essentiellen Multienzymkomplexe des zentralen Stoffwechsels, die nur mit dem universellen Kofaktor α -Liponsäure aktiv sind. Die Lipoylgruppe der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexe (Pyruvatdehydrogenase-Komplex, α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplex und verzweigtkettiger α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex) sowie der Acetoin Dehydrogenase ist dabei jeweils kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysinrestes der E2-Untereinheit gebunden. Dies ist eine vereinfachte Darstellung des zentralen Stoffwechsels zur Veranschaulichung der Einordnung Liponsäure-abhängiger Enzymkomplexe und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. CoA, Coenzym A.

Im Glycin-spaltenden System (Gcv) ist eine Lipoylgruppe an Protein H ebendieses Komplexes (GcvH) gebunden (Abb. 5). Das System wurde 1961 erstmals beschrieben (Sagers & Gunsalus, 1961) und katalysiert die Decarboxylierung und Deaminierung von Glycin, wobei CO_2 , NH_3 und 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat freigesetzt werden und das Reduktionsäquivalent NADH gebildet wird (G. Kikuchi, 1973). Lipoyl-GcvH agiert als zentrales Bindeglied zwischen der

Pyridoxalphosphat-abhängigen Glycin-Dehydrogenase GcvP, der Amino-methyltransferase GcvT und dem NAD⁺-abhängigen Flavoprotein Dihydroliponamid-Dehydrogenase GcvL (Motokawa & Kikuchi, 1969, 1974a, 1974b). Glycin bindet an GcvP und wird dort decarboxyliert. Die Bindung der Aminomethylgruppe an GcvH ist durch die reduktive Spaltung des Disulfids an eines der Mercaptogruppen der Dihydroliponsäure möglich. Die Schwefelatome des Dithiolans sind hochreaktiv und fungieren hierbei als nukleophile Zentren. GcvH präsentiert im folgenden Schritt GcvT die Aminomethylgruppe, die durch die katalytische Aktivität dieses Enzyms in Anwesenheit von Tetrahydrofolat (THF) zu 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat umgesetzt wird. Das zusätzlich entstehende Ammonium wird freigesetzt. GcvL reoxidiert die Dihydroliponsäure an GcvH, indem Elektronen und Protonen von den Thiolgruppen auf FAD und anschließend auf NAD⁺ übertragen werden, und gewährleistet somit die Möglichkeit eines erneuten Reaktionszyklus (Goro Kikuchi et al., 2008).

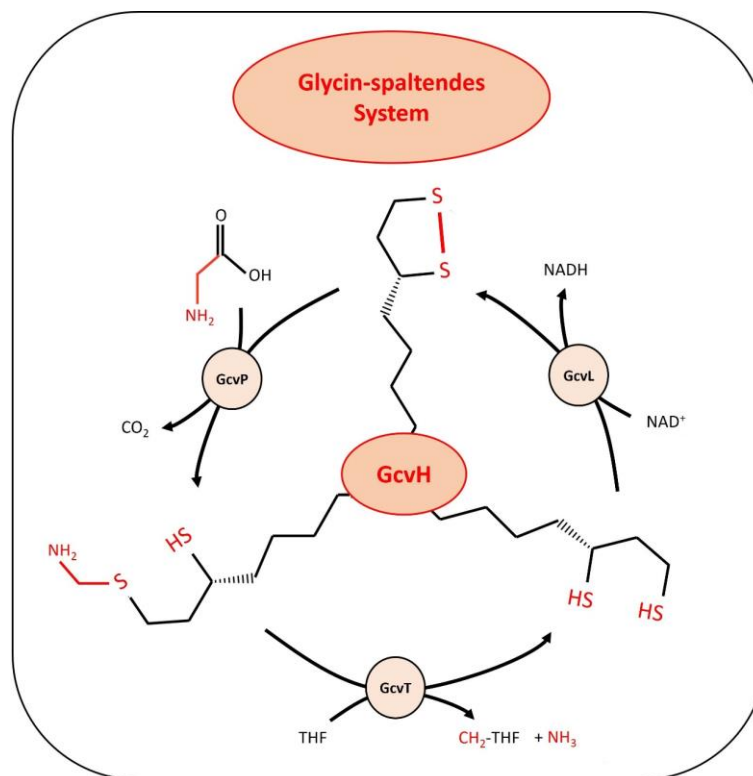


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus des Glycin-spaltenden Systems mit dem Liponsäure-bindenden Protein H (GcvH) als Bindeglied zwischen den Proteinkomponenten GcvP, GcvT und GcvL. An GcvP findet die oxidative Decarboxylierung von Glycin statt in Kombination mit der Reduktion der Liponsäure an GcvH und der simultanen Bindung der Aminomethylgruppe an eine Thiolgruppe. Die Methylengruppe wird durch die katalytische Aktivität von GcvT auf Tetrahydrofolat (THF) übertragen, wobei Ammonium freigesetzt wird. Die Reoxidation von Lipoyl-GcvH katalysiert die Dihydroliponamid-Dehydrogenase GcvL, wobei die Elektronen über FAD auf NAD⁺ übertragen werden. Zur Verdeutlichung der Rolle der Liponsäure in dem Reaktionszyklus sind die Schwefelatome und die zu übertragende Aminomethylgruppe rot dargestellt.

Dabei wird deutlich, dass α -Liponsäure durch seine Eigenschaft als Elektrophil nicht nur als redoxaktives Molekül an elektronenübertragenden Reaktionen beteiligt ist, sondern dass sie zudem an die Thiolgruppe gebundene Substrate zwischen den aktiven Zentrum der Proteinkomponenten innerhalb der oben genannten Multienzymkomplexe und des Glycinspaltenden Systems transferieren kann. Aufgrund dessen wird dieser Kofaktor auch als „schwingender Arm“ bezeichnet (Perham, 2000). Dabei ist allen Enzymkomplexen die oxidative Decarboxylierung mit simultaner Bildung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH gemein.

1.5. Liponsäureassemblierung in Prokaryoten

In den folgenden Abschnitten wird detailliert auf die Besonderheiten von LbpA und seiner Assemblierungsmaschinerie im Vergleich zu den an der kanonischen Liponsäureassemblierung beteiligten Proteinen und Enzymen eingegangen.

1.5.1. Kanonische Liponsäureassemblierung

Die kanonische Liponsäureassemblierung wird hier am Beispiel des GcvH von *Escherichia coli* beschrieben vertretend für alle Lipoyldomänen der E2-Untereinheiten der oben genannten Multienzymkomplexe und ist in Abbildung 6(A) schematisch dargestellt.

Frei zugängliche Liponsäure aus der Umwelt kann mit Hilfe einer Lipoat:Protein-Ligase (Lpl(AB)), die in vielen Bakterien, einschließlich *E. coli*, aus zwei fusionierten Domänen, der katalytischen Domäne LplA und der Hilfsdomäne LplB besteht, an das Akzeptorprotein GcvH ligiert werden (Cao & Cronan, 2015; Green et al., 1995). Ausgehend von der strukturellen Aufklärung der Lipoat:Protein-Ligase aus *E. coli* (Fujiwara et al., 2005) sowie der bioinformatischen Bestätigung, dass dieses Enzym aus den beiden fusionierten Untereinheiten LplA und LplB besteht (Tanabe et al., 2023), wurde die ursprünglich als LplA bezeichnete Ligase in Lpl(AB) umbenannt. Im Reaktionsverlauf wird der Oktanoylrest zunächst unter ATP-Verbrauch zu Oktanoyl-AMP aktiviert, woraufhin durch eine Konformationsänderung der Lipoat:Protein-Ligase das Aktive Zentrum für das Akzeptorprotein zugänglich wird. Der Oktanoylrest wird unter AMP-Abspaltung in Form einer kovalenten Amidbindung an die ϵ -Aminogruppe eines konservierten Lysinrestes an das Akzeptorprotein übertragen (Cronan, 2016; Fujiwara et al., 2010; Fujiwara et al., 2005).

Steht Liponsäure für die Aufnahme und den Einbau nicht zur Verfügung, muss sie ausgehend von ihrem Vorläufer, der Oktansäure, synthetisiert werden. Die Assemblierung des Liponamids beginnt hierbei entweder aus freier Oktansäure, die mit Hilfe der oben genannten Lipoat:Protein-Ligase Lpl(AB) energieabhängig an GcvH gebunden wird, oder unter Verwendung von Oktanoylresten aus der endogenen Fettsäurebiosynthese, die an Acyl-Carrier-Proteine (ACP) gebunden sind (Cronan, 2016; S. W. Jordan & Cronan, 1997; Morris et al., 1994). Die Oktanoyltransferase LipB katalysiert dabei die Oktanoyl-Übertragung von ACP auf GcvH und stellt somit eine Verbindung zwischen der Fettsäurebiosynthese und der Liponsäureassemblierung her (S. W. Jordan & Cronan, 1997).

Zur zweifachen Schwefelanlagerung an Oktanoyl-GcvH ist die Katalyse einer Lipoylsynthese LipA erforderlich, die der radikalen S-Adenosylmethionin (SAM) Superfamilie (RS-Superfamilie) zugeordnet ist (Frey & Booker, 2001; Lanz & Booker, 2015). Die schrittweise Anlagerung zunächst an das Kohlenstoffatom C₆ und anschließend an C₈ findet dabei in einer einzigen Reaktion statt (Douglas et al., 2006; Lanz et al., 2014). Alle Mitglieder der RS-Superfamilie besitzen zwei Eisen-Schwefel (FeS)-Cluster, ein [4Fe-4S]_{RS}-Cluster, das durch drei konservierte Cysteinreste koordiniert wird (C_{X3}C_{X2}C-Motiv) (Holliday et al., 2018b) und einem auxiliären [4Fe-4S]_{AUX}-Cluster. Der Reaktionsmechanismus läuft wie folgt ab (Booker & Lloyd, 2022): SAM bindet sowohl über seine Amino- und als auch über seine Carboxylgruppe an das freie Eisenion des [4Fe-4S]_{RS}-Cluster. Die Elektronenübertragung an das FeS-Cluster führt zur Fragmentierung von SAM, was die Bildung eines 5'-Desoxyadenosyl-Radikals (5'dA·) und Methionin mit sich bringt (Booker & Lloyd, 2022). Ersteres bewirkt die Abspaltung eines Wasserstoffatoms an entsprechendem Kohlenstoffatom (C₆ bzw. C₈), sodass anschließend schrittweise je ein Schwefelatom des [4Fe-4S]_{AUX}-Cluster an diese Stellen gebunden werden kann. Das auxiliäre Cluster zerfällt dabei. Dieser Opferungsprozess führt dazu, dass die Lipoylsynthesen nur einen einzigen vollständigen katalytischen Zyklus durchlaufen können, bevor ihr FeS-Cluster energieaufwendig erneuert werden muss (McCarthy & Booker, 2017, 2018; McCarthy et al., 2019).

1.5.2. Liponsäureassemblierung an LbpA

Die ersten Hinweise auf einen alternativen Weg für die Liponsäureassemblierung in Prokaryoten (Abb. 6(B)) ergaben sich, als gezeigt wurde, dass die GcvH-ähnlichen LbpA-Proteine, die in die dissimilatorische Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen durch das

sHdr-System involviert sind, nicht durch die kanonischen Assemblierungsmaschinerien von *E. coli* und *Bacillus subtilis* modifiziert werden konnten (Cao et al., 2018). Stattdessen sind z.B. in *H. denitrificans*, wie bereits beschrieben, in dem *shdr-lbpA*-Gencluster Gene assoziiert, die für spezifische Reifungsenzyme kodieren (Abb. 2(B)). Interessanterweise sind diese Enzyme, die mit der Liponsäureassemblierung an LbpA assoziiert sind, jedoch nicht nur auf Schwefeloxidierer beschränkt (Tanabe et al., 2023). In diesem Zusammenhang wurde auch herausgestellt, dass dieser neuartige Liponsäureassemblierungsweg nicht redundant ist, sondern stattdessen spezifisch für LbpA. Die Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB) katalysiert die ATP-abhängige Ligation von freier Oktan- oder Liponsäure an LbpA. Exemplarisch wurde bereits an LbpA-Akzeptorproteinen aus den Organismen *H. denitrificans*, dem obligat chemolithoautotrophen, alkaliphilen Schwefeloxidierer *Thioalkalivibrio* sp. K90mix und dem Purpurschwefelbakterium *Thiorhodospira sibirica*, das zu den Gammaproteobakterien gehört, beschrieben, dass sLpl(AB) aus Schwefeloxidierern nicht nur LbpA-Akzeptorproteine desselben Organismus lipoylieren, sondern auch *in vitro* Spezies-übergreifend Aktivität zeigen, während sie Lipoyl-Domänen von Akzeptorproteinen aus Organismen, die keine Komponenten eines sHdr-LbpA-Schwefeloxidationssystems besitzen, nicht erkennen. Gleichermäßen gab es *in vitro* keine Substraterkennung der kanonischen Lipoat:Protein-Ligase Lpl(AB) aus *Streptomyces coelicolor* hinsichtlich der untersuchten LbpA-Akzeptorproteine. Auch *in vivo* konnte sLpl(AB) die kanonische Ligase Lpl(AB) in *E. coli* nicht komplementieren (Cao et al., 2018).

Ob die Oktanoyltransferase LipB aus Schwefeloxidierern mit sHdr-System LbpA als Akzeptorprotein eines Oktanoylrestes von Oktanoyl-ACP erkennt, ist derzeit unklar. Es ist jedoch bekannt, dass sLpl(AB) keine Oktanoyltransferase-Aktivität *in vitro* aufweist (Cao et al., 2018). Die Schwefelinsertionen an das oktanoylierte LbpA katalysieren – anders als im kanonischen Liponsäureassemblierungsweg – zwei Vertreter der RS-Superfamilie, namentlich LipS1 und LipS2 (ursprünglich RadSAM1 und RadSAM2). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass homologe Enzyme aus dem thermophilen Archaeon *Thermocoocus kodakarensis* eine LipA-ähnliche Lipoylsynthase-Funktion für chemisch synthetisierte Peptidsubstrate *in vitro* aufweisen. Dabei stellte sich heraus, dass die Reihenfolge der Schwefelinsertionen sich zu der des kanonischen Liponsäureassemblierungswegs unterscheidet; LipS2 katalysiert zunächst die Insertion an Kohlenstoffatom C₈, anschließend ligiert LipS1 ein Schwefelatom an C₆ (Neti et al., 2022).

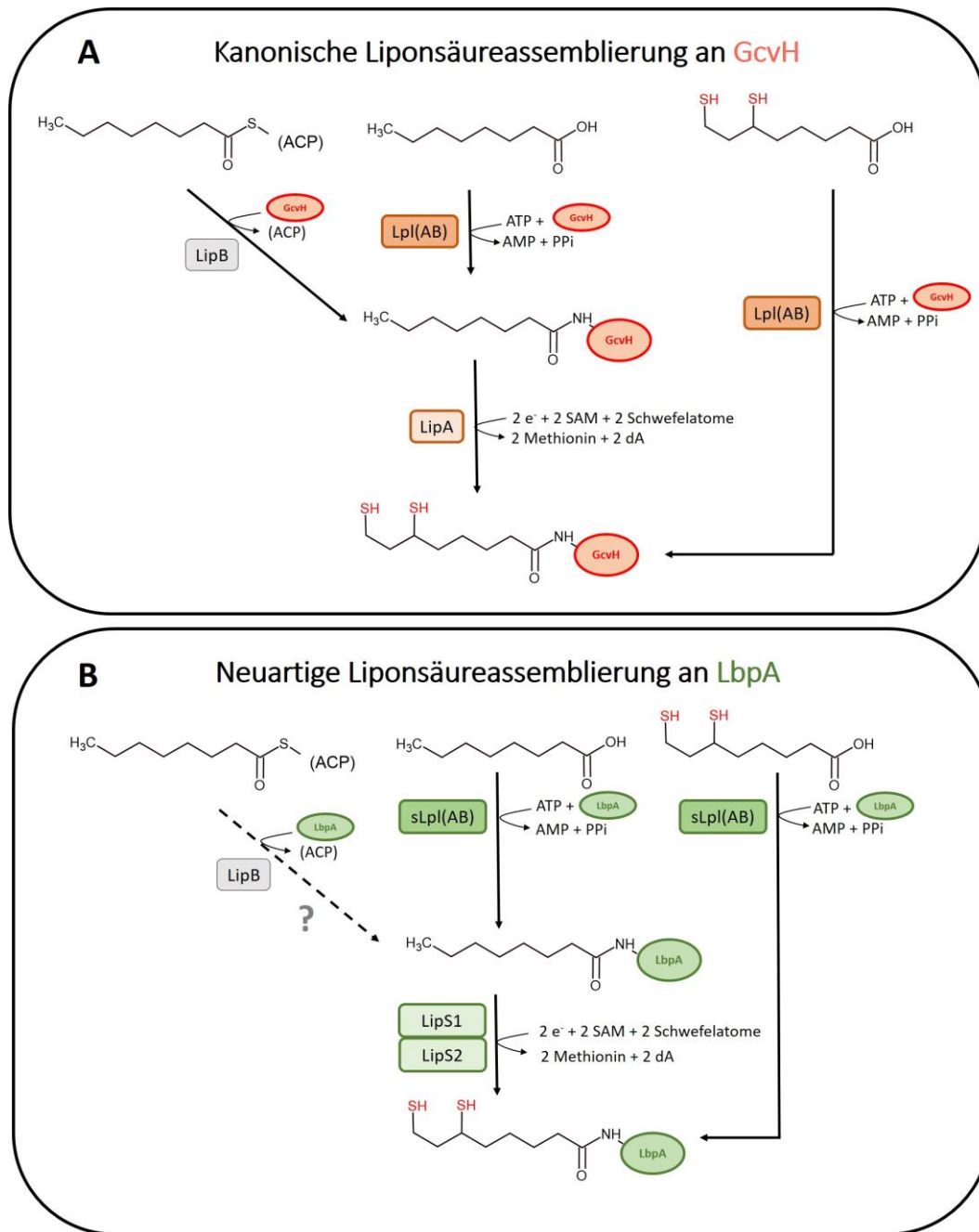


Abbildung 6: (A) Schematischer Reaktionsablauf der kanonischen Liponsäureassemblierung exemplarisch an GcvH in *E. coli*. Freie Oktansäure oder Liponsäure wird ATP-abhängig mit Hilfe einer Lipoyltransferase (Lpl(AB)) an GcvH gebunden. Alternativ transferiert die Oktanoyltransferase LipB einen an ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebundenen Oktanoylrest aus der Fettsäurebiosynthese auf GcvH. Die Schwefelinsertionen zunächst an C₆ und anschließend an C₈ des Oktanoyl-GcvH katalysiert die Lipoylsynthase LipA schrittweise in einer einzigen Reaktion. Das auxiliäre [4Fe-4S]_{aux}-Clusters dient bei der Reaktion als Schwefeldonor. **(B) Schematischer Reaktionsablauf der Liponsäureassemblierung exemplarisch an LbpA in *H. denitrificans*.** Freie Oktansäure oder Liponsäure wird ATP-abhängig mit Hilfe einer Lipoyltransferase (sLpl(AB)) an LbpA gebunden. Ob die Oktanoyltransferase LipB einen an ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebundenen Oktanoylrest aus der Fettsäurebiosynthese auf LbpA transferieren kann, ist bislang unklar. Die Schwefelinsertion zunächst an C₈ des Oktanoyl-GcvH katalysiert die Lipoylsynthase LipS2 und anschließend an C₆ die Lipoylsynthase LipS1. Inwiefern das auxiliäre FeS-Cluster bei der Reaktion als Schwefeldonor dient, ist derzeit unklar. dA, Desoxyadenosyl; GcvH, Glycyl-spaltendes System Protein H; LbpA, Liponsäure-bindendes Protein; SAM, S-Adenosylmethionin.

Bislang ist nichts über die entscheidenden Elemente bekannt, die für die Differenzierung der verschiedenen Liponsäure-bindenden Akzeptorproteine LbpA und GcvH in die entsprechenden Liponsäureassemblierungswege verantwortlich sind. Aufgründessen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit das Hauptaugenmerk auf die Substratspezifität des Enzyms gelegt, das die erste Reaktion innerhalb der Liponsäureassemblierung katalysiert, namentlich die Lipoat:Protein-Ligase. Die Charakterisierung der Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 sowie der FAD-abhängigen Oxidoreduktase LipT und des als Glutamin-Amidotransferase-ähnliches Protein annotierten LipX stand ebenfalls im Fokus der Untersuchungen.

1.6. CRISPR/Cas9 als Werkzeug zur Genmanipulation in Prokaryoten

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Sequenzen sind kurze, palindromische, sich wiederholende DNA-Sequenzen, die in Prokaryoten als Teil des adaptiven Immunsystems der Abwehr von Viren dienen, indem sie CRISPR-RNAs und CRISPR-assoziierte Endonukleasen (Cas) zum Eliminieren eingedrungener Nukleinsäuren einsetzen (Barrangou et al., 2007). Die CRISPR-Sequenzen werden durch kurze Sequenzen, sogenannte „Spacer“, getrennt, die Bakteriophagen- oder Plasmidsequenzen entsprechen (Bolotin et al., 2005). Diese Sequenzen wurden erstmals 1987 in *E. coli* entdeckt (Ishino et al., 1987; Nakata et al., 1989) und wenige Jahre später auch in anderen Bakterien und Archaeen wie *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* sp. PCC 7120 und *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993; Hoe et al., 1999; Masepohl et al., 1996; Mojica et al., 1995). Erst im Jahre 2000 wurde diesen Sequenzen der Name CRISPR verliehen (Jansen et al., 2002). Upstream dieser Sequenzen befinden sich die CRISPR-assoziierten (*cas*) Gene, die für eine vielfältige Proteinfamilie kodieren, die Nuklease-, Helikase- und Polymerase-Domänen umfasst (Marraffini & Sontheimer, 2010). CRISPR-Sequenzen konnten in etwa 87 % der Archaeen und 45 % der Bakterien nachgewiesen werden (Barrangou & Marraffini, 2014).

Je nach Struktur und Funktion des Cas-Proteins können CRISPR/Cas-Systeme in zwei Klassen (Klasse I, Klasse II) und diese wiederum in sechs Typen (Typ I-VI) eingeteilt werden (Makarova et al., 2015). Zur Klasse I gehören die Typen I, III und IV, zur Klasse II die Typen II, V und VI (Mohanraju et al., 2016).

Die Nutzung des CRISPR/Cas9-Systems, eines RNA-gesteuerten DNA-Endonuklease-Systems des Typs II, wurde erstmals 2012 als genetisches Werkzeug in Prokaryoten in Betracht

gezogen (Jinek et al., 2012) und hat seitdem in zahlreichen Forschungsbereichen Anwendung gefunden. Es eröffnete seitdem weitreichende Möglichkeiten für die gezielte Genomeditierung und die Untersuchung genetischer Funktionen in diversen Organismen. 2013 konnte das CRISPR/Cas9-System erstmals für *Streptococcus pneumoniae* und *E. coli* etabliert werden (W. Jiang et al., 2013). Das CRISPR/Cas9-System von *Streptococcus pyogenes* hat sich in den letzten Jahren z.B. als leistungsfähiges Werkzeug zur Genombearbeitung sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten erwiesen (Doudna & Charpentier, 2014). 2017 wurde das CRISPR/Cas9-System erstmals auch für ein Archaeon, *Methanosarcina acetivorans*, zugänglich, obwohl Archaeen bekanntlich extreme Bedingungen für ihr Wachstum benötigen (hohe Temperaturen, hohe Salzkonzentrationen), und mesophile Proteine wie die Cas9-Varianten unter diesen Bedingungen zunächst als nicht aktiv oder zumindest nicht als effizient galten (Gophna et al., 2017; Nayak & Metcalf, 2017).

In Abbildung 7 ist der Reaktionsmechanismus des CRISPR/Cas9-Systems schematisch dargestellt. Der CRISPR/Cas9-Komplex setzt sich aus dem Cas9-Protein sowie einer „single guide“ RNA (sgRNA) zusammen. Letztere besteht aus einem „transverse acting CRISPR“ RNA-Strang (tracrRNA oder gRNA-Scaffold), der das Cas9-Protein rekrutiert, und einem der Ziel-DNA komplementären, 20 Nukleotide umfassenden CRISPR-RNA-Strang (crRNA, Targeting-Sequenz). Diese Targeting-Sequenz (Zielsequenz) kann an beliebige Genomabschnitte angepasst werden, wodurch gezielte Genomeditierungen möglich werden (Jinek et al., 2012). Der Komplex interagiert mit der DNA des Zielorganismus, um nach "protospacer adjacent motifs" (PAMs) zu suchen. Dabei handelt es sich um kurze spezifische Sequenzen (5'-NGG-3'), die eine weitere Bindung des Cas9-Systems an die DNA ermöglichen. Die entsprechende interagierende Domäne des Enzyms wird als PI (PAM interacting)-Domäne bezeichnet (W. Chen et al., 2017). Wenn keine PAM-Stelle gefunden wird, löst sich Cas9 schnell wieder von der DNA. In Gegenwart einer PAM-Stelle hingegen übernimmt die Helikase-Domäne des Cas9-Proteins die Auftrennung der ersten 10 bis 12 Nukleotide stromaufwärts der PAM-Sequenz, was die Bildung eines DNA-RNA-Hybrids ermöglicht. Im Falle einer komplementären DNA-Bindung an die ersten 8 bis 12 Nukleotide der sgRNA, die als "Seed-Region" bezeichnet wird, ermöglicht dies der HNH-Nuklease-Domäne von Cas9, den primären DNA-Strang zu spalten, während die RuvC-Domäne den sekundären DNA-Strang spaltet (Esvelt et al., 2013; F. Jiang & Doudna, 2017; Sternberg et al., 2014; Szczelkun et al., 2014). Ein Überleben des Organismus ist nur möglich, wenn der entstandene Doppelstrangbruch repariert wird. Dies kann durch zufällige, nicht-homologe Endverknüpfung

(„non-homologous end joining“, NHEJ) geschehen, was oft zu ungezielten Insertionen und Deletionen führt, oder aber gezielt durch homologe Rekombination mit Donor-DNA, die dem Organismus zur Verfügung gestellt wird (Cai et al., 2019; W. Chen et al., 2017).

H. denitrificans ist, wie bereits beschrieben, ein metabolisch vielseitiges Bakterium, das als Modellorganismus zur Untersuchung der dissimilatorischen Schwefeloxidation dient. Die phänotypische Charakterisierung von Mutanten mit Gendeletionen und -insertionen ist entscheidend für das Verständnis dieses Stoffwechselwegs. Die derzeitigen Techniken zur gezielten Genomedition dieses Bakteriums sind besonders zeitaufwändig und arbeitsintensiv, was die *in vivo*-Untersuchungen stark einschränkt. Daher wurde in dieser Dissertation das Ziel verfolgt, ein CRISPR/Cas9-System für *H. denitrificans* zu etablieren.

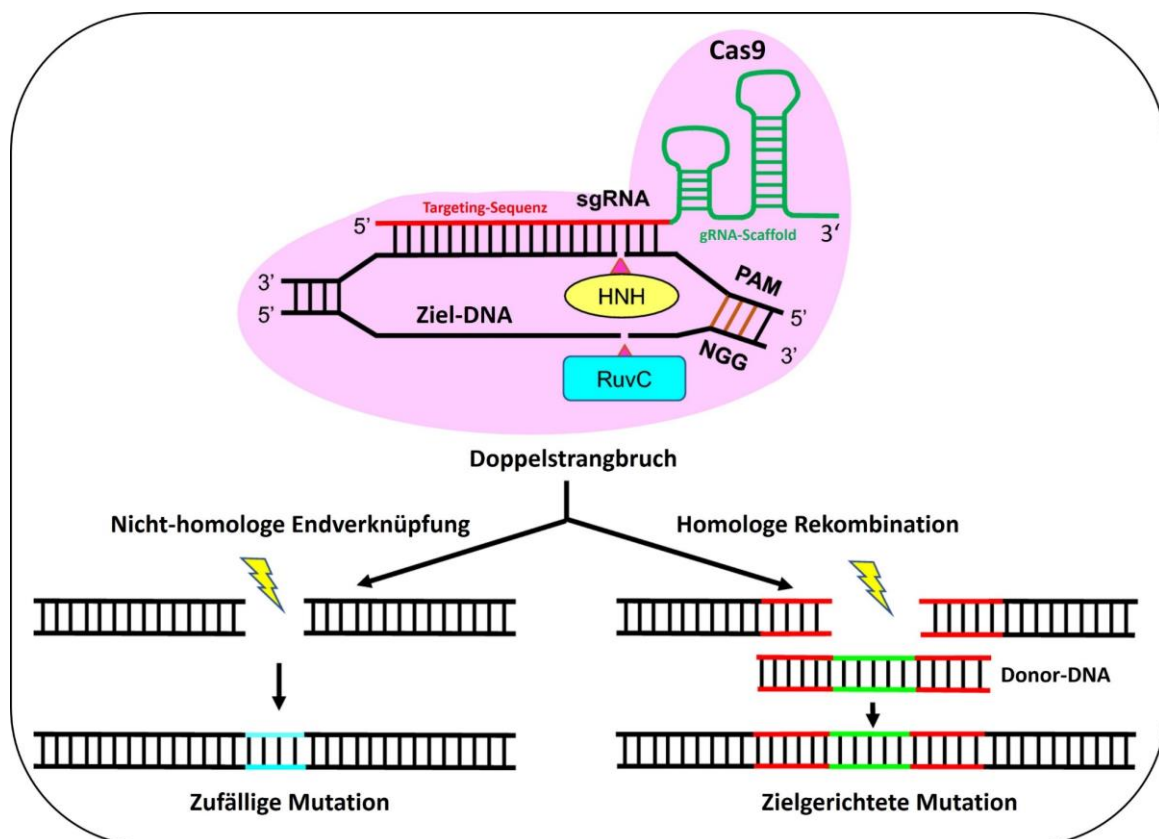


Abbildung 7: Überblick über das CRISPR/Cas9-vermittelte Genomeditionssystem. Cas9 und sgRNA bilden *in vivo* einen Komplex und binden dann an die Ziel-DNA-Sequenz stromaufwärts der PAM-Sequenz. Die Cas9-Nuklease-Domäne HNH schneidet daraufhin die Ziel-DNA-Sequenz, die komplementär zur 20 Nukleotide umfassenden Targeting-Sequenz ist, während die RuvC-Domäne den anderen DNA-Strang schneidet. Dadurch entsteht ein Doppelstrangbruch, der entweder durch nicht-homologe Endverknüpfung oder durch die homologe Rekombination mit einer zur Verfügung gestellten Donor-DNA repariert werden muss, um den Zelltod zu verhindern. (Modifiziert nach Cai et al., 2019).

1.7. Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die charakteristischen Eigenschaften und Mechanismen der Enzyme zu untersuchen, die an der Assemblierung von Liponsäure an dem Liponsäure-bindenden Protein LbpA beteiligt sind und die spezifischen Merkmale dieses neuartigen Assemblierungswegs im Vergleich zu der kanonischen Assemblierungsmaschinerie hervorzuheben. Dazu zählen die Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB), die Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2, die FAD-abhängige Oxidoreduktase LipT sowie das als Glutamin-Amido-transferase-ähnliches Protein annotierte LipX.

Exemplarisch für die kanonische Maschinerie wurde die Lipoylierung des Protein H aus dem Glycin-spaltenden System (GcvH) untersucht. Ein zentrales Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, die Substratspezifität des Enzyms zu analysieren, das die initiale Reaktion der Liponsäureassemblierung katalysiert, namentlich die Lipoat:Protein-Ligase. Diese Untersuchungen waren besonders wichtig, weil bisher nichts über die spezifischen Eigenschaften und Mechanismen der beteiligten Enzyme bekannt war. Bislang mangelte es an Erkenntnissen, wie diese Enzyme, sLpl(AB) und Lpl(AB), die verschiedenen Liponsäure-bindenden Akzeptorproteine LbpA und GcvH in den jeweiligen Liponsäureassemblierungswegen als Substrate erkennen und differenzieren können.

Innerhalb des Forschungsvorhabens sollten zudem einführende Versuche zur Untersuchung der Funktion von LbpA im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel durchgeführt werden, da das Verständnis der biochemischen Prozesse innerhalb dieses Stoffwechselwegs von großem Interesse ist.

Ein weiteres bedeutendes Ziel dieser Doktorarbeit war die Konzeption und Etablierung eines CRISPR/Cas9-basierten Systems zur gezielten Mutagenese des Modellorganismus *H. denitrificans*. Dieses System ist von großer Bedeutung, da es nicht nur gegenwärtige, sondern auch zukünftige Forschungsprojekte erheblich voranbringen kann. Das CRISPR/Cas9-System ermöglicht eine effiziente und präzise Genomeditierung, was zur Erforschung von Stoffwechselforgängen in *H. denitrificans* beitragen und somit tiefere Einblicke unter anderem in die Assemblierung und Funktion von LbpA erlauben soll.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Dissertation einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Liponsäureassemblierung und ihrer Mechanismen leistet. Sie beleuchtet die einzigartigen Eigenschaften der Liponsäureassemblierung an LbpA im Vergleich zur kanonischen Assemblierungsmaschinerie und präsentiert eine innovative Methode zur genetischen Manipulation von *H. denitrificans*. Dies eröffnet neue Perspektiven unter anderem für die Erforschung des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Chemikalien

2.1.1. Standard-Materialien und -Chemikalien

Alle Standard-Verbrauchsmaterialien wie Glas- und Plastikgefäße, Pipettenspitzen oder Einmalspatel sowie standardmäßig im Labor vorrätige Chemikalien wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Schott (Mainz, Deutschland) Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen, wenn nicht anders in der jeweiligen Versuchsdurchführung beschrieben.

2.1.2. Größenstandards

Der 1 kb DNA Ladder (NEB) wurde im Rahmen der Agarosegelelektrophorese als Größenstandard für DNA-Fragmente eingesetzt (Abb. 8(A)). Zur Größeneinordnung von Proteinen in Polyacrylamidgelen hingegen wurde der Color Prestained Protein Standard Broad Range (NEB) verwendet (Abb. 8(B)).

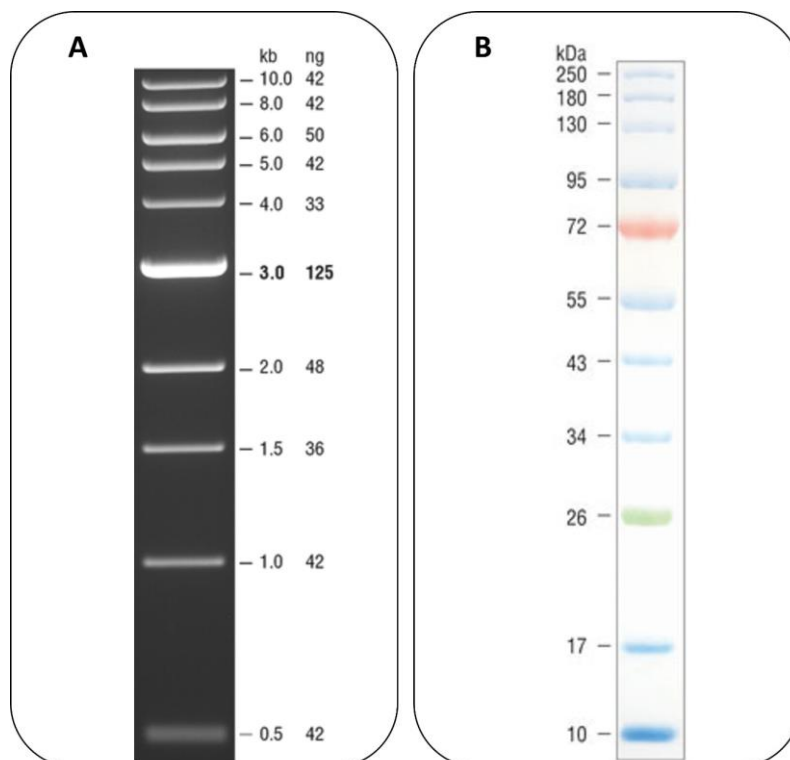


Abbildung 8: (A) 1 kb DNA Ladder (NEB, Ipswich, USA). (B) Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (NEB, Ipswich, USA).

2.1.3. Software-/ Datenbanken und Internet-Tools

Tabelle 1: Verwendete Software, Datenbanken und Onlineanwendungen.

Software/Onlineanwendung	Hersteller/Internetadresse
AlphaFill	https://alphafill.eu/
AlphaFold	https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb
AlphaFold Database	https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q5JIK4
ARNold finding terminators	http://rssf.i2bc.paris-saclay.fr/toolbox/arnold/
ChemStationSystem	Agilent Technologies
ChopChop	https://chopchop.cbu.uib.no/
Citavi 6	Swiss Academic Software
Clone Manger 9	Sci-Ed Software
ClustalΩ	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
ExpASy	https://www.expasy.org/
i-Tasser	https://zhanggroup.org/I-TASSER/
IMG JGI Gene Search	https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi?section=GeneSearch&page=searchForm
KEGG Genome	http://www.genome.jp/kegg/genome.html
MEGA X	https://www.megasoftware.net
mMass	http://www.mmass.org
MOTIF Search	http://www.genome.jp/tools/motif/
NCBI Genome	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome
NCBI Protein BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins
NEBaseChanger	https://nebasechanger.neb.com/
Office	Microsoft
Pfam-Datenbank	https://pfam.xfam.org/
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
ProtParam - ExpASy	http://web.expasy.org/protparam/
TrotParam - Translate	https://web.expasy.org/translate/
UCSF ChimeraX	RBVI
Unicorn 5.0	GE Healthcare
UniProt	http://www.uniprot.org/
WebLogo 3	https://weblogo.threepiusone.com/create.cgi

2.1.4. Verwendete Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Enzyme.

Enzym	Restriktionsschnittstelle	Hersteller
Alkalische Phosphatase	-	NEB (Ipswich, USA)
BsaI-HFv2	5'... GGTCTC (N) ₁ ▼... 3' 3'... CCAGAG (N) ₂ ▲... 5'	NEB (Ipswich, USA)
DNase I, RNase-free	-	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DpnI	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ 5' \dots \text{G} \downarrow \text{A} \text{T} \text{C} \dots 3' \\ 3' \dots \text{C} \text{T} \uparrow \text{A} \text{G} \dots 5' \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	NEB (Ipswich, USA)
Hind III-HF	5'... A▼AGCTT... 3' 3'... TTCGAA▲... 5'	NEB (Ipswich, USA)
Lysozym	-	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NcoI-HF	5'... C▼CATGG... 3' 3'... GGTAC▲C... 5'	NEB (Ipswich, USA)
NdeI	5'... C▼ATATG... 3' 3'... GTA▲TAC... 5'	NEB (Ipswich, USA)
NotI-HF	5'... GC▼GGCCGC... 3' 3'... CGCCGG▲CG... 5'	NEB (Ipswich, USA)
OneTaq DNA Polymerase	-	NEB (Ipswich, USA)
Q5 HiFi DNA Polymerase	-	NEB (Ipswich, USA)
Ribonuklease A	-	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
rSAP	-	NEB (Ipswich, USA)
T4 DNA Ligase	-	NEB (Ipswich, USA)
T4 Polynukleotidkinase	-	NEB (Ipswich, USA)
XbaI	5'... T▼CTAGA... 3' 3'... AGATC▲... 5'	NEB (Ipswich, USA)

2.1.5. Oligonukleotide und Plasmide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen (Tab. 4). Die im Rahmen der Klonierungsarbeiten entstandenen Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind fett geschrieben. Besonderheiten sind grau eingefärbt und fett sowie in Klammern beschrieben.

Oligonukleotid	Sequenz	Quelle/Referenz
dHden0683up_fw	TATTCTAGAGTGC GGGAAAACGCTCGAATTA G (XbaI)	Diese Arbeit
dHden0683up_rev	ATTTTCCTTCTTTGCC TCA CGCGCCGCCCGT CAC (integriertes Stop-Codon, für trunkiertes Gen)	Diese Arbeit
dHden0683down_fw	GTGACGGGCGGCGCG TGA GGCAAAGAAGG AAAAT (integriertes Stop-Codon, für trunkiertes Gen)	Diese Arbeit
dHden0683down_rev	ATATCTAGAGCCGGCTTCCGATGCGAT (XbaI)	Diese Arbeit
dHden0685up_fw	TATTCTAGAGCGATAAGTTTGC GCTGAAC (XbaI)	Diese Arbeit
dHden0685up_rev	GAAGCGCATATGCTC TCA CCCGCATCCGTG CAT (integriertes Stop-Codon, für trunkiertes Gen)	Diese Arbeit
dHden0685down_fw	ATGCACGGATGCGGG TGA GAGCATATGCGC TTC (integriertes Stop-Codon, für trunkiertes Gen)	Diese Arbeit
dHden0685down_rev	ATATCTAGAGCGGCAGTAGTCGAGC (XbaI)	Diese Arbeit
dHden0687up_fw	TATTCTAGACTCTCAAGCATCTTATGGGCGG TG	Diese Arbeit
dHden0687up_rev	TGATCGGCGAAG TCA GTGCTT CAT GGCCTC (für in-frame Deletion)	Diese Arbeit
dHden0687down_fw	GAGGCC ATG AAGCAC TGA CTTCGCCGAT CA (für in-frame Deletion)	Diese Arbeit
dHden0687down_rev	ATATCTAGATCCGACGATTCCCGCGCATT (XbaI)	Diese Arbeit
GGA_Hden0683_fw	TAAGTGTTCAAGTCCTACAACAGCGG	Diese Arbeit
GGA_Hden0683_rev	TAAACCGCTGTTGTAGGACTTGAACA	Diese Arbeit
GGA_Hden0684_fw	TAAGTACGTTTCGTGGAAGACGAGGGG	Diese Arbeit
GGA_Hden0684_rev	TAAACCCCTCGTCTTCCACGAACGTA	Diese Arbeit
GGA_Hden0685_fw	TAAGTTGAGTACGTTCAAATGTTCGAG	Diese Arbeit
GGA_Hden0685_rev	TAAACTCGACATTTGAACGTACTCAA	Diese Arbeit
GGA_Hden0686_fw	TAAG(T)ATTACGAAGCTATTCTGCG(G) (Nukleotide fehlen, um eine höhere Effizienz erzielen zu können)	Schilling, 2024
GGA_Hden0686_rev	TAAA(C)CGCAGAATAGCTTCGTGAAT(A) (Nukleotide fehlen, um eine höhere Effizienz erzielen zu können)	Schilling, 2024
GGA_Hden0687_fw	TAAG(T)GATGATGGAAGATCTCGTCA(G) (Nukleotide fehlen, um eine höhere Effizienz erzielen zu können)	Schilling, 2024
GGA_Hden0687_rev	TAAA(C)TGACGAGATCTTCCATCATC(A) (Nukleotide fehlen, um eine höhere Effizienz erzielen zu können)	Schilling, 2024
Hden0684_N-strep_fw	TATCATATG TGGAGCCACCCG CAGTTCGA AAAA AGCGCTACTGCTGGCGACACCGGA (NdeI , Strep-Tag)	Diese Arbeit

Oligonukleotid	Sequenz	Quelle/Referenz
Hden0684_NdeI_fw	TATCATATGACTGCTGGCGACACCG (NdeI)	Diese Arbeit
Hden0684_C-tag_rev	ATAAAGCTTCGATCTCCAATAGGCGTC (HindIII)	Diese Arbeit
Hden0684_C-his_fw	TATCCATGGGTACTGCTGGCGACAC (NcoI)	Diese Arbeit
Hden0684_N-tag_rev	ATAAAGCTTTCTTCCCGACCGATCTCACG (HindIII)	Diese Arbeit
Hden_0686_fw-up	ATATTCTAGAATCTGCTGCTGACATATCCT (XbaI)	Tanabe et al., 2023
Hden_0686_rev-up	AAAGCCGCGTGAACCACGGTTGCGCGCCGC	Tanabe et al., 2023
Hden_0686_fw-down	GTGAGTATAGGGCGGCGCGCAACCGTGGTT	Tanabe et al., 2023
Hden_0686_rev-down	ATATTCTAGACGCGGCTGCATGCGTTCTGC (XbaI)	Tanabe et al., 2023
Hden0687_NcoI_fw	TATCCATGG GT AAGCACGTCTCGGTCATTC A (NcoI , zusätzliche Nukleotide zur Einhaltung des Leserasters)	Diese Arbeit
Hden0687_HindIII_rev	ATAAAGCTTTGTTCATCCAGCCCGTGTAAC (HindIII)	Diese Arbeit
Hden1299_NdeI_fw	TATCATATGCCCTCCAGCTTATCTGACGAGA (NdeI)	Diese Arbeit
Hden1299_HindIII_rev	ATAAAGCTTCCTGGCTTTTGCGCCGAG (HindIII)	Diese Arbeit
Hden2793_NdeI_fw	TATCATATGCTGAAATATACCGAAGAGCATG (NdeI)	Diese Arbeit
Hden2793_NotI_rev	ATAGCGGCCCGCAGCAATGAGGTTTGCGTAG (NotI)	Diese Arbeit
HdLbpA2_C7A_fw	CGTGAAGGGA GC CAATCTACCCG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
HdLbpA2_C7A_rev_ pET22b	ACTGGCATATGTATATCTC	Diese Arbeit
HdLbpA2_C7A_rev	ACTGGCATAGTTCACTCC (für pK18mobsacB_ <i>lbpA</i> -His)	Diese Arbeit
HdLbpA2_C145A_fw_ pET22b	TTTCGCAGGT GC CGGCTGGAAGCTTGC (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
HdLbpA2_C145A_fw	TTTCGCAGGT GC CGGCGGCGGCGGCGG (ortsspezifische Mutagenese, für pK18mobsacB_ <i>lbpA</i> -His)	Diese Arbeit
HdLbpA2_C145A_rev	CCTTCAGACGCCATCTTGCTTCGTATTTG	Diese Arbeit
HdLbpA2_K71A_fw	CGAAAGCGGA GC ATGGGTTGGACC (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
HdLbpA2_K71A_rev	ACCGTCGCGCAGCTTTTA	Diese Arbeit
JW2872_NdeI_fw	TATCATATGAGCAACGTACCAGCAGAACT (NdeI)	Diese Arbeit
JW2872_HindIII_rev	ATAAAGCTTCTCGTCTTCTAACAATGCTTCGT (HindIII)	Diese Arbeit
JW4349_NcoI_fw	TATCCATGG GT TCCACATTACGCCTGCTCA TCT (NcoI , für EcLpl(AB)_C-His)	Diese Arbeit
JW4349_HindIII_rev	ATAAAGCTTCCTTACAGCCCCCGCC (HindIII , für EcLpl(AB)_C-His)	Diese Arbeit
JW4349_NdeI_fw	TATCATATGTCCACATTACGCCTGCTCATCT (NdeI , für EcLpl(AB)_N-His)	Diese Arbeit
JW4349_stopHindIII_rev	ATAAAGCTT CTA CCTTACAGCCCCCGC (HindIII , Stop-Codon, für EcLpl(AB)_N-His)	Diese Arbeit
LbpA-His_fw	GCGGCCAAATACGAAGCCA (für Kontroll-PCR)	Diese Arbeit
LbpA-His_rev	TGAAAATGTCGATCATGCGCC (für Kontroll- PCR)	Diese Arbeit

Material und Methoden

Oligonukleotid	Sequenz	Quelle/Referenz
mRNA_Beta_fw	ATCTGCGTTACCGAATGGAT (für Kontroll-PCR)	Diese Arbeit
mRNA_Beta_rev	CCCATGTTTTATCCAGGGCG (für Kontroll-PCR)	Diese Arbeit
mRNA_Cas9_fw	GCCCGTTCTCGAGTTTCG (für Kontroll-PCR)	Diese Arbeit
mRNA_Cas9_rev	GAATCGATCCTCCCAAGAG (für Kontroll-PCR)	Diese Arbeit
mRNA_Gam_fw	CATTGCTCACCACCAGGTTG (für Kontroll-PCR)	Diese Arbeit
mRNA_Gam_rev	GCTGAACTCCTGAAATAGCTGT (für Kontroll-PCR)	Diese Arbeit
pHD_TargetSeq_rev	TCCATCACCGGGCTTTACGAAA (für Sequenzierung der Target-Sequenz)	Diese Arbeit
RmLbpA2_TPKR51-54DLPE_fw	CTTTGCTGTC GATCTGCCGGAA GTGGGGCG CCTGTTC (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
RmLbpA2_TPKR51-54DLPE_rev	ATCTGGCGGGATGCCAGTGC	Diese Arbeit
RmLbpA2_R63A_fw	AGGCAGGA GCG TCGGCGGCAACGATAG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
RmLbpA2_R63A_rev	CGAACAGGCGCCCCAC	Diese Arbeit
RmLbpA2_P76D_fw	ATGGGTGGGA GAT ATGAGGCTTGCTTTTCG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
RmLbpA2_P76D_rev	TTGCTACTTTCTATCGTTGCCGCC	Diese Arbeit
RmLbpA2_V21E_fw	TGGTAATCAT GAA TGGTATCTGCCGATG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
RmLbpA2_V21E_rev	ACATCATAATGGCGATCGGTCCG	Diese Arbeit
RmLbpA2_R45D_fw	ACTGGCTAGT GAT CAGATTTTGCAGTTACC CCG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
RmLbpA2_R45D_rev	GCCACGGCCACCTGGGTCAG	Diese Arbeit
RmLbpA2_C7A_fw	CGTTAAAGGC GCG GAATTTCCGACCGATCG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
RmLbpA2_C7A_rev	CTCACCATGGTATATCTCCTTCT	Diese Arbeit
RmLbpA2_C145A_fw	TTTTCCGGGT GCG CAGAACTGGCCGCCG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
RmLbpA2_C145A_rev	TCATTGGCATCCATCCATGCA	Diese Arbeit
rosmuc01223_NdeI_fw	TATCATATGGTTTCTGTCAAGGGCTGCG (NdeI)	Diese Arbeit
rosmuc01223_HindIII_rev	ATAAAGCTTCTGACAGCCCCGAAAATCAT (HindIII)	Diese Arbeit
rosmuc01225_NcoI_fw	TATCCATGG GT ACACCCTTTCGCCTGATAG (NcoI , zusätzliche Nukleotide zur Einhaltung des Leserasters)	Diese Arbeit
rosmuc01225_NotI_rev	ATAGCGGCCGCTGATCTGGCATCCTCAGAA A (NotI)	Diese Arbeit
rosmuc03122_NdeI_fw	TATCATATGAAATTCACCGAAGAACATGAAT GG (NdeI)	Diese Arbeit
rosmuc03122_HindIII_rev	ATAAAGCTTGGCGATATGGGCCTGATA (HindIII)	Diese Arbeit
sgRNA_seq_fw	CTATAGGGCGAATTGGAGCT (für Sequenzierung des Reparaturfragments)	Diese Arbeit
TK90_0630_NcoI_fw	TATCCATGG GT TACGGATTCTCGGAGATC AC (NcoI , zusätzliche Nukleotide zur Einhaltung des Leserasters)	Diese Arbeit
TK90_0630_HindIII_rev	ATAAAGCTTATCCGGGGTGACGACCGATT (HindIII)	Diese Arbeit
TK90_0639_NdeI_fw	TATCATATGGCTGAACTGGGCAACGATTA (NdeI)	Diese Arbeit
TK90_0639_HindIII_rev	ATAAAGCTTTTAAAACGTTATCGTTTTATCG CT (HindIII)	Diese Arbeit

Oligonukleotid	Sequenz	Quelle/Referenz
TK90_0640_C7A_fw	AGTACGGGGTG CG GATATTCCGGAAGATCT G (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
TK90_0640_C7A_rev	GCGCCCATATGTATATCTCCTT	Diese Arbeit
TK90_0640_C40A_fw	CTCCTACGCG GCG TCGCTGGCCGGCACC (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
TK90_0640_C40A_rev	GTCAGGCCACGGTCGCGGT	Diese Arbeit
TK90_0640_C64A_fw	GGACAAGTCC GCG ACCACCGTCGAATCC (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
TK90_0640_C64A_rev	TTCTTGACGGTCTTGCCGACT	Diese Arbeit
TK90_0640_C145A_fw	TTTCGGCGGC GCG AAGCTTGCGGCCGCG (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
TK90_0640_C145A_rev	CCGTCCGCTTCCATCTTGGC	Diese Arbeit
TK90_0640_K71A_fw	CGAATCCGGC GCG TGGGTGGGTC (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
TK90_0640_K71A_rev	ACGGTGGTGCAGGACTTGTC	Diese Arbeit
TK90_0641_fw	TATCATAT G ACGACCTGGAACGAGGTGAT (NdeI)	Diese Arbeit
TK90_0641_rev	ATAA AGCTT GACATGGCAGCCGCCTC (HindIII)	Diese Arbeit
TK90_0642_fw	TATCATAT G TCTGAACGCGATCAGAAGACG (NdeI)	Diese Arbeit
TK90_0642_rev	ATAA AGCTT TCCCGCTGATTCCTCGGT (HindIII)	Diese Arbeit
TK90_0643_fw	TATCCAT GGG TATGCTCCCCGAGAAGGT (NcoI)	Diese Arbeit
TK90_0643_rev	ATAA AGCTT CGCGGCCTGGTCACCATC (HindIII)	Diese Arbeit
TK90_0644_fw	TATCATAT G AGTGCAAGTGCAGAGGAGAT (NdeI)	Diese Arbeit
TK90_0644_rev	ATAA AGCTT TGCGGACTTCTCGTCCTC (HindIII)	Diese Arbeit
TKLipS2_H224S_fw	GTTCGGTGCC AG CCTGATCTGCGGCAT (ortsspezifische Mutagenese)	Diese Arbeit
TKLipS2_H224S_rev	TTCTCCGGGCCAAATATTTTCGGCGG	Diese Arbeit
TK90_0648_NdeI_fw	TATCATAT G TTGGTCGCATCCACGGTCACC (NdeI)	Diese Arbeit
TK90_0648_HindIII_rev	ATAA AGCTT TCA GGCGCGGCGATC (HindIII , Stop-Codon)	Diese Arbeit
TK90_0648_HindIII_rev_ohneStop	ATAA AGCTT GGCGGCGGCGATCC (HindIII)	Diese Arbeit
TK90_1719_NdeI_fw	TATCATAT G AGCGAAGCACCGAAGGATCT (NdeI)	Diese Arbeit
TK90_1719_HindIII_rev	ATAA AGCTT GGACTCGGCCTCGACGT (HindIII)	Diese Arbeit
TK90_1746_NdeI_fw	TATCATAT G AGCCATACCGAATACAACGGCT (NdeI)	Diese Arbeit
TK90_1746_HindIII_rev	ATAA AGCTT GTTCGGCACAGCGCATG (HindIII)	Diese Arbeit
ThisiDRAFT1200_NdeI_fw	TATCATAT G AGCGATTTCTGCTGAATTAC GC (NdeI)	Diese Arbeit
ThisiDRAFT1200_HindIII_rev	ATAA AGCTT GCTATCATCGGCGTCAAGGC (HindIII)	Diese Arbeit
ThisiDRAFT1283_NdeI_fw	TATCATAT G ATGGAGACCACCGAGGTC (NdeI)	Diese Arbeit
ThisiDRAFT1283_HindIII_rev	ATAA AGCTT TGCACCCACCCAGTGTG (HindIII)	Diese Arbeit

Oligonukleotid	Sequenz	Quelle/Referenz
ThisiDRAFT2298_NcoI_Fw	TATCCATGG GT ACCCGACATTCCCAAACGC T (NcoI , zusätzliche Nukleotide zur Einhaltung des Leserasters)	Diese Arbeit
ThisiDRAFT2298_HindIII_rev	ATAAAGCTTAGATGATGCCGCCACTTCTG (HindIII)	Diese Arbeit

Tabelle 5: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle/Referenz
pHP45Ω-Tc	Amp ^R , Tc ^R	Fellay et al., 1987
pK18mobsacB	Km ^R , <i>sacB</i>	Schäfer et al., 1994
pK18mobsacB-Tc	Km ^R , <i>sacB</i> , mit zusätzlicher Tc ^R optimiert (mit Tc ^R aus pHP45Ω-Tc in SmaI Restriktionsschnittstellen kloniert)	J. Li, Koch et al., 2023
pK18mobsacB_truncHden0683_Tc	Km ^R , <i>sacB</i> , Tc ^R , 909 Bp SOE-PCR-Fragment zur Trunkierung eines 525 Bp-Fragments innerhalb von LipS1 (Hden_0683) (AS 71 bis 245 deletiert) in pK18mobsacB-Tc mittels XbaI-Restriktionsschnittstellen kloniert	Thöne, 2023
pK18mobsacB_truncHden0685_Tc	Km ^R , <i>sacB</i> , Tc ^R , 982 Bp SOE-PCR-Fragment zur Trunkierung eines 720 Bp-Fragments innerhalb von LipS2 (Hden_0685) (AS 95 bis 334 deletiert) in pK18mobsacB-Tc mittels XbaI-Restriktionsschnittstellen kloniert	Thöne, 2023
pK18mobsacBΔ <i>splA</i> -Tc	Km ^R , <i>sacB</i> , Tc ^R , 2,06 kb SOE-PCR-Fragment zur Deletion eines 1029 Bp-Fragments innerhalb von sLpl(AB) (Hden_0686) (AS 8 bis 349 deletiert) in pK18mobsacB-Tc mittels XbaI-Restriktionsschnittstellen kloniert	Tanabe et al., 2023
pK18mobsacB_ΔHden0687_Tc	Km ^R , <i>sacB</i> , Tc ^R , 1 kb SOE-PCR-Fragment zur Deletion eines 684 Bp-Fragments innerhalb von LipX (Hden_0687) (AS 4 bis 231 deletiert) in pK18mobsacB-Tc mittels XbaI-Restriktionsschnittstellen kloniert	Thöne, 2023
pBBR_Cas9_NT	pBBRMCS-2-Derivat, Km ^R , <i>mob</i> , <i>cas9</i> +C-His unter der Kontrolle des in <i>H. denitrificans</i> konstitutiven <i>lac</i> Promotors, Non-Targeting gRNA unter Kontrolle des BBa_J95023 Promotors und BBa_J95029 Terminators	Mougiakos et al., 2019
pUC19-sgRNA_optimized	Amp ^R , <i>lacZ</i> , optimierte sgRNA unter Kontrolle des Hden_2446 Promotors und Terminators (synthetisches Genkonstrukt von BioCat GmbH)	Diese Arbeit
pBBR_Cas9_NT_sgRNA_optimized	pBBR_Cas9_NT-Derivat, Insertion der optimierten sgRNA von pUC19-sgRNA_optimized kloniert mit SmaI and MfeI	Thöne, 2023

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle/Referenz
pHD_Cas9_NT	Km ^R , Tc ^R , pBBR_Cas9_NT_sgRNA_ optimized mit zusätzlicher Tc ^R (kloniert mit Tc ^R aus pHP45Ω-Tc herausgeschnitten mit SmaI and inseriert in pBBR_Cas9_NT_sgRNA_optimized in BstZ17I-Restriktionsschnittstelle)	Thöne, 2023
pHD_Cas9_NT_Δ <i>slpI</i> (AB)	pHD_Cas9_NT_sgRNAopt-Derivat, Insertion des Reparaturfragments für die Deletion von <i>slpI</i> (AB) (Hden_0686), kloniert mit XbaI	Thöne, 2023
pHD_Cas9_T <i>slpI</i> (AB)_Δ <i>slpI</i> (AB)	pHD_Cas9_NT_sgRNAopt_Δ <i>slpI</i> (AB)- Derivat, Non-targeting-Sequenz mit Targeting-Sequenz für <i>slpI</i> (AB) (Hden_0686) ausgetauscht (GGA)	Schilling, 2024
pET22b(+)	Amp ^R	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
pET22b(+)-Strep_M	Amp ^R , integriertes Strep-Tag zwischen NotI- und HindIII-Restriktionsschnittstelle	Mohr, 2021
pET28a(+)	Km ^R	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
pET22b(+)_Hden0683_C-Strep	Amp ^R , <i>lipS1</i> -Insertion (Hden_0683) in pET22b(+)-Strep_M mittels NdeI- und NotI-Restriktionsschnittstellen	Grosser, 2021
pET22b(+)_Hden0684_N-Strep	Amp ^R , <i>lipT</i> +N-Strep-Insertion (Hden_0684) in pET22b(+) mittels NdeI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_Hden0684_C-Strep	Amp ^R , <i>lipT</i> -Insertion (Hden_0684) in pET22b(+)-Strep_M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_Hden0684_N-His	Km ^R , <i>lipT</i> -Insertion (Hden_0684) in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_Hden0684_C-His	Km ^R , <i>lipT</i> -Insertion (Hden_0684) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pG-KJE8	Chl ^R , <i>dnaK-dnaJ-grpE</i> unter Kontrolle des <i>araB</i> -Promotors, <i>groES-groEL</i> unter Kontrolle des <i>Pzt-1</i> -Promotors	Takara Bio (San Jose, USA)
pET28a(+)_Hden_0687_C-His	Km ^R , <i>lipX</i> -Insertion (Hden_0687) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_EcLpl(AB)_N-His	Km ^R , <i>lplA</i> -Insertion (JW4349) in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_aq_402_N-Strep	Km ^R , <i>lbpA2</i> +N-Strep-Insertion (aq_402) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET28a(+)_aq_944_N-Strep	Km ^R , <i>lbpA1</i> +N-Strep-Insertion (aq_944) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII- Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle/Referenz
pET28a(+)_aq_1052_N-Strep	Km ^R , <i>gcvH</i> +N-Strep-Insertion (aq_1052) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET28a(+)_aq_1657_N-Strep	Km ^R , <i>lbpA1</i> +N-Strep-Insertion (aq_1657) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET28a(+)_aq_1108_N-Strep	Km ^R , <i>gcvH</i> +N-Strep-Insertion (aq_1108) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET22b(+)_RmLbpA2_TPKR51-54DLPE-C'Strep	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (rosmuc_01223) in pET22b(+)_RmLbpA2_C-Strep: TPKR51-54DLPE	Holz, 2024
pET22b(+)_RmLbpA2_R63A-C'Strep	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (rosmuc_01223) in pET22b(+)_RmLbpA2_C-Strep: R63A	Holz, 2024
pET22b(+)_RmLbpA2_P76D-C'Strep	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (rosmuc_01223) in pET22b(+)_RmLbpA2_C-Strep: P76D	Holz, 2024
pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis12	Km ^R , <i>lbpA2</i> +C-Strep-Insertion (rosmuc_01223) mit den Aminosäureaustauschen TPKR51-54DLPE sowie R63A in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis13	Km ^R , <i>lbpA2</i> +C-Strep-Insertion (rosmuc_01223) mit den Aminosäureaustauschen TPKR51-54DLPE sowie P76D in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis23	Km ^R , <i>lbpA2</i> +C-Strep-Insertion (rosmuc_01223) mit den Aminosäureaustauschen R63A sowie P76D in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis123	Km ^R , <i>lbpA2</i> +C-Strep-Insertion (rosmuc_01223) mit den Aminosäureaustauschen TPKR51-54DLPE sowie R63A und P76D in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle/Referenz
pET28a(+)_RmLbpA2_ mutagenesis123_2	Km ^R , <i>lbpA2</i> +C-Strep-Insertion (rosmuc_01223) mit den Aminosäure-austauschen TPKR51-54DLPK sowie R63A und P76D in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen (synthetisches Konstrukt von BioCat GmbH, für <i>E. coli</i> Kodon-optimiert)	Diese Arbeit
pET28a(+)_TK90_0643_C-His	Km ^R , <i>lipT</i> -Insertion (TK90_0643) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_ThisiDRAFT1283_ C-Strep	Amp ^R , <i>lipT</i> -Insertion (ThisiDRAFT_1283) pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_LipT_ Tthiocyanoxidans_C-His	Km ^R , <i>lipT</i> -Insertion (G372_RS0107505) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep	Amp ^R , <i>lbpA2</i> -Insertion (TK90_0640) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Tanabe et al., 2023
pET22b(+)_TK90_0641_C-Strep	Amp ^R , <i>lipS1</i> -Insertion (TK90_0641) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0642_C-Strep	Amp ^R , <i>slpI</i> (AB)-Insertion (TK90_0642) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90sLpl(AB)(0642)- C-His	Amp ^R , <i>slpI</i> (AB)-Insertion (TK90_0642) in pET22b(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Holz, 2024
pET22b(+)_TK90_0644_C-Strep	Amp ^R , <i>lipS2</i> -Insertion (TK90_0644) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C40A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C40A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C64A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C64A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C40A_C64A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C40A_C64A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C40A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C40A_C145A	Diese Arbeit

Material und Methoden

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle/Referenz
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C64A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C64A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C64A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C64A_C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_C40A_C64A_ C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, C40A_C64A, C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C40A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C40A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C40A_C64A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C40A, C64A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C40A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C40A, C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C40A_C64A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C40A, C64A, C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C64A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C64A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C64A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C64A, C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_C7A_K71A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: C7A, K71A, C145A	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0640_ C-Strep_K71A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (TK90_0640) in pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep: K71A	Diese Arbeit
pET22b(+)_Hden0696_ C-Strep_C7A_C145A	Amp ^R , ortsspezifische Mutagenese von <i>lbpA2</i> (Hden_0696) in pET22b(+)_Hden0696_C-Strep: C7A, C145A	Diese Arbeit
pET28a(+)_TK90_0639_N-His	Km ^R , <i>dsrE3B</i> -Insertion (TK90_0639) in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_TK90_0630_C-His	Km ^R , <i>rhd</i> -Insertion (TK90_0630) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle/Referenz
pET22b(+)_TK90TusA_C-Strep	Amp ^R , <i>tusA</i> +C-Strep-Insertion (TK90_0631) in pET22b(+) mittels NdeI- und EcoRI-Restriktionsschnittstellen	Tanabe et al., 2024
pET28a(+)_TK90_0648_N-His	Km ^R , <i>slpI</i> (AB)-Insertion (TK90_0648) in pET28a(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90sLpl(AB)(0648)-C-His	Amp ^R , <i>slpI</i> (AB)-Insertion (TK90_0648) in pET22b(+) mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Holz, 2024
pET22b(+)_TK90_1746_C-Strep	Amp ^R , <i>lbpA1</i> -Insertion (TK90_1746) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TsGcvH_C-Strep	Amp ^R , <i>gcvH</i> -Insertion (ThisiDRAFT_1200) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_TssLpl(AB)_C-His	Km ^R , <i>slpI</i> (AB)-Insertion (ThisiDRAFT_2298) in pET28a(+) mittels NcoI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TK90_0638_C-Strep	Amp ^R , <i>lbpA1</i> -Insertion (TK90_0638) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_RmLbpA2_C-Strep	Amp ^R , <i>lbpA2</i> -Insertion (rosmuc_01223) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_Hden_1299_C-Strep	Amp ^R , <i>gcvH</i> -Insertion (Hden_1299) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_EcGcvH_C-Strep	Amp ^R , <i>gcvH</i> -Insertion (JW2872) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_TKGcvH_C-Strep	Amp ^R , <i>gcvH</i> -Insertion (TK90_1719) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_RmGcvH_C-Strep	Amp ^R , <i>gcvH</i> -Insertion (rosmuc_03122) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_Hden_2793_C-Strep	Amp ^R , <i>gcvH</i> -Insertion (Hden_2793) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_Hden_0686_C-His	Amp ^R , <i>slpI</i> (AB)-Insertion (Hden_0686) in pET22b(+) mittels NdeI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET28a(+)_RmsLpl(AB)_C-His	Km ^R , <i>slpI</i> (AB)-Insertion (rosmuc_01225) in pET28a(+) mittels NcoI- und NotI-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_Hden_0696_C-Strep	Amp ^R , <i>lbpA2</i> -Insertion (Hden_0696) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_ThisiLbpA1_C-Strep	Amp ^R , <i>lbpA1</i> -Insertion (ThisiDRAFT_0958) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit
pET22b(+)_ThisiLbpA2_C-Strep	Amp ^R , <i>lbpA2</i> -Insertion (ThisiDRAFT_1817) in pET22b(+)_Strep-M mittels NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen	Diese Arbeit

2.1.6. Bakterienstämme

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80d lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 λ -thi-1 gyrA relA1	NEB (Ipswich, USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
<i>H. denitrificans</i> Sm200	Cm ^R , Sm ^R , spontan Streptomycin-resistente Mutante von <i>H. denitrificans</i> ATCC 51888 ^T	Koch & Dahl, 2018
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA	Cm ^R , Sm ^R , in-frame Deletion von tsdA (Hden_2748) in <i>H. denitrificans</i> Sm200	Koch & Dahl, 2018
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ lbpA	Cm ^R , Sm ^R , in-frame Deletion von lbpA (Hden_0696) in <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA	Tanabe et al., 2023
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA lbpA-His	Cm ^R , Sm ^R , Komplementierung von lbpA-His (Hden_0696) in <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ lbpA	Tanabe et al., 2023
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ slpI(AB) lbpA-His	Cm ^R , Sm ^R , in-frame Deletion von slpI(AB) (Hden_0686) in <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA lbpA-His	Tanabe et al., 2023
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ lipX lbpA-His	Cm ^R , Sm ^R , in-frame Deletion von lipX (Hden_0687) in <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA lbpA-His	Thöne, 2023
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ soxR	Cm ^R , Sm ^R , in-frame Deletion von soxR (Hden_0700) in <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA	J. Li, Koch et al., 2023
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ soxR lbpA-His	Cm ^R , Sm ^R , Austausch von lbpA (Hden_0696) zu lbpA-His in <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ soxR	PA Schilling, 2024
<i>H. denitrificans</i> Δ tsdA Δ soxR Δ lipX lbpA-His	Cm ^R , Sm ^R , in-frame Deletion von lipX (Hden_0687) in <i>H. denitrificans</i> Δ tsdA lbpA-His über CRISPR/Cas9-basierte Mutagenesemethode	Schilling, 2024

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde aerob in LB-Medium (siehe Tab. 7) im Schüttler bei 180 rpm und 37°C oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Im Rahmen der Proteinproduktion wurde der Einfluss verschiedener Medien (TB, TYMB, MI) auf die Expression untersucht (siehe Tab. 7). Das Festmedium für die Platten wurde durch Zugabe von 15 g Agar pro Liter Medium hergestellt. *E. coli* DH5 α wurde für molekulare Klonierungsarbeiten verwendet, *E. coli* BL21(DE3) für die rekombinante Proteinproduktion. Selektivantibiotika wurden in folgenden

Endkonzentrationen abhängig vom transformierten Plasmid eingesetzt: 25 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Ampicillin.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Wachstumsmedien.

Komponenten	Eingesetzte Menge [L ⁻¹]			
	Lysogen Broth (LB)	Terrific Broth (TB)	TCYM Medium	MI Medium
Hefeextrakt	5 g	24 g	5 g	20 g
Trypton	10 g	12 g	10 g	32 g
NaCl	5 g	-	5 g	-
K ₂ HPO ₄	-	12,54 g*	-	-
KH ₂ PO ₄	-	2,31 g*	-	-
Glycerin	-	4 ml*	-	-
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	-	-	2 g	-
Casaminosäuren	-	-	1 g	-
20 x M9	-	-	-	50 ml°
	-	-	-	1 ml*
	-	-	-	1 ml*
	-	-	-	100 µl*
	pH 7,0	pH 7,2 ± 0,2		
Agar-Agar			1,5 % (w/v)	

*in H₂O gelöst separat autoklaviert

° 20x M9	[100 ml ⁻¹]
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	12 g
KH ₂ PO ₄	6 g
NaCl	1 g
NH ₄ Cl	2 g

2.2.2. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach Mandel und Higa (Mandel & Higa, 1970) wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Eine 70 ml-Hauptkultur wurde 1%ig mit der Vorkultur angeimpft und etwa drei Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,3. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 4.000 x g, 4°C) wurden die Zellpellets in 10,5 ml CaCl₂-MgSO₄-Lösung (70 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄) vereint und resuspendiert und anschließend 45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 4.000 x g, 4°C) wurde das Zellpellet in 3,5 ml CaCl₂-MgSO₄-Lösung resuspendiert und anschließend für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Auf die Zugabe von 875 µl sterilem, kaltem Glycerin (87%) folgte die Aliquotierung á 220 µl. Die Aliquots wurden bei -70°C gelagert.

2.2.3. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte durch Zugabe von ca. 50-100 ng Plasmid-DNA zu 100 µl auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten *E. coli* DH5α oder *E. coli* BL21 (DE3). Nach Inkubation für 30 Minuten auf Eis folgte der Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden im Heizblock

(Hanahan, 1983). Die Zellen wurden anschließend für zwei Minuten auf Eis gestellt, bevor 500 µl LB-Medium hinzugegeben wurden. Auf eine Inkubation von etwa einer Stunde bei 37°C und 180 rpm wurden die Zellen auf eine LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

2.2.4. Heterologe Proteinexpression in *E. coli* BL21 (DE3)

Rekombinante Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 180 rpm in 200 ml bis 1 L LB-Medium mit dem jeweiligen Plasmid entsprechenden Selektivantibiotikum (siehe 2.2.1.) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 angezogen. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. IPTG-induzierte *E. coli* Zellen wurden über Nacht bei 18 °C und 160 rpm inkubiert. Die Zellen wurden 20 Minuten lang bei 8.000 x g geerntet und die Proteine nach dem Zellaufschluss mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.4.1.).

2.2.5. Kultivierung von *H. denitrificans*

H. denitrificans-Stämme wurden in optimiertem Minimalmedium (Meiberg & Harder, 1978) kultiviert (siehe Tab. 8) , das bei einem pH-Wert von 7,2 mit 100 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) gepuffert wurde. 24,4 mM Methanol wurden als Kohlenstoff- und Elektronenquelle zugefügt. Die Vor- und Hauptkulturen in Wachstumsexperimenten enthielten zusätzlich 2 mM Thiosulfat. Selektivantibiotika wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: 200 µg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Chloramphenicol in jeder Kultur (Resistenz von *H. denitrificans*), 15 µg/ml Tetracyclin nur im Rahmen der Elektroporation von Plasmiden in den Organismus (siehe 2.2.7.).

Tabelle 8: Bestandteile des optimierten (O)-Mediums zur Kultivierung von *H. denitrificans* (Meiberg & Harder, 1978; Vishniac & Santer, 1957).

Optimiertes (O)-Medium		*Spurenelemente-Lösung	
Komponenten	Menge pro Liter	Komponenten	Menge pro 100 ml
NH ₄ Cl	1 g	Na ₂ EDTA	5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	2,2 g
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,54 g
K ₂ HPO ₄	1,55 g	MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,5 g
Spurenelemente-Lösung*	2 ml	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
Methanol ^o	24,2 mM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,1 g
pH 7,0		CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,15 g
Agar-Agar	1,5 % (w/v)	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,16 g
^o aufgrund der Flüchtigkeit frisch dazugeben		pH 6,0 (KOH)	

2.2.6. Herstellung elektrokompetenter *H. denitrificans*-Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *H. denitrificans* Zellen wurde unter Verwendung eines modifizierten Protokolls hergestellt (C. G. Gliesche, 1997). Bereits 1997 wurde die Elektroporation als geeignetes Mittel für *H. denitrificans* beschrieben. Dazu wurden 200 ml Kultur in O-Medium angezogen und während der frühen Exponentialphase bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,3 geerntet (4.000 x g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem, sterilem Reinstwasser (4.000 x g, 10 Min., 4 °C) und einmal mit eiskaltem, sterilem 10 % (v/v Reinstwasser) Glycerin gewaschen bevor sie anschließend in 800 µl 10 % Glycerin resuspendiert wurden. 50µl Aliquots wurden für maximal eine Woche bei -70°C gelagert, falls sie nicht direkt in die Elektroporation eingesetzt wurden (siehe 2.2.7.).

2.2.7. Generierung von *H. denitrificans*-Mutanten

2.2.7.1. Konventionelle Mutagenese in *H. denitrificans*

Im Rahmen der konventionellen Mutagenese von *H. denitrificans*, die auf homologer Rekombination zur Verfügung gestellter DNA-Fragmente beruht, wurden die zuvor generierten Plasmid-Varianten des Suizidplasmids pK18mobsacB (Schäfer et al., 1994) in die kompetenten Zellen elektroporiert (C. G. Gliesche, 1997). Dazu wurden vorsichtig 40 µl elektrokompetente Zellen mit 500 ng Plasmid-DNA gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde in 1mm-Elektroporationsküvetten (Cell Projects, Harrietsham, UK) mit einem Bio-Rad-Genpulsar II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) mit den folgenden elektrischen Einstellungen durchgeführt: 2,4 kV und 200 Ω bei einer Kapazität von 25 µF. Nach zügiger Zugabe von 1 ml O-Medium wurden die Zellen sechs Stunden lang bei 30 °C und 180 rpm in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Verschiedene Verdünnungsstufen des Ansatzes wurden auf =-Medium-Agarplatten, die die entsprechenden Antibiotika enthielten (Chl, Str, Tc, siehe 2.2.5.) ausplattiert. Mutanten, in denen das Plasmid durch ein einzelnes Crossover-Event in das Genom integriert wurde, waren Tetracyclin-resistent und bildeten durch die Expression des *sacB*-Gens (Levansucrase) Schleim auf O-Medium-Agarplatten mit Chl, Str, Tc und 10% (w/v) Saccharose. Es folgte die Kultivierung dieser Einzel-Cross-over-Mutanten in Flüssigkultur für drei Tage, die anschließend auf O-Medium-Agarplatten mit Chl, Str und 10% (w/v) Saccharose ausplattiert wurden. Hier ist nur das Wachstum der Doppel-Crossover-Mutanten aufgrund des Verlusts der plasmidkodierten Levansucrase möglich. Die Zellen sind wieder Tetracyclin-sensitiv. Der Genotyp der Doppel-Crossover-Mutanten wurde mittels PCR verifiziert.

2.2.7.2. CRISPR/Cas9-basierte Mutagenese in *H. denitrificans*

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine CRISPR/Cas9-basierte Methode zur gezielten und effizienten Mutagenese von *H. denitrificans* konzipiert und etabliert. Im Folgenden werden die wesentlichen Schritte wiedergegeben, die detaillierte Erläuterung der Methode und insbesondere die Entstehung des Plasmids pHD_Cas9_NT, welches der Grundbaustein dieser Methode darstellt, ist jedoch im Ergebnis- und Diskussionsteil zu finden.

Zunächst werden Plasmid-Varianten von pHD_Cas9_NT generiert, in der die Non-Targeting-Sequenz durch eine Zielsequenz mittels Golden Gate Assembly ausgetauscht wurde (siehe 2.3.10.). ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/> (Labun et al., 2019)) ist ein Internet-Tool, um eine geeignete Zielsequenz innerhalb des Gens von Interesse zu finden. Es folgt die Insertion eines Reparaturfragments z.B. in die XbaI-Restriktionsschnittstelle des Plasmids. Nach erfolgreicher Klonierung werden 500 ng Plasmid-DNA ebenso wie in 2.2.7.2. beschrieben in *H. denitrificans* elektroporiert und nach einer Erholungsphase auf O-Medium-Platten ausplattiert, die die entsprechenden Antibiotika enthalten (Chl, Str, Tc, siehe 2.2.4.) ausplattiert. Da das Cas9-Enzym einen Doppelstrangbruch in der genomischen DNA der Zielsequenz verursacht, können theoretisch nur Zellen überleben, die in Lage waren, diesen Bruch zu reparieren. Durch die Anwesenheit des Plasmids und des darauf kodierten Reparaturfragments mit homologen Bereichen zu den stromauf- und -abwärtsgelegenen Bereichen der Zielsequenz, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Kolonien, die auf den Selektionsplatten wachsen, die gewünschte Mutation aufweisen. Der Genotyp der Mutanten kann mittels PCR verifiziert werden. Der Verlust des Plasmids pHD_Cas9 wird durch mehrfaches Passagieren der Zellen ohne Selektionsdruck auf Tetracyclin erreicht.

2.2.8. Wachstumsexperimente mit *H. denitrificans*-Mutanten

Zur phänotypischen Charakterisierung der *H. denitrificans*-Mutanten wurden Wachstumsexperimente mit Thiosulfat als Elektronendonator durchgeführt. Dazu wurden die Stämme in O-Medium und 2 mM Thiosulfat auf eine anfängliche OD₆₀₀ von 0,005 angeimpft, wobei Vorkulturen in der späten exponentiellen Wachstumsphase auf demselben Medium kultiviert wurden. Der Verlauf der optischen Dichte bei 430 nm, die Thiosulfat- (siehe 2.5.1.) sowie die Sulfit-Konzentration (siehe 2.5.2.) wurden innerhalb von 5 Tagen regelmäßig gemessen.

Für *H. denitrificans* wurde berichtet, dass die Beziehung zwischen Trockengewicht und Trübung, gemessen bei 430 nm, bis zu einer optischen Dichte von 2,0 linear ist, wobei eine OD₄₃₀ von 2,0 0,6 mg Trockengewicht ml⁻¹ entsprechen (Brooke & Attwood, 1983, 1984,

1985). Die in dieser Arbeit angegebenen Biomassewerte basieren alle auf diesem Umrechnungsfaktor. Ebenso konnte der Proteingehalt der Kulturen anhand der OD₄₃₀ berechnet werden, da eine lineare Korrelation besteht (J. Li, Koch et al., 2023); Das Verhältnis zwischen Trockengewicht und Protein beträgt bei Wachstum auf Methanol 2,01.

Spezifische Thiosulfat-Oxidationsraten wurden wie folgt berechnet: Die in Wachstumsexperimenten ermittelten Thiosulfat-Konzentrationen wurden grafisch gegen die Zeit aufgetragen und durch eine polynomielle Trendlinie zwischen dem zweiten und fünften Grad angepasst. Das Bestimmtheitsmaß half dabei, den korrekten Grad des Polynoms zu bestimmen. Anschließend wurde die erste Ableitung der Polynomfunktionsgleichung berechnet. Die Steigung entsprach der Thiosulfatoxidationsrate in $\mu\text{M h}^{-1}$ zu jedem Zeitpunkt, woraus die spezifische Oxidationsrate [$\mu\text{mol Thiosulfat h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$] abgeleitet wurde.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. DNA-Amplifikationen mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Sequenzen, die durch spezifische Oligonukleotide (Primer) beliebig angepasst werden kann (Mullis et al., 1986). In dieser Arbeit wurde im Rahmen von Kontroll-PCRs auf Gene einer *H. denitrificans*-Mutante die OneTaq DNA-Polymerase (NEB, Ipswich, USA) nach Herstellerangaben verwendet, die ein Temperaturoptimum von 68 °C besitzt und eine Synthesegeschwindigkeit von 1 Min/kb besitzt. Die Q5 HiFi-DNA-Polymerase (NEB, Ipswich, USA), mit einem Temperaturoptimum von 72 °C und einer Synthesegeschwindigkeit von 20-30 Sek/kb, wurde ebenfalls nach Herstellerangaben zur Amplifikation von DNA für Klonierungsarbeiten eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem zur Herstellung der Deletionsfragmente für pK18mobsacB-Varianten sowie zur Amplifikation der Reparaturfragmente für pHD_Cas9-Varianten die sogenannte Splicing by Overlap Extension (SOE)-PCR durchgeführt (Horton, 1995). Entsprechende Primer und Plasmide sind in Tabelle 4 und 5 aufgelistet (siehe 2.1.5.).

Für die ortsspezifische Mutagenese in Plasmiden mit Hilfe angepasster Primer, die die gewünschte Mutation enthielten (<https://nebasechanger.neb.com/>), wurde ebenfalls die Q5 HiFi-DNA-Polymerase (NEB, Ipswich, USA) eingesetzt, jedoch wurde nur ca. 5 ng Plasmid-DNA als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt und die PCR-Zyklen wurden auf 20 reduziert (statt 30), um eine ungewünschte Exonukleaseaktivität der Polymerase und somit eine ungewünschte Mutation nach der Ligation des linearen PCR-Produkts (siehe 2.3.4.) zu vermeiden.

2.3.2. Enzymatischer Restriktionsverdau

Mithilfe von Restriktionsendonukleasen wurde der Verdau von Plasmid-DNA durchgeführt. Zudem wurden Kontrollverdaue durchgeführt, um zu prüfen, ob die Klonierung erfolgreich verlief. Dabei binden diese Enzyme spezifisch an eine Nukleotidsequenz und schneiden dort die DNA. Der Verdau wurde dem Enzym entsprechend nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.3. Alkalische Phosphorylierung

Indem Alkalische Phosphatasen (APs) die Phosphatsäureester der beiden Enden der mit einem Restriktionsenzym geschnittenen DNA hydrolysieren und somit Phosphatgruppen entfernen, wird eine Religation der beiden Enden verhindert. Daher sollten nur Klone zustande kommen, die das nicht mit AP behandelte Insert in das gewünschte Plasmid integriert haben. Das verdaute Plasmid wurde nach Herstellerangaben mit der rSAP (NEB, Ipswich, USA) inkubiert.

2.3.4. Ligation

Mithilfe einer T4-DNA-Ligase (NEB, Ipswich, USA) wurden die DNA-Doppelstränge des Vektors und des Inserts miteinander ligiert. Zur genauen Durchführung siehe Herstellerangaben.

2.3.5. Agarosegelelektrophorese

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese (Adkins & Burmeister, 1996) werden DNA-Fragmente durch das Anlegen einer elektrischen Spannung ihrer Größe nach aufgetrennt. GelRed von (Biotium, Fremont, USA) wurde zur Visualisierung der DNA-Banden auf dem Agarosegel eingesetzt. Der jeweilige DNA-Ansatz wurde mit entsprechendem Volumen an Beschwererlösung (Gel Loading Dye, Purple (6x), NEB, Ipswich, USA) versetzt und aufgetragen. Zudem wurden 3 µL des 1 kb DNA Ladders (NEB, Ipswich, USA, siehe 2.2.1.) eingesetzt. Anschließend wurde für ca. 60 Minuten eine Spannung von 90 V angelegt.

2.3.6. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde amplifizierte oder verdaute DNA aus einem Agarosegel isoliert und für weitere Klonierungsschritte aufgereinigt. Zur genauen Durchführung siehe Herstellerangaben.

2.3.7. Plasmidpräparation

Die Plasmid-DNA von *E. coli* DH5 α wurde mittels des GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) isoliert. Zur genauen Durchführung siehe Protokoll des Herstellers.

2.3.8. Isolation genomischer DNA aus *H. denitrificans*

Die genomische DNA von *H. denitrificans* wurde mittels des Simplex Easy DNA-Isolationskit (GEN-IAL, Troisdorf, Deutschland) isoliert. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.9. Golden Gate Assembly

Zum Austausch des Non-Targeting Spacers in dem Plasmid pHD_Cas9_NT wurde das Golden Gate Assembly (GGA) nach (Engler et al., 2008) durchgeführt. Dabei wird mit Hilfe des Enzyms BsaI der 20 Nukleotide umfassende Non-Targeting Spacer ausgeschnitten und durch eine spezifische Targeting Sequenz (Zielsequenz) ersetzt, die aus zwei miteinander verbundenen synthetischen Oligonukleotiden besteht, die komplementäre Überhänge zu dem mit BsaI verdauten Vektor haben. Dazu wurden diese Oligonukleotide zuvor durch die katalytische Aktivität der T4-Polynukleotidkinase (NEB, Ipswich, USA) phosphoryliert. Dazu wurden sie in einem 40 μ l-Gesamtansatz auf eine Endkonzentration von 50 μ M eingestellt und mit 1 μ l T4-Polynukleotid-Kinase sowie 4 μ l T4-DNA-Ligase-Puffer für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für das Annealing der Oligonukleotide wurden dem Ansatz 2,5 μ l Natriumchlorid (1 M) hinzugefügt, und die Lösung wurde für drei Minuten bei 95 °C erhitzt. Ein möglichst langsames Abkühlen des Ansatzes geschah durch das Abschalten des Heizblocks, jedoch verweilen des Reaktionsgefäßes auf eben diesem, innerhalb von ca. drei Stunden bis auf Raumtemperatur.

In Tabelle 9 ist der Ansatz und das Programm für das GGA aufgeführt. Dieser Ansatz wurde anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert (siehe 2.2.3.).

Tabelle 9: Ansatz und Programm des Golden Gate Assembly.

Zusammensetzung		Programm		
Komponente	Volumen [μ l]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Plasmid (100 μ g/ml)	200 ng	37	2	30x
Annealte Oligos (50 μ M)	5-10 μ l*	16	5	
10x T4 DNA-Ligase Puffer	1	50	5	
T4 DNA-Ligase	0,5	80	15	
Bsal-HF	0,5	10	∞	
rH ₂ O	ad 20			

*erhöhen, um Effizienz ggf. zu steigern

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Chromatographische Methoden

Zur Aufreinigung rekombinant in *E. coli* produzierter Proteine, aber auch homolog exprimierter LbpA2 Proteine aus verschiedenen *H. denitrificans*-Stämmen wurden folgende chromatographische Methoden durchgeführt. Hervorzuheben ist, dass alle Aufreinigungsschritte der sauerstoffempfindlichen Enzyme LipS1 und LipS2 inklusive Zellaufschluss unter anoxischen Bedingungen im Anaerobenzelt durchgeführt wurden.

2.4.1.1. Strep-Tag Affinitätschromatographie

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet zunächst in 100 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 150 mM NaCl homogenisiert (3 ml Puffer pro Gramm Pelletgewicht). Bis auf LipT und LipX wurden alle Proteine in Gegenwart von 2 mM DTT aufgereinigt. Lysozym, DNase, RNase (siehe 2.1.4.) sowie Protease-Inhibitor (Halt™ Protease-Inhibitor-Cocktail, EDTA-frei (100x), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden nach Herstellerangaben zugefügt. Die Zellyse fand bei 4 °C mit Hilfe eines Ultraschallgeräts statt, wobei Ultraschall-Impulse bei 50 % Intensität für etwa 5 Minuten pro Gramm Pelletgewicht verwendet wurden. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 4 °C ultrazentrifugiert (145.000 x g). Der steril-gefilterte Überstand wurde anschließend in die Affinitätschromatographie eingesetzt.

Die Strep-Tag-Affinitätschromatographie (Schmidt & Skerra, 2007) wurde entweder über eine Graviditätssäule mit Streptactin Superflow (Iba Lifescience, Göttingen, Deutschland) oder mit einer vorgepackten StrepTrap™ HP Säule (Cytiva, Marlborough, USA) via FPLC (fast-protein liquid chromatography) an einer ÄKTApurifier 900 (Cytiva, Marlborough, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Elution wurden 2,5 mM Desthiobiotin eingesetzt.

2.4.1.2. His-Tag Affinitätschromatographie

Für den Zellaufschluss wurde das Pellet zunächst in 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol homogenisiert (3 ml Puffer pro Gramm Pelletgewicht). Bis auf LipT und LipX wurden alle Proteine in Gegenwart von 2 mM DTT aufgereinigt. Lysozym, DNase, RNase (siehe 2.1.4.) sowie Protease-Inhibitor (Halt™ Protease-Inhibitor-Cocktail, EDTA-frei (100x), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden nach Herstellerangaben zugefügt. Die Zellyse fand bei 4 °C mit Hilfe eines Ultraschallgeräts statt, wobei Ultraschall-Impulse bei 50 % Intensität für etwa 5 Minuten pro Gramm Pelletgewicht

verwendet wurden. Anschließend der Ansatz für 30 Minuten bei 4 °C ultrazentrifugiert (145.000 x g). Der steril-gefilterte Überstand wurde anschließend in die Affinitätschromatographie eingesetzt.

Die His-Tag-Affinitätschromatographie ist eine Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) (Hochuli et al., 1987). Sie wurde über entweder über eine 1 ml-Graviditätssäule mit Ni-NTA Superflow (Iba Lifescience, Göttingen, Deutschland) oder mit auf Kobalt basierendem TALON Superflow (Cytiva, Marlborough, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Alternativ wurde eine vorgepackte HisTrap™ HP 1 ml Säule (Cytiva, Marlborough, USA) oder eine vorgepackte HiTrap TALON crude 1 ml Säule (Cytiva, Marlborough, USA) via FPLC (fast-protein liquid chromatography) an einer ÄKTApurifier 900 (Cytiva, Marlborough, USA) nach Herstellerangaben genutzt. Die steigenden Imidazolkonzentrationen zur Elution des jeweiligen Proteins wurden individuell angepasst.

2.4.1.3. Anionenaustauschchromatographie

Als zusätzlicher Aufreinigungsschnitt wurde teilweise eine Anionenaustauschchromatographie mit einer vorgepackten HiTrap Q HP 1 ml Säule (Cytiva, Marlborough, USA) an einer ÄKTApurifier 900 (Cytiva, Marlborough, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde ein 20 mM Tris-Puffer (pH 7,6) verwendet, wobei im Verlauf der Chromatographie die NaCl-Konzentration von 100 mM stufenweise auf 250 mM, 400 mM, 550 mM und letztlich auf 700 mM gesteigert wurde (jeweils 4 Säulenvolumina).

2.4.1.4. Größenausschlusschromatographie

Als zusätzlicher Aufreinigungsschnitt wurde teilweise eine Größenaustauschchromatographie an einer ÄKTApurifier 900 (Cytiva, Marlborough, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Säulen wurden dem Zweck und den Proteineigenschaften angepasst nach Herstellerangaben eingesetzt: HiLoad 16/60 Superdex75 prep grade, Superdex75 Increase 10/300 GL, Superose6 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, USA). Die Säulen wurden mit verschiedenen Kombinationen aus den Proteinen Aprotinin (6,5 kDa), Pferdeherz-Cytochrom (12,4 kDa) Ribonuclease A (13,7 kDa), Lactalbumin (14,2 kDa) Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Conalbumin (75 kDa) und Dextranblau (2.000 kDa) in 50 mM Tris-Laufpuffer (pH 7,5) mit 30 mM NaCl kalibriert (siehe Abb. 9). Im Falle der LbpA-/GcvH-Proteine sowie der Lipoat:Protein-Ligasen sowie bei den

Untersuchungen des Oligomerisierungszustands von LipT unter reduzierten Bedingungen wurde dem Laufpuffer zudem 2 mM DTT frisch zugesetzt.

Die erstellte Kalibriergerade (siehe Abb. 9) wurde verwendet, um das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins zu ermitteln. Dazu wurde folgende Formel zur Berechnung des Verteilungskoeffizienten der Gelphase K_{AV} eingesetzt:

$$K(AV) = \frac{V(E) - V(0)}{V(t) - V(0)}$$

V_E = Elutionsvolumen des Proteins
 V_0 = Exklusionsvolumen der Säule (Dextranblau)
 V_t = Totalvolumen der Säule

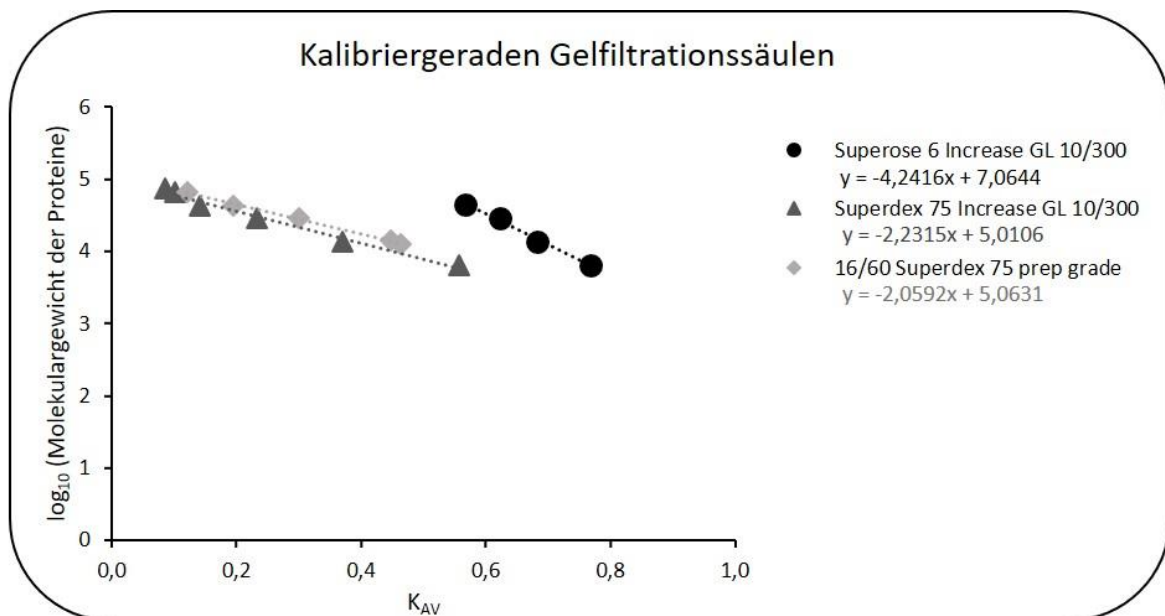


Abbildung 9: Kalibriergeraden der verwendeten Gelfiltrationssäulen. Aufgetragen wurde der Verteilungskoeffizient der Gelphase K_{AV} gegen den Logarithmus des Molekulargewichts der für die Kalibrierung verwendeten Proteine. Die Geradengleichungen sind in der Abbildung unter der jeweiligen Trendlinie aufgeführt.

2.4.2. Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinen

Zum Entsalzen, Umpuffern und/oder Aufkonzentrieren von Proteinen wurden je nach Volumen Amicon-Ultra0.5- oder Amicon-Ultra15-Filtereinheiten (Merck Millipore, Burlington, USA) nach Herstellerangaben genutzt, die dem Protein entsprechend eine Ausschlussgröße von 3 kDa oder 30 kDa besaßen.

2.4.3. Chemische Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern

Rekombinante Proteine wie LipS1 und LipS2, die Eisen-Schwefel (FeS)-Cluster als Cofaktoren enthalten, werden trotz Aufreinigung unter strikt anaeroben Bedingungen teilweise nur in ihrer Apoform isoliert. Aufgrund der Instabilität der FeS-Cluster gegenüber Sauerstoff, können diese anschließend auch nur unter anaeroben Bedingungen chemisch rekonstituiert werden (Sven-Andreas Freibert et al., 2018). Alle für die Rekonstitution benötigten Lösungen wurden frisch hergestellt, indem die benötigte Menge an DTT, FeCl₃ und Lithiumsulfid (Li₂S) in ein Eppendorfgefäß abgewogen und offen in das Anaerobenzelt eingeführt wurden. Die Pulver wurden dann in entgastem, bereits mindestens 48 Stunden vor Versuchsdurchführung ins Anaerobenzelt überführtem Wasser gelöst. Der Prozess der chemischen Rekonstitution der FeS-Cluster begann der Inkubation von LipS1 bzw. LipS2 mit 8 mM DTT bei 4 °C für drei Stunden in einem Volumen von 1 ml in einer 3 ml Quarzglasküvette im Diodenarray-UV-Vis-Spektralphotometer Agilent 8453 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit Kühlung und Magnetrührer. Um störende Einflüsse der Absorption von DTT im UV-Vis-Spektrum zu vermeiden, wurde das Spektrum des Proteins jeweils vor Zugabe des Reduktionsmittels aufgenommen. Aus der Absorption bei 280nm wurde zudem mit Hilfe der berechneten Extinktionskoeffizienten ϵ (siehe 2.5.1. sowie Tab. A1 im Anhang) und des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Proteinkonzentration berechnet (Stoscheck, 2018), um kalkulieren zu können, wie viel FeCl₃ und Li₂S zugegeben werden musste. Dabei wurde zunächst FeCl₃ in einem achtfachen molaren Überschuss aus einer Stammlösung von 10 mM FeCl₃ tröpfchenweise und unter fortwährender Benutzung des Magnetrührers zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation unter leichtem Rühren wurde Li₂S im gleichen molaren Verhältnis und unter identischer vorsichtiger Handhabung zugegeben.

Daraufhin folgte eine weitere Inkubation des Ansatzes bei 4°C unter Rühren für weitere 2 Stunden. Zuletzt wurde ungebundenes Eisen und Sulfid durch Zentrifugation entfernt (4°C, 16.000g, 5 Min.). Anschließend wurde das Protein in den ursprünglichen Puffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5, 2 mM DTT) umgepuffert und auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt (siehe 2.4.2.). So konnte ein vergleichendes Spektrum abschließend aufgenommen werden, um die Rekonstitution der FeS-Cluster anhand der für ein [4Fe-4S]-Cluster typischen Absorptionseigenschaften analysieren zu können. Der Eisen- und Schwefelgehalt pro Protein wurde ermittelt, indem für LipS1 und LipS2 ein modifizierter BCA-Assay (siehe 2.5.1.) sowie spektroskopische Methoden zur Eisen- und Sulfidbestimmung (siehe 2.5.4. und 2.5.5.) durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der einzelnen Methoden wurden entsprechend zusammengeführt und analysiert.

2.4.4. Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Rahmen der diskontinuierlichen Tricin-Natriumdodecylsulfat (Tricin-SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Schägger & Jagow, 1987) wurden die untersuchten Proteine denaturiert und der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Zusammensetzungen der Gele sowie der verwendeten Puffer sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Proben wurden mit reduzierendem 4x RotiLoad 1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden 20 µl Probe in die Taschen des Sammelgels geladen. Die Elektrophorese wurde mit 25 mA pro Gel gestartet, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 35 mA pro Gel für circa 45 bis 60 Minuten fortgesetzt. Die Gele wurden anschließend für ca. 30 Minuten mit RotiBlue Quick (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt.

Tabelle 10: Komponenten der Tricin-SDS-PAGE.

	Tricin-SDS-Gel	
	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (12,5 %)
30 % Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5:1)	300 µl	2,5 ml
H ₂ O _{dest}	1,238 ml	1,5 ml
3-fach Gelpuffer	938 µl	2 ml
10 % APS	75 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl
3-fach Gelpuffer	3 M Tris/HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45	
Anodenpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,9	
Kathodenpuffer	20 mM Tris, 20 mM Tricin, 0,2 % SDS, pH 8,25 (nicht einstellen)	

2.4.5. Native PAGE

Mit Hilfe der Nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (Native PAGE) wurden die untersuchten Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt (Schägger et al., 1994). Dazu wurden sie vor dem Beladen der Gele nicht durch reduzierende Agenzien oder durch Hitze denaturiert, sondern blieben in ihrem natürlichen Zustand gefaltet. Damit konnten im Rahmen dieser Arbeit vor allem Modifikationen an Liponsäure-bindenden Proteinen nachvollzogen werden (siehe Native Gel Mobility Assay, 2.4.6.). Um die Proben zu beschweren, wurde eine Mischung aus Bromphenolblau und Glycerin verwendet (0,001 g Bromphenolblau und 40% Glycerin (v/v) in 10 ml 62,5 mM Tris, pH 6,8). 6,7 µl dieser Beschwererlösung wurden 20 µl Probe beigemischt und anschließend wurden davon 20 µl auf die Native PAGE aufgetragen. Die Zusammensetzungen der Gele sowie der verwendeten Puffer sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Prozentigkeit wurde dabei abhängig vom pI des jeweiligen Proteins gewählt, um eine möglichst gute Auftrennung zu erreichen. Die Elektrophorese wurde

mit 25 mA pro Gel gestartet, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 35 mA pro Gel für circa 45 bis 60 Minuten fortgesetzt. Die Gele wurden anschließend für ca. 30 Minuten mit RotiBlue Quick (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt.

Tabelle 11: Komponenten der Native PAGE.

	Native Gele		
	Sammelgel (5 %)	Trenngel (15 %)	Trenngel (20 %)
30 % Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37,5:1)	416,5 µl	2,5 ml	3,557 ml
H ₂ O _{dest}	1,77 ml	1,15 ml	333 µl
1 M Tris, pH 6,8	312,5 µl	-	-
1,5 M Tris pH 8,8	-	1,25 ml	1,33 ml
10 % APS	50 µl	75 µl	75 µ
TEMED	5 µ	7,5 µl	7,5 µl
Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3 (nicht einstellen)		

2.4.6. Native PAGE Mobility Gel Shift Assay

Der Native PAGE Mobility Gel Shift Assay basiert auf den Eigenschaften der Native PAGE (siehe 2.4.5.), Proteine ihrem isoelektrischen Punkt entsprechend in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Diese Methode fand bereits 1990 Anwendung, um die Lipoylierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes nachvollziehen zu können (Ali et al., 1990). Dabei läuft das modifizierte Protein (Holoprotein) weiter zur Anode hin, da die positive Ladung des konservierten Lysinrestes des Liponsäure-bindenden Proteins durch die kovalente Amidbindung des Oktanoyl- oder Lipoylrestes verloren geht und der pI folglich niedriger wird. Folglich sieht man einen „Shift“ bei der Proteinbande des Holoproteins im Vergleich zur Bande des Apoproteins.

Die Ligationsansätze der verschiedenen Lipoat:Protein-Ligasen mit den potentiellen Substraten bestand aus den in Tabelle 12 aufgeführten Komponenten, wobei das Gesamtvolumen, sofern nicht separat vermerkt, 200 µl betrug. Es wurde ein 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) verwendet. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Ansätze 45 Minuten lang beim Temperaturoptimum der jeweiligen Lipoat:Protein-Ligase inkubiert, bevor die Proben auf die Native PAGE aufgetragen wurden.

Tabelle 12: Komponenten der *in vitro* Ligationsansätze der Lipoat:Protein-Ligasen mit LbpA-/GcvH-Substraten.

Komponente	Endkonzentration im Ansatz
Liponsäure-bindendes Protein (LbpA/GcvH)	10 µM
Lipoat:Protein-Ligase	0,5 – 1 µM
ATP	1,5 mM
MgCl ₂	1,5 mM
DTT	0,5 mM
Oktansäure/Liponsäure	1,5 mM

2.4.7. Western Blot

2.4.7.1. Western Blot aus Tricin-SDS-PAGEs

Ein Nachweis spezifischer Proteine in der SDS-PAGE lässt sich mittels Western Blot durchführen, indem die Proteine durch das Anlegen einer elektrischen Spannung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert werden (Burnette, 1981). Zur Identifikation von His-getagtem LbpA2 aus *H. denitrificans*-Stämmen in Tricin-SDS-Gelen wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) verwendet (25 V, 1,3 A, 10 Minuten). Die Nitrocellulose-Membran (Amersham Protran 0.2 µm NC, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) wurde für fünf Minuten in 10% Methanol aktiviert und anschließend wurden das Gel und die Membran für 20 Minuten in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol (Towbin et al., 1979)) inkubiert. In die Transferkammer wurden drei in Towbin-Puffer getränkte Whatman Filterpapiere aufeinandergelegt. Darauf folgte die Membran, dann das Gel und abschließend erneut drei in Towbin-Puffer getränkte Whatman Filterpapiere. Nach dem Blot wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran über Nacht bei 4°C blockiert (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4 + 0.05% (v/v) Tween 20, 4% (w/v) milk powder). Die Membran wurde anschließend dreimal für fünf Minuten in PBS-Tween-Puffer (4 mM KH₂O₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl + 0.1% Tween 20) gewaschen. Die Detektion erfolgte durch den Einsatz eines Anti-His-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugats (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), der spezifisch gegen Histidin-Tags gerichtet ist. Das Konjugat wurde dabei 1:5.000 in PBS-Puffer mit 0,5% (w/v) BSA eingesetzt und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Nachdem die Membran erneut dreimal für fünf Minuten in PBS-Tween-Puffer gewaschen wurde, kam die SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) nach Herstellerangaben zum Einsatz und die Chemilumineszenz auf der Membran wurde umgehend über das ChemiDoc Imaging System (BioRad Laboratories, München, Deutschland) visualisiert.

2.4.7.2. Western Blot aus Native PAGEs

Hier werden nur Abweichungen vom Western Blot aus Tricin-SDS-PAGEs aufgeführt (siehe 2.4.7.1.), die aufgrund der fehlenden Inkubation mit SDS als anionisches Detergenz notwendig sind. Das native Gel wird zunächst für 30 Minuten 50mM Tris/HCl, 0,1% SDS (pH 7,4) inkubiert. Die in Methanol aktivierte Membran (wie in 2.4.7.1. beschrieben) wird zusammen mit dem nativen Gel anschließend für 20 Minuten in Bjerrum-Puffer (48 mM Tris, 39 mM

glycine, 0,04% (w/v) SDS, pH ~9,2) inkubiert. Die Whatman Filterpapiere werden ebenfalls in Bjerrum-Puffer getaucht.

2.4.8. Dot Blot

Um das His-getaggte LbpA2 aus *H. denitrificans*-Stämmen in einzelnen Fraktionen verschiedener Chromatographien nachzuweisen, wurden Dot Blots durchgeführt. Hierbei wurden 2 µL der zu untersuchenden Probe auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham Protran 0.2 µm NC, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) pipettiert. Die Blockierung der Membran sowie die anschließende Antikörper-Detektion wurden wie in Abschnitt 2.4.7.1. beschrieben durchgeführt.

2.4.9. Schwefeltransferassays

Um eine mögliche Schwefelbindung von verschiedenen TK90LbpA2-Cysteinaustausch-Mutanten *in vitro* zu untersuchen, wurden 1,5 nmol der Proteine 30 Minuten lang mit 5 mM Polysulfid in 20 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) inkubiert. Nach Entfernung des Polysulfids in der Lösung (siehe 2.4.2.) konnte die Probe massenspektrometrisch untersucht werden (siehe 2.4.10.). Die für diese Experimente benötigte Polysulfid-Stammlösung wurde vorbereitet, verdünnt und wie zuvor beschrieben verwendet (Ikeda et al., 1972; J. Li, Törkel et al., 2023). Im Rahmen von Schwefeltransferassays wurde untersucht, ob ein Schwefeltransfer von einer bekannten rekombinanten Schwefeltransferase von *T. sp.* K90mix (TK90TusA) zu den TK90LbpA2-Cysteinaustausch-Mutanten möglich ist. Dazu wurden 1,5 nmol der Schwefeltransferase mit 0,5 mM Polysulfid in 20 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 30 Minuten lang bei Raum inkubiert. Die Akzeptorproteine wurden mit 1 mM DTT unter gleichen Bedingungen reduziert. Überschüssiges Polysulfid oder DTT wurde entfernt (siehe 2.4.2.). Donor- und Akzeptorproteine wurden im Verhältnis 1:1 auf ein Endvolumen von 40 µl gemischt und 30 Minuten lang bei RT inkubiert. Die Probe wurden anschließend via MALDI-TOF MS analysiert (siehe 2.4.10.).

2.4.10. MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) Massenspektrometrie (Karas & Hillenkamp, 1988) wurde zur Massenanalyse von Liponsäurebindenden Proteinen (LbpA und GcvH) verwendet. Es wurden je 20 µl von jeder Probe kurz vor der Messung via ZipTip mit 0,6-µl-C18-Harz (Merck Millipore, Burlington, USA) entsalzt

und zeitgleich auf 4 μ l aufkonzentriert, bevor sie von der Protein Synthesis & Bioanalytics Core Facility der Universität Bonn auf die Matrix aufgetragen und anschließend gemessen wurden. Die Rohdaten wurden mittels mMass (<http://www.mmass.org>) ausgewertet.

2.5. Spektroskopische Methoden

2.5.1. Quantifizierung von DNA und Proteinen

DNA-Konzentrationen wurden spektrometrisch anhand der Absorption bei 260nm mit Hilfe eines NanoDrop-Geräts (Biospectrometer basic, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die Schichtdicke der verwendeten Küvette betrug 1 mm.

Für die heterolog exprimierten LbpA- und GcvH-Proteine sowie die Lipoaat:Protein-Ligasen wurde gleichermaßen die Absorption bei 280nm gemessen und mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ der einzelnen Proteine (berechnet von ProtParam anhand der Aminosäure-Sequenz, siehe Tab. A1 im Anhang) die molare Konzentration berechnet (Stoscheck, 2018). Dazu wurde das Lambert-Beersche Gesetz nach c (Konzentration) umgestellt:

$$c = \frac{E}{\epsilon \times d}$$

c = Konzentration
 E = Extinktion bei 280 nm
 ϵ = Extinktionskoeffizient
 d = Schichtdicke der Küvette

Die Massenkonzentration (β) ließ sich mit Hilfe der von ProtParam kalkulierten Molekulargewichte (M) der einzelnen Proteine ebenfalls leicht umrechnen:

$$\beta = c \times M$$

Für LipT wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Der Nachweis und die Quantifizierung der Proteine beruht hierbei auf der Kombination der Biuret-Reaktion, also die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einem alkalischen Medium, mit dem kolorimetrischen Nachweis von Cu^{1+} über Bicinchoninsäure (BCA) (Smith et al., 1985).

Da die BCA-Methode sensitiv gegenüber reduzierenden Agenzien ist, wurde das Protokoll für die Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 modifiziert, indem die Proben vor Zugabe der BCA-Reagenz mit Iodacetamid behandelt wurden, um störendes DTT im Ansatz zu verdrängen (Hill

& Straka, 1988). Dies geschah durch vorherige Inkubation von 50 μl Probe mit 50 μl 1 M Iodacetamid (in 0,1 mM Tris/HCl, pH 8) für 15 Minuten bei 37°C. Dieser Ansatz wurde dann in den BCA-Assay eingesetzt und nach Herstellerangaben weiter durchgeführt. Die Ansätze für die Standardgerade wurden ebenso behandelt wie die Probe an sich. Die Messungen erfolgte in einer Mikrotiterplatte in einem Mikroplattenlesegerät (Sunrise™ Absorbance Microplate Reader, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) bei 562nm. Die Standardgeraden des BCA-Assays sowie des modifizierten BCA-Assays sind in Abbildung 10 dargestellt.

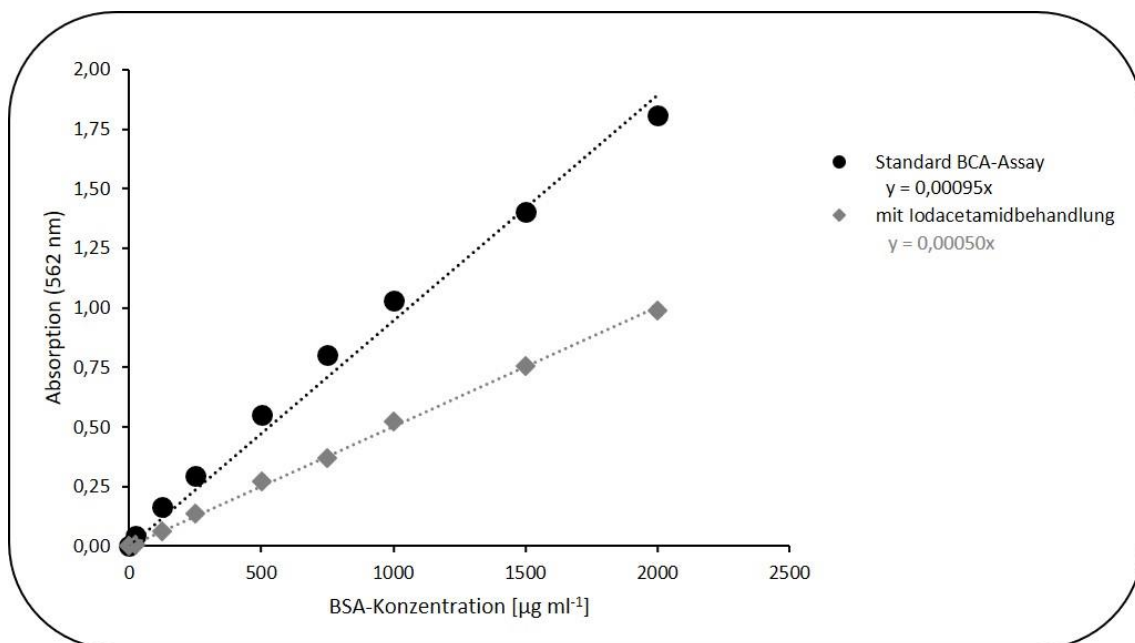


Abbildung 10: Standardgeraden zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe des BCA-Assays. Die Absorption der Verdünnungsreihe wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Geradengleichungen der Trendlinien sind im Diagramm unter der jeweiligen Methode aufgeführt.

2.5.2. Quantifizierung der Thiosulfatkonzentration

Thiosulfat wurde mittels der von Cao et al. modifizierten Methode durchgeführt (Cao et al., 2018), die eine minimalisierte Methode einer bereits 1996 etablierten Methode darstellt (C. Dahl, 1996). Den Kulturen der verschiedenen *H. denitrificans* Stämme wurden in regelmäßigen Abständen 200 μl Proben entnommen. Die Proben wurden 5 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert und als Triplikate gemessen. 50 μl H₂O und 40 μl 200 mM Natriumacetat (pH 4,8) wurden zu 40 μl Kulturüberständen gegeben. Es folgte die Zugabe von 10 μl 200 mM NaCN und 10 μl 40 mM CuCl₂. Nach erneutem gründlichen Mischen wurden 10 μl Eisennitratlösung (3 g Fe(NO₃)₃ × 9 H₂O und 40 ml 55 % (v/v) HNO₃, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 100 ml) zugegeben. Nachdem erneut gemischt wurde, konnte die Absorption bei 460 nm mit

einem Mikroplattenlesegerät (SunriseTM Absorbance Microplate Reader, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) aufgezeichnet werden. Die Standardgerade mit Thiosulfat in steigenden Konzentrationen bis 2,5 mM ist in Abbildung 11 dargestellt.

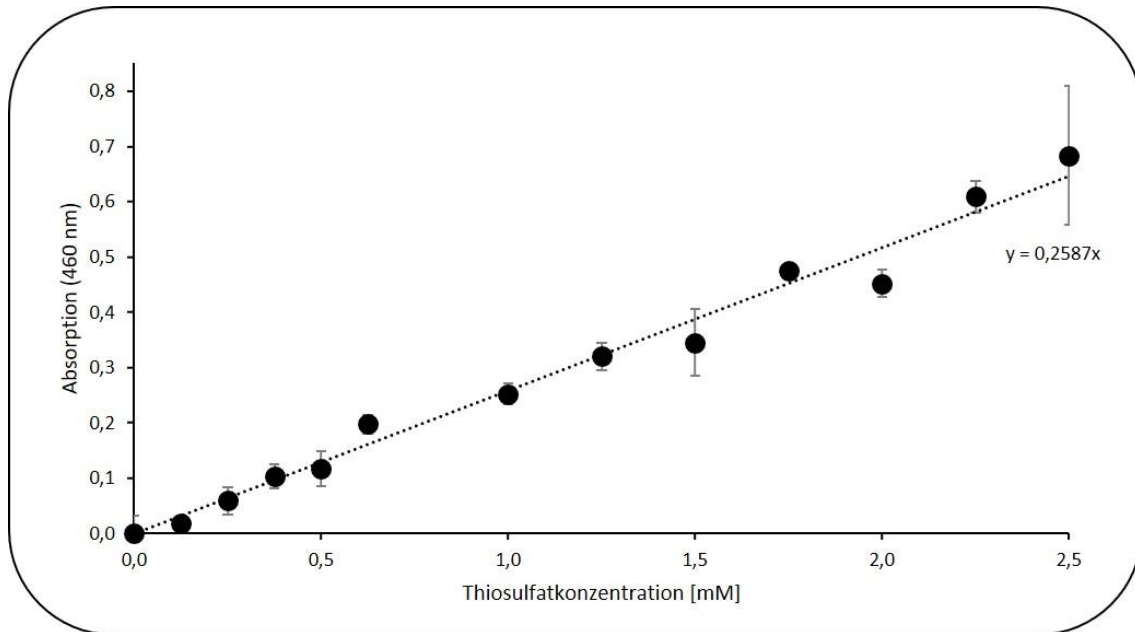


Abbildung 11: Standardgerade zur Bestimmung der Thiosulfatkonzentration in *H. denitrificans*-Kulturen. Die Absorption der Verdünnungsreihe wurde bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen. Die Geradengleichung der Trendlinie ist im Diagramm aufgeführt.

2.5.3. Quantifizierung der Sulfitkonzentration

Zur Bestimmung der Sulfitkonzentration wurde die Fuchsin-Methode (Leinweber & Monty, 2018) angewandt, die 1996 modifiziert (C. Dahl, 1996) und 2018 minimalisiert wurde (Cao et al., 2018), um sie in Mikrotiterplatten durchführen zu können. Den Kulturen der verschiedenen *H. denitrificans* Stämme wurden in regelmäßigen Abständen 200 µl Proben entnommen. Die Proben wurden 5 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert und als technische Triplikate gemessen. Der Kulturüberstand wurde je nach Messzeitpunkt unterschiedlich stark mit O-Medium (siehe 2.2.5.) auf ein Gesamtvolumen von 175 µl verdünnt. Anschließend wurde diese Probe mit 50 µl 2 % Zinkacetat und 25 µl 0,04 % Fuchsin (in 10 % (v/v) H₂SO₄) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 2,5 µl Formaldehyd beigelegt, gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von Fuchsin und Formaldehyd führt dabei zur Ausbildung eines roten Chromatophors. Von den Proben wurden jeweils 245 µl in ein Well einer Mikrotiterplatte überführt und bei 570 nm gemessen (SunriseTM Absorbance

Microplate Reader, Tecan Group, Männedorf, Schweiz). Die Standardgerade mit Sulfit in steigenden Konzentrationen bis 2,1 mM ist in Abbildung 12 dargestellt.

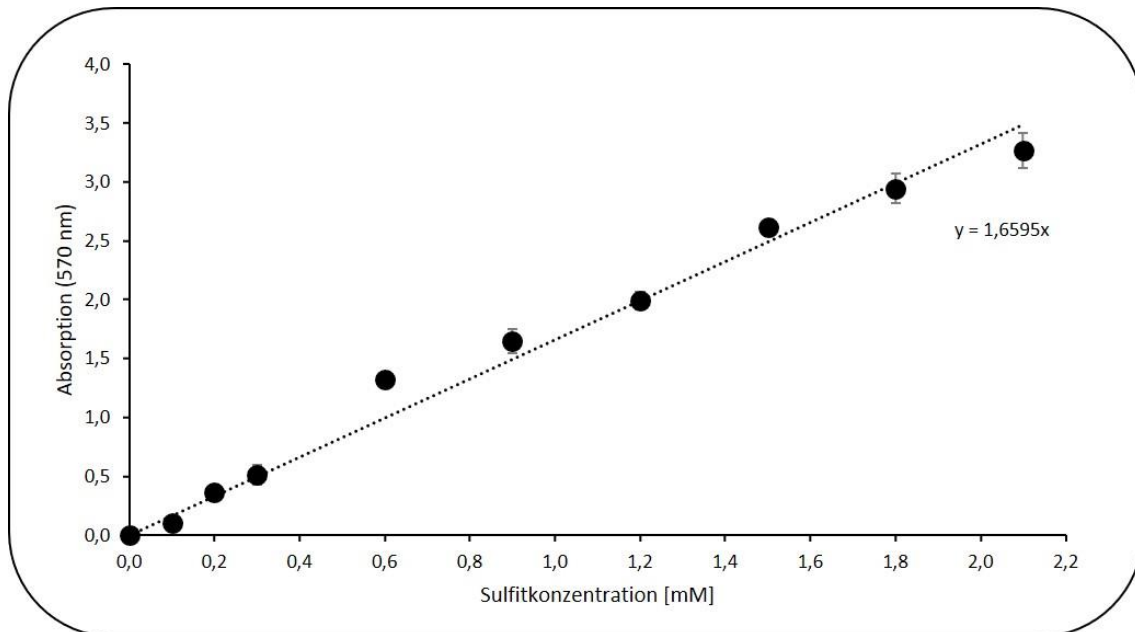


Abbildung 12: Standardgerade zur Bestimmung der Sulfitkonzentration in *H. denitrificans*-Kulturen. Die Absorption der Verdünnungsreihe wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Geradengleichung der Trendlinie ist im Diagramm aufgeführt.

2.5.4. Quantifizierung der Eisenkonzentration

Zur Quantifizierung von Eisenatomen in den Ansätzen mit den rekonstituierten Enzymen LipS1 und LipS2 wurde eine kolorimetrische Methode nach Fish durchgeführt (Fish, 1988). Nach Zugabe von 100 µl 1 % (v/v) Salzsäure zu 100 µl Probe folgte eine zusätzliche Hitzedenaturierung der Proteine für 10 Minuten bei 80°C. Daraufhin wurden 500 µL Ammoniumacetat (7,5 % (w/v)), 100 µL Ascorbinsäure (4 % (w/v)), 100 µL SDS (2,5 % (w/v)) und 100 µL Ferrozin (1,5 % (w/v)) zugegeben. Alle Lösungen, mit Ausnahme des Ferrozins, wurden am selben Tag frisch zubereitet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 x g für 5 Minuten, bevor der Überstand in einer 1 ml Glasküvette bei 593 nm gemessen wurde. Die Quantifizierung wurde durch eine Standardgerade erreicht, die unterschiedliche Konzentrationen von Ammoniumeisen(III)sulfat bis zu 320 µM enthielt. Diese ist in Abbildung 13 dargestellt.

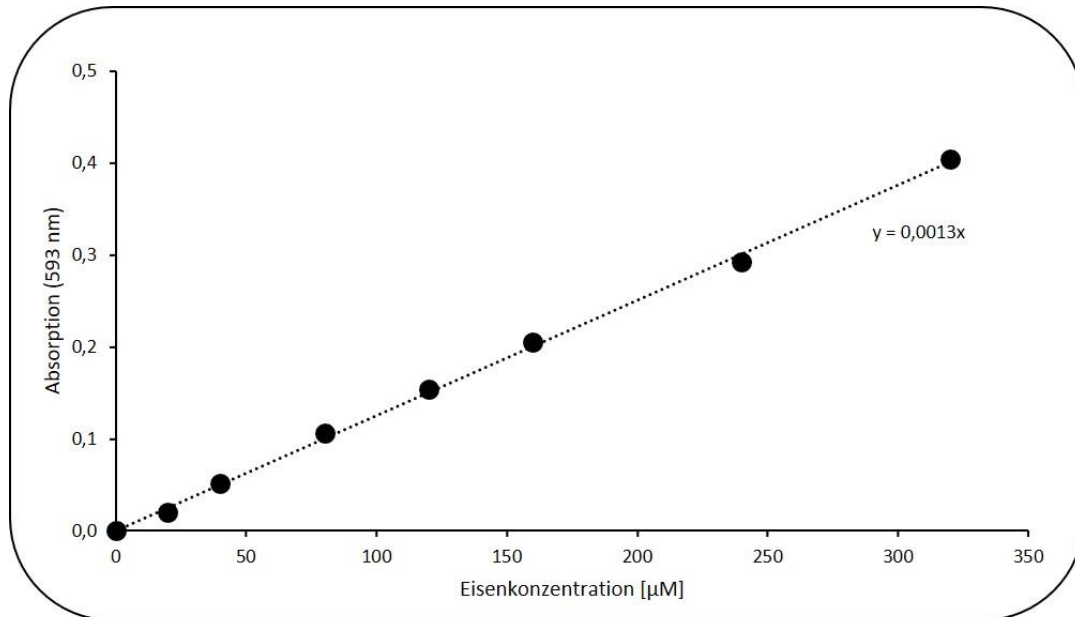


Abbildung 13: Standardgrade zur Quantifizierung der Eisenatome in chemisch rekonstituierten Eisen-Schwefel-Clustern von LipS1 und LipS2. Die Absorption der Verdünnungsreihe wurde bei einer Wellenlänge von 593 nm gemessen. Die Geradengleichung der Trendlinie ist im Diagramm aufgeführt.

2.5.5. Bestimmung der Sulfidkonzentration

Die Sulfidkonzentration zur Quantifizierung von FeS-Clustern der rekonstituierten Enzyme LipS1 und LipS2 wurde mit Hilfe einer 1983 etablierten Methode unter anoxischen Bedingungen im Anaerobenzelt durchgeführt (Beinert, 1983). Alle für die Rekonstitution benötigten Lösungen wurden frisch hergestellt, indem die benötigte Menge an Chemikalien in ein Eppendorfgefäß abgewogen und offen in das Anaerobenzelt eingeführt wurden. Die Pulver wurden dann in entgastem, bereits mindestens 48 Stunden vor Versuchsdurchführung ins Anaerobenzelt überführtem Wasser gelöst. 300 µL Zinkacetat (1 % (w/v)) und 15 µL NaOH (12 % (w/v)) wurden vorsichtig zu 100 µL Probe ohne kräftiges Mischen pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Im darauffolgenden Schritt wurden 75 µL N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (DMPD, 0,1 % (w/v)) zugegeben und das Reagenzgefäß wurde sehr vorsichtig geschüttelt. Zuletzt wurden 75 µL 23 mM FeCl₃ (gelöst in 1,2 M HCl) hineingegeben. Der Ansatz wurde anschließend kräftig geschüttelt, bis eine homogene, farblose Lösung entstand. Anschließend wurde die Lösung 15 Minuten lang bei 13.000 x g zentrifugiert. 250 µL des Überstands wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und für die Absorptionsmessung bei 670 nm in ein Mikroplattenlesegerät (Sunrise™ Absorbance Microplate Reader, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) gestellt. Die Quantifizierung von Sulfid wurde durch eine Standardgerade verschiedener Konzentrationen von Li₂S (bis zu 240 µM) erzielt und ist in Abbildung 14 dargestellt.

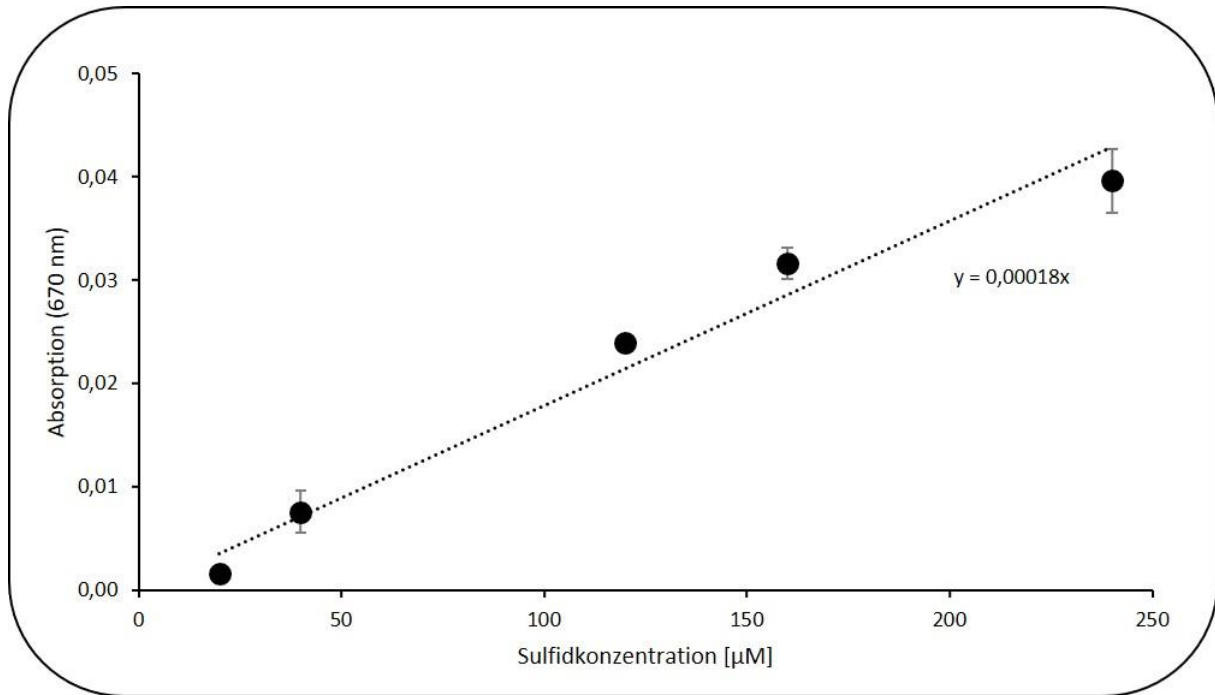


Abbildung 14: Standardgrade zur Quantifizierung der Schwefelatome in chemisch rekonstituierten Eisen-Schwefel-Clustern von LipS1 und LipS2. Die Absorption der Verdünnungsreihe wurde bei einer Wellenlänge von 670 nm gemessen. Die Geradengleichung der Trendlinie ist im Diagramm aufgeführt.

2.5.6. UV-Vis Spektroskopie

Zur Charakterisierung des Flavoproteins TK90LipT sowie zur Visualisierung der chemischen rekonstituierten Eisen-Schwefel-Cluster von HdLipS1 und TK90LipS2 wurden analytische UV-Vis-Spektren in Quarzglasküvetten unter anoxischen Bedingungen im Anaerobenzelt mit einem Diodenarray-Spektrophotometer (Agilent 8453, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) aufgenommen.

Zur Charakterisierung der Bindung des FAD-Kofaktors von TK90LipT wurde der Überstand nach Hitzedenaturierung des Enzyms für 10 Minuten bei 98°C UV-Vis-spektroskopisch betrachtet. Dabei werden die charakteristischen Absorptionspeaks bei 374 nm sowie 450 nm analysiert ($\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für $A_{450\text{nm}}$ (Macheroux, 1999)).

2.5.7. UV-Vis Titration

Für die FAD-abhängige Oxidoreduktase LipT wurde eine UV-Vis-Titration im Anaerobenzelt durchgeführt. Das Protein wurde in entgastem 50 mM Tris-Puffer (pH 7) mit 30 mM NaCl umgepuffert (siehe 2.4.2.). 1 ml des Proteins mit einer Konzentration von 90 μM (entspricht 3,8 mg ml^{-1}) wurde in einer Quarzglasküvette überführt. Alle Lösungen von Reduktions- oder Oxidationsmitteln wurden ebenfalls erst im Anaerobenzelt in bereits anoxisch gelagertem

Wasser gelöst. Es wurde eine 5 mM Natriumdithionit-Stammlösung sowie eine 5 mM Ferricyanid-Stammlösung hergestellt. Die schrittweise Reduktion von LipT durch Zugabe von je 1 μl Natriumdithionit (entspricht 5 μM im Gesamtansatz) wurde mit dem Diodenarray-Spektrophotometer (Agilent 8453, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) aufgenommen. Nach vollständiger Reduktion folgte die schrittweise Titration mit je 1 μl Ferricyanid (entspricht 5 μM im Gesamtansatz). Die Auswertung und graphische Darstellung der UV/Vis-Spektren erfolgte in Excel (Microsoft Office). Dabei wurden die Spektren bei 310 nm sowie 600 nm normiert, um die Zugabe der Zusätze im Verlauf der Titrations auszugleichen.

Zudem wurden erste Versuche zur Reduktion von LipT durch Zugabe von 400 μM NADH zu 400 μM LipT sowie 500 μM NADPH zu 16 μM LipT in oben genanntem Puffer durchgeführt. Die Reaktion wurde anhand der Absorptionsänderungen über die Zeit bei 340 nm für NAD(P)H ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bergmeyer, 1975)) verfolgt.

2.5.8. Messung der Diaphoraseaktivität von TK90LipT

Eine mögliche Diaphoraseaktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, indem je 500 μM NAD(P)H als Elektronendonator und Ferricyanid oder Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT) (Bernofsky & Swan, 1973) als Elektronenakzeptor zu variablen Konzentrationen von TK90LipT in einem 1 ml Ansatz pipettiert wurden. Dazu wurde MTT in 75 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Triton X-100 und 20% (v/v) Wasser gelöst. Die Reaktion wurde jeweils nach Inkubation des gesamten Ansatzes (ohne LipT) bei 34°C für 10 Minuten durch Zugabe des Enzyms gestartet und unmittelbar im UV-Vis-Spektrometer aufgezeichnet (MTT bei 578 nm ($\epsilon = 13 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bergmeyer, 1983)), Ferricyanid bei 420 nm ($\epsilon = 1,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Schellenberg & Hellerman, 1958))). Die Versuche wurden sowohl aerob als auch anaerob durchgeführt. Neben dem oben Puffer wurde zusätzlich 50 mM KPO_4 -Puffer (pH 7,0) verwendet, die Temperatur wurde zwischen 25°C und 34°C variiert und der pH-Wert wurde zwischen pH 5,0 und pH 7,5 abgeändert, um die Reaktion ggf. zu optimieren.

Es wurden abschließend erste Versuche zur möglichen Diaphoraseaktivität von TK90LipT in reverser Richtung durchgeführt, indem 1,2 μM TK90LipT mit 0,12 μM reduziertem TK90LbpA2 (sollte mit höheren Konzentrationen wiederholt werden) als Elektronendonator und 500 μM NAD^+ als Elektronenakzeptor versetzt wurden. Die Reaktion wurde anhand der Verfolgung Absorptionsänderungen über die Zeit über das gesamte visuelle Spektrum hinweg verfolgt.

Eine Aktivitätsfärbung im nativen Gel mittels MTT als Elektronenakzeptor wurde wie folgt durchgeführt: Das Gel der Native PAGE (siehe 2.4.5.), die mit zusätzlicher Kühlung der Kammer von Außen und bei maximal 10 mA durchgeführt wurde, wurde für 30 Minuten bei 30°C in 50 mM BisTris-Puffer (pH 6,0) mit 1 mM MTT und 120 µM NAD(P)H inkubiert. Proteinbanden mit Diaphoraseaktivität sollten entsprechend blau erscheinen.

2.6. Bioinformatische Methoden

2.6.1. Aminosäuren-Sequenzvergleich

Die Analyse der Aminosäuresequenzen aller untersuchter Proteine wurde mit ClustalΩ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt. Das Internet-Tool WebLogo3 (<https://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>) wurde ebenfalls genutzt (Crooks et al., 2004).

2.6.2. Vorhersage der Proteinstruktur

Die in dieser Arbeit aufgeführten Proteinstrukturen stammen entweder aus der Proteindatenbank (RCSB PDB) oder wurden von AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) modelliert. Analysiert und dargestellt wurden die Strukturen durch die Anwendung ChimeraX (Meng et al., 2023).

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Liponsäureassemblierung an dem Liponsäurebindenden Protein LbpA und das Herausstellen der Besonderheiten dieses neuen Assemblierungswegs im Vergleich zur kanonischen Assemblierungsmaschinerie, die unter anderem Protein H aus dem Glycin spaltende System (GcvH) lipoyliert.

Neben dem spannenden Feld der Liponsäurebiosynthese an LbpA war zudem die Frage nach der Funktion dieses Proteins im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von großem Interesse. Zur effizienten Mutagenese des Modellorganismus *H. denitrificans*, die für derzeitige aber auch für zukünftige Forschungsinteressen von enormem Nutzen ist, wurde die Etablierung eines CRISPR/Cas9 basierten Systems konzipiert.

3.1. *In vitro* Erforschung der Liponsäureassemblierung an dem Liponsäurebindenden Protein LbpA

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der beteiligten Proteine und Enzyme des Liponsäureassemblierungswegs an LbpA einzeln aufgeführt. Neben dem Akzeptorprotein LbpA sind die Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB) sowie die Lipoat-Synthasen LipS1 und LipS2 die Hauptakteure der Biosynthese (Abb. 6(B)). Zusätzlich galt das Forschungsinteresse der FAD-abhängigen Oxidoreduktase LipT sowie dem als Glutamin-Amidotransferase-ähnliches Protein annotierten LipX, deren Funktionen noch gänzlich ungeklärt sind.

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden repräsentative Organismen ausgewählt, die die neuartige Liponsäureassemblierung an LbpA besitzen. Auffällig ist hierbei die Assoziation zwischen LbpA und sHdr System in schwefeloxidierenden Bakterien. Sowohl das Alphaproteobakterium *H. denitrificans* ATCC 51888^T als auch die Gammaproteobakterien *Thioalkalivibrio* sp. K90mix und *Thiorhodospira sibirica* ATCC 700588^T besitzen das zytoplasmatische sHdr System zur dissimilatorischen Schwefeloxidation, wobei letztere chemolithoautotrophe Organismen sind, wohingegen *H. denitrificans* das System nur fakultativ einsetzt, wenn Thiosulfat oder andere reduzierte Schwefelverbindungen als Elektronendonoren verfügbar sind. Ein Repräsentant des Phylums Aquificae, *Aquifex aeolicus* VF5, gehört zu den hyperthermophilen chemolithoautotrophen Organismen, die mit Hilfe des sHdr Systems reduzierte Schwefelverbindungen oxidieren. Interessanterweise gibt es Organismen, die LbpA-Proteine und assoziierte Biosynthesegene besitzen, jedoch kein sHdr System. Dazu zählt das Alphaproteobakterium *Roseovarius mucosus* DSM 17069^T. Als Referenzstamm wurden

Proteine aus *E. coli* K12 in folgenden Versuchen eingesetzt. In Abbildung 15 sind jeweils die Gene, die für die Proteine LbpA und GcvH kodieren, in Grün und Rot markiert. Es ist ersichtlich, dass mehrere Liponsäure-bindende Proteine eines Typs in einem Organismus vorkommen können. Dabei wird auch nochmal zwischen LbpA1 und LbpA2 unterschieden, wobei es auch hier z.B. in *T. sp.* K90mix mehrere Gene gibt, die einem Subtyp angehören (in diesem Fall LbpA1). Auf die Merkmale dieser Subtypen wird später noch genauer eingegangen. Alle Liponsäure-bindenden Proteine sind nur als Holoprotein (Beladung mit ihrem Kofaktor) katalytisch aktiv und werden als potentielle Substrate für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Assemblierungsenzyme in Experimente eingesetzt. In diesem Zusammenhang wurde in Abbildung 15 zusätzlich das Gen für die Lipolat:Protein-Ligase als essentielle Komponente der *de novo* Liponsäurebiosynthese blau markiert, während die Gene, die für die Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 kodieren, sowie *lipT*, das für eine FAD-abhängige Oxidoreduktase kodiert, in unterschiedlichen gelb-Tönen hinterlegt sind.

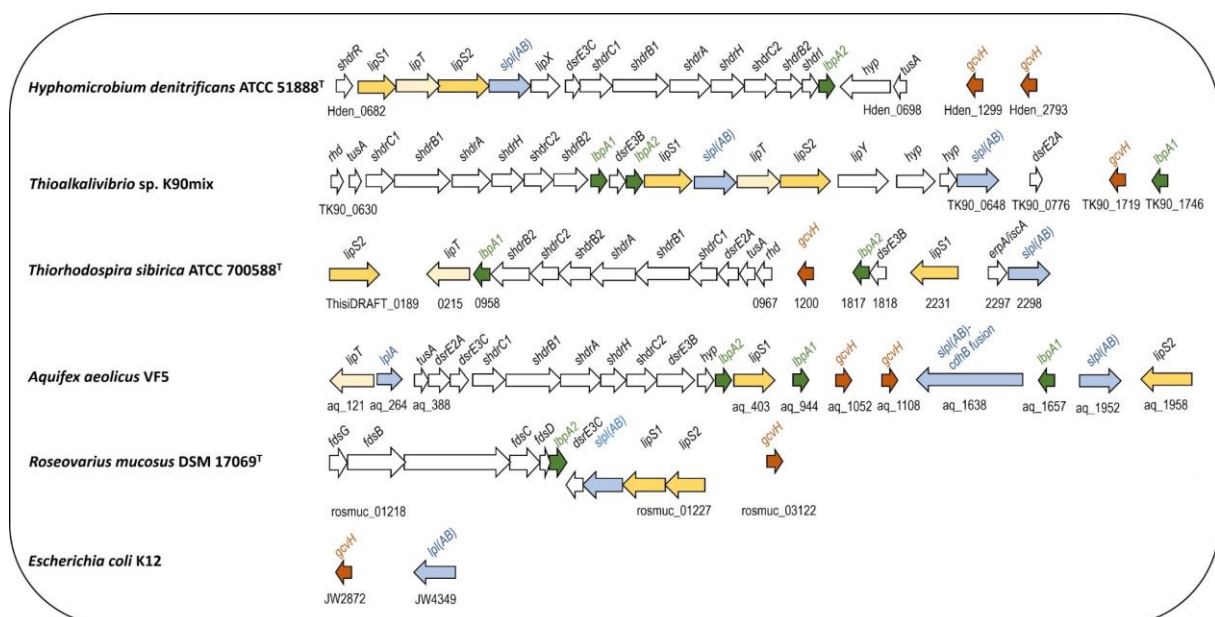


Abbildung 15: Genetische Anordnung von neuartigen Systemen für die Liponsäureassemblierung in repräsentativen Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae. Die Gene für das GcvH-Protein sind rot markiert, während die *lbpA*-Gene in Grün dargestellt sind. Gene für Lipolat:Protein-Ligasen (*s/lpl*(AB)) sind blau dargestellt. Gene für die Lipoylsynthasen (*lipS1* und *lipS2*) sowie *lipT* (kodiert für eine FAD-abhängige Oxidoreduktase) sind in unterschiedlichen gelb-Tönen markiert.

Hier ist insbesondere hervorzuheben, dass alle aufgeführten Organismen zusätzlich jeweils ein Gen besitzen, das für die Lipoylsynthase LipA kodiert. Bis auf *Aquifex aeolicus* VF5 besitzen alle das Gen *lipB*, das für eine Oktanoyltransferase kodiert. Der übersichtshalber sind diese Gene nicht mit in Abbildung 15 aufgeführt worden. Im Anhang befindet sich jedoch eine detaillierte und vollständige Auflistung aller relevanten Gene für die Liponsäureassemblierung

der ausgewählten Modellorganismen (siehe Tab. A2 im Anhang). *A. aeolicus* VF5 sticht heraus, da er nicht nur mehrere LbpA- und GcvH-Proteine in seinem Genom kodiert hat, sondern dieser extremophile Organismus besitzt zudem drei unterscheidliche Gene, die für Lipoat:Protein-Ligasen kodieren; Eine davon ähnelt LplA von *E. coli*, zwei sind den sLpl(AB) der untersuchten Schwefeloxidierer homolog. Aq_1638 stellt dazu eine Besonderheit dar, da C-terminal ein Gen fusioniert ist, dass als *chdB*-Gen annotiert ist (Acetyl-CoA-Decarboxylase/-Synthase Komplex Epsilon-Untereinheit; Teil eines Komplexes, der die reversible Spaltung von Acetyl-CoA katalysiert).

3.1.1. Liponsäure-bindende Proteine LbpA

LbpA2 aus *H. denitrificans*, als essentieller Bestandteil der dissimilatorischen Schwefeloxidation, ist strukturell nahezu identisch zum GcvH-Protein aus *E. coli*. In Abbildung 16 ist die Position des konservierten Lysinrestes mit dem kovalent gebundenen Lipoylrest in grau dargestellt. Ein direkter Unterschied der beiden Akzeptorproteine, LbpA und GcvH, ist ausschließlich am C- und N-terminalen Ende der Polypeptide zu erkennen; Die elongierten Enden des LbpA weisen jeweils einen konservierten Cystein-Rest auf, der in Gelb dargestellt wurde. Diese Aminosäuren sind in der AlphaFold Strukturvorhersage aufeinander zugerichtet und weisen auch durch den geringen Abstand von 1,77 Å auf die mögliche Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke unter physiologischen Bedingungen hin.

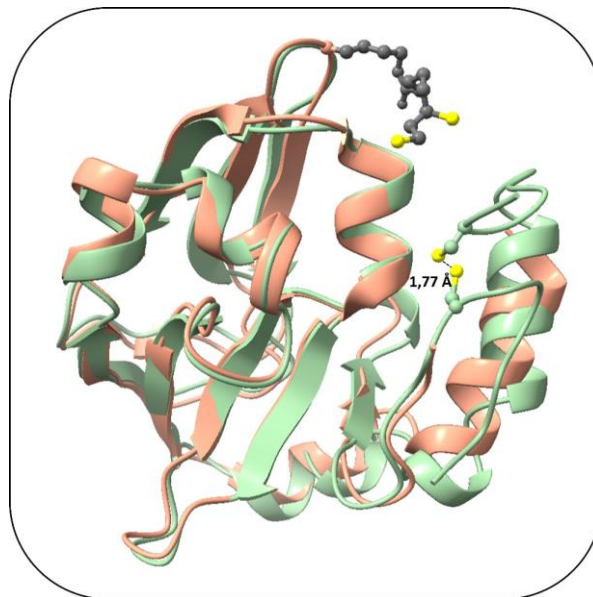


Abbildung 16: Vergleich der Strukturvorhersage von LbpA2 aus *H. denitrificans* (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) **und der Kristallstruktur von GcvH aus *E. coli*** (PDB 3AB9 (Fujiwara et al., 2010)). Beide Proteine, GcvH in orange und LbpA in grün besitzen einen konservierten Lysinrest (grau), an dem sich der kovalent gebundene Lipoylrest befindet. Die elongierten C- und N-terminalen Enden der LbpA-Polypeptide besitzen jeweils einen konservierten Cystein-Rest (gelb). Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

Neben den konservierten Cysteinen gibt es weitere signifikante Unterschiede zwischen LbpA- und GcvH-Proteinen, die in einem Multiple Sequence Alignment ersichtlich werden (siehe Abb. 17). Zunächst ist offensichtlich, dass sich die Liponsäure-bindenden Proteine basierend auf ihren Aminosäuresequenzen phylogenetisch klar in GcvH, LbpA1 und LbpA2 auftrennen (siehe Abb. 18). Detaillierter betrachtet, gibt es am C-Terminus sowie rund um das aktive Zentrum von GcvH einige konservierte, negativ geladene Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat, an dessen Position bei den LbpA-Proteinen zum Teil neutrale, jedoch hauptsächlich basische Aminosäuren wie Lysin und Arginin vorliegen. In direkter Nähe zu den konservierten Cysteinen der LbpA-Proteine befinden sich ebenfalls geladene Aminosäuren, wobei hier ersichtlich wird, dass sich die Subtypen LbpA1 und LbpA2 an genau diesen Stellen unterscheiden (in der Abbildung mit * markiert). Nur LbpA1 weist diese C- und N-terminalen konservierten, geladenen Aminosäuren auf (N-terminal sauer, C-terminal basisch). Die sauren Aminosäuren, die an derselben Position stehen wie E31 bei EcGcvH sind nur bei LbpA1-Proteinen ebenfalls negativ geladenen; Aminosäuren der LbpA2-Proteine sind an dieser Stelle ungeladen. Auch die Konservierung der zentral gelegenen, basischen Aminosäuren rund um den konservierten Lysinrest, an den der Kofaktor gebunden wird, unterscheidet sich zwischen LbpA1 und LbpA2 (mit * markiert in Abb. 17).

Auffällig ist AqGcvH_1 (aq_1052) von *A. aeolicus* VF5, da es weder im Alignment (siehe Abb. 17) noch im phylogenetischen Baum (siehe Abb. 18) einem der Substratgruppen zugeordnet werden kann. AqGcvH_1 besitzt eine Mischung aus den Eigenschaften von GcvH, LbpA1 und LbpA2 in Anbetracht der Aminosäuren, die markiert wurden, um die Besonderheiten der Gruppen hervorzuheben.

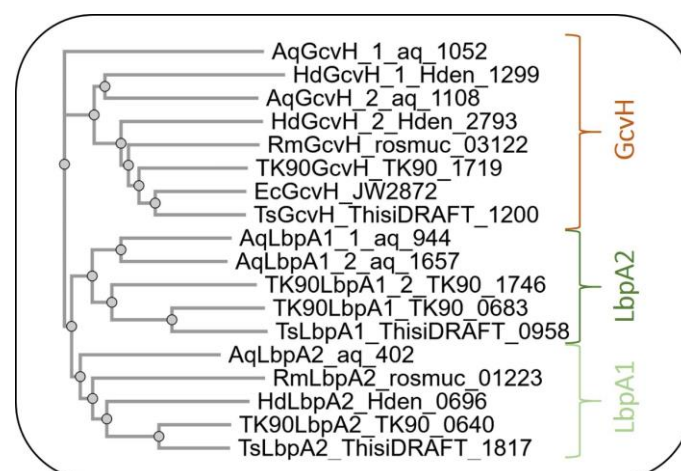


Abbildung 18: Phylogenetischer Baum von LbpA1-, LbpA2- und GcvH-Proteinen repräsentativer Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae. Aq, *A. aeolicus*; Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*; Rm, *R. mucosus*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. (ClustalΩ, EMBL-EBI).

HdGcvH_1 (Hden_1299)	-----MPSLSDEMFGHPC-----	HLWVRCSEPGEAHVGLS	IMVYLPQAGTSEADIPFGTVEFKVVS	LL	GAKAR	-----	133
AqGcvH_2 (aq_1108)	-----MEDFYEDYLKDRYYTKE-----	HWVRVK-N-GEAEVGLT	IVVYLPKCGKEVDAG	FLANLESVKNVAPVY	KEIVEEKEEEVEVKEEE	-----	160
HdGcvH_2 (Hden_2793)	-----MLKYTEE-----	HMLNVE-GD-IATIGITQ	LVFYLPKIGASLKKGAAA	VVESVKTAS	A-----	-----	120
RmGcvH (ros muc_03122)	-----MKFTEE-----	HMLRVE-DD-VVVVGTIT	LVFYLPVVGTEVSKD	EVVVIESVKAAS	A-----	-----	119
TK90GcvH (TK90_1719)	-----MSEAPKDLKYTKS-----	HWVRQE-ADGSTVIGIT	LVFYAPVAGSSVEAGS	ACATVESVKAAS	EAES-----	-----	130
EcGcvH (JW2872)	-----MSNVPAELKYSKE-----	HMLRKE-ADGTYTVGIT	MVFVLPVVGATVSAG	DCVAEVSVKAAS	EDE-----	-----	129
TsGcvH (ThisIDRAFT_1200)	-----MSDFPAELRYAPS-----	HWVRVE-DDGTVTVGTS	LVFYTPQVDSQVTAGG	ACAVVESVKAAS	DADDS-----	-----	131
AqGcvH_1 (aq_1052)	-----MWTDLRYVEPYRMLFQWVKDE--	GNGIYSVGNAS	LYSTIKVPYGTKLEVD	ALAIIEAGKRVATFP	KDFIILED-VDCSIVBE-	-----	143
RmLbpA2 (ros muc_01223)	-----MVSVKGCEPPTDRHYDGN-----	HWVYLPM-AEGRFRIGLTQ	IFAVTPKRVGRLEFAG	SAAATIESSKVVGPME	GAWMDANDFPGQ	-----	146
AqLbpA2 (aq_402)	-----MAYNGCQLPEDRLLYYINPD--	KNAFIWAKE-EDGVFTIGLTS	LVAVTPKVKYGVKAVK	KDKSVATTIESSKVVGPVP	QPIVQEKG-VKCG	-----	148
HdLbpA2 (Hden_0696)	-----MPVYKGNLPELLEDYVDN----	HIWFQEQ-PDGNVKKLGWTM	LVAFTPKRAGRQVEAG	KSCATVESGKVVGPAA	EAKMASEGFACGGW	-----	147
TK90LbpA2 (TK90_0640)	-----MGAVRGGDIPEDLMYVEN----	NVVRKE-SDGTAIVGLTS	IVSYTPKRVGKTVKKDK	KSCATTVESGKVVGPAA	EAKMEADFGGCG	-----	145
TsLbpA2 (ThisIDRAFT_1817)	-----MGTAKGCHFPEDVLYSTEN----	NVWVRQE-ADGNVTVGLTA	IVSYTPKRVGKDYKDK	KSCATVESGKVVGPAA	EAKMTEEGFKCGA	-----	147
TK90LbpA1_1 (TK90_0683)	-----N-CNGGEFFHPELFYDDEF-----	QIWLRRR-DDDDTLTVGMT	I IHVYRVRBPPTRRPPGK	PVATTIESSGKWAGPIP	CKRAKDED-IECORKLR-	-----	148
TsLbpA1 (ThisIDRAFT_0958)	-----MD-CNGGEFFHPELFYDADY----	QIWLRRR-ENGLLTVGMT	ILHVYRVRIGTRHPPGK	PVATTIESSGKWAGPIP	CARAQRDN-IHCTRTA--	-----	148
TK90LbpA1_2 (TK90_1746)	-----MSHTYNGGELPDDI.FYDLD----	YVWVRPE-DDGTFITLGIT	VQYVFRKPGSHRAAG	PVARLESKVVAGGIP	KQWIDRYD-IHCFMFCAD-	-----	150
AqLbpA1_1 (aq_944)	MGRQEKDLGTAWYQGGIIPKDLIYDIEN	-----QVWVRVN-EDGTVTVGLT	LLHTRVKPVGTVKVKKGK	PVATTIESSGKWAGPVP	KKHIDEWD-IVCMFCV--	-----	161
AqLbpA1_2 (aq_1657)	-----MAEKVEYRGGVIPKDLIYDIEN	-----QVWFKNV-EDGTVTVGVTT	I INTRIKPPGKYVKKGK	PVASLESKVVAGPVP	KEYIERED-VNCCGERAQ	-----	161

Abbildung 17: Multiple Sequence Alignment von LbpA- und GcvH-Proteinen repräsentativer Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae. Die kovalente Bindung der Liponsäure findet am konservierten Lysinrest (grau hinterlegt) statt. Die konservierten Cystein-Reste am C- und N-Terminus der LbpA-Proteine sind gelb markiert. Auffällig sind die N-terminalen sowie rund um das aktive Zentrum gelegenen geladenen Aminosäuren (saure Aminosäuren in Rot, basische Aminosäuren in Blau) von GcvH, die teilweise durch neutrale, teilweise durch komplementär geladene Aminosäuren ausgetauscht sind in LbpA-Proteinen. Unterschiede konservierter Aminosäuren von LbpA1 und LbpA2 sind mit * markiert. Aq, *A. aeolicus*; Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*; Rm, *R. mucosus*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. (ClustalΩ, EMBL-EBI).

Eine Analyse der Oberflächenladungsverteilung der Akzeptorproteine brachte die Erkenntnis, dass die oben genannten konservierten basischen Aminosäuren der LbpA-Proteine zu einem positiv geladenen Ausschnitt führen. Obwohl die Proteine bis auf N- und C-terminale Elongationen der LbpA-Proteine (sowie AqGcvH_2) in ihrer Tertiärstruktur nahezu identisch sind (siehe Abb. 19 (A)), ist eine auffällig unterschiedliche Ladungsverteilung für LbpA- und GcvH-Proteine der untersuchten Mikroorganismen offensichtlich (siehe Abb. 19 (B)).

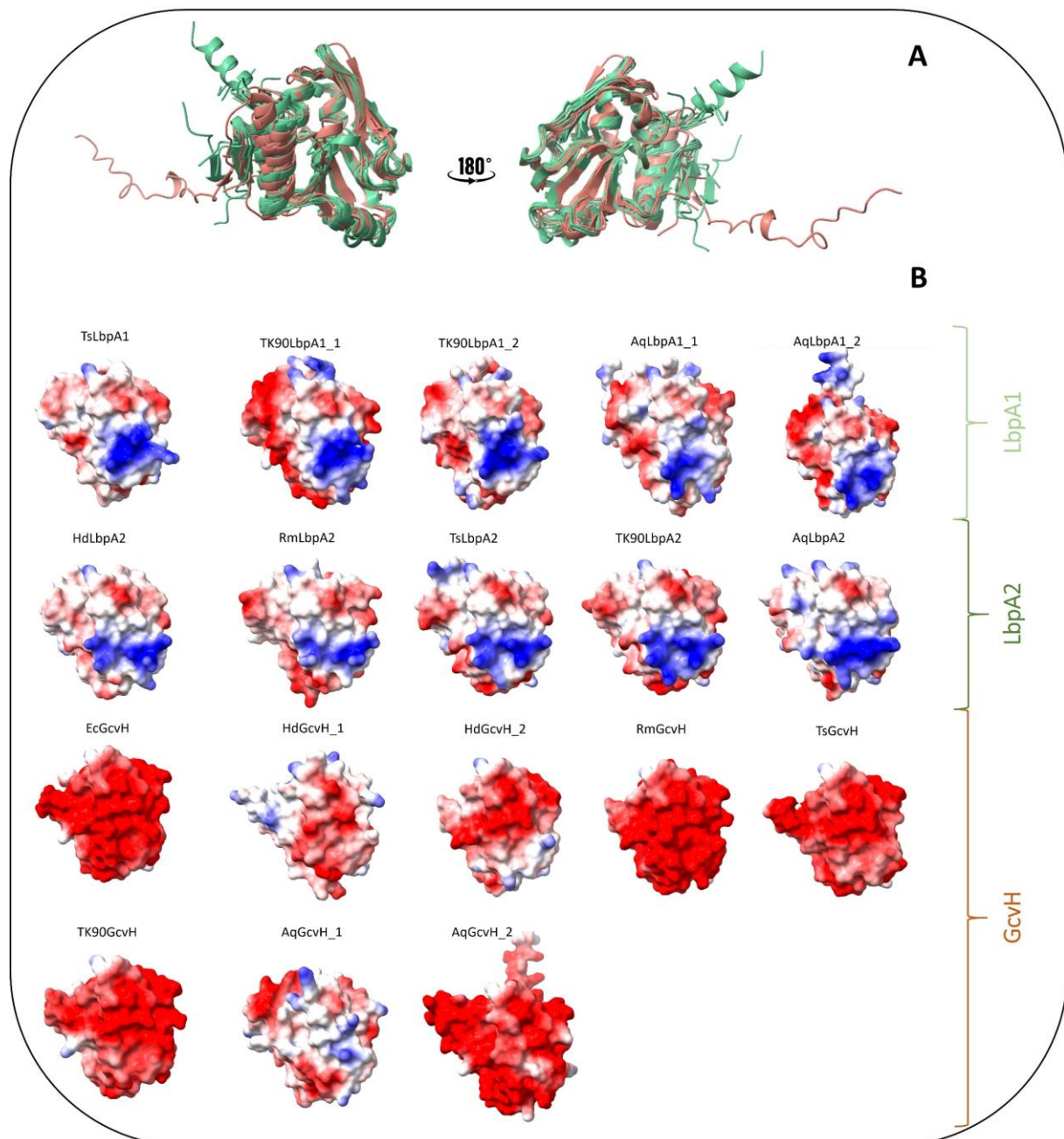


Abbildung 19: (A) Strukturvorhersagen sowie (B) Analyse der Oberflächenladungsverteilung Liponsäure-bindender Proteine ausgewählter Mikroorganismen der Phyla Pseudomonadota und Aquificae (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) im Vergleich zu GcvH aus *E. coli* (PDB 3AB9 (Fujiwara et al., 2010)). (A) Im Strukturalignment aller Proteine sind LbpA rot und GcvH grün aufgeführt. Unterschiede liegen hauptsächlich in C- und N-terminalen Elongationen der Polypeptide. (B) Positive Ladungen sind in Blau, negative in Rot dargestellt. Neutrale Bereiche sind in Weiß gehalten. Die Ausrichtung der Proteine ist identisch. Aq, *A. aeolicus*; Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*; Rm, *R. mucosus*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

Ergebnisse

Die Proteine aus *A. aeolicus* VF5 unterscheiden sich zudem noch von denen aus den anderen untersuchten Mikroorganismen durch zusätzliche Peptidfragmente, insbesondere elongierte Aminosäuresequenzen am C- und N-Terminus von GcvH und LbpA, aber auch durch Insertionen innerhalb der LbpA-Proteine, die im Rahmen einer WebLogo3-Darstellung (Crooks et al., 2004) sichtbar wurden (siehe Abb. 20).

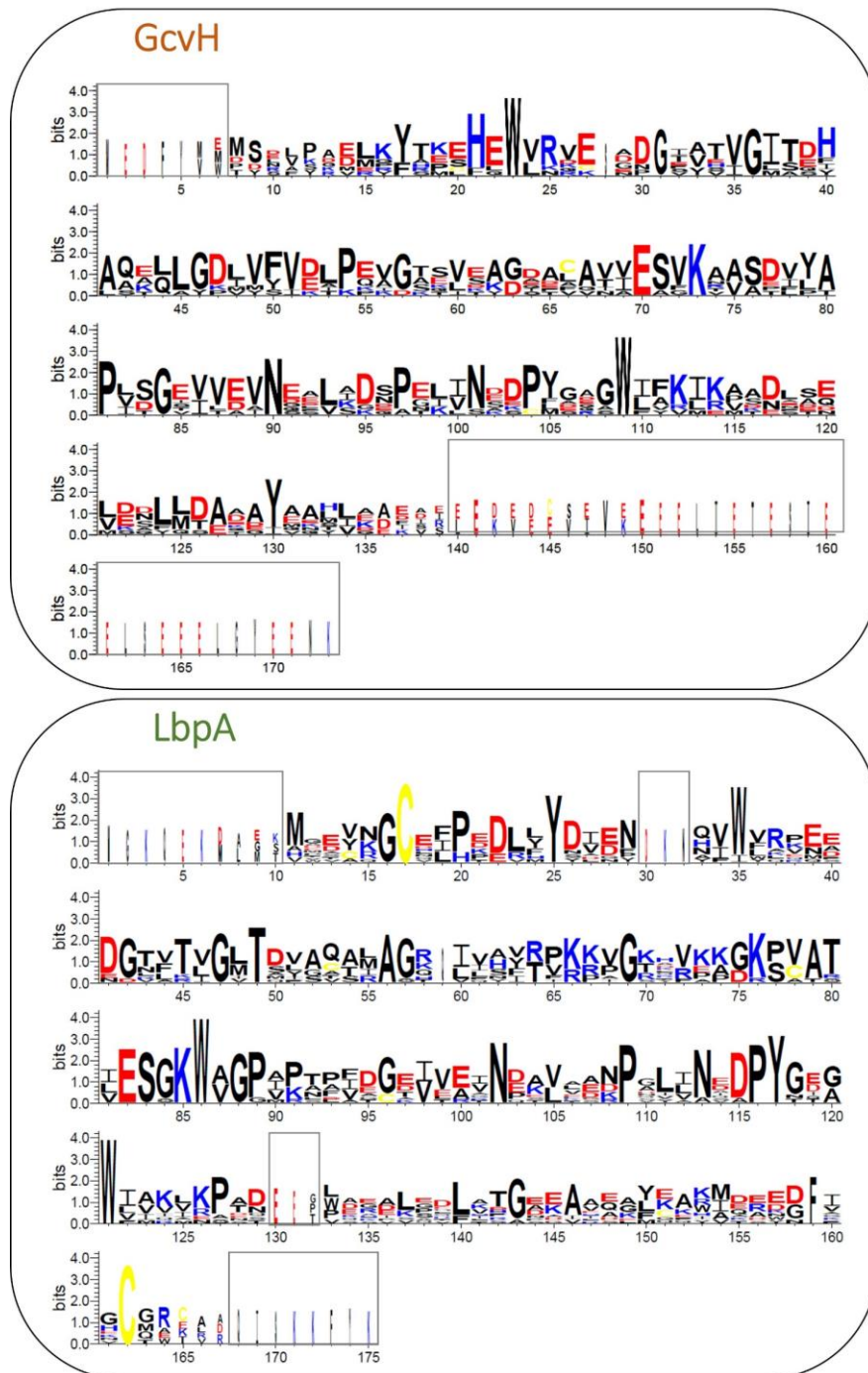


Abbildung 20: WebLogo -Darstellung (Crooks et al., 2004) **der Multiple Sequence Alignments von GcvH und LbpA repräsentativer Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae.** Neben den Unterschieden in der Aminosäuresequenz zwischen GcvH- und LbpA-Proteinen, insbesondere im Hinblick auf geladene Aminosäuren (basische in Blau, saure in Rot), sowie der konservierten Cysteine (gelb) in LbpA-Proteinen, werden Sequenzabschnitte sichtbar, die nur in den Proteinen von *A. aeolicus* VF5 vorkommen (graue Boxen).

Alle oben genannten Akzeptorproteine, sowohl LbpA als auch GcvH, aus den unterschiedlichen repräsentativen Mikroorganismen wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels His- oder Strep-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Auflistung aller Proteine mit entsprechendem Tag in Tab. A1 im Anhang). Größenausschlusschromatographie brachte die Erkenntnis, dass unter den hier vorliegenden Produktions- und Aufreinigungsbedingungen GcvH-Proteine als Dimer vorlagen. GcvH von *T. sp. K90mix* (TK90GcvH), das eine kalkulierte Masse inklusive Strep-Tag von 15,3 kDa aufweist (ProtParam), eluierte bei der verwendeten Superdex 75 Increase Gelfiltrationssäule bei rund 34 kDa (siehe Abb. 21).

LbpA-Proteine wiesen unter gleichen Bedingungen hingegen mehrere Oligomerisierungszustände auf; TK90LbpA2 eluierte beispielsweise bei rund 21 kDa, was unwesentlich mehr ist als die kalkulierte Masse des Monomer (17 kDa). Zu beobachten waren zudem Elutionspeaks, die der doppelten (Dimer) und der dreifachen Masse (Trimer) des ersten Peaks entsprachen, jedoch mit sinkender Intensität. TK90LbpA2_C7A_C145A, ein LbpA2-Protein, in dem die hochkonservierten C- und N-terminalen Cysteine in Alanine ausgetauscht wurden, wurde vergleichend in die Größenausschlusschromatographie eingesetzt, um zu schauen, ob diese Aminosäuren einen Einfluss auf den Oligomerisierungszustand der Proteine haben. Dabei fiel auf, dass die zuvor kalkulierten Massen nicht zu den beobachteten passten; Es sind zwar ebenfalls drei Peaks verzeichnet worden, jedoch liegen die verzeichneten 28 kDa genau zwischen der Masse eines Monomers (17 kDa) und eines Dimers (34 kDa). Die eluierten Oligomere, die eine weitaus geringere Intensität aufwiesen, entsprechen jedoch jeweils einem Vielfachen der verzeichneten 28 kDa. Um zu untersuchen, ob die geladenen Aminosäuren einen Einfluss auf den Oligomerisierungszustand von GcvH und LbpA haben, wurde zudem eine LbpA2-Variante von *R. mucosus* analysiert, die an Position 63 einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Alanin und an Position 76 von Prolin zu Glutamat auswies. Im Elutionsprofil dieses Proteins RmLbpA2_R63A_P76D sind ähnlich wie bei der LbpA2-Variante ohne C- und N-terminale Cysteine die Massen keinem Oligomerisierungszustand zuzuordnen. Die kalkulierte Masse des Proteins beträgt 17,2 kDa, es gibt jedoch zwei Elutionspeaks bei 26 kDa und 48 kDa. Auch wenn keine klare Aussage darüber getroffen werden kann, wie viele Polypeptide sich aneinanderlagern, ist jedoch klar ersichtlich, dass der höhere Oligomerisierungszustand dominiert. In dieser Eigenschaft unterscheidet sich das modifizierte, „saure“ Protein RmLbpA2_R63A_P76D von den natürlichen LbpA-Proteinen, die hauptsächlich als Monomer in der durchgeführten Gelfiltration eluierten.

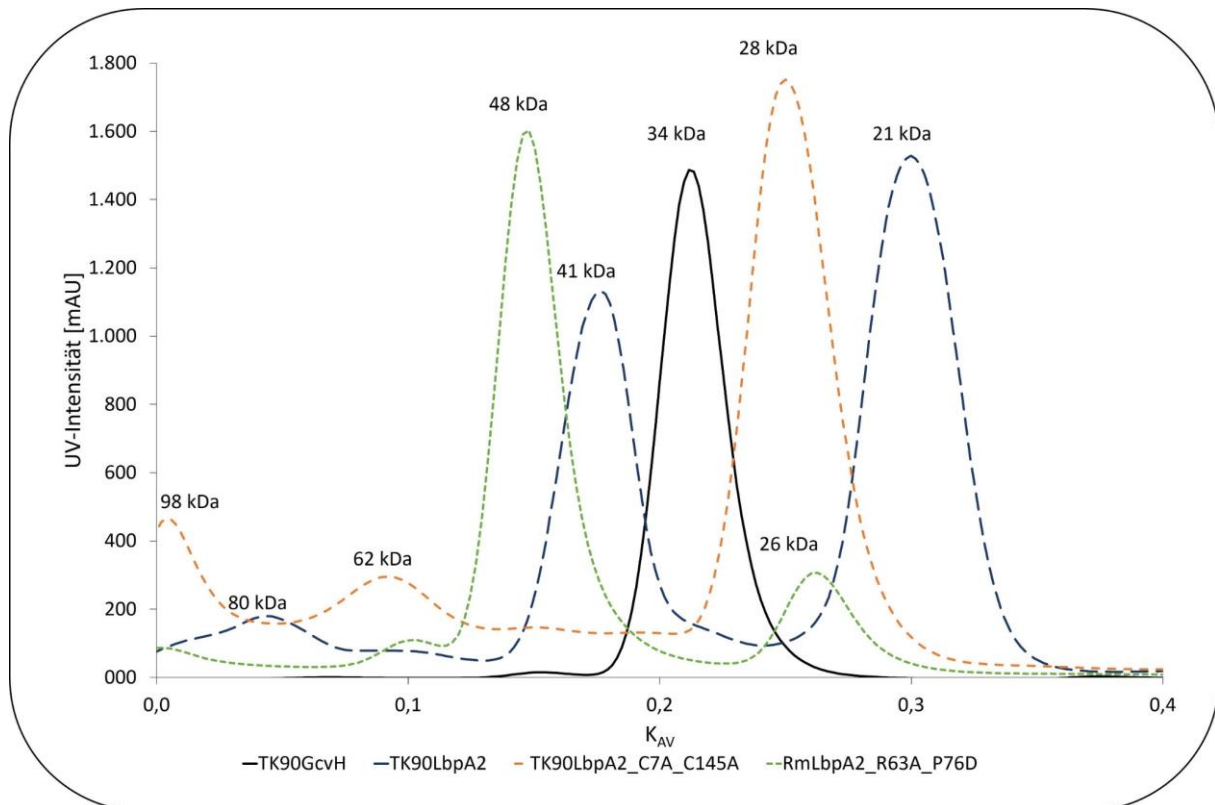


Abbildung 21: Größenausschlusschromatographie repräsentativer GcvH- und LbpA-Proteine aus *T. sp. K90mix* sowie *R. mucosus*. Die UV-Intensität [mAU] ist gegen den Verteilungskoeffizienten der Gelphase K_{AV} aufgetragen. Verwendet wurde die Superdex 75 Increase 10/300 GL Säule (Cytiva, Marlborough, USA). Die Masse der jeweiligen Peaks wurde im Diagramm vermerkt. Die kalkulierten Massen der monomeren Proteine waren wie folgt: TK90GcvH 15,3 kDa; TK90LbpA2 16,8 kDa; TK90LbpA2_C7A_C145A 16,8 kDa. TK90, *T. sp. K90mix*; RmLbpA2_R63A_P76D 17,2 kDa.

3.1.2. Lipotat:Protein-Ligasen sLpl(AB)

Die strukturelle Ähnlichkeit von GcvH und LbpA gepaart mit der Anwesenheit einer separaten Biosynthesemaschinerie führte zu der Fragestellung, ob die beteiligten Enzyme der Liponsäureassemblierung zwischen den Akzeptorproteinen LbpA und dem kanonischen GcvH unterscheiden können. Da die Lipotat:Protein-Ligase den ersten Schritt der *de novo* Biosynthese katalysiert, namentlich die ATP-abhängige Ligation eines Oktanoyl- oder Lipoyl-Restes an das Akzeptorprotein, wurden neben den Akzeptorproteinen auch sämtliche Lipotat:Protein-Ligasen aus den oben genannten ausgewählten Modellorganismen (blau markierte Proteine aus Abb. 15) zunächst bioinformatisch analysiert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Multiple Sequence Alignment der kanonischen Lipotat:Protein-Ligasen Lpl(AB) und der neuartigen sLpl(AB)-Enzyme angefertigt (siehe Abb. 22). 2010 wurde eine Kristallstruktur des Lpl(AB)-GcvH-Komplexes von *E. coli* aufgeklärt (Fujiwara et al., 2010). Geladene Aminosäuren, die an der Interaktion der beiden Polypeptide beteiligt sind, sind mit „+“ unter dem Alignment gekennzeichnet. Davon ausgehend stellte sich

die Frage, ob diese Aminosäuren in den anderen repräsentativen Lipoat:Protein-Ligasen konserviert sind. Dem Sequenzvergleich ist jedoch zu entnehmen, dass genau an den Positionen, an denen für EcLpl(AB) bekannt ist, dass dort die Interaktion mit GcvH stattfindet (R₄₇, R₁₄₀, K₁₄₃, K₁₇₅, K₂₇₂), größtenteils Aminosäuren ohne oder sogar mit komplementärer, negativer Ladung (rot hinterlegt) vorliegen (siehe Abb. 22 (+)). Eine Ausnahme stellt Position 175 in Bezug auf EcLpl(AB) dar; Alle Lipoat:Protein-Ligasen bis auf TK90sLpl(AB)_2 und RmsLpl(AB) besitzen an dieser Stelle eine positiv geladene Aminosäure (blau hinterlegt). Es gibt mehrere Positionen, an denen einzelne Lipoat:Protein-Ligasen mit ihren Aminosäureresten herausstechen. Im Alignment sind diese Positionen wie folgt dargestellt: „*“ kennzeichnet Besonderheiten von TK90sLpl(AB)_2, „:“ Besonderheiten von RmsLpl(AB), „~“ Besonderheiten von TssLpl(AB) und „#“ Besonderheiten von HdsLpl(AB). Grundsätzliche Unterschiede zwischen Lpl(AB) und sLpl(AB) sind mit einem „.“ gekennzeichnet. Insbesondere TK90sLpl(AB)_2 und RmsLpl(AB) besitzen an vielen, jedoch nicht identischen Positionen, an denen in anderen Enzymen geladene Aminosäuren vorkommen (farblich hinterlegt), ungeladene Reste. In diesem Zusammenhang sei zu erwähnen, dass Lpl(AB)-Proteine grundsätzlich verhältnismäßig mehr basische Aminosäuren besitzen, sLpl(AB) an gleicher Stelle saure Aminosäuren. An einigen Stellen fallen konservierte Glycin- oder Prolinreste bei sLpl(AB)-Enzymen ins Auge (grau hinterlegt). Neben den geladenen Aminosäuren, die einen Einfluss auf die Oberflächenladung der Enzyme haben, fallen konservierte Cysteinreste (gelb markiert) ins Auge, die eine klare Abgrenzung zwischen Lpl(AB) und sLpl(AB) aufweisen. In Anbetracht aller markierter Aminosäuren fällt zudem auf, dass es innerhalb der Lipoat:Protein-Ligasen, die mit LbpA assoziiert sind, eine weitere Unterteilung zu geben scheint. TK90sLpl(AB)_2 (TK90_0648) sowie AqsLpl(AB)_3 (Aq_1952) sind nicht immer eindeutig zuzuordnen oder weisen wie beispielsweise an Position 155 (auf EcLpl(AB) bezogen) eine Aminosäure mit komplementärer Ladung im Vergleich zu den anderen sLpl(AB)-Enzymen auf.

Im Rahmen der Erstellung eines phylogenetischen Baums aller Lipoat:Protein-Ligasen bestätigt sich diese Beobachtung (siehe Abb. 23). Neben den kanonischen Lpl(AB) gibt es zwei voneinander getrennte Zweige; ein Zweig mit TK90sLpl(AB)_2 sowie AqsLpl(AB)_3 und ein Zweig mit den anderen sLpl(AB)-Enzymen.

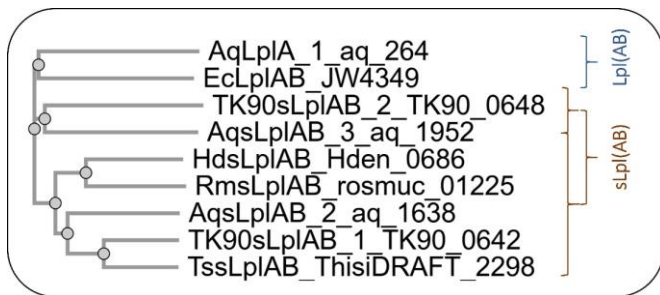
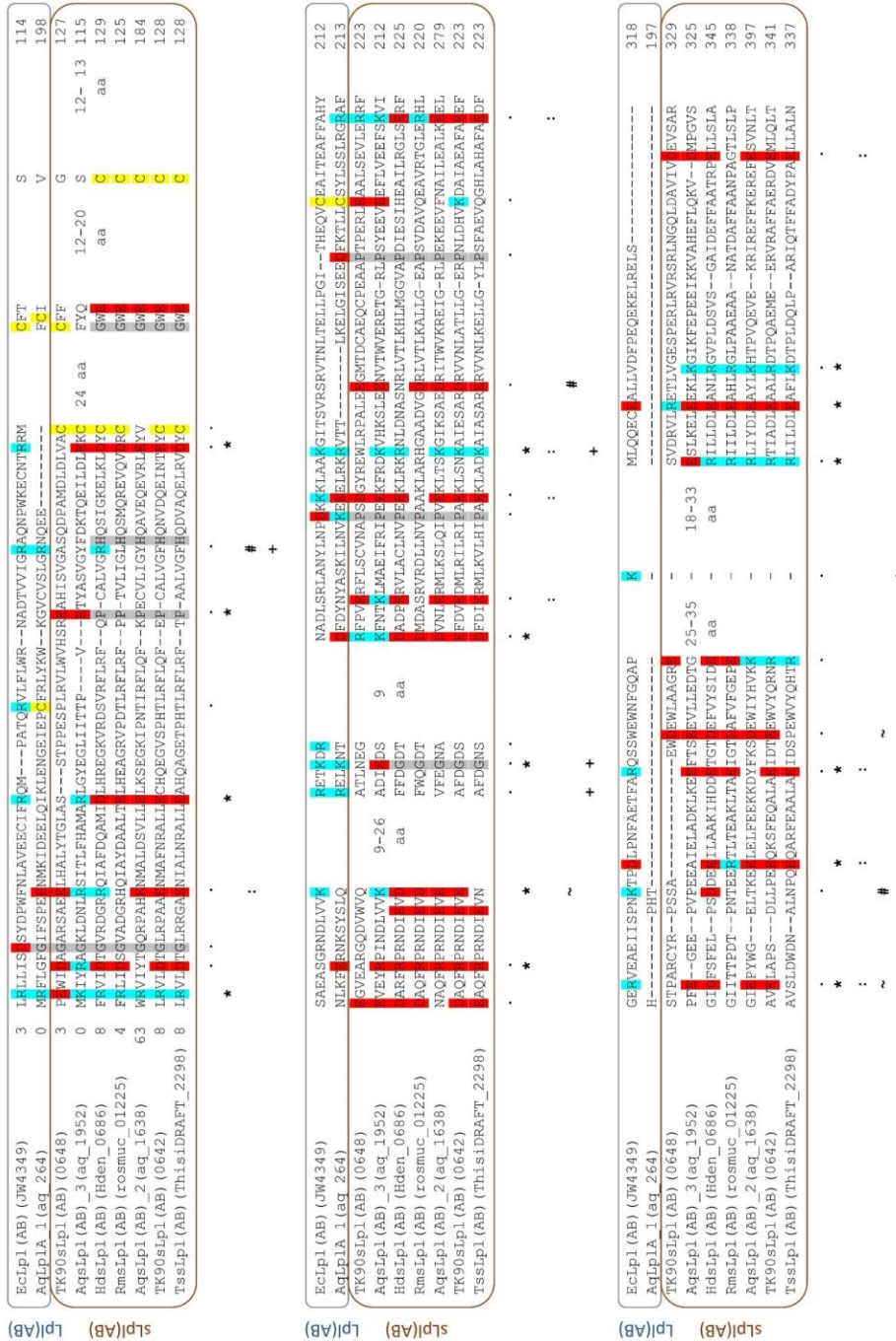


Abbildung 23: Phylogenetischer Baum der Lipoat:Protein-Ligasen Lpl(AB) und sLpl(AB) repräsentativer Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae. Aq, *A. aeolicus*, Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*; Rm, *R. mucosus*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. (ClustalΩ, EMBL-EBI).

Abbildung 22: Multiple Sequence Alignment der Lipoat:Protein-Ligasen repräsentativer Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae. Farblich hervorgehoben sind die Unterschiede zwischen der kanonischen Lipoat:Protein-Ligase Lpl(AB) sowie den neuartigen Lipoat:Protein-Ligasen sLpl(AB), die mit dem Liponsäure-bindenden Protein LbpA assoziiert sind. Geladene Aminosäuren sind rot (sauer) bzw. blau (basisch) markiert. Cyseteinreste sind gelb hinterlegt, auffällige neutrale Aminosäuren in Grau. Legende: *, Unterschiede zwischen Lpl(AB) und sLpl(AB); #, Besonderheit von TK90sLpl(AB) 2; ;, Besonderheit von RmsLpl(AB); ~, Besonderheit von TssLpl(AB); #, Besonderheit von HdsLpl(AB); +, Aminosäuren, die basierend auf der Kristallstruktur des EcLpl(AB)-EcGcvH-Komplexes als miteinander interagierende Aminosäuren identifiziert wurden (Fujiiwara et al., 2010). Aq, *A. aeolicus*, Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*; Rm, *R. mucosus*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. (ClustalΩ, EMBL-EBI).

Der Vergleich der Strukturvorhersagen aller Enzyme mit AlphaFold mit der bekannten Kristallstruktur von Lpl(AB) aus *E. coli* führte zu zwei Erkenntnissen. Zum einen sind die N-terminalen Domänen der Polypeptide nahezu identisch. Der grundsätzliche Aufbau der Tertiärstruktur der carboxyterminalen Domäne ist ebenfalls gleich, jedoch befindet sich diese Domäne im Rahmen der Vorhersage teilweise in einer nicht für EcLpl(AB) (in Grau dargestellt) typischen Orientierung (siehe Abb. 24 (A)); Dies gilt für die beiden Lipoat:Protein-Ligasen aus *T. sp. K90mix*, die in der Abbildung in Blau-Tönen dargestellt sind. Diese Domänen sind um ca. 90°C im Vergleich zu EcLplB gedreht, sodass im Rahmen der folgenden Analyse der Oberflächenladungsverteilung der Lipoat:Protein-Ligasen die Lipoat:Protein-Ligase aus *E. coli* in zwei unterschiedlichen Winkeln angezeigt wurde, um die Ladungsverteilungen der Enzyme gut miteinander vergleichen zu können (siehe Abb. 24 (B)). Diese Analyse brachte die Erkenntnis, dass die oben genannten basischen bzw. sauren Aminosäuren zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten geladenen Ausschnitt rund um das aktive Zentrum führen. Die schwarz umkreisten Ausschnitte der Enzyme weisen auf die Kontaktfläche hin, an die das Akzeptorprotein des Lipoylrests (LbpA oder GcvH) anlagert. Das Muster der vermehrt negativen Ladung bei sLpl(AB)-Enzymen ist dabei nicht so eindeutig ausgeprägt wie der positive Ausschnitt auf der Oberfläche von LbpA-Proteinen.

Auch für die Lipoat:Protein-Ligasen wurde eine WebLogo3-Darstellung gewählt, um Sequenzbereiche darzustellen, die einzelnen Enzymen fehlen oder andere Bereiche, die vergleichend betrachtet elongiert sind (siehe Abb. 25). Unterschiede zwischen Lpl(AB) und sLpl(AB) sind dabei in Grün- und Brauntönen eingekastet und belaufen sich N-terminal bis zentral der Polypeptidkette eher auf kleinere Insertionen oder Deletionen (zwei bis sechs Aminosäuren). C-terminal sind zwei große Sequenzabschnitte sichtbar, die ausschließlich bei sLpl(AB)-Enzymen vorhanden sind. Besonderheiten von Aq-Enzymen sind hingegen in Grautönen markiert und finden sich über die gesamte Sequenz verteilt. Dabei fällt auf, dass es sich hierbei meist um Elongationen oder fehlende Sequenzabschnitte in größerem Umfang handelt. Elongationen oder fehlende Sequenzabschnitte von TK90sLpl(AB)_2 im Vergleich zu den anderen Lipoat:Protein-Ligasen sind in Blau-Tönen markiert; Es gibt kleinere Unterschiede im N-Terminus des Polypeptids und größere abweichende Sequenzabschnitte zentral bis C-terminal gelegen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar alle Lipoat:Protein-Ligasen das bekannte RRxxGGG-Liponsäure-Bindemotiv besitzen, dass jedoch ansonsten eine große Variabilität insbesondere hinsichtlich der C-terminalen Domäne der Enzyme herrscht.

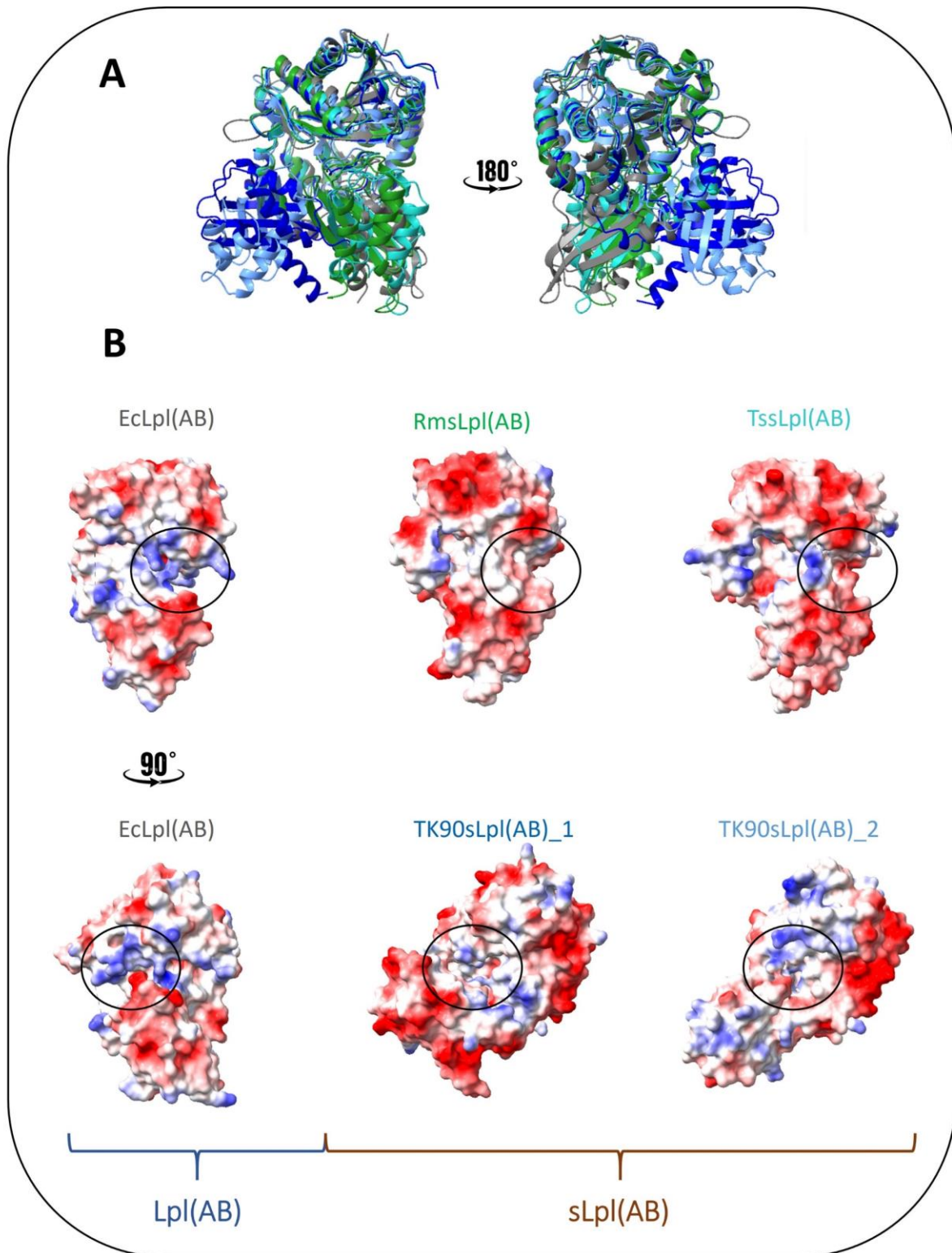


Abbildung 24: (A) Strukturvorhersagen sowie (B) Analyse der Oberflächenladungsverteilung von Lipoat:Protein-Ligasen ausgewählter Modellorganismen (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) im Vergleich zu Lpl(AB) aus *E. coli* (PDB 3A7R (Fujiwara et al., 2010)). (A) Im Strukturalignment aller Enzyme ist EcLpl(AB) grau, die beiden TK90sLpl(AB)-Varianten in Blautönen, RmsLpl(AB) grün sowie TssLpl(AB) cyan aufgeführt. Unterschiede liegen hauptsächlich in der Orientierung der carboxyterminalen Domäne der Polypeptide. (B) Positive Ladungen sind in Blau, negative in Rot dargestellt. Neutrale Bereiche sind in Weiß gehalten. Der Ausschnitt des aktiven Zentrums, an das Liponsäure-bindende Protein anlagert, ist jeweils eingekreist. Die Ausrichtung der Proteine ist identisch. Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*; Rm, *R. mucosus*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

Ergebnisse

Mit der Aufklärung der Struktur von LbpA, sLpl(AB) sowie dem ternären Komplex aus sLpl(AB), lipoyl-AMP und LbpA wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit begonnen, um Informationen über die Konformation der einzelnen Proteine, aber auch über einzelne Aminosäuren zu erhalten, die bei der Interaktion des Komplexes beteiligt sind. Da sowohl bei den Lipoat:Protein-Ligasen als auch bei deren Substraten wesentliche Unterschiede herausgestellt wurden, ist nicht auszuschließen, dass es sich auch im einen abgewandelten Reaktionsmechanismus handelt als bei EcLpl(AB) mit GcvH. Zur Vorbereitung einer Co-Kristallisation wurden TK90sLpl(AB)_1 und TK90LbpA2_K71A heterolog produziert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Lysin-defiziente Variante von TK90LbpA2 wurde benutzt, da die Komplexbildung so voraussichtlich stabiler ist als beim natürlichen Akzeptorprotein, da der zu übertragende Lipoylrest nicht übertragen werden kann. Die Komplexbildung wurde herbeigeführt, indem beide Proteine in einem molaren Verhältnis von 1:1 in Gegenwart von Liponsäure, ATP, MgCl₂ und DTT für 30 Minuten miteinander inkubiert wurden bevor ein Aufreinigungsschritt, ebenfalls unter reduzierenden Bedingungen, über die Gelfiltrationssäule Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, USA) folgte. Das Elutionsprofil des ternären Komplexes im Vergleich zu dem Profil der unbehandelten sLpl(AB) ist in Abbildung 26 dargestellt. Es ist ein deutlicher Versatz in Bezug auf den Verteilungskoeffizienten der Gelphase K_{AV} sichtbar. Die kalkulierten Massen von 42 kDa für TK90sLpl(AB)_1 sowie 58,8 kDa für den ternären Komplex stimmen nicht mit den beobachteten Massen von je 44 kDa und 53 kDa überein, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Konformationsänderung bei der Komplexbildung die Proteine schneller eluieren als erwartet. Es sind zudem kleinere Peaks zu sehen, die jeweils ungefähr der doppelten Masse des Monomers entsprechen (85 kDa bzw. 90 kDa).

Vergleichend wurden Größenausschlusschromatographien weiterer Lipoat:Protein-Ligasen durchgeführt, um eine Aussage über den Oligomerisierungszustand unter gegebenen Untersuchungsbedingungen treffen zu können. Neben TK90sLpl(AB)_1 eluiert auch HdsLpl(AB) in der Gelfiltrationssäule Superdex 75 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, USA) dominierend als Monomer bei rund 44 kDa (kalkulierte Masse 41 kDa) und es ist nur ein kleinerer Peak bei ca. der doppelten Masse (98 kDa) zu sehen (siehe Abb. 27 (A)). Interessanterweise eluiert TK90sLpl(AB)_1 aus dem gleichen Aufreinigungsansatz in der Superose 6 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, USA) ausschließlich als Dimer etwas langsamer als erwartet bei rund 73 kDa (siehe Abbildung 27 (B)). Ein kleiner Peak, der der doppelten Masse, d.h. einem Tetramer entsprechen könnte, ist ebenfalls zu sehen.

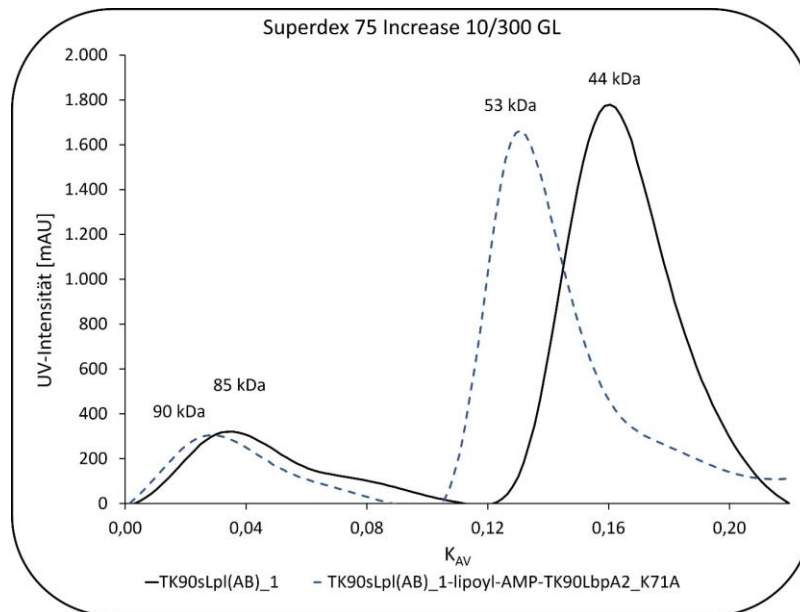


Abbildung 26: Größenausschlusschromatographie der sLpl(AB)₁ aus *T. sp. K90mix* sowie des ternären Komplexes TK90sLpl(AB)₁-lipoyl-AMP-TK90LbpA2_K71A zur Vorbereitung der Co-Kristallisation. Die Intensität [mAU] ist gegen den Verteilungskoeffizienten der Gelphase K_{AV} aufgetragen. Verwendet wurde die Superdex 75 Increase 10/300 GL Säule (Cytiva, Marlborough, USA). Die Masse der jeweiligen Peaks wurde im Diagramm vermerkt. Die kalkulierten Massen der monomeren Proteine waren wie folgt: TK90sLpl(AB)₁ 42 kDa; TK90sLpl(AB)₁-lipoyl-AMP-TK90LbpA2_K71A 58,8 kDa. TK90, *T. sp. K90mix*.

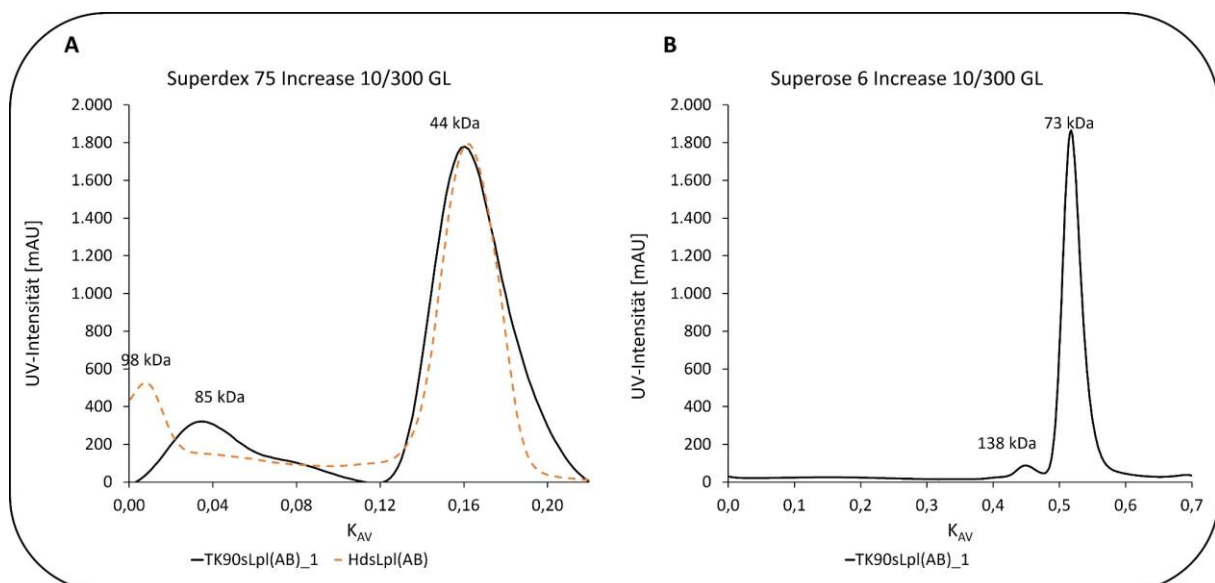


Abbildung 27: Vergleichende Größenausschlusschromatographie mit unterschiedlichen Gelfiltrationssäulen von TK90sLpl(AB)₁ sowie HdsLpl(AB). Die Intensität [mAU] ist gegen den Verteilungskoeffizienten der Gelphase K_{AV} aufgetragen. Verwendet wurden die (A) Superdex 75 Increase 10/300 GL sowie die (B) Superose 6 Increase 10/300 GL Säule (Cytiva, Marlborough, USA). Die Masse der jeweiligen Peaks wurde im Diagramm vermerkt. Die kalkulierten Massen der monomeren Proteine waren wie folgt: TK90sLpl(AB)₁ 42 kDa; HdsLpl(AB) 41 kDa. Hd, *H. denitrificans*; TK90, *T. sp. K90mix*.

Für folgende *in vitro* Untersuchungen zur Substratspezifität der Lipolat:Protein-Ligasen aus den oben genannten repräsentativen Organismen (blau markierte Proteine aus Abb. 15), wurden diese heterolog in *E. coli* exprimiert (bis auf die Lipolat:Protein-Ligasen aus *A. aeolicus* VF5),

mittels His- oder Strep-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Auflistung aller Proteine mit entsprechendem Tag in Tab. A1 im Anhang) und in allen denkbaren Kombinationen in Native PAGE Mobility Gel Shift Assays eingesetzt. TKsLpl(AB)_2 (TK90_0648) lies sich bisher nicht erfolgreich produzieren und wurde in folgenden Versuchen außer Acht gelassen. Aufgrund der kovalenten Amidbindung des Cofaktors an einen hoch konservierten Lysinrest der Liponsäure-bindenden Proteine geht im Rahmen der Oktanoylierung oder Lipoylierung die positive Ladung an diesem Aminosäurerest verloren. Das Holoprotein läuft folglich tiefer in eine Native PAGE ein als das Apoprotein, da sich der isoelektrische Punkt (pI) reduziert. Jenachdem, welche Akzeptorproteine betrachtet wurden, musste die Prozentigkeit der nativen Gele auf den pI angepasst werden (Auflistung in Tab. A1 im Anhang). GcvH Proteine haben grundsätzlich einen niedrigeren pI bei rund 4 und wurden über 20 % Gele aufgetrennt, LbpA-Proteine besitzen einen pI von 5 bis 6 durch den höheren Anteil positiv geladener Aminosäuren innerhalb der Polypeptidsequenzen und wurden in 15 % Gelen betrachtet. Die Liponsäure-bindenden Proteine wurden jeweils mit einer Konzentration von 10 μM eingesetzt und die entsprechende Lipoat:Protein-Ligase mit einer Konzentration von 0,5 bis 1 μM . Für die erfolgreiche Modifikation der Substrate mit einem Oktanoyl- oder Lipoylrest *in vitro* waren reduzierende Bedingungen sowie das Vorhandensein von MgCl_2 und ATP unabdingbar. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden die Proben im Vergleich zu den Proteinen, die keine Oktansäure oder Liponsäure im Ansatz hatten, über eine Native PAGE aufgetrennt und miteinander verglichen. In Abbildung 28 ist eine Übersicht der untersuchten Enzym-Akzeptorprotein-Kombinationen aufgeführt. In Anbetracht von Lpl(AB) aus *E. coli* K12 (EcLpl(AB)) z.B. ist ersichtlich, dass diese Lipoat:Protein-Ligase ausschließlich GcvH Proteine als Substrat erkannte (grüne Kreise), LbpA-Proteine wurden hingegen nicht modifiziert (rote Kreise). Innerhalb der farbigen Kreise, die den Erfolg oder Misserfolg der Substraterkennung wiedergeben, sind Ausschnitte der Native PAGEs aufgeführt, in der die Proteinbande des jeweiligen Akzeptorproteins zu sehen sind. Erfolgreiche Lipoylierungen sind wie oben bereits beschrieben durch einen Versatz dieser Bande nach unten zu erkennen. EcLpl(AB) katalysierte spezieübergreifend GcvH der ausgewählten Bakterien des Phylums Pseudomonadota. Eine Modifikation der GcvH Proteine aus *A. aeolicus* VF5 konnte hingegen nicht verzeichnet werden. Diese wurden von keinem der heterolog produzierten und aufgereinigten Lipoat:Protein-Ligasen als Substrat erkannt. Neben seinem eigenem LbpA2-Protein erkannte die RmsLpl(AB) nur die LbpA1- und LbpA2-Proteine von *T. sibirica* sowie LbpA1_2 (Aq_1657) von *A. aeolicus* VF5. GcvH Proteine blieben gänzlich unerkannt.

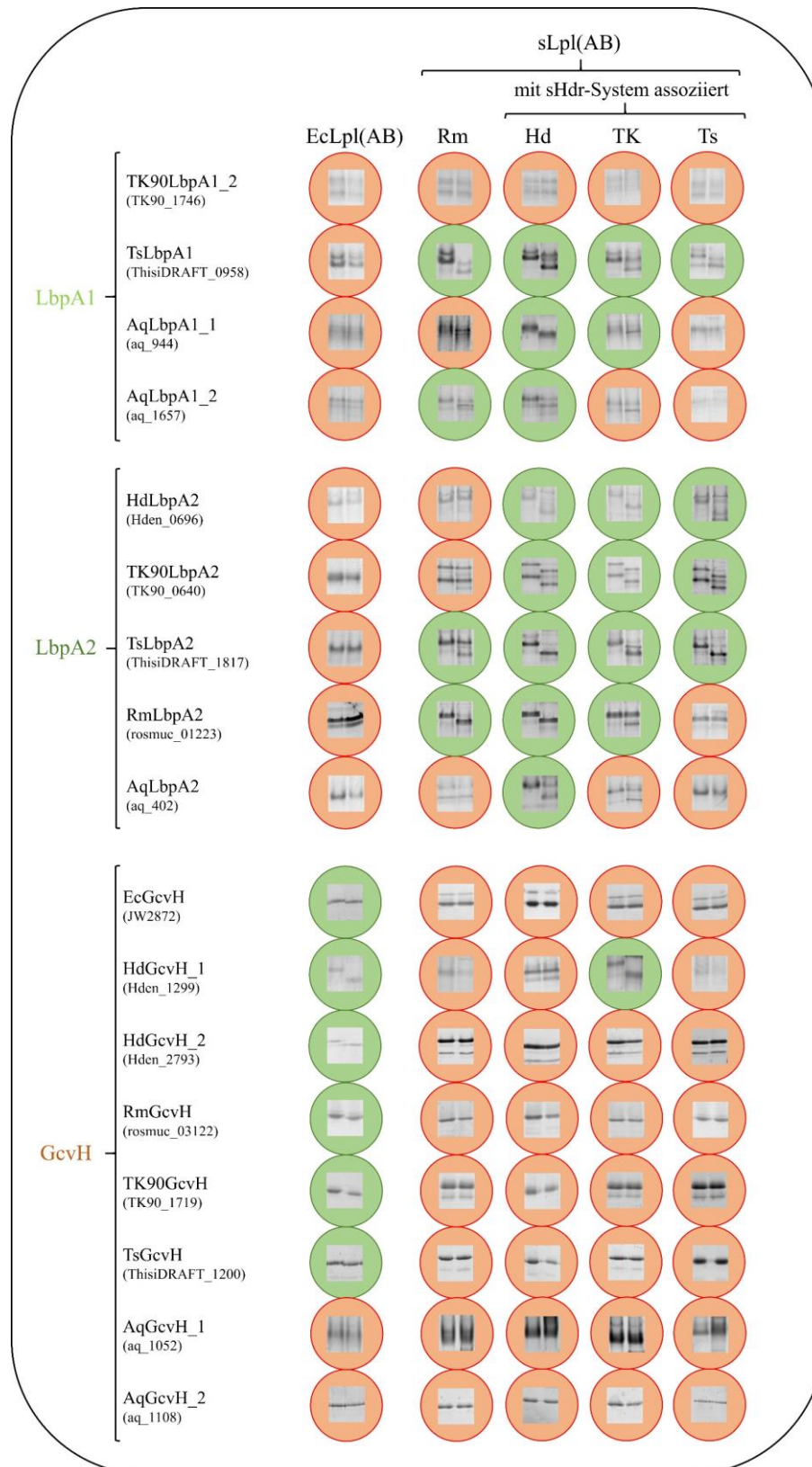


Abbildung 28: Übersicht der Substraterkennung der LipAat:Protein-Ligasen ausgewählter Modellorganismen. Mit Hilfe eines Native PAGE Mobility Gel Shift Assays wurde die Substratspezifität von LipAat:Protein-Ligasen ((s)Lpl(AB)) hinsichtlich unterschiedlicher LbpA1-, LbpA2- und GcvH-Proteine getestet. Eingesetzt wurden jeweils 10 μ M Akzeptorprotein und 0,5 - 1 μ M (s)Lpl(AB). Eine erfolgreiche Modifikation ist durch einen Versatz der Proteinbande im nativen Gel zu erkennen und ist mit einem grünen Kreis hinterlegt. Wurde das Akzeptorprotein nicht erkannt, ist das Gelbild rot umkreist. Aq, *A. aeolicus*; Ec, *E. coli* K12; GcvH, Glycinspaltendes System Protein H; Hd, *H. denitrificans*; LbpA, Liponsäure-bindendes Protein; Rm, *R. mucosus*, TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*.

Ergebnisse

Die Lipoat:Protein-Ligase aus *H. denitrificans* (HdsLpl(AB)) zeigte eine breite Spezies-übergreifende Substratspezifität, da sie alle untersuchten LbpA-Proteine bis auf TK90LbpA1_2 (TK90_1746) modifizieren konnte. Dieses Protein wurde jedoch von keiner der eingesetzten Lipoat:Protein-Ligasen als Akzeptorprotein des Lipoylrests erkannt. Bei näherer Betrachtung der Native PAGEs fällt auch auf, dass die Proteinbanden von TK90LbpA1_2 nicht sehr definiert sind. Dieses Phänomen tritt auch bei anderen Liponsäure-bindenden Proteinen teilweise auf und ist unterschiedlich ausgeprägt. Besonders hervorzuheben ist sLpl(AB) von *T. sp.* K90mix, die als einzige Lipoat:Protein-Ligase des neuen Liponsäureassemblierungswegs an LbpA auch ein GcvH-Protein (HdGcvH_1) im Rahmen dieses Experiments modifizieren konnte. Diese Spezies-übergreifende Substratspezifität zeigte sich auch hinsichtlich der LbpA-Proteine, wobei nur AqLbpA1_2 (Aq_1657) und AqLbpA2 (Aq_402) neben TK90LbpA1_2, wie zuvor erwähnt, unmodifiziert blieben. TssLpl(AB) aus *T. sibirica* zeigte im Vergleich zu den anderen untersuchten Lipoat:Protein-Ligasen die eingeschränkste Substraterkennung; Alle Proteine von *A. aeolicus* VF5 sowie von *R. mucosus* wiesen im Rahmen des Native PAGE Mobility Gel Shift Assays keine Bandenverschiebung auf.

TK90LbpA1_1 (TK90_0638) ließ sich als einziges Akzeptorprotein gar nicht in einer Native PAGE darstellen. Hier wurde auf MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) zurückgegriffen, um eine Aussage über eine mögliche Modifikation des Akzeptorproteins treffen zu können (siehe Abb. 29). Das Apoprotein mit einer Masse von 18.276 Da ist in allen Ansätzen zu finden, auch bei denen die für 45 Minuten mit einer der ausgewählten Lipoat:Protein-Ligasen inkubiert wurde. Im Vergleich zu der unbehandelten Probe ist jedoch mit bei allen anderen Proben ein zusätzlicher Peak bei rund 18.464 Da entstanden. Diese Masse entspricht der erwarteten Masse des Holoproteins, an dem ein Lipoylrest kovalent gebunden vorliegt (zusätzliche 188 Da). Diese Modifikation konnte sowohl für TK90LbpA1_1 verzeichnet werden, das mit den einzelnen sLpl(AB)-Enzymen inkubiert wurde als auch für das Akzeptorprotein, das mit EcLpl(AB) in einem Ansatz war.

Eine Zusammenfassung der prozentualen Verteilung der Substraterkennung der einzelnen Lipoat:Protein-Ligasen hinsichtlich LbpA1, LbpA2 und GcvH ist in Abbildung 30 graphisch dargestellt. Während EcLpl(AB) 75% aller untersuchten GcvH-Proteine der repräsentativen Mikroorganismen als Substrat erkannte, wurde nur eines der eingesetzten LbpA-Proteine (TKLbpA1_1) von dieser Lipoat:Protein-Ligase modifiziert, was 25% aller LbpA1-Proteine entspricht. Alle sLpl(AB)-Enzyme zusammengefasst erkannten hingegen nur 3% der GcvH Proteine. Diese 3% sind auf die Besonderheit der TK90sLpl(AB) zurückzuführen, die

HdGcvH_2 lipoylieren konnte (siehe oben). Im Hinblick auf die LbpA-Proteine hingegen wurde eine hohe Spezies-übergreifende Substratspezifität der sLpl(AB)-Enzyme verzeichnet; rund 75% aller LbpA1-Proteine sowie 58% aller LbpA2-Proteine wurden lipoyliert.

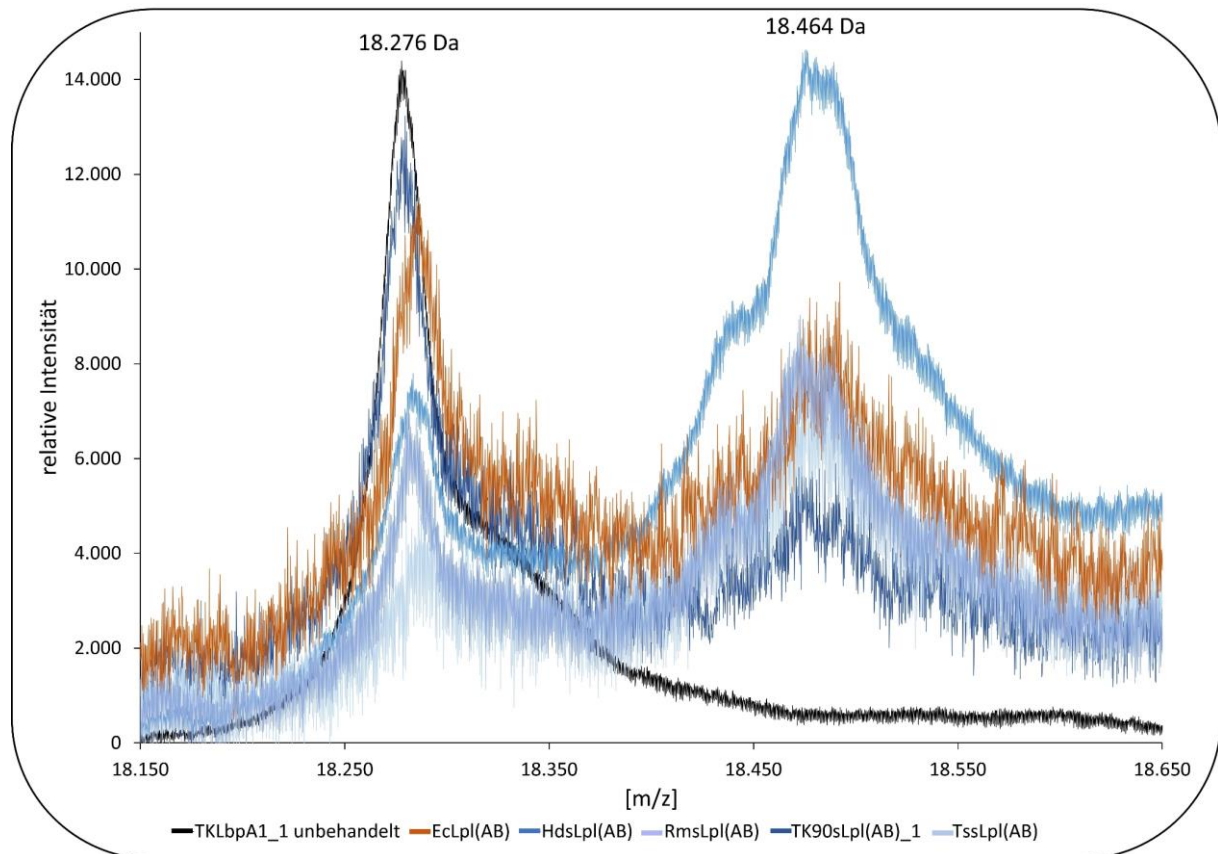


Abbildung 29: MALDI-TOF Massenspektren von LbpA1_1 aus *T. sp. K90mix*, das in die *in vitro* Ligation mit verschiedenen Lipoat:Protein-Ligasen aus ausgewählten Mikroorganismen eingesetzt wurde. In die Reaktion wurden jeweils 10 μM Akzeptorprotein und 0,5 - 1 μM (s)Lpl(AB) eingesetzt. Die erwartete Masse für das Apoprotein TK90LbpA1_1 beträgt 18.276 Da, für die lipoylierte Form 18.464 Da. Ec, *E. coli* K12; Hd, *H. denitrificans*; Rm, *R. mucosus*, TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*.

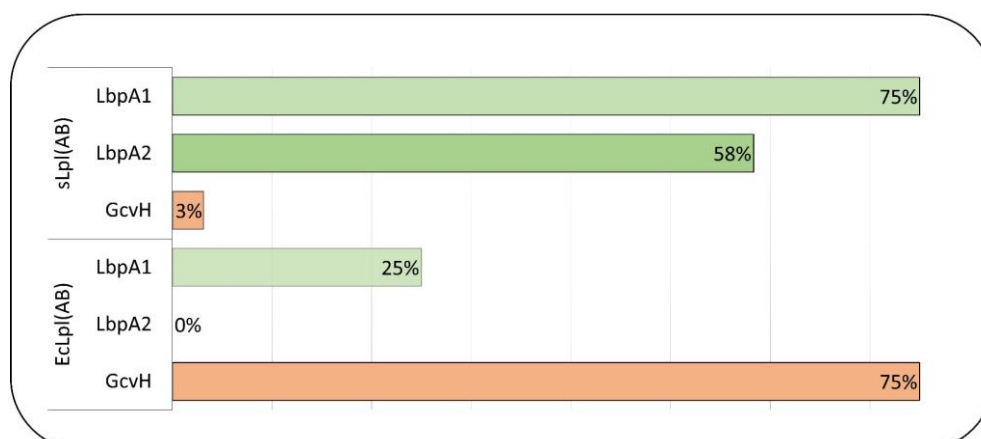


Abbildung 30: Prozentualer Anteil der Substraterkennung der Lipoat:Protein-Ligasen hinsichtlich LbpA1-, LbpA2- und GcvH- Proteinen repräsentativer Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae.

Ergebnisse

Für die Lipoat:Protein-Ligase Lpl(AB) aus *E. coli* ist bekannt, dass sie neben freier Liponsäure aus der Umgebung alternativ auch Oktansäure als Vorläufermolekül ATP-abhängig zu Oktanoyl-AMP aktivieren und anschließend auf ein Akzeptorprotein transferieren kann. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für alle sLpl(AB)-Enzyme aus *H. denitrificans*, *R. mucosus*, *T. sp. K90mix* sowie *T. sibirica* getestet. Exemplarisch ist in Abbildung 31 der erfolgreich durchgeführte Native PAGE Mobility Gel Shift Assay von TsLbpA2 mit TssLpl(AB) dargestellt. Sowohl bei Zugabe von Oktansäure als auch Liponsäure ist eine klare Bandenverschiebung zu erkennen.

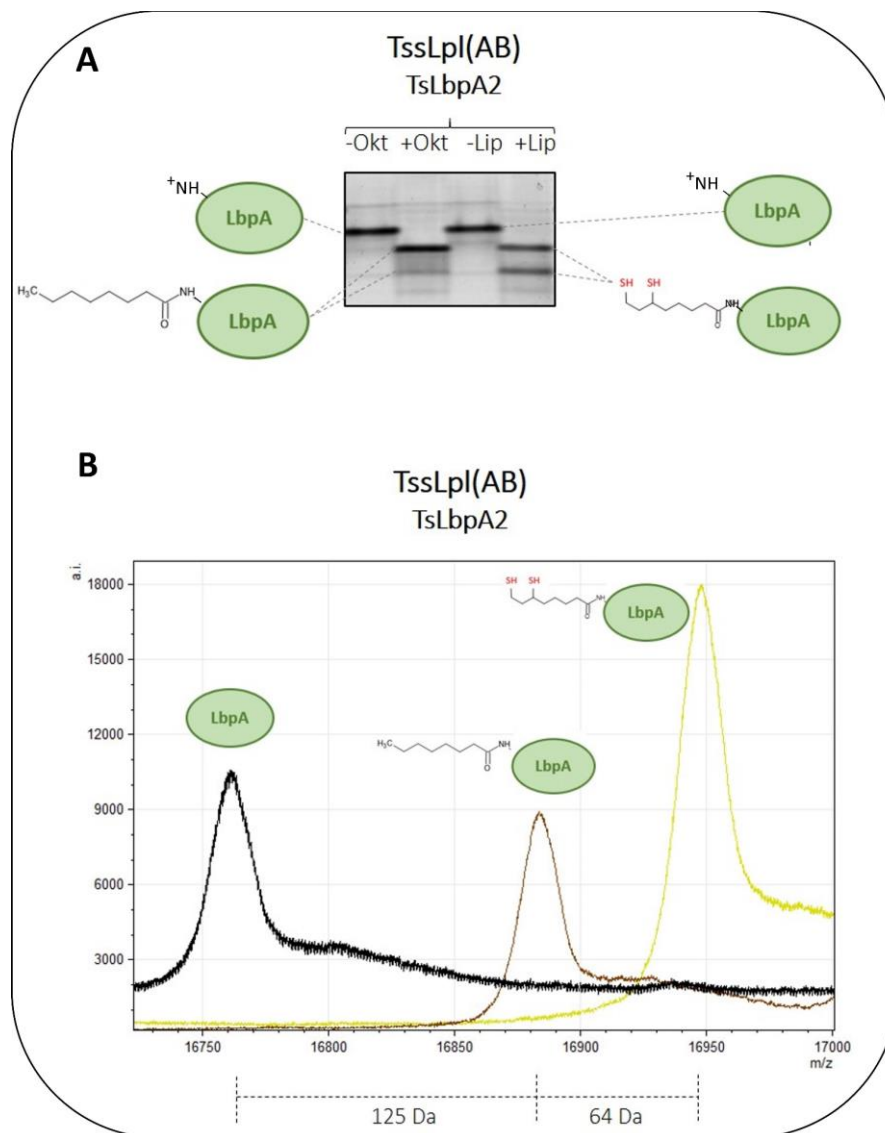


Abbildung 31: Bestätigung der Oktanoylierungsfähigkeit von sLpl(AB) exemplarisch dargestellt durch (A) einen Native PAGE Gel Shift Assay mit LbpA2 und sLpl(AB) aus *T. sibirica* sowie (B) massenspektrometrische Bestätigung der Ergebnisse. (A) Ein Versatz der Proteinbande im nativen Gel ist sowohl mit Oktansäure (Okt) als auch mit Liponsäure (Lip) im Versuchsansatz sichtbar. Eingesetzt wurden jeweils 10 μ M Akzeptorprotein und 0,5 μ M sLpl(AB). (B) Die erwarteten Massen waren für das Apoprotein TsLbpA2 16.758 Da ohne Start-Methionin, eine Oktanoylierung führt zu einem Massenanstieg von 125 Da, eine Lipoylierung von 188 Da (2 x 32 Da der Schwefelatome). LbpA, Liponsäure-bindendes Protein; sLpl(AB), Lipoat:Protein-Ligase; Ts, *T. sibirica*.

Zusätzlich wurde durch MALDI-TOF MS spektrometrisch bestätigt, dass das Akzeptorprotein (16.758 Da ohne Start-Methionin) mit beiden Säuren modifiziert werden konnte; Die Zugabe von Oktansäure verursachte einen Versatz des Protein-Peaks um 125 Da, was der kovalenten Bindung eines Oktanoylrests entspricht, die Zugabe von Liponsäure hingegen um weitere 64 Da, was mit zwei zusätzlichen Schwefelatomen korreliert.

Im Rahmen der mehrfach durchgeführten Oktanoylierungs- und Lipoylierungsexperimente fiel auf, dass die Enzyme ihre Reaktion nicht gleich schnell katalysierten. In dem unten aufgeführten Native PAGE Mobility Gel Shift Assay wurden gleichermaßen 0,5 μM der Lipoat:Protein-Ligasen EcLpl(AB), TK90sLpl(AB)_1 sowie TssLpl(AB) in den Reaktionsansatz eingesetzt. Inkubiert wurden die Proben bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Organismus, aus dem die Lipoat:Protein-Ligase stammte (entsprechend 37°C für *E. coli*, 34°C für *T. sp. K90mix* und 30°C für *T. sibirica*). Bereits nach fünf Minuten lag HdGcvH vollständig lipoyliert vor, während TK90LbpA2 mit TKsLpl(AB)_1 und TssLpl(AB) jeweils erst nach 20 bis 25 Minuten vollständig modifiziert vorlag (siehe Abb. 32). In den Zwischenzeiten ist der Verlauf der Abnahme des Apoproteins und der Zunahme des Holoproteins gut sichtbar. HdGcvH wurde für diesen Versuch eingesetzt, da das *E. coli* eigene GcvH durch seinen extrem niedrigen pI von 4,15 nur schwer im nativen Gel aufzutrennen war.

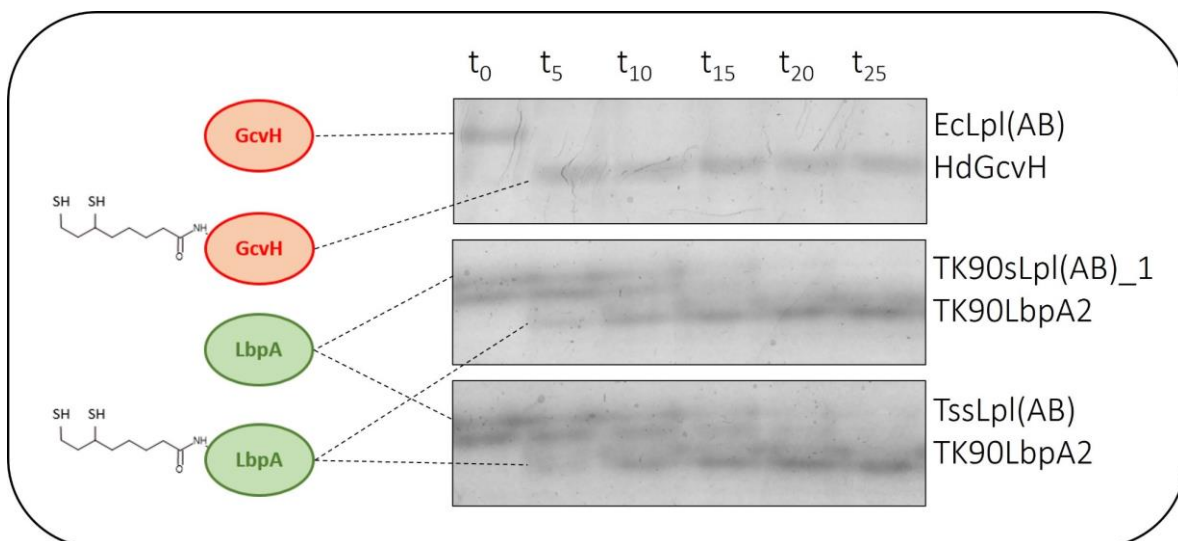


Abbildung 32: Vergleichender Zeitverlauf der Lipoylierungsgeschwindigkeit von EcLpl(AB) an HdGcvH mit der Geschwindigkeit von TK90sLpl(AB)_1 sowie TssLpl(AB) an TK90LbpA2. Ein Versatz der Proteinbande im nativen Gel ist sowohl in dem Ansatz mit EcLpl(AB) und HdGcvH bereits nach 5 Minuten sichtbar. Die fortschreitende Lipoylierung von TK90LbpA2 mit den beiden sLpl(AB)-Enzymen ist im Verlauf der Zeit gut sichtbar, wobei eine vollständige Modifikation erst nach 20 bis 25 Minuten eintrat. Eingesetzt wurden jeweils 10 μM Akzeptorprotein und 0,5 μM (s)Lpl(AB). GcvH, Protein H des Glycin-spaltenden Systems; LbpA, Liponsäure-bindendes Protein; sLpl(AB), Lipoat:Protein-Ligase; Ec, *E. coli* K12; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*.

Ergebnisse

Nachdem eine spezifische Substraterkennung von Lpl(AB) hinsichtlich GcvH und von sLpl(AB)-Enzymen hinsichtlich LbpA beobachtet worden war, wurde im weiteren Verlauf *in vitro* analysiert, ob die C- und N-terminal konservierten Cysteinreste der LbpA-Proteine einen Einfluss auf diese Substratspezifität haben. Nachdem Expressionsplasmide von TK90LbpA2-Varianten durch ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe einer Q5-Polymerase kloniert worden waren, in der entweder Cys7 oder Cys145 oder beide Cysteine jeweils durch ein Alanin ersetzt wurden, konnte mit den exprimierten und aufgereinigten Proteinen ebenso ein Native PAGE Mobility Gel Shift Assay durchgeführt werden. Der Versatz der Proteinbande nach Zugabe von Liponsäure visualisiert die Lipoylierung des jeweiligen Apoproteins (siehe Abb. 33). Es wurde exemplarisch nur die Bande des Apoproteins TK90LbpA2_C7A gezeigt, da sowohl der Aminosäureaustausch an C₁₄₅ als auch der kombinierte Austausch an C₇ und C₁₄₅ keine Veränderung in der Laufeigenschaft im nativen Gel mit sich gebracht hat (pI identisch). Zusätzlich wurde durch MALDI-TOF MS spektrometrisch bestätigt, dass das jeweilige Akzeptorprotein (16.684 Da ohne Methionin für die einfachen Cystein-Austauschvarianten sowie 16.652 Da ohne Start-Methionin für TK90LbpA2_C7A_C145A) durch TK90sLpl(AB)_1 lipoyliert wurde; Durch die kovalente Bindung des Lipoylrestes an das Liponsäure-bindende Protein entstand ein Versatz des Proteinpreaks um jeweils 188 Da.

Da die C- und N-terminalen, konservierten Cysteine der LbpA-Proteine *in vitro* keinen Einfluss auf die Substratspezifität der sLpl(AB)-Enzyme hatten, wurden im weiteren Verlauf mehrere RmLbpA2-Varianten generiert mit unterschiedlichen Austauschen der basischen zu neutralen oder sauren Aminosäuren rund um den konservierten Lysinrest, an dem die kovalente Bindung des Lipoylrests stattfindet. Dazu wurden ebenfalls Expressionsplasmide teilweise durch ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe einer Q5-Polymerase kloniert und teilweise synthetische Genkonstrukte bestellt (BioCat GmbH). Eine Übersicht der Aminosäuren, die in den RmLbpA2-Varianten ausgetauscht wurden, ist Abbildung 34 (A) zu entnehmen. Es wurden drei Aminosäurereste bzw. -abschnitte ausgewählt, die sowohl einzeln als auch in allen möglichen Kombinationen an EcGcvH angeglichen wurden. Die produzierten und aufgereinigten Proteine wurden in einen Native PAGE Mobility Gel Shift Assay mit EcLpl(AB) und RmsLpl(AB) eingesetzt (siehe Abb. 34(B)). Wurde nur einer der Abschnitte von RmLbpA2 ausgetauscht (entweder TPRK51-54DLPE, R63A oder P76D), erkannte RmsLpl(AB) das Substrat noch und lipoylierte es. Diese Lipoylierungsexperimente mit einem Austausch von nur einer Position wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt (Holz, 2024).

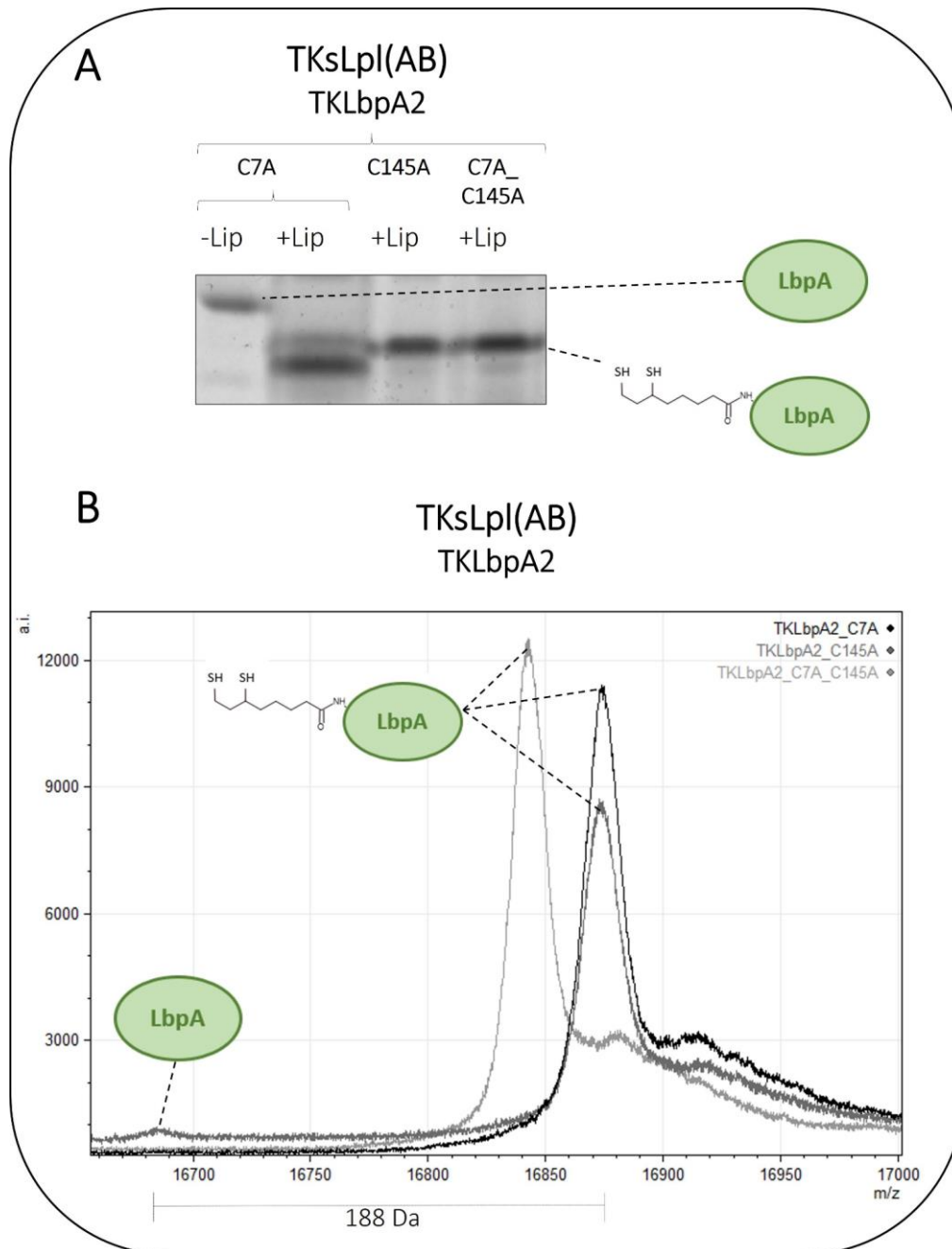


Abbildung 33: Untersuchung des Einflusses der konservierten C- und N-terminalen Cysteinreste von LbpA-Proteinen hinsichtlich der Substratspezifität von sLpl(AB) exemplarische dargestellt durch einen Native PAGE Gel Shift Assay mit LbpA2-Varianten und sLpl(AB) aus *T. sp. K90mix* sowie massenspektrometrische Bestätigung der Ergebnisse. Ein Versatz der Proteinbande im nativen Gel ist sowohl für alle Cystein-Austauschvarianten von TK90LbpA2 sichtbar. Die erwarteten Massen waren für die Apoproteine TK90LbpA2_C7A sowie -C145A ohne Start-Methionin 16.684 Da, während die doppelte Cystein-Austauschvariante eine Masse von 16.652 Da ohne Start-Methionin aufweist. Die erfolgreiche Lipoylierung ist durch den Versatz der erwarteten Massen um 188 Da sichtbar. Eingesetzt wurden jeweils 10 μM Akzeptorprotein und 0,5 μM sLpl(AB). LbpA, Liponsäure-bindendes Protein; Lip, Liponsäure; sLpl(AB), Lipoat:Protein-Ligase; TK, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*.

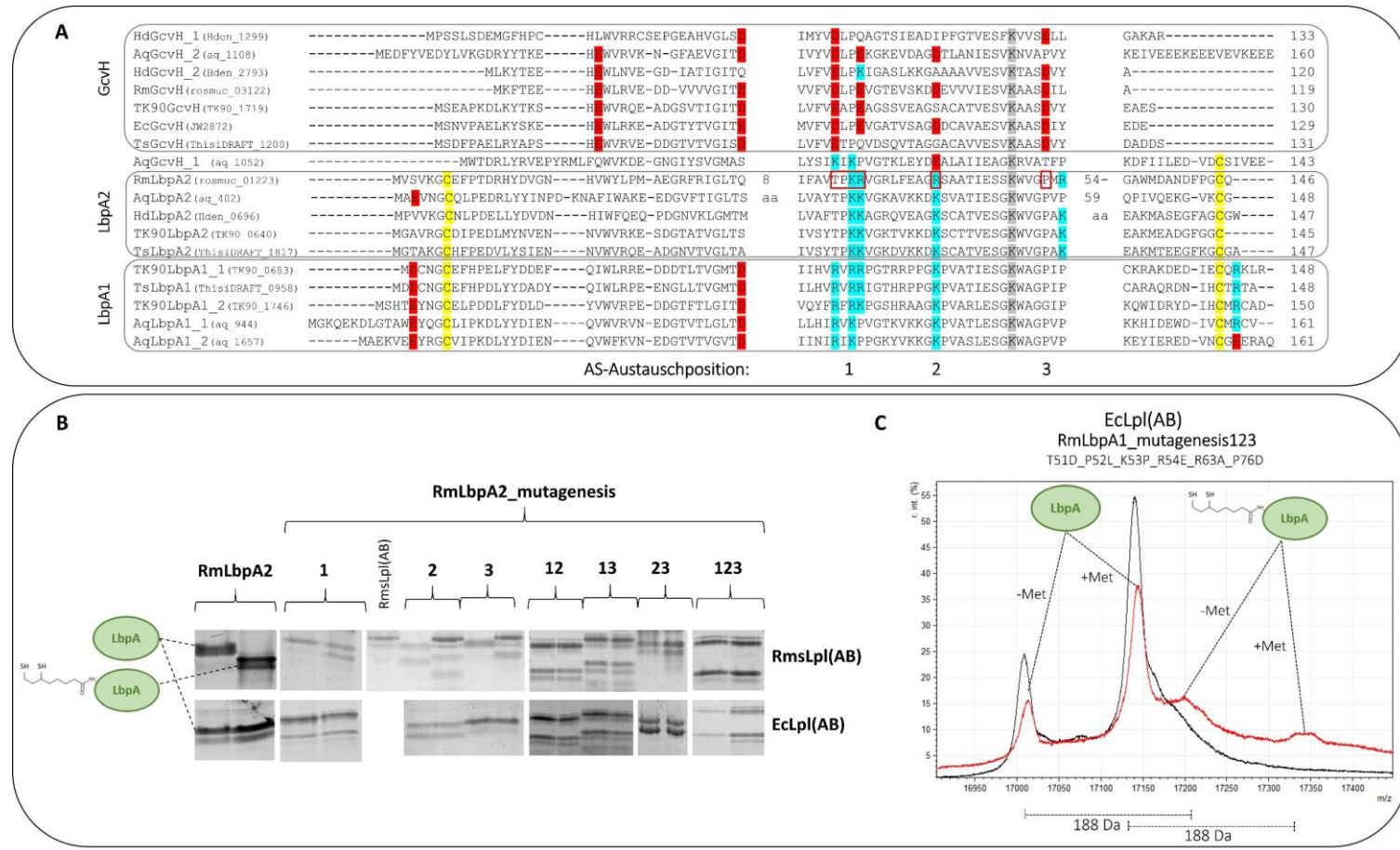


Abbildung 34: Untersuchung diverser LbpA2-Varianten von *R. muscosus*, die an spezifischen Aminosäurepositionen schrittweise EcGcvH angeglichen wurden. (A) Multiple Sequence Alignment aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Liponsäure-bindenden Proteine. Die kovalente Bindung der Liponsäure findet am konservierten Lysinrest (grau hinterlegt) statt. Die konservierten Cystein-Reste am C- und N-Terminus der LbpA-Proteine sind gelb markiert. Auffällig sind die N-terminalen sowie rund um das aktive Zentrum gelegenen geladenen Aminosäuren (saure Aminosäuren in Rot, basische Aminosäuren in Blau) von GcvH, die teilweise durch neutrale, teilweise durch komplementär geladene Aminosäuren ausgetauscht sind in LbpA-Proteinen. Es wurden exemplarisch drei Positionen ausgewählt (roter Kasten), die einzeln (1-2-3), aber auch in Kombinationen (12-13-23-123) EcGcvH angeglichen wurden. (B) Native PAGE Mobility Gel Shift Assay der RmLbpA_mutagenesis-Varianten im Vergleich zum natürlichen Protein sowohl mit RmsLpl(AB) als auch mit EcLpl(AB). RmsLpl(AB) erkennt RmLbpA2 ab zwei ausgetauschten Aminosäure-Positionen nicht mehr als Substrat, wohingegen EcLpl(AB) erst ab dem Austausch aller drei Positionen eine leichte Ligase-Aktivität aufzeigt, was erst im Rahmen der Betrachtung der molaren Masse via MALDI-TOF MS auffiel (C). (C) MALDI-TOF MS Spektren von unbehandeltem RmLbpA2_mutagenesis123 (schwarz) sowie der Probe mit Liponsäure (rot) in Kombination mit EcLpl(AB). Die erwarteten Massen waren wie folgt: RmLbpA2_mutagenesis123 Apoprotein 17.139 Da mit und 17.008 Da ohne Start-Methionin. Bei erfolgreicher Lipoylierung kamen jeweils 188 Da hinzu. Ec, *E. coli* K12; Rm, *R. muscosus*.

Da in manchen Gelen RmsLpl(AB) auf Höhe der Substrate mitlief und kein Ausschnitt ohne die Proteinbande zu realisieren war, wurde die Lipoat:Protein-Ligase nochmal separat aufgetragen und aufgeführt, um die Höhe der Bande in den anderen Ansätzen (RmLbpA2_mutagenesis2 und -3) zuordnen zu können. Bei einer Kombination aus zwei Abschnitten (egal welche) war jedoch bereits keine Modifikation des Akzeptorproteins mehr möglich. Ebenso verhielt es sich für die Varianten, die an jeder der drei Positionen an EcGcvH angeglichen wurden. Betrachtete man die Ligase-Aktivität von EcLpl(AB) hinsichtlich der verschiedenen RmLbpA2-Varianten, war der Effekt weniger stark ersichtlich. Erst mit dem Austausch aller ausgewählten Positionen konnten im Massenspektrum des untersuchten Ansatzes molekulare Massen aufgezeichnet werden, die dem Holoprotein entsprachen (17.327 Da mit und 17.169 Da ohne Start-Methionin) (siehe Abb. 34 (C)). Die Protein-Peaks der Apoproteine dominieren jedoch mit 17.139 Da (mit Start-Methionin) und 17.008 Da (ohne Start-Methionin). Im dargestellten Multiple Sequence Alignment sind jedoch weitere eventuell relevante Aminosäuren markiert, die einen Einfluss auf die Substratspezifität der Lipoat:Protein-Ligasen haben könnten, und die in zukünftigen Arbeiten in Betracht gezogen werden sollten.

3.1.3. Lipoat-Synthasen LipS1 und LipS2

Da im vorausgegangenen Abschnitt, in der das Augenmerk auf der Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB) und dessen Besonderheiten im Vergleich zu Lpl(AB) von *E. coli* lag, bereits bestätigt wurde, dass dieses Enzym die energieaufwendige Oktanoylierung des Liponsäure-bindenden Proteins LbpA katalysieren kann, folgt im nächsten Schritt die Betrachtung der komplexen Reaktion der Schwefelinsertion an C₆ und C₈ des Oktanoylrests. Auch hier gibt es ein homologes Enzym aus *E. coli*, namentlich das LipA. Interessanterweise kodieren Organismen, die die Liponsäureassemblierungsmaschinerie für LbpA besitzen, nicht nur eine Lipoylsynthase, sondern direkt zwei. LipS1 und LipS2 gehören der RS-Superfamilie an und besitzen als solche jeweils zwei FeS-Cluster, die für einen erfolgreichen Reaktionsablauf essentiell sind; ein [4Fe-4S]_{RS}-Cluster und ein auxiliäres [4Fe-4S]_{aux}-Cluster.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden beide Lipoylsynthasen, LipS1 und LipS2, sowohl aus *H. denitrificans* als auch aus *T. sp. K90mix* heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und unter Sauerstoffausschluss im Anaerobenzelt via Strep-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die anaerobe Aufreinigung von LipS1 aus *H. denitrificans* (HdLipS1) führte zu

Ergebnisse

einer größeren und saubereren Ausbeute im Vergleich zu LipS1 aus *T. sp. K90mix* (TK90LipS1). LipS2 aus *H. denitrificans* (HdLipS2) bildete Proteinaggregate und ließ sich nicht aufreinigen. Die Aufreinigung von LipS2 aus *T. sp. K90mix* (TK90LipS2) hingegen führte zum Erfolg. Beide Enzyme, HdLipS1 und TK90LipS2, besitzen wie oben beschrieben zwei FeS-Cluster. Die chemische Rekonstitution mit Lithiumsulfid und Eisenchlorid unter striktem Sauerstoffausschluss wurde vorsichtig und unter ständigem Rühren durchgeführt. Der Erfolg der Rekonstitution ist in Abbildung 35 (A) anhand des Anstiegs der Absorption bei 400 nm zu verzeichnen.

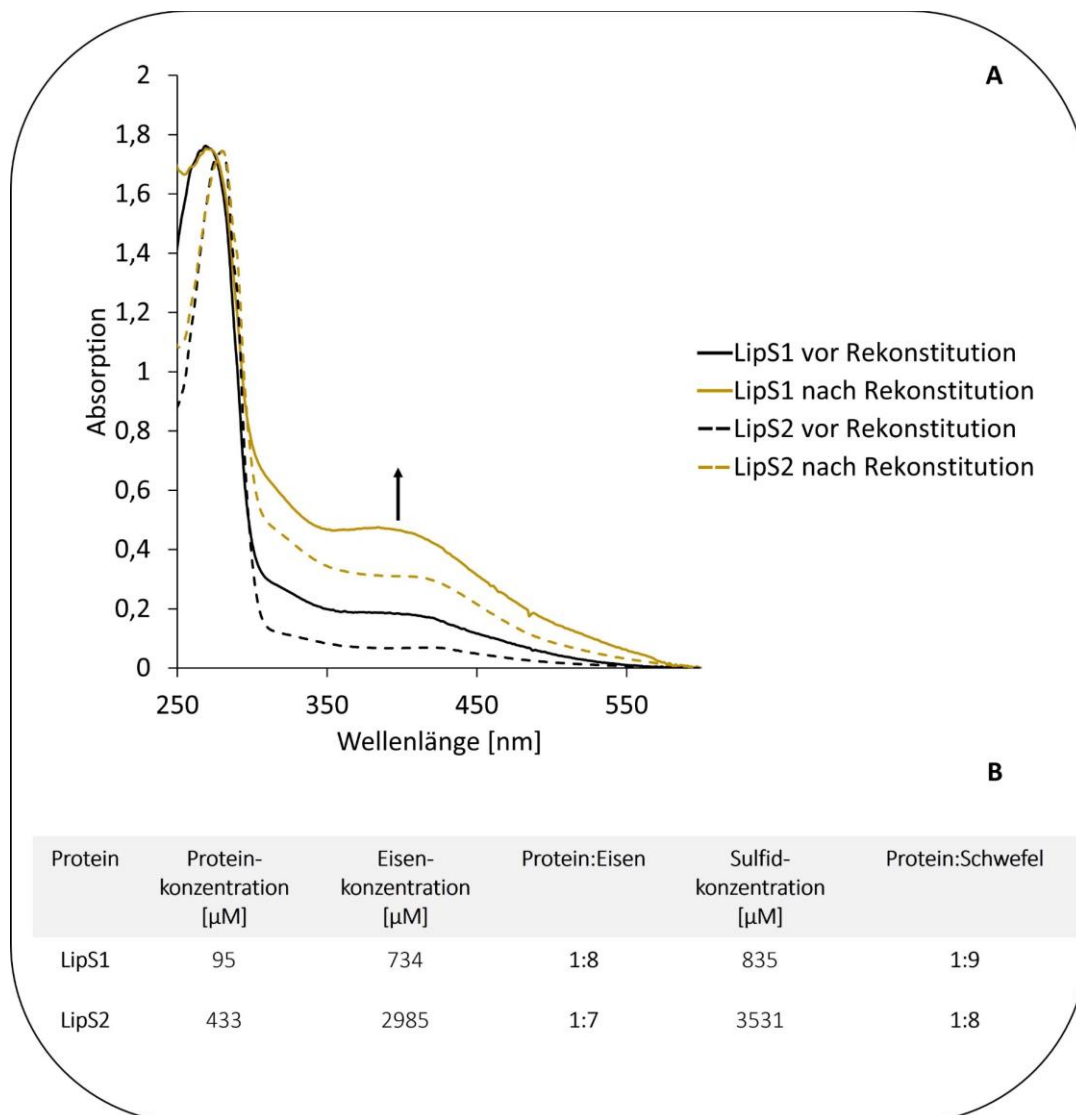


Abbildung 35: Nachweis der erfolgreichen chemischen Rekonstitution der Lipoylsynthasen HdLipS1 und TK90LipS2. (A) UV-Vis-Spektroskopie von HdLipS1 (durchgezogene Linien) und TK90LipS2 (gestrichelte Linien) vor (schwarz) und nach der durchgeführten chemischen Rekonstitution (gelb). Eine Erhöhung rund um 400 nm bestätigt die Inkorporation der FeS-Cluster. (B) Übersicht über die gemessenen Protein-, Eisen- und Sulfidkonzentrationen und die daraus resultierenden Verhältnisse zwischen Protein-Monomer und entsprechend der Anzahl an Eisen- bzw. Schwefelatomen. Das Verhältnis von je rund 1:8 spricht für zwei [4Fe-4S]-Cluster pro Enzym. Hd, *H. denitrificans*; TK90, *T. sp. K90mix*.

Die anschließende Bestimmung der Protein-, Eisen- und Sulfidkonzentrationen in den Ansätzen brachte die Erkenntnis, dass sowohl für HdLipS1 als auch für TK90LipS2 ein Verhältnis von 1:8 bzw. von 1:7 Protein zu Eisenatomen vorlag sowie ein Verhältnis von 1:9 bzw. 1:8 Protein zu Schwefelatomen (siehe Abb. 35(B)). Dies stimmt mit der Erwartung von zwei [4Fe-4S]-Clustern pro Polypeptid überein.

Um *in vitro* die komplette Liponsäureassemblierung an TK90LbpA durchzuführen, wurde das Liponsäure-bindende Protein zuvor mit Hilfe von TKsLpl(AB)_1 unter bekannten Konditionen aerob oktanoxyliert. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass es geglückt ist, die *in vitro* Oktanoxylierung auf einen 20 ml-Ansatz hochzuskalieren, wobei maximal 200 μM TKLbpA2 mit 30 μM TKsLpl(AB)_1 miteinander inkubiert wurden. Die molaren Konzentrationen der Zusätze (DTT, MgCl_2 , ATP, Oktansäure) wurden nicht verändert im Vergleich zum Standardprotokoll. Oktanoyl-TK90LbpA2 diente anschließend als Substrat für die Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2, wobei im Ansatz zusätzlich sowohl DTT, SAM als auch NADPH eingesetzt wurde. Zudem wurden Versuche durchgeführt, in denen die FAD-abhängige Oxidoreduktase LipT als potentieller Elektronenüberträger fungieren sollte.

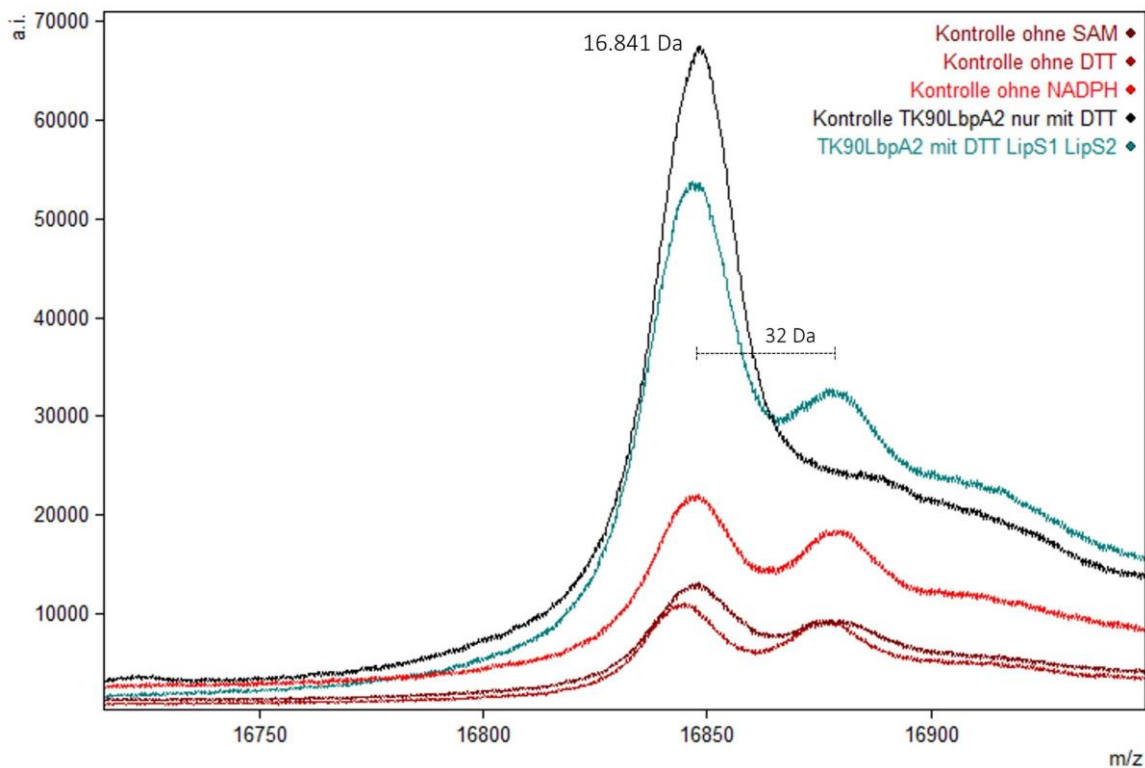


Abbildung 36: MALDI-TOF Massenspektren der Proben, die im Rahmen der *in vitro* Liponsäureassemblierung untersucht wurden. Falls in der Legende innerhalb der Abbildung nicht anders beschrieben, befand sich in jedem Ansatz neben Oktanoly-TK90LbpA2 DTT, NADPH, SAM (S-Adenosylmethionin), HdLipS1 und TK90LipS2. Die erwarteten Massen waren wie folgt: Oktanoyl-TK90LbpA2 ohne Start-Methionin 16.841 Da; je 32 Da pro zusätzlichem Schwefelatom. Die Kontrollansätze zeigten, dass eine Lips1-/LipS2-unabhängige Schwefelanlagerung stattfand. Hd, *H. denitrificans*; TK90, T. sp. K90mix.

Die Auswertung der Massenspektren nach erfolgter Inkubationszeit aller Reaktionspartner brachte nicht die erwarteten Ergebnisse; Es war zwar eine Schwefelanlagerung an Oktanoyl-TK90LbpA2 (ohne Start-Methionin) zu erkennen (16.841 Da plus 32 Da), jedoch auch bei den Negativkontrollen (siehe Abb. 36). D.h. auch als kein SAM im Ansatz war, lagerte ein Schwefelatom am Akzeptorprotein an. Das gleiche galt für die Ansätze ohne NADPH und ohne DTT. Lediglich in dem Ansatz, in dem weder LipS1 noch LipS2, aber alle anderen Zusätze enthalten waren, sah man ausschließlich die Masse von Oktanoyl-TK90LbpA2. Zusätzliche Schwefelanlagerungen darüber hinaus konnten grundsätzlich nicht verzeichnet werden.

3.1.4. LipT

Das Flavoprotein LipT ist eine Oxidoreduktase, die wie oben beschrieben eventuell als Elektronenüberträger für die LipS1-/LipS2-abhängige Schwefelinsertion in oktanoyl-LbpA dient. Zur Untersuchung von LipT *in vitro* wurde zunächst das Protein aus *H. denitrificans* (Hden_0684) rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) produziert. Obwohl die Art (His-Tag sowie Strep-Tag) als auch die Position des Tags (C- und N-terminal) an Hden_0684 variiert wurde, war keine heterologe Expression erfolgreich und es bildeten sich Proteinaggregate. Die Verwendung unterschiedlicher Medien (LB, TB, TCYM, MI) oder die Coexpression mit Chaperonen (pG-KJE8) zeigte ebenfalls keine Reduktion der in Inclusion Bodies aggregierten Proteine. Aus diesem Grund wurden die Gene für LipT aus den Organismen *T. sibirica* (ThisiDRAFT_1283) und *T. sp. K90mix* (TK90_0643) sowie *T. thiocyanoxidans* (G372_RS0107505) in Expressionsvektoren kloniert und diese dann in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Proteinproduktionen in LB-Medium ohne den Einsatz von Chaperonen sowie die Aufreinigungen waren in allen Fällen erfolgreich.

Die weitere Charakterisierung von TKLipT brachte die Erkenntnis, dass das Protein nach der Aufreinigung bereits rund 1 FAD-Molekül pro Monomer besaß. Dazu wurde mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ von FAD bei 450 nm die Konzentration berechnet und mit der Konzentration des Polypeptids verglichen, die mittels BCA-Assay bestimmt wurde. Zusätzliches FAD im Aufreinigungspuffer oder eine *in vitro* Rekonstitution mit FAD führte zu keiner weiteren Steigerung des FAD-Gehalts. Eine Hitzedenaturierung von LipT und anschließender spektroskopischer Betrachtung des abzentrifugierten Überstandes machte deutlich, dass das FAD nicht kovalent gebunden vorliegt.

In Abbildung 37 ist ein UV-Vis-Spektrum von LipT nach erfolgreicher Aufreinigung dargestellt. Es zeigt eine verhältnismäßig hohe Absorption bei 280 nm, da neben den aromatischen Aminosäuren des Polypeptids auch der Cofaktor FAD in diesem Wellenlängenbereich absorbiert. Aufgrund dessen wurden alle Konzentrationsbestimmungen des Proteins mittels BCA Assay durchgeführt. Sichtbar sind die für die oxidierte Form des Cofaktors typischen Absorptionsmaxima bei 374 nm sowie 450 nm. Die gelbe Färbung des Proteins gab bereits während des Aufreinigungsprozesses den Hinweis darauf, dass es sich bei dem Cofaktor in diesem Zustand um die oxidierte Form FAD handelte.

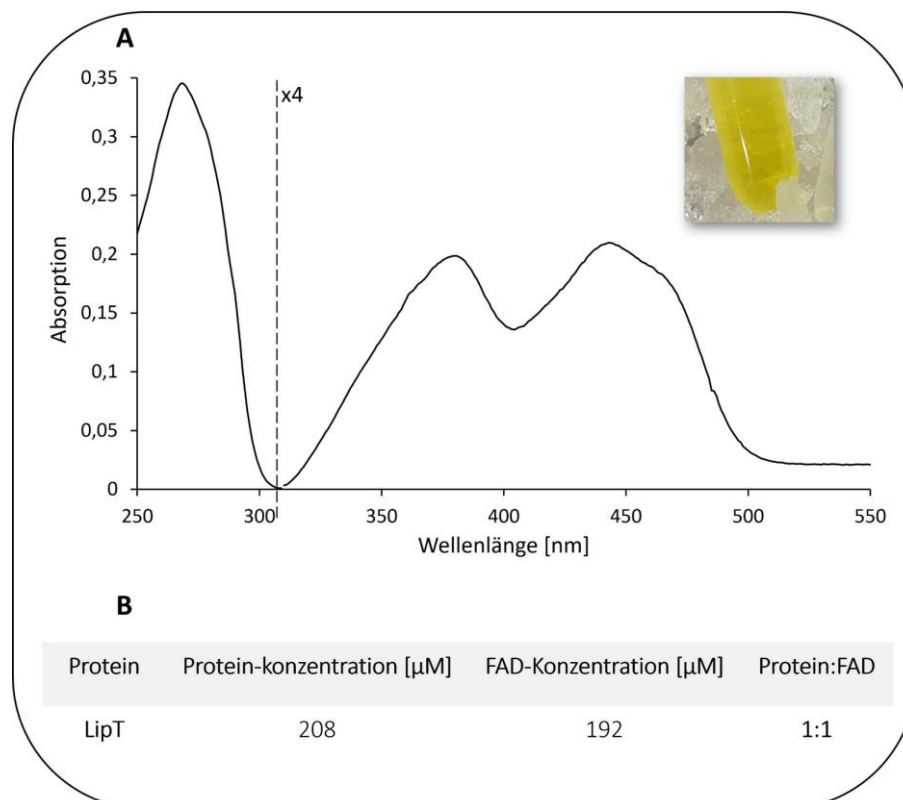


Abbildung 37: Nachweis des FAD-Cofaktors der Oxidoreduktase TK90LipST. (A) UV-Vis-Spektroskopie von TK90LipT (1:10 verdünnt eingesetzt). Eine erhöhte Absorption bei 374 nm sowie 450 nm bestätigt die Anwesenheit des oxidierten Cofaktors, der in diesem Zustand bereits visuell sichtbar eine gelbe Färbung verursacht. (B) Übersicht über die gemessene Protein- sowie FAD-Konzentration und das daraus resultierende Verhältnisse zwischen Protein-Monomer und FAD-Molekül; Das Verhältnis entspricht 1:1. TK90, *T. sp.* K90mix.

Eine Reduktion des FAD zu FADH_2 mit DTT war unter aeroben Bedingungen nicht möglich. Auf Grund dessen wurde eine UV-Vis-Titration im Anaerobenzelt durchgeführt, um eine Reduktion mittels Natriumdithionit, einem stärkeren Reduktionsmittel als DTT, und eine anschließende Reoxidation mit Ferricyanid aufzeichnen zu können (siehe Abb. 38). Beobachtet wurde jeweils die Ab- und Zunahme der Absorptionen bei 375 nm sowie 450 nm. Eingesetzt wurden $90 \mu\text{M}$ TK90LipT, die schrittweise mit je $5 \mu\text{M}$ Natriumdithionit versetzt wurden.

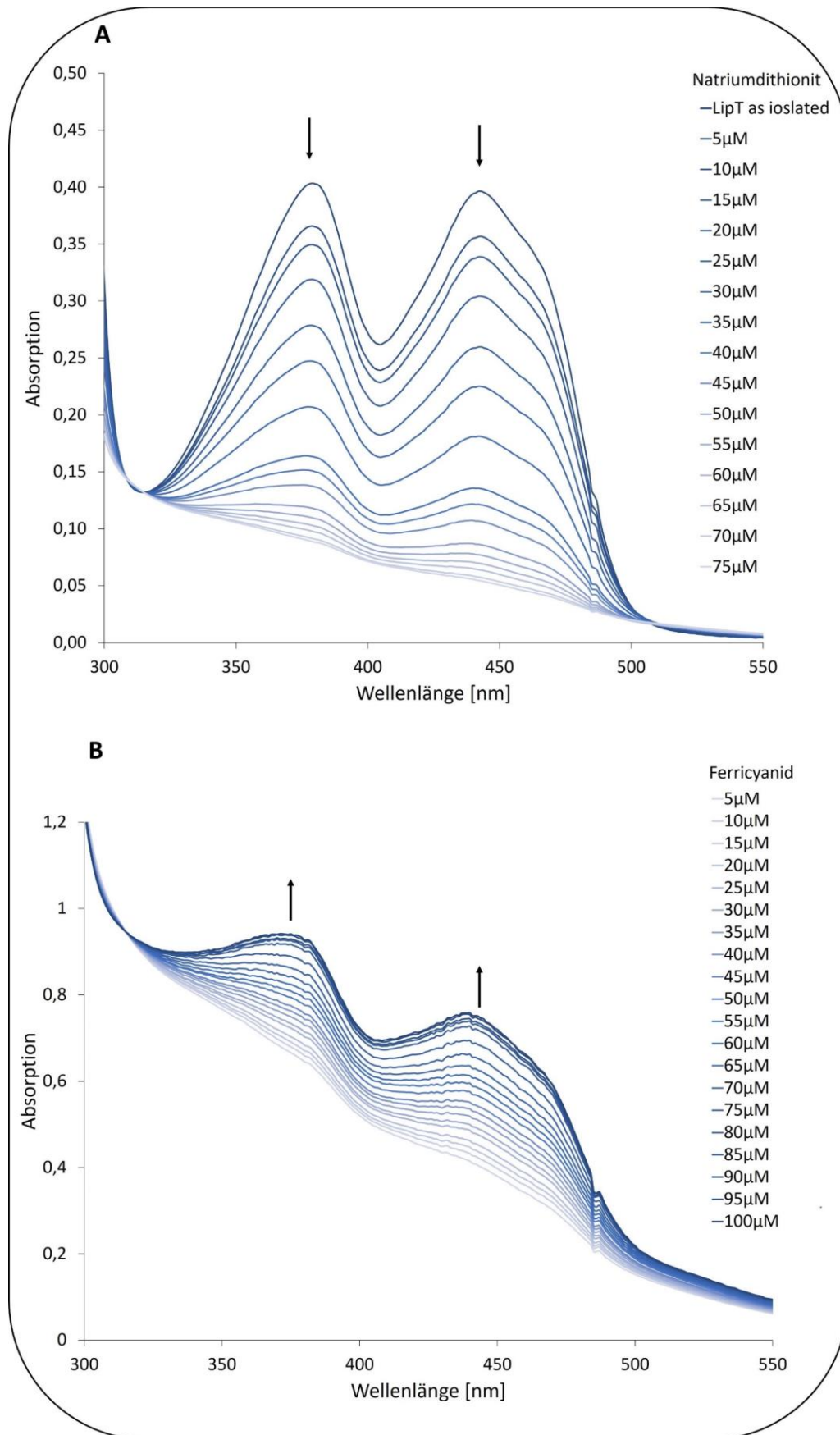


Abbildung 38: UV-Vis-Titration der Oxidoreduktase TK90LipT. Schrittweise wurden 5 μ M Natriumdithionit zu 90 μ M TK90LipT zur Reduktion des FAD-Kofaktors pipettiert. Nach vollständiger Reduktion wurde FADH₂ wieder schrittweise mit je 5 μ M Ferricyanid reoxidiert. Die Spektren wurden auf 300 nm sowie 600 nm normalisiert.

Bis der FAD-Kofaktor vollständig reduziert als FADH₂ vorlag, wurden insgesamt 75 µM des Reduktionsmittels eingesetzt. Da Natriumdithionit eine hohe Eigenabsorption im UV-Bereich besitzt und diese ab einer gewissen Konzentration auch einen Einfluss auf den Übergangsbereich zum visuellen Wellenlängenbereich hat (insbesondere in (B) sichtbar), wurden alle Spektren auf 300 nm sowie 600 nm normalisiert. Die anschließende Reoxidation des Kofaktors konnte mit der ebenfalls schrittweisen Zugabe von je 5 µM Ferricyanid erzielt werden. Nach einer Gesamtkonzentration im Ansatz von 100 µM Ferricyanid konnte keine weitere Erhöhung der Absorptionen bei 375 nm sowie 450 nm mehr festgestellt werden. Die eingesetzten Molaritäten der Reduktions- und Oxidationsmittel passen 1:1 (± 10 %) zur TK90LipT-Konzentration im Ansatz (90 µM).

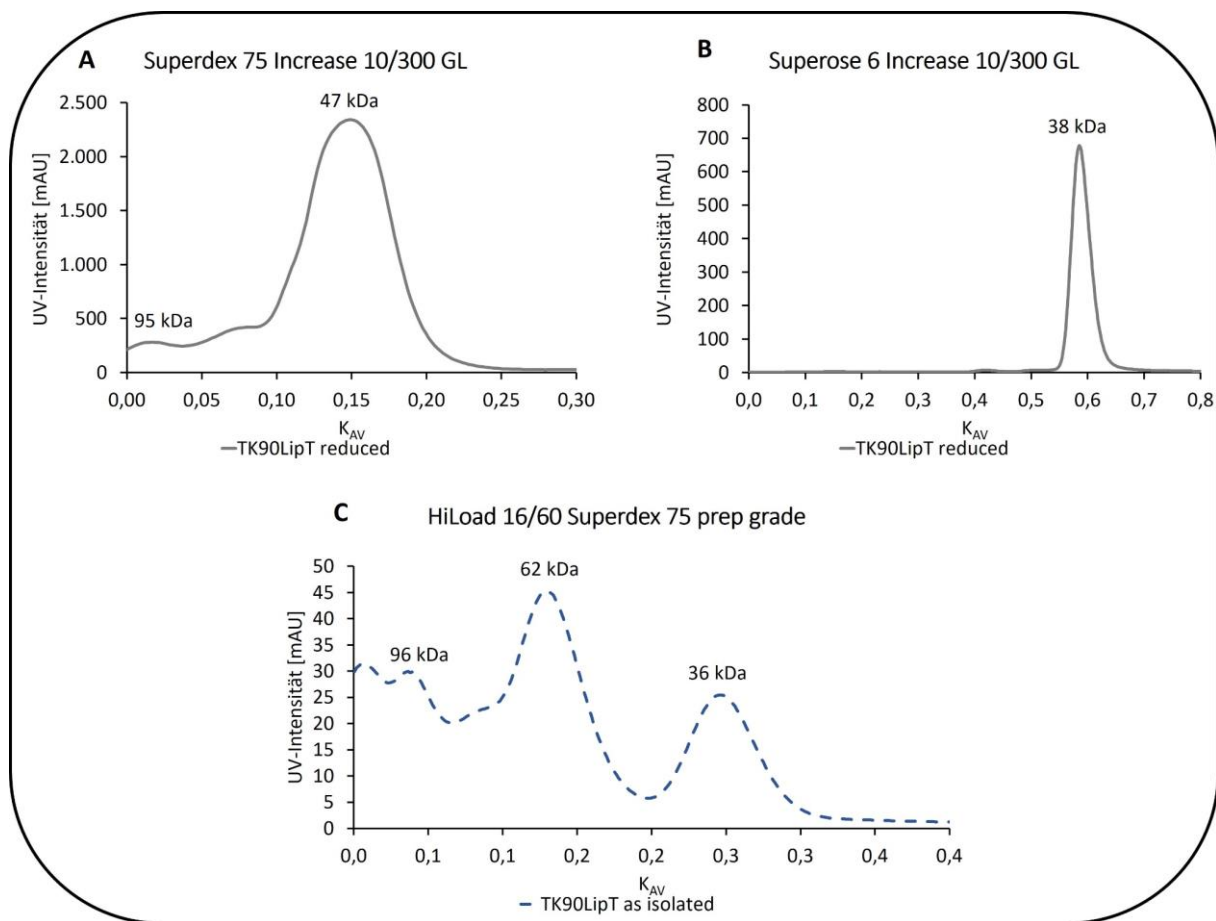


Abbildung 39: Vergleichende Größenausschlusschromatographie mit unterschiedlichen Gelfiltrationssäulen von TK90LipT in seiner Form, wie es unter Standardbedingungen isoliert wurde, sowie in reduzierter Form. Die Intensität [mAU] ist gegen den Verteilungskoeffizienten der Gelpolphase K_{AV} aufgetragen. Verwendet wurden die (A) Superdex 75 Increase 10/300 GL, die (B) Superose 6 Increase 10/300 GL sowie die (C) HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule (Cytiva, Marlborough, USA). Die Gelfiltrationen in (A) und (B) wurden im Vergleich zu (C) unter reduzierenden Bedingungen (2 mM DTT) durchgeführt. Die Masse der jeweiligen Peaks wurde im Diagramm vermerkt. Die kalkulierte Masse des Monomers liegt bei 40,5 kDa. TK90, *T. sp.* K90mix.

Ergebnisse

Die Größenausschlusschromatographie wurde durchgeführt, um Aussagen über den Oligomerisierungszustand von TK90LipT treffen zu können (siehe Abb. 39). Unter reduzierenden Bedingungen eluierte die Oxidoreduktase sowohl in der Superdex 75 Increase 10/300 GL als auch in der Superose 6 Increase 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, USA) als Monomer, wobei auffiel, dass die Differenz der berechneten Massen relativ groß war (47 kDa im Vergleich zu 38 kDa). Die mittels ProtParam kalkulierte Masse liegt mit 40,5 kDa dazwischen. Die Aufreinigung des Proteins ohne DTT-Zusatz führte hingegen neben dem Monomer zur Elution von höheren Oligomeren (siehe Abb. 39 (C)). Auch in dieser Säule, der HiLoad 16/60 Superdex prep grade lag die beobachtete Masse des Monomers mit 36 kDa unterhalb der kalkulierten 40,5 kDa.

In Abbildung 40 (A) ist ein strukturelles Alignment der AlphaFold-Vorhersagen von LipT aus *T. sp. K90mix*, *H. denitrificans* sowie *T. sibirica* dargestellt (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024). Sie sind nahezu identisch. LipT ist als Geranylgeranyl-Glycerophospholipid-Reduktase annotiert, mit der Digeranylgeranyl-Phospholipid-Reduktase (Ta0516) aus *Thermoplasma acidophilum* als Homolog mit der höchsten sequenziellen Übereinstimmung (31,25%) unter allen Homologen, die bereits erfolgreich kristallisiert wurden (PDB, 3OZ2) (Xu et al., 2010). In Abbildung 40 ist ein strukturelles Alignment dieses Enzyms mit TK90LipT dargestellt; Dabei weisen sie eine hohe Ähnlichkeit auf.

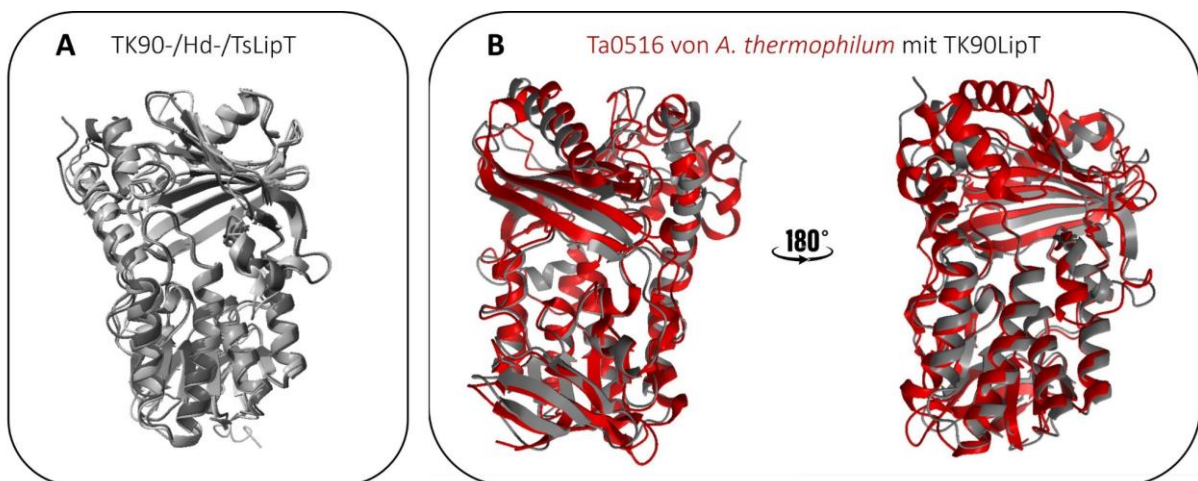


Abbildung 40: (A) Strukturvorhersagen von LipT aus *T. sp. K90mix* (TK90_0643), *H. denitrificans* (Hden_0684) sowie *T. sibirica* (ThisiDRAFT_1283) (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) (B) im Vergleich zur Kristallstruktur der Digeranylgeranyl-Phospholipid-Reduktase (Ta0516) aus *T. acidophilum* (PDB 3OZ2) (Xu et al., 2010)). LipT-Enzyme sind im Strukturalignment Grau-Tönen, Ta0516 aus *T. acidophilum* in rot dargestellt. Hd, *H. denitrificans*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

Eine mögliche Diaphoraseaktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, jedoch konnte keine spezifische Aktivität verzeichnet werden, wenn NADH oder NADPH als Elektronendonator und Ferricyanid oder (MTT) als Elektronenakzeptor eingesetzt wurden. Die Versuche wurden auch unter anoxischen Bedingungen wiederholt und es wurden sowohl Optimierungsversuche an der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und dem pH-Wert durchgeführt, jedoch ohne Erfolg. Eine Aktivitätsfärbung im nativen Gel mit MTT als Elektronenakzeptor war ebenfalls nicht möglich.

In diesem Zusammenhang wird im folgenden Abschnitt neben der möglichen Funktion von LipT, Elektronen für die LipS1/LipS2-abhängige Schwefelinsertion zu liefern, auf eine mögliche Interaktion von LipT und LbpA hingewiesen und somit ein alternativer Elektronendonator vorgeschlagen. Begründet werden kann diese Annahme in Anbetracht einer auffälligen Verteilung der Oberflächenladung von LipT im Vergleich zu Ta0516 aus *T. acidophilum* (siehe Abb. 41(A)).

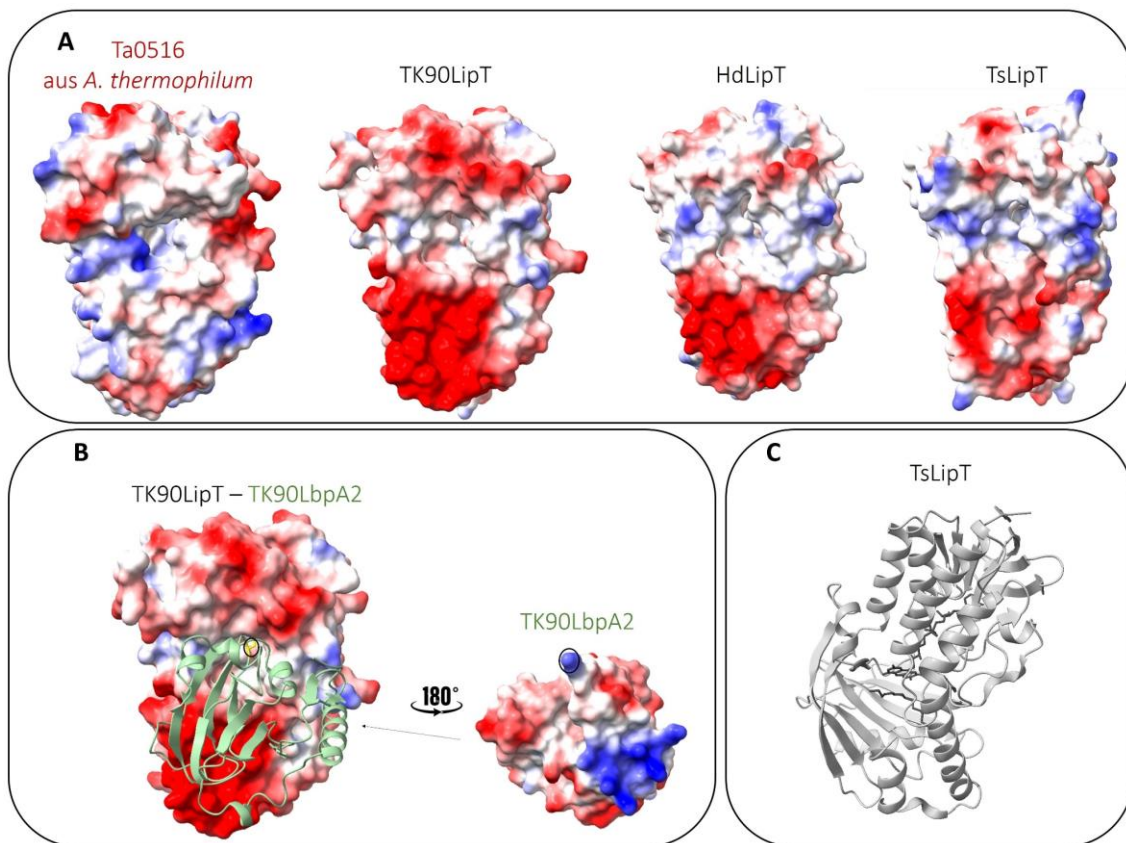


Abbildung 41: (A) Analyse der Oberflächenladungsverteilung von LipT aus *T. sp. K90mix* (TK90_0643), *H. denitrificans* (Hden_0684) sowie *T. sibirica* (ThisiDRAFT_1283) (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) im Vergleich zur Kristallstruktur der Digeranylgeranyl-Phospholipid-Reduktase (Ta0516) aus *T. acidophilum* (PDB 30Z2 (Xu et al., 2010)). Positive Ladungen sind in Blau, negative in Rot dargestellt. Neutrale Bereiche sind in Weiß gehalten. Die Ausrichtung der Proteine ist identisch. (B) AlphaFold-Vorhersage eines TK90LipT-TK90LbpA-Dimers mit markiertem Lys₇₄. (C) AlphaFill Vorhersage (Hekkelman et al., 2023) der möglichen Kofaktoren (FAD) und Liganden (C₁₄) für TsLipT. Hd, *H. denitrificans*; TK90, *T. sp. K90mix*; Ts, *T. sibirica*. Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

Ein auffälliger negativ geladener Ausschnitt der Oberfläche der LipT-Enzyme führte zu der Idee, exemplarisch einen Komplex aus TK90LipT mit TK90LbpA2 via AlphaFold (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) zu modellieren, da die LbpA-Proteine, wie oben beschrieben, einen spezifischen, positiv geladenen Ausschnitt auf ihrer Oberfläche tragen. Das Heterodimer-Modell zeigt die klare Ausrichtung des konservierten Lysinrestes K71 von TKLbpA2 hin zum aktiven Zentrum von TK90LipT (siehe Abb. 41(B)). Bei Betrachtung der Oberflächenladung des Komplexes fällt auf, dass die Kontaktflächen exakt komplementär zueinander sind. Bei der Analyse von LipT via AlphaFill (Hekkelman et al., 2023), mit dessen Hilfe potentielle Kofaktoren und Liganden prognostiziert und modelliert werden, wurde neben einem FAD-Molekül als Cofaktor inmitten des Enzyms interessanterweise ein Tetradecan an die Stelle modelliert, an der die Liponsäure lokalisiert sein müsste im Komplex zwischen TK90LipT und TK90LbpA2 (siehe Abb. 41 (B) und (C)). Ausgehend von der Hypothese, dass LbpA als Oxidoreduktase mit dem sHdr-Komplex assoziiert ist und im Rahmen der Sulfanschwefel-Oxidation die Elektronen von diesem aufnimmt, muss das reduzierte LbpA wieder reoxidiert werden, um den Zyklus zu schließen (siehe Abb. 2 (A)). Das Enzym, das diesen Schritt katalysiert, wird als Dihydrolipoyl-Dehydrogenase bezeichnet. Ausgehend von den oben genannten Ergebnissen wird im Rahmen dieser Arbeit die Idee aufgegriffen, dass LipT diese Funktion übernehmen könnte. Dazu wurde im Anaerobenzelt zunächst getestet, ob LipT dazu in der Lage ist, NADH oder NADPH zu reduzieren, d.h. um zu prüfen, ob eine Anlagerung des Nukleotids an das Enzym möglich ist und ob eine anschließende Elektronenübertragung stattfindet. Sowohl NADH (400 μ M TK90LipT + 400 μ M NADH) als auch NADPH (16 μ M TK90LipT + 500 μ M NADPH) zeigten im UV-Vis-Spektrum eine Abnahme der Absorption (innerhalb von 60 Sekunden) an der für diese Moleküle charakteristischen Wellenlänge von 340 nm (siehe Abb. 42 (A) und (B)). Ein erster Beweis einer Diaphoraseaktivität von TK90LipT *in vitro* mit TK90LbpA2 konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gesammelt werden; Im Verlauf einer kinetischen Messreihe konnte eine eindeutige Reduktion von TK90LipT anhand der abnehmenden Absorptionen bei 375 nm sowie 450 nm verzeichnet werden (siehe Abb. 42 (C)). Eingesetzt wurden 1,2 μ M TK90LipT, 0,12 μ M TK90LbpA2 sowie 500 μ M NAD⁺. D.h. eine elektronenübertragende Interaktion zwischen TK90LipT und TK90LbpA2 konnte bestätigt werden. In Zukunft sollten diese Versuche mit höheren Konzentrationen der eingesetzten Proteine im Anaerobenzelt wiederholt werden, um genauere Aussagen über die katalytische Aktivität von TK90LipT treffen zu können.

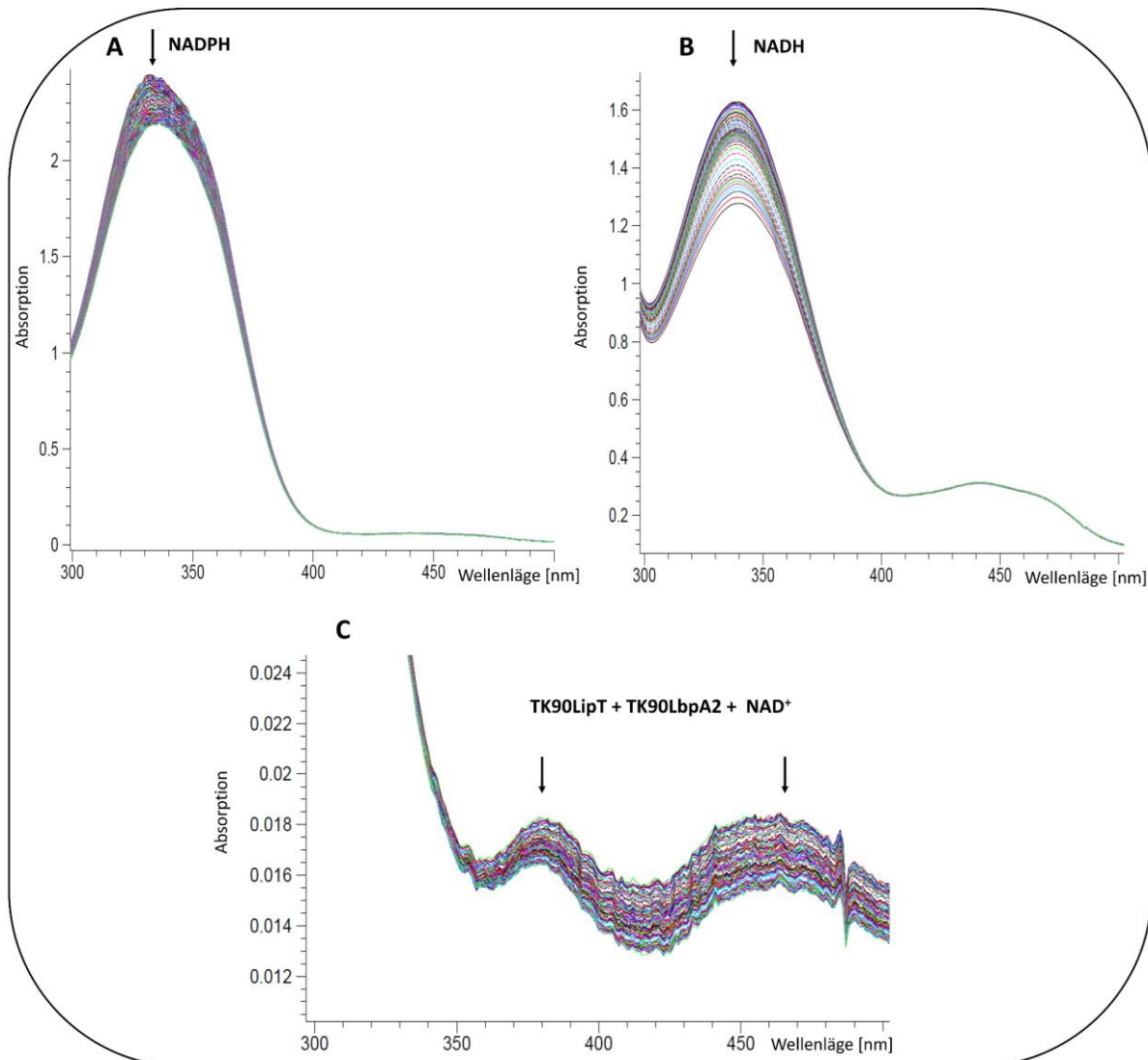


Abbildung 42: UV-Vis-Spektren im Verlauf einer mit der Zeit von TK90LipT. Die Messungen wurden automatisiert alle 0,5 Sekunden über 60 Sekunden hinweg aufgenommen. (A) 16 μM LipT wurden mit 500 μM NADPH versetzt. (B) 400 μM TK90LipT wurden mit 400 μM NADH versetzt. (C) 1,2 μM TK90LipT wurden mit 500 μM NAD^+ versetzt. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 0,12 μM TK90LbpA2 gestartet. TK90, *T. sp.* K90mix.

3.2. *In vivo* Erforschung der Liponsäureassemblierung an LbpA2 in *H. denitrificans*

Neben den Untersuchungen *in vitro* ist die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Liponsäureassemblierung an LbpA *in vivo* von großem Interesse. Zunächst konnte für *E. coli* BL21 (DE3) bestätigt werden, dass dieser zwar GcvH aus *E. coli* K12 (EcGvH) sowie aus *H. denitrificans* (HdGcvH) lipoylieren konnte, wenn der Organismus ohne IPTG-Induktion und mit Liponsäure-Supplementierung im LB-Medium angezogen wurde, TsLbpA1 sowie TK90LbpA2 hingegen wurden nicht mit Hilfe der *E. coli* BL21 (DE3)-eigenen Liponsäureassemblierungsmaschinerie modifiziert. Dazu wurden die Liponsäure-bindenden Proteine mit Hilfe ihres Tags aufgereinigt und deren Massen mittels MALDI-TOF MS analysiert (siehe Abb. 43). Die erwarteten Massen der Apoproteine EcGcvH (15.175 Da ohne

Start-Methionin) und HdGcvH_1 (15.703 Da ohne Start-Methionin) waren zu finden, jedoch dominierten die Protein-Peaks die der Masse des Holoproteins entsprechen mit entsprechend zusätzlichen 188 Da (kovalent gebundener Lipoylrest). TK90LbpA2 lag in der unbehandelten Probe wie erwartet unmodifiziert mit 16.847 Da vor, in der Probe, die aus *E. coli* BL2 (DE3) isoliert wurde, war interessanterweise die Masse des Apoproteins ohne Start-Methionin zu sehen (16.716 Da). TsLbpA1 entsprach der unbehandelten Probe und war folglich ebenfalls nicht modifiziert worden (17.893 Da).

Zusätzlich zu den rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) exprimierten Liponsäure-bindenden Proteinen, konnte eine *H. denitrificans* Austauschmutante generiert werden, in der das LbpA2 ein C-terminales His-Tag trägt (Tanabe et al., 2023). Zudem sei zu erwähnen, dass alle genannten *H. denitrificans*-Stämme, die in dieser Dissertation beschrieben werden, *tsdA*-defizient sind, d.h. den Stämmen fehlt die periplasmatische Thiosulfatdehydrogenase zur Thiosulfat-Oxidation (Koch & Dahl, 2018). Diese kann folglich ausschließlich über das trunkierte SOX-System sowie das zytoplasmatische sHdr-LbpA-System erfolgen.

In folgenden Versuchen wurde der Stamm *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ *lbpA*-His als Referenzstamm (Positivkontrolle) verwendet, der eine funktionsfähige dissimilatorische Schwefeloxidation durchführen kann. In Wachstumsexperimente wurde *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta LbpA$ als Negativkontrolle eingesetzt (Tanabe et al., 2023). Zusätzliche Mutanten, die im Verlauf der Doktorarbeit untersucht wurden, sind zum einen *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta slp(AB)$ *lbpA*-His, der das Gen für die Lipolat:Protein-Ligase sLpl(AB) fehlt (Tanabe et al., 2023), zum anderen *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta lipX$ *lbpA*-His (Thöne, 2023) ohne das hypothetische Protein LipX, das als Glutamin-Amidotransferase-ähnliches Protein annotiert ist sowie *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta soxR$ *lbpA*-His (Projektarbeit Schilling, 2024) ohne den Regulator der Genexpression der *sox*-sowie *shdr*-Gene SoxR (Repressor).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das His-getaggte LbpA2-Protein (Hden_0696) aus allen oben genannten *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ *lbpA*-His-Mutanten mittels Affinitätschromatographie isoliert und zum einen mit Hilfe des Native PAGE Mobility Gel Shift Assays und zum anderen via MALDI-TOF MS auf die Auswirkungen der genetischen Veränderungen hinsichtlich der Liponsäureassemblierung an LbpA analysiert werden.

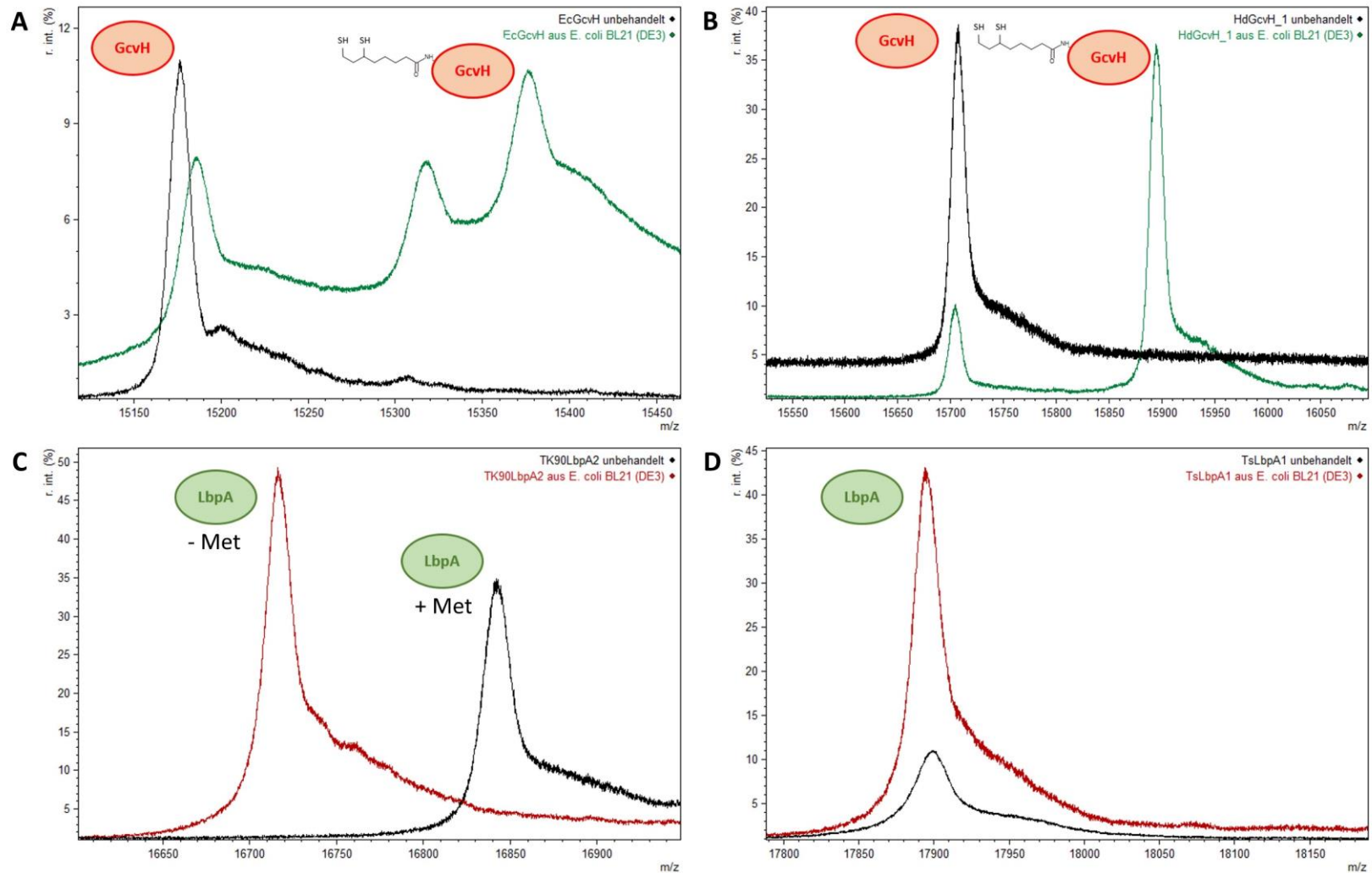


Abbildung 43: MALDI-TOF MS Spektren von unbehandeltem EcGcvH, HdGcvH_1, TK90LbpA2 sowie TsLbpA1 (schwarz) im Vergleich zu demselben Protein isoliert aus *E. coli* BL21 (DE3), der jeweils ohne IPTG-Induktion sowie mit Liponsäurezugabe im Medium angezogen wurde. Die erwarteten Massen der Apoproteine waren wie folgt: EcGcvH 15.175 Da (ohne Start-Methionin), HdGcvH_1 15.703 Da (ohne Start-Methionin), TK90LbpA2 16.847 Da mit und 16.716 Da ohne Start-Methionin, TsLbpA1 17.893 Da (mit Start-Methionin). Bei erfolgreicher Lipoylierung kamen jeweils 188 Da hinzu. Ec, *E. coli* K12; Hd, *H. denitrificans*; Met, Methionin; TK90, *T. sp.* K90mix; Ts, *T. sibirica*.

Da die Aufreinigung des LbpA-His aus den *H. denitrificans*-Stämmen über eine Ni-NTA-Agarose-Säule keine saubere Auftrennung des Zielproteins mit sich brachte, wurden im Rahmen dieser Arbeit alternative und zusätzliche chromatographische Schritte durchgeführt. Die Aufreinigung über eine Kobalt-basierte TALON-Säule mit sich anschließender Anionenaustausch- sowie zusätzlicher Größenausschlusschromatographie brachte das bestmögliche, wenn auch nicht zufriedenstellende Ergebnis. Dazu wurde nach jedem Aufreinigungsschritt ein Dot Blot mit einem Anti-His-HRP-Konjugat durchgeführt, um einzelne Fraktionen zu identifizieren, die das LbpA-His Protein enthielten, und diese daraufhin in die darauffolgende Ausreinigungsmethode einzusetzen. Zur eindeutigen Identifikation von LbpA2-His in Polyacrylamidgelen (Tricin-SDS- sowie nativen Gelen) wurde abschließend ein Western Blot mit Anti-His-HRP-Konjugat durchgeführt. Der Transfer des Proteins aus einem nativen Gel auf die Nitrocellulosemembran erforderte dazu eine Optimierung des Versuchsprotokolls. Eine Inkubation des nativen Gels mit SDS vor dem Transfer sowie die Anwesenheit von SDS im verwendeten Bjerrum-Transferpuffer waren dabei essentiell.

In Abbildung 44 sind die Aufnahmen des Western Blots sowohl einer Tricin-SDS- als auch einer Native PAGE dargestellt, auf die je ca. 2-5 µg der LbpA-His Proteine aus den Organismen *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ lbpA-His (Ref.) sowie *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta slpI(AB)$ lbpA-His nach mehreren Aufreinigungsschritten aufgetragen wurden (Abbildung modifiziert nach Tanabe et al., 2023). In einer SDS-PAGE lässt sich die Modifikation des Liponsäure-bindenden Proteins im Gegensatz zur Betrachtung in einem nativen Gel nicht feststellen. Die kalkulierte Größe des Proteins beträgt 16,3 kDa. Die detektierte Proteinband liegt in der Tricin-SDS-PAGE unwesentlich oberhalb der 17 kDa Markerbande und somit im erwarteten Bereich. Im Native PAGE Mobility Gel Shift Assay zeigt die Proteinbande des LbpA-His aus *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta slpI(AB)$ lbpA-His wie erwartet einen Shift nach oben im Vergleich zur Probe aus dem Referenzstamm, da aufgrund der fehlenden Bindung des Lipoylrestes die positive Ladung des Lysinrestes eine Verschiebung des pI des Proteins bewirkt.

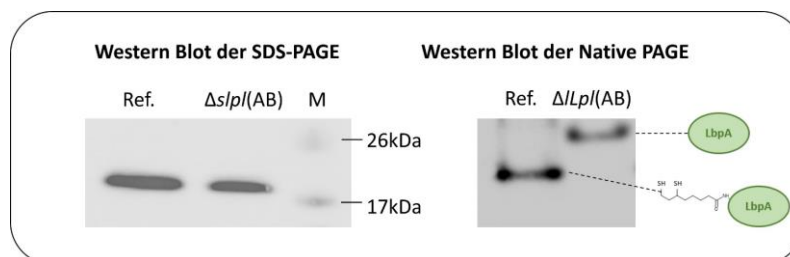


Abbildung 44: Western Blot der SDS- sowie Native PAGE, auf die je ca. 2-5 µg der LbpA-His Proteine aus den Organismen *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ lbpA-His (Ref.) sowie *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta slpI(AB)$ lbpA-His ($\Delta slpI(AB)$) nach mehreren Aufreinigungsschritten aufgetragen wurden. (Modifiziert nach Tanabe et al., 2023). M, Marker.

Die Massenspektren aller untersuchten *H. denitrificans*-Mutanten sowie des Referenzstammes aus der MALDI-TOF Massenspektrometrie sind Abbildung 45 zu entnehmen. Betrachtet man das LbpA2 Protein aus dem Referenzstamm findet man zwei Peaks, die zum einen dem Holoprotein (16.462 Da ohne Start-Methionin) plus zusätzlichen 40 Da entsprechen, zum anderen dazu noch zusätzliche 32 Da (siehe Abb. 45 (A)). D.h. neben dem kovalent gebundenen Lipoylrest als Cofaktor des Proteins bindet scheinbar ein zusätzliches Schwefelatom an unbekannter Stelle. LbpA-His aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *slpl*(AB) *lbpA*-His zeigte im Massenspektrum wie erwartet 16.274 Da (Apoprotein ohne Start-Methionin). Die Betrachtung der Masse von LbpA-His aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *lipX* *lbpA*-His erwies sich als unerwartet schwierig. Die Aufreinigung verlief identisch zu der der LbpA-Proteine aus anderen *H. denitrificans*-Mutanten, jedoch war die Intensität des Holoproteins plus 40 Da (wie LbpA-His aus dem Referenzstamm) im Massenspektrum vergleichsweise gering und wurde von vielen zusätzlichen Protein-Peaks umgeben. Eine kleine Erhöhung mit zusätzlichen 32 Da war ebenfalls zu sehen. Die Massenspektren der LbpA-Proteine aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *soxR* *lbpA*-His wurden von im Rahmen einer Bachelorarbeit (Schilling, 2024) durchgeführt (siehe Abb. 45 (C)). Da dem Stamm der Repressor SoxR fehlt - sowohl für die *sox*-Gene als auch für die *shdr*-Gene inklusive *lbpA* und der entsprechenden Gene für die Reifungsenzyme -, konnte aus ihm LbpA-His isoliert werden, ohne dass er mit Thiosulfat in Kontakt kam. Der Stamm wurde in O-Medium ausschließlich mit Methanol (24,4 mM) als Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen und dabei fiel auf, dass zwar das Holoprotein plus 40 Da zu sehen war, jedoch keine zusätzliche Masse detektiert wurde, die dem Holoprotein plus 40 Da und einem angelagerten Schwefelatom entsprach. Hatte der Organismus hingegen 2 mM Thiosulfat als zusätzliche Elektronenquelle im Medium, tauchte die erwartete zusätzliche Masse auf. Diese ließ sich durch eine Behandlung des aufgereinigten Proteins mit DTT wieder entfernen. Das nun im reduzierten Zustand vorliegende Dihydroliponamid ließ sich mittels Iodacetamid-Inkubation unter leicht alkalischen Bedingungen (pH 8,5) schrittweise zwei Carbamidomethylierungen unterziehen (jeweils plus 56 Da). Interessanterweise wurden trotz insgesamt drei im Polypeptid vorhandenen Cysteinresten keine zusätzlichen Modifikationen durch die Iodacetamid-Behandlung beobachtet. Dass in der Probe des LbpA-His, die direkt nach der Aufreinigung ohne vorherige Reduktion mit Iodacetamid inkubiert wurde, keine Modifikationen sichtbar sind, weist darauf hin, dass das Liponamid im oxidierten Zustand vorlag nach Isolation aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *soxR* *lbpA*-His.

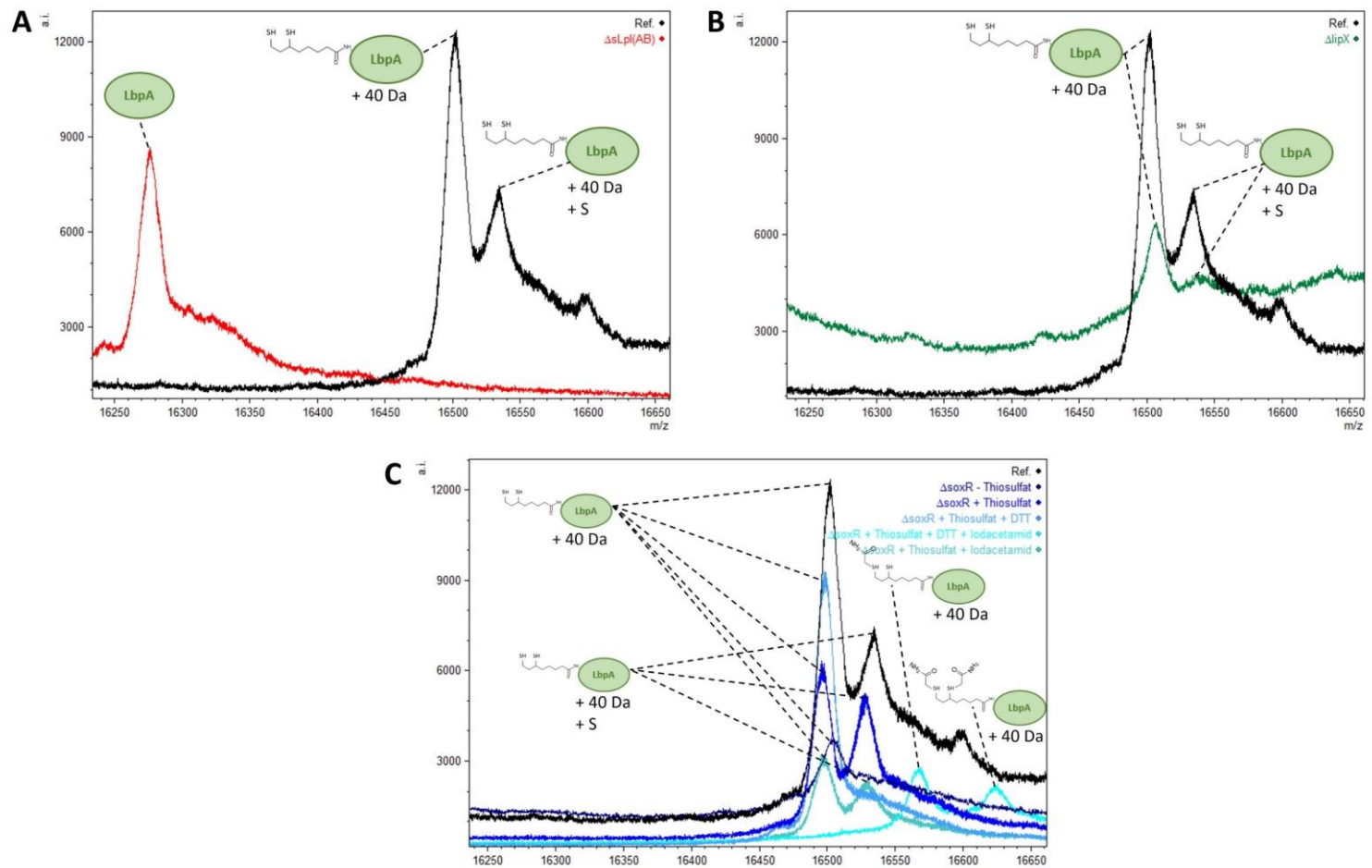


Abbildung 45: MALDI-TOF MS Spektren zur Analyse des Einflusses genetischer Manipulationen ausgewählter *H. denitrificans*-Stämme auf die Liponsäureassemblierung an LbpA2. LbpA-His wurde mittels Affinitätschromatographie aus verschiedenen *H. denitrificans*-Mutanten isoliert und in die Massenspektrometrie eingesetzt. Die erwartete Masse des Apoproteins ohne Start-Methionin lag bei 16.274 Da. Bei erfolgreicher Lipoylierung kamen 188 Da hinzu, verzeichnet wurde allerdings bei allen modifizierten Proteinen eine Masse mit zusätzlichen 40 Da. Eine zusätzliche Schwefelanlagerung führte zu einem Massenzuwachs um 32 Da. Eine Carbamidomethylierung bringt 56 kDa mit sich. Dargestellt wurden LbpA-His aus (A) *H. denitrificans* Δ slpI(AB) lbpA-His, (B) *H. denitrificans* Δ tsdA Δ lipX lbpA-His sowie (C) *H. denitrificans* Δ tsdA Δ soxR lbpA-His im Vergleich zu LbpA-His aus dem Referenzstamm *H. denitrificans* Δ tsdA lbpA-His. – Thiosulfat, Wachstum in O-Medium; + Thiosulfat, Wachstum in O-Medium und 2 mM Thiosulfat; DTT, Inkubation des aufgereinigten Proteins mit 10 mM DTT; Iodacetamid, Inkubation des aufgereinigten Proteins mit 5 mM Iodacetamid.

Zur Aufklärung der beobachteten zusätzlichen 40 Da, die am Holoprotein zu finden sind, wurde zunächst eine Sequenzierung von *lbpA*-His aus dem Genom von *H. denitrificans* Δ *tsdA lbpA*-His durchgeführt. Diese ergab keine Mutationen, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass der Massenzuwachs einem Aminosäureaustausch geschuldet ist. Um die Position der zusätzlichen Masse am Protein lokalisieren zu können, wurde ein Verdau mit Chymotrypsin mit anschließender ESI-LC-MS/MS durchgeführt. Diese Methode verlief ohne Erfolg, da keine einzelnen Peptidfragmente nicht zugeordnet werden konnten aufgrund der zu heterogenen Probe (zu viele unbekannte Proteine mit im Ansatz). In Zukunft sollte man das Ziel der Aufklärung der zusätzlichen 40 Da nochmal aufgreifen.

Die im Folgenden beschriebenen Wachstumsexperimente wurden hauptsächlich im Rahmen von dieser Doktorarbeit angegliederten Bachelorarbeiten durchgeführt; Die phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *slpl*(AB) *lbpA*-His mit Kontrollen (*H. denitrificans* Δ *tsdA lbpA*-His sowie *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *lbpA*) wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt (Vtulkin, 2022) durchgeführt, die Untersuchungen zur Thiosulfatoxidationsfähigkeit von *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *lipX lbpA*-His mit Kontrollen hingegen im Rahmen einer dem Gesamtprojekt angegliederten Projektarbeit (Schilling, 2024).

In Abbildung 46 (A) wurden die der phänotypischen Auswirkungen der Deletion von *slpl*(AB), *lipX* bzw. *lbpA2* auf die Thiosulfatoxidation in *H. denitrificans* graphisch dargestellt. In Anbetracht des Biomassezuwachs der Mikroorganismen mit der Zeit (Kreise) fällt auf, dass alle Mutanten im Vergleich zum Referenzstamm eine Verzögerung des Wachstums aufwiesen. Diese ist auf die Anwesenheit des für den Organismus toxischen Effekts des Stoffwechselzwischenprodukts Sulfid (Kästchen) zurückzuführen.

Da alle Mutanten eine signifikante Einschränkung der Thiosulfatoxidation (Dreiecke) aufweisen, konnte im Verlauf der Zeit kein Sulfid detektiert werden. Am meisten beeinflusst ist die Verstoffwechslung von Thiosulfat durch die Abwesenheit von *LbpA2*, diese ist jedoch gleichzusetzen mit der Abwesenheit von *sLpl*(AB) und somit dem fehlenden Kofaktor Liponsäure in *LbpA*. Die spezifische Thiosulfatoxidationsrate ist von $1,9 \mu\text{mol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ im Referenzstamm auf rund $0,1 \mu\text{mol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gesunken (siehe Abb. 46 (B)). Für *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *lipX lbpA*-His wurde eine reduzierte spezifische Thiosulfatoxidationsrate von rund $3,5 \mu\text{mol h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ kalkuliert.

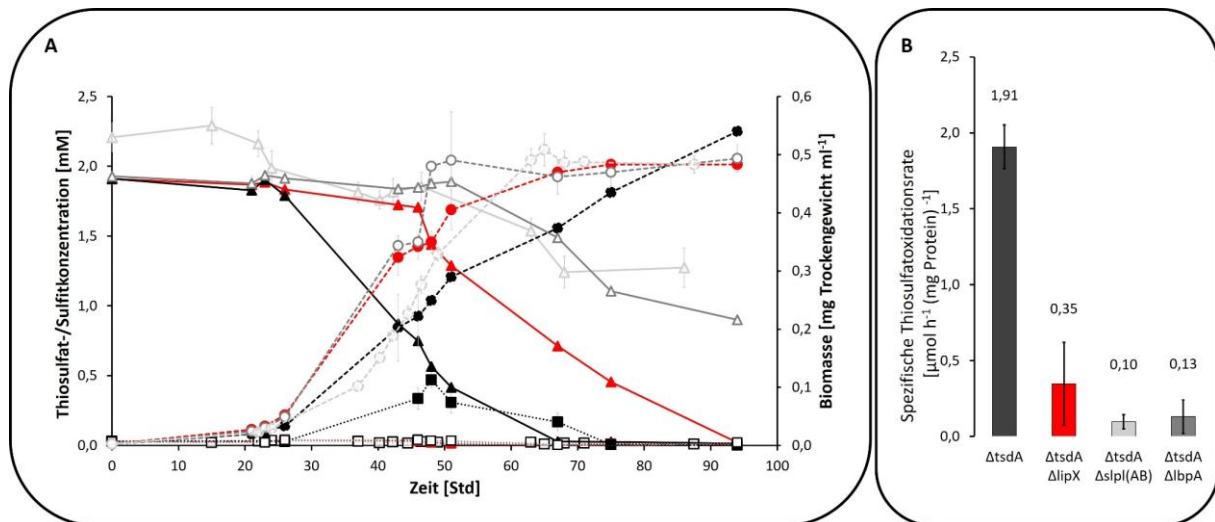


Abbildung 46: Untersuchung der phänotypischen Auswirkungen der Deletion von *spl(AB)* bzw. *lipX* auf die Thiosulfatoxidation in *H. denitrificans*. Untersucht wurden folgende Stämme: *H. denitrificans* Δ*tsdA* *lbpA*-His (Referenzstamm), *H. denitrificans* Δ*tsdA* Δ*lbpA* *lbpA*-His (Negativkontrolle), *H. denitrificans* Δ*tsdA* Δ*spl(AB)* *lbpA*-His sowie *H. denitrificans* Δ*tsdA* Δ*lipX* *lbpA*-His. (A) Dargestellt sind zum einen der Biomassezuwachs (Kreise), aber auch die Thiosulfat- (Dreiecke) und Sulfid- (Kästchen) Konzentrationen über die Zeit für vier verschiedene *H. denitrificans*-Stämme während des Wachstums auf Methanol (24,4 mM) als Kohlenstoffquelle in Gegenwart von 2 mM Thiosulfat. (B) Graphische Darstellung der spezifischen Thiosulfatoxidationsraten der untersuchten *H. denitrificans*-Stämme.

3.3. Funktion von LbpA in der dissimilatorischen Schwefeloxidation

Das aufgestellte Modell der dissimilatorischen Thiosulfatoxidation von *H. denitrificans* über das trunkierte SOX-System im Periplasma in Kombination mit dem zytoplasmatischen sHdr-LbpA-System (siehe Abb. 2 (A)) spiegelt eine mögliche Funktion von LbpA in diesem Metabolismus wider; Der kovalent gebundene Kofaktor Liponamid übernimmt dabei die Funktion des Elektronenakzeptors aus der Sulfanschwefel-Oxidation am sHdr-Komplex und überträgt diese anschließend über eine Dihydroliponamid-Dehydrogenase (DLDH) auf NAD⁺.

Eine mögliche zusätzliche Funktion, die allen bisher bekannten Liponsäure-bindenden Proteinen gemein ist, ist der Transfer von Molekülgruppen im Rahmen einer komplexen übergeordneten Reaktion (z.B. Methylamin-Übertragung auf Tetrahydrofolat beim Glycinspaltenden System, Acetyl-Übertragung auf CoA beim Pyruvatdehydrogenasekomplex). Da *in vivo* eine Masse an Lipoyl-HdLbpA2 gefunden wurde, die einem angelagerten Schwefelatom entspricht, sind Untersuchungen zur möglichen Schwefeltransferaktivität von LbpA von großem Interesse. Neben der Möglichkeit eines proteingebundenen Sulfanschwefeltransfers an einer der Thiolgruppen des Lipoylrests an LbpA von der Plasmamembran aus hin zum sHdr-Multienzymkomplex, sollte jedoch stattdessen die Bindung des beobachteten Schwefelatoms an einem der Cysteinreste des Proteins nicht außer Acht gelassen werden.

Zur Untersuchung der Persulfidierungsfähigkeit eines LbpA2-Proteins aus *T. sp. K90mix*, in dem alle vorhandenen Cysteinreste durch Alaninreste ausgetauscht wurden, wurde zunächst eine ortsspezifische Mutagenese des vorhandenen Plasmids pET22b(+)_TKLbpA2_C-Strep mittels HiFi Q5 Polymerase (NEB) durchgeführt. TK90LbpA2_C7A_C40A_C64A_C145A wurde heterolog exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend mit Polysulfid inkubiert. Die Analyse des Proteins mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie zeigte jedoch keine Schwefelanlagerungen sowohl an das Apoprotein, was zu erwarten war, als auch an das zuvor mit Hilfe von TK90sLpl(AB)_1 lipoylierte Akzeptorprotein. Neben der erfolglosen Persulfidierung von Lipoyl-TK90LbpA2_C7A_C40A_C64A_C145A konnte auch kein Schwefeltransfer von TK90TusA (TK90_0631), TK90Rhodanese (TK90_0630) oder TK90DsrE3B (TK90_0639) im Rahmen von Schwefeltransferassays verzeichnet werden. Da jedoch in der Vergangenheit durch Sebastian Tanabe (Dissertation, 2024) Schwefeltransferassays mit TK90LbpA2_C7A sowie TK90LbpA2_C145A durchgeführt wurden, ist ein direkter Vergleich möglich.

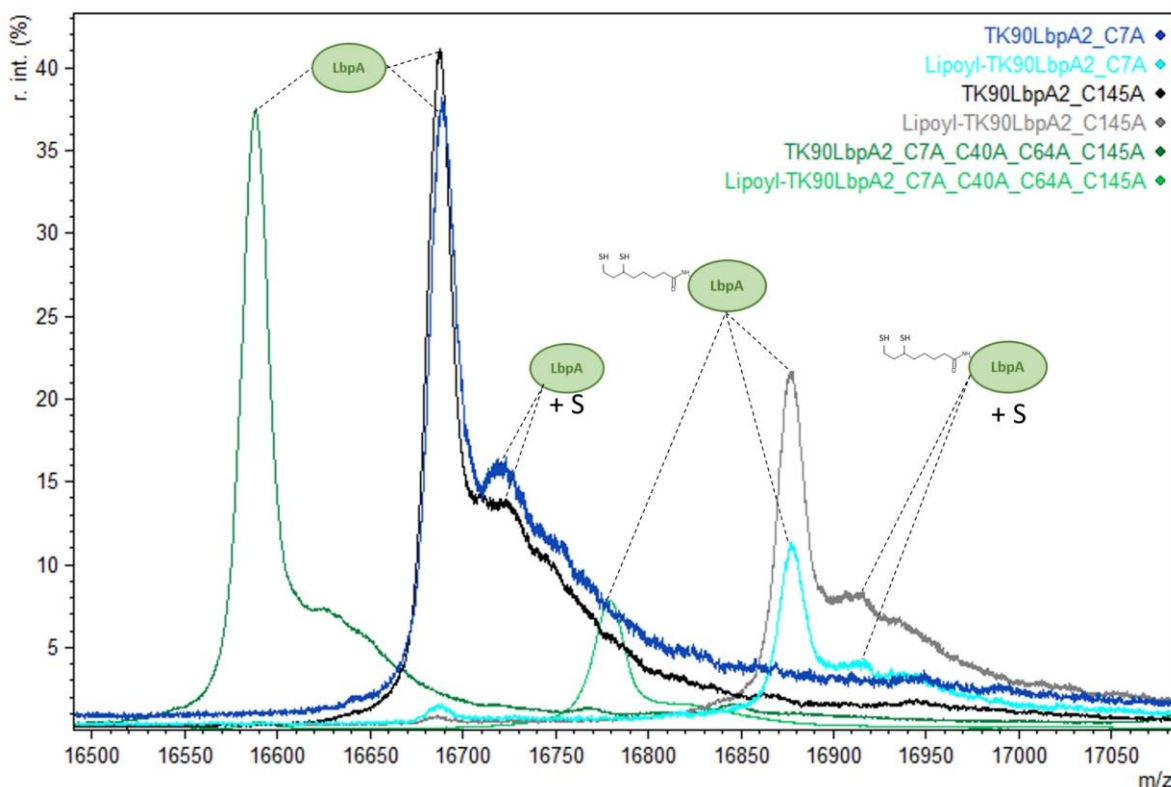


Abbildung 47: MALDI-TOF MS Spektren der Schwefeltransferassays von persulfidiertem TK90TusA auf verschiedene Cystein-Austauschvarianten von TK90LbpA2. Zur Lokalisationsaufklärung des auf TKLbA2 transferierten Schwefelatoms wurden sowohl die Apoproteine als auch die lipoylierten Proteine untersucht. Die farbliche Zuordnung der verschiedenen Akzeptorproteine ist der Legende innerhalb der Abbildung zu entnehmen. Die erwarteten Massen der Apoproteine ohne Start-Methionin lag bei 16.694 Da für TK90LbpA2_C7A sowie TK90LbpA2_C145A und bei 16.588 Da für TK90LbpA2_C7A_C40A_C64A_C145A. Bei erfolgreicher Lipoylierung kamen 188 Da hinzu. Eine zusätzliche Schwefelanlagerung führte zu einem Massenzuwachs um 32 Da. TK90, *T. sp. K90mix*.

In Abbildung 47 sind die Massenspektren der in einen Schwefeltransfer mit persulfidiertem TK90TusA eingesetzten Akzeptorproteine mit sowie ohne den Liponsäure-Cofaktor aufgeführt. Es ist eindeutig sichtbar, dass auf die beiden Cystein-Austauschvarianten C7A sowie C145A jeweils ein Schwefelatom transferiert wurde unabhängig von der Anwesenheit des Cofaktors. Fehlten hingegen alle Cysteine in TK90LbpA2 war kein Schwefeltransfer mehr möglich – auch nicht mit Anwesenheit des Lipoylrests.

3.4. Etablierung eines CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesewerkzeugs für *H. denitrificans*

Wie zuvor beschrieben, ist die Untersuchung der dissimilatorischen Schwefeloxidation von *H. denitrificans* von großem Forschungsinteresse und insbesondere die Frage nach der Funktion einzelner Genprodukte *in vivo* stellt die Wissenschaftler/innen immer wieder vor Herausforderungen. Die zielgerichtete Mutagenese von *H. denitrificans* ist zwar grundsätzlich möglich, nimmt jedoch meist viel Zeit in Anspruch und ist mit ihrer geringen Effizienz verbesserungswürdig. Im Verlauf dieser Doktorarbeit konnten z.B. trotz mehrfacher Bemühungen keine *H. denitrificans*-Deletionsmutanten für die Gene *lipS1*, *lipS2* sowie *lipT* generiert werden. Aufgründessen wurde bereits im Rahmen einer Masterarbeit (Flegler, 2021) mit der Etablierung eines CRISPR/Cas9- basierten Mutagenesesystems begonnen. Während das Konzept des gesamten Systems im Rahmen dieser Doktorarbeit erarbeitet wurde, wurden die Klonierungsarbeiten des grundlegenden Plasmids pHD_Cas9_NT sowie des spezifisch auf die in-frame Deletion der Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB) (Hden_0686) angepassten Plasmids pHD_Cas9_TsLpl(AB)_ΔsLpl(AB) teilweise im Verlauf dieser Arbeit, teilweise im Rahmen von Bachelorarbeiten durchgeführt (Thöne, 2023; Schilling, 2024; siehe Plasmidübersicht in 2.1.5.).

3.4.1. Konstruktion des Plasmids pHD_Cas9_NT als Grundlage des CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesesystems für *H. denitrificans*

Unsere Arbeit basierte auf dem pBBR_Cas9_NT-Vektor (Mougiakos et al., 2019), der das *cas9*-Gen enthält, das für *Cereibacter sphaeroides* (ehemals *Rhodobacter sphaeroides* (Hördt et al., 2020; Suresh et al., 2015)) Codon-optimiert ist. Das Vektorrückrad stammt aus dem Broad-Host-Vektor pBBR1MCS2, der in *H. denitrificans* elektroporiert werden kann und dort replikationsfähig ist (Cao et al., 2018). Die Expression des *cas9*-Gens stand unter der Kontrolle des *plac*-Promotors, der aufgrund des Fehlens des *lacI*-Repressorgens im *H. denitrificans*-Genom eine konstitutive Transkriptionsaktivität vermittelt.

In Anbetracht des bekannten Codon-Gebrauchs von *H. denitrificans* und *C. sphaeroides* (siehe Tab. A4 im Anhang (Nakamura et al., 2000)) und der vergleichenden Analyse der in pBBR_Cas9_NT verwendeten Codons für die Aminosäuren, die sich im Codon-Gebrauch zwischen den beiden Organismen unterscheiden, wurde festgestellt, dass es nur eine kritische Aminosäure gibt; Das verwendete Codon CGG für Arginin wird in *H. denitrificans* nur in 15% der Fälle genutzt (siehe Tab. 13). Es gibt insgesamt 77 Argininreste in Cas9, was 5,6 % der gesamten Aminosäuresequenz ausmacht. Alle anderen im Plasmid verwendeten Codons im *cas9*-Gen werden in *H. denitrificans* in mindestens 27% der Fälle natürlicherweise für die Aminosäuren der exprimierten Peptide vom Organismus eingesetzt.

Tabelle 13: Vergleich ausgewählter Codons, die sich im Gebrauch von *H. denitrificans* und *C. sphaeroides* unterscheiden, und in pBBR_Cas9_NT zur gewünschten Expression des *cas9*-Gens eingesetzt wurden.

Aminosäure	Verwendetes Codon in pBBR_Cas9_NT	Codon-Gebrauch in <i>H. denitrificans</i> im Vergleich zu anderen möglichen Codons für die gleiche Aminosäure
Glutamat	GAG	44 %
Valin	GTT	27 %
Lysin	AAA	42 %
Threonin	ACG	54 %
Arginin	CGG	15 %
Glutamin	CAG	63 %

Zusätzlich enthält das Plasmid pBBR_Cas9_NT die Promotorsequenz von BBa_J95023, eine sgRNA sowie den Terminator von BBa_J95029. Dieses Gesamtkonstrukt musste optimiert werden, da die sgRNA möglicherweise nicht in *H. denitrificans* transkribiert werden würde.

Diese Optimierung wurde zunächst *in silico* geplant (siehe Abb. 48 (A)). Die mutmaßliche Promotor- sowie Terminatorsequenz des *H. denitrificans*-Gens für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Hden_2446) wurde ausgewählt, da dieses Protein bekanntermaßen mit am häufigsten in *H. denitrificans* exprimiert wird und diese Häufigkeit nicht durch die Anwesenheit von Dimethylamin oder Dimethylsulfid beeinflusst wird (Koch & Dahl, 2018). Innerhalb der 200 Nukleotide stromaufwärts des ATG-Startcodons wurde mit Hilfe des SAPHIR-Tools (Coppens & Lavigne, 2020) folgende Promotorregion (-35 und -10) vorhergesagt: 5'-CCGATCTTTCTTCCTGATCTGGAGGATTCCTAAGAATG-3'.

Stromabwärts des TAA-Stoppcodons wurden 86 Bp ausgewählt, die die Transkriptionsterminationssequenz enthalten; Für folgende Sequenz wird von ARNold (Naville et al., 2011) ein rho-unabhängiger Transkriptionsterminator vorhergesagt:

5'-GACGGGCGCCCTGATCGGCGCCCGTC-3'.

Ergebnisse

Der nicht zielgerichtete Non-Targeting (NT-)-Spacer von pBBR_Cas9_NT, der an jedem Ende eine BsaI-Erkennungsstelle enthält, blieb unverändert. Es wurde mittels Nukleotid-BLAST-Analyse (megaBLAST) bestätigt, dass der Protospacer-Kandidat im Genom von *H. denitrificans* mindestens 6 Fehlanpassungen in der Nicht-Seed-Region (die 12 PAM-distalen Nukleotide) und mindestens 2 zusätzliche Fehlanpassungen in seiner Seed-Region (die 8 PAM-proximalen Nukleotide) enthält. Dabei sind maximal 10 Nukleotide zusammenhängend innerhalb der 20 Nukleotide der NT-Sequenz komplementär zur genomischen DNA von *H. denitrificans*.

Zusätzlich wurde die „sgRNA(F+E) combined“-Sequenz nach Chen et al. für die tracrRNA (gRNA-Scaffold) ausgewählt, da sie eine effiziente Cas9-Beladung und Editierung garantiert (B. Chen et al., 2013).

Ein synthetisches Konstrukt, das die gesamte sgRNA enthält, d.h. den Hden_2446-Promotor, die optimierte sgRNA sowie den Hden_2446-Terminator, wurde als XbaI/SmaI-Fragment von der Firma BioCat GmbH synthetisiert (Nukleotidsequenz siehe A3 im Anhang) und im pUC19-Vektor bereitgestellt (siehe Abb. 48 (B)). In das Fragment wurde eine MfeI-Restriktionsschnittstelle unmittelbar vor der XbaI-Erkennungssequenz für folgende Klonierungsarbeiten eingefügt.

pUC19-sgRNA_optimized wurde zur Lagerung und Amplifikation in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Anschließend wurden sowohl dieses Plasmid, das das oben beschriebene, optimierte Konstrukt enthält (siehe Abb. 48 (B)), sowie pBBR_Cas9_NT (siehe Abb. 48 (C)) mit MfeI und SmaI verdaut. Das sgRNA-Konstrukt mit Promotor- und Terminatorsequenz sowie das linearisierte pBBR_Cas9_NT-Plasmid wurden mit der T4-DNA-Ligase (NEB) ligiert, wodurch pBBR-Cas9_NT_sgRNA_optimized (siehe Abb. 48 (D)) entstand.

Dieses Plasmid wiederum wurde mit der Blunt-End-Restriktionsendonuklease BstZ17I verdaut und die Tetracyclin-Resistenz aus pHP45 Ω -Tc (siehe Abb. 48 (E)), geschnitten mit SmaI, wurde eingefügt, sodass das abschließende Plasmid pHD_Cas9_NT entstand (siehe Abb. 48 (F)). Dieses bildet die Grundlage für alle folgenden CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesevorhaben in *H. denitrificans*-Stämmen.

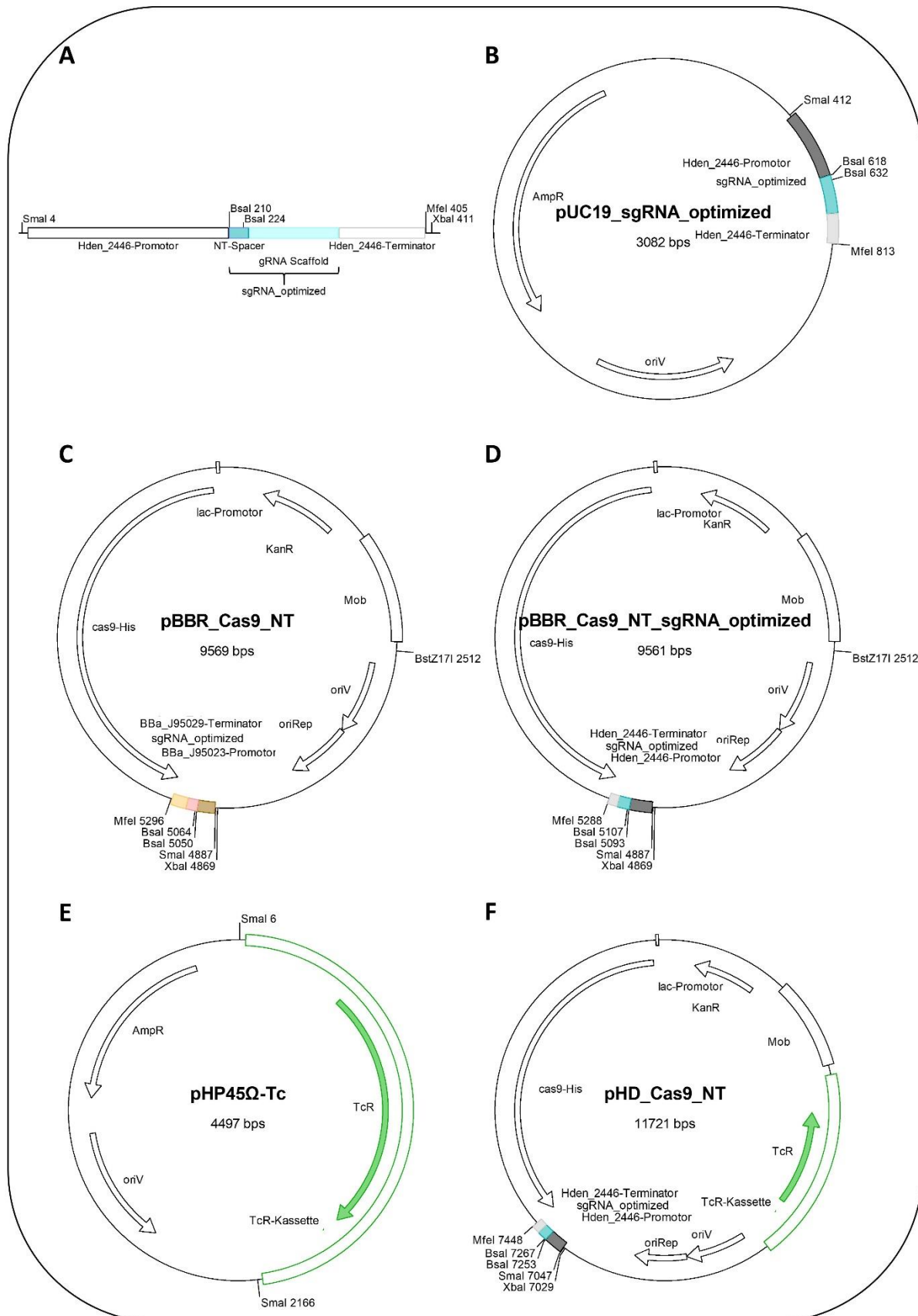


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pHD_Cas9_NT. Mittels Ligation eines synthetischen, für *H. denitrificans* optimierten sgRNA-Konstrukts (**A**) (BioCat GmbH), das in einem pUC19-Vektor bereitgestellt wurde (**B**), und dem Plasmid pBBR_Cas9_NT (**C**) (Mougiakos et al., 2019), die zuvor beide mit SmaI und MfeI verdaut wurden, entstand das Plasmid pBBR_Cas9_NT_sgRNA_optimized (**D**). Ein Tetracyclinresistenzgen wurde mit SmaI aus pHP45 Ω_Tc (**E**) herausgeschnitten und in die BstZ171-Restriktionsschnittstellen von (**D**) eingebaut. Das endgültige Plasmid pHD_Cas9_NT (**F**) bildet die Grundlage für die CRISPR/Cas9-basierte Mutagenese in *H. denitrificans*.

3.4.2. Konstruktion von pHD_Cas9-Plasmidvarianten zur gezielten Mutagenese in *H. denitrificans*

Die Konstruktion von pHD_Cas9-Varianten zur gezielten Mutagenese von *H. denitrificans* wird hier am Beispiel einer gewünschten in-frame Deletion von *Hdspl(AB)* (Hden_0686) beschrieben. Zunächst wurde durch die Anwendung des Online Tools ChopChop (Labun et al., 2019) eine Zielsequenz innerhalb des Gens von Interesse herausgesucht, die eine möglichst hohe prognostizierte Effizienz aufwies. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit bereits zusätzlich zur geplanten Deletion von *spl(AB)* der Plan für die Deletion der Gene *lipS1* (Hden_0683), *lipT* (Hden_0684), *lipS2* (Hden_0685) sowie *lipX* (Hden_0687) aufgestellt wurde, sind in Tabelle 14 alle ausgewählten Zielsequenzen mit entsprechender kalkulierter Effizienz aufgelistet.

Tabelle 14: Ausgewählte Targetingsequenzen, die sich unmittelbar stromaufwärts einer PAM-Sequenz befinden (NGG) mit prognostizierter Effizienz in *H. denitrificans* (ChopChop Online-Tool (Labun et al., 2019)).

Zielgen	Locus-Tag	Targeting-Sequenz (5'-3')	Effizienz
<i>lipS1</i>	Hden_0683	GTTCAAGTCCTACAACAGCG	77,2 %
<i>lipT</i>	Hden_0684	ACGTTTCGTGGAAGACGAGGG	75,3 %
<i>lipS2</i>	Hden_0685	TGAGTACGTTCAAATGTCTCGA	66,6 %
<i>spl(AB)</i>	Hden_0686	ATTCACGAAGCTATTCTGCG	76,6 %
<i>lipX</i>	Hden_0687	GATGATGGAAGATCTCGTCA	70,5 %

Diese Sequenzen wurden als zwei, zueinander revers komplementärer Oligonukleotide mit entsprechenden Überhängen, die zum Plasmid pHD_Cas9_NT (nach BsaI-Verdau) komplementär sind, von Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

In vitro begann die Konstruktion des Plasmids pHD_Cas9_T*spl(AB)*_Δ*spl(AB)* mit der Amplifikation des Reparaturfragments Δ*spl(AB)* via Splicing by Overlap Extension (SOE)-PCR (siehe Abb. 49 (A)). Mit Hilfe von Primer-Überhängen wurden XbaI-Restriktionsschnittstellen sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende eingefügt, um es anschließend in das Plasmid pHD_Cas9_NT (siehe Abb. 49 (B)) ligieren zu können.

Daraufhin wurde das Golden Gate Assembly (GGA) zum Austausch des Non-Targeting-Spacers in pHD_Cas9_Δ*spl(AB)* (siehe Abb. 49 (C)) mit der Zielsequenz *Tspl(AB)* durchgeführt. Diese Methode wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit (Hartenfels, 2022) optimiert (siehe 2.3.9.). Zur Vorbereitung wurden die synthetischen Oligonukleotide zur Herstellung der doppelsträngigen Zielsequenz zunächst mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase

phosphoryliert und miteinander verbunden (siehe 2.3.9.) (siehe Abb. 49 (D)). Durch die Kombination aus Restriktionsverdau mit BsaI, das durch seine Besonderheit, außerhalb der eigentlichen Erkennungssequenz zu schneiden, dazu eingesetzt wird, den Non-Targeting-Spacer zu entfernen, ohne zueinander komplementäre Nukleotid-Überhänge innerhalb des Plasmids zu generieren, und der zeitgleich ablaufenden Ligation mit den eingesetzten doppelsträngigen Oligonukleotide (Targeting-Sequenzen), ist diese Methode verhältnismäßig einfach durchzuführen, effizient und schnell. Der GGA-Ansatz wurde anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert und mit Hilfe eines Kontrollverdaus mit BsaI, das in pHD_Cas9_Tslpl(AB)_ Δ slpl(AB) (siehe Abb. 49 (E)) keine Schnittstelle mehr findet, verifiziert.

Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass die Reihenfolge bei beiden oben genannten Klonierungsschritten nur dann redundant ist, wenn sich im Reparaturfragment keine BsaI-Schnittstelle befindet. Anderenfalls muss das GGA als erstes durchgeführt werden.

Damit waren die Klonierungsarbeiten zur Vorbereitung auf die Elektroporation von pHD_Cas9_Tslpl(AB)_ Δ slpl(AB) in *H. denitrificans* abgeschlossen.

3.4.3. Ablauf der gezielten Mutagenese in *H. denitrificans* mittels Elektroporation der generierten pHD_Cas9-Plasmide

Das endgültige Plasmid pHD_Cas9_Tslpl(AB)_ Δ slpl(AB) wurde durch Elektroporation in *H. denitrificans* Δ tsdA Δ soxR *lbpA*-His übertragen. Die Erholungszeit bei 30 °C vor dem Ausplattieren wurde von 6 auf 16 Stunden verlängert. Die Auswahl der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen der elektroporierten Zellen auf O-Medium-Agar mit den Antibiotika Streptomycin, Chloramphenicol und Tetracyclin. Die Platten wurden bei 30 °C für bis zu 14 Tage inkubiert. Der Genotyp des in dieser Studie erzeugten *H. denitrificans* Δ tsdA Δ soxR Δ slpl(AB) *lbpA*-His wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit mittels PCR bestätigt (Schilling, 2024).

Der forcierte Verlust des pHD_Cas9-Plasmids nach erfolgreicher Mutagenese der positiven *H. denitrificans*-Mutante steht noch aus. Dieser Verlust wird durch eine Aufhebung des Selektionsdrucks induziert, d.h. durch mehrfache Passagierung der Zellen in O-Medium ohne Tetracyclin für je drei Tage. Die Zellen werden anschließend verdünnt auf Tetracyclin-freie Agarplatten verteilt. Einzelne Kolonien werden daraufhin auf Agar mit und ohne Tetracyclin

überführt; Diejenigen Zellen, die ohne Antibiotikum wuchsen, in Gegenwart von Tetracyclin jedoch nicht, gelten als Plasmid-frei. Eine abschließende Überprüfung kann via PCR mit Primern auf das *cas9*-Gen erfolgen.

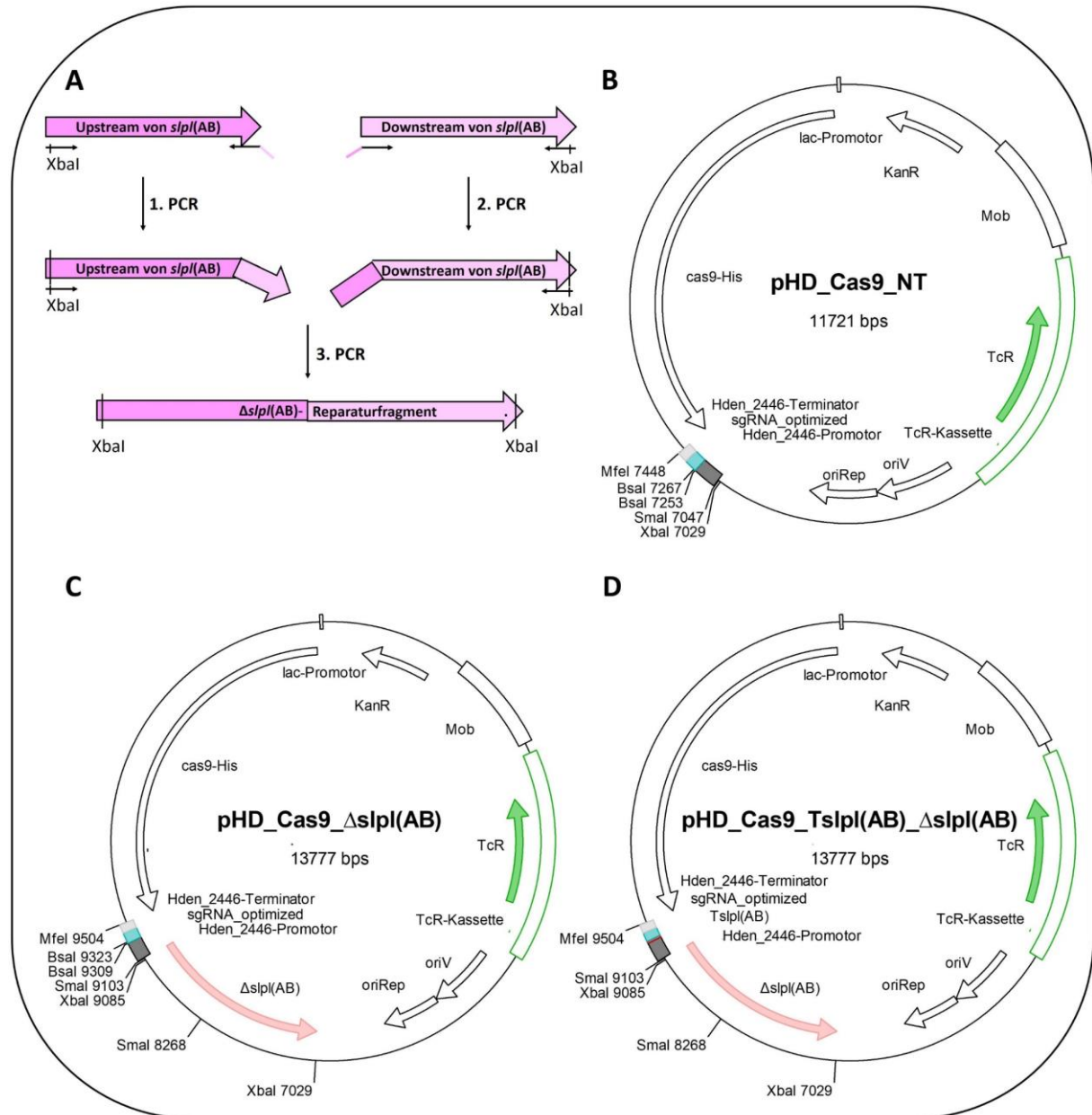


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pHD_Cas9_TsIpl(AB)_ΔsIpl(AB). Insertion des via SOE-PCR generierten Reparaturfragments ΔsIpl(AB) (A) in in die XbaI-Restriktionsschnitten von pHD_Cas9_NT (B), sodass pHD_Cas9_ΔsIpl(AB) (C) entstand. Das Golden Gate Assembly (GGA) wurde zum Austausch der Non-Targeting-Sequenz aus pHD_Cas9_ΔsIpl(AB) (C) mit der spezifischen Targeting-Sequenz TsIpl(AB) (D) (BioCat GmbH) durchgeführt. Daraus resultierte das Plasmid pHD_Cas9_TsIpl(AB)_ΔsIpl(AB) (E), das im Folgenden in *H. denitrificans* elektroporiert werden konnte, um eine gezielte Deletion von *sIpl(AB)* zu erzielen.

4. Diskussion

Diese Doktorarbeit befasste sich mit der detaillierten Untersuchung der Enzyme, die an der Liponsäure-Assemblierung an den Liponsäure-bindenden Proteinen LbpA beteiligt sind, mit dem Ziel, die spezifischen Charakteristika dieses Prozesses im Vergleich zur bereits erforschten Assemblierungsmaschinerie zu beleuchten. Die Untersuchung der kanonischen Maschinerie wurde durch die Analyse der Lipoylierung des Proteins H aus dem Glycin-spaltenden System (GcvH) veranschaulicht. Zu den analysierten Enzymen gehören die Lipoat:Protein-Ligasen Lpl(AB) und sLpl(AB), die Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 im Vergleich zu LipA, die FAD-abhängige Oxidoreduktase LipT sowie das als Glutamin-Amidotransferase-ähnliche Protein annotierte LipX. Die durchgeführten Untersuchungen sind von besonderer Relevanz, da bislang keine spezifischen Eigenschaften und Mechanismen der beteiligten Enzyme bekannt waren. Insbesondere fehlten fundierte Erkenntnisse darüber, wie die Enzyme sLpl(AB) und Lpl(AB) die unterschiedlichen Liponsäure-bindenden Akzeptorproteine LbpA und GcvH in ihren jeweiligen Liponsäure-Assemblierungswegen als Substrate erkennen und unterscheiden können.

4.1. Neue Erkenntnisse zu spezifischen Eigenschaften der beiden Liponsäure-bindenden Proteintypen GcvH und LbpA

Aus vorausgegangenen Arbeiten ist unter anderem bekannt, dass LbpA-Proteine das GcvH-Protein in *B. subtilis* funktionell nicht ersetzen können; Eine Komplementation von GcvH in *B. subtilis* Δ gcvH mit TsLbpA1 (ThisiDRAFT_0958) und HdLbpA2 (Hden_0696) führte dabei zu keinem Wachstum der Zellen (Cao et al., 2018). Zur Aufklärung der Ursache dieser Beobachtung wurden zunächst bioinformatische Analysen durchgeführt und anschließend biochemische Methoden angewandt, um zunächst die spezifischen Eigenschaften der beiden Liponsäure-bindenden Proteintypen GcvH und LbpA zu ergründen.

In Abbildung 15 sind die Gencluster und deren Umgebung der im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten, repräsentativen Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae dargestellt, die die Anordnung der genetischen Kodierung oben beschriebener Proteine veranschaulichen. Auffällig ist, dass oftmals mehr als ein LbpA-Protein in den einzelnen Organismen kodiert ist. GcvH-Proteine können ebenfalls in mehrfacher Ausführung vorliegen. Der Grund für das Vorhandensein von verschiedenen LbpA-Proteinen bei Schwefeloxidierern

ist bisher unklar. Eine Hypothese ist, dass mehr als ein LbpA-Monomer im sHdr-LbpA-Komplex funktional aktiv sein könnte (Tanabe et al., 2023), ähnlich den Lipoat-bindenden E2-Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexe, die bis zu drei Lipoyl-Domänen enthalten (Kok et al., 1998). Möglicherweise kam es zu einer Genduplikation, die eine effizientere Proteinaktivität ermöglichte, gefolgt von einer unabhängigen Evolution der beiden Gene.

Neben der fast identischen strukturellen Anordnung der Aminosäuren innerhalb der Tertiärstruktur von GcvH- und LbpA-Proteinen konnten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Eigenschaften der Polypeptide herausgestellt werden, die jeweils einzigartig sind; Zum einen fallen zwei konservierte Cysteinreste am C- und N-Terminus in LbpA-Proteinen auf, die es in GcvH-Proteinen nicht gibt, zum anderen gibt es konservierte geladene Aminosäuren, die in den zwei Protein-Typen jeweils komplementär vorliegen und somit eine signifikant unterschiedliche Oberflächenladung verursachen. Dabei fielen zudem Unterschiede innerhalb der LbpA-Proteine auf, die bereits zuvor als LbpA1 und LbpA2 beschrieben wurden (Cao et al., 2018; Tanabe et al., 2023), zu denen es bisher jedoch keine detaillierte Aufklärung der für diese Trennung verantwortlichen Aminosäuren gab. Diese Unterschiede sind in Abbildung 17 dargestellt und beziehen sich auf folgende Positionen (bezogen auf HdLbpA2): An Position 2 und 37 stehen in LbpA1-Proteinen negativ geladene Aminosäuren, in LbpA2-Proteinen sind hingegen neutrale oder hydrophobe Aminosäuren kodiert. An Position 50 besitzen LbpA1-Proteine Threoninreste, LbpA2-Proteine Argininreste. An Position 77 sind in LbpA1-Proteinen basische Aminosäuren kodiert, während LbpA2-Proteine einen Prolinrest aufweisen; An Position 147 sind in LbpA1-Proteinen geladene Aminosäuren kodiert (bis auf aq_1657 alle basisch), die meisten LbpA2-Proteine enden hingegen bereits ein bis zwei Aminosäuren zuvor. Die C- und N-terminal geladenen Aminosäuren bei LbpA1-Proteinen direkt angrenzend zu den konservierten Cysteinresten, die basierend auf Strukturvorhersagen dazu in der Lage sein sollten, unter oxidativen Bedingungen eine intramolekulare Disulfidbrücke auszubilden (Sun et al., 2017), könnten dabei für eine gesteigerte Stabilität ebendieser Verbindung sorgen. Diese Stabilisierung durch komplementär geladene Aminosäuren innerhalb der Seitenketten können dabei ungünstigen elektrostatischen Eigenschaften entgegenwirken (Bordo & Argos, 1994).

Eine Oligomerisierung (hauptsächlich Dimerisierung) von GcvH-Proteinen wurde bereits beschrieben. Entgegen der Vermutung, dass Cysteine an einer intermolekularen Disulfidbrücke beteiligt sein könnten (Kochi & Kikuchi, 1974), wurde z.B. GcvH aus *Thermus thermophilus*

als Homodimer kristallisiert, obwohl es in seiner Aminosäuresequenz keine Cysteine besitzt (Nakai et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls in der Größenausschlusschromatographie beobachtet, dass GcvH-Proteine als Dimer eluieren. Die beobachteten Massen für die LbpA-Proteine passen nicht immer zu den kalkulierten und liegen zum Teil genau zwischen der kalkulierten Masse eines Monomers und eines Dimers. Eine Erklärung dafür könnte eine kompaktere Form der Dimere oder eine weniger kompakte Konformation der Tertiärstruktur des Monomers sein aufgrund der C- und N-terminalen Elongationen, die durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen C₇ und C₁₄₅ stabilisiert wird. Unter den reduzierenden Bedingungen, die während der Größenausschlusschromatographie herrschten, könnten diese Elongationen ungeordneter vorliegen und zu einem langsameren Elutionsverhalten führen. Zudem tendierten LbpA-Proteine im Vergleich zu GcvH-Proteinen zur Ausbildung höherer Oligomere.

4.2. Interaktion zwischen Liponsäure-bindenden Proteinen und Lipoat:Protein-Ligasen durch die Anziehungskraft komplementärer Oberflächenladungen

Ein zentrales Forschungsziel dieser Dissertation war es, die Substratspezifität der Enzyme zu charakterisieren, das die initiale Reaktion der Liponsäure-Assemblierung katalysiert, nämlich die Lipoat:Protein-Ligasen.

Bereits 2014 wurden *in vivo* Untersuchungen zur Unterscheidung der kanonischen und der neuartigen Liponsäureassemblierung in *E. coli* durchgeführt (Cao et al., 2018); Komplementationen der Lipoat:Protein-Ligase Lpl(AB) in *E. coli* $\Delta lpl(AB)$ $\Delta lipB$ mit HdsLpl(AB) (Hden_0686) sowie TK90sLpl(AB)_1 (TK90_0642) führten zu keinem Wachstum der Zellen, sodass eine Substratspezifität der eingesetzten Lipoat:Protein-Ligasen hinsichtlich LbpA-Proteinen bereits zu diesem Zeitpunkt postuliert wurde, auch wenn der Mechanismus zu diesem Zeitpunkt unklar war.

Basierend auf den bioinformatischen Erkenntnissen wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, indem die Lipoylierungsreaktion von fünf unterschiedlichen Lipoat:Protein-Ligasen mit insgesamt 16 verschiedenen Liponsäure-bindenden Proteinen in allen möglichen Kombinationen durchgeführt wurde. Im Native PAGE Mobility Gel Shift Assay konnte bestätigt werden, dass eine klare Substratspezifität der Lipoat:Protein-Ligasen besteht; EcLpl(AB) katalysiert ausschließlich die Lipoylierung von GcvH-Proteinen (mit nur einer Ausnahme; TKLbpA1), während sLpl(AB)-Enzyme mit nur einer Ausnahme

(TK90sLpl(AB)_1 mit HdGcvH_1) ausschließlich LbpA-Proteine als Substrate erkennen. Prozentual betrachtet erkannte EcLpl(AB) 75% aller untersuchten GcvH-Proteine der repräsentativen Mikroorganismen als Substrat, alle sLpl(AB)-Enzyme zusammengefasst erkannten hingegen nur 3% der GcvH-Proteine. Im Kontrast dazu katalysieren sLpl(AB) die ATP-abhängige Lipoylierung der LbpA-Substrate in großem Maßstab Spezies-übergreifend (siehe Abb. 28 und 30); rund 75% aller LbpA1-Proteine sowie 58% aller LbpA2-Proteine wurden lipoyliert. Für sLpl(AB)-Enzyme konnte zudem verifiziert werden, dass sie ebenso wie kanonische Lpl(AB)-Enzyme nicht nur eine Lipoylierungsaktivität aufweisen, sondern auch freie Oktansäure als Substrat an Liponsäure-bindende Proteine ligieren können (Green et al., 1995; Morris et al., 1994, 1995; Zhao et al., 2003).

Gelegentlich sind undefinierte Banden von Liponsäure-bindenden Proteinen in der Native PAGE aufgetreten. Manche Proteine tendieren dazu grundsätzlich mehr als andere. TKLbpA1 z.B. konnte trotz mehrfacher Wiederholung nicht als Bande auf einem nativen Gel visualisiert werden. Die Schnelligkeit des Auftrags auf die Native PAGE nach der *in vitro* Ligation scheint jedoch ebenfalls einen Einfluss auf dieses Phänomen zu haben, sodass in Zukunft darauf geachtet werden sollte, unnötige Wartezeiten im Verlauf des Experiments zu vermeiden.

Auf der Suche nach möglichen Eigenschaften, die eine Substratspezifität ausmachen könnten, fielen neben der Oberflächenladungsverteilung zwei hoch konservierte Cysteine auf, die sich C- und N-terminal der LbpA-Proteine befinden (siehe Abb. 16 und 17). Diese sind in der Strukturvorhersage nur 1,77 Å voneinander entfernt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich im oxidierten Zustand eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden wird (Sun et al., 2017). Mit Hilfe von Native PAGE Mobility Gel Shift Assays wurde gezeigt, dass ein Austausch der beiden oben genannten Cysteinreste zu Alanin, sowohl einzeln als auch in Kombination, nicht zu einer Veränderung der Substratspezifität führte. Diese Aminosäuren sind dennoch von hohem Interesse, da im Rahmen von Wachstumsexperimenten an *H. denitrificans*-Mutanten, denen entweder C₇ oder C₁₄₅ im LbpA2-Protein fehlten, eine signifikant reduzierte Schwefeloxidationsrate bei Wachstum mit 2 mM Thiosulfat im Medium aufwies (Faßbender, 2019).

Aufgrund des zuvor beschriebenen charakteristischen, positiv geladenen Oberflächenausschnitts von LbpA-Proteinen, an dessen Position GcvH-Proteine negativ geladen sind, wurde die Theorie aufgestellt, dass die Interaktion zwischen Lipoat:Protein-Ligasen und den

entsprechenden Lipoyl-Akzeptorproteinen auf einer komplementären Oberflächenladung beruht. Die entsprechend positiv geladene Oberfläche in der Nähe des aktiven Zentrums von EcLpl(AB) ist eindeutig auszumachen und passt zu dem negativ geladenen EcGcvH. Die für die Ladung von EcLpl(AB) verantwortlichen basischen Aminosäuren sind in sLpl(AB)-Enzymen hingegen teilweise neutral, teilweise komplementär geladen (siehe Abb. 22). Aus der Kristallstruktur des Proteinkomplexes EcLpl(AB)-EcGcvH (PDB 3A7A) ist ersichtlich, dass es sich bei mehreren der zuvor genannten, komplementär geladenen Aminosäuren um Reste handelt, die für die Interaktion des Komplexes verantwortlich sind (Fujiwara et al., 2010); Diese sind Asp₄₃, Glu₄₆, Glu₆₁, Asp₆₈ und Asp₈₆ in EcGcvH sowie die basischen Aminosäuren Arg₄₇, Arg₁₄₀, Lys₁₄₃, Lys₁₇₅ und Lys₂₇₂ in EcLpl(AB).

Die Analyse von RmLbpA2-Varianten, in der einzelne für die Substratspezifität in Betracht gezogene, basische Aminosäuren zu sauren ausgetauscht wurden, ergab, dass diese Substraterkennung nicht auf einzelne konservierte Aminosäuren zurückzuführen ist, sondern dass vielmehr eine Akkumulation von mehreren basischen Aminosäuren die Anlagerung des LbpA-Proteins an sLpl(AB) ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit, in der maximal drei Sequenzbereiche innerhalb von RmLbpA2 ausgetauscht wurden, wurde eine eindeutige Auswirkung auf die Substraterkennung von RmsLpl(AB) nachgewiesen; bereits ab zwei ausgetauschten Aminosäuren erkannte die Lipoat:Protein-Ligase das Akzeptorprotein nicht mehr. Umgekehrt konnte jedoch für EcLpl(AB) nur eine geringe Lipoylierungsaktivität nachgewiesen werden und das auch nur, als alle drei Sequenzabschnitte negativ geladen waren. Dass keine vollständige Modifikation von RmLbpA2_mutagenesis123 verzeichnet werden konnte, lässt darauf schließen, dass weitere Aminosäure-Austausche (z.B. V21E, R45D und R78Y) für eine uneingeschränkte Substraterkennung notwendig sind. Dies bestätigt die bereits zuvor geäußerte Annahme, dass es sich vielmehr um eine großflächige, komplementäre Oberflächenladung handelt, die eine Interaktion mit der entsprechenden Lipoat:Protein-Ligase ermöglicht. Die aufeinander abgestimmte komplementäre Oberflächenladung der Heterodimere TK90sLpl(AB)_1-TK90LbpA2 sowie EcLpl(AB)-EcGcvH ist in Abbildung 50 dargestellt. In Zukunft sollte diese Hypothese durch die Untersuchung weiterer LbpA- und GcvH-Varianten geprüft werden. Eine Kombination aus dem Austausch der positiv geladenen Aminosäuren und den konservierten Cysteinen sollte ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden. Die Aufklärung der Struktur des ternären Komplexes TK90sLpl(AB)_1-lipoyl-AMP-TK90LbpA2 ist in Form einer Kristallisation noch in Arbeit und verspricht dabei wertvolle Informationen über mögliche Interaktionspartner innerhalb des Komplexes.

Interessanterweise besitzen die im Rahmen dieser Doktorarbeit ausgewählten repräsentativen Mikroorganismen mit einem Liponsäureassemblierungsweg an LbpA keine kanonischen Lpl(AB)-Ligasen (siehe Tab. A2 im Anhang), die GcvH lipoylieren könnten. Da die Funktionalität des zentralen Stoffwechsels von den mit ihrem Liponsäure-Cofaktor beladenen GcvH-Proteinen und E2-Untereinheiten der α -Ketosäuredehydrogenasen abhängig ist, müssen diese Prokaryoten eine alternative Möglichkeit besitzen, diese Proteine mit Liponsäure zu beladen.

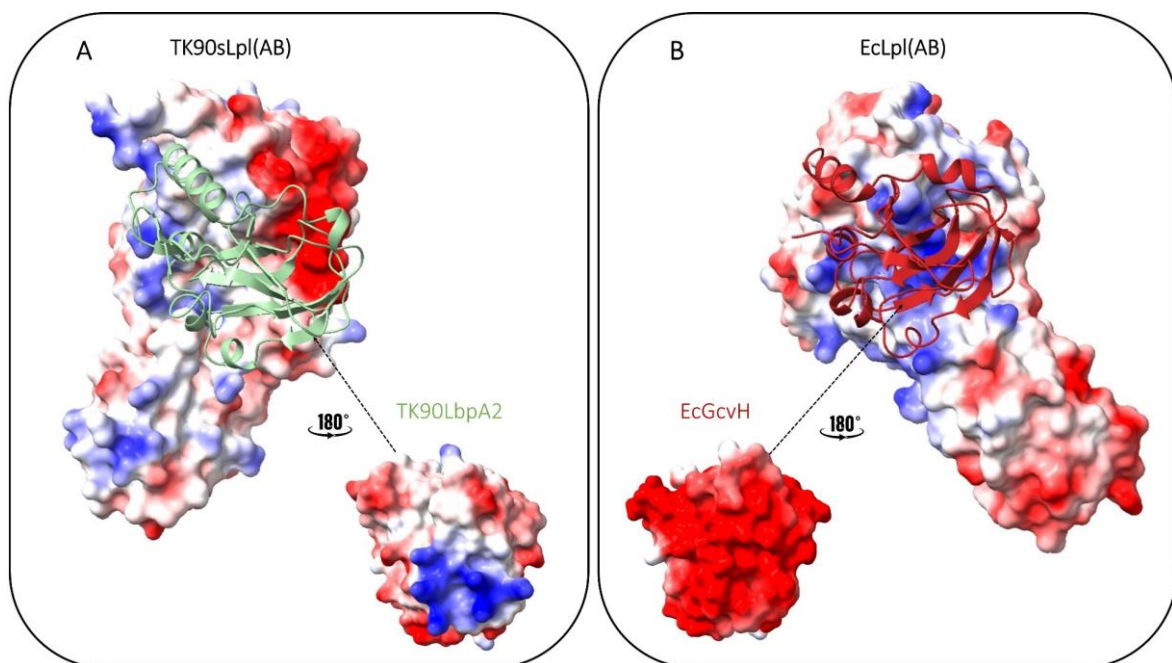


Abbildung 50: Darstellung der Komplexbildung zwischen (A) TK90sLpl(AB) und TK90LbpA2 (AlphaFold-Modell (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024) sowie zwischen (B) EcLpl(AB) und EcGcvH (PDB 3A7A (Fujiwara et al., 2010)) zur Verdeutlichung des Mechanismus der Proteininteraktionen durch die Anziehungskraft komplementärer Oberflächenladungen. Positive Ladungen sind in Blau, negative in Rot dargestellt. Neutrale Bereiche sind in Weiß gehalten. Ec, *E. coli*; TK90, *T. sp. K90mix*. Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

4.3. Aufstellung einer Hypothese zur differenzierten Liponsäureassemblierung von GcvH und LbpA im schwefeloxidierenden Bakterium *H. denitrificans*

In Bezug auf die oben aufgeführte Frage nach einer alternativen Möglichkeit zur Cofaktorbeladung von GcvH in schwefeloxidierenden Bakterien mit sHdr-LbpA-System, gibt es bekanntermaßen die Oktanoyltransferase LipB, die einen ACP-gebundenen Oktanoylrest auf Lipoyldomänen von Akzeptorproteinen transferieren kann (Sean W. Jordan & Cronan, 2003; Zhao et al., 2005; Zhao et al., 2003).

Interessanterweise ist im Rahmen einer Transkriptom-Analyse von *H. denitrificans* mittels RT-PCR kürzlich publiziert worden, dass die Expression der Gene der Fettsäurebiosynthese in Gegenwart von Thiosulfat herunterreguliert ist; Darunter die Gene für das ACP, die β -Hydroxyacyl-ACP-Dehydratase sowie die β -Ketoacyl-ACP-Synthase (J. Li et al., 2024). Zeitgleich ist die Expression des gesamten sHdr-LbpA2-Locus bis zu 20-fach hochreguliert, darunter auch die Enzyme, die für die Liponsäureassemblierung an LbpA verantwortlich sind.

Wenn LipB sowohl für die Oktanoylierung von GcvH/LD des zentralen Stoffwechsels als auch für LbpA verantwortlich wäre, dann würden die Substrate gegeneinander konkurrieren. GcvH würde energieaufwendig assembliert werden, obwohl es nicht gebraucht wird. Daher wird basierend auf allen zuvor genannten Informationen die Hypothese aufgestellt, dass für die Schwefeloxidierer, die das sHdr-LbpA-System besitzen, *in vivo* eine Differenzierung zwischen den Substraten GcvH und LbpA stattfindet, indem unterschiedliche Enzyme für die Assemblierung verantwortlich sind (siehe Abb. 51). In der Abbildung ist zur Vereinfachung exemplarisch nur die Modifikation der Lipoat:Protein-Ligasen mit Oktansäure dargestellt, eine Lipoylierung mit Hilfe dieses Enzyms ist wie oben beschrieben jedoch ebenso möglich. Es ist bekannt, dass in *E. coli* die Lipoyldomänen der verschiedenen Akzeptorproteine (GcvH und E2-Untereinheiten der α -Ketosäuredehydrogenasen) sowohl mit Hilfe der Lipoat:Protein-Ligase Lpl(AB) mit freier Oktansäure energieaufwendig beladen werden können (Morris et al., 1994) als auch durch die katalytische Aktivität von LipB mit einem an ein ACP gebundenen Oktanoylrest aus der Fettsäurebiosynthese (Zhao et al., 2005). sLpl(AB) wird bei Wachstum auf Thiosulfat 16-fach hochreguliert (J. Li et al., 2024) und katalysiert die Ligation von Oktan- oder Liponsäure an LbpA. Dieses Enzym ist nicht in der Lage, GcvH zu modifizieren. Dieses wird aber auch unter den bestehenden Umweltbedingungen nicht gebraucht. In *H. denitrificans* wird folglich immer nur das Liponsäure-bindende Protein modifiziert, das tatsächlich gebraucht wird. Ein Rückschluss aus dieser Theorie unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit erarbeiteten Erkenntnisse ist folglich, dass *H. denitrificans* bei chemoheterotrophem Wachstum durch die fehlende Lipoylierungsmöglichkeit der Lipoat:Protein-Ligase von GcvH und den E2-Untereinheiten der α -Ketosäuredehydrogenase-Komplexen nicht dazu befähigt ist, freie Oktansäure oder Liponsäure für seinen Metabolismus nutzen zu können. Da diese Tatsache für den Organismus energetisch ungünstig ist, sollten das Augenmerk zukünftiger Forschungsinteressen auf der Hinterfragung und Verifizierung der oben aufgeführten Hypothese liegen.

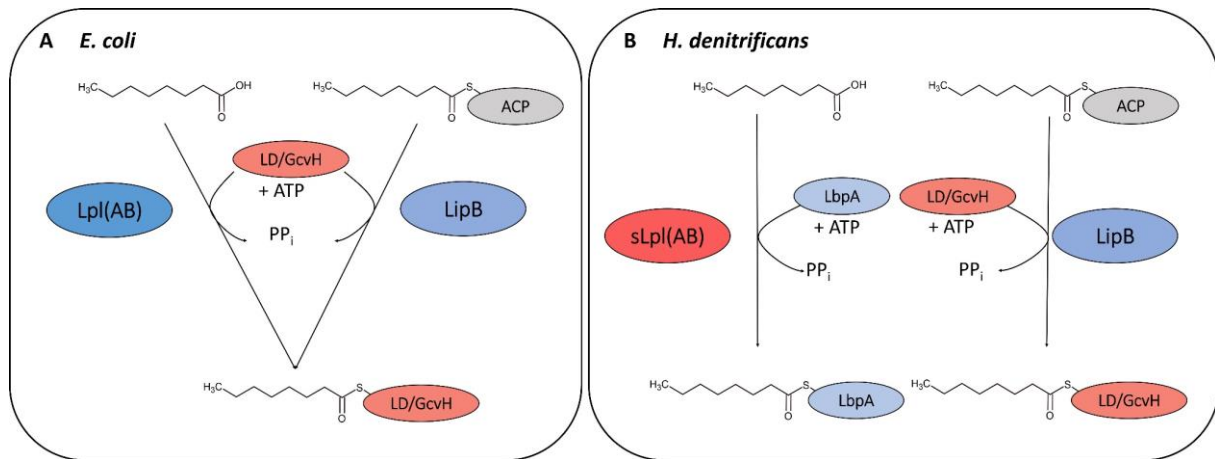


Abbildung 51: Schematisches Modell der Oktanoylierung unterschiedlicher Liponsäure-bindender Proteine innerhalb eines Mikroorganismus exemplarisch dargestellt an dem ersten Schritt des Liponsäure-assemblierungssystems in *E. coli* und *H. denitrificans*. LD/GcvH aus *E. coli* können entweder durch die katalytische Aktivität von Lpl(AB) oder durch den Transfer eines ACP-gebundenen Oktanoylrests mit Hilfe von LipB oktanoyleiert werden. In *H. denitrificans*, der einen zusätzlichen, andersartigen Liponsäure-bindenden Proteintyp besitzt, namentlich LbpA, entsteht durch die Präsenz einer spezialisierten Lipolat:Protein-Ligase sLpl(AB) eine Substratdifferenzierung von sLpl(AB) zu LbpA, die GcvH-Proteine nicht als Akzeptorproteine erkennt. Eine kanonisches Lpl(AB)-Enzym ist nicht vorhanden. Die Substraterkennung der dargestellten Enzyme basiert auf komplementären Oberflächenladungen, die schematische mit Blau- (positiv) und Rot-Tönen (negativ) dargestellt sind. ACP, Acyl-Carrier-Protein; LbpA, Liponsäure-bindendes Protein A; LipB, Oktanoyltransferase; GcvH, Protein H des Glycin-spaltenden Systems; LD, Lipoyl-Domäne der α -Ketosäuredehydrogenasen; (s)Lpl(AB), Lipolat:Protein-Ligase.

Wachstumsexperimente brachten bereits zum Vorschein, dass die Abwesenheit der Lipolat:Protein-Ligase sLpl(AB) vergleichbare, verheerende Auswirkungen auf die Thiosulfatoxidation von *H. denitrificans* haben wie die Deletion von *lbpA* an sich (Tanabe et al., 2023). Dies bestätigt, dass der Cofaktor Liponsäure, der mit Hilfe des oben beschriebenen Enzyms kovalent an LbpA gebunden wird, essentiell ist für die Funktionalität ebendieses Proteins. Die Beobachtung, dass *H. denitrificans* $\Delta tsdA \Delta spl(AB)$ *lbpA*-His eine höchst eingeschränkte Thiosulfatoxidation aufweist (Tanabe et al., 2023), bestätigt die hier aufgestellte Hypothese, dass es einen Unterscheidungsmechanismus der Substraterkennung sowohl der Lipolat:Protein-Ligase als auch der Oktanoyltransferase LipB geben muss. LipB scheint LbpA *in vivo* wenn nur eingeschränkt als Substrat zu erkennen, da es anderenfalls *spl(AB)* in der Hinsicht ersetzen könnte, ACP-gebundene Oktanoylreste aus der Fettsäurebiosynthese auf LbpA zu übertragen. Dies scheint nicht der Fall zu sein. Ein zusätzlicher Beweis dieser Annahme ergibt sich aus der Strukturvorhersagen von LipB aus *E. coli* K12 und exemplarisch aus *H. denitrificans* (siehe Abb. 52). Darin wird deutlich, dass die Substratanlagerung der GcvH-Proteine wesentlich wahrscheinlicher ist als die der LbpA-Proteine mit ihrer positiven Oberfläche, da rund um das aktive Zentrum der Oktanoyltransferasen aus beiden Organismen ebenfalls positive Ladungen vorhanden sind und das LbpA-Protein abgestoßen werden würde.

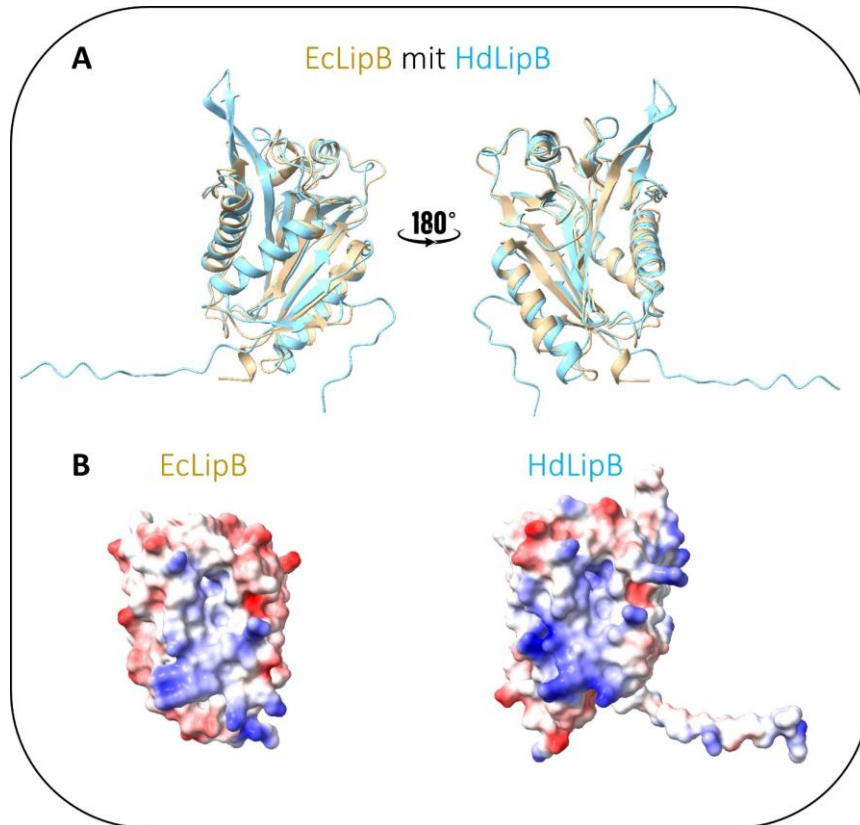


Abbildung 52: (A) Strukturvorhersagen sowie (B) Analyse der Oberflächenladungsverteilung von LipB aus *H. denitrificans* im Vergleich zu LipB aus *E. coli* (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024). (A) Im Strukturalignment der beiden Enzyme ist EcLipB beige, HdLipB in blau aufgeführt. Unterschiede liegen hauptsächlich in C- und N-terminalen Elongationen von HdLipX. (B) Positive Ladungen sind in Blau, negative in Rot dargestellt. Neutrale Bereiche sind in Weiß gehalten. Der Ausschnitt des aktiven Zentrums ist nach vorne hin sichtbar dargestellt, an das Liponsäure-bindende Proteine anlagern; In beiden Enzymen dominieren positive Ladungen, die für eine Anlagerung von GcvH- und eine Abstoßung von LbpA-Proteinen spricht. Die Ausrichtung der Proteine ist identisch. Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*. Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

4.4. Anpassungen der Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 an ihr Substrat LbpA

Nach erfolgter Oktanoylierung von LbpA mit Hilfe der Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB) folgt die Schwefelinsertion an den Kohlenstoffatomen C₆ und C₈, um die Liponsäure zu vervollständigen. Diese Aufgabe übernehmen die Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2, die der RS-Superfamilie angehören (Booker & Lloyd, 2022; Neti et al., 2022).

Alle Mitglieder der RS-Superfamilie enthalten mindestens ein [4Fe-4S]_{RS} Cluster, das durch drei Cysteinreste ligiert wird. Diese Reste treten typischerweise in einer CX₃CX₂C-Anordnung auf. Die sequenzielle Ähnlichkeit zwischen den Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 zu LipA beschränkt sich auf den N-terminalen Teil der Proteine, wo das [4Fe-4S]_{RS} Cluster als Cofaktor vorhanden ist. Diese Ligandenkoordination ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Stabilität der Proteine dieser Familie (Holliday et al., 2018a).

Der Reaktionsmechanismus sieht wie folgt aus: SAM bindet über seine Amino- und Carboxylgruppen zweizählig an das vierte, nicht über Cysteine ligierte Eisenion des RS-Clusters. Eine Reduktion bewirkt die Fragmentierung von SAM, was zur Bildung eines 5'-Desoxyadenosyl-Radikals (5'dA·) und Methionin führt (Booker & Lloyd, 2022). Bei fast allen RS-Reaktionen besteht die Funktion des 5'-dA· darin, Wasserstoffatome aus einem Substrat zu extrahieren. Im Fall von LipA, LipS1 und LipS2 ist es die Extraktion eines Wasserstoffatoms an C₆ bzw. C₈ des an GcvH-/LbpA-gebundenen Oktanoylrestes. Daraufhin folgt die Schwefelinsertion an den entsprechenden Kohlenstoffatomen, wobei die Schwefelatome eines auxiliären [4Fe-4S]_{aux} Clusters als Donor dienen und im Zuge der katalytischen reaktion geopfert werden (Booker & Lloyd, 2022; Cicchillo et al., 2004).

Im Gegensatz zum kanonischen Liponsäureassemblierungsweg tragen die LipS1/S2-Lipoylsynthasen jeweils nur ein Schwefelatom zum Prozess bei und katalysieren die Schwefel-Insertionen in zwei verschiedenen Reaktionen (siehe Abb. 6 (B)). LipS2 ist dabei für die Insertion des Schwefels am Kohlenstoffatom C₈ des Oktanoylrestes verantwortlich, während LipS1 daraufhin die zweite Schwefelinsertion an C₆ vornimmt (Neti et al., 2022). Welche Faktoren zur Substratspezifität von LipS1 und LipS2 hinsichtlich Oktanoyl-LbpA und 8-Mercaptooktanoyl-LbpA ausschlaggebend sind, ist bisher unklar. Für LipA ist bekannt, dass die Schwefelatome dabei aus dem [4Fe-4S]_{aux} Cluster stammen, das aufgrunddessen innerhalb der Reaktion zerstört wird (Booker & Lloyd, 2022). Dieser Opferprozess führt zu einer Einschränkung der Enzyme, die nur einen einzigen vollständigen katalytischen Umsatz zulässt. Die katalytische Aktivität bekannter FeS-Cluster Assemblierungsmaschinerien wie das ISC (iron sulfur cluster)-, SUF (sulfur formation)- und NIF (nitrogen fixation)-System (Braymer et al., 2021; Kim et al., 2015; Outten, 2015; Roche et al., 2013) sind zur Regeneration des FeS-Clusters notwendig. Die Wiederherstellung des LipA-Hilfsclusters wird durch die Beteiligung eines spezifischen Fe/S-Cluster-Trägerproteins (NfuA) katalysiert (Booker & Lloyd, 2022; McCarthy & Booker, 2017, 2018; McCarthy et al., 2019). Welches System die Rolle der Regeneration von LipS1 und LipS2 übernimmt, ist derzeit unklar.

Ein Bindemotiv für das auxiliäre FeS-Cluster wie in LipA, das drei Cysteine und ein Serin (innerhalb eines RSSY-Motivs) umfasst (McLaughlin et al., 2016), ist in LipS1 und LipS2 nicht vorhanden. Stattdessen verfügen diese beiden Enzyme über konservierte Histidinreste in der C-terminalen Domäne, die die Funktion der Ligation übernehmen könnten (Kümpel et al., 2024). Diese Histidinreste wurden experimentell als ligierende Fe/S-Cluster sowohl in LipS1 als auch

in LipS2 aus *T. kodakarensis* nachgewiesen (Neti et al., 2022). Eine interessante Fragestellung ist, ob Histidinreste eine andere Bindungsstärke zu Eisenatomen aufweisen im Vergleich zu Serinresten, da im Falle der Schwefelinsertionen an Oktanoyl-LbpA zwei Enzyme beteiligt sind im Vergleich zu dem Enzym LipA, das beide Schwefelatome in einer Reaktion inseriert. Es ist bekannt, dass für Metall-Aminosäure-Komplexe mit dreizähliger Bindung höhere Stabilitätskonstanten erwartet werden als für solche mit nur zweizähliger Koordination, da eine stärkere Chelatbildung eine höhere thermodynamische Stabilität verleiht (Murphy et al., 2020). Obwohl sowohl Histidin als auch Serin dreizählige Bindungen aufbauen, hat Histidin eine höhere Stabilitätskonstante zu Eisenatomen als Serin (Murphy et al., 2020). Für den Reaktionsmechanismus von LipA ist bekannt, dass Ser₂₉₂ im Zuge der Wasserstoff-Abspaltung an C₆ des Oktanoylrestes protoniert wird und um auxiliären FeS-Cluster dissoziiert (Dong et al., 2018). Die Vorstellung, dass die höhere Stabilität der Histidin-Eisen-Verbindung in LipS1 und LipS2 die Dissoziation des FeS-Clusters verhindern würde, führt zu Frage nach einem möglichen alternativen Schwefeldonator für die Vervollständigung des Liponsäure-Cofaktors mit Hilfe der dieser Lipoylsynthasen. Eine mögliche Antwort darauf liefert eine Hypothese, die erst kürzlich aufgestellt wurde. Dabei postulieren Lachowicz et al. ein [4Fe-5S] Cluster als zweites FeS-Cluster neben dem RS-Cluster in den Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 von *T. kodakarensis*, ähnlich wie in der von ihnen untersuchten Biotinsynthase BioB (Lachowicz et al., 2024). BioB besitzt dabei ebenso wie LipS1 und LipS2 Histidin als vierten Liganden des auxiliären FeS-Clusters. Interessanterweise wurden diese Enzyme auch als Biotinsynthasen annotiert (Lachowicz et al., 2024).

Eine Kristallisation von LipS1 und LipS2 wäre von großem Vorteil, um zum einen die vermutete Ligation über His₂₂₄ betrachten zu können und zum anderen, um Informationen zu einem möglichen [4Fe-5S] Cluster zu erhalten. Zudem wäre es interessant, sich *in vitro* die Auswirkung eines Aminosäureaustauschs von His₂₂₄ zu Serin auf die Substratspezifität (Oktanoyl-LbpA und 8-Mercaptooktanoyl-LbpA) und die Aktivität der Enzyme anzuschauen.

Interessanterweise gibt es in allen im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Organismen, die das sHdr-LbpA-System besitzen, sowohl *lipA*- als auch *lipS1*- und *lipS2*-Gene, was erneut die Frage nach der Substratspezifität der kodierten Enzyme aufwirft. In einem exemplarischen strukturellen Vergleich zwischen LipA und LipS1 fällt auf, dass der Kern der Proteine EcLipA und HdLipS1 sehr ähnlich ist; C- und N-terminale Bereiche unterscheiden sich jedoch sichtlich.

In Anbetracht der Oberflächenladung fällt auf, dass die Elongationen von HdLipS1 sowohl am C- als auch am N-Terminus zu der Ausbildung eines größeren negativ geladenen Ausschnittes führt, der wiederum begünstigend ist für eine Anlagerung von LbpA-Proteinen im Vergleich zu den negativ geladenen GcvH-Proteinen (siehe Abb. 53). In diesem Zusammenhang wird für die Lipoylsynthasen ebenso wie für die oben beschriebenen Lipoat:Protein-Ligasen eine Enzym-Substrat-Interaktion basierend auf der Anziehungskraft komplementärer Oberflächenladungen postuliert.

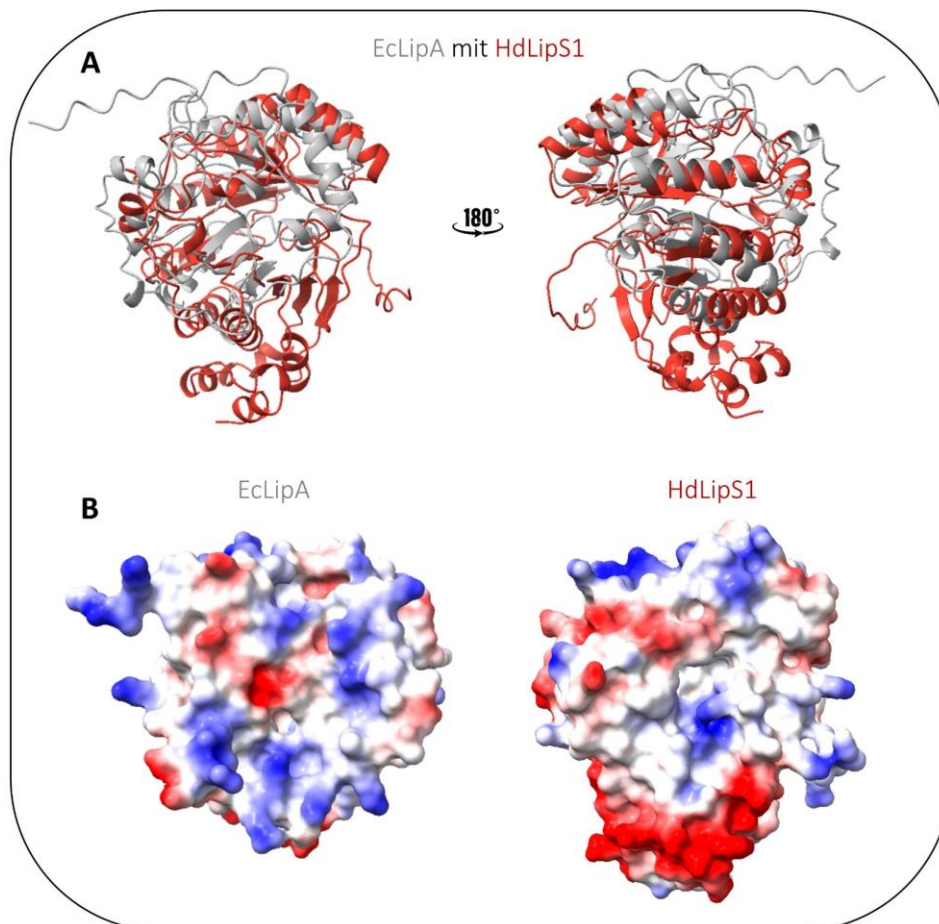


Abbildung 53: (A) Strukturvorhersagen sowie (B) Analyse der Oberflächenladungsverteilung von LipS1 aus *H. denitrificans* im Vergleich zu LipA aus *E. coli* (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2024). (A) Im Strukturalignment der beiden Enzyme ist EcLipA grau, HdLipS1 in Rot aufgeführt. Unterschiede liegen hauptsächlich in C- und N-terminalen Elongationen von HdLipS1. (B) Positive Ladungen sind in Blau, negative in Rot dargestellt. Neutrale Bereiche sind in Weiß gehalten. Es wird deutlich, dass die Elongationen in HdLipS1 für einen größeren negativ geladenen Ausschnitt auf der Proteinoberfläche sorgen. Dieser lässt die Vermutung auf eine Substratspezifität hinsichtlich LbpA-Proteinen mit ihrem positiv geladenen Oberflächenausschnitt zu, während negativ geladene GcvH-Proteine abgestoßen werden würden. Die Ausrichtung der Proteine ist identisch. Ec, *E. coli*; Hd, *H. denitrificans*. Dargestellt mit ChimeraX (Meng et al., 2023).

Die chemische Rekonstitution von HdLipS1 wurde erstmals im Rahmen einer Masterarbeit (MA Grosser, 2021) durchgeführt und optimiert. FeCl₃ wurde bereits vor 13 Jahren im Rahmen der FeS-Cluster-Rekonstitution in *E. coli* eingesetzt (Yeung et al., 2011), während Li₂S erst

2017 als effizienter Schwefeldonator für die FeS-Cluster-Rekonstitution in *Trachipleistophora hominis* beschrieben wurde (Sven-A Freibert et al., 2017). Ziel der Experimente mit den erfolgreich rekonstituierten Lipoylsynthasen HdLipS1 und TK90LipS2 war eine vollständige *in vitro* Liponsäureassemblierung an TK90LbpA2 gemeinsam mit der Lipoat:Protein-Ligase TK90sLpl(AB)_1 sowie mit TK90LipT als potentiellm Elektronenüberträger von NADPH auf die Lipoylsynthasen.

Die Vermutung liegt nahe, dass die *in vitro* Liponsäureassemblierung nicht geglückt ist, da ein passender Elektronenüberträger von NAD(P)H auf LipS1 bzw. LipS2 fehlte. Eingesetzt wurde LipT, eine oftmals mit LipS1 und LipS2 assoziierte FAD-abhängige Oxidoreduktase, die im nächsten Abschnitt nochmal genauer beschrieben wird. Wenn der Versuch in Zukunft wiederholt wird, sollte z.B. ein Ferredoxin/Ferredoxin-Reduktase-System eingesetzt werden. In *E. coli* wurden die Elektronen für die von LipA-katalysierte Reaktion z.B. von NADPH über das reduzierende System Flavodoxin/Flavodoxin-Reduktase bereitgestellt (Cicchillo et al., 2004). In BioB wurde zudem die Methylthioadenosine/S-Adenosyl-homocystein-Nukleosidase (MTAN) erfolgreich eingesetzt, um die Enzymaktivität zu steigern (Lachowicz et al., 2024). MTAN hebt dabei vermutlich die Produkthemmung durch die Hydrolyse von 5'-Desoxyadenosin (Produkt aus der Spaltung von SAM) auf (Challand et al., 2009).

Eine Erkenntnis, die dennoch aus diesem Experiment gezogen werden konnte, war, dass sich – sobald eine Schwefelquelle im Ansatz war (in dem Falle vermutlich durch den Zerfall einzelner FeS-Cluster von LipS1/LipS2), ein Schwefelatom an das Apoprotein anlagert. An die Oktansäure kann dieses Atom nicht gebunden sein, da für diese Anlagerung an ein inertes Kohlenstoffatom eine radikalische Reaktion von Nöten ist. Ein Massenzuwachs um 32 Da wurde jedoch auch für die Ansätze beschrieben, in denen z.B. kein SAM vorhanden war, aus dem das 5'-Desoxyadenosin-Radikal (dA·) im Rahmen der katalytischen Aktivität der Lipoylsynthasen entsteht. Eine zusätzliche Schwefelanlagerung an Oktanoyl-TK90LbpA2 in allen Proben verdeutlicht demnach, dass zumindest *in vitro* die Schwefelanlagerung an einem der insgesamt vier freien Cysteine innerhalb von TK90LbpA2 stattfindet. Eine zusätzliche Beobachtung, dass sich TK90LbpA2 ohne Cysteine nicht persulfidieren ließ, ist ebenfalls ein Indiz für diese Annahme. Weitere Untersuchungen mit TK90LbpA2 Cystein-Austauschmutanten sind in Planung. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit Plasmide erstellt, die Gene mit sämtlichen Kombinationen von möglichen Cystein-Austauschvarianten von TK90LbpA2 enthalten (siehe Tab. A1 im Anhang).

4.5. LipT als potentieller Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Kandidat für LbpA

Neben der Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB) und den Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 ist oftmals ein weiteres Enzym mit dem sHdr-LbpA-System assoziiert; LipT ist als Geranylgeranylreduktase-ähnliches Enzym annotiert, für das durch seinen FAD-Kofaktor Oxidoreduktase-Aktivität vorausgesagt wird.

Die oxidierte Form von FAD-Cofaktoren weist im Absorptionsspektrum zwei charakteristische Maxima auf: ein Absorptionsmaximum liegt bei 368 nm im UV-A-Bereich und das andere bei 450 nm im blauen sichtbaren Bereich (Schwinn et al., 2020). Anhand des spezifischen Extinktionskoeffizienten von FAD bei 450 nm sowie der Bestimmung des Proteingehalts konnte ein FAD-Molekül pro LipT-Monomer spektroskopisch nachgewiesen werden. Diese Beobachtung passt zur durchgeführten bioinformatischen Analyse der Aminosäuresequenz, da folgende bekannte hauptsächlich für Enzyme der Geranylgeranylreduktase (GGR)-Familie spezifische FAD-Bindemotive (Dym & Eisenberg, 2001; Xu et al., 2010) gefunden wurden: GxGxxGx₁₇D, RxxFD, LxGG sowie PxxYxWxFP. Die typische Struktur der FAD-Binderegion von sechs parallelen β -Faltblättern mit einer überkreuzenden α -Helix (Dym & Eisenberg, 2001) ist in der AlphaFold-Vorhersage sichtbar. Zudem ist das NADPH-Bindemotiv FxxGD vorhanden. Dieses ist eine verkürzte Version des Motivs, das auch in DLDH-Enzymen präsent ist (Dym & Eisenberg, 2001). Dass LipT als Geranylgeranylreduktase-ähnliches Enzym annotiert ist, schließt nicht aus, dass es die Oxidoreduktase-Reaktion anderer Substrate katalysiert. 2019 wurden die Strukturähnlichkeiten aller FAD-abhängigen Oxidoreduktasen beleuchtet und in dem Zusammenhang wurde die Präsenz von Misannotation ebenfalls thematisiert (Trisolini et al., 2019).

Eine mögliche Geranylgeranylreduktase-ähnliche Funktion von LipT ist denkbar, indem dieses Enzym die Reduktion einer C=C-Doppelbindung einer kovalent gebundenen Fettsäure an LbpA katalysiert. Dies würde jedoch bedeuten, dass die Lipoat:Protein-Ligase sLpl(AB) diese ungesättigte Fettsäure zuvor an LbpA ligiert. Eine breite Substratspezifität von Lpl(AB) wurde bereits beschrieben (Green et al., 1995), sodass diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen wird. Auch Alkine mit einer C-C-Dreifachbindung wurden bereits getestet; Die Substratspezifität ist zwar gering im Vergleich zu Liponsäure (ca. 5% Umsetzung), die Reaktion ist jedoch möglich (Fernández-Suárez et al., 2007).

Die im Anaerobenzelt durchgeführten Experimente zur Analyse der Diaphoraseaktivität von LipT zeigten keinerlei Erfolg hinsichtlich einer NAD(P)H-Oxidation gepaart mit der Reduktion eines artifiziellen Elektronenakzeptors wie Ferricyanid oder MTT. Eine Abnahme der Absorptionen bei 374 nm und 450 nm, d.h. eine Reduktion von TK90LipT, über die Zeit, gibt jedoch Hinweise auf eine mögliche reverse Aktivität des Enzyms. Da in diesem Fall reduzierte Liponsäure als Elektronendonator eingesetzt wurde, ähnelt diese Reaktion dem Dihydroliponamid-Dehydrogenase (DLDH)-Mechanismus, in dem die Elektronen ebenfalls auf NAD^+ übertragen werden (Danson, 1988). In *H. denitricans* sind insgesamt vier verschiedene Gene für DLDH-Enzyme kodiert: Hden_0791 ist alleinstehend im Genom, Hden_0896 steht in Assoziation mit Genen der Pyruvatdehydrogenase, Hden_1300 *gcvH* und Hden_3225 mit Genen der 2-Oxoglutaratdehydrogenase. D.h. auch hier könnten die verschiedenen Enzyme ggf. nur an dem jeweils assoziierten Enzymkomplex spezifisch aktiv sein. Für das sHdr-LbpA-System (sHdr funktionell analog zu E1, LbpA funktionell identisch zu E2) würde LipT als Homolog/Analog der E3-Untereinheit in Frage kommen. DLDH besitzen jedoch im Gegensatz zu LipT zwei hoch konservierte Cysteinreste, die für eine intramolekulare Weiterleitung der Elektronen zum FAD-Cofaktor hin sorgen. Ein Vertreter der Flavinprotein-Disulfidreduktase Familie, zu der DLDH zählt, ohne konservierte Cysteine am aktiven Zentrum wurde bisher noch nicht beschrieben. Durch die offensichtlich komplementäre Ladung von LipT und LbpA sowie die vorausgesagte Form des aktiven Zentrums von LipT in Form eines charakteristischen Tunnels, in das ein Tetradecan-Molekül (Ähnlichkeit zu C_8 der Liponsäure) durch AlphaFill hineinmodelliert wurde (siehe Abb. 41 (C)), ist eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen sehr wahrscheinlich. *In vitro* konnte diese Interaktion in Form einer Reduktion von LipT durch LbpA wie oben beschrieben bereits beobachtet werden (siehe Abb. 42). Eventuell ist die Struktur des Tunnels zum FAD hin, die in GGR-Enzymen (zu denen LipT die höchste Ähnlichkeit aufweist) auf längere, Fettsäure-ähnliche Substrate ausgelegt ist, dafür verantwortlich, dass keine zusätzlichen Cysteine für den Elektronentransfer notwendig sind, da die Thiolgruppen der Liponsäure den FAD-Cofaktor direkt erreichen können.

Die Beobachtung, dass sich TK90LipT unter aeroben Bedingungen nicht durch die Zugabe von DTT reduzieren ließ, bestätigt die Hypothese, dass dieses Enzym revers agierend Elektronen von NAD^+ auf LbpA übertragen kann, da unter dieser Annahme das Standard-Redoxpotential von TK90LipT zwischen dem von NAD^+/NADH mit -0,364 V (Saleh et al., 2011) und dem Redoxpotential der Protein-gebundenen Liponsäure liegen muss. Dabei ist zu beachten, dass

proteingebundene Cofaktoren kein festgelegtes Redoxpotential besitzen, sondern dass dieses vom jeweiligen Protein beeinflusst wird. Folgende Redoxpotentiale wurden z.B. bisher über das oxidierte und reduzierte Liponsäure-Paar berichtet: $E^0 = -0,23 \text{ V}$ bei 22°C und pH 6,0 (Goldman, 1959), $E^0 = 0,41 \text{ V}$ bei 23°C und pH 7,1 (Gunsalus, 1954; Reed, 1953), $E^0 = -0,30 \text{ V}$ unter zuvor genannten Bedingungen (Sanadi & Seals, 1957) sowie $E^0 = -0,30 \text{ V}$ bei 30°C und pH 7,0 (Ke, 1957). Das Standard-Redoxpotential von DTT liegt mit $-0,33 \text{ V}$ (Seo et al., 2013) genau zwischen diesen Werten. Das erfolgreich verwendete, stärkere Reduktionsmittel Natriumdithionit hingegen hat ein Standard-Redoxpotential von $-0,66$ (Mayhew, 1978). In Zukunft sollte eine Redoxtitration mit TK90LipT durchgeführt werden, um das Standard-Redoxpotential zu bestimmen.

4.6. Informationen über weitere mit dem sHdr-LbpA-System assoziierte Enzyme: LipX und LipY

Es gibt weitere Enzyme, die an der Liponsäureassemblierung an LbpA beteiligt sein könnten im Hinblick auf ihre genetische Assoziation zu *spl*(AB), *lipS* und *lipS2*. Das *lipX*-Gen ist nur in manchen Organismen vertreten, die den LipS1/LipS2-abhängigen Assemblierungsweg der Liponsäure an LbpA besitzen (siehe Tab. A2 im Anhang). Dazu zählen bei den in dieser Arbeit untersuchten repräsentativen Mikroorganismen *H. denitrificans* sowie *T. sp. K90mix*. LipX ist als Glutamin-Amidotransferase-ähnliches Protein annotiert. In diesem Zusammenhang wird zusätzlich auf die Anwesenheit eines weiteren Enzyms hingewiesen, namentlich LipY, das als Transportprotein für langkettige Fettsäuren annotiert ist und dessen Funktion bisher unbekannt ist. Auch dieses Protein kommt nur vereinzelt in Assoziation mit LbpA vor und wird z.B. nicht von *H. denitrificans* kodiert. Werden die einzelnen Bestandteile des sHdr-LbpA-Systems und in dem Zusammenhang insbesondere die Unterschiede von Typ I- und Typ II-sHdr-System oder die Verbreitung der Gene einzelner Schwefeltransferasen, fällt auf, dass auch dort eine enorme Diversität herrscht (Kümpel et al., 2024; Tanabe et al., 2024; Tanabe et al., 2023). Die Gesamtheit der Bestandteile des sHdr-LbpA-Systems erinnert an ein Puzzle mit vielen Bausteinen, die abhängig von den individuellen Bedürfnissen der einzelnen Organismen im Laufe der Zeit evolviert sind. Es bleibt eine spannende Aufgabe in der Zukunft, die Charakteristika und Funktionen der Puzzleteile zu erforschen.

Neben ausführlichen bioinformatischen Analysen der einzelnen Enzyme, die an der Liponsäureassemblierung von LbpA beteiligt sind, sowie der Charakterisierung der heterolog exprimierten Proteinen *in vitro*, lag das Interesse auf der Aufklärung des Assemblierungswegs

mit Hilfe des Modellorganismus *H. denitrificans in vivo*. Dazu wurde u. a. eine *H. denitrificans* Δ *tsdA*-Mutante generiert, die eine in-frame Deletionen von *lipX* aufwies. Die signifikant reduzierte Thiosulfatoxidationsrate dieser Mutante im Vergleich zum Referenzstamm führt zu der Erkenntnis, dass auch dieses Protein für die gesamte Schwefeloxidation von großer Bedeutung ist. Die Funktion dieses Proteins ist bisher unbekannt. Da es als Glutamin-Amidotransferase-ähnliches Protein annotiert ist, gab es die Überlegung, dass es an dem Transfer eines Moleküls auf LbpA beteiligt sein könnte. Im Rahmen der Aufreinigung und massenspektrometrischen Betrachtung der LbpA2-His-Proteine aus verschiedenen *H. denitrificans*-Stämmen ist aufgefallen, dass die Masse des lipoylierten HdLbpA2-His stets 40 Da größer war als die zu erwartende Masse. Interessanterweise sind diese 40 Da unbekanntes Ursprungs nicht auf LbpA2-His aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *slpl*(AB) *lbpA*-His zu finden, wo aufgrund der fehlenden Lipoat:Protein-Ligaseaktivität ausschließlich die Masse des Apoproteins verzeichnet wurde. Da LbpA2-His aus *H. denitrificans* Δ *tsdA* Δ *lipX* *lbpA*-His jedoch, identisch zu dem isolierten Protein aus dem Referenzstamm, die Masse des Holoproteins plus 40 Da aufweist, wird die zuvor aufgeführte Überlegung der möglichen Modifikationsfunktion in Form eines Molekültransfers an einzelne Aminosäuren oder den Lipoylrest wieder verworfen.

Die zusätzlichen 40 Da könnten zu einem Acetylrest passen (42 Da), jedoch fehlt bisher eine passende Erklärung zu einer Anlagerung dieses Moleküls. Im Rahmen der strukturellen Analyse aller Liponsäure-bindender Proteine fiel auf, dass GcvH aus *E. coli* zusammen mit einem Calcium-Ion kristallisiert wurde, das an Asp₄₃ gebunden ist. In Anbetracht der exakt 40 Da dieses Ions liegt die Vermutung nahe, dass es sich auch bei der zusätzlichen Masse an HdLbpA2 um ein Protein-stabilisierendes Calcium-Ion handeln könnte (McPhalen et al., 2001). Interessanterweise handelt es sich bei Asp₄₃ um eine der in LbpA-Proteinen komplementär geladenen Aminosäuren, die für die Interaktion zwischen GcvH und Lpl(AB) verantwortlich sind (Fujiwara et al., 2010). Im Rahmen der Analyse mit dem Internet-Tool AlphaFill modellierte das Programm HdLbpA2 tatsächlich mit einem angelagerten Calcium-Ion, das stattdessen an Asp₈₉ gebunden war, sich jedoch räumlich betrachtet an der gleichen Stelle befand wie das Calcium-Ion an EcGcvH. Da es es sich lediglich um ein Modell handelt, müssen weitere Untersuchungen zur Identifikation und Lokalisation der beobachteten 40 Da in Zukunft noch folgen.

Die Aufklärung der Funktion von LipX bleibt ebenfalls aufgrund der beobachteten Relevanz für die Schwefeloxidation in *H. denitrificans* ein spannendes Thema für die Zukunft.

4.7. Untersuchungen zur Funktion des Liponsäure-bindenden Proteins innerhalb des sHdr-LbpA-Systems in *H. denitrificans*

Neben der Liponsäureassemblierung an LbpA ist auch die Funktion dieses interessanten Proteins innerhalb des sHdr-LbpA-Systems von großem Interesse.

Die genaue Funktion der Liponsäure auf LbpA innerhalb des katalytischen Zyklus der sHdr-LbpA-basierten Schwefeloxidation ist derzeit unklar. Es gibt zum einen die Überlegung, dass LbpA ausschließlich als Redox-System fungieren könnte, indem die im Rahmen der Persulfid-Oxidation freigesetzten Elektronen auf die Liponsäure übertragen werden (Ernst et al., 2021). Die Reoxidation der Dihydroliponsäure wäre mittels einer Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (DLDH) möglich, wobei NADH als Reduktionsäquivalent gewonnen werden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wird zudem die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass LbpA-gebundene Liponsäure in Form eines Liponamid-Trisulfids als schwefelhaltige Substratbindungseinheit dient und Schwefel an das aktive Zentrum des sHdr-Komplexes übertragen kann (Kümpel et al., 2024). Aufgrund des derzeitig begrenzten Wissens über die Eigenschaften von sHdr-Systemen ist es wichtig zu beachten, dass verschiedene mechanistische Szenarien möglich sind.

Die Beobachtung der Ausführung mehrerer *lbpA*-Gene innerhalb eines Organismus legen die Vermutung nahe, dass mehr als ein einzelnes LbpA-Monomer im sHdr-Multienzym-System vorhanden und funktionsfähig ist. Wie bereits weiter oben beschrieben, könnte sich z.B. ein Heterodimer bilden, da u.a für die Lipoat-bindenden E2-Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexe bekannt ist, dass sie bis zu drei Lipoyl-Domänen enthalten können (Kok et al., 1998).

Alle bisher charakterisierten Liponsäure-bindenden Proteine wie das GcvH oder die E2-Untereinheiten der verschiedenen α -Ketosäuredehydrogenasen haben neben ihrer Oxidoreduktase-Aktivität eine Substrat-transferierende Funktion inne; GcvH transferiert Methylamin auf Tetrahydrofolat (Goro Kikuchi et al., 2008), der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex katalysiert hingegen den Transfer eines Acetylrests auf Coenzym A (Patel & Korotchkina, 2003). Demnach ist es wahrscheinlich, dass LbpA-Proteine aus Schwefeloxidierern eine ähnliche Substrat-Transferfunktion haben, in diesem Falle eine

Schwefeltransferfunktion. Falls dem nicht so wäre, wäre LbpA das erste bekannte Liponsäure-bindende Protein ohne Substrat-Transferfunktion. Interessanterweise befindet sich neben dem N-terminalen Cystein (Cys₇) ein strikt konservierter Glycinrest (Gly₆). Diese Kombination aus Glycin und Cystein, wenn auch nicht in gleicher Ausführung, erinnert an ein konserviertes Pentapeptid GGCG(G), das für die Schwefelbindung und -übertragung innerhalb des Schwenkarms von SoxY verantwortlich ist (Sauvé et al., 2007).

Die Analyse der Massen des LbpA2-His-Proteins aus dem Referenzstamm *H. denitrificans* Δ tsdA lbpA-His ergab wie bereits zuvor beschrieben, dass es neben der Masse, die dem Holoprotein plus 40 Da entspricht, zusätzlich eine Massenverschiebung um 32 Da gibt. Diese Masse entspricht einem Schwefelatom, sodass die Überlegung nahe liegt, dass LbpA2 neben seiner elektronenübertragenden Funktion auch eine Rolle im Schwefeltransfer zum sHdr-Komplex spielen könnte. Um Aussagen darüber treffen zu können, ob dieses angelagerte Schwefelatom nur im Rahmen des Schwefeloxidationsprozesses im Zytoplasma vorhanden ist, wurde das Liponsäure-bindende Protein aus der Mutante *H. denitrificans* Δ tsdA Δ soxR lbpA-His isoliert und via MALDI-TOF MS analysiert, wobei der Organismus einmal in Abwesenheit und einmal mit 2 mM Thiosulfat im Medium angezogen wurde. Das Ergebnis spricht für sich: Die zusätzlichen 32 Da sind ausschließlich an dem Protein zu finden, das aus der Mutante aufgereinigt wurde, die mit Thiosulfat in Berührung kam.

Es besteht die Überlegung, dass sich das *in vivo* beobachtete, an Lipoyl-LbpA2 angelagerte Schwefelatom an einer der Thiolgruppen der Liponsäure befindet und diese damit eine GcvH-ähnliche Funktion des Substrattransfers durchführen kann. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit generierten Erkenntnisse aus verschiedenen Experimenten legen die Möglichkeit nahe, dass die Persulfidierung eines der Cysteinreste des LbpA-Proteins zu dem beobachteten Massenzuwachs führt. Bei näherer Betrachtung der Cysteinreste aller hier betrachteten LbpA-Proteine fiel auf, dass es neben den konservierten Cys₇ und Cys₁₄₅-Resten, die wie bereits beschrieben wahrscheinlich eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden, in TKLbpA1_1 (TK90_0638) und TsLbpA1 identische Cysteinreste an den Positionen 3, 81 und 131 (auf TKLbpA1_1 bezogen) gibt, wobei Cys₃ und Cys₁₃₁ aufgrund ihrer räumlichen Nähe (1,8 Å) vermutlich eine stabilisierende Disulfidbrücke ausbilden. Cys₈₁ stellt somit einen freien Cystein-Rest dar, an das eine Schwefelanlagerung denkbar wäre. Während in TKLbpA2 und TsLbpA2 Cys₄₀ und Cys₆₄ neben Cys₇ und Cys₁₄₅ konserviert sind, fehlt HdLbpA2 vergleichend dazu der Cysteinrest an Position 40. Beide Cysteine liegen voneinander entfernt,

Diskussion

sodass beide als potentielle Schwefelliganden in Frage kommen (mit Cys₆₄ als vielversprechendsten Kandidaten durch die Konservierung auch in HdLbpA2). In dem Zusammenhang gilt es jedoch zu beachten, dass auch TKGcvH, TsGcvH und EcGcvH Cys₆₄ kodieren. Während TKLbpA1_2 ebenso wie AqLbpA1_1 (Aq_944) beide an Position 142 einen verhältnismäßig gut an der Oberfläche des Proteins exponierten Cysteinrest besitzen, besitzen AqLbpA1_2 (Aq_1657), AqLbpA2 sowie RmLbpA2 ausschließlich C₇ und C₁₄₅.

Da die Persulfidierung von Lipoyl-TK90LbpA2_C7A_C40A_C64A_C145A, einem LbpA2-Protein ohne Cysteinreste *in vitro* mit Polysulfid bisher erfolglos war und auch kein Schwefeltransfer von TK90TusA (TK90_0631), TK90Rhodanese (TK90_0630) oder TK90DsrE3B (TK90_0639) im Rahmen von Schwefeltransferassays auf dieses Akzeptorprotein verzeichnet werden konnte, ist die Anlagerung des Schwefels an die Thiolgruppen der Liponsäure innerhalb von LbpA2 unwahrscheinlich. Vorausgegangene Versuche von Sebastian Tanabe brachten hingegen die Erkenntnis, dass ein Schwefeltransfer von TK90TusA auf das Apoprotein TK90LbpA2 (alle Cysteine vorhanden) ohne den Liponsäure-Cofaktor möglich war. Diese Beobachtung bekräftigt die Theorie, dass das Schwefelatom an einem der Cysteinreste gebunden vorliegt. Zudem wurde im Rahmen der *in vitro* Liponsäureassemblierung mit den Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 in der Negativkontrolle (ohne SAM) ein LbpA2 detektiert, das eindeutig keine Schwefelatome an C₆ und C₈ haben kann (radikalische Reaktion notwendig), das jedoch 32 Da größer als die erwartete Masse war, wenn eine Schwefelquelle (in diesem Fall wahrscheinlich zerfallene FeS-Cluster aus LipS1/LipS2) im Ansatz vorlagen.

Eine mögliche Hypothese ist, dass die Liponsäure nicht als Schwefel-transferierendes Molekül aktiv ist, sondern ausschließlich eine Rolle in der Oxidoreduktase-Reaktion spielt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das LbpA an sich mit seinen konservierten Cysteinresten eine Schwefeltransferfunktion innerhalb des sHdr-LbpA-Systems übernimmt. In Zukunft sollten die im Rahmen dieser Arbeit generierten TK90LbpA2-Varianten mit allen möglichen Cystein-Austausch-Kombinationen (siehe bereits klonierte Plasmide, Tab. A1 im Anhang) in Schwefeltransferassays eingesetzt werden, um weitere Erkenntnisse über Funktion von LbpA innerhalb der dissimilatorischen Schwefeloxidation zu sammeln.

Interessanterweise kommen LbpA-Proteine und deren für die Assemblierung verantwortlichen Enzyme nicht nur in Schwefeloxidierern vor. In *R. mucosus* z.B. liegen stromaufwärts des

lbpA2-Gens (ros muc_01223) Gene, die für die Gamma-, Beta- und Alpha-Untereinheiten der Formiatdehydrogenase, den Formiatdehydrogenase-Assemblierungsfaktor FdhD sowie die Delta-Untereinheit der Formiatdehydrogenase kodieren. Bisher ist jedoch keine Verbindung zwischen der Formiatdehydrogenase, die die reversible Umsetzung von Formiat zu Kohlenstoffdioxid katalysiert, und einem Liponsäure-bindenden Protein bekannt. Im Rahmen der Genomanalyse von *Thermoanaerobacter kivui* wurde lediglich ein als *gcvH* annotiertes Gen erwähnt, das mit Genen des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs (Wood-Ljungdahl-Weg) assoziiert sind (Hess et al., 2014). Seine Funktion ist unbekannt, auch wenn postuliert wurde, dass seine Funktion wichtig zu sein scheint, da das Gen auch in anderen Organismen wie *Acetobacterium woodii* und *Moorella thermoacetica* mit den Genen des Wood-Ljungdahl-Weg assoziiert ist. Kürzlich wurde zudem ein Modell aufgestellt, in dem eine mögliche Funktion eines GcvH-ähnlichen Proteins innerhalb der Typ II Methylen-Tetrahydrofolatreduktase-katalysierten Reduktion von Methylen-THF und Ferredoxin beschrieben (Öppinger et al., 2022). Da alle LbpA-Proteine bislang als GcvH in Protein-Datenbanken annotiert sind, gibt es voraussichtlich eine hohe Dunkelziffer an LbpA-Proteinen, die in Zukunft noch als solche identifiziert werden müssen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktionsaufklärung dieses interessanten Proteins ein spannendes Forschungsgebiet bleibt. Da sich das Liponsäure-bindende Protein LbpA in seinen Eigenschaften hinsichtlich der Oberflächenladung stark von GcvH unterscheidet, müssen auch die Enzyme, die an der gesamten Liponsäureassemblierung beteiligt sind entsprechend angepasst sein, um diesen Prozess funktionsfähig zu halten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde maßgeblich zur Aufklärung dieser spezifischen Liponsäureassemblierung in Schwefeloxidierern mit sHdr-LbpA-System beigetragen. Zudem wurden Hypothesen zu einzelnen Mechanismen aufgestellt und Denkanstöße gegeben, an welchen Stellen eine Erforschung in Zukunft interessant wäre.

4.8. Erfolgreiche Konzeption und Etablierung eines CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesesystems für *H. denitrificans*

Für die oben genannten, zukünftigen Forschungsziele sind gentechnisch veränderte *H. denitrificans*-Stämme für *in vivo* Untersuchungen essentiell. Dieser Organismus dient u.a. als Modellorganismus für die Analyse des oxidativen Schwefelstoffwechsels. Die Mutagenese in Form von Gendeletionen und -insertionen in seinem Chromosom waren dabei bisher entscheidend für die Aufklärung der dissimilatorischen Schwefeloxidation (Cao et al., 2018;

Koch & Dahl, 2018; J. Li et al., 2024; J. Li, Koch et al., 2023; J. Li, Törkel et al., 2023; Tanabe et al., 2024; Tanabe et al., 2023). Das Fehlen eines effizienten und zeitsparenden markerlosen Genombearbeitungswerkzeug für *H. denitrificans* stellt jedoch einen Engpass für diese grundlegenden Studien dar. Dabei wurde bisher auf die konventionelle Art der Genombearbeitung mittels homologer Rekombination zurückgegriffen (Jasin & Schimmel, 1984; Ruvkun & Ausubel, 1981; Winans et al., 1985). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten jedoch z.B. trotz mehrfacher Durchführung der Mutagenese mittels homogener Rekombination zur Vergügung gestellter DNA-Fragmente innerhalb des Suizidvektors pK18mobsacB (Schäfer et al., 1994) keine Deletionsmutanten der *lipS1*-, *lipT*- sowie *lipS2*-Gene generiert werden. Dieses System beruht auf dem Einbau des nicht-replizierenden Vektors in das Genom von *H. denitrificans* über ein erstes Single-Crossover-Ereignis (SCO) und der anschließenden Exzision des Vektors über ein zweites SCO-Ereignis bei der Induktion von Gegenselektionsdruck; Durch den Einsatz von Saccharose im Kulturmedium wachsen nur die Mutanten, die den Vektor wieder aus dem Genom entfernt haben und somit keine Levansucrase (*sacB*) mehr exprimieren. Das zweite SCO kann dabei entweder zur Rekonstitution eines genomischen Wildtyps oder zur gewünschten genetischen Veränderung führen. Das Fehlen einer Gegenselektionsmethode, die speziell auf die interessierende genomische Region abzielt, führt in der Regel zu hohen Raten von Wildtyp-Revertanten, insbesondere bei essenziellen Genen. Daher kann das Screening von Mutanten zeitaufwendig sein und ist häufig erfolglos.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Notwendigkeit einer Optimierung der Genombearbeitung, um die Erforschung der dissimilatorischen Schwefeloxidation in *H. denitrificans* voranzubringen, wurde ein an den Organismus angepasstes CRISPR/Cas9-basiertes Mutagenesesystems entworfen und erstmalig erfolgreich in Form einer markerlosen Deletion des Lipoat:Protein-Ligase-Gens *slpI*(AB) (Hden_0686) durchgeführt.

Die Etablierung einer CRISPR/Cas9-Technologie lieferte bereits 2014 ein kostengünstiges und einfach durchzuführendes Verfahren, um ortsspezifische Mutagenese einer Vielzahl von Zellen und Organismen präzise und effizient durchzuführen. Diese Technologie ist dabei auf CRISPR-Cas-Systeme vom Typ II zurückzuführen, die Bakterien eine adaptive Immunität gegen Viren und Plasmide verleihen (Doudna & Charpentier, 2014). Das CRISPR-assoziierte Protein Cas9 (ursprünglich aus *Streptococcus pyogenes*) ist eine Endonuklease, die eine spezifische Leitsequenz innerhalb eines RNA-Duplexes, crRNA:tracrRNA, verwendet, um an DNA-Zielsequenzen zu binden, wodurch Cas9 einen ortsspezifischen Doppelstrangbruch in die DNA

einführen kann (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek et al., 2012). Im Gegensatz zu Eukaryoten, die alle Non-homologous End Joining (NHEJ)-ähnliche Systeme besitzen, um diesen Doppelstrangbruch reparieren zu können, sind viele Prokaryoten auf die homologe Rekombination (HR) in Form von Anlagerungen eines zur Verfügung gestellten DNA-Fragments innerhalb eines Plasmids mit homologen Bereichen zur Ziel-DNA angewiesen, da ihnen die DNA-Reparaturenzyme fehlen, die für den bakteriellen NHEJ-Mechanismus verantwortlich sind, namentlich Ku und LigD (Bowater & Doherty, 2006). Leider stellt der Modellorganismus *H. denitrificans* eine Ausnahme dar, da er Gene für beide Proteine in seinem Genom kodiert (*ku*: Hden_1068; *ligD*: Hden_1069). Diese Tatsache erschwert die genetische Manipulation des Organismus unabhängig von dem gewählten Mutagenesewerkzeug (konventionell oder CRISPR/Cas9). Die Cas9-basierten Doppelstrangbrüche sind folglich in *H. denitrificans* nicht gezwungenermaßen tödlich, was die Effizienzrate des Mutagenesesystems verhältnismäßig gering ausfallen lässt. Das gleiche gilt jedoch auch für *C. sphaeroides* und bekanntlich wurden für diesen Organismus nichtsdestotrotz hohe Effizienzraten mittel CRISPR/Cas9-basierter Mutagenese erzielt (Mougiakos et al., 2019).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Plasmid pBBR_Cas9_NT, das ursprünglich auf *C. sphaeroides* optimiert wurde (Mougiakos et al., 2019), umkloniert, um es effizient für die Mutagenese von *H. denitrificans*-Stämmen einsetzen zu können.

Die zuvor beschriebene duale crRNA:tracrRNA wird im Rahmen der CRISPR/Cas9-Technologie als Single Guide RNA (sgRNA) konstruiert, die zwei entscheidende Merkmale trägt: eine 20 Nukleotide umfassende Targeting-Sequenz am 5'-Ende, die der DNA-Zielstelle entspricht, und eine Duplex-RNA-Struktur (gRNA-Scaffold) am 3'-Ende, die an Cas9 bindet (Doudna & Charpentier, 2014).

Bekanntermaßen wird die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Hden_2446), ein Enzym der Glykolyse und revers agierend der Gluconeogenese, in *H. denitrificans* mit am häufigsten exprimiert und die Expression wird nicht durch die Anwesenheit von Dimethylamin oder Dimethylsulfid beeinflusst (Koch & Dahl, 2018). Aufgunddessen wurden sowohl die Promotor- als auch die Terminatorsequenzen dieses Enzyms jeweils stromaufwärts und -abwärts der optimierten sgRNA positioniert. Die Sequenz eines rho-unabhängigen Terminators wurde im Zuge der Anwendung des Onlinetools „ARNold“ (Naville et al., 2011) vorhergesagt, die Promotorsequenz mittels SAPHIR (Coppens & Lavigne, 2020). Zur

Diskussion

Bestätigung der erfolgreichen Transkription der sgRNA unter dem Promotor der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase könnte zukünftig eine RT-PCR durchgeführt werden.

Das gRNA-Scaffold (tracrRNA) wurde im Rahmen der *in silico* Konstruktion der optimierten sgRNA mit angepasster Promotor- und Terminatorsequenz ebenfalls modifiziert („sgRNA(F+E) combined“-Sequenz nach B. Chen et al., 2013), da sie in der Vergangenheit zu einer effizienteren Cas9-Beladung und Genom-Editierung führte.

Für den Non-Targeting-Spacer in pHD_Cas9_NT wurde geprüft, dass es im Genom von *H. denitrificans* mindestens sechs Fehlpaarungen (Mismatches) innerhalb der 12 PAM-distalen Nukleotide sowie mindestens zwei zusätzliche Fehlpaarungen innerhalb der 8 PAM-proximalen Nukleotide enthält. Bei dieser Anzahl der Fehlanpassungen wurde wissenschaftlich belegt, dass der Off-Targeting-Effekt des Cas9-Enzyms zu vernachlässigen ist (Hsu et al., 2013). 2015 wurde zudem eine systematische Analyse der CRISPR-Cas9 Fehlpaarungstoleranz durchgeführt, die ergab, dass generell mehr als 3 Fehlpaarungen innerhalb der 20 Nukleotide der Erkennungssequenz zu keiner Erkennung mehr führten (Anderson et al., 2015); Dabei sind Fehlpaarungen am 3`-Ende fataler als am 5`-Ende (entfernter zur PAM-Sequenz).

Es wurde berichtet, dass die Mutagenese-Effizienz eines Cas9-Systems stark von der ausgewählten Targeting-Sequenz abhängt und sich erheblich zwischen verschiedenen Zielen unterscheiden kann, sogar innerhalb desselben Gens (Cui & Bikard, 2016; Mougiakos et al., 2019). Daher stellt die Verfügbarkeit eines entsprechenden Werkzeugs zur Auswahl einer Targeting-Sequenz mit möglichst hoher vorhergesagter Effizienzrate wie ChopChop (Labun et al., 2019) eine enorme Erleichterung dar beim Design der Oligonukleotide, die mittels GGA in das Plasmid pHD_Cas9_NT eingebaut werden. Alternativ wäre nur eine manuelle Suche nach PAM-Sequenzen möglich ohne Prognose, wie effizient die ausgewählte Sequenz sein würde. Da den im Rahmen der an diese Arbeit angegliederten Bachelorarbeit (Schilling, 2024) genutzten Oligonukleotiden, die der Zielsequenz entsprechen, ein PAM-proximales Nukleotid fehlt (siehe GGA_Hden0686_fw und GGA_Hden0686_rev, 2.1.5.), und dies bekanntermaßen einen großen Einfluss auf die Effizienz des gesamten Mutagenesesystems hat (Anderson et al., 2015), stehen in Zukunft die Untersuchungen zur tatsächlichen Effizienz der ausgewählten Targeting-Sequenzen (siehe Tab. 14) noch aus.

Die Expression des *cas9*-Gens erfolgte unter der Kontrolle des plac -Promotors, der aufgrund des Fehlens des *lacI*-Repressorgens im Genom von *H. denitrificans* eine konstitutive Transkriptionsaktivität aufweist. Ob die Codonoptimierung des *cas9*-Gens auf *C. sphaeroides* einen Einfluss auf die Transkription des Gens in *H. denitrificans* hat, sollte in Zukunft mittels real-time (RT)-PCR verifiziert werden. Eine vergleichende Analyse des Codon-Gebrauchs von *H. denitrificans* und *C. sphaeroides* lassen jedoch zunächst nicht darauf schließend, dass es Probleme bei der Expression von *cas9* geben könnte (Nakamura et al., 2000). Interessanterweise kann es auch unbeabsichtigt zu toxischen Effekten des Cas9-Enzyms kommen. In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach eine Einschränkungen der Mutageneseeffizienz beschrieben, die auf diesen Effekten beruhen (Hao et al., 2023; Y. Jiang et al., 2017; H. Li et al., 2016; Wendt et al., 2016). Die Durchführung der Elektroporation von *pHD_Cas9_NT* in *H. denitrificans* ist aufgrunddessen als Kontrolle unabdingbar. Dadurch wird sichtbar, ob die Expression des *cas9*-Gens einen Einfluss auf die Vitalität des Organismus hat im Vergleich zu *H. denitrificans*-Zellen, die dem Experiment der Elektroporation zwar unterzogen, jedoch kein Plasmid zur Aufnahme zur Verfügung gestellt bekommen haben. In Zukunft könnte eine mögliche Toxizität des Cas9-Proteins und damit ein Einfluss dieses Enzyms auf das Wachstum von *H. denitrificans* auch in Form von Wachstumsexperimenten der *H. denitrificans* ΔtsdA ΔsoxR $\Delta\text{slpl(AB)}$ *lbpA*-His-Mutante, in der *pHD_Cas9_Tslpl(AB)_\Delta\text{slpl(AB)}* noch vorhanden ist, im Vergleich zu *H. denitrificans* ΔtsdA $\Delta\text{slpl(AB)}$ *lbpA*-His untersucht werden. Bei erfolgreichem *pHD_Cas9*-Plasmid-Verlust ist diese eventuell auftretende Wachstumseinschränkung jedoch für Folgeexperimente mit der entsprechenden *H. denitrificans*-Mutante nicht mehr von Bedeutung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein CRISPR/Cas9-basiertes Mutagenesesystem für *H. denitrificans* entworfen wurde. Die Generierung einer ersten Mutante, namentlich *H. denitrificans* ΔtsdA ΔsoxR ΔlipX *lbpA*-His verifiziert die Funktionalität des Systems. In Zukunft stehen jedoch noch weitere Experimente aus, um die Effizienz des Systems vergleichend zur konventionell durchgeführten Mutagenese in *H. denitrificans* herauszustellen. Eine markerlose Deletion einzelner Gene, die für die Erforschung der dissimilatorischen Schwefeloxidation von großem Interesse sind, ist bisher nicht mit der gewünschten Effizienz geglückt. Mit dem Vorteil, nun ein CRISPR/Cas9-basiertes Mutagenesesystem in *H. denitrificans* nutzen zu können, steigt die Wahrscheinlichkeit, in naher Zukunft die gewünschten Mutanten zu erhalten und neue Einblicke in die Funktion der einzelnen Proteine und Enzyme *in vivo* zu gewinnen.

5. Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit wurden umfassende bioinformatische und Protein-biochemische Untersuchungen zur Liponsäureassemblierung an LbpA durchgeführt, einem essenziellen Liponsäure-bindenden Protein der dissimilatorischen Schwefeloxidation am zytoplasmatischen sHdr-Multienzymkomplex.

Die Forschung konzentrierte sich auf mehrere zentrale Aspekte der Funktionsweise der Assemblierung des Cofaktors an GcvH, LbpA1 und LbpA2 sowie auf die Substratspezifität der Lipoat:Protein-Ligasen aus ausgewählten repräsentativen Mikroorganismen, die zusätzlich den Liponsäureassemblierungsweg an LbpA durchführen im Vergleich zu *E. coli*, der ausschließlich den kanonischen Liponsäureassemblierungsweg an GcvH und Lipoyldomänen innerhalb der E2-Untereinheiten bekannter α -Ketosäuredehydrogenasen durchführt.

Ein zentrales Ergebnis der Arbeit war die Identifizierung der für die phylogenetische Trennung verantwortlichen Aminosäuren von GcvH, LbpA1 und LbpA2. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Substratspezifität der Lipoat:Protein-Ligasen der untersuchten Organismen durch komplementäre Oberflächenladungen der Polypeptide bestimmt wird. Diese Theorie konnte durch den Austausch konservierter, basischer Aminosäuren in einem heterolog exprimierten LbpA2-Proteins *in vitro* bekräftigt werden.

Weiterhin wurde der Mechanismus der sich gegenseitig anziehenden, komplementären Oberflächenladungen von sLpl(AB) und LbpA auch für die Interaktion zwischen LipB und GcvH in Betracht gezogen. Wachstumsexperimenten an *H. denitrificans* $\Delta tsdA \Delta slpl(AB)$ *lbpA*-His deuten in dem Zusammenhang auf eine fehlende Aktivität von LipB an LbpA-Proteinen hin. Es ist wahrscheinlich, dass auch die Substraterkennung der Lipoylsynthasen LipS1 und LipS2 sowie von LipA auf der Ladungsanziehung zwischen den jeweiligen Enzymen und LbpA bzw. GcvH beruht.

Da die Oxidoreduktase LipT ebenfalls einen großen negativ geladenen Oberflächenausschnitt in der Nähe des aktiven Zentrums aufweist, zudem eine tunnelartige Struktur zum FAD-Cofaktor hin aufweist, die eine Interaktion zu dem lipoylierten LbpA nahe legt, wurden einführende Versuche zur Untersuchung einer möglichen Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Funktion von LipT durchgeführt, die diese Hypothese untermauern.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Modell für die differenzierte Liponsäureassemblierung von GcvH und LbpA in schwefeloxidierenden Bakterien wie *H. denitrificans* aufgestellt, die das sHdr-LbpA-System besitzen. Die Hypothese besagt, dass nur die Liponsäure-bindenden Proteine mit dem Cofaktor beladen werden, die unter den gegebenen Umweltbedingungen für ihre katalytische Aktivität benötigt werden, und der Organismus entsprechend zwischen der Lipoylierung der in der Zelle vorliegenden Liponsäure-bindenden Proteine GcvH und LbpA wechselt, jenachdem welches Protein für den jeweiligen Stoffwechselweg benötigt wird.

Ein weiterer bedeutender Fortschritt dieser Arbeit war die Etablierung eines optimierten CRISPR/Cas9-basierten Mutagenesesystems für *H. denitrificans*, welches die erste Mutante *H. denitrificans* $\Delta tsdA$ $\Delta soxR$ $\Delta lipX$ *lbpA*-His hervorbrachte.

Zusammenfassend konnte die Arbeit wichtige molekulare Mechanismen der Liponsäureassemblierung an LbpA in schwefeloxidierenden Bakterien aufklären und ein neues Mutagenesesystem etablieren, das zukünftige Forschungsarbeiten in diesem Bereich wesentlich erleichtern wird.

Literaturverzeichnis

- Adkins, S. & Burmeister, M. (1996). Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Analytical Biochemistry*, 240(1), 17–23. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0325>
- Ali, S. T., Moir, A. J., Ashton, P. R., Engel, P. C. & Guest, J. R. (1990). Octanoylation of the lipoyl domains of the pyruvate dehydrogenase complex in a lipoyl-deficient strain of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 4(6), 943–950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00667.x>
- Anandham, R., Indiragandhi, P., Madhaiyan, M., Chung, J.-B., Ryu, K.-Y., Jee, H.-J. & Sa, T. (2009). Thiosulfate Oxidation, Mixotrophic Growth of *Methylobacterium goesingense* and *Methylobacterium fujisawaense*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(1), 17–22. <https://doi.org/10.4014/jmb.0802.127>
- Anderson, E. M., Haupt, A., Schiel, J. A., Chou, E., Machado, H. B., Strezoska, Ž., Lenger, S., McClelland, S., Birmingham, A., Vermeulen, A. & van Smith, A. B. (2015). Systematic analysis of CRISPR-Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity. *Journal of Biotechnology*, 211, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.427>
- Argyrou, A. & Blanchard, J. S. (2004). Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 78, 89–142. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(04\)78003-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(04)78003-4)
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Barrangou, R. & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*, 54(2), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Beinert, H. (1983). Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Analytical Biochemistry*, 131(2), 373–378. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90186-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90186-0)
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00160>
- Bergmeyer, H. U. (1975). Neue Werte für die molaren Extinktions-Koeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium [New values for the molar extinction coefficients of NADH and NADPH for the use in routine laboratories (author's transl)]. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie*, 13(11), 507–508. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3038/>
- Bergmeyer, H. U. (1983). *Methods of Enzymatic Analysis*.
- Bernofsky, C. & Swan, M. (1973). An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Analytical Biochemistry*, 53(2), 452–458. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90094-8)
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Booker, S. J. & Lloyd, C. T. (2022). Twenty Years of Radical SAM! The Genesis of the Superfamily. *ACS Bio & Med Chem Au*, 2(6), 538–547. <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.2c00078>
- Bordo, D. & Argos, P. (1994). The role of side-chain hydrogen bonds in the formation and stabilization of secondary structure in soluble proteins. *Journal of Molecular Biology*, 243(3), 504–519. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1676>
- Bowater, R. & Doherty, A. J. (2006). Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS genetics*, 2(2), e8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020008>

- Braymer, J. J., Freibert, S. A., Rakwalska-Bange, M. & Lill, R. (2021). Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(1), 118863. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118863>
- Brito, J. A., Denkmann, K., Pereira, I. A. C [Inês A. C.], Archer, M. & Dahl, C [Christiane] (2015). Thiosulfate dehydrogenase (TsdA) from *Allochromatium vinosum*: structural and functional insights into thiosulfate oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(14), 9222–9238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.623397>
- Brooke, A. G. & Attwood, M. M. (1983). Regulation of Enzyme Synthesis during the Growth of *Hyphomicrobium X* on Mixtures of Methylamine and Ethanol. *Microbiology*, 129(8), 2399–2404. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-8-2399>
- Brooke, A. G. & Attwood, M. M. (1984). Methylamine Uptake by the Facultative Methylotroph *Hyphomicrobium X*. *Microbiology*, 130(3), 459–463. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-3-459>
- Brooke, A. G. & Attwood, M. M. (1985). Regulation of enzyme synthesis in *Hyphomicrobium X*: Growth on mixtures of methylamine and ethanol in continuous cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 29(3), 251–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00871.x>
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Cai, P., Gao, J. & Zhou, Y. (2019). CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1112-2>
- Canfield, D. E. & Raiswell, R. (1999). The evolution of the sulfur cycle. *American Journal of Science*(299(7-9), 697–723. <https://doi.org/10.2475/ajs.299.7-9.697>
- Cao, X. & Cronan, J. E [John E.] (2015). The *Streptomyces coelicolor* lipoate-protein ligase is a circularly permuted version of the *Escherichia coli* enzyme composed of discrete interacting domains. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 7280–7290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626879>
- Cao, X., Koch, T., Steffens, L., Finkensieper, J., Zigann, R., Cronan, J. E [John E.] & Dahl, C [Christiane] (2018). Lipoate-binding proteins and specific lipoate-protein ligases in microbial sulfur oxidation reveal an atypical role for an old cofactor. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.37439>
- Challand, M. R., Ziegert, T., Douglas, P., Wood, R. J., Kriek, M., Shaw, N. M. & Roach, P. L. (2009). Product inhibition in the radical S-adenosylmethionine family. *FEBS Letters*, 583(8), 1358–1362. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.044>
- Chen, B [Baohui], Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., Park, J., Blackburn, E. H., Weissman, J. S., Qi, L. S. & Huang, B. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 155(7), 1479–1491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>
- Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W.-S., Bae, T. & Ji, Q. (2017). Rapid and Efficient Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System. *Journal of the American Chemical Society*, 139(10), 3790–3795. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13317>
- Cicchillo, R. M., Iwig, D. F., Jones, A. D., Nesbitt, N. M., Baleanu-Gogonea, C., Souder, M. G., Tu, L. & Booker, S. J. (2004). Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid. *Biochemistry*, 43(21), 6378–6386. <https://doi.org/10.1021/bi049528x>
- Coppens, L. & Lavigne, R. (2020). SAPPHERE: a neural network based classifier for $\sigma 70$ promoter prediction in *Pseudomonas*. *BMC bioinformatics*, 21(1), 415. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03730-z>

- Cronan, J. E [John E.] (2016). Assembly of Lipoic Acid on Its Cognate Enzymes: an Extraordinary and Essential Biosynthetic Pathway. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(2), 429–450. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00073-15>
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Cui, L. & Bikard, D. (2016). Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 44(9), 4243–4251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw223>
- Dahl, C [C.] (1996). Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. *Microbiology (Reading, England)*, 142 (Pt 12)(12), 3363–3372. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-12-3363>
- Dahl, C [Christiane] (2015). Cytoplasmic sulfur trafficking in sulfur-oxidizing prokaryotes. *IUBMB Life*, 67(4), 268–274. <https://doi.org/10.1002/iub.1371>
- Dahl, C [Christiane] (2020). A biochemical view on the biological sulfur cycle(2), 55–96. https://doi.org/10.2166/9781789060966_0055
- Dahl, C [Christiane], Engels, S., Pott-Sperling, A. S., Schulte, A., Sander, J., Lübbe, Y., Deuster, O. & Brune, D. C. (2005). Novel genes of the dsr gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1392–1404. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1392-1404.2005>
- Dahl, C [Christiane], Prange, A. & Steudel, R. (2005). *Metabolism of Natural Polymeric Sulfur Compounds. Biopolymers Online*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/3527600035.bpo19002>
- Danson, M. J. (1988). Dihydropolipoamide dehydrogenase: a 'new' function for an old enzyme? *Biochemical Society transactions*, 16(2), 87–89. <https://doi.org/10.1042/bst0160087>
- Denkmann, K., Grein, F., Zigann, R., Siemen, A., Bergmann, J., van Helmont, S., Nicolai, A., Pereira, I. A. C [Inês A. C.] & Dahl, C [Christiane] (2012). Thiosulfate dehydrogenase: a widespread unusual acidophilic c-type cytochrome. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2673–2688. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02820.x>
- Dong, G., Cao, L. & Ryde, U. (2018). Insight into the reaction mechanism of lipoyl synthase: a QM/MM study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(2), 221–229. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1522-8>
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Douglas, P., Kriek, M., Bryant, P. & Roach, P. L. (2006). Lipoyl synthase inserts sulfur atoms into an octanoyl substrate in a stepwise manner. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 45(31), 5197–5199. <https://doi.org/10.1002/anie.200601910>
- Dym, O. & Eisenberg, D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 10(9), 1712–1728. <https://doi.org/10.1110/ps.12801>
- Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLOS ONE*, 3(11), e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>
- Ernst, C., Kayastha, K., Koch, T., Venceslau, S. S [Sofia S.], Pereira, I. A. C [Inês A. C.], Demmer, U., Ermler, U. & Dahl, C [Christiane] (2021). Structural and spectroscopic characterization of a HdrA-like subunit from *Hyphomicrobium denitrificans*. *The FEBS Journal*, 288(5), 1664–1678. <https://doi.org/10.1111/febs.15505>
- Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yaung, S. J. & Church, G. M. (2013). Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nature Methods*, 10(11), 1116–1121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2681>

- Faßbender, W. (2019). *Die Funktion des Lipoatbindeproteins LbpA2 im oxydativen Schwefelstoffwechsel von Hyphomicrobium denitrificans* [Bachelorarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- 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(2-3), 147–154. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90041-2)
- Fernández-Suárez, M., Baruah, H., Martínez-Hernández, L., Xie, K. T., Baskin, J. M., Bertozzi, C. R. & Ting, A. Y. (2007). Redirecting lipoic acid ligase for cell surface protein labeling with small-molecule probes. *Nature Biotechnology*, 25(12), 1483–1487. <https://doi.org/10.1038/nbt1355>
- Fish, W. W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods in Enzymology*, 158, 357–364. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)58067-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)58067-9)
- Flegler, W. (2021). *Membran- und cytoplasmatischer Transport von Sulfanschwefel in Hyphomicrobium denitrificans* [Masterarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Freibert, S.-A [Sven-A], Goldberg, A. V., Hacker, C., Molik, S., Dean, P., Williams, T. A., Nakjang, S., Long, S., Sendra, K., Bill, E., Heinz, E., Hirt, R. P., Lucocq, J. M., Embley, T. M. & Lill, R. (2017). Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron-sulfur cluster biosynthesis. *Nature Communications*, 8(1), 13932. <https://doi.org/10.1038/ncomms13932>
- Freibert, S.-A [Sven-Andreas], Weiler, B. D., Bill, E., Pierik, A. J., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2018). Chapter Seven - Biochemical Reconstitution and Spectroscopic Analysis of Iron–Sulfur Proteins. In V. Bandarian (Hrsg.), *Methods in Enzymology : Radical SAM Enzymes* (Bd. 599, S. 197–226). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.11.034>
- Frey, P. A. & Booker, S. J. (2001). Radical mechanisms of S-adenosylmethionine-dependent enzymes. In *Advances in Protein Chemistry : Novel Cofactors* (Bd. 58, S. 1–45). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(01\)58001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(01)58001-8)
- Friedrich, C. G [C. G.], Rother, D., Bardischewsky, F [F.], Quentmeier, A [A.] & Fischer, J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2873–2882. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2873-2882.2001>
- Fujiwara, K., Maita, N., Hosaka, H., Okamura-Ikeda, K., Nakagawa, A. & Taniguchi, H. (2010). Global conformational change associated with the two-step reaction catalyzed by *Escherichia coli* lipoate-protein ligase A. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9971–9980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.078717>
- Fujiwara, K., Toma, S., Okamura-Ikeda, K., Motokawa, Y [Yutaro], Nakagawa, A. & Taniguchi, H. (2005). Crystal structure of lipoate-protein ligase A from *Escherichia coli*. Determination of the lipoic acid-binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33645–33651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505010200>
- Gliesche, C. G [C. G.] (1997). Transformation of methylotrophic bacteria by electroporation. *Canadian journal of microbiology*, 43(2), 197–201. <https://doi.org/10.1139/m97-026>
- Gliesche, C. G [Christian G.], Fesefeldt, A. & Hirsch, P. (2015). *Hyphomicrobium*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (S. 1–34). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00820>
- Goldman, D. S. (1959). Enzyme systems in the mycobacteria. VI. Further studies on the pyruvic dehydrogenase system. *Biochimica et biophysica acta*, 32(1), 80–95. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90555-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90555-4)
- Gophna, U., Allers, T. & Marchfelder, A. (2017). Finally, Archaea Get Their CRISPR-Cas Toolbox. *Trends in Microbiology*, 25(6), 430–432. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.03.009>

- 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*(3), e0173395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173395>
- 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 of the United States of America*, *112*(52), E7166-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506386112>
- Green, D. E., Morris, T. W., Green, J., Cronan, J. E [J. E.] & Guest, J. R. (1995). Purification and properties of the lipoate protein ligase of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, *309* (Pt 3)(Pt 3), 853–862. <https://doi.org/10.1042/bj3090853>
- Groenen, P. M., Bunschoten, A. E., van Soolingen, D. & van Embden, J. D. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*, *10*(5), 1057–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
- Grosser, M. (2021). *Biochemical and Functional Characterization of a Novel Radical SAM Protein from Hyphomicrobium denitrificans* [Masterarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Gunsalus, I. C. (1954). The Mechanism of Enzyme Action. *Soil Science*, *77*(6), 482. <https://doi.org/10.1097/00010694-195406000-00013>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Hao, L., Zhao, R. T., Welch, N. L., Tan, E. K. W., Zhong, Q., Harzallah, N. S., Ngambenjawong, C., Ko, H., Fleming, H. E., Sabeti, P. C. & Bhatia, S. N. (2023). CRISPR-Cas-amplified urinary biomarkers for multiplexed and portable cancer diagnostics. *Nature nanotechnology*, *18*(7), 798–807. <https://doi.org/10.1038/s41565-023-01372-9>
- Hartenfels, H. (2022). *Beiträge zur Reifung des neuartigen Lipoatbindeproteins LbpA aus dem Alphaproteobakterium Hyphomicrobium denitrificans* [Bachelorarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Hay Mele, B., Monticelli, M., Leone, S., Bastoni, D., Barosa, B., Cascone, M., Migliaccio, F., Montemagno, F., Ricciardelli, A., Tonietti, L., Rotundi, A., Cordone, A. & Giovannelli, D. (2023). Oxidoreductases and metal cofactors in the functioning of the earth. *Essays in Biochemistry*, *67*(4), 653–670. <https://doi.org/10.1042/EBC20230012>
- Hekkelman, M. L., Vries, I. de, Joosten, R. P. & Perrakis, A. (2023). AlphaFill: enriching AlphaFold models with ligands and cofactors. *Nature Methods*, *20*(2), 205–213. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01685-y>
- Hess, V., Poehlein, A., Weghoff, M. C., Daniel, R. & Müller, V. (2014). A genome-guided analysis of energy conservation in the thermophilic, cytochrome-free acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *BMC Genomics*, *15*(1), 1139. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1139>
- Hill, H. D. & Straka, J. G. (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analytical Biochemistry*, *170*(1), 203–208. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90109-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90109-1)
- Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of chromatography*, *411*, 177–184. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)93969-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)93969-4)
- Hoe, N., Nakashima, K., Grigsby, D., Pan, X., Dou, S. J., Naidich, S., Garcia, M., Kahn, E., Bergmire-Sweat, D. & Musser, J. M. (1999). Rapid molecular genetic subtyping of serotype M1 group A *Streptococcus* strains. *Emerging Infectious Diseases*, *5*(2), 254–263. <https://doi.org/10.3201/eid0502.990210>

- Holliday, G. L., Akiva, E., Meng, E. C., Brown, S. D., Calhoun, S., Pieper, U., Sali, A., Booker, S. J. & Babbitt, P. C. (2018a). Atlas of the Radical SAM Superfamily: Divergent Evolution of Function Using a “Plug and Play” Domain. In V. Bandarian (Hrsg.), *Methods in Enzymology : Radical SAM Enzymes* (S. 1–71). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.06.004>
- Holliday, G. L., Akiva, E., Meng, E. C., Brown, S. D., Calhoun, S., Pieper, U., Sali, A., Booker, S. J. & Babbitt, P. C. (2018b). Chapter One - Atlas of the Radical SAM Superfamily: Divergent Evolution of Function Using a “Plug and Play” Domain. In V. Bandarian (Hrsg.), *Methods in Enzymology : Radical SAM Enzymes* (Bd. 606, S. 1–71). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.06.004>
- Holz, E. (2024). *Charakterisierung und Funktionsanalyse liponsäurebindender Protein in der dissimilatorischen Schwefeloxidation* [Bachelorarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L.-M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N. C., Woyke, T. & Göker, M. (2020). Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>
- Horton, R. M. (1995). PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Molecular Biotechnology*, *3*(2), 93–99. <https://doi.org/10.1007/BF02789105>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y [Yinqing], Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G. & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, *31*(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Ikeda, S., Satake, H., Hisano, T. & Terazawa, T. (1972). Potentiometric argentimetric method for the successive titration of sulphide and dissolved sulphur in polysulphide solutions. *Talanta*, *19*(12), 1650–1654. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(72\)80240-6](https://doi.org/10.1016/0039-9140(72)80240-6)
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, *169*(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W. & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jasin, M. & Schimmel, P. (1984). Deletion of an essential gene in *Escherichia coli* by site-specific recombination with linear DNA fragments. *Journal of Bacteriology*, *159*(2), 783–786. <https://doi.org/10.1128/jb.159.2.783-786.1984>
- Jiang, F. & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, *46*(Volume 46, 2017), 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, *31*(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>
- Jiang, Y [Yu], Qian, F., Yang, J., Liu, Y., Dong, F., Xu, C., Sun, B., Chen, B [Biao], Xu, X., Li, Y [Yan], Wang, R. & Yang, S. (2017). CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nature Communications*, *8*(1), 15179. <https://doi.org/10.1038/ncomms15179>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jordan, S. W [S. W.] & Cronan, J. E [J. E.] (1997). A new metabolic link. The acyl carrier protein of lipid synthesis donates lipoic acid to the pyruvate dehydrogenase complex in *Escherichia coli* and mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(29), 17903–17906. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.17903>

- Jordan, S. W [Sean W.] & Cronan, J. E [John E.] (2003). The *Escherichia coli* lipB gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein:protein transferase. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1582–1589. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1582-1589.2003>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., . . . Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Karas, M. & Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299–2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>
- Ke, B. (1957). The polarographic behavior of alpha-lipoic acid. *Biochimica et biophysica acta*, 25(3), 650–651. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90544-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90544-9)
- Kikuchi, G [G.] (1973). The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Molecular and cellular biochemistry*, 1(2), 169–187. <https://doi.org/10.1007/BF01659328>
- Kikuchi, G [Goro], Motokawa, Y [Yutarō], Yoshida, T. & Hiraga, K. (2008). Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 84(7), 246–263. <https://doi.org/10.2183/pjab.84.246>
- Kim, J. H., Bothe, J. R., Alderson, T. R. & Markley, J. L. (2015). Tangled web of interactions among proteins involved in iron-sulfur cluster assembly as unraveled by NMR, SAXS, chemical crosslinking, and functional studies. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(6), 1416–1428. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.020>
- Koch, T. & Dahl, C [Christiane] (2018). A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. *The ISME Journal*, 12(10), 2479–2491. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0209-7>
- Kochi, H. & Kikuchi, G [G.] (1974). Mechanism of the reversible glycine cleavage reaction in *Arthrobacter globiformis*. I. Purification and function of protein components required for the reaction. *The Journal of Biochemistry*, 75(5), 1113–1127. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130483>
- Kok, A. de, Hengeveld, A. F., Martin, A. & Westphal, A. H. (1998). The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 1385(2), 353–366. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00079-X)
- Kümpel, C., Grosser, M., Tanabe, T. S [Tomohisa Sebastian] & Dahl, C [Christiane] (2024). Fe/S proteins in microbial sulfur oxidation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1871(5), 119732. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2024.119732>
- Kurth, J. M., Brito, J. A., Reuter, J., Flegler, A., Koch, T., Franke, T., Klein, E.-M., Rowe, S. F., Butt, J. N., Denkmann, K., Pereira, I. A. C [Inês A. C.], Archer, M. & Dahl, C [Christiane] (2016). Electron Accepting Units of the Diheme Cytochrome c TsdA, a Bifunctional Thiosulfate Dehydrogenase/Tetrathionate Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 291(48), 24804–24818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.753863>
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H. & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic acids research*, 47(W1), W171–W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- Lachowicz, J. C., Lennox-Hvenekilde, D., Myling-Petersen, N., Salomonsen, B., Verkleij, G., Acevedo-Rocha, C. G., Caddell, B., Gronenberg, L. S., Almo, S. C., Sommer, M. O. A., Genee, H. J. & Grove, T. L. (2024). Discovery of a Biotin Synthase That Utilizes an Auxiliary 4Fe-5S Cluster for Sulfur Insertion. *Journal of the American Chemical Society*, 146(3), 1860–1873. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c05481>

- Lanz, N. D. & Booker, S. J. (2015). Auxiliary iron-sulfur cofactors in radical SAM enzymes. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(6), 1316–1334. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.002>
- Lanz, N. D., Pandelia, M.-E., Kakar, E. S., Lee, K.-H., Krebs, C. & Booker, S. J. (2014). Evidence for a catalytically and kinetically competent enzyme-substrate cross-linked intermediate in catalysis by lipoyl synthase. *Biochemistry*, 53(28), 4557–4572. <https://doi.org/10.1021/bi500432r>
- Leinweber, F.-J. & Monty, K. J. (2018). Sulfite determination: Fuchsin method. In V. Bandarian (Hrsg.), *Methods in Enzymology : Radical SAM Enzymes* (S. 15–17). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43006-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43006-1)
- Li, H., Shen, C. R., Huang, C.-H., Sung, L.-Y., Wu, M.-Y. & Hu, Y.-C. (2016). CRISPR-Cas9 for the genome engineering of cyanobacteria and succinate production. *Metabolic Engineering*, 38, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.09.006>
- Li, J., Göbel, F., Hsu, H., Koch, J., Hager, N., Flegler, W., Tanabe, T. & Dahl, C [Christiane] (2024). YeeE-like bacterial SoxT proteins mediate sulfur import for oxidation and signal transduction. Vorab-Onlinepublikation. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4461547/v1>
- Li, J., Koch, J., Flegler, W., Garcia Ruiz, L., Hager, N., Ballas, A., Tanabe, T. S [Tomohisa S.] & Dahl, C [Christiane] (2023). A metabolic puzzle: Consumption of C1 compounds and thiosulfate in *Hyphomicrobium denitrificans* XT. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*(1), 148932. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148932>
- Li, J., Törkel, K., Koch, J., Tanabe, T. S [Tomohisa Sebastian], Hsu, H. Y. & Dahl, C [Christiane] (2023). In the Alphaproteobacterium *Hyphomicrobium denitrificans* SoxR Serves a Sulfane Sulfur-Responsive Repressor of Sulfur Oxidation. *Antioxidants*, 12(8), 1620. <https://doi.org/10.3390/antiox12081620>
- Liu, L.-J., Stockdreher, Y [Yvonne], Koch, T., Sun, S.-T., Fan, Z., Josten, M., Sahl, H.-G., Wang, Q., Luo, Y.-M., Liu, S.-J., Dahl, C [Christiane] & Jiang, C.-Y. (2014). Thiosulfate transfer mediated by DsrE/TusA homologs from acidothermophilic sulfur-oxidizing archaeon *Metallosphaera cuprina*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 26949–26959. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.591669>
- Löffler, M., Feldhues, J., Venceslau, S. S [Sofia S.], Kammler, L., Grein, F., Pereira, I. A. C [Inês A. C.] & Dahl, C [Christiane] (2020). DsrL mediates electron transfer between NADH and rDsrAB in *Allochromatium vinosum*. *Environmental Microbiology*, 22(2), 783–795. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14899>
- Löffler, M., Wallerang, K. B., Venceslau, S. S [Sofia S.], Pereira, I. A. C [Inês A. C.] & Dahl, C [Christiane] (2020). The Iron-Sulfur Flavoprotein DsrL as NAD(P)H:Acceptor Oxidoreductase in Oxidative and Reductive Dissimilatory Sulfur Metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 11, 578209. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.578209>
- Macheroux, P. (1999). UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 131, 1–7. <https://doi.org/10.1385/1-59259-266-X:1>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., . . . Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, 53(1), 159–162. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)
- Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 181–190. <https://doi.org/10.1038/nrg2749>

- Martineau, C., Mauffrey, F. & Villemur, R. (2015). Comparative Analysis of Denitrifying Activities of *Hyphomicrobium nitratorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzini*. *Applied and environmental microbiology*, 81(15), 5003–5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.00848-15>
- Masepohl, B., Görlitz, K. & Böhme, H. (1996). Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochimica et biophysica acta*, 1307(1), 26–30. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(96\)00040-1](https://doi.org/10.1016/0167-4781(96)00040-1)
- Mayhew, S. G. (1978). The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *European journal of biochemistry*, 85(2), 535–547. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12269.x>
- McCarthy, E. L. & Booker, S. J. (2017). Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6361), 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.aan4574>
- McCarthy, E. L. & Booker, S. J. (2018). Biochemical Approaches for Understanding Iron-Sulfur Cluster Regeneration in *Escherichia coli* Lipoyl Synthase During Catalysis. *Methods in Enzymology*, 606, 217–239. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.06.006>
- McCarthy, E. L., Rankin, A. N., Dill, Z. R. & Booker, S. J. (2019). The A-type domain in *Escherichia coli* NfuA is required for regenerating the auxiliary 4Fe-4S cluster in *Escherichia coli* lipoyl synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1609–1617. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.006171>
- 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 of the United States of America*, 113(34), 9446–9450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602486113>
- McPhalen, C. A., Strynadka, N. C. & James, M. N. (2001). Calcium-Binding Sites in Proteins: A Structural Perspective. In *Advances in Protein Chemistry : Novel Cofactors* (Bd. 42, S. 77–144). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60535-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60535-5)
- Meiberg, J. B. M. & Harder, W. (1978). Aerobic and Anaerobic Metabolism of Trimethylamine, Dimethylamine and Methylamine in *Hyphomicrobium X*. *Journal of General Microbiology*, 106(2), 265–276. <https://doi.org/10.1099/00221287-106-2-265>
- Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H. & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein Science*, 32(11), e4792. <https://doi.org/10.1002/pro.4792>
- Middelburg, J. J. (2000). The geochemical sulfur cycle. *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution. Principles and Engineering*, 33–46. <https://pure.knaw.nl/portal/en/publications/the-geochemical-sulfur-cycle>
- Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. V. & van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6299), aad5147. <https://doi.org/10.1126/science.aad5147>
- Mohr, M. G. (2021). *Thioredoxin, Rhodanese und ein potentiell Eisen-Schwefel-Protein in der Schwefeloxidation und deren Regulation in Hyphomicrobium denitrificans* [Bachelorarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Mojica, F. J., Ferrer, C., Juez, G. & Rodríguez-Valera, F. (1995). Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, 17(1), 85–93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x
- Morris, T. W., Reed, K. E. & Cronan, J. E. [J. E.] (1994). Identification of the gene encoding lipoyl-protein ligase A of *Escherichia coli*. Molecular cloning and characterization of the *lplA* gene and gene product. *Journal of Biological Chemistry*, 269(23), 16091–16100. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33977-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33977-7)

- Morris, T. W., Reed, K. E. & Cronan, J. E. [J. E.] (1995). Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lplA* and *lipB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *Journal of Bacteriology*, *177*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1128/jb.177.1.1-10.1995>
- Motokawa, Y. [Y.] & Kikuchi, G. [G.] (1969). Glycine metabolism by rat liver mitochondria. IV. Isolation and characterization of hydrogen carrier protein, an essential factor for glycine metabolism. *Archives of biochemistry and biophysics*, *135*(1), 402–409. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90556-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90556-6)
- Motokawa, Y. [Y.] & Kikuchi, G. [G.] (1974a). Glycine metabolism by rat liver mitochondria. Isolation and some properties of the protein-bound intermediate of the reversible glycine cleavage reaction. *Archives of biochemistry and biophysics*, *164*(2), 634–640. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90075-7)
- Motokawa, Y. [Y.] & Kikuchi, G. [G.] (1974b). Glycine metabolism by rat liver mitochondria. Reconstruction of the reversible glycine cleavage system with partially purified protein components. *Archives of biochemistry and biophysics*, *164*(2), 624–633. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90074-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90074-5)
- Mougiakos, I., Orsi, E., Ghiffary, M. R., Post, W., Maria, A. de, Adiego-Perez, B., Kengen, S. W. M., Weusthuis, R. A. & van der Oost, J. (2019). Efficient Cas9-based genome editing of *Rhodobacter sphaeroides* for metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1255-1>
- 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 Pt 1*, 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Murphy, J. M., Powell, B. A. & Brumaghim, J. L. (2020). Stability constants of bio-relevant, redox-active metals with amino acids: The challenges of weakly binding ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, *412*, 213253. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213253>
- Nakai, T., Ishijima, J., Masui, R., Kuramitsu, S. & Kamiya, N. (2003). Structure of *Thermus thermophilus* HB8 H-protein of the glycine-cleavage system, resolved by a six-dimensional molecular-replacement method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *59*(Pt 9), 1610–1618. <https://doi.org/10.1107/S09074444903014975>
- Nakamura, Y., Gojobori, T. & Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 292. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.292>
- Nakata, A., Amemura, M. & Makino, K. (1989). Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology*, *171*(6), 3553–3556. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3553-3556.1989>
- Naville, M., Ghuillot-Gaudeffroy, A., Marchais, A. & Gautheret, D. (2011). ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biology*, *8*(1), 11–13. <https://doi.org/10.4161/rna.8.1.13346>
- Nayak, D. D. & Metcalf, W. W. (2017). Cas9-mediated genome editing in the methanogenic archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(11), 2976–2981. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618596114>
- Neti, S. S., Sil, D., Warui, D. M., Esakova, O. A., Solinski, A. E., Serrano, D. A., Krebs, C. & Booker, S. J. (2022). Characterization of LipS1 and LipS2 from *Thermococcus kodakarensis*: Proteins Annotated as Biotin Synthases, which Together Catalyze Formation of the Lipoyl Cofactor. *ACS Bio & Med Chem Au*, *2*(5), 509–520. <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.2c00018>
- Öppinger, C., Kremp, F. & Müller, V. (2022). Is reduced ferredoxin the physiological electron donor for MetVF-type methylenetetrahydrofolate reductases in acetogenesis? A hypothesis. *International Microbiology*, *25*(1), 75–88. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00190-0>
- Ou, P., Tritschler, H. J. & Wolff, S. P. (1995). Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochemical Pharmacology*, *50*(1), 123–126. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00116-H](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00116-H)

- Outten, F. W. (2015). Recent advances in the Suf Fe-S cluster biogenesis pathway: Beyond the Proteobacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(6), 1464–1469. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.001>
- Packer, L., Witt, E. H. & Tritschler, H. J. (1995). alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(2), 227–250. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00017-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00017-R)
- Patel, M. S. & Korotchkina, L. G. (2003). The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 31(1), 5–15. <https://doi.org/10.1002/bmb.2003.494031010156>
- Perham, R. N. (2000). Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 69(Volume 69, 2000), 961–1004. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.961>
- Pott, A. S. & Dahl, C [Christiane] (1998). Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the dsr locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 7)(7), 1881–1894. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-7-1881>
- Reed, L. J. (1953). Metabolic functions of thiamine and lipoic acid. *Physiological reviews*, 33(4), 544–559. <https://doi.org/10.1152/physrev.1953.33.4.544>
- Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B. & Barras, F. (2013). Reprint of: Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. *Biochimica et biophysica acta*, 1827(8-9), 923–937. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.05.001>
- Ruvkun, G. B. & Ausubel, F. M. (1981). A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature*, 289(5793), 85–88. <https://doi.org/10.1038/289085a0>
- Sagers, R. D. & Gunsalus, I. C. (1961). Intermediary metabolism of *Diplococcus glycinophilus*. I. Glycine cleavage and one-carbon interconversions. *Journal of Bacteriology*, 81(4), 541–549. <https://doi.org/10.1128/jb.81.4.541-549.1961>
- Saleh, F. S., Rahman, M. R., Okajima, T., Mao, L. & Ohsaka, T. (2011). Determination of formal potential of NADH/NAD⁺ redox couple and catalytic oxidation of NADH using poly(phenosafranin)-modified carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, 80(2), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.07.001>
- Sanadi, D. R. & Seals, R. L. (1957). Reversible reduction of thioctamide catalyzed by the alpha-ketoglutaric dehydrogenase complex. *Biochimica et biophysica acta*, 24(1), 220–221. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90179-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90179-8)
- 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(32), 23194–23204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701602200>
- 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(32), 21707–21718. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002709>
- 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(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
- Schägger, H., Cramer, W. A. & Jagow, G. von (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 217(2), 220–230. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1112>
- Schägger, H. & Jagow, G. von (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)

- Schellenberg, K. A. & Hellerman, L. (1958). Oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide. *Journal of Biological Chemistry*, 231(1), 547–556. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77327-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77327-X)
- Schilling, P. (2024). *Assemblierung des liponsäurebindenden Proteins LbpA2 in Hyphomicrobium denitrificans* [Bachelorarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols*, 2(6), 1528–1535. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.209>
- Schwinn, K., Ferré, N. & Huix-Rotllant, M. (2020). UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 22(22), 12447–12455. <https://doi.org/10.1039/D0CP01714K>
- Seo, A., Jackson, J. L., Schuster, J. V. & Vardar-Ulu, D. (2013). Using UV-absorbance of intrinsic dithiothreitol (DTT) during RP-HPLC as a measure of experimental redox potential in vitro. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(19), 6379–6384. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7063-2>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Spalding, M. D. & Prigge, S. T. (2010). Lipoic acid metabolism in microbial pathogens. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 74(2), 200–228. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-10>
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>
- Stetter, K. O. (1996). Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 149–158. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00233.x>
- 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(12), 3279–3319. <https://doi.org/10.1039/C8CS00826D>
- Stoscheck, C. M. (2018). Quantitation of protein. In V. Bandarian (Hrsg.), *Methods in Enzymology : Radical SAM Enzymes* (Bd. 182, S. 50–68). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)
- Suh, J. H., Zhu, B.-Z., deSzoeko, E., Frei, B. & Hagen, T. M. (2004). Dihydrolipoic acid lowers the redox activity of transition metal ions but does not remove them from the active site of enzymes. *Redox Report*, 9(1), 57–61. <https://doi.org/10.1179/135100004225003923>
- Sun, M., Wang, Y., Zhang, Q., Xia, Y., Ge, W. & Guo, D. (2017). Prediction of reversible disulfide based on features from local structural signatures. *BMC Genomics*, 18(1), 279. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3668-8>
- Suresh, G., Sasikala, C. & Ramana, C. V. (2015). Reclassification of Gemmobacter changlensis to a new genus as *Cereibacter changlensis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 3), 794–798. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000016>
- Szczelkun, M. D., Tikhomirova, M. S., Sinkunas, T., Gasiunas, G., Karvelis, T., Pschera, P., Siksnys, V. & Seidel, R. (2014). Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), 9798–9803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402597111>
- Tanabe, T. S [Tomohisa Sebastian], Bach, E., D'Ermo, G., Mohr, M. G., Hager, N., Pfeiffer, N., Guiral, M. & Dahl, C [Christiane] (2024). A cascade of sulfur transferases delivers sulfur to the sulfur-oxidizing heterodisulfide reductase-like complex. *Protein Science*, 33(6), e5014. <https://doi.org/10.1002/pro.5014>

- Tanabe, T. S [Tomohisa Sebastian], Grosser, M., Hahn, L., Kämpel, C., Hartenfels, H., Vtulkin, E., Flegler, W. & Dahl, C [Christiane] (2023). Identification of a novel lipoic acid biosynthesis pathway reveals the complex evolution of lipoate assembly in prokaryotes. *PLOS Biology*, 21(6), e3002177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002177>
- Tanabe, T. S [Tomohisa Sebastian], Leimkühler, S. & Dahl, C [Christiane]. (2019). The functional diversity of the prokaryotic sulfur carrier protein TusA. In *Advances in microbial physiology* (Bd. 75, S. 233–277). <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.07.004>
- Thöne, J. K. L. (2023). *Die neuartigen Lipoatsynthesen LipS1 und LipS2 aus Hyphomicrobium denitrificans und Thioalkalivibrio sp. K90mix* [Bachelorarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Trisolini, L., Gambacorta, N., Gorgoglione, R., Montaruli, M., Laera, L., Colella, F., Volpicella, M., Grassi, A. de & Pierri, C. L. (2019). FAD/NADH Dependent Oxidoreductases: From Different Amino Acid Sequences to Similar Protein Shapes for Playing an Ancient Function. *Journal of Clinical Medicine*, 8(12), 2117. <https://doi.org/10.3390/jcm8122117>
- Urakami, T., Sasaki, J., Suzuki, K.-I. & Komogata, K. (1995). Characterization and Description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 528–532. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-528>
- Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., Tsenkov, M., Nair, S., Mirdita, M., Yeo, J., Kovalevskiy, O., Tunyasuvunakool, K., Laydon, A., Židek, A., Tomlinson, H., Hariharan, D., Abrahamson, J., Green, T., Jumper, J., . . . Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic acids research*, 52(D1), D368-D375. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>
- Venceslau, S. S [S. S.], Stockdreher, Y [Y.], Dahl, C [C.] & Pereira, I. A. C [I. A. C.] (2014). The "bacterial heterodisulfide" DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1837(7), 1148–1164. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.03.007>
- Vishniac, W. & Santer, M. (1957). The *thiobacilli*. *Bacteriological reviews*, 21(3), 195–213. <https://doi.org/10.1128/br.21.3.195-213.1957>
- Vtulkin, E. (2022). *Assemblierung von Lipoat am LbpA-Protein in Hyphomicrobium denitrificans* [Bachelorarbeit]. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn.
- Wendt, K. E., Ungerer, J., Cobb, R. E., Zhao, H. & Pakrasi, H. B. (2016). CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0514-7>
- Winans, S. C., Elledge, S. J., Krueger, J. H. & Walker, G. C. (1985). Site-directed insertion and deletion mutagenesis with cloned fragments in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 161(3), 1219–1221. <https://doi.org/10.1128/jb.161.3.1219-1221.1985>
- Xu, Q., Eguchi, T., Mathews, I. I., Rife, C. L., Chiu, H.-J., Farr, C. L., Feuerhelm, J., Jaroszewski, L., Klock, H. E., Knuth, M. W., Miller, M. D., Weekes, D., Elsliger, M.-A., Deacon, A. M., Godzik, A., Lesley, S. A. & Wilson, I. A. (2010). Insights into substrate specificity of geranylgeranyl reductases revealed by the structure of digeranylgeranyl glycerophospholipid reductase, an essential enzyme in the biosynthesis of archaeal membrane lipids. *Journal of Molecular Biology*, 404(3), 403–417. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.032>
- Yeung, N., Gold, B., Liu, N. L., Prathapam, R., Sterling, H. J., Willams, E. R. & Butland, G. (2011). The *E. coli* monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes. *Biochemistry*, 50(41), 8957–8969. <https://doi.org/10.1021/bi2008883>

- Zander, U., Faust, A., Klink, B. U., Sanctis, D. de, Panjikar, S., Quentmeier, A [Armin], Bardischewsky, F [Frank], Friedrich, C. G [Cornelius 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(10), 8349–8360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193631>
- Zhao, X., Miller, J. R. & Cronan, J. E [John E.] (2005). The reaction of LipB, the octanoyl-acyl carrier protein:protein N-octanoyltransferase of lipoic acid synthesis, proceeds through an acyl-enzyme intermediate. *Biochemistry*, 44(50), 16737–16746. <https://doi.org/10.1021/bi051865y>
- Zhao, X., Miller, J. R., Jiang, Y [Yanfang], Marletta, M. A. & Cronan, J. E [John E.] (2003). Assembly of the covalent linkage between lipoic acid and its cognate enzymes. *Chemistry & Biology*, 10(12), 1293–1302. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.11.016>

Anhang

Tabelle A1: Eigenschaften aller der im Rahmen dieser Arbeit produzierten Proteine.

Protein-Name	Locus-Tag des Gens	Expressionsplasmid	Tag	Isoelektrischer Punkt pI	Molekulargewicht [Da]	Extinktionskoeffizient ϵ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
LbpA1						
TK90LbpA1_1	TK90_0638	pET22b(+)_TK90_0638_C-Strep	C-Strep	4,88	18.276	26.470
TK90LbpA1_2	TK90_1746	pET22b(+)_TK90_1746_C-Strep	C-Strep	5,16	18.331	36.440
TsLbpA1	ThisiDRAFT_0958	pET22b(+)_ThisiLbpA1_C-Strep	C-Strep	6,36	17.893	29.450
AqLbpA1_1	aq_944	pET28a(+)_aq_944_N-Strep	N-Strep	5,59	19.492	40.450
AqLbpA1_2	aq_1657	pET28a(+)_aq_1657_N-Strep	N-Strep	5,17	19.613	32.430
LbpA2						
HdLbpA2	Hden_0696	pET22b(+)_Hden_0696_C-Strep	C-Strep	5,66	17.035	37.470
HdLbpA2_C7A	Hden_0696	pET22b(+)_Hden_0696_C-Strep_C7A	C-Strep	5,66	17.002	37.470
HdLbpA2_C145A	Hden_0696	pET22b(+)_Hden_0696_C-Strep_C145A	C-Strep	5,66	17.002	37.470
HdLbpA2_C7A_C145A	Hden_0696	pET22b(+)_Hden0696_C-Strep_C7A_C145A	C-Strep	5,66	16.970	37.470
HdLbpA2_K71A	Hden_0696	pET22b(+)_Hden0696_C-Strep_K71A	C-Strep	5,34	16.977	37.470
RmLbpA2	rosmuc_10223	pET22b(+)_RmLbpA2_C-Strep	C-Strep	5,32	17.190	33.460
RmLbpA2_mutagenesis1	rosmuc_10223	pET22b(+)_RmLbpA2_TPKR51-54DLPE-C-Strep	C-Strep	4,74	17.162	33.460
RmLbpA2_mutagenesis2	rosmuc_10223	pET22b(+)_RmLbpA2_R63A-C-Strep	C-Strep	4,96	17.149	33.460
RmLbpA2_mutagenesis3	rosmuc_10223	pET22b(+)_RmLbpA2_P76D-C-Strep	C-Strep	5,12	17.208	33.460
RmLbpA2_mutagenesis12	rosmuc_10223	pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis12	C-Strep	4,55	17.121	33.460
RmLbpA2_mutagenesis13	rosmuc_10223	pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis13	C-Strep	4,65	17.180	33.460
RmLbpA2_mutagenesis23	rosmuc_10223	pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis23	C-Strep	4,84	17.167	33.460
RmLbpA2_mutagenesis123	rosmuc_10223	pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis123	C-Strep	4,49	17.139	33.460
RmLbpA2_mutagenesis123_2	rosmuc_10223	pET28a(+)_RmLbpA2_mutagenesis123_2	C-Strep	4,63	17.138	33.460
TK90LbpA2	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep	C-Strep	4,87	16.847	33.460
TK90LbpA2_C7A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A	C-Strep	4,87	16.815	33.460
TK90LbpA2_C7A_C40A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A_C40A	C-Strep	4,87	16.783	33.460
TK90LbpA2_C7A_C64A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A_C64A	C-Strep	4,87	16.783	33.460
TK90LbpA2_C7A_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A_C145A	C-Strep	4,87	16.783	33.460
TK90LbpA2_C7A_C40A_C64A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A_C40A_C64A	C-Strep	4,87	16.751	33.460
TK90LbpA2_C7A_C40A_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A_C40A_C145A	C-Strep	4,87	16.751	33.460
TK90LbpA2_C7A_C64A_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A_C64A_C145A	C-Strep	4,87	16.751	33.460
TK90LbpA2_C7A_C40A_C64A_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C7A_C40A_C64A_C145A	C-Strep	4,87	16.719	33.460
TK90LbpA2_C40A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C40A	C-Strep	4,87	16.815	33.460
TK90LbpA2_C40A_C64A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C40A_C64A	C-Strep	4,87	16.783	33.460
TK90LbpA2_C40A_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C40A_C145A	C-Strep	4,87	16.783	33.460
TK90LbpA2_C40A_C64A_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C40A_C64A_C145A	C-Strep	4,87	16.751	33.460
TK90LbpA2_C64A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C64A	C-Strep	4,87	16.815	33.460
TK90LbpA2_C64A_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C64A_C145A	C-Strep	4,87	16.783	33.460
TK90LbpA2_C145A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_C145A	C-Strep	4,87	16.815	33.460
TK90LbpA2_K71A	TK90_0640	pET22b(+)_TK90_0640_C-Strep_K71A	C-Strep	4,77	16.790	33.460
TsLbpA2	ThisiDRAFT_1817	pET22b(+)_ThisiLbpA2_C-Strep	C-Strep	5,44	16.889	33.460
AqLbpA2 (402)	aq_402	pET28a(+)_aq_402_N-Strep	N-Strep	5,52	17.210	27.960
GcvH						
EcGcvH	JW2872	pET22b(+)_EcGcvH_C-Strep	C-Strep	4,15	15.306	23.950
HdGcvH_1	Hden_1299	pET22b(+)_Hden_1299_C-Strep	C-Strep	5,25	15.834	20.970
HdGcvH_2	Hden_2793	pET22b(+)_Hden_2793_C-Strep	C-Strep	4,49	18.003	22.460
RmGcvH	rosmuc_03122	pET22b(+)_RmGcvH_C-Strep	C-Strep	4,12	14.643	19.480
TK90GcvH	TK90_1719	pET22b(+)_TK90GcvH_C-Strep	C-Strep	4,27	15.315	20.970
TsGcvH	ThisiDRAFT_1200	pET22b(+)_TsGcvH_C-Strep	C-Strep	3,98	15.425	22.460
AqGcvH_1	aq_1052	pET28a(+)_aq_1052_N-Strep	N-Strep	5,13	17.567	32.430
AqGcvH_2	aq_1108	pET28a(+)_aq_1108_N-Strep	N-Strep	4,06	20.999	32.890
Lipoat:Protein-Ligasen						
EcLpl(AB)	JW4349	pET28a(+)_EcLpl(AB)_N-His	N-His	6,21	40.089	47.440
HdsLpl(AB)	Hden_0686	pET22b(+)_Hden_0686_C-His	C-His	5,68	40.997	12.950
RmsLpl(AB)	rosmuc_01225	pET28a(+)_RmsLpl(AB)_C-His	C-His	5,18	39.224	15.470
TK90sLpl(AB)_1	TK90_0642	pET22b(+)_TK90_0642_C-Strep	C-Strep	4,78	41.958	29.450
TK90sLpl(AB)_2	TK90_0648	pET28a(+)_TK90_0648_N-His	N-His	5,98	40.406	49.960
TK90sLpl(AB)_2	TK90_0648	pET22b(+)_TK90sLpl(AB)(0648)-C-His	C-His	5,85	39.762	49.960
TssLpl(AB)	ThisiDRAFT_2298	pET28a(+)_TssLpl(AB)_C-His	C-His	5,65	41.273	33.920
Lipoyl-Synthasen						
HdLipS1	Hden_0683	pET22b(+)_Hden0683_C-Strep	C-Strep	6,06	39.312	25.900
TK90LipS1	TK90_0641	pET22b(+)_TK90_0641_C-Strep	C-Strep	5,16	44.118	40.910
TK90LipS2	TK90_0644	pET22b(+)_TK90_0644_C-Strep	C-Strep	4,7	45.343	60.390
LipT						
HdLipT	Hden_0684	pET22b(+)_Hden0684_N-Strep	N-Strep	6,76	39.051	30.940
HdLipT	Hden_0684	pET22b(+)_Hden0684_C-Strep	C-Strep	7,58	39.347	30.940
HdLipT	Hden_0684	pET22b(+)_Hden0684_N-His	N-His	7,69	40.016	25.440
HdLipT	Hden_0684	pET22b(+)_Hden0684_C-His	C-His	7,05	39.429	25.440
TK90LipT	TK90_0643	pET28a(+)_TK90_0643_C-His	C-His	5,29	40.459	42.400
ThiocyanoxidansLipT	G372_RS0107505	pET28a(+)_LipT_Thiocyanoxidans_C-His	C-His	5,23	40.363	42.400
TsLipT	ThisiDRAFT_1283	pET22b(+)_ThisiDRAFT1283_C-Strep	C-Strep	6,56	38.641	68.410
LipX						
HdLipX	Hden_0687	pET28a(+)_Hden_0687_C-His	C-His	5,7	26.603	26.470
Schwefeltransferasen						
TK90Rhadanese	TK90_0630	pET28a(+)_TK90_0630_C-His	C-His	6,03	13.214	13.980
TK90TusA	TK90_0631	pET22b(+)_TK90TusA_C-Strep	C-Strep	6,26	9.508	6.990
TK90DsrE3B	TK90_0639	pET28a(+)_TK90_0639_N-His	N-His	5,2	17.202	7.450

Tabelle A2: Übersicht der Gene, die in den ausgewählten repräsentativen Mikroorganismen aus den Phyla Pseudomonadota und Aquificae im Zusammenhang mit der Liponsäureassemblierung stehen.

Organismus/ Zugehörigkeit	Eigenschaften	kanonische Liponsäureassemblierung an GcvH		neuartige Liponsäureassemblierung an LbpA			shdr Gene
		gcvH	lip(AB) / lipA / lipB	lbpA1	lbpA2	sip(AB) / lipS1 / lipS2 / lipT / lipX / lipY	
PSEUDAMONADOTA							
Alphaproteobacteria							
<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> DSM 1869 ^T	mesophil chemoorganoheterotroph	Hden_2793, Hden_1299	- / Hden_2670 / Hden_2234	-	Hden_0696	Hden_0686 / Hden_0683 / Hden_0685 / Hden_0684 / Hden_0687 / -	✓
<i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069 ^T	mesophil chemoorganoheterotroph	rosmuc_03122	- / rosmuc_03577 / rosmuc_03109	-	rosmuc_012 23	rosmuc_01225 / rosmuc_01226 / rosmuc_01227 / rosmuc_00033 / - / rosmuc_03572	-
Gammaproteobacteria							
<i>Thioalkalivibrio</i> sp. TK90mix	mesophil chemolithoautotroph	TK90_1719	- / TK90_1966 / TK90_1967	TK90_0638, TK90_1746	TK90_0640	TK90_0642, TK90_0648 / TK90_0641 / TK90_0644 / TK90_0643 / TK90_1992 / TK90_0645	✓
<i>Thiorhodospira sibirica</i> ATCC 70588 ^T	mesophil photolithoautotroph	ThisiDRAFT_1200	- / ThisiDRAFT_2265 / ThisiDRAFT_0201	ThisiDRAFT_0958	ThisiDRAFT_1817	ThisiDRAFT_2298 / ThisiDRAFT_2231 / ThisiDRAFT_1089 / ThisiDRAFT_0215 / - / ThisiDRAFT_2401	✓
<i>Escherichia coli</i> K12 DSM 18039	mesophil chemoorganoheterotroph	JW2872	JW4349 / JW0623 / JW5089	-	-	- / - / - / - / - / -	-
AQUIFICAE							
Aquificae							
<i>Aquifex aeolicus</i> (strain VF5)	hyperthermophil chemolithoautotroph	aq_1052, aq_1108	aq_264 (LplA) / aq_1355 / -	aq_944, aq_1657	aq_402	aq_1952, aq_1683 (sLplA-CdhB) / aq_403 / aq_1958 / aq_121 / - / Aq_627	✓

Tabelle A3: Nukleotidsequenz der optimierten sgRNA für pHD_Cas9_NT. Restriktionsschnittstellen SmaI und MfeI sind blau, die Promotor-Sequenz von Hden_2446 schwarz, die NT-Sequenz grün, das optimierte gRNA-Scaffold in türkis und die Terminatorsequenz von Hden_2446 orange gekennzeichnet.

CCCGGGTAAACGACAGCGTGTTTGGGCGCATTCCAATGAAAATTTGAAGAGCGGCCACGTGGAG
TCGGACCTGCCACATTGACAGAGTCCTATACCGTCACGTTTAAGACCCCTTAAATATCGAGAGAA
CACGAGAAACGGTCGGTCAAACCCCGTTTGCTGTTTGAGCCCGATCTTTCTTCCTGATCTGGAGG
ATTCTAAGAGAGACCGACGTTGCGGTCTCGTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGT
TAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTCTCTTTATGAA
ACTCGGACGGGCGCCCTGATCGGCGCCCGTCTTTGTTTAAAGAAAAAAAAACCTCAAAGGCCATT
CGGAGGCATTTCAATTG

Tabelle A4: Codon-Gebrauch von *H. denitrificans* und *C. sphaeroides* (Codon Usage Database (Nakamura et al., 2000)). Im Falle eines von den Organismen präferierten, sich stark unterscheidenden Codon-Gebrauchs, sind die entsprechenden Aminosäuren rot dargestellt.

Häufigkeit des genutzten Codons [1000 AS ⁻¹]				Häufigkeit des genutzten Codons [1000 AS ⁻¹]			
Aminosäure	Codon	<i>H. denitrificans</i>	<i>C. sphaeroides</i>	Aminosäure	Codon	<i>H. denitrificans</i>	<i>C. sphaeroides</i>
Gly	GGG	9	20	Trp	TGG	13	14
Gly	GGA	15	5	Stop	TGA	1	3
Gly	GGT	12	5	Cys	TGT	2	1
Gly	GGC	39	60	Cys	TGC	7	8
Glu	GAG	29	50	Stop	TAG	2	0
Glu	GAA	37	13	Stop	TAA	0	0
Asp	GAT	23	17	Tyr	TAT	14	9
Asp	GAC	32	37	Tyr	TAC	15	10
Val	GTG	14	41	Leu	TTG	11	3
Val	GTA	4	1	Leu	TTA	0	0
Val	GTT	20	3	Phe	TTT	5	3
Val	GTC	37	28	Phe	TTC	37	32
Ala	GCG	39	61	Ser	TCG	22	23
Ala	GCA	22	6	Ser	TCA	6	1
Ala	GCT	14	4	Ser	TCT	5	1
Ala	GCC	31	64	Ser	TCC	10	10
Arg	AGG	5	3	Arg	CGG	9	28
Arg	AGA	2	1	Arg	CGA	8	2
Ser	AGT	3	1	Arg	CGT	4	4
Ser	AGC	15	13	Arg	CGC	41	42
Lys	AAG	29	21	Gln	CAG	19	27
Lys	AAA	21	3	Gln	CAA	11	2
Asn	AAT	7	4	His	CAT	10	9
Asn	AAC	25	16	His	CAC	16	10
Met	ATG	20	25	Leu	CTG	23	52
Ile	ATA	2	1	Leu	CTA	4	1
Ile	ATT	9	2	Leu	CTT	16	8
Ile	ATC	37	42	Leu	CTC	23	45
Thr	ACG	31	21	Pro	CCG	29	29
Thr	ACA	6	2	Pro	CCA	4	1
Thr	ACT	5	1	Pro	CCT	8	3
Thr	ACC	15	28	Pro	CCC	12	23

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, all jenen zu danken, die mich auf dem Weg zu dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Zuerst möchte ich meiner Doktormutter, Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl, meinen tiefsten Dank aussprechen. Deine fachliche Expertise, deine Geduld und deine kontinuierliche Unterstützung waren für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit von unschätzbarem Wert. Dein Verständnis für meine Lebenssituation ist unvergleichlich gewesen. Nur mit deinem mir im Voraus entgegengebrachten Vertrauen in meine Fähigkeiten konnte ich zeigen, dass es auch mit drei kleinen Kindern möglich ist, eine Doktorarbeit innerhalb von drei Jahren anzufertigen. Deine motivierenden Worte haben mich stets angetrieben. Vielen Dank dafür!

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinem Zweitgutachter, Prof. Dr. Uwe Deppenmeier, sowie Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber und Herrn Prof. Dr. Sigurd Höger für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an meine Kolleginnen und Kollegen am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, insbesondere an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Dahl. Die inspirierenden Diskussionen, die nette Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung haben diese Zeit zu einer bereichernden Erfahrung gemacht. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Jingjing, Marc, Martina und Sebastian danken, dass ihr auch kurzfristig ohne mit der Wimper zu zucken eingesprungen seid, um noch mal eben eine SDS-PAGE anzufärben oder Bakterien zu füttern, wenn meine familiären Verpflichtungen mich davon abgehalten haben... Im Rahmen meiner Doktorarbeit durfte ich mehrere Bachelorstudenten betreuen, was mir immer viel Freude gebracht hat; In diesem Zusammenhang nochmal vielen Dank an Jule, Hanna, Evelyn, Pia und Emma. Ohne die Erkenntnisse jeder einzelnen Abschlussarbeit von euch, sähe dieses Gesamtwerk ganz anders aus. Birgit, Elisabeth, Marlene, Natalie und Nicole möchte ich ebenfalls für Ihre Hilfsbereitschaft rund um die Uhr danken, wenn ich Fragen zu administrativen oder technischen Angelegenheiten hatte.

Lieber Toni, dir möchte ich danken für deine Unterstützung bei der Aufnahme und Auswertung der Massenspektren sowie für deine Bemühungen, mit mir gemeinsam noch ungeklärte Fragen bezüglich der mysteriösen zusätzlichen Masse an LbpA zu ergründen.

Ich möchte auch meiner Familie meinen tiefen Dank aussprechen. Meinen Eltern, Regina und Klaus, danke ich für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen. Euer Glaube an mich hat mir die nötige Kraft gegeben, dieses Ziel stets im Auge zu behalten und letztlich zu erreichen. Ein besonderer Dank geht an meine Schwester, Elena, die mich stets ermutigt und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Besonders erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang auch dich, liebe Mine. Deine Unterstützung und dein Verständnis haben mir immer sehr viel bedeutet.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann, Simon, und meiner Schwiegermutter Angelika von Herzen danken. Ihr habt mich unterstützt, immer ein offenes Ohr für mich gehabt und mir in stressigen Zeiten stets den Rücken freigehalten. Maria, Pepe und Ole, euch danke ich dafür, dass ihr mir jeden Tag durch eure Unbeschwertheit und Lebensfreude dazu verholfen habt, meine Gedanken auch mal von der Arbeit abschweifen zu lassen. Euer Lachen hat jedes gescheiterte Experiment im Labor wieder wett gemacht. Ihr seid die Besten!

Diese Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung und das Verständnis all dieser wunderbaren Menschen nicht möglich gewesen. Ihnen allen gilt mein aufrichtiger Dank!