

# **Ein neuer Weg der mikrobiellen Schwefeloxidation**

## **Das Heterodisulfidreduktase-ähnliche System**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Tobias Koch**

aus

Bonn

Bonn 2018

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

1. Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl  
2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier  
Tag der Promotion: 17.12.2018  
Erscheinungsjahr: 2019

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Cao, X., **Koch, T.**, Steffens, L., Finkensieper, J., Zigann, R., Cronan, J.E. & Dahl, C. (2018) Lipoate-binding proteins and specific lipoate-protein ligases in microbial sulfur oxidation reveal an atypical role for an old cofactor. *eLife* 7, doi:10.7554/eLife.37439.

**Koch, T.** & Dahl, C. (2018) A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. *The ISME journal* 12 (10):2479–2491, doi:10.1038/s41396-018-0209-7.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Der Schwefelzyklus.....	1
1.2	Heterodisulfidreduktasen in methanogenen Archaeen ohne Cytochrome.....	3
1.3	Potentielle Rolle von Heterodisulfidreduktase-ähnlichen Komplexen im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel.....	4
1.4	Das Bakteriengenus <i>Hyphomicrobium</i> .....	7
1.4.1	Dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel im Bakteriengenus <i>Hyphomicrobium</i> .....	8
1.5	Der Organismus <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> X <sup>T</sup> .....	10
1.6	Der Organismus <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> EG .....	11
1.7	Zielsetzungen der Arbeit .....	13
2	Material .....	14
2.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	14
2.2	Geräte .....	14
2.3	Enzyme .....	14
2.4	Antikörper und Antiseren.....	15
2.5	Standards .....	15
2.6	Plasmide .....	16
2.7	Oligonukleotide .....	17
2.8	Bakterienstämme .....	19
2.9	Kits .....	19
2.10	Software und Internet-Tools.....	20
3	Methoden.....	21
3.1.	Mikrobiologische Methoden .....	21
3.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	21
3.1.2	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> .....	21
3.1.3	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> .....	21
3.1.4	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> .....	21
3.1.5	Kultivierung von <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> X <sup>T</sup> .....	23
3.1.6	Screening nach metabolisierbaren schwefelhaltigen Substraten für <i>H. denitrificans</i> ...	24
3.1.7	Wachstumsversuche mit Dimethylsulfid.....	24
3.1.8	Wachstumsversuche mit Thiosulfat.....	25
3.1.9	Herstellung von elektrisch kompetenten <i>H. denitrificans</i> .....	26
3.1.10	Elektroporation von elektrisch kompetenten <i>H. denitrificans</i> .....	26
3.1.11	Generierung von Mutanten in <i>H. denitrificans</i> .....	26
3.1.12	Konservierung von <i>H. denitrificans</i> als Kryokulturen .....	27
3.1.13	Kultivierung von <i>Hyphomicrobium</i> EG .....	28

3.2.	Molekularbiologische Methoden.....	28
3.2.1	Genamplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion .....	28
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	28
3.2.3	Gene Splicing by Overlap Extension .....	28
3.2.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....	29
3.2.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	29
3.2.6	Sequenzierung von DNS .....	30
3.2.7	Southern-Blot-Analyse .....	30
3.3.	Proteinbiochemische Methoden .....	30
3.3.1	Bestimmung des Proteingehalts von Proteinlösungen.....	30
3.3.2	Gewinnung von Zellextrakten für immunologische Proteinnachweise.....	31
3.3.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	31
3.3.4	Western-Blot-Analyse .....	32
3.4.	Chromatographische Methoden.....	33
3.4.1	Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	33
3.4.2	Fast Protein Liquid Chromatography .....	33
3.4.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	33
3.4.4	Gaschromatographie.....	34
3.5.	Spektroskopische Methoden.....	34
3.5.1	UV/Vis-Spektroskopie .....	34
3.5.2	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	35
3.5.3	Determination von Thiosulfat-Konzentrationen.....	35
3.5.4	Determination von Tetrathionat-Konzentrationen.....	35
3.5.5	Determination von Sulfit-Konzentrationen .....	36
3.5.6	Determination von Sulfat-Konzentrationen.....	36
3.5.7	Determination von Eisen-Schwefel-Clustern in rekombinanten Proteinen.....	36
3.6	Anaerobes Arbeiten.....	37
3.7	Kristallographie .....	37
3.8	Proteom-Analysen .....	37
4	Ergebnisse .....	40
4.1	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> -Ansatz .....	40
4.1.1	Bioinformatische Untersuchung zum Schwefelstoffwechsel in <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> X <sup>T</sup> .....	40
4.1.2	Entwicklung eines genetischen Systems für <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> X <sup>T</sup> .....	43
4.1.3	Entwicklung eines Systems zur gerichteten Mutagenese von <i>H. denitrificans</i> X <sup>T</sup> und Generierung von Knock-out- und Knock-in- Mutanten .....	45

4.1.4	Screening nach metabolisierbaren schwefelhaltigen Substraten für <i>Hyphomicrobium X<sup>T</sup></i> .....	52
4.1.5	Untersuchungen zum Thiosulfat-Stoffwechsel in <i>Hyphomicrobium X<sup>T</sup></i> .....	53
4.1.6	Untersuchungen zum Dimethylsulfid-Stoffwechsel in <i>Hyphomicrobium X<sup>T</sup></i> .....	59
4.1.7	HdrA als Markerprotein für die Expression Hdr-ähnlicher Proteine in <i>Hyphomicrobium X<sup>T</sup></i> .....	63
4.1.8	LbpA als Markerprotein für die Expression Hdr-ähnlicher Proteine in <i>Hyphomicrobium X<sup>T</sup></i> .....	64
4.1.9	Phänotypische Charakterisierung von <i>H. denitrificans Δhdr</i> .....	67
4.1.10	Phänotypische Charakterisierung von <i>H. denitrificans ΔhdrΔsqr</i> .....	70
4.1.11	Phänotypische Charakterisierung von <i>H. denitrificans ΔlbpA</i> .....	72
4.1.12	Phänotypische Charakterisierung von <i>H. denitrificans ΔtsdA</i> .....	74
4.1.13	Proteom-basierte Einblicke in den Dimethylsulfid-Stoffwechsel von <i>H. denitrificans</i> .....	77
4.2	<i>Hyphomicrobium</i> EG-Ansatz .....	84
4.2.1	Bioinformatische Untersuchung zum Schwefelmetabolismus in <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> EG .....	84
4.2.2	Proteom-basierte Einblicke in den Dimethylsulfoxid-Stoffwechsel von <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> EG .....	88
4.3	Rekombinanter Ansatz .....	96
4.3.1	Heterologe Expression von rekombinantem TK90_0635 und Hden_0692 in <i>E. coli</i> ...	96
4.3.2	Heterologe Expression von rekombinantem HdrA in <i>E. coli</i> .....	99
4.3.3	UV/Vis-Spektroskopie von rekombinantem HdrA .....	100
4.3.4	Bestimmung der Redoxeigenschaften von HdrA .....	104
4.3.5	Struktur von HdrA .....	106
4.3.6	Expression ganzer Hdr-Komplexe in <i>E. coli</i> .....	108
5	Diskussion .....	110
5.1	<i>Hyphomicrobium denitrificans X<sup>T</sup></i> als Modellorganismus für den oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel .....	110
5.2	Ein Modell für die Rolle Hdr-ähnlicher Proteine im oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in <i>Hyphomicrobium denitrificans X<sup>T</sup></i> .....	117
5.3	Zusammenhänge zwischen der Struktur, den Redoxpotentialen und möglichen Funktionen in Hdr-ähnlichen Proteinen .....	131
5.4	Oxidativer dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel in <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> EG .....	136
6	Zusammenfassung .....	144
7	Literaturverzeichnis .....	145
	Anhang .....	161
	Danksagung .....	167
	Publikationen .....	168

**Abkürzungsverzeichnis**

% (m/v)	Masseprozent
% (v/v)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
4Fe-4S	Eisen-Schwefel-Cluster
Å	Ångström
Å <sup>2</sup>	Quadrat-Ångström
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CCN	Wolken-Kondensationskeime
Cfu/mL	Kolonieformende Einheiten pro Milliliter
Cm <sup>R</sup> ,	Chloramphenicol-Resistenz
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoM-S-S-CoB	archaeales Heterodisulfid
d	Tag
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DES	Diethylsulfid
DMA	Dimethylamin
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO <sub>2</sub>	Dimethylsulfon
DMSP	Dimethylsulfoniopropionat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E <sub>0</sub> '	biologisches Standardpotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethylsulfid
engl.	englisch
EPR	Elektronenspinresonanz
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBEB	Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation
FDR	Falschidentifikationsrate
Ferricyanid	Kaliumhexacyanidoferrat(III)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
gDNS	genomische DNS
GHz	Gigahertz
h	Stunde
Hdr	Heterodisulfidreduktase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP-Peroxidase	Meerrettichperoxidase
<i>Hyphomicrobium</i> EG	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> EG
<i>Hyphomicrobium</i> spp.	Spezies aus dem Genus <i>Hyphomicrobium</i>
<i>Hyphomicrobium</i> X	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> X <sup>T</sup>
inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Grad Kelvin
kB	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kHz	Kilohertz
Km <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz

kV	Kilovolt
L	Liter
LbpA	Lipoatbindeprotein
LCD	Flüssigkristallanzeige
M	Molar
MBp	Megabasenpaar
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
mHdrA	HdrA aus <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>
mHdrB	HdrB aus <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>
mHdrC	HdrC aus <i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MSA	Methansulfonsäure
msek	Millisekunden
mT	Millitesla
MT	Methanthiol
MTO	Methanthioloxidase
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
mW	Milliwatt
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nd	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
NiFe	Eisen-Nickel Zentrum
nL	Nanoliter
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDO	Persulfiddioxygenase
PEP	A-posteriori-Fehler-Wahrscheinlichkeit
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
PSM	Peptidspektrum Übereinstimmung
p-Wert	Korrelationskoeffizienten nach Pearson
rH <sub>2</sub> O	autoklaviertes demineralisiertes Wasser
Rif <sup>R</sup>	Rifampin-Resistenz
RNS	Ribonukleinsäuren
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Elementsymbol von Schwefel
S <sup>2-</sup>	Sulfid
SDC	Natriumdesoxycholat
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Sm <sup>R</sup>	Streptomycin-Resistenz
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat
SOE	Splicing by Overlap Extension
Sqr	Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase
Tab.	Tabelle
Tc <sup>R</sup>	Tetracyclin Resistenz
TEAB	Triethylammonium-Bicarbonat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Thiosulfat
TsdA	Thiosulfatdehydrogenase
üN	über Nacht
üWE	über Wochenende
V	Volt
xHdrA	HdrA aus <i>Hyphomicrobium X</i>
Δ	delta
Ω	Ohm

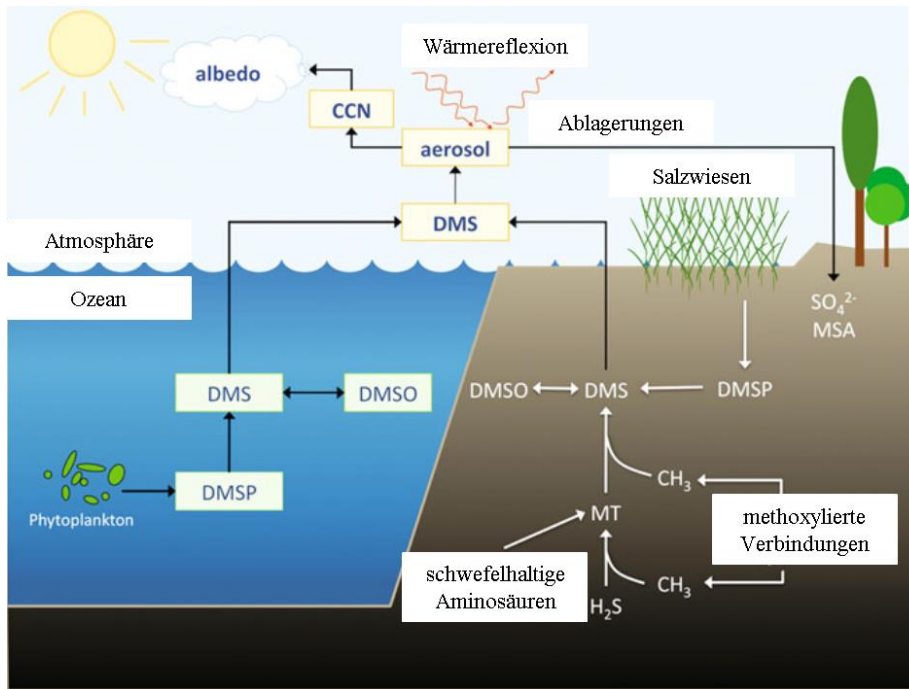


# 1 Einleitung

## 1.1 Der Schwefelzyklus

Das Element Schwefel (Elementsymbol S) befindet sich in der sechsten Hauptgruppe des Periodensystems und gehört damit zu den Chalkogenen. Der nicht metallische Feststoff kann in der Natur sowohl in Form von organischen und anorganischen Verbindungen als auch als gediegener Feststoff vorkommen, wobei er hinsichtlich seiner Häufigkeit in der Lithosphäre den 16. Platz belegt. Unter den anorganischen Verbindungen stellt Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) die höchstoxidierte Form dar, während es sich bei Sulfid ( $\text{S}^{2-}$ ) um die höchstreduzierte Form handelt. Neben der Bedeutung für die Lithosphäre wurde Schwefel zudem für jede Art von bisher charakterisiertem Leben als essentielles Makronährelement nachgewiesen. Diese Wichtigkeit spiegelt sich unter anderem im Auftreten von schwefelhaltigen organischen Verbindungen wie Aminosäuren, Coenzym A, Vitamin B<sub>7</sub> oder Liponsäuren in allen drei Domänen des Lebens wider. Während Eukaryoten nur zum assimilatorischen Schwefelstoffwechsel befähigt sind, können Prokaryonten dissimilatorischen Schwefelmetabolismus betreiben (Canfield & Raiswell, 1999). Im reduktiven dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel werden unter anoxischen Bedingungen oxidierte Schwefelverbindungen anstelle von Sauerstoff als terminale Elektronenakzeptoren verwendet. Diesem gegenüber steht der oxidative dissimilatorische Schwefelmetabolismus, bei dem reduzierte Schwefelverbindungen oxidiert werden, wobei die hierbei freigesetzten Elektronen zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten und/oder zum Aufbau von Ladungsgradienten genutzt werden (Dahl *et al.*, 2008; Dahl, 2017). Die hierbei als terminale Elektronenakzeptoren fungierenden Verbindungen sind variabel und können neben Sauerstoff beispielsweise auch oxidierte Stickstoffverbindungen oder die photosynthetische Elektronentransportkette sein.

Durch die mikrobielle Oxidation bzw. Reduktion von anorganischen Schwefelverbindungen sind der organische und der anorganische Schwefelkreislauf eng miteinander verknüpft. Ein prominentes Beispiel für diese Verknüpfung ist der biosphärische Kreislauf der Organoschwefelverbindung Dimethylsulfid (DMS, Abb. 1). Durch die mikrobielle Degradation von Dimethylsulfoniopropionat (DMSP) in den oberen Meeresschichten werden jährlich bis zu 300 Megatonnen DMS freigesetzt (de Zwart & Kuenen, 1992; Kettle & Andreae, 2000; Curson *et al.*, 2011). Hinzu kommen andere Emissionsquellen wie die mikrobielle Reduktion von Dimethylsulfoxid (DMSO) und der Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren sowie die Methylierung von Sulfid oder Methanthiol (MT) (Drotar *et al.*, 1987; Holland, 1988; Bak *et al.*, 1992). Neben diesen natürlichen Emissionsquellen von DMS treten beispielsweise Kläranlagen, Kompostierungsanlagen oder die Papierherstellung als anthropogene Quellen auf (Springer, 1985; van Durme *et al.*, 1992; Gostelow *et al.*, 2001).



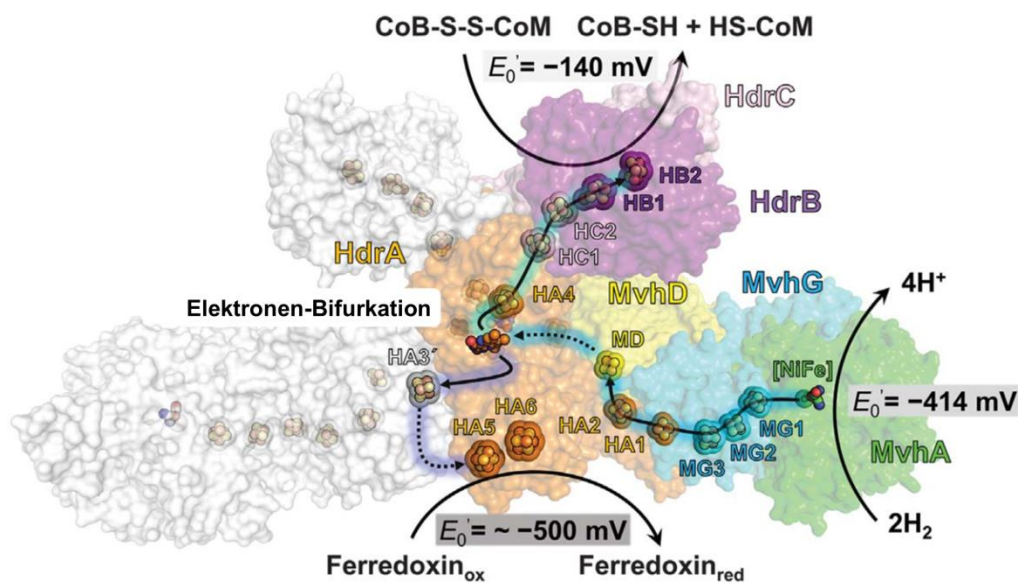
**Abb. 1: Schematische Darstellung des DMS-Kreislaufs in der Biosphäre.** Abkürzungen: DMS = Dimethylsulfid ( $\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$ ); DMSO = Dimethylsulfoxid ( $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$ ); DMSP = Dimethylsulfoniopropionat ( $((\text{CH}_3)_2\text{S}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-)$ ); MT = Methanethiol ( $\text{CH}_3\text{-SH}$ ); MSA = Methansulfonsäure ( $\text{CH}_3\text{-SO}_3\text{H}$ ); CCN = Wolken-Kondensationskeime. Abb. verändert nach Kappler & Schäfer (2014).

Das aus marinen und terrestrischen Quellen emittierte DMS wird in der Atmosphäre abiotisch abgebaut. Die hierbei entstehenden Degradationsprodukte bilden Aerosole, die als Wolken-Kondensationskeime fungieren und DMS damit eine zentrale Rolle im Rahmen der globalen Klimaentwicklung zukommen lassen (Charlson *et al.*, 1987). Durch biotischen Abbau in terrestrischen und aquatischen Habitaten werden schätzungsweise 90 % des jährlich gebildeten DMS vor Erreichen der Atmosphäre abgebaut (Kiene & Bates, 1990). Damit kommt der mikrobiellen DMS-Degradation eine entscheidende Bedeutung bei der globalen Klimaentwicklung zu.

Aerobe Bakterien der Gattungen *Hyphomicrobium*, *Thiobacillus* oder *Methylophaga* metabolisieren DMS und oxidieren den enthaltenen Schwefel zu anorganischen Schwefelverbindungen wie Sulfat, Thiosulfat oder Tetrathionat (de Bont *et al.*, 1981; Kanagawa & Kelly, 1986; Suylen *et al.*, 1986; Cho *et al.*, 1991; Visscher & Taylor, 1993; Pol *et al.*, 1994; de Zwart *et al.*, 1996; Boden *et al.*, 2010). Andere Formen der DMS-Degradation bestehen in der aeroben Oxidation zu DMSO oder im anaeroben Abbau durch Denitrifizierer, Phototrophe oder sulfatreduzierende Bakterien sowie methanogene Archaeen (Zeyer *et al.*, 1987; Holland, 1988; Visscher & van Gemerden, 1991; Zhang *et al.*, 1991; Finster *et al.*, 1992; Visscher & Taylor, 1993; Tanimoto & Bak, 1994; Lomans *et al.*, 1999). Die zugrunde liegenden Stoffwechselwege sind allerdings in vielen Fällen nur unzureichend untersucht. Während die initialen Schritte des DMS-Abbaus in Ansätzen verstanden sind und die verantwortlichen Schlüsselenzyme identifiziert werden konnten, ist für die Oxidation des im DMS enthaltenen Schwefels das Gegenteil der Fall (Schäfer *et al.*, 2010; Kappler & Schäfer, 2014; Eyice *et al.*, 2018).

## 1.2 Heterodisulfidreduktasen in methanogenen Archaeen ohne Cytochrome

In methanogenen Archaeen stellen Heterodisulfidreduktasen (Hdr) eine essentielle Komponente im Rahmen der Energiekonservierung dar. Hdr-Komplexe katalysieren hierbei die Reduktion des archaealen Heterodisulfids CoM-S-S-CoB zu CoM-SH und CoB-SH, wobei CoM-S-S-CoB zuvor im terminalen Schritt der Methanogenese von der Methyl-Coenzym-M-Reduktase gebildet wurde (Hedderich *et al.*, 1990; Hedderich *et al.*, 1994; Setzke *et al.*, 1994; Ermler *et al.*, 1997). In Archaeen mit Cytochromen wird die Reduktion von CoM-S-S-CoB in der Regel durch einen membrangebundenen Hdr-Komplex vom DE-Typ (HdrDE) katalysiert (Peinemann *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu ist in Archaeen ohne Cytochrome eine lösliche Heterodisulfidreduktase vom ABC-Typ (HdrABC) im Cytosol zu finden (Setzke *et al.*, 1994). Zusätzlich wurde kürzlich eine homologe Variante (HdrA2B2C2) gefunden, die sich teilweise strukturell und funktionell von HdrABC unterscheidet (Yan *et al.*, 2017). Der klassische HdrABC-Komplex bildet einen Superkomplex mit einer Coenzym  $F_{420}$  nicht reduzierenden Hydrogenase (MvhAGD), wobei die Untereinheiten einen Dimer aus zwei Heterohexameren bilden (Wagner *et al.*, 2017).



**Abb. 2: Reaktion und Struktur des HdrABC-MvhAGD-Komplexes aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus*.** Die jeweiligen prosthetischen Gruppen der Protomere sind graphisch dargestellt. Die FeS-Cluster sind nummeriert und den jeweiligen Protomeren durch eindeutige Buchstaben zugeordnet. Abb. verändert nach Wagner *et al.* (2017).

Ein HdrA-Protomer enthält ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) sowie sechs Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S). Die N-terminale Domäne enthält hierbei ein 4Fe-4S-Cluster, das auf ungewöhnliche Weise über vier Cysteine (C386, C399, C403, C404) ligiert wird. Die Thioredoxin-Domäne enthält ebenfalls ein 4Fe-4S-Cluster, während eine inserierte und die C-terminale Ferredoxin-Domäne zusätzlich jeweils zwei 4Fe-4S-Cluster aufweisen. HdrC besitzt eine Ferredoxin-ähnliche Domäne, die zwei 4Fe-4S-Cluster bindet. Ein HdrB-Protomer besitzt zwei sehr ähnliche nicht-cubane 4Fe-4S-Cluster, die wiederum jeweils aus einem 2Fe-2S- und einem 3Fe-4S-Subcluster bestehen. Diese Subcluster teilen sich jeweils ein Eisen und einen Schwefel. Zusätzlich ist jeweils einer der Schwefel

im 3Fe-4S-Subcluster durch einen Cystein-Schwefel blockiert (Wagner *et al.*, 2017). Während die Zusammensetzungen von Hdr-Komplexen aus verschiedenen Untereinheiten schon bekannt waren, herrschte lange Unklarheit über den genauen Reaktionsmechanismus der katalysierten Reaktion. Erst das Konzept der Flavin-basierten Elektronen-Bifurkation ermöglichte es, die Stöchiometrie der Reaktion aufzuklären (Thauer *et al.*, 2008; Kaster *et al.*, 2011). Im Rahmen der Flavin-basierten Elektronen-Bifurkation in HdrABC-MvhAGD-Komplexen wird ein Hydrid-Elektronenpaar aus der Oxidation von Wasserstoff aufgeteilt in ein Elektron mit einem negativeren und ein Elektron mit einem positiveren Redoxpotential im Vergleich zu dem Redoxpotential des Elektronenpaares. Durch diesen Prozess können Elektronen aus der Oxidation von Wasserstoff ( $E_0' = \text{ca. } -420 \text{ mV}$ ) mit einem ausreichend negativen Redoxpotential generiert werden, um die endergone Reduktion von Ferredoxinen ( $E_0' = -500 \text{ mV}$ ) mit der gleichzeitigen exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB ( $E_0' = -140 \text{ mV}$ ) zu betreiben (Thauer *et al.*, 2008; Kaster *et al.*, 2011; Buckel & Thauer, 2013, 2018). Durch eine Kristallstruktur von HdrABC-MvhAGD konnte ein vorläufiges Modell für die einzelnen Elektronentransportreaktionen aufgestellt werden (Abb. 2).

### 1.3 Potentielle Rolle von Heterodisulfidreduktase-ähnlichen Komplexen im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel

Heterodisulfidreduktasen vom ABC-Typ sind vor allem für ihre Funktion in methanogenen Archaeen bekannt, in denen sie mit MvhAGD oder der Formiat-Dehydrogenase Superkomplexe bilden (Thauer *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010). Homologe gibt es ebenfalls in verschiedenen Desulfurikanten. Für das Archaeon *Archaeoglobus profundus*, das neben einem HdrABC-Komplex ebenfalls einen HdrDE-Komplex besitzt, konnte gezeigt werden, dass HdrABC einen Superkomplex mit einer NiFe-Hydrogenase bildet und durch Wasserstoff reduziert wird (Mander *et al.*, 2004). Eine genaue metabolische Funktion konnte den Hdr-Komplexen jedoch nicht zugewiesen werden. Im Gegensatz hierzu stehen die HdrABC-Komplexe in verschiedenen Desulfurikanten. In *Desulfovibrio vulgaris* bildet HdrABC einen Superkomplex mit der NADH-Dehydrogenase FlxABCD, der essentiell für die NADH-Oxidation während des Wachstums auf Ethanol mit Sulfat als Elektronenakzeptor ist (Ramos *et al.*, 2015). Groß angelegte bioinformatische Datenbankanalysen zeigten zusätzlich, dass *hdr*-ähnliche Gencluster in Sulfurikanten in zwei der drei Domänen des Lebens konserviert auftreten (Liu *et al.*, 2014; Venceslau *et al.*, 2014; Dahl, 2015). Basierend auf Transkriptom- und Proteom-Analysen verschiedener *Acidithiobacillus* spp. (Quatrini *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Ehrenfeld *et al.*, 2013; Osorio *et al.*, 2013), die eine verstärkte Expression der *hdr*-ähnlichen Gene bzw. Proteine bei Wachstum auf reduzierten Schwefelverbindungen zeigten, gilt eine Beteiligung von Hdr-ähnlichen Komplexen am oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel als wahrscheinlich. Zudem konnte für *Aquifex aeolicus* gezeigt werden, dass in diesem Organismus die Hdr-ähnlichen Proteine einen membranassoziierten Komplex bilden (Boughanemi *et al.*, 2016).

Während HdrABC-Komplexe in Methanogenen aus drei verschiedenen Protomeren bestehen, deren Gene als ein Gencluster, aber auch vereinzelt im Genom vorliegen können (Rohlin & Gunsalus, 2010),

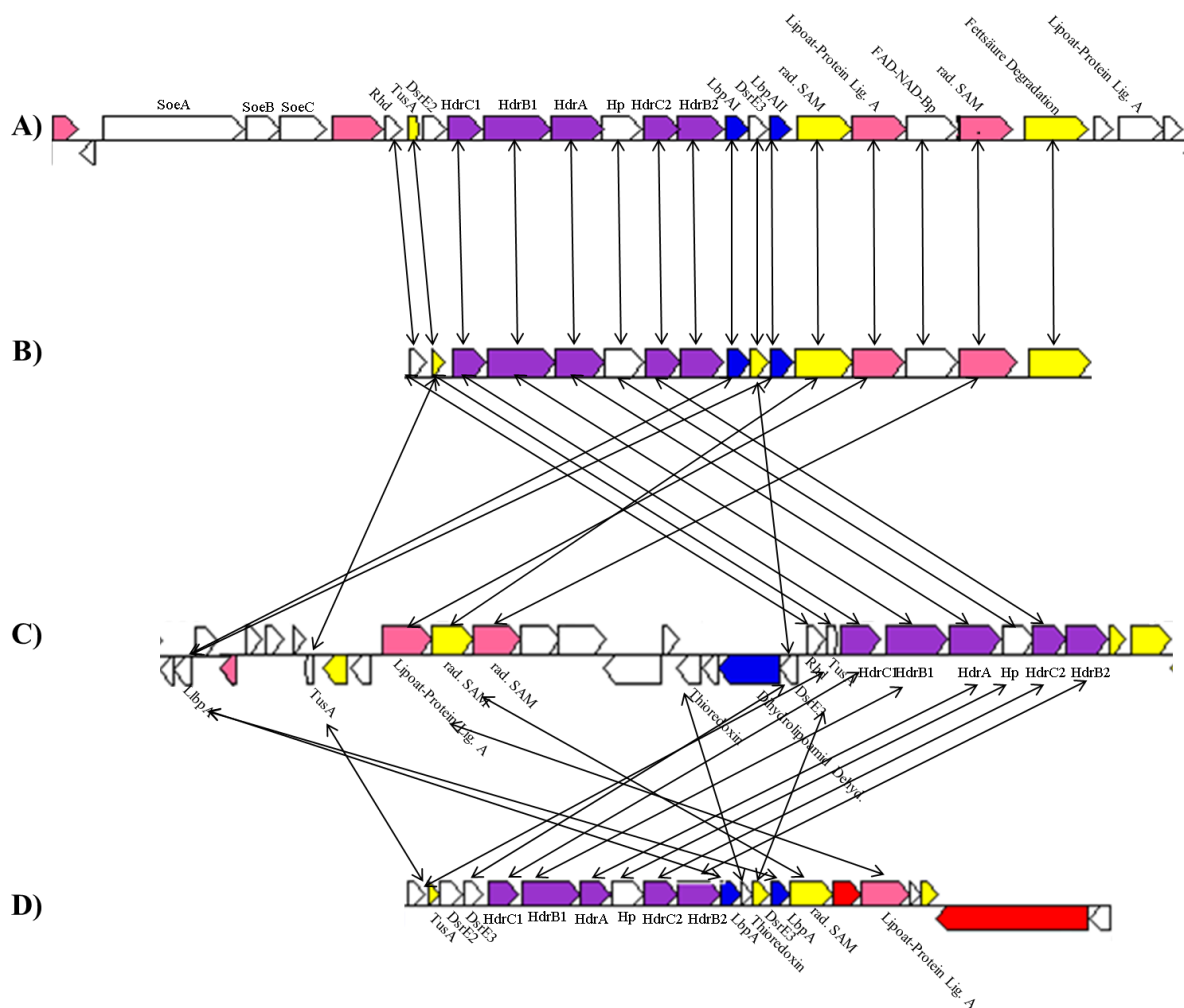
gestaltet sich die Situation bei den Hdr-ähnlichen Komplexen anders. Mit Ausnahme einiger grampositiver Organismen, bei denen die *hdr*-ähnlichen Gene in einem Cluster mit Genen für ein elektronentransferierendes Flavoprotein (EtfBA) zu finden sind (Garcia Costas *et al.*, 2017), besteht der *hdr*-ähnliche Genlokus *sensu stricto* aus sechs Genen (Abb. 3).



**Abb. 3: Der *hdr*-ähnliche Genlokus in *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888<sup>T</sup>.** Gezeigt werden die Gene Hden\_0689 (*hdrC1*) bis Hden\_0694 (*hdrB2*). Die Länge der Pfeile korreliert mit der Länge der jeweiligen Gene. Abkürzungen: hP = hypothetisches Protein.

HdrC1 und HdrC2 besitzen ähnlich wie HdrC aus Archaeen eine Ferredoxin-ähnliche Domäne und binden wahrscheinlich jeweils zwei 4Fe-4S-Cluster. HdrB2 weist sehr hohe Sequenzübereinstimmungen mit HdrB aus Methanogenen auf, inklusive der bindenden Aminosäurereste für die zwei nicht-cubanen 4Fe-4S-Cluster. HdrB1, das deutlich größer als HdrB2 ist, besitzt ebenfalls konservierte Bereiche mit Ähnlichkeiten zu HdrB. Hier sind jedoch nicht alle cluster-bindenden Aminosäurereste konserviert. Das HdrA-Protein aus Sulfurikanten ist deutlich kleiner als HdrA aus Methanogenen. Während die inserierte und die C-terminale Ferredoxin-Domäne mit ihren jeweils zwei 4Fe-4S-Clustern und die N-terminale Domäne mit einem 4Fe-4S-Cluster fehlen, zeigt das Sulfurikanten-HdrA eine große Ähnlichkeit zur Thioredoxin-Domäne von HdrA aus methanogenen Archaeen und weist ein Flavin-Bindemotiv sowie vier hochkonservierte Cysteine auf. Zusätzlich finden sich in den *hdr*-ähnlichen Genloki von schwefeloxidierenden Mikroorganismen Gene, die für ein hypothetisches Protein kodieren. Diese Gene finden sich ausschließlich in *hdr*-ähnlichen Genloki.

Untersuchungen der erweiterten Umgebung *hdr*-ähnlicher Genloki führten zur Identifizierung von Genen, die hochkonserviert zusammen mit Genen für Hdr-ähnliche Proteine auftreten (Liu *et al.*, 2014; Venceslau *et al.*, 2014; Dahl, 2015) (Abb. 4).



**Abb. 4: Vergleich der konservierten Bereiche im erweiterten *hdr*-ähnlichen Genlokus von Organismen der Familien Acidithiobacillaceae (*Acidithiobacillus caldus* SM-1, A), Ectothiorhodospiraceae (*Thioalkalivibrio* sp. K90mix, B), Sulfolobaceae (*Metallosphaera cuprina* Ar-4, C) und Aquificaceae (*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, D). Die Genprodukte der jeweils konservierten Gene der erweiterten Hdr-Genloki wurden annotiert. Pfeile verbinden orthologe Gene. Bei den aufgeführten Annotationen handelt es sich um automatische Annotationen. Die Abb. wurde erstellt unter Verwendung von Bildmaterial von KEGG.**

Neben den eigentlichen *hdr*-ähnlichen Genloki *sensu stricto* umfassen die hochkonservierten erweiterten *hdr*-ähnlichen Genloki (*sensu lato*) mindestens noch ein Gen, das für ein Lipoiatbindeprotein (LbpA), sowie ein weiteres, das für ein DsrE3-Protein kodiert. Zusätzlich findet sich ein Gencluster, das für Enzyme kodiert, die an der Biosynthese von lipoiatbindenden Proteinen beteiligt sein könnten (radical SAM-Proteine, Lipoiat-Protein-Ligase). Während *lbpA* und *dsrE3* in fast allen sequenzierten Organismen mit *hdr*-ähnlichem Genlokus in der direkten genetischen Umgebung der *hdr*-ähnlichen Gene zu finden sind, liegen die Gene für die potentiellen Biosynthese-Proteine in seltenen Fällen an einer anderen Stelle im Genom (Cao *et al.*, 2018).

Durch die Vielzahl an Daten aus Omics-Untersuchungen hat sich das Modell eines am dissimilatorischen Schwefelmetabolismus beteiligten Hdr-ähnlichen Komplexes in der Literatur etabliert. Da eine große Mehrheit an Organismen mit *hdr*-ähnlichen Genen extremophil und häufig auch obligat chemolithoautotroph ist sowie in vielen Fällen keine genetischen Systeme vorhanden

sind, mangelt es an geeigneten Modellorganismen. Entsprechend steht der Nachweis der tatsächlichen Funktion von Hdr-ähnlichen Komplexen noch aus.

#### 1.4 Das Bakteriengenus *Hyphomicrobium*

Bakterien aus dem Genus *Hyphomicrobium* gehören zur Familie der Hyphomicrobiaceae, die in die Klasse der Alphaproteobacteria einzuordnen ist. Der erste beschriebene Organismus dieses Genus ist *Hyphomicrobium vulgare* (Stutzer & Hartleb, 1898). Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit besteht das Genus gemäß der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) aus 115 verschiedenen Arten, von denen insgesamt 18 sequenziert sind. Die verschiedenen Arten sind ubiquitär verbreitet. Spezies des Genus *Hyphomicrobium* sind obligat chemoorganotroph sowie fakultativ methylophil und können reduzierte C1-Verbindungen wie Methanol, methylierte Amine, methylierte Schwefelverbindungen, halogenierte Methylenverbindungen oder Formaldehyd als Substrate zum Wachstum verwenden (Harder & Attwood, 1978; Rainey *et al.*, 1998). Ferner umfasst das Substratspektrum dieser Organismen C2-Verbindungen wie Ethanol oder Acetat. Einige Vertreter des Genus können zudem Pektin metabolisieren (Urakami *et al.*, 1995) oder aber kurzkettige Alkohole mit einer Kettenlänge von C3–C6 (Harder & Attwood, 1978). Als terminaler Elektronenakzeptor wird Sauerstoff oder Nitrat genutzt (Attwood & Harder, 1972). Der Aufbau von Biomasse erfolgt über den Serin-Weg (Meiberg & Harder, 1978). Unter Laborbedingungen wachsen die Zellen bei neutralem oder leicht alkalischem pH bei Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C optimal (Attwood & Harder, 1972). Die Zellen sind entweder stäbchenförmig mit spitzen Enden, oval oder bohnenförmig, haben einen Durchmesser von 0,5–1 µm und eine Länge von bis zu 3 µm. An ihren Enden produzieren sie mono- oder bipolar filamentöse Pseudohyphen von variabler Länge. Organismen aus diesem Genus unterliegen einem obligaten biphasischen Lebenszyklus und vermehren sich durch Hyphenknospung (Abb. 5).

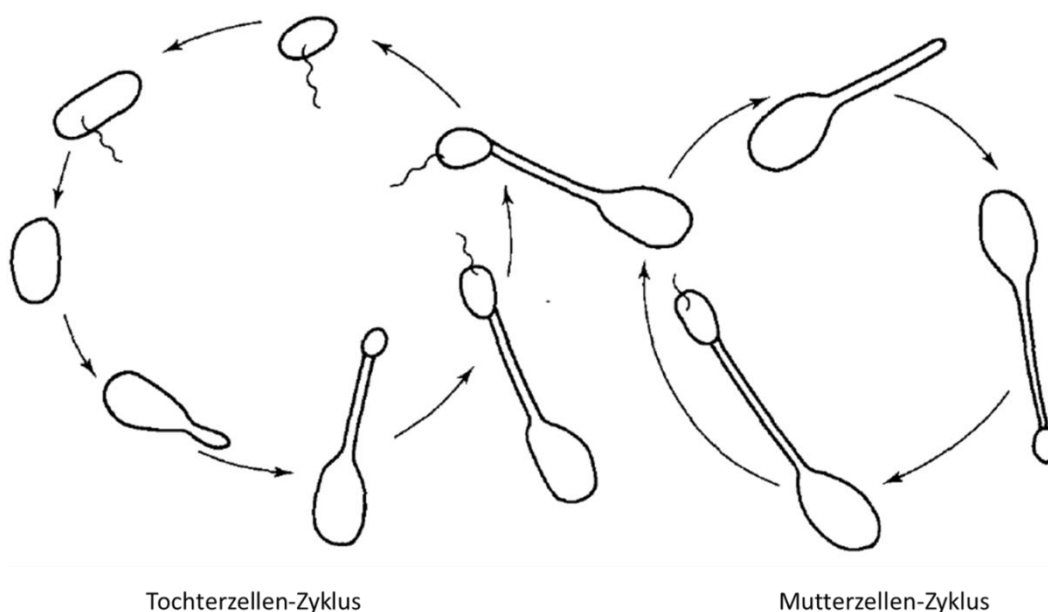


Abb. 5: Schematische Darstellung des biphasischen Lebenszyklus von Spezies aus dem Genus *Hyphomicrobium*. Abb. verändert nach Harder & Attwood (1978).

Eine motile Tochterzelle (ein bis drei polare oder subpolare Flagellen) verliert im Verlauf des Tochterzellen-Zyklus ihr Flagellum (Abb. 5, links). Die Zelle heftet sich an eine Oberfläche und bildet durch polares Wachstum eine Pseudohyphye aus, an deren Ende eine motile Tochterzelle gebildet wird. Durch eine asymmetrische Teilung wird die Tochterzelle abgeschnürt und geht in den Tochterzellen-Zyklus über, während die Mutterzelle am Ende der Pseudohyphye eine neue Tochterzelle ausbildet (Leifson, 1964; Attwood & Harder, 1972; Harder & Attwood, 1978).

Organismen aus dem Genus *Hyphomicrobium* bzw. einzelne Gencluster oder Enzyme aus Organismen finden vielfältige Anwendung in biotechnologischen Prozessen. So werden beispielsweise Ganzzellkatalysatoren ebenso für die Reinigung von Luft von geruchsintensiven methylierten Schwefelverbindungen genutzt (Pol *et al.*, 1994) wie für die Reinigung von Industrieabwässern aus der Produktion von Halbleitern oder LCD-Anzeigen (Murakami-Nitta *et al.*, 2002; Murakami-Nitta *et al.*, 2003). Zudem gibt es Prozesse, bei denen *Hyphomicrobium* spp. zur Denitrifizierung von Ab- und Trinkwasser eingesetzt werden (Nyberg *et al.*, 1992; Liessens *et al.*, 1993) oder aber zur Remediation von Abwässern, die halogenierte Methylenverbindungen enthalten (McDonald *et al.*, 2001). Ein Beispiel für die gezielte Nutzung eines Enzyms aus *Hyphomicrobium* spp. ist die Verwendung der Methanthioloxidase aus *Hyphomicrobium* EG als Zusatzstoff für Mittel zur Unterstützung der Mundhygiene und zur Reduzierung von Mundgeruch (US-Patent US20150147365A1). Ferner werden *Hyphomicrobium* spp. bzw. Gencluster aus selbigen zur industriellen Produktion von Pyrrolochinolinchinon verwendet (US-Patent US20130337511A1).

#### 1.4.1 Dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel im Bakteriengenus *Hyphomicrobium*

Spezies des Genus *Hyphomicrobium* sind dafür bekannt, einen oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus zu betreiben (Rainey *et al.*, 1998; Schäfer *et al.*, 2010; Kappler & Schäfer, 2014). Als Substrate können hierbei unter anderem anorganische reduzierte Schwefelverbindungen wie Sulfid oder Thiosulfat dienen. Einige Stämme verwerten zusätzlich organische Schwefelverbindungen wie Dimethylsulfon (DMSO<sub>2</sub>), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylsulfid (DMS) oder Methanthiol (MT) (Tab. 1).

**Tab. 1: Exemplarische Schwefelstoffwechsel im Genus *Hyphomicrobium*.** Abkürzungen: DMSO<sub>2</sub> = Dimethylsulfon; DMSO = Dimethylsulfoxid; DMS = Dimethylsulfid; MT = Methanthiol; H<sub>2</sub>S = Dihydrogensulfid; TS = Thiosulfat; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = Sulfat; EMS = Ethylmethylsulfid; DES = Diethylsulfid. Die Angaben zu involvierten Enzymen beziehen sich auf nachgewiesene Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten oder substratabhängigen Sauerstoffverbrauch.

Organismus	Substrate	Endprodukte	Enzyme	Sequenziert	Quelle
<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> WU-IQ 17	DMSO, DMS, EMS, DES	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	nicht untersucht	nein	(Murakami-Nitta <i>et al.</i> , 2002)
<i>Hyphomicrobium</i> EG	DMSO, DMS, MT, TS, H <sub>2</sub> S	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	MT-Oxidase, DMSO-Reduktase	ja, Sequenz nicht öffentlich	(Suylen <i>et al.</i> , 1986; Suylen & Kuenen, 1986; Suylen <i>et al.</i> , 1987; Hatton <i>et al.</i> , 1994)



Organismus	Substrate	Endprodukte	Enzyme	Sequenziert	Quelle
<i>Hyphomicrobium</i> S	DMSO, DMS, MT	$\text{SO}_4^{2-}$	DMSO- Reduktase, DMS- Monooxygenase, MT-Oxidase	nein	(de Bont <i>et al.</i> , 1981)
<i>Hyphomicrobium</i> S1	$\text{DMSO}_2$ , DMSO, DMS	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{DMSO}_2$ - Reduktase, DMSO -Reduktase, DMS- Monooxygenase, MT-Oxidase	nein	(Borodina <i>et al.</i> , 2000)
<i>Hyphomicrobium</i> <i>sulfonivorans</i>	$\text{DMSO}_2$ , DMSO, DMS	$\text{SO}_4^{2-}$	DMSO- Reduktase, DMS- Monooxygenase, Schwefel- Dioxygenase, APS-Reduktase	ja, Sequenz nicht öffentlich	(Borodina <i>et al.</i> , 2002; Boden <i>et</i> <i>al.</i> , 2011)
<i>Hyphomicrobium</i> VS	DMSO, DMS, $\text{H}_2\text{S}$ , TS	$\text{SO}_4^{2-}$	DMSO- Reduktase, DMS- Monooxygenase, MT-Oxidase	nein	(Pol <i>et al.</i> , 1994)

Die Umsetzung von reduzierten organischen Schwefelverbindungen durch *Hyphomicrobium* spp. erfolgt nach einem konservierten Muster (Abb. 6).

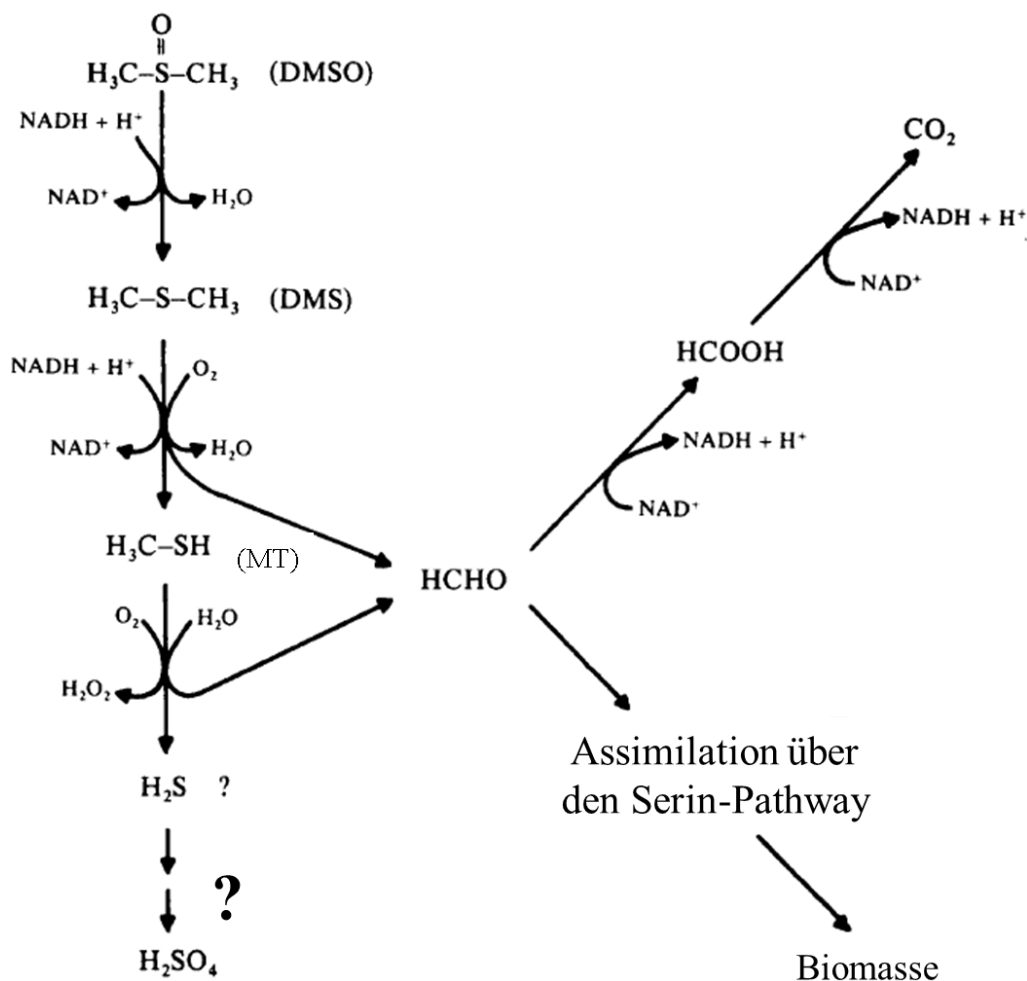


Abb. 6: Vereinfachte Darstellung des oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus in *Hyphomicrobium* spp.. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid; DMS = Dimethylsulfid; MT = Methanthiol;  $\text{H}_2\text{S}$  = Dihydrogensulfid;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  = Schwefelsäure; Abb. verändert nach de Bont *et al.* (1981).

DMSO<sub>2</sub> oder DMSO wird zunächst zu DMS reduziert. Eine DMS-Monooxygenase setzt dann ebenfalls unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten DMS zu Methanthiol um, wobei bei diesem Schritt Formaldehyd gewonnen wird. Dieses wird entweder zur Energiegewinnung zu CO<sub>2</sub> oxidiert oder zum Aufbau von Zellmasse über den Serin-Weg assimiliert. Das verbleibende Methanthiol wird nachfolgend von einer Methanthioloxidase zu einem weiteren Formaldehyd und Sulfid umgesetzt. Da die Methanthioloxidase als weiteres Produkt Wasserstoffperoxid freisetzt, weisen zellfreie Extrakte von *Hyphomicrobium* spp., die auf DMSO<sub>2</sub>, DMSO oder DMS kultiviert wurden, häufig eine erhöhte Katalaseaktivität auf (de Bont *et al.*, 1981; Suylen *et al.*, 1986; Pol *et al.*, 1994; Borodina *et al.*, 2000; Eyice *et al.*, 2018). Die Oxidation des reduzierten Schwefels zu Sulfat ist größtenteils unklar. Für die *Hyphomicrobium*-Stämme VS und EG ist die Bildung von Thiosulfat als Intermediat während der Oxidation von Sulfid beschrieben (Suylen *et al.*, 1986; Pol *et al.*, 1994), allerdings konnte eine abiotische Thiosulfatbildung (Chen & Morris, 1972) nicht ausgeschlossen werden. In zellfreien Extrakten von *Hyphomicrobium sulfonivorans* wurde Aktivität von Schwefel-Dioxygenase und APS-Reduktase nachgewiesen (Borodina *et al.*, 2002).

Die verfügbaren Daten wurden mit *Hyphomicrobium*-Stämmen erhoben, deren Genomsequenzen nicht verfügbar sind (Tab. 1). So können die nachgewiesenen Enzyme bzw. deren Aktivitäten nur in wenigen Fällen den entsprechenden Genen zugeordnet werden (Kappler & Schäfer, 2014).

## 1.5 Der Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup>

Der Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> (in der Literatur auch als *Hyphomicrobium denitrificans* Urakami *et al.*, *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC51888<sup>T</sup>, *Hyphomicrobium denitrificans* NCIMB 11706<sup>T</sup>, *Hyphomicrobium denitrificans* DSM1869<sup>T</sup>, *Hyphomicrobium denitrificans* TK0415<sup>T</sup> zu finden) ist der Typstamm für die Art *Hyphomicrobium denitrificans* (Urakami *et al.*, 1995). Er wurde 1973 in den Niederlanden aus einer Anreicherungskultur für methylotherme Bakterien isoliert (Harder *et al.*, 1973) und in der Literatur bis zur Klassifizierung als Typstamm im Jahr 1995 als *Hyphomicrobium* X beschrieben. Fälschlicherweise wird *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> sowohl in der Literatur (Deligeer *et al.*, 2002; Yamaguchi, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004; Nojiri *et al.*, 2005; Nojiri *et al.*, 2007) als auch in großen Datenbanken (PDB IDs 5B1J, 3EF4, 2DV6, 2D0W, 2D0V, 2D0V) mit *Hyphomicrobium denitrificans* A3151 gleichgesetzt. Letzterer wurde jedoch 1988 in Japan isoliert (Aida & Nomoto, 1988) und ist somit lediglich ein nah verwandter Stamm von *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup>.

*Hyphomicrobium* X ist ein gramnegatives stäbchenförmiges Alphaproteobakterium. Die Zellen haben einen Durchmesser von 0,3–0,6 µm bei einer Länge von 1–3 µm und können mono- oder bipolar unseptierte Pseudohyphen mit einem Durchmesser von 0,3–0,4 µm ausbilden.

Als fakultativ methylothermes Bakterium kann *Hyphomicrobium* X mit C1-Verbindungen wie Methanol, Formaldehyd oder methylierten Aminen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle

wachsen, ebenso wie mit C2-Verbindungen wie Ethanol oder Acetat (Harder *et al.*, 1973). Zudem wird Pektin verwertet, während Methan nicht als Substrat genutzt werden kann (Urakami *et al.*, 1995). Der Organismus ist mesophil (pH-Optimum 6–8, Temperatur-Optimum 30 °C, kein Wachstum in Gegenwart von 3 % (m/v) NaCl im Medium) und bildet innerhalb von 3–6 Tagen glänzende, glatte Kolonien mit einem Durchmesser von 1–2 mm auf Agarplatten mit Methanol. Das Wachstum erfolgt obligat als Atmung. Hierbei dient Sauerstoff oder Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor. Eine Gärung ist nicht beschrieben (Harder & Attwood, 1978). Als Chinon bildet der Organismus Ubichinon (95,6 % Q-9, 3,5 % Q-8, 0,9 % Q-11) (Urakami & Komagata, 1986). Die Gene für die Synthese von Menachinon oder Methylmenachinon besitzt *Hyphomicrobium X* nicht. Da der Organismus aufgrund eines inkompletten Pyruvatdehydrogenase-Komplexes nicht zur Verwertung von langkettigen Kohlenstoffverbindungen fähig ist, erfolgt der Aufbau von Biomasse über den Serin-Weg (Harder *et al.*, 1973).

Im Zusammenhang mit Studien zum Kohlenstoffmetabolismus von *Hyphomicrobium X* wurde ein System zum Einbringen von Plasmiden in den Organismus mittels Elektroporation oder Konjugation entwickelt (Dijkhuizen *et al.*, 1984; Gliesche, 1997). Ferner ist für den Organismus eine biotechnologische Anwendung beschrieben, bei der die Methanol-Dehydrogenase als zellfreies biologisches Sensorsystem zur Detektion von Methanol verwendet wird (Argall & Smith, 1993).

Der Organismus wurde 2010 durch das US DOE Joint Genome Institute komplett sequenziert (Referenz-Sequenz NC\_014313.1). Das Genom mit einer Größe von 3,64 MBp kodiert gemäß automatischer Annotation für 3.542 Gene (3.473 Proteine). Gemäß Datenbank-Analysen (Venceslau *et al.*, 2014) enthält das Genom von *Hyphomicrobium X* die Gene für einen Hdr-ähnlichen Komplex, der in Verdacht steht, in Prozesse des oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus involviert zu sein (Quatrini *et al.*, 2009). Laut Literatur kann der Organismus weder auf methylierten Schwefelverbindungen wachsen noch Thiosulfat als zusätzliche Energie- und Elektronenquelle in Gegenwart einer reduzierten Kohlenstoffverbindung verwerten (Suylen *et al.*, 1986).

## 1.6 Der Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* EG

Der Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* EG wurde 1986 aus einem Abwasserfilter einer Papiermühle in den Niederlanden mittels einer Anreicherungskultur für DMSO verwertende Bakterien isoliert (Suylen & Kuenen, 1986). Vom Westerdijk Fungal Biodiversity Institute wird der Organismus als Stamm der Art *H. denitrificans* (*Hyphomicrobium denitrificans* EG) geführt. Der Organismus ist ein stäbchenförmiges Bakterium, dessen Zellen einen Durchmesser von 0,4–0,7 µm bei einer Länge von bis zu 1,2 µm aufweisen. Als mesophiles Bakterium wächst *Hyphomicrobium* EG bei 30 °C in einem pH-Bereich von 6,5–9,0 mit einem Optimum bei 7,0–7,5. Der Organismus wächst aerob mit DMSO, DMS, Formaldehyd, Methylamin, Dimethylamin oder Trimethylamin als Kohlenstoff- und Energiequelle. Ein Wachstum mit Methanol, Ethanol oder Acetat ist ebenso wenig möglich wie ein

anaerobes Wachstum mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor oder eine Gärung (Suylen & Kuenen, 1986). Der Aufbau von Biomasse erfolgt über den Serin-Weg.

Der Organismus ist fähig, einen oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus zu betreiben, wobei sowohl methylierte Schwefelverbindungen wie DMSO, DMS oder Methanthiol zu Sulfat oxidiert werden als auch anorganische Schwefelverbindungen wie Thiosulfat oder Sulfid (Suylen & Kuenen, 1986) (Tab. 1). In diesem Zusammenhang wurde *Hyphomicrobium* EG als Modellorganismus zur Untersuchung der Oxidation von methylierten Schwefelverbindungen etabliert. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten sowohl die Methanthioloxidase (Suylen *et al.*, 1987) als auch die DMSO-Reduktase (Hatton *et al.*, 1994) aus dem Organismus aufgereinigt und kinetisch charakterisiert werden. Die dazugehörenden Proteinsequenzen sind zum Zeitpunkt der ersten Aufreinigung unbekannt gewesen, ebenso wie die Enzyme, die den Schwefelanteil aus den methylierten Schwefelverbindungen oxidieren (Abb. 6). Für die Methanthioloxidase des Organismus konnten später im Rahmen einer Dissertation die N-terminale Aminosäuresequenz des Proteins ermittelt und der kodierende Abschnitt im Genom identifiziert werden (Kassel-Çati, 1999).

In kontinuierlichen Kulturen konnte gezeigt werden, dass der Organismus reduzierte anorganische Schwefelverbindungen als zusätzliche Energiequellen während eines heterotrophen Wachstums mit einer reduzierten Kohlenstoffverbindung nutzen kann. Die zusätzliche Oxidation der anorganischen Schwefelverbindung führt in diesem Zusammenhang zu einer signifikanten Zunahme des Gesamtproteins und des Gesamtkohlenstoffs pro Liter Kultur im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Schwefelverbindung (Suylen *et al.*, 1986). Zudem kann in zellfreien Extrakten ein substratabhängiger Verbrauch von Sauerstoff nicht nur für DMSO, DMS und Methanthiol sondern auch für Sulfid und Thiosulfat gezeigt werden. Für Sulfit hingegen ist dies nicht der Fall (Suylen *et al.*, 1986; Suylen & Kuenen, 1986).

Im Jahr 2012 wurde *Hyphomicrobium* EG von dem niederländischen Unternehmen Koninklijke DSM N.V. im Rahmen einer Patententwicklung (US-Patent US20150147365A1) sequenziert, die Methanthioloxidase identifiziert und als Zusatzstoff für Produkte zur Reduzierung von Mundgeruch verwendet. Jedoch sind weder die Sequenz des Proteins noch die des Genoms in einer frei zugänglichen Datenbank hinterlegt worden.

## 1.7 Zielsetzungen der Arbeit

Obgleich eine Beteiligung von Hdr-ähnlichen Proteinen am oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von Prokaryoten bereits seit 2009 postuliert wird (Quatrini *et al.*, 2009), steht ein experimenteller Nachweis der *in vivo* Funktion von Hdr-ähnlichen Komplexen noch aus. Um diese große Wissenslücke zu schließen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Alphaproteobakterium *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> als neuer Modellorganismus zur Erforschung der Rolle von Hdr-ähnlichen Proteinen etabliert werden. Dazu musste ein genetisches System für den Organismus etabliert werden, das die Deletion von Genen sowie deren Komplementationen *in trans* ermöglicht. Zudem sollten Protokolle zur Untersuchung des oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels entwickelt werden. Diese Protokolle könnten dann als Grundlage zur phänotypischen Charakterisierung von generierten Mutanten-Stämmen dienen. Zudem galt es, über Proteom-basierte Ansätze weitere Schlüsselenzyme aus dem dissimilatorischen Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium* X zu identifizieren. Um zusätzlich zu den Erkenntnissen aus der Arbeit mit einem Modellorganismus weitere Informationen zu den Hdr-ähnlichen Komplexen auf Ebene der einzelnen Proteine zu erhalten, sollten diese rekombinant in *Escherichia coli* produziert werden. Die aufgereinigten rekombinanten Proteine würden dann durch spektroskopische und kristallographische Methoden weiter analysiert.

Ferner sollte mit *H. denitrificans* EG ein weiterer Organismus aus dem Genus *Hyphomicrobium* hinsichtlich seines dissimilatorischen Schwefelmetabolismus untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

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

### 2.2 Geräte

Tab. 2: Verwendete Laborgeräte einschließlich Herstellerangaben.

Gerätetyp	Hersteller
Äkta Purifier (FPLC)	GE Healthcare (Little Chalfont/Großbritannien)
Anaerobenzelt	Coy Laboratory Products (Grass Lake/USA)
Bandelin Sonopuls UW 2070	Bandelin electronic (Berlin/Deutschland)
BioPhotometer D30 (Nano Drop)	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
Bio-Rad gene pulser II (Elektroporator)	Bio-Rad (München/Deutschland)
GENESYS 20 Visible (Spektrophotometer)	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
Horizon 50 (Horizontale Gelelektrophoresekammer)	Biometra (Göttingen/Deutschland)
Mini Trans-Blot Cell (SDS-PAGE-Kammer)	Bio-Rad (München/Deutschland)
Minitron (Schüttelinkubator)	Infors HT (Bottmingen/Schweiz)
My Cycler (PCR-Maschine)	Bio-Rad (München/Deutschland)
PerkinElmer Clarus 480 (Gaschromatograph)	PerkinElmer (Waltham/USA)
SONIFIER Cell-disruptor B15 (Ultraschall-Desintegrator)	Branson (Danbury/USA)
Specord 210 (UV/Vis-Spektralphotometer)	Analytik Jena (Jena/Deutschland)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München/Deutschland)

### 2.3 Enzyme

Tab. 3: Verwendete Enzyme einschließlich Herstellerangaben.

Enzym	Hersteller
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs (Ipswich/USA)
Deoxyribonuklease I	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA),
Klenow Fragment	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
Lysozym	Roth (Karlsruhe/Deutschland)
Phusion High-Fidelity DNS Polymerase	New England Biolabs (Ipswich/USA)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe/Deutschland)
Q5 High-Fidelity DNS Polymerase	New England Biolabs (Ipswich/USA)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Ipswich/USA)
Ribonuklease A	Roth (Karlsruhe/Deutschland)
T4 DNS Ligase	New England Biolabs (Ipswich/USA)

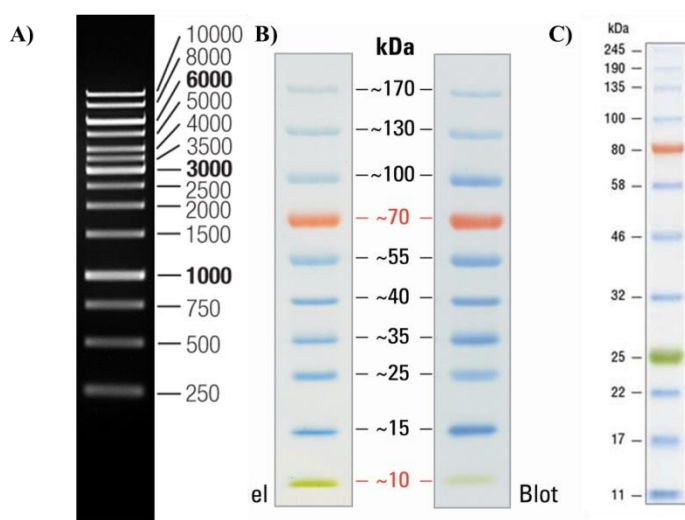
## 2.4 Antikörper und Antiseren

Tab. 4: Verwendete Antikörper und Antiseren einschließlich Herstellerangaben.

Antikörper/Antiserum	Verwendung	Hersteller
Maus $\alpha$ -Liponsäure (13C5)	Monoklonaler Antikörper gegen Liponsäure aus Maus	Santa Cruz Biotechnology (Dallas/USA)
StrepMAB-Classic	Monoklonaler Antikörper gegen Strep-tag II aus Maus	IBA BioTAGnology (Göttingen/Deutschland)
Strep-Tactin-HRP-Konjugat	Strep-Tactin mit gekoppelter HRP-Peroxidase	IBA BioTAGnology (Göttingen/Deutschland)
Ziege $\alpha$ -Kaninchen IgG (ganzes Molekül), HRP-Konjugat	HRP-Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus Ziege	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Ziege $\alpha$ -Maus IgG, HRP-Konjugat	HRP-Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG aus Ziege	Merck (Darmstadt/Deutschland)
$\alpha$ -Digoxigenin-AP	Alkalische Phosphatase konjugierter Antikörper gegen Digoxigenin	(Roche, Mannheim/Deutschland)
$\alpha$ -HdrA-Antiserum	Antiserum aus Kaninchen, die gegen rekombinantes HdrA (Hden_0691) immunisiert wurden	Eurogentec (Lüttich/Belgien)
$\alpha$ -LbpA-Antikörper	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, die gegen zwei Peptide von LbpA (Hden_0696, Peptid 1: WSSVKPTLTPGAEVA, Peptid 2: INDSLVSNPQIANQD) immunisiert wurden	Eurogentec (Lüttich/Belgien)

## 2.5 Standards

Die in Abb. 7 dargestellten Elektrophorese-Größenstandards wurden verwendet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Proteinlösungen wurde ein 2-mg/mL-Standard von Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA) genutzt.



**Abb. 7: Verwendete Elektrophorese-Größenstandards.** A) GeneRuler 1 kB DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Rockford/USA), B) PageRuler Prestained 10–180 kDa (Thermo Fisher Scientific Rockford/USA), C) Color Prestained Protein Standard, Broad Range 11–245 kDa (New England Biolabs Ipswich/USA). Abb. entnommen aus <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0312> (A), <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CCG/product-images/F102591~p.eps-650.jpg> (B) und <https://www.neb.com/products/p7712-color-prestained-protein-standard-broad-range-11-245-kda> (C).

## 2.6 Plasmide

Tab. 5: Verwendete Plasmide einschließlich Quellenangaben und Daten zu auf den Plasmiden kodierten Merkmalen.

Name	Merkmale	Referenz
<b>pASKIBA3+</b>	Ap <sup>R</sup> , <i>tet</i> , Strep@-tag (C-terminal)	IBA BioTAGnology (Göttingen/Deutschland)
<b>pASKIBA3+Δhdr</b>	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , XhoI/XbaI-Fragment von pET-22bΔhdrTc in XhoI/XbaI von pASKIBA3+	diese Arbeit
<b>pASKIBA3+HdenHdr</b>	Ap <sup>R</sup> , XbaI/KpnI-Fragment der PCR auf die Gene Hden_0688 bis Hden_0696 in XbaI/KpnI von pASKIBA3+	diese Arbeit
<b>pASKIBA3+Rif</b>	Ap <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , enthält das Rifampin-Resistenz-Gen <i>arr-2</i> aus <i>S. enterica</i> LT2 Stamm TT23430 (Slechts <i>et al.</i> , 2003) in SmaI von pASKIBA3+	diese Arbeit
<b>pASKIBA3+TK900635</b>	Ap <sup>R</sup> , XbaI/Eco47III-Fragment der PCR auf <i>hp</i> (TK90_0635) in XbaI/Eco47III von pASKIBA3+	diese Arbeit
<b>pBBR1MCS-2</b>	Mob <sup>+</sup> , <i>rep</i> , Km <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
<b>pBBR1MCS-3</b>	Mob <sup>+</sup> , <i>rep</i> , Tc <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
<b>pBBR1p264</b>	Mob <sup>+</sup> , <i>rep</i> , Km <sup>R</sup> , <i>lacZ'</i> , pBBR1MCS-2 (Kovach <i>et al.</i> , 1995) mit der 5'-UTR von Gox0264	Kallnik <i>et al.</i> (2010)
<b>pBBR1p264HdenHdr</b>	Km <sup>R</sup> , DraI/KpnI-Fragment der PCR auf die Gene Hden_0688 bis Hden_0696 in EcoRV/KpnI von pBBR1p264	diese Arbeit
<b>pBBR1p264HdenHdrRif</b>	Km <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Rifampin-Kassette aus pASKIBA3+Rif ausgeschnitten mit SmaI und eingefügt in pBBR1p264HdenHdr via NotI und Klenow fill in	diese Arbeit
<b>pBBR1p264HdenHdrTc</b>	Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , pHP45Ω-Tc Tetracyclin-Kassette ausgeschnitten mit SmaI und eingefügt in pBBR1p264HdenHdr via VspI und Klenow fill in	diese Arbeit
<b>pET-22b(+)</b>	Ap <sup>R</sup> , T7 Promotor, lac Operator, C-terminales His-tag, pelB leader	Merck KGaA (Darmstadt/Germany)
<b>pET-22bΔhdr</b>	Ap <sup>R</sup> , 2,01 kB XhoI/NcoI SOE-Fragment der via PCR amplifizierten Region um Hden_0691 und Hden_0692 mit einer Deletion von 801 Bp im 3'- bzw. 5'-Bereich dieser Gene, in XhoI/NcoI von pET-22b (+)	diese Arbeit
<b>pET-22bΔhdrTc</b>	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , pHP45Ω-Tc Tetracyclin-Kassette in pET-22bΔhdr via HindIII	diese Arbeit
<b>pET-22bΔSQR</b>	Ap <sup>R</sup> , 2,01 kB XbaI/NotI SOE-Fragment der via PCR amplifizierten Region vor Hden_0718 und hinter Hden_0721 mit einer kompletten Deletion der Gene (3767 Bp), in XbaI/NotI von pET-22b (+)	diese Arbeit
<b>pET-22bΔSQRKm</b>	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , pHP45Ω-Km Kanamycin-Kassette in pET-22bΔSQR via BamHI	diese Arbeit
<b>pET-22bΔSQRrif</b>	Ap <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Rifampin-Kassette aus pASKIBA3+Rif ausgeschnitten mit SmaI und eingefügt in pET-22bΔSQR via BamHI und Klenow fill in	diese Arbeit
<b>pET-22bHden0691</b>	Ap <sup>R</sup> , NdeI/HindIII-Fragment der PCR auf <i>hdrA</i> (Hden_0691) in NdeI/HindIII von pET-22b (+)	diese Arbeit
<b>pET-22bHden0692</b>	Ap <sup>R</sup> , NdeI/HindIII-Fragment der PCR auf <i>hp</i> (Hden_0692) in NdeI/HindIII von pET-22b (+)	diese Arbeit



Name	Merkmale	Referenz
<b>pET-22bHdenHdr</b>	Ap <sup>R</sup> , XbaI/NotI-Fragment der PCR auf die Gene Hden_0688 bis Hden_0696 in XbaI/NotI von pET-22b (+)	diese Arbeit
<b>pEX-A258-Knockin</b>	Ap <sup>R</sup> , 2122 Bp Insert mit Teilen der Sequenz von <i>hdrB1</i> (Hden_0690) mit fusioniertem C-terminalem Strep-tag, <i>hdrA</i> (Hden_0691) mit N-terminalem His-tag und NcoI-Schnittstelle in der nicht kodierenden Region zwischen Hden_0690-Hden_0691 in XbaI/HindIII von pEX-A258	diese Arbeit
<b>pHP45Ω-Km</b>	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Fellay <i>et al.</i> (1987)
<b>pHP45Ω-Tc</b>	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	Fellay <i>et al.</i> (1987)
<b>pk18mobsacB</b>	Km <sup>R</sup> , Mob <sup>+</sup> , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZα</i>	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
<b>pk18mobsacBΔhdr</b>	XbaI/PstI-Fragment von pASKIBA3+Δhdr in XbaI/PstI von <i>pk18mobsacB</i>	diese Arbeit
<b>pk18mobsacBΔlbpA</b>	Km <sup>R</sup> , 2,01 kB SphI/XbaI SOE-Fragment der via PCR amplifizierten Region vor und hinter Hden_0696 mit einer Deletion von 435 Bp vom <i>lbpA</i> (Hden_0696) Fragment eingefügt in SphI/XbaI von <i>pk18mobsacB</i>	diese Arbeit
<b>pk18mobsacBΔlbpATc</b>	Tc <sup>R</sup> , pHP45Ω-Tc Tetracyclin-Kassette ausgeschnitten mit SmaI und eingefügt in <i>pk18mobsacBΔlbpA</i> via BglII und Klenow fill in	diese Arbeit
<b>pk18mobsacBΔtsdA</b>	Km <sup>R</sup> , Mob <sup>+</sup> , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZα</i> , 2,01 kB SphI SOE-Fragment der via PCR amplifizierten Region vor und hinter Hden_2748 mit einer Deletion von 996 Bp vom <i>tsdA</i> (Hden_2748) Fragment eingefügt in SphI von <i>pk18mobsacB</i>	diese Arbeit
<b>pk18mobsacBΔtsdATc</b>	Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , pHP45Ω-Tc Tetracyclin-Kassette ausgeschnitten mit SmaI und eingefügt in <i>pk18mobsacBΔtsdA</i> via SmaI	diese Arbeit
<b>pk18mobsacBKnockin</b>	Km <sup>R</sup> , XbaI/HindIII-Fragment von pEX-A258-Knockin in <i>pk18mobsacB</i>	diese Arbeit
<b>pk18mobsacBKnockinTc</b>	Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , pHP45Ω-Tc Tetracyclin-Kassette ausgeschnitten mit SmaI und eingefügt in <i>pk18mobsacBKnockin</i> via AfeI	diese Arbeit

## 2.7 Oligonukleotide

**Tab. 6: Verwendete Oligonukleotide einschließlich Sequenz- und Schmelzpunktangabe.** Die jeweiligen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in den Primern sind fett geschrieben, die schneidende Restriktionsendonukleasen in Klammern angegeben. Alle aufgeführten Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit geplant und von der Firma Eurofins (Nantes, Frankreich) bezogen.

Name	Sequenz von 5' nach 3'	T <sub>m</sub> [°C]
<b>SOE-PCR ΔtsdA</b>		
<b>Fwd 3'ΔtsdA</b>	TCGCTCCAT <b>GAA</b> CTACTTCTGATTCGGCAGCTACTCGC (XmnI)	76
<b>Rev 3'ΔtsdA</b>	TAATA <b>AAG</b> CATGCGCAGCCGCGTCTGCT (SphI)	74
<b>Fwd 5'ΔtsdA</b>	AATTA <b>AAG</b> CATGCCGCGGAATGCGACAGC (SphI)	73
<b>Rev 5'ΔtsdA</b>	GCGAGTAGCTGCCGAAATC <b>AAG</b> CTTTCATGGAGCGACCC (XmnI)	80
<b>SOE-PCR Δhdr</b>		
<b>Fwd 3'Δhdr</b>	TGTGAACAAGCCGAA <b>AAG</b> CTTGAGGAGATTGGAGGCATCGA (HindIII)	78
<b>Rev 3'Δhdr</b>	AAAA <b>AAC</b> CAT <b>GGT</b> GGAAGCGCGGCTC (NcoI)	70
<b>Fwd 5'Δhdr</b>	AAGG <b>CACT</b> CGAGGATCTATGACGACG (XhoI)	69
<b>Rev 5'Δhdr</b>	GCCTCCAATCTCCT <b>CAAG</b> CTTCCGGCTGTTCACACTATC (HindIII)	76

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Tm [°C]
<b>SOE-PCR <math>\Delta</math>sqr</b>		
Fwd_3' $\Delta$ sqr	AAAGCGGCCGCATCGACTTTCAGGAAGCT (NotI)	75
Rev_3' $\Delta$ sqr	ACCCGGAATTTTATCGGATCCTTTTGGGGAACCAGAGGCAG (BamHI)	77
Fwd_5' $\Delta$ sqr	AAATCTAGAAGCGATTCTTCGGCTTGAGC (XbaI)	69
Rev_5' $\Delta$ sqr	TCTGGTTCCTCCAAAAGGATCCGATAAAAATTCCGGGTTTGTT (BamHI)	75
<b>SOE-PCR <math>\Delta</math>lbpA</b>		
Fwd_3' $\Delta$ lbpA	AAAATCTAGAGCGATCGCTCGATGGAAAA (XbaI)	68
Rev_3' $\Delta$ lbpA	CAATATCGGAGTGAAGTATGCCCGGGTGAGCTTCTACGGCCGCTCTTA (SmaI)	80
Fwd_5' $\Delta$ lbpA	AAAAGCATGCCACCAAGGGACGGCTCGCT (SphI)	77
Rev_5' $\Delta$ lbpA	TAAGAGCGGCCGTAGAAGCTCACCCGGGCATAGTTCACTCCGATATTG (SmaI)	80
<b>Klonierung Hden_0691</b>		
Fwd_Hden0691	AAATTTTATATGAAGCCGATCCTGG (NdeI)	63
Rev_Hden0691	AAATTTAAGCTTTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCACTCGGCCGCTCCCTC (HindIII)	82
<b>Klonierung Hden_0692</b>		
Fwd_Hden0692	TGGGTCATATGGTGCTCAGCGTAGCAAC (NdeI)	72
Rev_Hden0692	ACAAAAAGCTTTTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAATGAATATGCTTGATCGCGA (HindIII)	79
<b>Klonierung TK90_0635</b>		
Fwd_TK90_0635	TGCGGTCTAGATGCGCTGGTTTC (XbaI)	69
Rev_TK90_0635	TCGTTCAAGCGCTATGCAGCGACG (Eco47III)	71
<b>Klonierung Hden_0688- Hden_0696</b>		
Fwd_HdenHdr	AAAAATTTAAAGGAGGTGGCATTGGCCGA (DraI)	69
Fwd_HdenHdrII	AAAAATCTAGAGGAGGTGGCATTGGCCGA (XbaI)	71
rev_HdenHdr	AAAAGGTACCTCAGCCGCAACCTGCGAAA (KpnI)	73
Rev_HdenHdrStrep	TTTTGGTACCTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCCGCAACCTGCGAAACCTT (KpnI)	83
Rev_HdenHdrStrepII	TTTTGCGGCCGCTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCCGCAACCTGCGAAACCTT (NotI)	86
<b>Klonierung <math>rif^R</math></b>		
Fwd_rifR	AAAAAACCCGGGCACCAACACCCCCCAA (SmaI)	76
Rev_rifR	AAAAAACCCGGGCACACAACCACACCACA (SmaI)	74
<b>Klonierung <math>tet^R</math></b>		
Fwd_tetR	TCCTAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATC (HindIII)	63
Fwd_tetRII	TTAAACCCGGGTAAGAAACCATATTATC (SmaI)	63
Rev_tetR	TTTTAAGCTTGTCTGTCAGCTGC (HindIII)	68
<b>PCR zur Genotypisierung</b>		
Rev_tetR_Ko	CTCCGCAAGAATTGATTGGCTC	64
Fwd_Genotyp_EG	AACGGCGTTACGTCCAACCTATCG	67
Rev_Genotyp_EG	CCAGGCACCACAAGAAA	58
Fwd_Knockin_screen	TGATGAGACGGATCAGACGAGCTG	67
Rev_Knockin_screen	TCATCGCGGCTGCATTGGCCT	71
Fwd_degen_HdrB1	CTTTGGCATCACAAGAGCTG	61
Rev_degen_HdrB1	ATCCACTGGTTCTTATCGA	57
Fwd_php45Km	ACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTC	69
Rev_php45Km	GTCAAGAAGGCGATAGAAGGC	62

## 2.8 Bakterienstämme

Tab. 7: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstämme	Relevanter Genotyp oder Beschreibung	Referenz
<b>Escherichia coli-Stämme</b>		
<i>E. coli</i> NEB 10β	$\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta\text{lacX74 galK16 galE15 e14-}$ $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 recA1 relA1 endA1}$ <i>nupG rpsL</i> (Sm <sup>R</sup> ) <i>rph spoT1</i> $\Delta(\text{mrr-}$ <i>hsdRMS-mcrBC)</i>	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>+</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen (Darmstadt/Deutschland)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) $\Delta\text{iscR}$	F <sup>+</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> $\Delta\text{iscR}::\text{Kan}$ (DE3)	Akhtar & Jones (2008)
<b>Hyphomicrobium denitrificans-Stämme</b>		
<i>H. denitrificans</i> ATCC 51888 <sup>T</sup>	Cm <sup>R</sup> , Wildtyp	Urakami <i>et al.</i> (1995)
<i>H. denitrificans</i> Sm200	Sm <sup>R</sup> , Streptomycin resistente Spontanmutante von <i>H. denitrificans</i> ATCC 51888 <sup>T</sup>	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> $\Delta\text{hdr}$	Sm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Hden_0691- Hden_0692:: $\Omega\text{Tet}$ (in Sm200)	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> $\Delta\text{hdr}\Delta\text{sqr}$	Sm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Hden_0718- Hden_0721::Rif (in $\Delta\text{hdr}$ )	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> $\Delta\text{hdr}^+$	Sm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup> , Komplementation von <i>H. denitrificans</i> $\Delta\text{hdr}$ mit dem Plasmid pBBR1p264HdenHdrRif	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> $\text{hdr}^+$	Tc <sup>R</sup> , <i>H. denitrificans</i> ATCC 51888 <sup>T</sup> mit dem Plasmid pBBR1p264HdenHdrTc	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> $\Delta\text{lbpA}$	Sm <sup>R</sup> , <i>in frame</i> Deletion von <i>lbpA</i> (Hden_0696) in <i>H. denitrificans</i> Sm200	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> $\Delta\text{tsdA}$	Sm <sup>R</sup> , <i>in frame</i> Deletion von <i>tsdA</i> (Hden_2748) in <i>H. denitrificans</i> Sm200	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> knock-in	Sm <sup>R</sup> , <i>hdrB1</i> (Hden_0690) mit fusioniertem C-terminalem Strep-tag, <i>hdrA</i> (Hden_0691) mit N-terminalem His-tag und NcoI-Schnittstelle in der nicht-kodierenden Region zwischen Hden_0690-Hden_0691 durch <i>in frame</i> Rekombination mit dem Plasmid pk18 <i>mobsacB</i> knockinTc	diese Arbeit
<i>H. denitrificans</i> EG	Cm <sup>R</sup> , Wildtyp	Suylen & Kuenen (1986)

## 2.9 Kits

Tab. 8: Verwendete Kits.

Name	Verwendung	Hersteller
First-DNA all-tissue Kit	Extraktion von genomischer DNS für Southern-Blot-Experimente	GEN-IAL GmbH (Troisdorf/Deutschland)
GeneJET Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Bestimmung des Proteingehalts von Proteinlösungen	Thermo Fisher Scientific (Rockford/USA)
SignalFire ECL reagent	Chemolumineszenz-basierende Immunodetektion einzelner Proteine	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
Simplex Easy DNA-Extraktionskit	Extraktion von genomischer DNS für PCR	GEN-IAL GmbH (Troisdorf/Deutschland)

## 2.10 Software und Internet-Tools

Tab. 9: Verwendete Software und Internet-Tools.

Software und Internet-Tool	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems
Adobe Photoshop	Adobe Systems
AMPHIPASEEK	<a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_amphipaseek.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_amphipaseek.html</a>
BIOCYC	<a href="http://biocyc.org/">http://biocyc.org/</a>
BioEdit	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a>
BRENDA	<a href="https://www.brenda-enzymes.org/">https://www.brenda-enzymes.org/</a>
Citavi 5	Swiss Academic Software
Clone Manger 9	Sci-Ed Software
Clustal Omega	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
DISULFIND	<a href="http://disulfind.dsi.unifi.it/">http://disulfind.dsi.unifi.it/</a>
EMBL-EBI	<a href="https://www.ebi.ac.uk/">https://www.ebi.ac.uk/</a>
EMBOSS Needle	<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/</a>
ExPASy	<a href="https://www.expasy.org/">https://www.expasy.org/</a>
GeneDoc	<a href="http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpc/genedoc-readme.html">http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpc/genedoc-readme.html</a>
GNU Image Manipulation Program 2.6	GNU General Public License
Inkscape	Inkscape Community
IrfanView	<a href="http://www.irfanview.de/">http://www.irfanview.de/</a>
KEGG Genome	<a href="http://www.genome.jp/kegg/genome.html">http://www.genome.jp/kegg/genome.html</a>
MEGA 6	<a href="http://www.megasoftware.net/">http://www.megasoftware.net/</a>
MOTIF Search	<a href="http://www.genome.jp/tools/motif/">http://www.genome.jp/tools/motif/</a>
NCBI Genome	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome</a>
NCBI Standard Protein BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins</a>
Office 2010	Microsoft
OperonDB	<a href="http://operondb.cbcb.umd.edu/cgi-bin/operondb/operons.cgi">http://operondb.cbcb.umd.edu/cgi-bin/operondb/operons.cgi</a>
Origin 8	Originlab
Pfam	<a href="https://pfam.xfam.org/">https://pfam.xfam.org/</a>
Pfam	<a href="http://pfam.sanger.ac.uk/">http://pfam.sanger.ac.uk/</a>
Phobius	<a href="http://phobius.sbc.su.se/">http://phobius.sbc.su.se/</a>
PRED-TAT	<a href="http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/">http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/</a>
ProtParam	<a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a>
PYMOL	<a href="https://pymol.org/2/">https://pymol.org/2/</a>
R	<a href="https://www.r-project.org/">https://www.r-project.org/</a>
SignalP 4.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
SMART	<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1">http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1</a>
SWISS-MODEL	<a href="http://swissmodel.expasy.org">http://swissmodel.expasy.org</a>
TatP	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/</a>
TatP 1.0 Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/</a>
TMHMM Server v. 2.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
TMpred	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>
Unicorn 5.0	GE Healthcare
UniProt	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
WinASPECT 2.2	Analytik Jena

### 3 Methoden

#### 3.1. Mikrobiologische Methoden

##### 3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Der Organismus *Escherichia coli* wurde für allgemeine Klonierungsarbeiten und für die Amplifikation von fertigen Plasmiden (*E. coli* NEB 10 $\beta$ , Tab. 7) sowie für die rekombinante Produktion heterologer Proteine (*E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ *iscR*, Tab. 7) genutzt.

##### 3.1.2 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

Um *E. coli* eine chemische Kompetenz zu verleihen, wurde die Methode von Dagert und Ehrlich (Dagert & Ehrlich, 1979) verwendet. Eine 70-mL-Hauptkultur (2YT-Medium, 10 g/L Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7) wurde 1 zu 100 mit einer  $\mu$ N-Vorkultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen bei 4 °C und 4000 g für 10 min pelletiert, in 10,5 mL eiskaltem Puffer (70 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>) resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Der zuvor beschriebene Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das gewonnene Pellet in 3,5 mL Puffer resuspendiert. Im Anschluss an eine erneute Inkubation auf Eis (40 min) wurde die Zellsuspension mit zusätzlichen 876  $\mu$ L Glycerin versetzt, eine geeignete Aliquotierung vorgenommen und die Aliquots bei -70 °C gelagert.

##### 3.1.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Das Einbringen von Plasmiden in *E. coli* erfolgte durch die Transformation chemisch kompetenter Zellen mittels der Hitzeschock-Methode (Hanahan, 1983). 100  $\mu$ L chemisch kompetente Zellen wurden mit 1  $\mu$ L Plasmid-DNS oder einem kompletten 20- $\mu$ L-Ligationsansatz zusammen 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock bei 42 °C (20–60 sek) und einer erneuten Inkubation auf Eis für 5 min. Nachfolgend wurde der Transformationsansatz mit 900  $\mu$ L LB-Medium (10 g/L Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,5) aufgefüllt und für mindestens 60 min bei 37 °C inkubiert. In Abhängigkeit von den auf den Plasmiden kodierten Resistenzen wurden die Zellsuspensionen nach Abschluss der Inkubation in geeigneten Verdünnungen auf LB-Platten (LB-Medium mit 1,5 % (m/v) Agar), die die gewünschten Antibiotika enthielten, ausplattiert. Antibiotika wurden in den nachfolgenden Konzentrationen verwendet: Ampicillin (100  $\mu$ g/mL), Chloramphenicol (25  $\mu$ g/mL), Gentamicin (10  $\mu$ g/mL), Kanamycin (50  $\mu$ g/mL), Rifampicin (50  $\mu$ g/mL), Streptomycin (50  $\mu$ g/mL), Tetracyclin (15  $\mu$ g/mL).

##### 3.1.4 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Das Gen TK90\_0635 wurde heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Hierfür wurde das Plasmid pASKIBA3+TK900635 (Tab. 5) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und eine  $\mu$ N-Vorkultur (maximal 16 h) in LB-Medium (3.1.3, mit 100  $\mu$ g/mL Ampicillin) bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Mittels der Vorkulturen wurden Hauptkulturen (1 L LB-Medium in 2-L-Erlenmeyer-Kolben mit 100  $\mu$ g/mL Ampicillin) 1%ig angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 inkubiert. Nachfolgend wurden die Kulturen mit 200 ng/mL AHT induziert und bei 25 °C und 90 rpm  $\mu$ N weiter

inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte die Zellernte bei 11.000 g und 4 °C für 12 min. Die resultierenden Zellpellets wurden wie unter 3.4.1 näher beschrieben weiterverarbeitet.

Das Gen Hden\_0692 wurde heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Hierfür wurde das Plasmid pET-22bHden0692 (Tab. 5) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und eine üN-Vorkultur (maximal 16 h) in LB-Medium (3.1.3, mit 100 µg/mL Ampicillin) bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Mittels der Vorkulturen wurden Hauptkulturen (1,4 L LB-Medium in 2-L-Erlenmeyer-Kolben mit 100 µg/mL Ampicillin) 1%ig angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 inkubiert. Nachfolgend wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert und bei 25 °C und 90 rpm üN weiter inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte die Zellernte bei 11.000 g und 4 °C für 12 min. Die resultierenden Zellpellets wurden wie unter 3.4.1 näher beschrieben weiterverarbeitet.

Das Gen Hden\_0691 wurde zur Generierung eines Antiserums heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert. Hierfür wurde das Plasmid pET-22bHden0691 (Tab. 5) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und eine üN-Vorkultur (maximal 16 h) in LB-Medium (3.1.3, mit 100 µg/mL Ampicillin) bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Mittels der Vorkulturen wurden Hauptkulturen (1,6 L LB-Medium in 2-L-Erlenmeyer-Kolben mit 100 µg/mL Ampicillin) 0,5%ig angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 inkubiert. Nachfolgend wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert und bei 25 °C und 90 rpm üN weiter inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte die Zellernte bei 11.000 g und 4 °C für 12 min. Die resultierenden Zellpellets wurden wie unter 3.4.1 näher beschrieben weiterverarbeitet.

Für die Kristallisation sowie spektroskopische Experimente wurde Hden\_0691 in *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ *iscR* (Akhtar & Jones, 2008) rekombinant produziert. Hierfür wurden frisch mit dem Plasmid pET-22bHden0691 transformierte Zellen als Vorkultur in LB-Medium (50 mL in 100-mL-Erlenmeyer-Kolben, mit 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin und 100 mM MOPS-Puffer pH 7,4) üN (maximal 16 h) bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Ausgehend von den Vorkulturen erfolgte die Beimpfung der Hauptkulturen (5%ig, 950 mL LB-Medium in 2-L-Erlenmeyer-Kolben mit 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin, 25 mM Glucose, 2 mM Ammoniumeisencitrat und 100 mM MOPS-Puffer pH 7,4), die weiterführend bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4–0,6 inkubiert wurden. Nachfolgend wurden die Kulturen mit 0,1 mM IPTG induziert und zusätzlich mit 25 mM Natriumfumarat und 0,5 mM L-Cystein versetzt. Im Anschluss wurden die supplementierten Suspensionen auf 0,5-L-Erlenmeyer-Kolben aufgeteilt und für 15 min in einem Anaerobenzelt (98 % Stickstoff, 2 % Wasserstoff) unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kolben im Anaerobenzelt gasdicht verschlossen und für 48–72 h bei 16 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit erfolgte die Zellernte anaerob bei 11.000 g und 4 °C für 12 min. Die resultierenden Zellpellets wurden wie unter 3.4.1 näher beschrieben weiterverarbeitet.

Die heterologe Produktion ganzer Hdr-ähnlicher Komplexe (Hden\_0688-Hden\_0696) unter Verwendung der Plasmide pASKIBA3+HdenHdr, pET-22bHdenHdr und pBBR1p264HdenHdrTc erfolgte gemäß dem zuvor beschriebenen Protokoll mit kleinen Modifikationen. Im Fall der Expression der Proteine ausgehend von pASKIBA3+HdenHdr erfolgte die Induktion mit 200 ng/mL AHT. Bei der Verwendung von pBBR1p264HdenHdrTc als Expressionsplasmid enthielten Vor- und Hauptkultur Tetracyclin (15 µg/mL) anstelle von Ampicillin und es erfolgte keine Induktion der Kulturen.

### 3.1.5 Kultivierung von *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup>

Der Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> wurde in verschiedenen Minimalmedien kultiviert (Tab. 10). In allen Fällen erfolgte die Kultivierung bei 30 °C und im Fall von Flüssigkulturen bei 180 rpm oder 220 rpm.

**Tab. 10: Verwendete Medien zur Kultivierung von *H. denitrificans*.** Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (m/v) Agar zugesetzt. Zudem wurde im Fall von Medium mit Methylamin Hydrochlorid als Kohlenstoffquelle die Menge auf 3,4 g/L erhöht. Im Rahmen einiger Wachstumsversuche wurden die Medien zusätzlich vor dem Autoklavieren mit 100 mM MOPS-Puffer (pH 7,2) versetzt.

Name des Mediums	Zusammensetzung	Referent
<b>Hyphomicrobium Medium</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,00 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,20 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,50 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,55 g/L Spurenelement-Lösung 2 mL/L Methylamin Hydrochlorid 0,70 g/L pH 7,20	Meiberg & Harder (1978)
<b>Hyphomicrobium Medium 0-Medium</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,00 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,20 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,50 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,55 g/L Spurenelement-Lösung 2 mL/L pH 7,20	diese Arbeit
<b>0-Medium</b>	NH <sub>4</sub> Cl 2,00 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,20 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,50 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,55 g/L Spurenelement-Lösung 2 mL/L pH 7,2	diese Arbeit
<b>optimiertes 0-Medium</b>	NH <sub>4</sub> Cl 1,00 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,20 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 0,50 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,55 g/L Spurenelement-Lösung 2 mL/L pH 7,2	diese Arbeit
<b>Spurenelement-Lösung</b>	Na <sub>2</sub> -EDTA 5,0 g/L ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 2,2 g/L CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,54 g/L MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 0,5 g/L FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,5 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 0,1 g/L CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O 0,15 g/L CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,16 g/L pH 6	Modifiziert nach Viahniac & Santer (1957)

Wurde *H. denitrificans* mit Methylamin Hydrochlorid oder Dimethylamin als Kohlenstoffquelle kultiviert, so wurden diese Substrate dem Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt. Sämtliche

anderen Substrate (Methanol, Ethanol, DMSO, DMS, Acetat) wurden entweder separat autoklaviert oder sterilfiltriert und erst kurz vor der Verwendung dem sterilen Medium in den gewünschten Konzentrationen hinzugefügt. Wurden die Medien mit Antibiotika (Tab. 11) supplementiert, erfolgte dies stets nach dem Autoklavieren.

Tab. 11: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentrationen Antibiogramm [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Konzentrationen normale Kultivierung [ $\mu\text{g/mL}$ ]
Ampicillin	rH <sub>2</sub> O	10/25/100/250/500	100
Chloramphenicol	Isopropanol	100	25/50
Erythromycin	Isopropanol	10/25/100/250/500	/
Gentamicin	rH <sub>2</sub> O	10/25/100/250/500	/
Kanamycin	rH <sub>2</sub> O	10/25/100/250/500	50
Nalidixinsäure	rH <sub>2</sub> O	10/25/100/250/500	/
Neomycin	rH <sub>2</sub> O	10/25/100/250/500	/
Rifampicin	DMSO	10/25/100/250/500	50
Streptomycin	rH <sub>2</sub> O	/	200
Tetracyclin	Isopropanol	5/10/25/50/100	12,5/15/25
Trimethoprim	DMSO	10/25/100/250/500	/

Zur Erstellung eines Antibiogramms wurden geeignete Verdünnungen von *H. denitrificans*-Kulturen auf Platten mit Hyphomicrobium Medium mit 3,4 g/L Methylamin Hydrochlorid (Tab. 10) und den gewünschten Antibiotika-Konzentrationen ausplattiert. Hierbei enthielten sämtliche Platten 100  $\mu\text{g/mL}$  Chloramphenicol und eine variable Konzentration eines anderen Antibiotikums (Tab. 11). Pro Antibiotika-Konzentration wurden zwei biologische Replikate betrachtet.

### 3.1.6 Screening nach metabolisierbaren schwefelhaltigen Substraten für *H. denitrificans*

Zur Überprüfung, ob *H. denitrificans* verschiedene schwefelhaltige Substrate (Tab. 12) metabolisieren kann, wurden Kulturen (70 mL Hyphomicrobium Medium in einem 100-mL-Erlenmeyer-Kolben) bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Die Kulturen wurden zu diesem Zweck auf 0,7 g/L Methylamin Hydrochlorid vorgezogen und nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase mit 10 mM der zu testenden Substrate versetzt.

Tab. 12: Getestete schwefelhaltige Substrate für *H. denitrificans*.

Substrat	Summenformel
2-Mercaptoethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS
Ethylthioacetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> OS
Kaliumthioacetat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KOS
Methyl(methylthio)acetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> S
S-Methylthioacetat	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OS
Thioacetamid	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NS
Thioglycolsäure	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S
Trimethylsulfonium	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> S <sup>+</sup>

### 3.1.7 Wachstumsversuche mit Dimethylsulfid

Die Kultivierung von *H. denitrificans* mit Dimethylsulfid erfolgte in gasdichten Serumflaschen. Hierbei wurden entweder 100-mL-Flaschen mit 25 mL Medium oder 500-mL-Flaschen mit 100 mL



Medium zur Kultivierung verwendet. Das verwendete Medium variierte hierbei zwischen Hyphomicrobium Medium 0-Medium, 0-Medium oder optimiertem 0-Medium (Tab. 10). In Abhängigkeit vom Genotyp der kultivierten *H. denitrificans*-Zellen wurde das sterile Medium vor der Inokulation mit geeigneten Antibiotika supplementiert. Die Inokulation erfolgte entweder aus Kryokulturen oder Vorkulturen. Bei der Verwendung von Vorkulturen wurden diese zunächst pelletiert und in einem geringen Volumen von optimiertem 0-Medium resuspendiert. Die verwendeten Zellsuspensionen wurden auf die gleiche OD<sub>600nm</sub> eingestellt. Ausgehend von diesen Zellsuspensionen wurden dann die Hauptkulturen auf eine einheitliche OD<sub>600nm</sub> beimpft. DMS wurde den Kulturen in Form einer Stammlösung hinzugefügt. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 100-mL-Serumflaschen mit 100 mL Hyphomicrobium Medium 0-Medium, 0-Medium oder optimiertem 0-Medium (Tab. 10) befüllt, gasdicht verschlossen und autoklaviert. Dem sterilen Medium wurden im Anschluss bei Bedarf Antibiotika hinzugefügt sowie reines DMS zum Einstellen einer DMS-Konzentration von 30 mM oder 40 mM. Derartig hergestellte DMS-Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert. DMS wurde nur von kalten Stammlösungen zur Beimpfung von Wachstumsversuchen entnommen. Die Wachstumsversuche erfolgten grundsätzlich bei 30 °C und 180 rpm.

Für quantitative Wachstumsversuche auf DMS wurden 500-mL-Serumflaschen mit 100 mL optimiertem 0-Medium (inkl. 100 mM MOPS pH 7,2) verwendet. Das Medium wurde mit 200 µg/mL Streptomycin oder 25 µg/mL Chloramphenicol sowie dem Genotyp der zu kultivierenden Zellen entsprechenden weiteren Antibiotika versetzt, ausgehend von üWE-Vorkulturen auf eine OD<sub>600nm</sub> von etwa 0,005–0,01 angeimpft und mit 0,6 mM DMS angereichert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 30 °C und 180 rpm. Zur Dokumentation von Wachstum und DMS-Oxidation wurden Proben genommen und weiterführend spektroskopisch untersucht (3.5) sowie die DMS-Konzentration in der Gasphase gemessen (3.4.4).

### 3.1.8 Wachstumsversuche mit Thiosulfat

Wachstumsversuche mit Thiosulfat wurden in 500-mL-Erlenmeyer-Kolben mit 200 mL Hyphomicrobium Medium, Hyphomicrobium 0-Medium, 0-Medium oder optimiertem 0-Medium (Tab. 10) durchgeführt. Hierbei wurden die Medien teilweise mit 100 mM MOPS (pH 7,2) supplementiert. Die Inokulation erfolgte, wie zuvor (3.1.7) beschrieben. Als Kohlenstoffquelle dienten bei Wachstumsversuchen mit Thiosulfat entweder 3,4 g/L Methylamin Hydrochlorid oder 24,41 mM Methanol. In Abhängigkeit vom Genotyp der kultivierten *H. denitrificans*-Zellen wurde das sterile Medium wie zuvor beschrieben (3.1.7) vor der Inokulation mit geeigneten Antibiotika supplementiert. Vor der Inokulation der Kulturen wurde dem Medium steriles Thiosulfat in Form einer 1 M-Stammlösung bis zum Erreichen der gewünschten Thiosulfat-Konzentration hinzugefügt. Die Wachstumsversuche erfolgten grundsätzlich bei 30 °C und 220 rpm.

Für quantitative Wachstumsversuche auf Thiosulfat wurden 500-mL-Erlenmeyer-Kolben mit 200 mL optimiertem 0-Medium (inkl. 100 mM MOPS pH 7,2) verwendet. Das Medium wurde mit 200 µg/mL

Streptomycin oder 25 µg/mL Chloramphenicol sowie dem Genotyp der zu kultivierenden Zellen entsprechenden weiteren Antibiotika versetzt. Als Kohlenstoffquelle dienten 24,41 mM Methanol. Ausgehend von üWE-Vorkulturen (mit 24,41 mM Methanol und 2,5 mM Thiosulfat) wurden die Hauptkulturen auf eine OD<sub>600nm</sub> von etwa 0,005–0,01 angeimpft und mit 2,5 mM Thiosulfat versetzt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 30 °C und 220 rpm. Zur Dokumentation von Wachstum und Thiosulfat-Oxidation wurden Proben genommen und weiterführend spektroskopisch untersucht (3.5.3, 3.5.4, 3.5.6).

### 3.1.9 Herstellung von elektrisch kompetenten *H. denitrificans*

Die Herstellung von elektrisch kompetenten *H. denitrificans*-Zellen zur Elektroporation erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Borodina *et al.* (2004), das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde. *H. denitrificans* wurde in 400 mL 0-Medium oder optimiertem 0-Medium mit 24,41 mM Methanol und 25 µg/mL Chloramphenicol in einem 2-L-Erlenmeyer-Kolben bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 angezogen. Nachfolgend wurden die Zellen bei 4 °C und 4.000 g für 10 min geerntet und zwei Mal mit eiskaltem sterilen rH<sub>2</sub>O gewaschen (4.000 g, 4 °C, 10 min), gefolgt von einem Waschschrift mit 10%igem (v/v) eiskaltem Glycerol (4.000 g, 4 °C, 10 min). Das resultierende Pellet wurde in 800 µL 10%igem (v/v) eiskaltem Glycerol resuspendiert und in 50 µL Aliquots bei -70 °C für maximal drei Monate gelagert.

### 3.1.10 Elektroporation von elektrisch kompetenten *H. denitrificans*

Zum Einbringen von Plasmiden in elektrisch kompetente *H. denitrificans*-Zellen wurden die Zellen und die Plasmid-Lösung (eluiert in Wasser, DNS-Menge bis 500 ng in einem maximalen Volumen von 10 µL) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine eiskalte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite, Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld/Deutschland) überführt und sofort mit einem Bio-Rad gene pulser II (Bio-Rad, München/Deutschland) elektroporiert (Einstellungen: 2,4 kV und 200 Ω bei einer Kapazität von 25 µF). Zur Regeneration wurden die Zellen mit 900 µL 0-Medium oder optimiertem 0-Medium mit 24,41 mM Methanol versetzt und für bis zu 6 h bei 30 °C in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß regeneriert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen in einer dezimalen Verdünnungsreihe (bis 1:1000) auf Agarplatten mit 0-Medium oder optimiertem 0-Medium mit 24,41 mM Methanol und 25 µg/mL Chloramphenicol sowie geeigneten Antibiotika zur Selektion auf die auf den Plasmiden kodierten Resistenzgenen ausplattiert. Hierfür wurden von jeder Verdünnungsstufe 100 µL Zellsuspension verwendet. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C. Hierbei wurden die Platten jeweils einzeln mit Parafilm und zusätzlich mit Alufolie umwickelt. Als Kontrolle wurde bei jeder Elektroporation ein Aliquot Zellen ohne Plasmid-Lösung elektroporiert und in den nachfolgenden Schritten gleich behandelt.

### 3.1.11 Generierung von Mutanten in *H. denitrificans*

Zur gerichteten Mutagenese von *H. denitrificans* wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zum einen wurden markerlose *in frame* Deletionen von Genen im Genom vorgenommen bzw.

Abschnitte im Genom markerlos *in frame* ersetzt. Zum anderen wurden DNS-Abschnitte im Genom durch Resistenzmarker ausgetauscht. Die zuerst genannte Methode fand Anwendung bei der Generierung der Stämme *H. denitrificans*  $\Delta$ lbpA, *H. denitrificans*  $\Delta$ tsdA und *H. denitrificans* knock-in. Hierfür wurden elektrisch kompetente *H. denitrificans* Sm200 mit dem Plasmid pk18mobsacB $\Delta$ lbpATc elektroporiert und auf Platten mit optimiertem 0-Medium (24,41 mM Methanol, 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol, 15  $\mu$ g/mL Tetracyclin) ausplattiert. Von angewachsenen Klonen wurde mittels des Simplex Easy DNA-Extraktionskits gDNS extrahiert und der Genotyp via PCR verifiziert. Erfolgreich verifizierte Single-Crossover-Mutanten wurden für 72 h in Flüssigkultur (optimiertes 0-Medium, 24,41 mM Methanol, 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol) kultiviert und anschließend in einer dezimalen Verdünnungsreihe (bis 1:1000) in Volumina von 100  $\mu$ L auf Platten (optimiertes 0-Medium mit 24,41 mM Methanol, 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol, 10 % (m/v) Saccharose) ausplattiert. Aus angewachsenen Klonen wurde mittels des Simplex Easy DNA-Extraktionskits gDNS extrahiert und der Genotyp via PCR verifiziert. Die Generierung von *H. denitrificans*  $\Delta$ tsdA erfolgte wie zuvor beschrieben auf Basis des Plasmides pk18mobsacB $\Delta$ tsdA und die Generierung von *H. denitrificans* knock-in auf Basis des Plasmides pk18mobsacBKnockinTc.

Zur Generierung von *H. denitrificans*  $\Delta$ hdr und *H. denitrificans*  $\Delta$ hdr $\Delta$ sqr wurde ein abweichendes Protokoll verwendet. Zunächst wurde das Plasmid pET-22b $\Delta$ hdrTc in elektrisch kompetente *H. denitrificans* Sm200 elektroporiert, die auf Platten mit 0-Medium (24,41 mM Methanol, 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol, 15  $\mu$ g/mL Tetracyclin) ausplattiert wurden. Angewachsene Klone wurden auf 0-Medium-Platten (24,41 mM Methanol, 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol) mit 100  $\mu$ g/mL Ampicillin überführt. Klone, die auf Tetracyclin wuchsen, nicht jedoch auf Ampicillin, wurden als putative Doppel-Crossover-Mutanten angesehen. Von diesen wurde mittels des Simplex Easy DNA-Extraktionskits gDNS extrahiert und der Genotyp via PCR bestimmt. Der Genotyp von erfolgreich verifizierten Doppel-Crossover-Mutanten wurde zusätzlich durch einen Southern Blot abgesichert. Zur Generierung von *H. denitrificans*  $\Delta$ hdr $\Delta$ sqr wurden elektrokompetente *H. denitrificans*  $\Delta$ hdr mit dem Plasmid pET-22b $\Delta$ SQRRif elektroporiert und auf Platten mit 0-Medium (24,41 mM Methanol, 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol, 50  $\mu$ g/mL Rifampicin) ausplattiert. Angewachsene Klone wurden auf 0-Medium-Platten (24,41 mM Methanol, 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol) mit 100  $\mu$ g/mL Ampicillin überführt. Klone, die auf Rifampicin wuchsen, nicht jedoch auf Ampicillin, wurden als putative Doppel-Crossover-Mutanten angesehen. Von diesen wurde mittels des Simplex Easy DNA-Extraktionskits gDNS extrahiert und der Genotyp via PCR bestimmt. Der Genotyp von erfolgreich verifizierten Doppel-Crossover-Mutanten wurde zusätzlich durch einen Southern Blot abgesichert.

### 3.1.12 Konservierung von *H. denitrificans* als Kryokulturen

Zur langfristigen Konservierung von *H. denitrificans* wurden 50-mL-Kulturen (0-Medium oder optimiertes 0-Medium mit 24,41 mM Methanol und 25  $\mu$ g/mL Chloramphenicol) in 100-mL-Erlenmeyer-Kolben bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von mindestens 0,4 wurden die Zellen bei 4.000 rpm für 10 min geerntet. Das resultierende Pellet wurde

zunächst in 500 µL 0-Medium oder optimiertem 0-Medium resuspendiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension mit 500 µL 80%igem (v/v) Glycerol durchmischt und geeignete Aliquots der Zellen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -70 °C dauerhaft gelagert.

### **3.1.13 Kultivierung von *Hyphomicrobium* EG**

Die Kultivierung von *Hyphomicrobium* EG erfolgte in 0-Medium mit 100 mM MOPS pH 7,2 in Erlenmeyer-Kolben bei 30 °C und 180 rpm. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium entweder vor dem Autoklavieren Dimethylamin oder alternativ nach dem Autoklavieren DMSO (separat autoklaviert) in den gewünschten Konzentrationen zugesetzt. Die Kultivierung auf Festnährmedien erfolgte ebenfalls bei 30 °C auf Agarplatten (1,5 % (m/v) Agar).

## **3.2. Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Genamplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion**

Für die gerichtete Amplifikation von DNS-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986) zur Genotypisierung oder zur Klonierung von Genen wurden PCRs in einem My Cycler (Bio-Rad, München/Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden die in Tab. 6 aufgeführten Oligonukleotide als Primer verwendet. Als Polymerase fungierte die Phusion High-Fidelity DNS Polymerase oder die Q5 High-Fidelity DNS Polymerase (beide von New England Biolabs, Ipswich/USA). Die Durchführung der PCRs erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

### **3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNS gemäß ihrer Länge wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt (Maniatis *et al.*, 1982). Aufzutragende Proben wurde mit 6 x Ladepuffer (New England Biolabs, Ipswich/USA) versetzt. 1- bis 1,5%ige (m/v) Agarosegele in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA) wurden in Horizon-50-Gelkammern (Biometra, Göttingen/Deutschland) bei 90 V für 1 h laufen gelassen. Die Visualisierung der aufgetrennten DNS-Fragmente erfolgte durch Inkubation in GelRed-Puffer (rH<sub>2</sub>O mit 60 µL GelRed/200 mL, Biotium, Köln/Deutschland) und anschließende Begutachtung der Gele unter UV-Licht in einem Gel iX Imager (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen/Deutschland). Zur Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen wurde das GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA) gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

### **3.2.3 Gene Splicing by Overlap Extension**

Zur gerichteten Mutagenese von spezifischen DNS-Abschnitten im Genom von *H. denitrificans* wurden geeignete Knock-out-Konstrukte via SOE-PCR hergestellt (Horton, 1995). Die hierbei verwendeten Oligonukleotide wurden in Tab. 6 zusammengefasst. Grundsätzlich wurden in separaten PCR-Reaktionen zunächst die gewünschten 5'- und 3'-Fragmente amplifiziert, bevor diese in einem 1:1-Verhältnis als Template in der dritten PCR-Reaktion genutzt wurden.

### 3.2.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Zur spezifischen Modifikation von Nukleinsäuren wurden die in Tab. 3 aufgeführten Enzyme verwendet. Die Nutzung erfolgte hierbei gemäß den jeweiligen Angaben der Hersteller.

### 3.2.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen oder aus Ansätzen zur enzymatischen Modifikation von Nukleinsäuren wurde ein GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA) verwendet. Die Extraktion aus Agarosegelen erfolgte hierbei gemäß den Angaben des Herstellers. Zur Aufreinigung aus Ansätzen zur enzymatischen Modifikation von Nukleinsäuren wurde der gesamte Ansatz mit 200 µL des Binding Buffers aus dem Kit für 10 min bei 60 °C inkubiert und dann auf eine Aufreinigungssäule geladen. Anschließend erfolgte die Extraktion gemäß den Angaben des Herstellers. Abweichend hiervon erfolgte die Elution von Nukleinsäuren grundsätzlich mit sterilem rH<sub>2</sub>O. Die Extraktion von Plasmiden aus *E. coli* wurde mit einem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution von Nukleinsäuren erfolgte davon abweichend mit sterilem rH<sub>2</sub>O. Zur Gewinnung von gDNS aus *H. denitrificans* für PCRs zur Genotypisierung wurde ein Simplex Easy DNA-Extraktionskit (GEN-IAL GmbH, Troisdorf/Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Abweichend hiervon wurde teilweise kein Zellmaterial aus Flüssigkulturen verwendet, sondern Material von Kolonien von Agarplatten. Die Extraktion von gDNS für Southern-Blot-Analysen wurde mit einem First-DNA all-tissue Kit (GEN-IAL GmbH, Troisdorf/Deutschland) nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt. Zellmaterial, aus dem gDNS extrahiert werden sollte (250 mg), wurde in 500 µL rH<sub>2</sub>O resuspendiert, auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit 500 µL rH<sub>2</sub>O gewaschen (3 min, 16.100 g, 4 °C). Die nachfolgenden Schritte wurden für beide Ansätze parallel durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 10 µL Enzymlösung resuspendiert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 500 µL Lyse 1, 50 µL Lyse 2 und 10 µL 1 M DTT gegeben. Der Ansatz wurde gevortext und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Pro 100 µL Lysat wurde dem Ansatz 1 µL RNase (10 mg/mL) zugesetzt, gefolgt von einer Inkubation von 10 min bei 37 °C. Nachfolgend wurden 500 µL Lyse 3 hinzugefügt und der Ansatz 30 sek gevortext, gefolgt von einer Inkubation von 5 min bei -20 °C. Diesem Schritt schloss sich eine Zentrifugation (16.100 g, 10 min, 4 °C) an. Von dem resultierenden Überstand wurden 500 µL mit 525 µl eiskaltem Isopropanol gemischt, gefolgt von einer Zentrifugation (16.100 g, 15 min, 4 °C) und einem Waschschritt mit 70%igem (v/v) Ethanol (16.100 g, 10 min, 4 °C). Das gewonnene Pellet wurde 20 min bei 37 °C und 10 min bei 65 °C getrocknet und anschließend in 100 µL rH<sub>2</sub>O gelöst und die DNS-Lösungen der beiden parallelen Ansätze wurden vereint. Die Menge der extrahierten gDNS wurde in einem BioPhotometer D30 (Eppendorf, Hamburg/Deutschland) bestimmt und die Qualität via Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Chromosomale DNS wurde grundsätzlich bei 4 °C gelagert, Plasmide oder aufgereinigte DNS-Stücke (< 20 kB) wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.2.6 Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS wurde durch den externen Anbieter GATC Biotech (Konstanz/Deutschland) übernommen.

### 3.2.7 Southern-Blot-Analyse

Zur Verifizierung der erfolgreichen gerichteten Mutagenese im Genom von *H. denitrificans* wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde zunächst gDNS von der zu untersuchenden Mutante und einem Wildtyp als Referenz extrahiert und eine größere Menge (2–4 µg) üN via Restriktionsendonukleasen verdaut. Im Anschluss wurden die DNS-Fragmente in einem 1%igem Agarosegel via Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch einen Kapillarblot (üN) auf eine Nylon-Membran (Roth, Karlsruhe/Deutschland) übertragen. Nachfolgend wurde die Membran kurz in 2xSSC/1 % SDS (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, 1 % SDS, pH 7) geschwenkt und die transferierte DNS kovalent in einem UV-Crosslinker (UV Stratalinker 1800, Stratagene, San Diego/USA) an die Membran gebunden. Zur Vorhybridisierung wurde die Membran für 16 h bei 68 °C in 20 mL Vorhybridisierungslösung (20 mM Maleinsäure, 0,75 M NaCl, 75 mM Natriumcitrat pH 7, 0,1 % (w/v) N-lauroylsarcosin, 0,02 % SDS, 2 % Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim/Deutschland)) inkubiert. Im Anschluss wurde die gewünschte und mit Digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim/Deutschland) markierte Sonde zunächst für 20 min bei 100 °C in 1 mL Vorhybridisierungslösung gekocht und dann für weitere 16 h zusammen mit der Membran in 20 mL Vorhybridisierungslösung bei 68 °C inkubiert. Für eine Chemilumineszenz-basierte Detektion via Antikörper wurde die Membran zunächst zwei Mal für 5 min in 100 mL 2xSSC (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, 1 % SDS, pH 7) bei RT gewaschen. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe in 100 mL 0,1 % SSC/1 % SDS für 15 min bei 68 °C und ein weiterer Waschschriff für 5 min in 100 mL Waschpuffer (0,1 % (v/v) Tween 20, 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) bei RT. Es folgten 30 min Inkubation in 100 ml Puffer 2 (1 % (m/v) Blocking-Reagenz, 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) bei RT und eine weitere Inkubation in 10 mL Puffer 2 und 2 µL  $\alpha$ -Digoxigenin-AP (Roche, Mannheim/Deutschland) für 30 min bei RT. Anschließend erfolgten erneut zwei Waschschriffe mit 100 mL Waschpuffer bei RT für 15 min sowie eine Inkubation für 5 min in 20 mL Puffer 3 (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5) bei RT. Zur Auswertung der Membran wurde diese im Anschluss für 20 min in 10 mL Puffer 3 und 10 µL CDP-Star (Roche, Mannheim/Deutschland) bei RT inkubiert, kurz auf Whatman-Papier abgetrocknet und dann das emittierte Licht unter Verwendung eines Röntgenfilms (Fujifilm, Tokio/Japan) dokumentiert.

## 3.3. Proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 Bestimmung des Proteingehalts von Proteinlösungen

Die Bestimmung des Proteingehalts von Proteinlösungen erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA) gemäß den Angaben des Herstellers.

### 3.3.2 Gewinnung von Zellextrakten für immunologische Proteinnachweise

Zur Gewinnung von Zellextrakten aus *E. coli*-oder *H. denitrificans*-Zellen für nachfolgende immunologische Proteinnachweise wurden drei verschiedene Verfahren angewendet. Bei kleinstmengen an Zellen (Feuchtwicht des Pellets < 50 mg) wurden diese in einem kleinen Volumen des gewünschten Aufschlusspuffers resuspendiert und mit reduzierendem Roti-Load 1 Probenpuffer (Roth, Karlsruhe/Deutschland) 1 zu 4 verdünnt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Aufkochen für 5 min bei 95 °C. Bei kleinen Zellmengen (Feuchtwicht des Pellets < 500 mg) wurde das Pellet in einem kleinen Volumen des gewünschten Aufschlusspuffers resuspendiert und mit bis zu 100 mg Silica-Kugeln versetzt. Der Aufschluss erfolgte in einem Silamat S6 (Ivoclar Vivadent, Schaan/Liechtenstein) durch viermaliges Schütteln für 30 sek im Standardprogramm. Nachfolgend wurden Zelltrümmer und die Silica-Kugeln durch eine Zentrifugation (16.100 g, 10 min, 4 °C) pelletiert und der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Größere Zellpellets wurden durch Ultraschall-desintegration aufgeschlossen. Hierfür wurden die Zellpellets zunächst in einem geeigneten Volumen des gewünschten Aufschlusspuffers resuspendiert. Nachfolgend erfolgte der Zellaufschluss entweder anaerob mit einem Bandelin Sonopuls UW 2070 (Bandelin electronic, Berlin/Deutschland) für 2 min pro mL Zellsuspension unter Kühlung mit einer Intensität von 65 % oder aerob mit einem SONIFIER Cell-disruptor B15 (Branson, Danbury/USA) bei den gleichen gewählten Parametern.

### 3.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung komplexer Proteingemische wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt (Laemmli, 1970). Hierfür wurden die Lösungen A (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,3 % SDS) und B (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 % SDS) sowie eine Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid/Bisacrylamid), TEMED und 10 % APS (m/v) in rH<sub>2</sub>O benötigt. Ein exemplarisches Rezept zur Herstellung von 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen zeigt die Tab. 13. Wurden abweichend von diesem Rezept Trenngelen mit einem niedrigeren oder einem höheren Acrylamid-Gehalt benötigt, wurde das Verhältnis von Wasser zu Acrylamid entsprechend angepasst. Der Laufpuffer (30 g/L Tris, 144 g/L Glycin, 10 g/L SDS) für die Gele wurde 10fach konzentriert hergestellt und vor der Verwendung 1 zu 10 mit rH<sub>2</sub>O verdünnt.

Tab. 13: Rezeptur zur Herstellung von 2 SDS-Polyacrylamid-Gelen mit einem 4,5%igen Sammelgel und einem 15%igen Trenngel.

Gel	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4,5 %)
Reagenzien		
rH <sub>2</sub> O	3 mL	3 mL
30 % Acrylamid	6 mL	0,75 mL
Lösung A	3 mL	/
Lösung B	/	1,25 mL
10 % APS	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele entweder für eine nachfolgende Western-Blot-Analyse verwendet oder einer Färbung unterzogen. Bei den Färbungen handelte es sich um eine Coomassie-Färbung oder eine Silberfärbung. Für zuerst genannte wurde das Gel für 1 h in der Färbelösung (0,25 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) Eisessig, 40 % (v/v) rH<sub>2</sub>O) inkubiert und nachfolgend in einer Entfärbelösung (10 % (v/v) Eisessig, 20 % (v/v) MeOH, 70 % (v/v) rH<sub>2</sub>O) bis zum Erreichen der gewünschten Färbung entfärbt. Bei der alternativ durchgeführten Silberfärbung wurde das Gel zunächst für 20 min in Lösung 1 (50 % (v/v) MeOH, 5 % (v/v) Eisessig in rH<sub>2</sub>O) inkubiert, gefolgt von 10 min Inkubation in Lösung 2 (50 % (v/v) MeOH in rH<sub>2</sub>O) und 10 min in rH<sub>2</sub>O. Anschließend erfolgten eine weitere Inkubation für 1 min in Lösung 3 (0,02 % (m/v) Natriumthiosulfat in rH<sub>2</sub>O) und zwei Waschschrte in rH<sub>2</sub>O (je 1 min). Hieran schloss sich eine Inkubation für 20 min bei 4 °C in Lösung 4 (0,1 % (m/v) Silbernitrat in rH<sub>2</sub>O) an. Zum Färben wurde das Gel bis zum Erreichen der gewünschten Bandenintensität in Lösung 5 (3 % (m/v) Natriumcarbonat, 0,1 % (v/v) Formaldehyd, 16 µM Natriumthiosulfat in rH<sub>2</sub>O) inkubiert. Der Färbeprozess wurde durch Zugabe von 5 % (v/v) Eisessig gestoppt.

### 3.3.4 Western-Blot-Analyse

Um ein Protein von Interesse spezifisch in den aufgetrennten Banden eines SDS-Polyacrylamid-Gels nachzuweisen, wurden Western-Blot-Analysen angewendet. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm Porengröße, Roth, Karlsruhe/Deutschland) wurde mittels des Semi-Dry-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979) mit einem Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München/Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst das zu blottende Gel und die Membran für 20 min in Towbin-Puffer (3,04 g/L Tris, 14,58 g/L Glycin, 20 % (v/v) MeOH in rH<sub>2</sub>O) inkubiert. Für den Transfer wurden zwei Lagen 3MM Chromatographie Papier (Roth, Karlsruhe/Deutschland) in Towbin Puffer getränkt und auf der Anode platziert. Darüber wurde luftblasenfrei zuerst die Membran gelegt, gefolgt von dem Gel und erneut zwei in Towbin-Puffer getränkten Lagen 3MM-Chromatographie-Papier. Der Proteintransfer wurde bei 15 V für 20–45 min in Abhängigkeit der zu detektierenden Proteine durchgeführt. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran in 1x PBS (4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl) mit 1 g Milchpulver pro 20 mL Volumen inkubiert. Hieran schlossen sich drei Waschschrte für jeweils 5 min mit 50 mL PBS an. Antiseren und Antikörper (Tab. 4, α-HdrA-Antiserum, α-LbpA- und α-Liponsäure-Antikörper) wurden in verschiedenen Verdünnungen (1:2000 α-HdrA, 1:500 α-LbpA, 1:4000 α-Liponsäure) in PBS mit 0,5 % (m/v) BSA hinzugegeben und für 3 h inkubiert. Hieran schlossen sich drei Waschschrte für jeweils 5 min mit 100 mL PBS an. Sekundäre Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (1:40.000 bei α-HdrA, 1:4.000 bei α-LbpA, 1:5000 bei α-Liponsäure) in PBS mit 0,5 % (m/v) BSA für 1 h auf die Membran gegeben, gefolgt von drei Waschschrten für 5 min mit jeweils 100 mL 1x PBT (PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20) sowie vier Waschschrten mit 100 mL PBS für 5 min. Derartig behandelte Membranen wurden einer chemolumineszenz-basierenden Immunodetektion mittels SignalFire ECL reagent (Cell Signaling



Technology, Danvers, USA) gemäß den Angaben des Herstellers unterzogen. Für eine alternative chromogene Detektion wurde die Membran nach dem letzten Waschschrift in Entwicklerlösung (7 mL eiskaltes EtOH mit 30 mg 4-Chlor-1-naphthol, aufgefüllt auf 50 mL mit rH<sub>2</sub>O) inkubiert und die Entwicklung durch Zugabe von 20 µL Wasserstoffperoxid gestartet. Die Verwendung und die damit verbundene Immunodetektion der weiteren Antikörper (Tab. 4) erfolgten gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller.

### **3.4. Chromatographische Methoden**

#### **3.4.1 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie**

Für die Aufreinigung von rekombinant produzierten Proteinen aus Bakterien wurden Strep-Tactin-Affinitätschromatographien unter aeroben oder unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mittels Ultraschallintegration aufgeschlossen. Hierfür wurden die Zellpellets in einem geeigneten Volumen von Puffer W (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) resuspendiert. Nachfolgend erfolgte der Zellaufschluss anaerob mit einem Bandelin Sonopuls UW 2070 (Bandelin electronic, Berlin/Deutschland) für 2 min pro mL Zellsuspension unter Kühlung mit einer Intensität von 65 % oder aerob mit einem SONIFIER Cell-disruptor B15 (Branson, Danbury/USA) bei den gleichen gewählten Parametern. Die eigentliche Affinitätschromatographie erfolgte in Abhängigkeit von der Menge des Zelllysats entweder mit selbst gegossenen Gravity-Flow-Säulen (bis 3 mL Säulenvolumen) aus Strep-Tactin Sepharose (IBA BioTAGnology, Göttingen/Deutschland) oder mit fertigen StrepTrap HP 5-mL-Säulen (GE Healthcare, Little Chalfont/Großbritannien). Die Benutzung erfolgte jeweils gemäß den Angaben der Hersteller. Abweichend hiervon wurde dem Puffer W für die Waschschriffe 0,1 % (v/v) Triton X-100 hinzugefügt.

Nach Abschluss der Affinitätschromatographie wurden die gewonnenen Elutionsfraktionen bei Bedarf aufkonzentriert und umgepuffert. Dies geschah in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des zu konzentrierenden Proteins mit Zentrifugationsfiltern (Amicon Ultracel-10K filters, Merck, Darmstadt/Deutschland, Vivaspin 500, Sartorius, Göttingen/Deutschland) gemäß den Angaben der Hersteller.

#### **3.4.2 Fast Protein Liquid Chromatography**

Um heterolog produzierte rekombinante Proteine sauber von kontaminierenden Proteinen zu trennen, wurden Größenausschlusschromatographien mit einem Äkta Purifier und einer HiLoad 16/60 Superdex 75pg Säule (beides GE Healthcare, Little Chalfont/Großbritannien) durchgeführt. Das System wurde mit einem Laufpuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2 entgast, filtriert) bei 4 °C sowie einer Flussrate von 0,5 mL/min und einem Fraktionsvolumen von 1 mL verwendet.

#### **3.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Zur hochsensitiven Detektion von Thiolen (Sulfid, Polysulfide, Sulfit, Thiosulfat) wurden Hochleistungsflüssigkeitschromatographien durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Derivatisierung der Thiolgruppen mit Monobromobiman (Rethmeier *et al.*, 1997), um diese durch Fluoreszenzdetektion

bei 480 nm (Anregung bei 380 nm, FL3000 Fluoreszenz Detektor, Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA) zu quantifizieren. 50 µL zellfreier Kulturüberstand wurden mit 50 µL HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 5 mM EDTA, pH 8) und 55 µL Acetonitril gemischt. Hierzu wurden 3 µL Monobromobiman (48 mM in Acetonitril) gegeben, gefolgt von 30 min Inkubation im Dunkeln. Durch Zugabe von 100 µL Methansulfonsäure (65 mM) wurde die Derivatisierung gestoppt. Vor der HPLC-Analyse wurden die Proben für 10 min bei 16.100 g zentrifugiert. 10 µL vom Überstand wurden mit 190 µL ddH<sub>2</sub>O vermischt. Hiervon wurden 50 µL auf die Säule (LiChrospher 100 RP18e, Merck, Darmstadt, Deutschland) injiziert. Zur Auftrennung der Probe wurde ein linearer Gradient (Tab. 14) verwendet.

**Tab. 14: Elutionsprotokoll für die Detektion von Monobromobiman derivatisierten Thiolen via HPLC.** Die Flussrate betrug 1 mL/min, die Temperatur 35 °C.

Zeit [min]	% 0,25 % (v/v) Essigsäure pH 4	% Methanol
0	85	15
5	85	15
50	55	45
55	0	100
58	0	100
61	85	15
76	85	15

### 3.4.4 Gaschromatographie

Für die Quantifizierung von DMS wurden Gaschromatographien durchgeführt. Hierfür wurden mittels einer gasdichten 50-µL-Luer-Lock Hamilton-Spritze (Hamilton Company, Reno/USA) 50 µL der Gasphase einer Kultur in einen Gaschromatographen (PerkinElmer Clarus 480, Rascon FFAP Säule 25m × 0.25 micron, PerkinElmer, Waltham/USA) eingespritzt. Die Säulentemperatur betrug 200 °C, die Injektortemperatur 150 °C und die Detektortemperatur (Flammenionisationsdetektor) 250 °C. Als Trägergas wurde N<sub>2</sub> verwendet. Die eigentliche Quantifizierung erfolgte unter Verwendung einer Siebenpunkt-Kalibriergeraden mit DMS-Standards bekannter Konzentration in baugleichen Kulturgefäßen und Medien mit identischen Gasphasen zu Flüssigphasen-Verhältnissen.

## 3.5. Spektroskopische Methoden

### 3.5.1 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Untersuchung der spektralen Eigenschaften von Proteinen wurde ein Specord 210 UV/Vis-Spektralphotometer (Analytik Jena, Jena/Deutschland) verwendet. Messungen fanden bei 30 °C in Präzisionsküvetten aus Quarzglas (Hellma Analytics, Müllheim/Deutschland) entweder aerob oder anaerob statt. Spektren wurden in 0,2-nm-Schritten mit einer Geschwindigkeit von 2 nm/sek aufgenommen. Zur Oxidation von Proteinen wurden Kaliumhexacyanidoferrat(III)(Ferricyanid)-Lösungen (aerob oder anaerob) in geeigneten Konzentrationen verwendet. Die Reduktion erfolgte mit Natriumdithionit-Lösungen (aerob oder anaerob) in geeigneten Konzentrationen.

### 3.5.2 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Zur Bestimmung des Redoxpotentials des Eisen-Schwefel-Clusters von rekombinantem HdrA (Hden\_0691) wurde eine Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine potentiometrische Titration in einem anaeroben Zelt (95 % N<sub>2</sub>, 5 % H<sub>2</sub>) vorgenommen. Als Basis dienten 180 µM rekombinantes HdrA (Hden\_0691) und 180 µM einer Mixtur von Redox-Mediatoren (1,2-Naphthochinon, Phenazinmethosulfat, Phenazinethosulfat, Methylenblau, Indigo-tetrasulfonat, Indigo-disulfonat, 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon, Safranin, Anthrachinon-2-sulfonat, Neutralrot, Benzylviologen, Methylviologen) in 100 mM MOPS (pH 7,5 mit 5 mM EDTA). Durch Zugabe einer gepufferten Natriumdithionit-Lösung (pH 8) wurde das Redoxpotential erniedrigt. Das Potential der Lösung wurde mit einer kombinierten Ag/AgCl-Elektrode (kalibriert gegen eine gesättigte Chinhydron-Lösung bei pH 7) und einer Standard-Wasserstoffelektrode als Referenz gemessen. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Titration wurden Proben genommen, unter anaeroben Bedingungen in EPR-Tubes transferiert, versiegelt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. EPR-Spektren auf dem X-Band wurden mit einem Bruker-EMX-Spektrometer (Billerica/USA) unter Verwendung eines ESR-900 X-Band Helium Cryostat von Oxford Instruments (Abingdon-on-Thames/Großbritannien) aufgenommen. Für die Aufnahme der Spektren wurden die folgenden Parameter gewählt: Mikrowellenfrequenz 9,39 GHz, Mikrowellenpower 2,01 mW, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT, Temperatur 5 K. Einzelspektren von HdrA im Zustand ‚wie isoliert‘ und ‚komplett reduziert‘ wurden ohne den Zusatz von Redox-Mediatoren bei 18 K aufgenommen.

### 3.5.3 Determiation von Thiosulfat-Konzentrationen

Die Bestimmung von Thiosulfat in zellfreien Kulturüberständen erfolgte mit einem kolorimetrischen Test (Urban, 1961). Zellfreier Kulturüberstand (650 µL, bei Bedarf verdünnt) wurde mit 200 µL Natriumacetat (0,2 M, pH 4,8) sowie 50 µL Natriumcyanid (0,2 M) und 50 µL Kupferchlorid (40 mM) versetzt und gevortext. Hierzu wurden 50 µL Eisennitrat-Reagenz (300 g/L Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> x 9 H<sub>2</sub>O, 22,1 % HNO<sub>3</sub>) gegeben, anschließend wurde die Probe erneut gevortext und direkt die Absorption bei 460 nm mit einem Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibrierung erfolgte anhand von Proben mit bekanntem Thiosulfatgehalt (25–400 nmol).

### 3.5.4 Determiation von Tetrathionat-Konzentrationen

Die Bestimmung von Tetrathionat in zellfreien Kulturüberständen erfolgte mit einem kolorimetrischen Test (Kelly *et al.*, 2002). Zellfreier Kulturüberstand (500 µL, bei Bedarf verdünnt) wurde mit 50 µL Tris-Acetate (1 M, pH 8,7) sowie 50 µL Natriumcyanid (0,2 M) versetzt und gevortext. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend wurden 50 µL Eisennitrat-Reagenz (300 g/L Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> x 9 H<sub>2</sub>O, 22,1 % HNO<sub>3</sub>) hinzugegeben, die Probe erneut gevortext und direkt die Absorption bei 460 nm mit einem Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibrierung erfolgte anhand von Proben mit bekanntem Tetrathionatgehalt (12,5–125 nmol).

### 3.5.5 Determination von Sulfit-Konzentrationen

Die Bestimmung von Sulfit in zellfreien Kulturüberständen erfolgte mit einem kolorimetrischen Test (Grant, 1947). Zellfreier Kulturüberstand (690 µL, bei Bedarf verdünnt) wurde mit 200 µL Zinkacetat (2 % (m/v)) sowie 100 µL Fuchsin-Reagenz (0,04 % (m/v) in 10 % (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) versetzt, gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden den Proben 10 µL Formaldehyd (37 %) hinzugefügt, gefolgt von einer erneuten Inkubation (10 min, RT). Nach dieser wurde die Absorption bei 570 nm mit einem Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibrierung erfolgte anhand von Proben mit bekanntem Sulfitgehalt (5–40 nmol).

### 3.5.6 Determination von Sulfat-Konzentrationen

Die Bestimmung von Sulfat in zellfreien Kulturüberständen erfolgte mit einem turbidimetrischen Test (Sörbo, 1987). Zellfreier Kulturüberstand wurde mit einem gleichen Volumen von 0,5 M Trichloressigsäure verdünnt, gevortext und für 10 min in einem geöffneten Reaktionsgefäß inkubiert. 200 µL hiervon wurden mit 600 µL 0,25 M Trichloressigsäure verdünnt und mit 200 µL Bariumchlorid-Reagenz (0,489 g BaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O, 7,5 g PEG 6000, 0,1 mL 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 50 mL rH<sub>2</sub>O) versetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert und während dieser Zeit wiederholt gevortext. Nachfolgend wurde die optische Dichte bei 450 nm mit einem Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibrierung erfolgte anhand von Proben mit bekanntem Sulfatgehalt (25–500 nmol).

### 3.5.7 Determination von Eisen-Schwefel-Clustern in rekombinanten Proteinen

Zur Determination von Eisen-Schwefel-Clustern in rekombinanten Proteinen wurde ein kolorimetrischer Test zur Eisenbestimmung (Fish, 1988) und zur Schwefelbestimmung (King & Morris, 1967) durchgeführt. Für die Schwefelbestimmung wurden 200 µL einer Proteinlösung in einer geeigneten Verdünnung mit einem Prämix aus 300 µL 1 % (m/v) Zinkacetat und 15 µL 12 % (m/v) NaOH versetzt, einmal invertiert und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden 75 µL 0,1 % (m/v) Dimethylphenylendiamin (in 5 M HCl) hinzugegeben und die Probe zweimal invertiert, gefolgt von einer Zugabe von 75 µL 2 mM Eisen(III)-chlorid (in 1,2 M HCl) und einer weiteren Inkubation für 20 min (RT, dunkel). Nach Ablauf der Zeit wurde die Probe zentrifugiert (10 min 10.000 g, RT) und die Absorption vom Überstand bei 670 nm mit einem Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibrierung erfolgte anhand von Proben mit bekanntem Sulfidgehalt (2,5–20 nmol).

Für die Eisenbestimmung wurden 100 µL einer Proteinlösung in einer geeigneten Verdünnung mit 100 µL 1 % (v/v) HCl versetzt, gevortext und zentrifugiert (30 sek, 16.100 g, RT). Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 80 °C gekocht und langsam auf RT zurückgekühlt. Diesem Ansatz wurden 500 µL Ammoniumacetat (7,5 % (m/v)), 100 µL Ascorbinsäure (4 % (m/v)) und 100 µL Ferrozin (1,5 % (m/v)) hinzugefügt. Der Ansatz wurde gevortext, zentrifugiert (5 min, 16.100 g, RT) und die Absorption vom Überstand bei 593 nm mit einem Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kalibrierung erfolgte anhand von Proben mit bekanntem Eisengehalt (5–50 nmol).

### 3.6 Anaerobes Arbeiten

Experimente, bei denen unter Ausschluss von Sauerstoff gearbeitet werden sollte, wurden in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake/USA) mit einer Stickstoff- (98 %) und Wasserstoff-Atmosphäre (2 %) durchgeführt. Um ein effektives anaerobes Arbeiten sicherzustellen, wurden Puffer und Verbrauchsmaterialien mindestens 24 h vor Beginn des Experimentes in das Anaerobenzelt eingeschleust. Proteinlösungen, die unter anaeroben Bedingungen aufgereinigt wurden, wurden zunächst im Anaerobenzelt in gasdichten Glasgefäßen verschlossen und aus dem Zelt ausgeschleust. Anaerobe Küvetten wurden im Anaerobenzelt nach Bedarf befüllt, gasdicht verschlossen und dann ausgeschleust. Zur Herstellung von anaeroben Puffern außerhalb des Anaerobenzelts wurden diese zunächst entgast, in gasdichte verschlossene Glasgefäße transferiert und anschließend mit Stickstoff begast. Die Entnahme von Volumina aus den Gefäßen erfolgte mit gasdichten Hamilton-Spritzen (Hamilton Company, Reno/USA).

### 3.7 Kristallographie

Zur Kristallisation von rekombinantem HdrA (Hden\_0691) wurde die Sitting-drop-Methode bei 18 °C in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake/USA) mit einer Stickstoff- (95 %) und Wasserstoff-Atmosphäre (5 %) durchgeführt. Hierfür wurden ein OryxNano-Kristallisationsroboter (Douglas Instruments Ltd., Hungerford/Großbritannien) und JBScreen-Pentaerythritol-Gefäße (Jena Bioscience, Jena/Deutschland) verwendet. HdrA wurde in einer konzentrierten Proteinlösung (20 mg/mL in 20 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 µM FAD) in Gegenwart eines 0,1 M MES-Puffers (pH 6,5) mit 25 % (m/v) Pentaerythritolpropoxylat 629 kristallisiert. Die Kristallstrukturanalyse erfolgte im Paul Scherrer Institut an der Strahllinie PXIII (Villigen/Schweiz). Für die Auswertung wurden Kristalle mit einer Beugung unter 1,5 Å verwendet. Die Aufarbeitung der Rohdaten erfolgte mit XDS (Kabsch, 2010). Die Positionen der Eisen in den Eisen-Schwefel-Clustern wurden mit SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002) und die Phasen mit SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1967) bestimmt und mit SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) verbessert. Das Modell wurde automatisch via ARP/wARP erstellt und manuell unter Verwendung von COOT (Emsley & Cowtan, 2004) beendet. Verfeinerungen des Modells wurden mit REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997), PHENIX.refine (Afonine *et al.*, 2010) und BUSTER (Global Phasing, Cambridge/Großbritannien) durchgeführt. Die Qualität des Modells wurde mit COOT und MOLPROBITY (Davis *et al.*, 2007) überprüft. Strukturvergleiche wurden mit DALI (Holm & Laakso, 2016) und Oberflächenberechnungen über den PISA-Server (Krissinel & Henrick, 2007) durchgeführt.

### 3.8 Proteom-Analysen

Für einen Vergleich der Proteome von *H. denitrificans* bei Wachstum mit DMS im Vergleich zum Wachstum mit DMA wurden pro Bedingung jeweils drei biologische Replikate von *H. denitrificans* Sm200 in 500-mL-Erlenmeyer-Kolben mit 300 mL 0-Medium (100 mM MOPS pH 7,2, 200 µg/mL Streptomycin) angeimpft. Die Inkubation erfolgte aerob bei 220 rpm und 30 °C. Drei Kulturen wurden mit 8 mM DMA angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600nm</sub> von

0,35 geerntet (10.000 g, 12 min, 4 °C). Drei weitere Kulturen wurden mit 4 mM DMA bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,2 angezogen und dann mit insgesamt 2,25 mM DMS in 0,25- bis 0,5 mM-Schritten gefüttert. Die Zellen wurden geerntet, bevor die letzte Portion DMS verbraucht wurde (10.000 g, 12 min, 4 °C). Parallel wurde ein Versuch äquivalent mit *Hyphomicrobium* EG durchgeführt, wobei hier das Proteom bei Wachstum mit DMA mit dem mit DMSO verglichen wurde. Jeweils drei biologische Replikate wurden pro Bedingung in 500-mL-Erlenmeyer-Kolben mit 300 mL 0-Medium (100 mM MOPS pH 7,2, 25 µg/mL Streptomycin) angeimpft. Drei der Kolben enthielten 8 mM DMA als Kohlenstoff- und Energie-Quelle, die anderen drei 13 mM DMSO. Die Ernte der Kulturen (10.000 g, 12 min, 4 °C) erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase (mit DMA bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,2, mit DMSO bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,4). Die nachfolgenden Schritte wurden für alle Zellpellets gleich durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in 1x PBS (4 mM  $KH_2PO_4$ , 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 115 mM NaCl) gewaschen und dann in Lysis-Puffer (1x PBS mit 5 % (m/v) Natriumdesoxycholat (SDC) und c0mplete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim/Deutschland)) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte anaerob mit einem Bandelin Sonopuls UW 2070 (Bandelin electronic, Berlin/Deutschland) für 2 min pro mL Zellsuspension unter Kühlung mit einer Intensität von 65 %. Zelltrümmer wurden entfernt (16.100 g, 30 min, 4 °C), der Proteingehalt der Überstände bestimmt und mit Lysis-Puffer auf einen Proteingehalt von 2 mg/mL eingestellt. Mit den Zentrifugationsüberständen wurde eine ‚in Lösung-Präparation‘ der Peptide auf Zentrifugationsfiltern gemäß einem modifizierten Protokoll durchgeführt (Manza *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2008; Wiśniewski *et al.*, 2009; León *et al.*, 2013). 50 µg Protein wurden auf einen Zentrifugationsfilter (Pall Filtersystems, Crailsheim/Deutschland) mit einer Ausschussgröße von 10 kDa geladen. Der Puffer wurde zu 20 mM Triethylammonium-Bicarbonat (TEAB) gewechselt, die Proteine mit 20 mM Dithiothreitol für 20 min bei 55 °C reduziert sowie die Thiol-Gruppen mit 40 mM Acrylamid für 30 min bei RT alkyliert. Nach einem erneuten Pufferaustausch wurden 5 µg Trypsin in 20 mM TEAB mit 0,5 % (m/v) SDC in einem Gesamtvolumen von 50 µL hinzugegeben und der Verdau üN bei 37 °C durchgeführt. Nachfolgend wurden die Peptide im Filtrat gesammelt und verbleibendes SDC wurde mit Trifluoressigsäure (TFA, 0,5 % in der Lösung) präzipitiert. Zurückbleibendes SDC wurde durch einen Phasentransfer mit einem gleichen Volumen an Ethylacetat entfernt. Die Peptide wurden vakuumkonzentriert, in 20 mM TEAB resuspendiert und mit einem isobarischen TMTsimplex-Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA) markiert. Nachfolgend wurden die Peptide gepoolt und auf Oasis-HLP-Filtern (Waters GmbH, Eschborn/Deutschland) entsalzen. Die Eluate enthielten 70 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure, wurden getrocknet und mittels eines Off-Gel-Fraktionierers (Agilent Technologies, Waldbronn/Deutschland) gemäß ihre. isoelektrischen Punkt in 12 Fraktionen aufgeteilt, erneut getrocknet und bei -20 °C gelagert. Nachfolgend wurden die Peptide in 8 µL 0,1 % TFA resuspendiert und 0,5 µL der Lösung auf eine C18-Trap-Säule (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 5 µm, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen/Deutschland) geladen. Gebundene Peptide wurden auf eine mit 0,1 % Ameisensäure äquilibrierte C18-Analyse-Säule (ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1,9 µm Dr. Maisch

GmbH, Ammerbuch-Entringen/Deutschland) eluiert. Die Peptide wurden auf dieser mit einem linearen Gradienten von 4 % zu 35 % Lösungsmittel B (80 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) innerhalb von 120 min mit einer Flussrate von 250 nL/min aufgetrennt. Die nanoHPLC war gekoppelt an ein LTQ-Orbitrap-Velos-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA). Peptid-Ionen zwischen 330 und 1600 m/z wurden mit dem Orbitrap-Detektor mit einer Auflösung von 30.000 gescannt (maximum fill time 400 msec, AGC Ziel  $10^6$ ). Die 22 intensivsten Vorläuferionen (Intensitätsgrenzwert 5.000) wurden einer durch eine hochenergetische Kollision induzierte Dissoziation unterzogen (schrittweise Kollisionsenergie, 3 Schritte, Weite 10, normalisierte Energie 42 %) und die Fragmente durch den Orbitrap-Detektor analysiert. Fragmentierte Peptide wurden für 17 sek von wiederholten Analysen ausgeschlossen. Die Masseverriegelung betrug 445,12002 Da.

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mittels Proteome Discoverer 2.1.1.21 (Thermo Fisher Scientific, Rockford/USA). Die Identifikation der Peptide wurde über einen Mascot-Server Version 2.5.1 (Matrix Science Ltd, London/Großbritannien) vorgenommen. Als Grundlage wurden die auf TrEMBL hinterlegte Genomsequenz von *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888 (veröffentlicht 10.2016) und die Genomsequenz von *Hyphomicrobium* EG (zur Verfügung gestellt von Koninklijke DSM N.V., Heerlen/Niederlande) verwendet. Als Vorläufer-Ionen-m/z-Toleranz wurden 10 ppm und als Fragment-Ionen-Toleranz 0,02 Da gewählt. Es wurde nach tryptischen Peptiden mit bis zu zwei ausgelassenen Schnittstellen gesucht. Propanamid an Cysteinen bzw. TMT am N-Terminus von Lysinen wurden als statische Modifikation eingestellt, ebenso wie Oxidation als dynamische Modifikation von Methioninen und Acetylierungen am N-Terminus. Den Ergebnissen wurde eine A-posteriori-Fehler-Wahrscheinlichkeit (PEP) über einen Percolator-Algorithmus zugewiesen (Käll *et al.*, 2008). Spektren mit einem Identifikations-PEP unter 1 % wurden erneut einer Datenbanksuche unterzogen (eine ausgelassene Trypsinschnittstelle und Propanamid als dynamische Modifikation erlaubt). Proteine wurden in die Ergebnisliste aufgenommen, wenn mindestens zwei Peptide mit einer Falschidentifikationsrate (FDR) unter 1 % gefunden werden konnten. Nur Peptidspektrum-Übereinstimmungen (PSM) mit einer Co-Isolation von über 30 % und einzigartigen Peptiden wurden für die Quantifizierung verwendet. Die statistische Auswertung wurde mit R (Foundation for statistical computing) für Proteine durchgeführt, die in allen drei biologischen Replikaten identifiziert werden konnten. Für die statistische Auswertung wurden die Proteinintensitäten logarithmiert ( $\log_2$ ) und normalisiert. Ein Pearson-Korrelationskoeffizient wurde ermittelt. Für die Analyse der Signifikanz von Veränderungen der Proteinhäufigkeit unter den verschiedenen untersuchten Wachstumsbedingungen wurden zwei verschiedene statistische Tests durchgeführt (limma und Rank Product (Schwämmle *et al.*, 2013)). Die resultierenden p-Werte wurden gemäß Schwämmle *et al.* (2013) bereinigt. Veränderungen der Proteinhäufigkeit wurden ab einem p-Wert  $\geq 0,05$  als signifikant, ab einem p-Wert  $\geq 0,01$  als sehr signifikant und ab einem p-Wert  $\geq 0,001$  als höchstsignifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *Hyphomicrobium denitrificans*-Ansatz

#### 4.1.1 Bioinformatische Untersuchung zum Schwefelstoffwechsel in *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup>

Um vor dem eigentlichen Beginn von praktischen Arbeiten zu evaluieren, ob der Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> (*Hyphomicrobium* X) als potentieller Modellorganismus für die Untersuchung der Rolle von Heterodisulfidreduktase(Hdr)-ähnlichen Komplexen im oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus geeignet ist, wurde das Genom des Organismus einer ausführlichen bioinformatischen Untersuchung unterzogen. Hierfür wurden mit den Aminosäuresequenzen von Enzymen, für die in der Literatur bereits eine Beteiligung an oxidativen Prozessen im dissimilatorischen Schwefelmetabolismus gezeigt werden konnte, über eine BLASTP-Analyse Homologe in *Hyphomicrobium* X gesucht (Tab. 15).

**Tab. 15: Proteine mit einer möglichen Involvierung in den dissimilatorischen Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium* X.** Die jeweils angegebenen Referenzproteine wurde mittels BLASTP gegen *Hyphomicrobium* X gelastet.

Name	Lokus-Tag	Annotation	E-Value	Referenzprotein	Quelle
AprA	/	/	/	Alvin_1121	Dahl <i>et al.</i> (2008)
AprB	/	/	/	Alvin_1120	Dahl <i>et al.</i> (2008)
AprM	/	/	/	Alvin_1119	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DMS-Monooxygenase	/	/	/	DmoA aus <i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	Boden <i>et al.</i> (2011)
DmsA	Hden_1433	molybdopterin dinucleotide-binding region	1,0*10 <sup>-62</sup>	DmsA aus <i>Escherichia coli</i>	Bilous <i>et al.</i> (1988)
DmsB	Hden_0927	nitrate reductase, beta subunit	5,0*10 <sup>-22</sup>	DmsB aus <i>Escherichia coli</i>	Bilous <i>et al.</i> (1988)
DmsC	/	/	/	DmsC aus <i>Escherichia coli</i>	Bilous <i>et al.</i> (1988)
DMS-Oxidase	Hden_0734	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	4,0*10 <sup>-48</sup>	DsoF aus <i>Acinetobacter</i> strain 20B	Horinouchi <i>et al.</i> (1997)
DoxA	/	/	/	DoxA aus <i>Acidianus ambivalens</i>	Müller <i>et al.</i> (2004)
DoxD	/	/	/	DoxD aus <i>Acidianus ambivalens</i>	Müller <i>et al.</i> (2004)
DsrA	/	/	/	Alvin_1251	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DsrB	/	/	/	Alvin_1252	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DsrC	/	/	/	Alvin_1256	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DsrE3-like	Hden_0688	conserved hypothetical protein	2,0*10 <sup>-7</sup>	Mcup_0681	Liu <i>et al.</i> (2014)
FccA	Hden_1401	Flavocytochrome c sulphide dehydrogenase flavin-binding protein	9,0*10 <sup>-102</sup>	Alvin_1092	Dahl <i>et al.</i> (2008)



Name	Lokus-Tag	Annotation	E-Value	Referenzprotein	Quelle
FccB	Hden_0890	putative cytochrome c	$3,0 \cdot 10^{-9}$	Alvin_1093	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdrA	Hden_0691	fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein domain protein	$3,0 \cdot 10^{-151}$	AFE_2553	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrB1	Hden_0690	protein of unknown function DUF224 cysteine-rich region domain protein	0,0	AFE_2554	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrB2	Hden_0694	CoB--CoM heterodisulfide reductase	$4,0 \cdot 10^{-141}$	AFE_2550	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrC1	Hden_0689	iron-sulfur cluster-binding protein	$1,0 \cdot 10^{-129}$	AFE_2555	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrC2	Hden_0693	heterodisulfide reductase subunit C	$3,0 \cdot 10^{-90}$	AFE_2551	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
Hyp	Hden_0692	hypothetical protein	$4,0 \cdot 10^{-27}$	AFE_2552	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
LbpA	Hden_0696	glycine cleavage H-protein	$3,0 \cdot 10^{-18}$	AFE_2549	Liu <i>et al.</i> (2014)
Methanthioloxidase	Hden_0743	selenium-binding protein, putative	0,0	Methanthioloxidase aus <i>Hyphomicrobium</i> VS	Eyice <i>et al.</i> (2018)
Persulfidooxygenase	Hden_0740	beta-lactamase domain protein	$7,0 \cdot 10^{-110}$	PDO2 aus <i>Pseudomonas putida</i>	Sattler <i>et al.</i> (2015)
QmoA	/	/	/	QmoA aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dahl <i>et al.</i> (2008)
QmoB	/	/	/	QmoB aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dahl <i>et al.</i> (2008)
QmoC	/	/	/	QmoC aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dahl <i>et al.</i> (2008)
Sat	/	/	/	Alvin_1118	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoeA	/	/	/	Alvin_2491	Dahl <i>et al.</i> (2013)
SoeB	/	/	/	Alvin_2490	Dahl <i>et al.</i> (2013)
SoeC	/	/	/	Alvin_2489	Dahl <i>et al.</i> (2013)
SorA	Hden_1146	oxidoreductase molybdopterin binding protein	$4,0 \cdot 10^{-30}$	SorA aus <i>Starkeya novella</i>	Kappler <i>et al.</i> (2000)
SorB	/	/	/	SorB aus <i>Starkeya novella</i>	Kappler <i>et al.</i> (2000)
SoxA	Hden_0703	conserved hypothetical protein	$3,0 \cdot 10^{-11}$	Alvin_2169	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxB	Hden_0706	5'-Nucleotidase domain protein	$4,0 \cdot 10^{-169}$	Alvin_2167	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxC	Hden_1146	oxidoreductase molybdopterin binding protein	$1,0 \cdot 10^{-100}$	SoxC aus <i>Paracoccus pantotrophus</i>	Wodara <i>et al.</i> (1997)
SoxD	Hden_1145	cytochrome c class I	$2,0 \cdot 10^{-30}$	SoxD aus <i>Paracoccus pantotrophus</i>	Wodara <i>et al.</i> (1997)

Name	Lokus-Tag	Annotation	E-Value	Referenzprotein	Quelle
SoxF	Hden_1401	Flavocytochrome c sulphide dehydrogenase flavin-binding protein	$7,0 \cdot 10^{-111}$	SoxF aus <i>Paracoccus pantotrophus</i>	Quentmeier <i>et al.</i> (2004)
SoxX	Hden_0702	conserved hypothetical protein	$3,0 \cdot 10^{-8}$	Alvin_2168	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxY	Hden_0704	sulfur oxidation protein SoxY	$3,0 \cdot 10^{-13}$	Alvin_2111	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxYZ Fusionsprotein	Hden_1147	sulfur oxidation protein SoxZ sulfur-oxidizing protein SoxY	$7,0 \cdot 10^{-111}$ / $7,0 \cdot 10^{-7}$	Alvin_2111 / Alvin_2112	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxZ	Hden_0705	sulfur oxidation protein SoxZ	$5,0 \cdot 10^{-15}$	Alvin_2112	Dahl <i>et al.</i> (2008)
Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrB-Typ	Hden_0718	sulfide:quinone oxidoreductase	$2,0 \cdot 10^{-108}$	Sqr aus <i>Staphylococcus aureus</i>	Shen <i>et al.</i> (2016)
Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrD-Typ	/	/	/	Alvin_2145	Weissgerber <i>et al.</i> (2013)
Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrF-Typ	/	/	/	Alvin_1195	Weissgerber <i>et al.</i> (2013)
TauE	Hden_0720	protein of unknown function DUF81	/	/	Weinitschke <i>et al.</i> (2007)
TetH	/	/	/	AFE_0029	Kanao <i>et al.</i> (2007)
TsdA	Hden_2748	cytochrome c class I	$9,0 \cdot 10^{-52}$	Alvin_0091	Denkmann <i>et al.</i> (2012)
TusA	Hden_0698	SirA family protein	$6,0 \cdot 10^{-24}$	Alvin_2600	Stockdreher <i>et al.</i> (2014)

Für die Oxidation von Sulfid verfügt *Hyphomicrobium X* über eine Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase vom SqrB-Typ (Hden\_0718). Direkt vergesellschaftet in der gleichen Leserichtung konnten Gene gefunden werden, die für ein Protein mit einem Rhodanese-Motiv (Hden\_0719), ein Protein mit einem TauE-Motiv (Sulfit-Exporter, Hden\_0720) und ein Protein mit einem  $\beta$ -Lactamase-Motiv (Hden\_0721) kodieren. Eine ähnliche Anordnung von Homologen zu diesen Genen ist unter anderem für das CST-Operon in *Staphylococcus aureus* bekannt (Grossoehme *et al.*, 2011).

Weiterhin konnte in *Hyphomicrobium X* ein Protein mit einer hohen Ähnlichkeit zu FccA (Flavocytochrom c Sulfid Dehydrogenase, Hden\_1401) und ein weiteres mit einer niedrigen Ähnlichkeit zu FccB (Hden\_0890) identifiziert werden. Das Gen, das für Letzteres kodiert, liegt hierbei in einem anderen Genlokus. Für die Oxidation von Persulfiden konnte eine potentielle Persulfiddioxygenase (Hden\_0740) identifiziert werden. Gene, die für ein Dsr-System zur Oxidation von Schwefel kodieren (Dahl *et al.*, 2008), beherbergt das Genom von *Hyphomicrobium X* nicht. Stattdessen liegt ein kompletter *hdr*-ähnlicher Genlokus (Hden\_0689-Hden\_0694) in direkter genetischer Nähe zu einem Gen für ein Lipoatbindeprotein (Hden\_0696) vor.

Bekannte Systeme zur Oxidation von Sulfit wie SoeABC (Dahl *et al.*, 2013) oder die Kombination aus Sat (Sulfat-Adenyltransferase) und AprABM (Adenylsulfat-Reduktase) (Dahl *et al.*, 2008) konnten nicht für *Hyphomicrobium X* gefunden werden, dafür aber ein Protein mit einer Ähnlichkeit zur Sulfitoxidase SorA (Hden\_1146). Ein Homolog zu SorB beinhaltet das Genom von *Hyphomicrobium X* nicht, jedoch liegt Hden\_1146 in einem Gencluster mit einem weiteren Gen, das für ein potentielles Mono-Häm *c*-Typ Cytochrom kodiert (Hden\_1145). Es muss beachtet werden, dass Hden\_1146 gleichzeitig eine hohe Ähnlichkeit zu SoxC und Hden\_1145 eine Ähnlichkeit zu SoxD aufwies. Ein potentieller Sulfit-Exporter mit einem TauE-Motiv (Hden\_0720) konnte ebenfalls gefunden werden. Für eine mögliche Oxidation von Thiosulfat verfügt der Organismus über homologe Proteine (SoxABCDXYZ) zum biochemisch charakterisierten Sox-System. Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass die Gene, die für SoxC und SoxD kodieren, zusammen mit einer Kopie eines Fusionsproteins aus SoxY und SoxZ in einem Operon vorliegen, während die Gene für SoxABXYZ in einem getrennten Operon an einer anderen Stelle des Genoms gefunden werden konnten. Zudem zeigte sich, dass das SoxD-Homolog (Hden\_1145) eine trunkierte Version von SoxD darstellte. Das entsprechende Protein wies Ähnlichkeiten zum N-Terminus von SoxD aus *Paracoccus pantotrophus* auf, ist mit einer Länge von 180 Aminosäuren aber deutlich kleiner als das *P. pantotrophus* SoxD (384 AS) und zeigte zudem nur eine der beiden charakteristischen *c*-Typ-Cytochrom-Bindemotive (CxxCH). Als weiteres potentiell Thiosulfat oxidierendes Enzym konnte ein TsdA-Homolog (Thiosulfatdehydrogenase, Hden\_2748) gefunden werden. Homologe zu Tetrathionat degradierenden Enzymen wurden hingegen nicht identifiziert.

Für die potentielle Metabolisierung von Organoschwefelverbindungen konnte ein Homolog zur Methanthioloxidase (Hden\_0743) identifiziert werden, während keine DMS-Monooxygenase ermittelt wurde. Stattdessen wurde mit Hden\_0734 ein potentiell homologes Protein zu DsoF (DMS-Oxidase) gefunden, wobei die übrigen Komponenten eines möglichen Dso-Komplexes (DsoABCDE) nicht im Genom von *Hyphomicrobium X* kodiert werden. Eine ähnliche Situation konnte für Homologe zur DMSO-Reduktase gefunden werden. Mit Hden\_1433 und Hden\_0927 liegen Proteine mit einer Ähnlichkeit zu DmsA bzw. DmsB vor, jedoch sind diese in zwei verschiedenen Regionen des Genoms kodiert und ein Homolog zu DmsC fehlt vollständig.

#### **4.1.2 Entwicklung eines genetischen Systems für *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup>**

Um ein genetisches System für den Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> entwickeln zu können, wurden zunächst basale Parameter wie der Zusammenhang zwischen der OD600<sub>nm</sub> und der korrespondierenden Zellzahl ermittelt. Es zeigte sich, dass eine OD600<sub>nm</sub> von 0,1 einer Zellzahl von  $4,9 \cdot 10^7$  kolonieformenden Einheiten pro Milliliter (Cfu/mL) entsprach.

Weiterführend sollten geeignete Resistenzmarker für mögliche genetische Arbeiten gefunden werden. Hierbei sollten zunächst im Rahmen eines Antibiotogramms Antibiotika gefunden werden, in deren

Gegenwart *Hyphomicrobium X* eine möglichst geringe Spontanmutationsrate aufwies. Die Auswahl der Antibiotika für das Antibiotogramm erfolgte basierend auf der Verfügbarkeit von Resistenzmarkern. Für die Auswertung des durchgeführten Antibiotogramms (3.1.5 und Tab. 11) wurden die Platten bis zu 21 Tage inkubiert und die auf antibiotikahaltigen Platten gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Spontanmutationsrate wurde als Quotient der gewachsenen Kolonien und der theoretisch ausplattierten kolonieformenden Einheiten ermittelt (Tab. 16).

**Tab. 16: Ergebnisse des Antibiotogramms.** Die angegebenen Spontanmutationsraten ergeben sich aus den Mittelwerten der Spontanmutationsraten aller Antibiotikakonzentrationen, bei denen ein Koloniewachstum verzeichnet werden konnte.

Antibiotikum	MW Spontanmutationsrate	Wachstum bis Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]
Neomycin	$3,5 \cdot 10^{-7}$	50
Erythromycin	$9,9 \cdot 10^{-6}$	500
Nalidixinsäure	1	500
Ampicillin	0	0
Tetracyclin	$9,7 \cdot 10^{-9}$	5
Gentamicin	$2,2 \cdot 10^{-7}$	100
Kanamycin	$1,6 \cdot 10^{-7}$	500
Trimethoprim	1	500
Rifampicin	$2,0 \cdot 10^{-8}$	50

Neben der in der Literatur bereits beschriebenen natürlichen Resistenz gegen Chloramphenicol konnten für *Hyphomicrobium X* zusätzlich natürliche Resistenzen gegen Nalidixinsäure und Trimethoprim nachgewiesen werden. Bei Wachstum in Gegenwart von Tetracyclin wurde eine sehr geringe Spontanmutationsrate auch in Gegenwart von niedrigen Antibiotikakonzentrationen festgestellt. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Versuche zur Etablierung eines genetischen Systems mit Tetracyclin als Antibiotikum und einer entsprechenden plasmidkodierten Resistenzkassette als Selektionsmarker durchgeführt. Es wurde versucht, das in der Literatur beschriebene Protokoll zum Einbringen von Plasmiden in *Hyphomicrobium X* (Gliesche, 1997) unter Verwendung des Plasmids pBBR1MCS-3 (Tab. 5) zu reproduzieren. Eine erfolgreiche Reproduktion konnte jedoch nicht erzielt werden.

Unter Orientierung an einem Protokoll zur Elektroporation von *Hyphomicrobium chloromethanicum* (Borodina *et al.*, 2004) konnten nach einigen Modifikationen (3.1.9, 3.1.10) Zellen von *Hyphomicrobium X* detektiert werden, die erfolgreich mit pBBR1MCS-3 transformiert wurden. Die Plasmiddetektion erfolgte hierbei via PCR. Eine Aufreinigung des Plasmides aus den Zellen konnte nicht bewerkstelligt werden. Im Rahmen der Entwicklung des Elektroporationsprotokolls wurde festgestellt, dass die Wahl der Kohlenstoffquelle in den Selektionsplatten und bei der Herstellung von elektrisch kompetenten Zellen einen Einfluss auf die Entwicklung von Spontanresistenzen gegen Tetracyclin hatte. Im Rahmen von einzelnen Elektroporationen wiesen die Kontrollplatten mit Methylamin als Kohlenstoffquelle um bis zu zwei Zehnerpotenzen mehr Kolonien auf im Vergleich zu

Kontrollplatten mit Methanol als Kohlenstoffquelle. Eine statistische Auswertung dieser Beobachtungen wurde nicht vorgenommen. Das entwickelte Protokoll zum Einbringen von Plasmiden in *Hyphomicrobium X* via Elektroporation wurde für alle nachfolgenden Experimente verwendet.

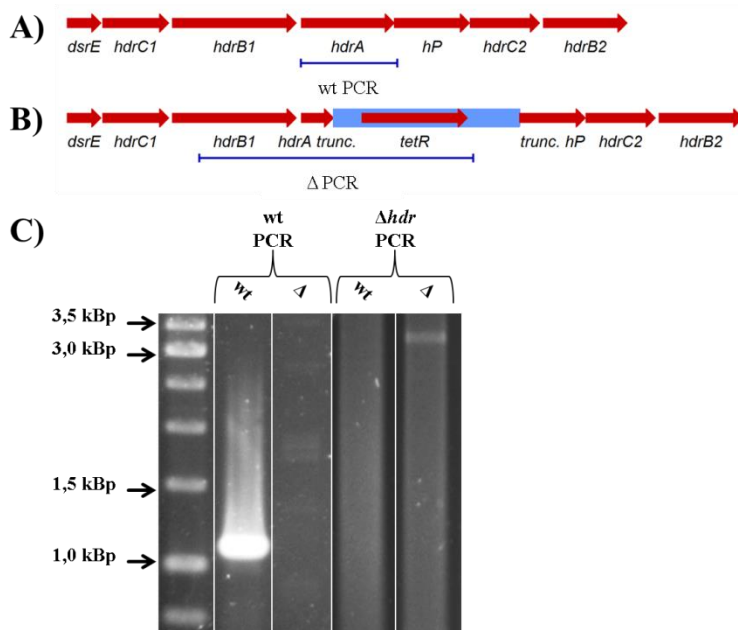
Das in der Literatur beschriebene Protokoll zum Einbringen von Plasmiden in *Hyphomicrobium X* via Konjugation (Dijkhuizen *et al.*, 1984) konnte erfolgreich reproduziert werden, fand jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine weitere Verwendung.

#### **4.1.3 Entwicklung eines Systems zur gerichteten Mutagenese von *H. denitrificans* X<sup>T</sup> und Generierung von Knock-out- und Knock-in- Mutanten**

Nachdem erfolgreich ein System zum Einbringen von Plasmiden in *Hyphomicrobium X* etabliert werden konnte, sollte ein Protokoll zur gerichteten Mutagenese des Organismus entwickelt werden. Das Ziel war hierbei, über den Ansatz der reversen Genetik Aufschlüsse über die Funktion einzelner Gene und deren Genprodukte im Stoffwechsel von *Hyphomicrobium X* zu gewinnen. Deshalb wurden zunächst Vektoren ermittelt, die in *Hyphomicrobium X* nicht replikativ waren. Die Vektoren pk18*mobsacB*, pASKIBA3+ und pET-22b(+) erfüllten diese Anforderung. Elektroporationsansätze mit den jeweiligen Plasmiden, die auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert wurden, führten im Fall von pASKIBA3+ und pET-22b(+) zu keiner Koloniebildung und im Fall von pk18*mobsacB* zu einer Koloniebildung im Rahmen der Spontanmutationsrate. Während die Vektoren pASKIBA3+ und pET-22b(+) prinzipiell nur für eine gerichtete Mutagenese geeignet sind, bei der ein Resistenzmarker im Genom zurückgelassen wird, kann der Vektor pk18*mobsacB* auch für eine markerlose *in frame* Deletion verwendet werden. Durch das auf dem Vektor vorhandene Suicide-Gen *sacB* – kodiert für eine Levansucrase – kann in Gegenwart von Saccharose eine Negativselektion auf das Vorhandensein des Vektors durchgeführt werden. Die Voraussetzung hierfür ist, dass der zu manipulierende Organismus weder durch Saccharose im Medium (10 % (m/v)) inhibiert wird noch diese verstoffwechseln kann. Beides konnte experimentell für *Hyphomicrobium X* bestätigt werden.

Über den Ansatz der reversen Genetik sollte mehr über die putative Rolle eines Hdr-ähnlichen Komplexes im Schwefelstoffwechsel erfahren werden. Basierend auf der zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente aktuellen Literaturlage wurde HdrA als essentieller Bestandteil von Hdr-Komplexen in methanogenen Archaeen angesehen, da diese Untereinheit eine Elektronen-Bifurkation katalysiert (Kaster *et al.*, 2011). Unter der Annahme einer ähnlichen Funktion für HdrA in Hdr-ähnlichen Komplexen wurde eine Knock-out-Strategie für *Hyphomicrobium X* entwickelt. Bei dieser sollten der C-Terminus von *hdrA* (Hden\_0691) und der N-Terminus des nachfolgenden Gens (Hden\_0692) durch eine  $\Omega$ -Tetracyclin-Kassette ersetzt werden (Abb. 8). Durch eine Termination der Transkription von stromabwärts liegenden Genen, vermittelt durch die Elemente der  $\Omega$ -Kassette (Fellay *et al.*, 1987), sollten zudem die übrigen, in der gleichen Leserichtung liegenden Gene des *hdr*-ähnlichen Genclusters funktionell ausgeschaltet werden. Unter Verwendung der Primer Fwd\_3' $\Delta$ hdr,

Rev\_3' $\Delta$ hdr, Fwd\_5' $\Delta$ hdr und Rev\_5' $\Delta$ hdr wurde mittels SOE-PCR (Horton, 1995) das Plasmid pET-22b $\Delta$ hdr generiert. Das Plasmid enthält jeweils 1 kB homologe DNS-Sequenzen zum Stromaufwärts- und zum Stromabwärts-Bereich des zu deletierenden Fragmentes von 801 Bp. In die Mitte der flankierenden homologen Sequenzen wurde eine  $\Omega$ -Tetracyclin-Kassette aus dem Plasmid pHP45 $\Omega$ -Tc inseriert, was zur Generierung von pET-22b $\Delta$ hdrTc führte. Der für den Knock-out relevante Bereich wurde zudem via Restriktionsverdau aus pET-22b $\Delta$ hdrTc ausgeschnitten und in den Vektor pASKIBA3+ ligiert (pASKIBA3+ $\Delta$ hdr). Die Plasmide pET-22b $\Delta$ hdrTc und pASKIBA3+ $\Delta$ hdr wurden in *H. denitrificans* Sm200 elektroporiert. Zellen, die auf Selektivnährmedium mit Tetracyclin und Chloramphenicol wuchsen, wurden mittels zwei verschiedener PCRs auf ihren Genotyp hin untersucht (Abb. 8).

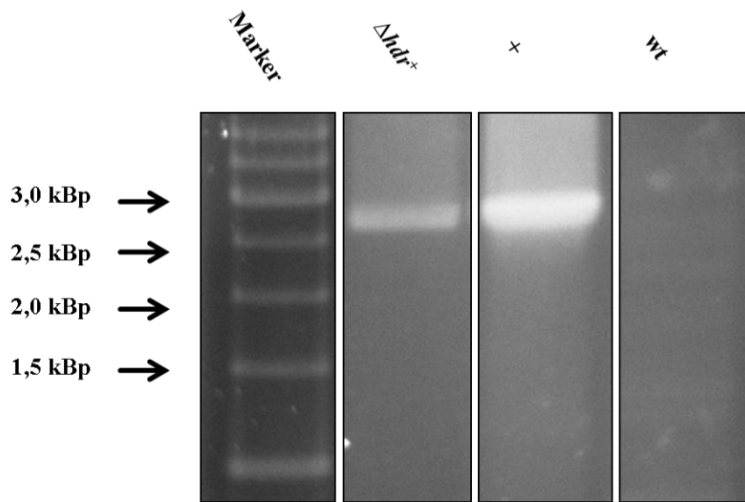


**Abb. 8:** *hdr*-Genlokus in wildtypischem *Hyphomicrobium X* (A) und  $\Delta$ *hdr*-Mutanten (B) sowie Verifizierung des Genotyps mittels PCR (C). Unter Verwendung der Primer Fwd\_Hden0691 und Rev\_Hden0691 für die Wildtyp-PCR (wt PCR) wurde für wildtypische Zellen ein 1095 Bp-PCR-Produkt generiert, während bei  $\Delta$ *hdr*-Mutanten kein Produkt gebildet wurde. Die Primer-Kombination Fwd\_dgen\_HdrB1 und Rev\_tetR-Ko lieferte bei  $\Delta$ *hdr*-Mutanten ein 3110 Bp-PCR-Produkt und bei wildtypischen Zellen kein Amplifikat.

Mittels PCR konnte erfolgreich der Stamm *H. denitrificans*  $\Delta$ *hdr* identifiziert werden. Der korrekte Genotyp des Stammes wurde zusätzlich durch eine Southern-Blot-Analyse verifiziert (hier nicht gezeigt).

Zur Komplementierung der  $\Delta$ *hdr*-Mutante wurde das Plasmid pBBR1p264HdenHdr generiert (Tab. 5). Dieses enthält den kompletten erweiterten *hdr*-Genlokus (Hden\_0688-Hden\_0696) von *Hyphomicrobium X* unter der Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors aus *Gluconobacter oxydans*. Das Plasmid wurden in *H. denitrificans*  $\Delta$ *hdr* elektroporiert. Unter den getesteten Bedingungen konnte keine erfolgreiche Komplementation der  $\Delta$ *hdr*-Mutante mit Kanamycin als Selektionsmarker verzeichnet werden. Deshalb wurde eine Rifampin-Resistenz als Marker getestet. Das Plasmid pBBR1p264HdenHdrRif (Tab. 5) wurde in *H. denitrificans*  $\Delta$ *hdr* elektroporiert. Es war

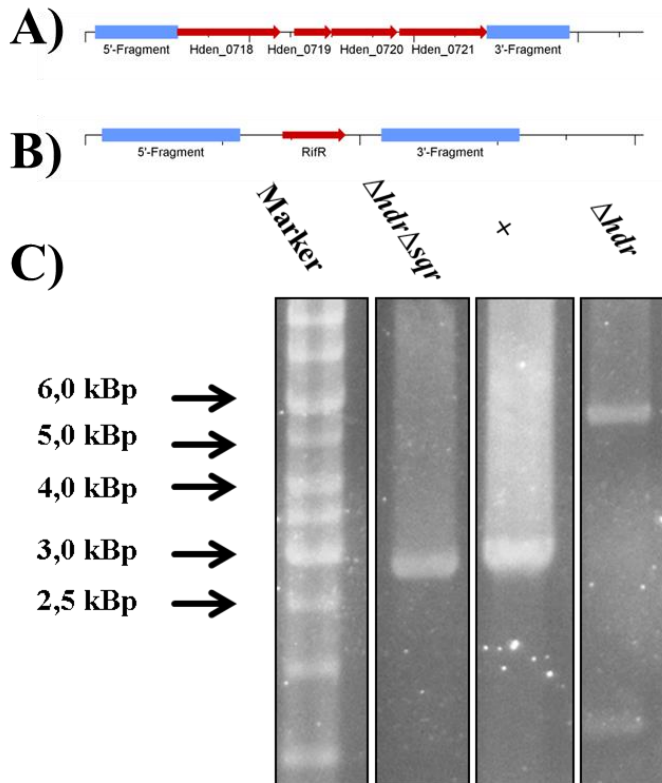
nicht möglich, das Plasmid aus Zellen aufzureinigen, die auf einem Selektivnährmedium wuchsen. Mittels PCR konnte jedoch das Plasmid in den Zellen nachgewiesen werden (Abb. 9).



**Abb. 9: Verifizierung des Genotyps von *H. denitrificans*  $\Delta\text{hdr}^+$  mittels PCR.** Unter Verwendung der Primer Fwd\_rifR und Rev\_php45Km wurde ein 2595 Bp-Fragment vom Vektorrückrad amplifiziert und das Plasmid pBBR1p264HdenHdrRif nachgewiesen. Wildtypische Zellen enthalten das Plasmid nicht und zeigten kein Amplifikat. Als Positivkontrolle diente das aufgereinigte Plasmid pBBR1p264HdenHdrRif als Template.

Neben dem *hdr*-ähnlichen Genlokus verfügt *Hyphomicrobium X* zusätzlich über ein dem *cst*-Operon aus *Staphylococcus aureus* (Grossoehme et al., 2011) ähnliches Gencluster (Tab. 15). Dieses enthält neben einem Gen für eine Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase vom SqrB-Typ (Hden\_0718) auch direkt vergesellschaftet in der gleichen Leserichtung im Genom Gene, die für ein Protein mit einem Rhodanese-Motiv (Hden\_0719), ein Protein mit einem TauE-Motiv (Sulfit-Exporter, Hden\_0720) und ein Protein mit einem  $\beta$ -Lactamase-Motiv (Hden\_0721) kodieren. Diese Proteine könnten in den dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel involviert sein. Um eine mögliche Verfälschung der phänotypischen Analyse der  $\Delta\text{hdr}$ -Mutante ausschließen zu können, sollte entsprechend eine  $\Delta\text{hdr}\Delta\text{sqr}$ -Doppelmutante generiert werden. Hierfür wurde das zuvor für die Generierung der  $\Delta\text{hdr}$ -Mutante beschriebene Verfahren angewendet.

Das Plasmid pET-22b $\Delta$ SQRKm (Tab. 5) wurden in *H. denitrificans*  $\Delta\text{hdr}$  elektroporiert. In Zellen, die auf einem Selektivnährmedium wuchsen, konnte das Plasmid nicht nachgewiesen werden. Da unter den getesteten Bedingungen keine  $\Delta\text{hdr}\Delta\text{sqr}$ -Doppelmutante mit Kanamycin als Selektionsmarker generiert werden konnte, wurde eine Rifampin-Resistenz als Marker getestet. Hierfür wurde das Plasmid pET-22b $\Delta$ SQRRif (Tab. 5) in *H. denitrificans*  $\Delta\text{hdr}$  elektroporiert. Mittels PCR konnte erfolgreich der Stamm *H. denitrificans*  $\Delta\text{hdr}\Delta\text{sqr}$  identifiziert werden (Abb. 10). Zusätzlich wurde der Genotyp des Stamms durch einen Southern Blot verifiziert (hier nicht gezeigt).



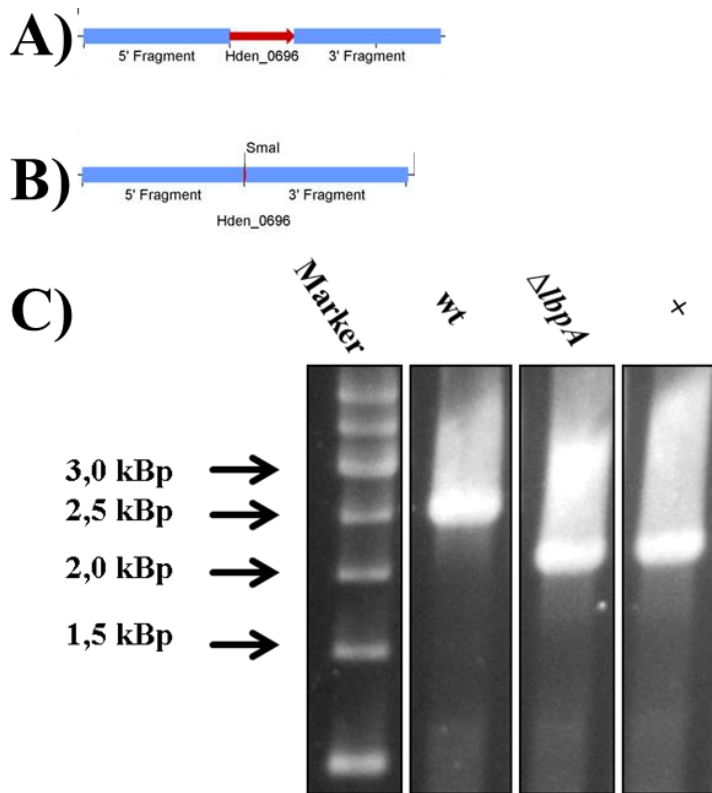
**Abb. 10:** *sqr*-Genlocus in wildtypischem *Hyphomicrobium X* (A) und  $\Delta$ *sqr*-Mutanten (B) sowie Verifizierung des Genotyps mittels PCR (C). Unter Verwendung der Primer Fwd\_3' $\Delta$ sqr und Fwd\_5' $\Delta$ sqr wurde im Fall einer erfolgreichen Deletion des *sqr*-Genlokus ein PCR-Produkt von 3053 Bp Länge erwartet und für den wildtypischen Genlocus ein Produkt von 5786 Bp. Als Positivkontrolle diente das aufgereinigte Plasmid pET-22b $\Delta$ SQRRif als Template, als Negativkontrolle gDNS von *H. denitrificans*  $\Delta$ *hdr*.

Eine Komplementation der  $\Delta$ *hdr* $\Delta$ *sqr*-Mutante war in Ermangelung weiterer Resistenzmarker nicht möglich.

Untersuchungen der erweiterten Umgebung *hdr*-ähnlicher Genloki führten zur Identifizierung von Genen, die hochkonserviert zusammen mit *hdr*-ähnlichen Proteinen auftreten (Liu *et al.*, 2014; Venceslau *et al.*, 2014; Dahl, 2015). Ein besonderes Interesse galt im Rahmen der vorliegenden Arbeit den Genen, die für ein möglicherweise Lipoat-bindendes Protein (LbpA) kodieren. Im Fall von *Hyphomicrobium X* liegt *lbpA* (Hden\_0696) direkt stromabwärts der *hdr*-ähnlichen Gene (Hden\_0689-Hden\_0694) in derselben Leserichtung im Genom. In der Literatur wurde bereits die Hypothese formuliert (Liu *et al.*, 2014; Dahl, 2015), dass LbpA ein Interaktionspartner für einen *Hdr*-ähnlichen Komplex sein könnte. Deshalb sollte eine Deletionsmutante generiert werden. Um unbeabsichtigte Effekte einer ins Genom inserierten Resistenz-Kassette auf andere Gene im selben Gencluster zu vermeiden, sollte eine markerlose *in frame* Deletion von Hden\_0696 vorgenommen werden. Unter Verwendung der Primer Fwd\_3' $\Delta$ lbpA, Rev\_3' $\Delta$ lbpA, Fwd\_5' $\Delta$ lbpA und Rev\_5' $\Delta$ lbpA wurde mittels SOE-PCR das Plasmid pk18*mobsacB* $\Delta$ lbpA generiert. Das Plasmid enthält jeweils 1 kB homologe DNS-Sequenzen zum Stromaufwärts- und Stromabwärts-Bereich des zu deletierenden Fragmentes von 435 Bp (Abb. 11). Hierbei wurde mit Ausnahme des Start- und des Stop-Codons die restliche kodierende Sequenz von *lbpA* durch eine *Sma*I-Schnittstelle ersetzt. Die  $\Omega$ -Tetracyclin-



Kassette aus dem Plasmid pHP45Ω-Tc wurde in das Vektorrückrad inseriert, was zur Entstehung von pk18*mobsacB*Δ*lbpA*Tc führte. Das Plasmid wurde in *H. denitrificans* Sm200 elektroporiert. Zellen, die auf einem Selektivnährmedium wuchsen, wurden mittels PCR mit den Primern Fwd\_3'Δ*lbpA* und Fwd\_5'Δ*lbpA* auf eine Single-Crossover-Rekombination des Plasmids in das Genom der Zellen hin untersucht (Abb. 11).



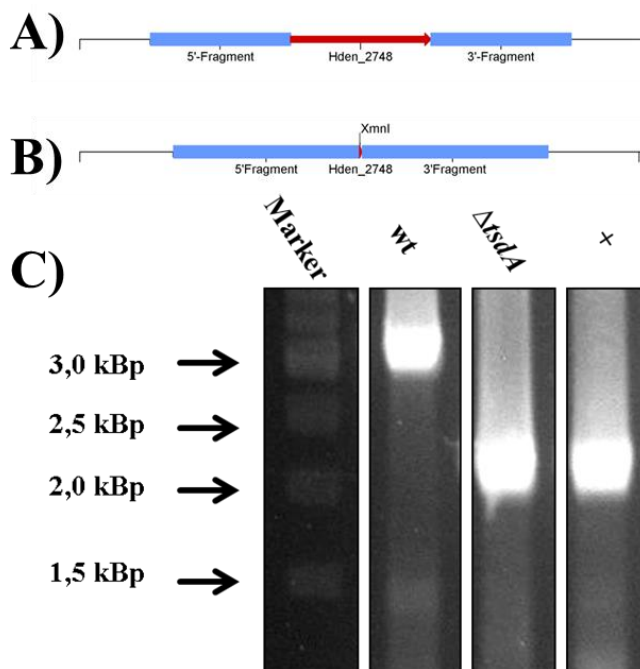
**Abb. 11:** *lbpA*-Genlokus in wildtypischem *Hyphomicrobium* X (A) und  $\Delta lbpA$ -Mutanten (B) sowie Verifizierung des Genotyps mittels PCR (C). Unter Verwendung der Primer Fwd\_3'Δ*lbpA* und Fwd\_5'Δ*lbpA* wurde im Fall einer erfolgreichen Deletion des *lbpA*-Genlokus ein PCR-Produkt von 2032 Bp Länge erwartet und für den wildtypischen Genlokus ein Produkt von 2461 Bp. Als Positivkontrolle diente das aufgereinigte Plasmid pk18*mobsacB*Δ*lbpA*Tc als Template, als Negativkontrolle gDNS von *H. denitrificans* Sm200.

Eine verifizierte Single-Crossover-Mutante wurde nachfolgend als Flüssigkultur mit Streptomycin als einzigem Antibiotikum inkubiert, um den Zellen durch ein weiteres Rekombinationsereignis den Verlust der Tetracyclin-Resistenz zu ermöglichen und Doppel-Crossover-Mutanten zu generieren. Diese sollten entweder eine erfolgreiche Deletion von *lbpA* oder einen wildtypischen *lbpA*-Genlokus aufweisen (Abb. 11). Zur Selektion wurde die Flüssigkultur in der späten exponentiellen Wachstumsphase auf Selektivnährmedium mit Chloramphenicol und 10 % (m/v) Saccharose ausplattiert. Gewachsene Kolonien wurden auf eine erfolgreiche Deletion von *lbpA* hin untersucht (Abb. 11). Der Stamm *H. denitrificans*  $\Delta lbpA$  konnte erfolgreich identifiziert werden. Der korrekte Genotyp wurde zusätzlich via Southern Blot verifiziert (hier nicht gezeigt). Eine Komplementation der  $\Delta lbpA$ -Mutante wurde nicht durchgeführt.

*Hyphomicrobium* X besitzt ein Gen, das für eine Thiosulfatdehydrogenase vom TsdA-Typ (Hden\_2748) kodiert (Tab. 15). Um überprüfen zu können, inwieweit dieses Enzym eine Relevanz im

Rahmen eines möglichen oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium X* besitzt, sollte eine markerlose *in frame* Deletion des Gens vorgenommen werden. Hierbei fand das zuvor für die Erzeugung der  $\Delta lbpA$ -Mutante beschriebene Verfahren Anwendung.

Das Plasmid  $pk18mobsacB\Delta tsdATc$  wurden in *H. denitrificans* Sm200 elektroporiert. Klone, die auf Selektivnährmedien wuchsen, wurden via PCR auf eine Single-Crossover-Rekombination des Plasmids hin untersucht (hier nicht gezeigt). Ausgehend hiervon wurde eine Doppel-Crossover-Mutante erzeugt. Mittels PCR konnte erfolgreich der Stamm *H. denitrificans*  $\Delta tsdA$  identifiziert werden (Abb. 12).

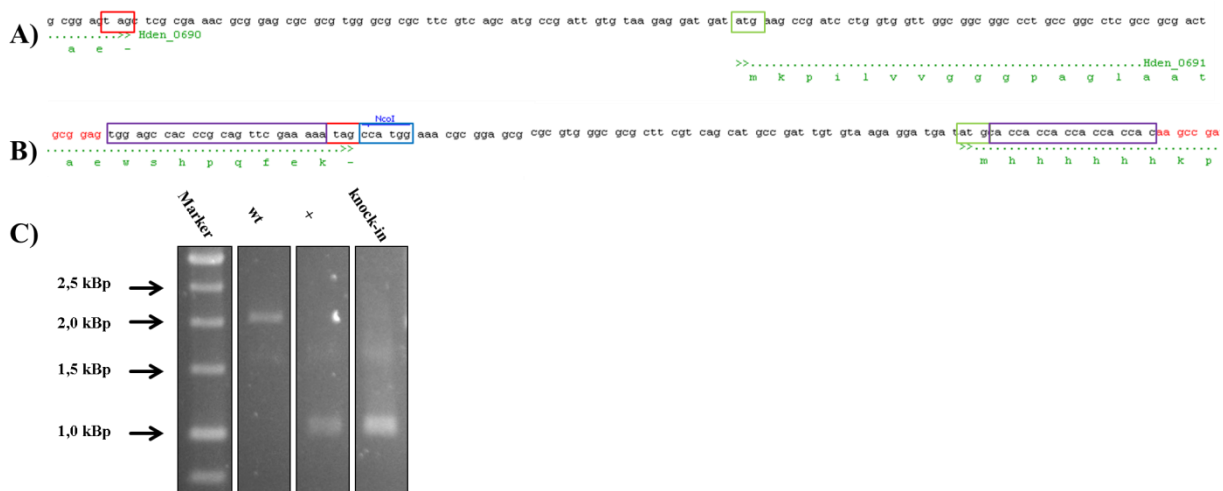


**Abb. 12:** *tsdA*-Genlokus in wildtypischem *Hyphomicrobium X* (A) und  $\Delta tsdA$ -Mutanten (B) sowie Verifizierung des Genotyps mittels PCR (C). Unter Verwendung der Primer Fwd\_5' $\Delta tsdA$  und Rev\_3' $\Delta tsdA$  wurde im Fall einer erfolgreichen Deletion des *tsdA*-Genlokus ein PCR-Produkt von 2034 Bp Länge erwartet und für den wildtypischen Genlokus ein Produkt von 3021 Bp. Als Positivkontrolle diente das aufgereinigte Plasmid  $pk18mobsacB\Delta tsdATc$  als Template, als Negativkontrolle gDNS von *H. denitrificans* Sm200.

Der korrekte Genotyp des Stammes wurde zusätzlich via Southern-Blot-Analyse verifiziert (hier nicht gezeigt).

Um einen Hdr-ähnlichen Komplex aus *Hyphomicrobium X* für weiterführende Untersuchungen aufzureinigen, wurden verschiedene Strategien entwickelt. Eine einfache Aufreinigung durch eine Affinitätschromatographie wurde als ökonomischste Strategie befunden. Deshalb sollte durch homologe Rekombination Affinitäts-Tags an zentrale Proteine des möglichen Komplexes fusioniert werden. Eine Untersuchung des *hdr*-ähnlichen Genlokus in *Hyphomicrobium X* führte zu dem Ergebnis, dass der N-Terminus von HdrA (Hden\_0691) und der C-Terminus HdrB1 (Hden\_0690) am besten für die Strategie geeignet sind. Zwischen den kodierenden Genen liegt eine größere, nicht kodierende Region im Genom vor und entsprechend ist es unwahrscheinlich, dass eine Fusion von Affinitäts-Tags die Transkription bzw. die Translation benachbarter Gene und deren Genprodukte

beeinflusst (Abb. 13). Bei den übrigen Genen im *hdr*-ähnlichen Genlokus ist dies nicht der Fall, potentielle Tag-Fusionen würden den Abstand von Ribosomenbindestellen zum dazugehörigen Start-Codon verändern. Das gewünschte DNS-Fragment wurde *in silico* designt und bei der Firma Eurofins (Nantes, Frankreich) bestellt. Es bestand aus einem 2122 Bp-Fragment und umfasste jeweils eine 1 kB Stromaufwärts- und Stromabwärts-Sequenz vom 3'-Ende von *hdrB1* und dem 5'-Ende von *hdrA*. Zusätzlich wurde hinter das letzte für ein Glutamat kodierende Triplet von *hdrB1* die Sequenz eines Strep-tags sowie hinter das Stop-Codon eine NcoI-Schnittstelle eingefügt (Abb. 13). Zudem wurde die Sequenz von *hdrA* um ein His-tag direkt nach dem Start-Codon erweitert. Das gesamte 2122 Bp-Fragment beinhaltet zusätzlich eine XbaI-Schnittstelle am 5'-Ende und eine HindIII-Schnittstelle am 3'-Ende.

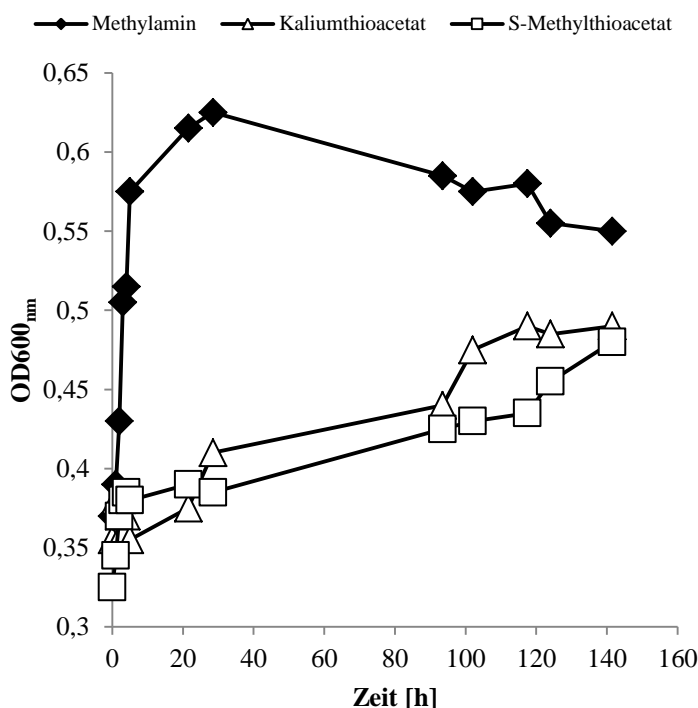


**Abb. 13:** *hdr*-Genlokus in wildtypischem *Hyphomicrobium* X (A) und Knock-in-Mutanten (B) sowie Verifizierung des Genotyps mittels PCR und Restriktionsverdau (C). Unter Verwendung der Primer Fwd\_Knockin\_screen und Rev\_Knockin\_screen wurde im Fall eines erfolgreichen Knock-ins ein PCR-Produkt von 2112 Bp Länge erwartet, das bei einem Verdau mit NcoI ein 1028 Bp- und ein 1084 Bp-Fragment liefern sollte. Für den wildtypischen Genlokus wurde ein Produkt von 2070 Bp bei der PCR erwartet. Durch die fehlende NcoI-Schnittstelle würde dieses Fragment auch nach einem Restriktionsverdau bestehen bleiben. Als Positivkontrolle diente das aufgereinigte Plasmid pk18mobsacBKknockinTc als Template, als Negativkontrolle gDNS von *H. denitrificans* Sm200.

Um einen markerlosen *in frame* Knock-in bewerkstelligen zu können, wurde eine äquivalente Methode zur Generierung von markerlosen *in frame* Deletionen verwendet. Das Plasmid pk18mobsacBKknockinTc (Tab. 5) wurde in *H. denitrificans* Sm200 elektroporiert. Single-Crossover-Mutanten wurden via PCR identifiziert (hier nicht gezeigt) und zur Generierung einer Doppel-Crossover-Mutante verwendet. Eine Verifizierung der Mutanten erfolgte erneut durch eine PCR (Abb. 13). Die gewonnenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt und einem Restriktionsverdau mit NcoI unterzogen. Im Fall von wildtypischen Zellen kann das Fragment (2070 Bp) nicht verdaut werden, da keine NcoI-Schnittstelle vorliegt, während Knock-in-Mutanten die inserierte Schnittstelle aufweisen und das PCR-Produkt (2112 Bp) in zwei Fragmente (1028 Bp und 1084 Bp) zerlegt wird. Mittels PCR und angeschlossenen Restriktionsverdaus konnte erfolgreich der Stamm *H. denitrificans* knock-in identifiziert werden.

#### 4.1.4 Screening nach metabolisierbaren schwefelhaltigen Substraten für *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup>

In der Literatur ist beschrieben, dass *Hyphomicrobium X* weder Thiosulfat noch methylierte Schwefelverbindungen wie DMS oder DMSO metabolisieren kann (Suylen *et al.*, 1986). Deshalb sollten alternative schwefelhaltige Substrate für *Hyphomicrobium X* gefunden werden. Als fakultativer Methylophiler verstoffwechselt *Hyphomicrobium X* vorzugsweise C-1- oder C-2-Verbindungen (Urakami *et al.*, 1995). Deshalb wurden derartige Substrate gesucht, die zusätzlich noch ein Schwefelatom enthalten. Als Auswahlkriterien dienten die Verfügbarkeit, die Toxizität, bereits in der Literatur vorhandene Beispiele für eine mikrobielle Degradation der Substanz, die Möglichkeit, die Substanz zu quantifizieren, sowie allgemeine physikalische Eigenschaften, die ein Arbeiten mit dem Substrat behindern könnten. Es konnten acht geeignete Substrate (2-Mercaptoethanol, Ethylthioacetat, Kaliumthioacetat, Methyl-(methylthio)acetat, S-Methylthioacetat, Thioacetamid, Thioglycolsäure, Trimethylsulfonium) gefunden werden (Tab. 12). Als qualitativer Test, ob *Hyphomicrobium X* die genannten Substrate zum Wachstum nutzen kann, wurden mit 10 mM Methylamin vorgezogene Kulturen in Gegenwart von 10 mM der jeweiligen Substrate inkubiert und das Wachstum verfolgt. Als Kontrolle diente eine Kultur mit Methylamin als Substrat. Mit sechs der getesteten Substrate konnte kein Wachstum verzeichnet werden (nicht gezeigt), während mit Kaliumthioacetat und S-Methylthioacetat eine Zunahme der OD<sub>600nm</sub> festgestellt wurde (Abb. 14).



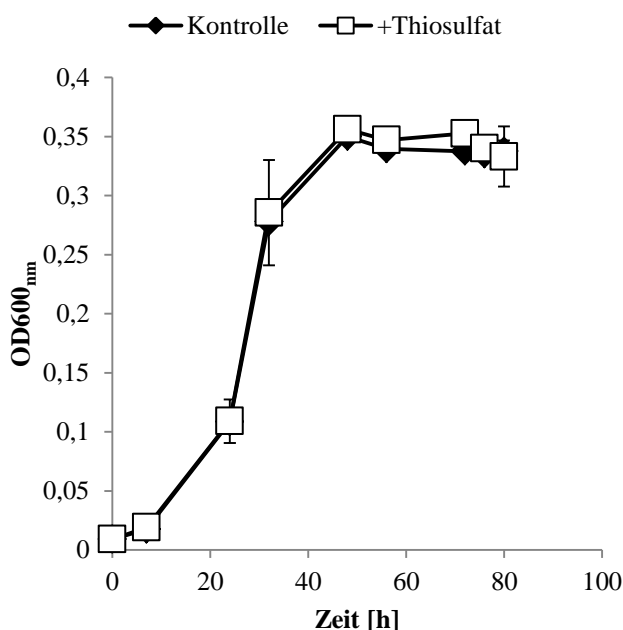
**Abb. 14:** Screening nach metabolisierbaren schwefelhaltigen Substraten für *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup>. Die Kulturen wurden wie unter 3.1.6 beschrieben kultiviert.

Während die Kontrollkultur mit Methylamin als Substrat innerhalb von weniger als 30 Stunden die Start-OD<sub>600nm</sub> annähernd verdoppelte, zeigten die Kulturen mit Kaliumthioacetat bzw. S-

Methylthioacetat als Substrat ein deutlich langsames Wachstum und erreichten innerhalb der untersuchten 140 Stunden nicht die End-OD<sub>600nm</sub> der Kontrolle. Die beobachtete Zunahme der OD<sub>600nm</sub> zeigte, dass *Hyphomicrobium X* mit Kaliumthioacetat und S-Methylthioacetat als alleinige Kohlenstoffquelle wachsen konnte.

#### 4.1.5 Untersuchungen zum Thiosulfat-Stoffwechsel in *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup>

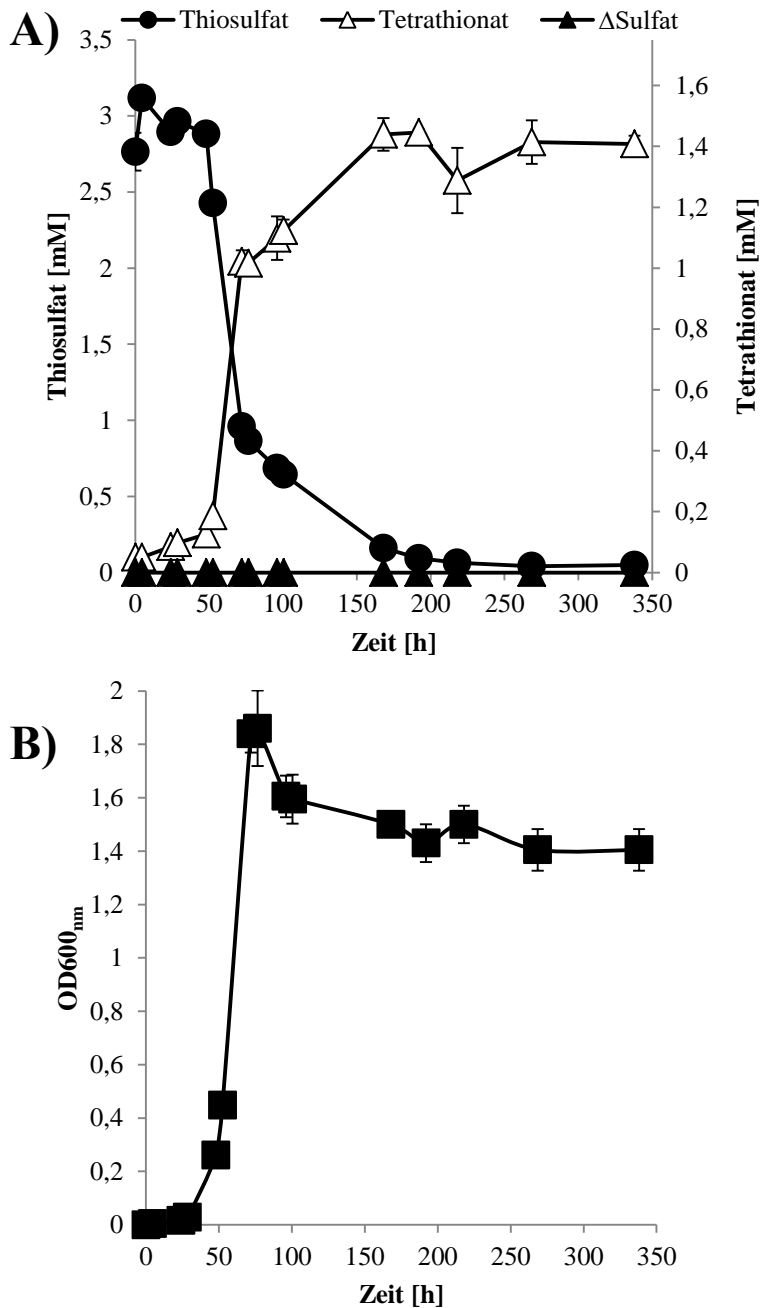
*Hyphomicrobium X* ist gemäß der Literatur im Gegensatz zu *Hyphomicrobium EG* in kontinuierlicher Kultur nicht zur Oxidation von Thiosulfat fähig (Suylen *et al.*, 1986). *Hyphomicrobium EG* bildete bei einer gleichzeitigen Fermentation mit Methylamin und 8,55 mM Thiosulfat als Substrate eine höhere Zellmasse und mehr Gesamtprotein. *Hyphomicrobium X* hingegen verstoffwechselte ausschließlich das Methylamin, während die reduzierte Schwefelverbindung nicht metabolisiert wurde. Die Ergebnisse der bioinformatischen Untersuchung von *Hyphomicrobium X* lieferten Grund zur Annahme, dass der Organismus verschiedene Enzyme zur Oxidation von Thiosulfat besitzt (Tab. 15). Deshalb sollte der Thiosulfatstoffwechsel von *Hyphomicrobium X* untersucht werden. Zunächst wurde überprüft, ob Thiosulfat im Medium einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Organismus hat (Abb. 15).



**Abb. 15: 8,55 mM Thiosulfat führten zu keiner höheren optischen Dichte beim Wachstum auf Methylamin.** *Hyphomicrobium X* wurde in ungepuffertem *Hyphomicrobium* Medium mit 10 mM Methylamin als Substrat (Kontrolle) und zusätzlich mit 10 mM Methylamin und 8,55 mM Thiosulfat (+Thiosulfat) kultiviert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

Bei einem Vergleich von Kulturen, die nur mit Methylamin als Substrat angezogen wurden, und Kulturen, die zusätzlich noch Thiosulfat im Medium enthielten, konnte kein verändertes Wachstumsverhalten festgestellt werden (Abb. 15). Ein möglicher Substratverbrauch (Thiosulfat) und die damit einhergehende Produktbildung (Tetrathionat, Sulfat) wurden nicht überprüft. Das reguläre *Hyphomicrobium* Medium enthält 8,3 mM Sulfat (Tab. 10). Entsprechend wäre die Quantifizierung

der Veränderung der Sulfat-Konzentration während einer Fermentation schwierig. Deshalb wurde ein Medium mit einem reduzierten Sulfatgehalt von 0,8 mM (0-Medium, Tab. 10) entwickelt. Mit diesem Medium wurde ein Wachstumsversuch mit 50 mM Methylamin und 3 mM Thiosulfat als Substrate durchgeführt (Abb. 16).



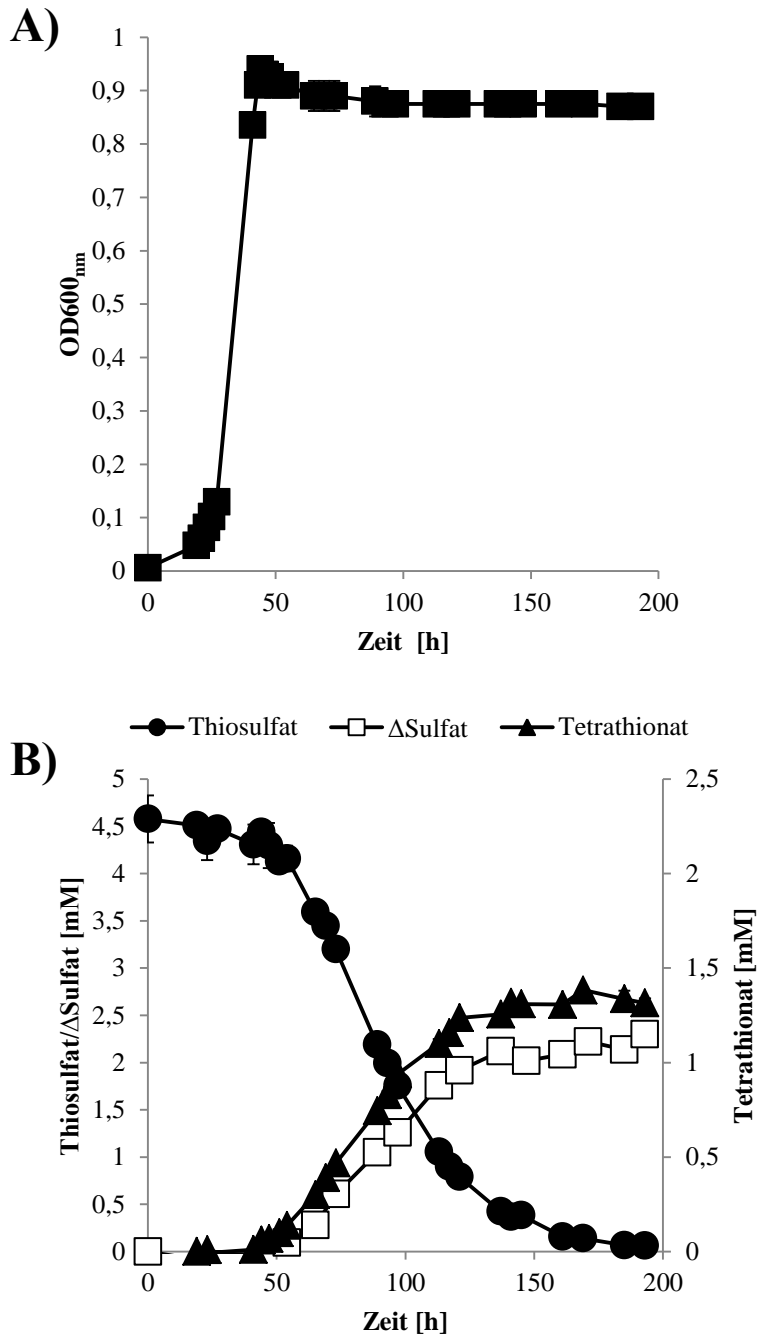
**Abb. 16:** *Hyphomicrobium X* setzte Thiosulfat stöchiometrisch zu Tetrathionat um. Dokumentation von Substratverbrauch und Produktbildung (A) und der Zunahme der OD<sub>600nm</sub> (B). Die Kulturen wurden in ungepuffertem 0-Medium mit 50 mM Methylamin und 3 mM Thiosulfat kultiviert. Der pH-Wert wurde nach 72 h mit 1 M NaOH auf 7,2 nachtitriert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

*Hyphomicrobium X* oxidierte unter den gewählten Versuchsbedingungen Thiosulfat annähernd stöchiometrisch zu Tetrathionat. Eine Veränderung der Sulfat-Konzentration des Mediums konnte nicht festgestellt werden. Die Oxidation von Thiosulfat setzte erst mit Beginn der exponentiellen

Wachstumsphase ein. Die Ansäuerung des Mediums durch die Oxidation von Methylamin zu  $\text{CO}_2$  in Kombination mit keiner ausreichenden Pufferkapazität des Mediums bewirkte ein Absinken des pH-Wertes der Kulturen auf pH 4 (72 h) und erforderte eine Nachtitration auf pH 7. Dies hatte eine Abnahme der Thiosulfat-Oxidationsrate von  $73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  auf  $7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  zur Folge, ebenso wie für die Tetrathionatbildungsrate ( $41 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  auf  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).

Das einzige bekannte Enzym, das Thiosulfat zu Tetrathionat oxidiert und im Genom von *Hyphomicrobium X* kodiert wird, ist die Thiosulfatdehydrogenase TsdA (Hden\_2748). Für dieses leicht acidophile periplasmatische Enzym sind aus anderen Organismen hohe spezifische Aktivitäten bekannt (Denkmann *et al.*, 2012). Um die Involvierung anderer Enzyme in den Thiosulfat-Metabolismus vom *Hyphomicrobium X* untersuchen zu können, sollten durch Veränderungen der Wachstumsparameter (pH 6–8, konstanter pH, 4–10 mM Thiosulfat, Methanol oder Methylamin als Kohlenstoffquelle, 1 g/L oder 2 g/L Ammoniumchlorid im Medium) Bedingungen gefunden werden, bei denen die Tetrathionatbildung minimiert wird. Dafür wurden Wachstumsversuche mit jeweils einzelnen geänderten Parametern durchgeführt (hier nicht gezeigt). Der einzige getestete Puffer ohne negativen Einfluss auf das Wachstum vom *Hyphomicrobium X* war 100 mM MOPS-Puffer. Die höchsten Thiosulfat-Oxidationsraten konnten bei einem leicht sauren konstanten pH (pH 6, 100 mM MOPS) mit Methylamin als Kohlenstoffquelle verzeichnet werden ( $280 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Mit Methanol als Kohlenstoffquelle wurden Sulfat und Tetrathionat als Oxidationsendprodukte gefunden. Mit Methylamin als Substrat fand eine exklusive Umsetzung von Thiosulfat zu Tetrathionat statt. Eine ähnliche Beobachtung konnte für variierende Stickstoffmengen im Medium gemacht werden. Bei 2 g/L Ammoniumchlorid im Medium wurde unabhängig von der Kohlenstoffquelle Thiosulfat ausschließlich zu Tetrathionat oxidiert, wohingegen bei 1 g/L bis zu 30 % des Schwefels aus dem Thiosulfat als Sulfat detektiert werden konnten. Je höher die getestete Thiosulfat-Konzentration war, desto höher war der prozentuale Anteil von Tetrathionat als Oxidationsendprodukt im Vergleich zu Sulfat. Einen exemplarischen Wachstumsversuch unter den Bedingungen, bei denen das meiste Sulfat gebildet wurde (konstanter pH 7,2, Methanol als Kohlenstoffquelle, 1 g/L Ammoniumchlorid), zeigt Abb. 17. Da das verwendete Kulturmedium bereits zu Versuchsbeginn 0,8 mM Sulfat enthielt, wurde die Veränderung der Sulfat-Konzentration als  $\Delta\text{Sulfat}$ -Wert angegeben. Die Betrachtung der Schwefelbilanz zeigte, dass nicht der gesamte in Form von Thiosulfat eingesetzte Schwefel ( $4,5 \text{ mM Thiosulfat} = 9 \text{ mM Schwefel}$ ) am Ende der Fermentation in Form von Tetrathionat ( $1,3 \text{ mM Tetrathionat} = 5,2 \text{ mM Schwefel}$ ) und Sulfat ( $2,3 \text{ mM}$ ) wiedergefunden wurde. Deshalb wurde der im Kulturüberstand enthaltene Gesamtschwefel rechnerisch zu jedem Messzeitpunkt bestimmt und der hieraus resultierende fehlende Schwefel kalkuliert. Es zeigte sich, dass die Zunahme des fehlenden Schwefels durch eine parallele Kurve zur Tetrathionat- und Sulfatbildung beschrieben wurde (hier nicht gezeigt). Dies deutete auf die Bildung einer nicht gemessenen Schwefelverbindung hin. Im Vergleich zum in Abb. 16 beschriebenen Wachstumsversuch unter ungepufferten Bedingungen fiel auf, dass eine höhere Thiosulfat-Oxidationsrate ( $83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  statt  $73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) sowie eine

niedrigere Tetrathionatbildungsrate ( $18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  statt  $41 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) verzeichnet werden konnten. Die Sulfatbildungsrate betrug  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

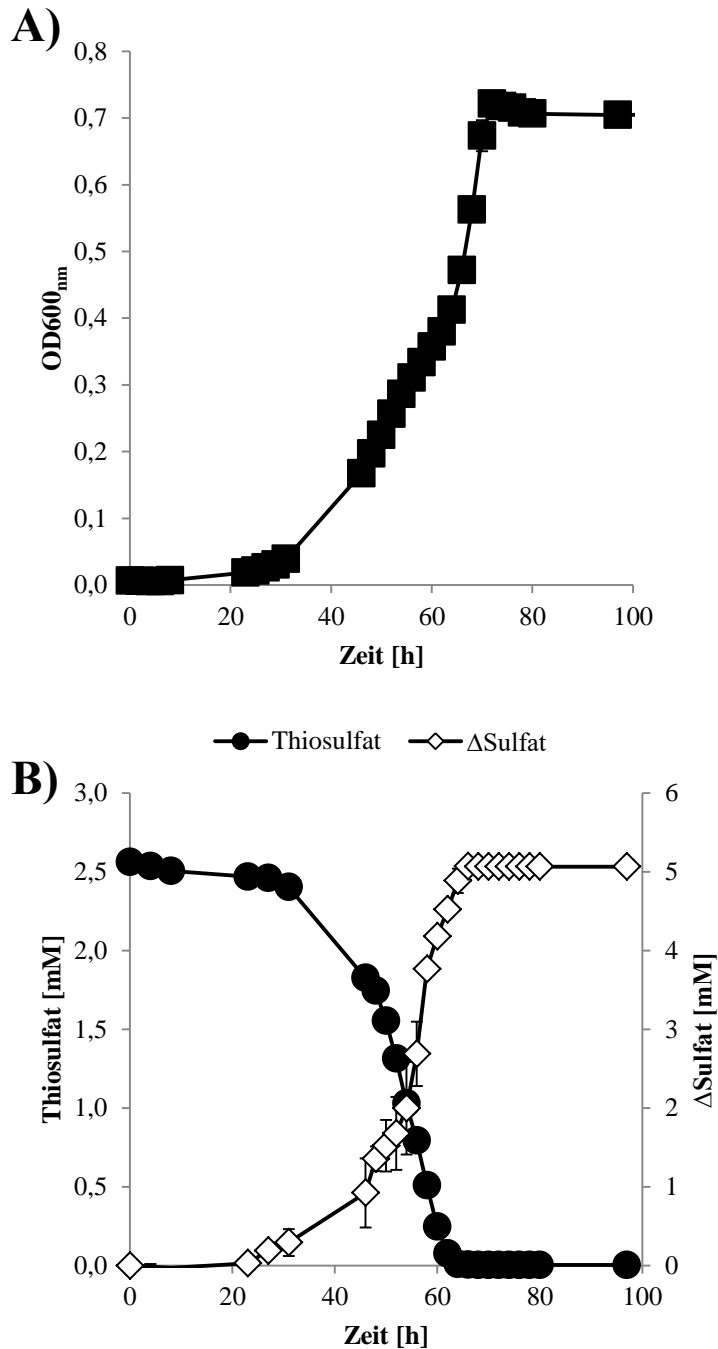


**Abb. 17: Veränderungen der Fermentationsbedingungen führten zu einer Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat und Sulfat.** Dokumentation der Zunahme der  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  (A) und von Substratverbrauch und Produktbildung (B). Die Kulturen wurden in mit 100 mM MOPS gepuffertem optimierten 0-Medium mit 24,41 mM Methanol und 5 mM Thiosulfat kultiviert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

Da festgestellt wurde, dass die Thiosulfat-Oxidation zu Sulfat erst mit dem Erreichen der stationären Phase einsetzte und zudem niedrigere Thiosulfat-Konzentrationen die Sulfatbildung begünstigten, sollten diese Parameter weiter optimiert werden. Hierzu wurden Kulturen mit 2,5 mM Thiosulfat und 24,41 mM Methanol als Substrat bei konstantem pH und 1 g/L Ammoniumchlorid im Medium



inkubiert. Im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen wurden die Vorkulturen ebenfalls mit 2,5 mM Thiosulfat versetzt (Abb. 18).



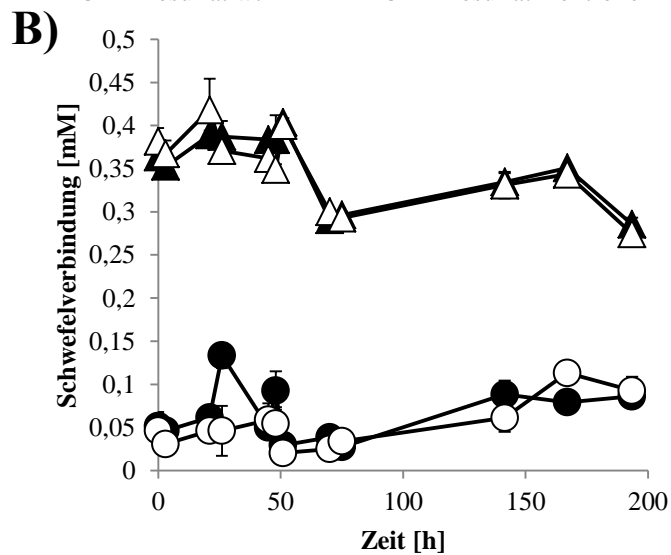
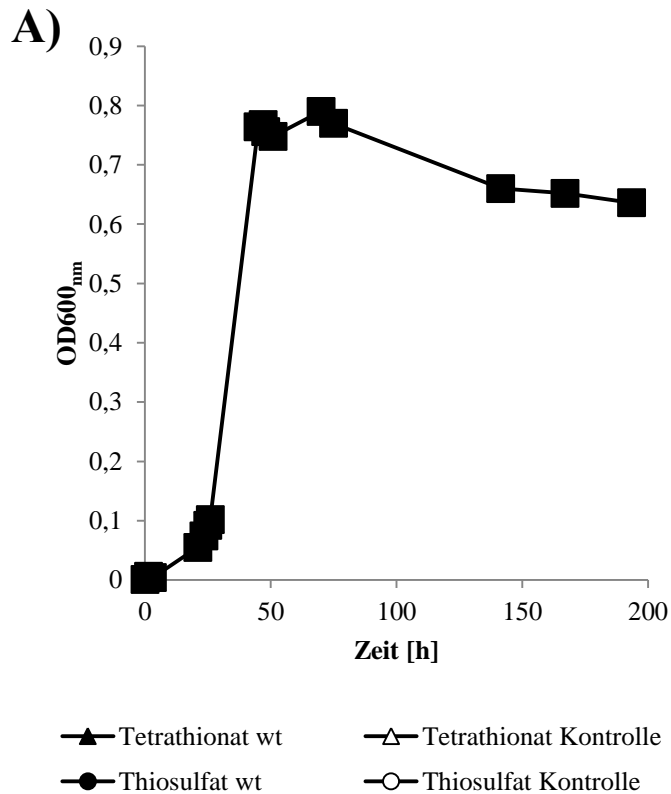
**Abb. 18: Die Optimierung der Fermentationsbedingungen führte zu einer exklusiven Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat.** Dokumentation der Zunahme der OD<sub>600nm</sub> (A) und von Substratverbrauch und Produktbildung (B). Die Kulturen wurden in mit 100 mM MOPS gepuffertem optimierten 0-Medium mit 24,41 mM Methanol und 2,5 mM Thiosulfat kultiviert. Die Vorkulturen enthielten ebenfalls 2,5 mM Thiosulfat. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

Die Kulturen zeigten ein verlangsamtes Wachstum (Abb. 18, A). Es konnten zwei verschiedene Wachstumsphasen beobachtet werden. Solange noch Thiosulfat im Kulturüberstand detektiert werden konnte (62 h, Abb. 18, B), betrug die Verdopplungszeit 2,3 Tage (d) und fiel dann bis zum Erreichen der End-OD auf 0,58 d. Im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen konnte eine kontinuierliche

Thiosulfat-Oxidation beobachtet werden. Sämtliches Thiosulfat im Kulturüberstand wurde bereits vor dem Erreichen der End-OD verbraucht. Zu jedem Messpunkt wurde die Tetrathionat-Konzentration im Kulturüberstand überprüft (hier nicht gezeigt). Es konnte kein Tetrathionat nachgewiesen werden. Stattdessen fand eine stöchiometrische Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat statt. Die maximale Thiosulfat-Oxidationsrate betrug hierbei  $123 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , während die maximale Sulfatbildungsrate bei  $442 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  lag.

Nachfolgend sollte überprüft werden, ob die exklusive Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat durch das bereits in der Vorkultur eingesetzte Thiosulfat oder durch die niedrige Thiosulfat-Konzentration bedingt war. Hierzu wurden Kulturen mit 2,5 mM Thiosulfat in der Vor- und Hauptkultur mit Kulturen verglichen, die nur 2,5 mM Thiosulfat in der Hauptkultur enthielten (hier nicht gezeigt). Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Metabolisierung des Thiosulfats festgestellt werden. Unter beiden Bedingungen wurde Thiosulfat stöchiometrisch zu Sulfat oxidiert. Zudem konnte unter beiden Bedingungen eine Unterteilung des Wachstums in zwei Phasen festgestellt werden: eine langsamere Phase bis zum Zeitpunkt des kompletten Verbrauchs des Thiosulfats und eine schnelle Wachstumsphase, die sich hieran bis zum Erreichen der End-OD anschloss. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass das Oxidationsproduktmuster während der Oxidation von Thiosulfat durch *Hyphomicrobium* X neben dem pH-Wert, der Kohlenstoffquelle und dem im Medium enthaltenen Stickstoff vor allem durch die Thiosulfat-Konzentration beeinflusst wird.

Für die Thiosulfatdehydrogenase TsdA ist bekannt, dass das Enzym eine bifunktionale Ausrichtung besitzt und sowohl als Thiosulfatdehydrogenase als auch als Tetrathionatreduktase fungieren kann (Kurth *et al.*, 2016). Um zu überprüfen, ob das TsdA-Homolog in *Hyphomicrobium* X (Hden\_2748) eine *in vivo* relevante Tetrathionatreduktase-Aktivität besitzt, wurden Wachstumsversuche mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Methanol oder Methylamin) und verschiedenen Tetrathionat-Konzentrationen (0,5, 1, 2,5 mM) als Substrat durchgeführt. Um zu testen, ob ein möglicher Tetrathionat-Abbau durch enzymatische Aktivität oder durch abiotische Degradation vermittelt wurde, diente unbeimpftes Medium als Kontrolle (Abb. 19). Die Kulturen zeigten keine Wachstumsinhibierung durch das im Medium enthaltene Tetrathionat. Die Konzentration von im Kulturüberstand enthaltenen Tetrathionat und Thiosulfat unterlag während des Versuchszeitraums Schwankungen. Diese traten gleichermaßen in Kontrolle und Kulturen auf. Die zu jedem Messzeitpunkt ermittelte Sulfat-Konzentration des Kulturüberstands (hier nicht gezeigt) wies ebenfalls keine Veränderung auf. Damit konnten keine Hinweise auf eine biotische Degradation von Tetrathionat gefunden werden. Experimente mit höheren Tetrathionat-Konzentrationen bestätigten diese Beobachtung (hier nicht gezeigt).

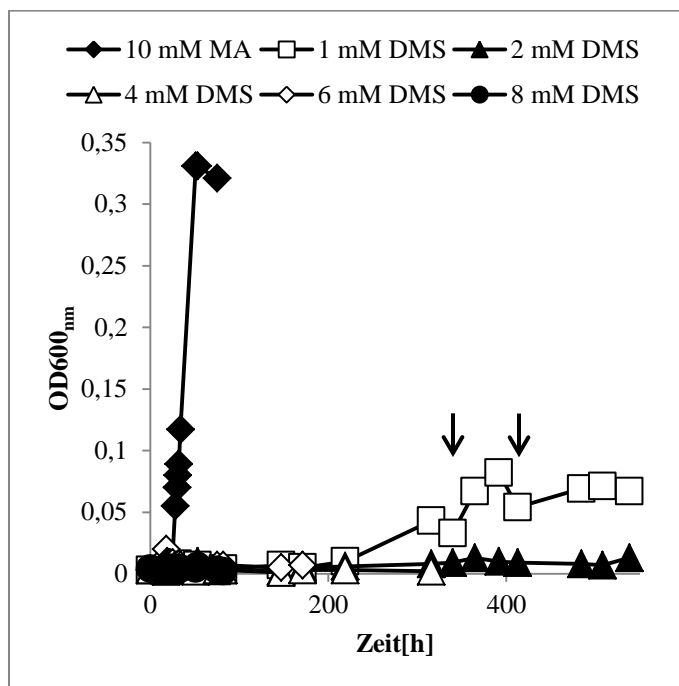


**Abb. 19: Tetrathionat kann nicht durch *Hyphomicrobium X* umgesetzt werden.** Dokumentation der Zunahme der OD600<sub>nm</sub> (A) und von Substratverbrauch und Produktbildung (B). Die Kulturen wurden in mit 100 mM MOPS gepuffertem optimierten 0-Medium mit 24,41 mM Methanol und 0,5 mM Tetrathionat kultiviert. Als Kontrolle wurde unbeimpftes Medium gleicher Zusammensetzung mit 0,5 mM Tetrathionat untersucht. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten, die Kontrolle erfolgte in einem einfachen Ansatz.

#### 4.1.6 Untersuchungen zum Dimethylsulfid-Stoffwechsel in *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup>

In der Literatur ist beschrieben, dass *Hyphomicrobium X* nicht mit Dimethylsulfid (DMS) als Substrat wachsen kann (Suylen *et al.*, 1986). Diese Angabe deckte sich zunächst mit den Ergebnissen der bioinformatischen Untersuchung des Genoms von *Hyphomicrobium X* (Tab. 15). Der Organismus verfügt zwar über zahlreiche Enzyme, die im Rahmen der Oxidation des im DMS enthaltenen Schwefels eine Rolle spielen könnten (Hdr-ähnliches System, Sox-System, SQR, PDO), und ein Homolog einer Methanthioloxidase (Hden\_0743), Gene für eine DMS-Monooxygenase vom DmoAB-

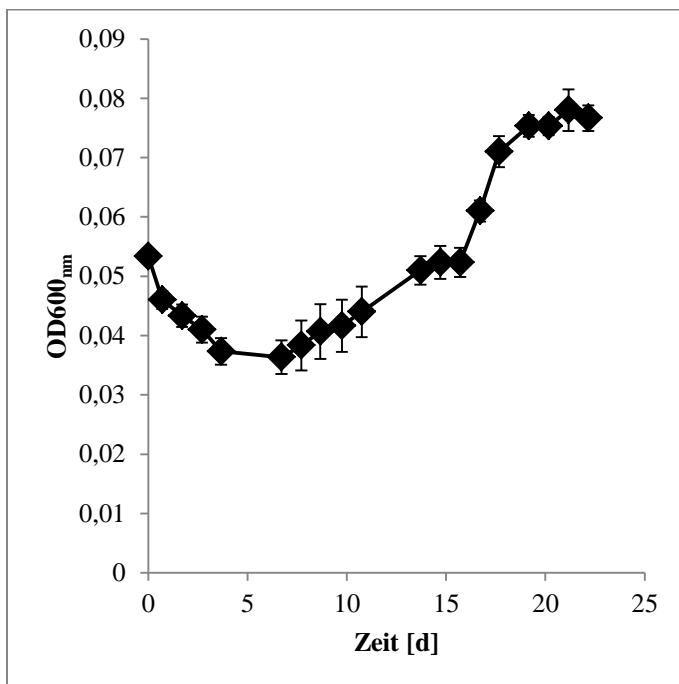
Typ (Boden *et al.*, 2011) weist er aber nicht auf. Da bereits für den Thiosulfatstoffwechsel die Literaturangaben widerlegt werden konnten, sollte die Fähigkeit von *Hyphomicrobium X* zum Wachstum mit DMS als Substrat ebenfalls überprüft werden. Es wurden qualitative Wachstumsversuche durchgeführt, bei denen überprüft werden sollte, ob der Organismus mit DMS als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Kulturen von *Hyphomicrobium X* wurden in 100-mL-Serumflaschen mit 50 mL Hyphomicrobium Medium 0-Medium kultiviert. Als exklusives Substrat wurde den Kulturen entweder DMS in verschiedenen Konzentrationen oder 10 mM Methylamin als Kontrolle hinzugefügt (Abb. 20).



**Abb. 20: *Hyphomicrobium X* wächst mit DMS als exklusivem Substrat.** Die Kulturen wurden in 50 mL Hyphomicrobium Medium 0-Medium in 100-mL-Serumflaschen mit verschiedenen DMS-Konzentrationen oder mit 10 mM Methylamin als Substrat kultiviert. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte an, an denen die Kultur mit ursprünglich 1 mM DMS als Substrat mit 1 mM DMS nachgefüttert wurde.

Während die Kontrolle nach 51 h ausgewachsen war, wurde bei der Kultur mit 1 mM DMS erst nach 315 h eine OD-Zunahme verzeichnet. Dies war verbunden mit einer Ansäuerung des Mediums (pH 6). Bei sämtlichen höheren DMS-Konzentrationen konnte kein Wachstum dokumentiert werden, weshalb bis zum Ende des Versuchs lediglich die Kultur mit 1 mM DMS als Substrat und die mit 2 mM DMS untersucht wurden. Um einem möglichen Substratmangel und einem damit verbundenen Ende des Wachstums vorzubeugen, wurde die Kultur mit 1 mM DMS zu den Zeitpunkten 339 h und 412 h erneut mit 1 mM DMS versetzt (Abb. 20, Pfeile) und der pH-Wert auf pH 7 titriert. Der ersten Substratzugabe folgte ein weiteres Wachstum, wohingegen die zweite Substratzugabe zu einer Inhibition des Wachstums führte. Das Experiment zeigte, dass DMS-Konzentrationen > 1 mM toxisch für *Hyphomicrobium X* waren, der Organismus aber grundsätzlich zu einem Wachstum mit DMS als Substrat fähig war.

Zur Erforschung der Rolle einzelner Enzyme im Rahmen des Schwefelstoffwechsels von *Hyphomicrobium X* sollten Knock-out-Mutanten generiert und deren mögliche Phänotypen charakterisiert werden. Um sicherzustellen, dass mögliche Wachstumsphänotypen tatsächlich auf dem Knock-out einzelner Gene beruhen und nicht auf generellen Schwierigkeiten des Organismus, auf einem Substrat zu wachsen, sollte das Protokoll für Wachstumsversuche auf DMS optimiert werden. In Anlehnung an die Ergebnisse zum Thiosulfatstoffwechsel in *Hyphomicrobium X* (4.1.5) wurden hier der pH-Wert des Mediums und der Stickstoffgehalt verändert. Ein konstant mit 100 mM MOPS auf einen Wert von 7,2 gepufferter pH und 1 g/L Ammoniumchlorid stellten die besten Wachstumsbedingungen bei DMS-Konzentrationen von 0,5 mM oder 0,75 mM dar (hier nicht gezeigt). DMS-Konzentrationen zwischen 0,75 mM und 1,5 mM erlaubten ein Wachstum, das mit einer deutlich längeren lag-Phase von bis zu 200 Stunden verbunden war. Kulturen, die zuvor bereits mit DMS als Substrat angezogen wurden und dann erneut in frischem Medium mit DMS kultiviert wurden, wuchsen schneller und zeigten eine kürzere lag-Phase (zwischen 50 h und 100 h). Ein exemplarisches Experiment für die unter optimalen Bedingungen stattfindende Kultivierung von *Hyphomicrobium X*-Zellen, die zuvor noch nie mit DMS als Substrat gewachsen waren, zeigt die Abb. 21.

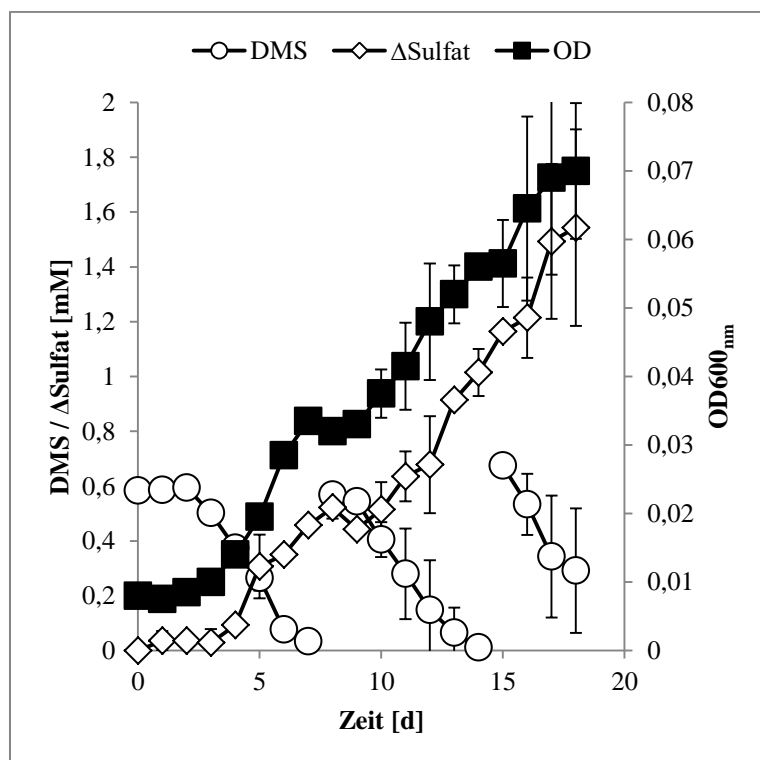


**Abb. 21: *Hyphomicrobium X* wächst mit DMS als alleiniges Substrat.** Die Kulturen wurden in 25 mL optimiertem 0-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS in 100-mL-Serumflaschen mit 0,75 mM DMS als Substrat kultiviert. Nach 15 Tagen erfolgte eine erneute Zugabe von 0,75 mM DMS. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von fünf biologischen Replikaten.

Die getesteten Kulturen zeigten spätestens nach sieben Tagen ein Ansteigen der OD. Nachdem die OD-Zunahme der Kulturen nach 15 Tagen stoppte, wurden die Kulturen erneut mit 0,75 mM DMS versetzt. Dies führte zu einer erneuten, schnelleren Wachstumsphase. Während der ersten, langsamen Wachstumsphase betrug die Verdopplungszeit 346 Tage, während der zweiten Wachstumsphase 71

Tage. Im direkten Vergleich zu den schnellsten beobachteten Verdopplungszeiten mit Methylamin bzw. Methanol als Substrat (0,3 Tage bzw. 0,5 Tage) deutete dies darauf hin, dass *Hyphomicrobium X* zwar zur DMS-Oxidation fähig jedoch nicht darauf spezialisiert ist.

Weiterführend sollten die DMS-Oxidation und die Bildung möglicher Oxidationsprodukte quantifiziert werden. Die DMS-Konzentrationen in der Gasphase der Kulturen wurden durch Gaschromatographie ermittelt, Degradationsprodukte wurden ebenfalls via Gaschromatographie gesucht. Zusätzlich wurden Kulturüberstände mittels HPLC-Analysen sowie kolorimetrischen und turbidimetrischen Tests untersucht. Als exklusives Degradationsprodukt konnte Sulfat in stöchiometrischen Mengen gefunden werden (Abb. 22).



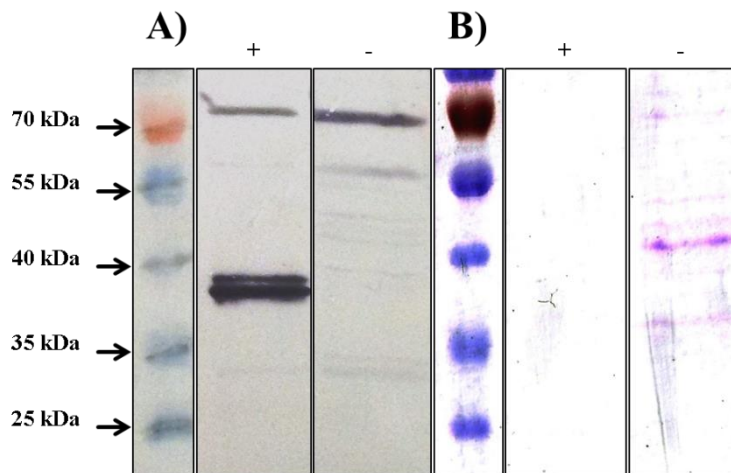
**Abb. 22:** *Hyphomicrobium X* oxidiert DMS kontinuierlich zu Sulfat. Die Kultivierung erfolgte, wie unter 3.1.7 für quantitative Wachstumsversuche beschrieben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

Die untersuchten Kulturen zeigten nach drei Tagen eine Zunahme der OD<sub>600nm</sub>, was mit einer Abnahme der DMS-Konzentration in der Gasphase der Kulturen einherging. Die Sulfatbildung setzte erst nach vier Tagen ein. Die eingesetzten 0,6 mM DMS wurden innerhalb von 7 Tagen komplett verbraucht. Ein erneutes Zusetzen von DMS bewirkte weiteres Wachstum der Kulturen und eine stöchiometrische Oxidation von DMS zu Sulfat. Der höchste gemessene DMS-Verbrauch betrug hierbei  $87,7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $\pm 3,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), während die Sulfatbildungsrate bei  $75,8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $\pm 3,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) lag.

#### 4.1.7 HdrA als Markerprotein für die Expression Hdr-ähnlicher Proteine in *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup>

Um die Expression von Proteinen in einem Organismus zu analysieren oder einzelne Proteine und Proteinkomplexe aus einem Organismus mit klassischen chromatographischen Methoden reinigen zu können, ist ein spezifisches Antiserum gegen das Protein von Interesse hilfreich. Für die Hdr-ähnlichen Proteine in *Hyphomicrobium X* wurde – basierend auf der Struktur des Genlokus – angenommen, dass der Komplex aus bis zu sechs verschiedenen Untereinheiten (HdrC1, HdrB1, HdrA, Hp, HdrC2, HdrB2) bestehen kann. HdrA weist als einziges der Hdr-ähnlichen Proteine eine FAD-Bindedomäne auf. Da eine solche für eine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation essentiell ist (Buckel & Thauer, 2018), wurde angenommen, dass HdrA ein essentieller Bestandteil Hdr-ähnlicher Komplexe ist. Zudem ist bereits beschrieben, dass sich HdrA aus *Aquifex aeolicus* gut für die immunologische Detektion des Hdr-ähnlichen Komplexes aus diesem Organismus eignet (Boughanemi *et al.*, 2016). Deshalb wurde diese Strategie übernommen.

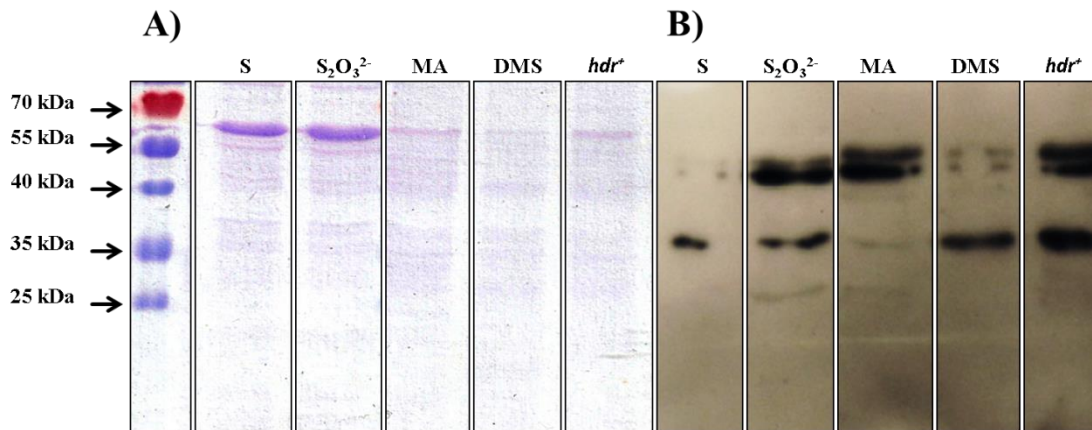
Rekombinantes HdrA aus *Hyphomicrobium X* wurde unter Verwendung des Plasmids pET-22bHden0691 (+) in *E. coli* BL21(DE3) heterolog produziert und aufgereinigt. Das hochreine Protein wurde lyophilisiert und durch einen externen Dienstleister (Eurogentec, Lüttich/Belgien) zur Produktion eines Antiserums in Kaninchen verwendet. Um die Spezifität des erworbenen Antiserums zu testen, wurden Rohextrakte nach Zellaufschluss einer *E. coli* BL21(DE3)-Überexpressionskultur mit dem Plasmid pET-22bHden0691 sowie als Kontrolle die einer Leervektorexpression (pET-22b(+)) einer Western-Blot-Analyse unterzogen (Abb. 23).



**Abb. 23: Das  $\alpha$ -HdrA-Antiserum detektierte spezifisch rekombinantes HdrA in *E. coli*-Rohextrakten.** Gezeigt sind das Ergebnis der chromogenen Detektion der Western-Blot-Analyse (A) und die dazugehörige coomassiegefärbte SDS-PAGE (B). Aufgetragen wurden 2  $\mu$ g Rohextrakt nach Zellaufschluss einer *E. coli* BL21(DE3)-Überexpressionskultur mit dem Plasmid pET-22bHden0691 (+) sowie als Kontrolle (-) 4  $\mu$ g einer Leervektorexpression (pET-22b(+)).

Die Leervektorexpression zeigte keine Bande, die mit der Proteingröße von rekombinantem HdrA (38 kDa) korrespondiert, im Gegensatz zum Rohextrakt der Überexpressionskultur. Zusätzlich konnten Kreuzreaktionen des Antiserums mit jeweils größeren oder kleineren Proteinen beobachtet werden.

Da die Spezifität des  $\alpha$ -HdrA-Antiserums gegen rekombinantes HdrA belegt werden konnte, sollte nachfolgend versucht werden, HdrA in Rohextrakten von *Hyphomicrobium X*-Zellen zu detektieren (Abb. 24).



**Abb. 24: Das  $\alpha$ -HdrA-Antiserum detektierte HdrA spezifisch in Kulturen mit schwefelhaltigen Substraten.** Gezeigt ist das Ergebnis der coomassiegefärbten SDS-PAGE (A) und der chemolumineszenz-basierenden Immunodetektion (B). Aufgetragen wurden jeweils Rohextrakte nach Zellaufschluss von *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup> bzw. *H. denitrificans hdr*<sup>+</sup>-Kulturen, die mit unterschiedlichen Substraten angezogen wurden. Als Substrate dienten bei *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup> 50 mM Methylamin und 5 mM Schwefel (S, 13  $\mu$ g), 50 mM Methylamin und 5 mM Thiosulfat (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, 14  $\mu$ g), 50 mM Methylamin (MA, 17  $\mu$ g), 4,5 mM DMS (DMS, 22  $\mu$ g, gefüttert in 0,5 mM Schritten) sowie bei *H. denitrificans hdr*<sup>+</sup> 50 mM Methylamin (*hdr*<sup>+</sup>, 17  $\mu$ g).

In Rohextrakten einer *Hyphomicrobium X*-Kultur, die mit Methylamin als Substrat kultiviert wurde (MA), konnte eine schwache Bande in der Immunodetektion bei 38 kDa detektiert werden. Kulturen, die in Gegenwart von schwefelhaltigen Substraten gewachsen waren, zeigten eine deutliche Bande bei 38 kDa. Ähnlich verhielt es sich mit Rohextrakten von *H. denitrificans hdr*<sup>+</sup>. Dieser Stamm exprimiert das komplette erweiterte *hdr*-ähnliche Gencluster (Hden\_0688-Hden\_0696) auf dem Plasmid pBBR1p264HdenHdrTc unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Rohextrakte von diesem Stamm (mit Methylamin als Substrat kultiviert) zeigten eine deutliche HdrA-Bande im Western Blot. Dies deutete darauf hin, dass die Hdr-ähnlichen Proteine in *Hyphomicrobium X* spezifisch beim Wachstum auf schwefelhaltigen Substraten exprimiert werden.

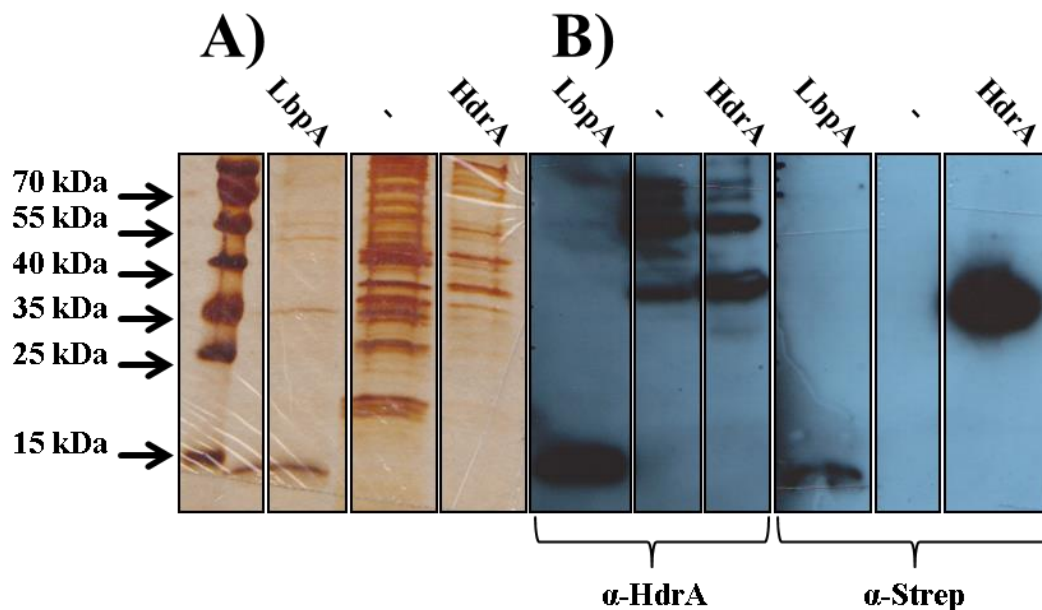
#### 4.1.8 LbpA als Markerprotein für die Expression Hdr-ähnlicher Proteine in *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup>

In der Literatur wird basierend auf der genetischen Vergesellschaftung der kodierenden Gene über eine funktionelle Verknüpfung von Lipoatbindeproteinen (LbpAs) und Hdr-ähnlichen Proteinen im Rahmen des oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels spekuliert (Ehrenfeld *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Dahl, 2015). LbpAs könnten als Redox-Carrier oder Schwefeltransportprotein fungieren. Ferner konnte eine genetische Verknüpfung von Proteinen, die in die Biosynthese von LbpAs involviert sein könnten, mit den *hdr*-ähnlichen Genloki gefunden werden (Liu *et al.*, 2014; Dahl, 2015). Um zu überprüfen, ob neben der genetischen Vergesellschaftung auch eine funktionelle Verknüpfung zwischen LpbAs und Hdr-ähnlichen Proteinen besteht, sollten Verfahren zur



spezifischen Detektion von LpbA aus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> (Hden\_0696) entwickelt werden.

Zunächst wurde unter Verwendung eines *E. coli*-Modells überprüft, ob Hden\_0696 in einem Operon mit den *hdr*-ähnlichen Genen (Hden\_0689-Hden\_0694) liegt (Abb. 25). Hierfür wurde das Plasmid pBBR1p264HdenHdrTc, das die Gene Hden\_0688 bis Hden\_0696 unter Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors aus *Gluconobacter oxydans* exprimiert (Kallnik *et al.*, 2010), verwendet. Zur spezifischen Detektion von LpbA wurde bei der Erstellung des Plasmids Hden\_0696 mit einem C-terminalen Strep-tag fusioniert.

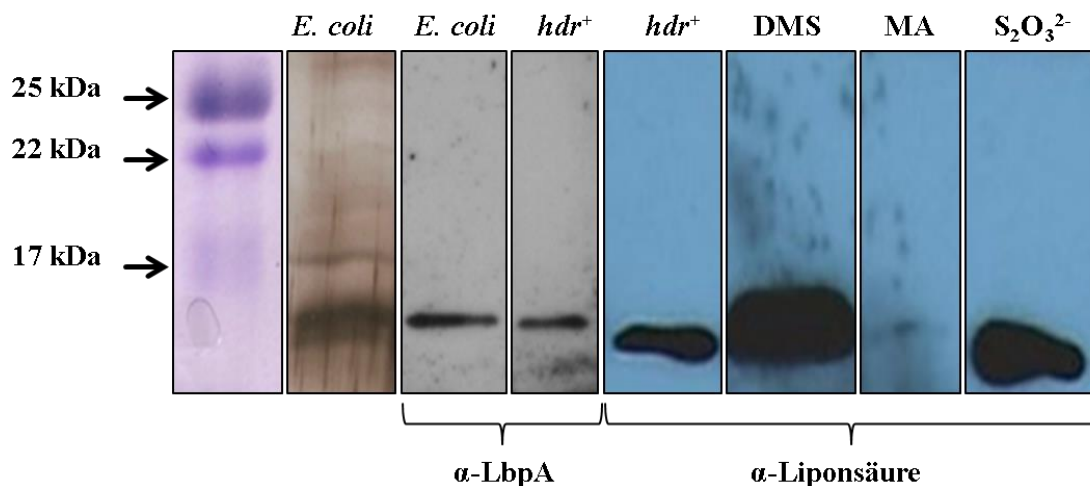


**Abb. 25: Das Lipoatbindeprotein LpbA (Hden\_0696) bildet ein Operon mit den *hdr*-ähnlichen Proteinen in *Hyphomicrobium* X.** Gezeigt sind die silbergefärbte SDS-PAGE (A) und die chemolumineszenz-basierende Immunodetektion mit dem  $\alpha$ -HdrA-Antiserum ( $\alpha$ -HdrA) bzw. dem StrepMAB-Classic-Antikörper ( $\alpha$ -Strep) (B). Aufgetragen wurde durch die Expression von pBBR1p264HdenHdrTc in *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ *iscR* produziertes und aus dem Ultrazentrifugationsüberstand nach Zellaufschluss via Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigtes Hden\_0696 (LpbA) sowie der Durchfluss der Affinitätschromatographie (-) und verdünnter Rohextrakt einer *E. coli* BL21(DE3)-Überexpressionskultur mit dem Plasmid pET-22bHden0691 als Kontrolle (HdrA).

Rekombinantes Hden\_0696 mit einem C-terminalen Strep-tag besitzt eine theoretische Größe von 17 kDa. In der Silberfärbung der Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie konnte nur eine Bande bei rund 15 kDa nachgewiesen werden (Abb. 25, A). Im Durchfluss der Affinitätschromatographie sowie in der HdrA-Positivkontrolle wurde diese Bande nicht beobachtet. Die immunologische Detektion mit einem speziell gegen das Strep-tag gerichteten Antikörper (Abb. 25, B,  $\alpha$ -Strep) führte zur Detektion einer Bande auf gleicher Höhe, während die Kontrollen kein Signal für ein Protein mit einer ähnlichen Größe zeigten. Dies führte zu der Annahme, dass es sich bei der Bande um rekombinantes Hden\_0696 handelte, bei dem das Laufverhalten nicht mit der theoretischen Größe korrespondierte. Die Strep-tag-Detektion führte zudem in der HdrA-Positivkontrolle zu dem erwarteten Signal bei etwa 38 kDa. Der Durchfluss der Affinitätschromatographie und die Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie wiesen kein

solches Signal auf. Die Immunodetektion mit dem  $\alpha$ -HdrA-Antiserum (Abb. 25, B,  $\alpha$ -HdrA) zeigte sowohl in der HdrA-Positivkontrolle als auch im Durchfluss der Affinitätschromatographie ein Signal bei 38 kDa. Dies deutete darauf hin, dass der Durchfluss rekombinantes HdrA enthielt. Da das  $\alpha$ -HdrA-Antiserum gegen rekombinantes HdrA inklusive Strep-tag gerichtet ist, besitzt das Serum eine Kreuzreaktivität gegen Proteine mit Strep-tag. Entsprechend wurde auch Hden\_0696 in Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie detektiert. Die Ergebnisse der immunologischen Analysen zeigten, dass im Fall von *Hyphomicrobium X* das für *lbpA* kodierende Gen in einem Operon mit den *hdr*-ähnlichen Proteinen liegt und diese zusammen in *E. coli* exprimiert werden können. Die gebildeten Proteine lagen hierbei löslich vor. Ferner wurde gezeigt, dass LbpA unter den gewählten Bedingungen keinen stabilen Komplex mit HdrA als Markerprotein für den Hdr-ähnlichen Komplex bildete.

Nachdem die Zugehörigkeit von *lbpA* zum *hdr*-ähnlichen Operon innerhalb eines heterologen Systems geklärt werden konnte, sollte überprüft werden, wie sich die Situation *in vivo* in *Hyphomicrobium X* verhält (Abb. 26). Das endogene LbpA besitzt kein Strep-tag. Deshalb musste ein alternatives Verfahren zur immunologischen Detektion in Betracht gezogen werden. Hierfür wurden zwei parallele Strategien entworfen. Unter Verwendung eines Antikörpers, der speziell gegen lipoylierte Proteine gerichtet ist, sollte versucht werden, LbpA in Zellextrakten von *Hyphomicrobium X*-Kulturen, die mit unterschiedlichen Substraten kultiviert wurden, nachzuweisen. Zudem wurde bei einem externen Dienstleister (Eurogentec, Lüttich/Belgien) ein Antikörper gegen synthetische immunogene Peptide von Hden\_0696 bestellt.



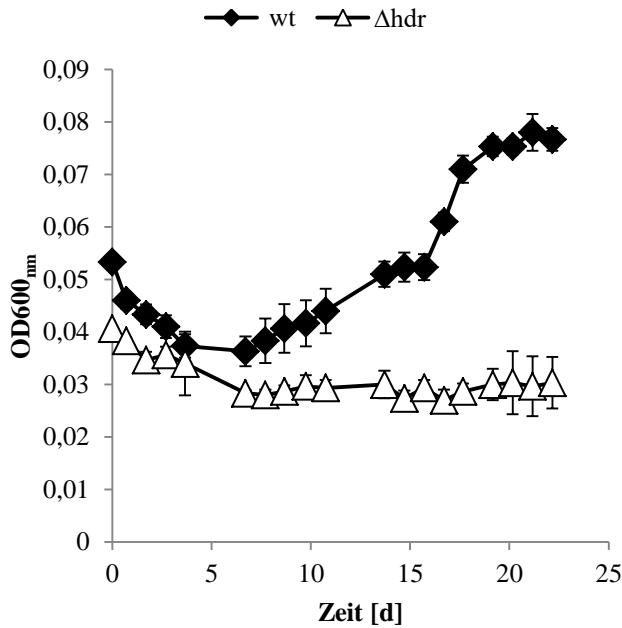
**Abb. 26: LbpA kann spezifisch mit zwei verschiedenen immunologischen Tests detektiert werden.** Gezeigt sind die silbergefärbte SDS-PAGE und die chemolumineszenz-basierende Immunodetektion mit dem  $\alpha$ -LbpA-Antikörper ( $\alpha$ -LbpA) bzw. dem Maus- $\alpha$ -Liponsäure-(13C5)-Antikörper ( $\alpha$ -Liponsäure). Aufgetragen wurden durch die Expression von pBBR1p264HdenHdrTc in *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ *iscR* produziertes und aus dem Ultrazentrifugationsüberstand nach Zellaufschluss via Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigtes Hden\_0696 (*E. coli*, 20 ng) sowie Rohextrakte nach Zellaufschluss von *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup> bzw. *H. denitrificans* *hdr*<sup>+</sup>-Kulturen, die mit unterschiedlichen Substraten angezogen wurden (je 15–20  $\mu$ g Protein). Als Substrate dienten bei *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup> 50 mM Methylamin und 5 mM Thiosulfat ( $S_2O_3^{2-}$ ), 50 mM Methylamin (MA), 4,5 mM DMS (DMS, gefüttert in 0,5 mM Schritten) sowie bei *H. denitrificans* *hdr*<sup>+</sup> 50 mM Methylamin (*hdr*<sup>+</sup>).

Wie zuvor (Abb. 25) wich das Laufverhalten von rekombinantem LbpA von der theoretischen Größe (17 kDa) ab. Das mittels des Plasmids pBBR1p264HdenHdrTc in *E. coli* produzierte LbpA zeigte in der Silberfärbung der SDS-PAGE eine Bande bei etwa 15 kDa (Abb. 26). Unter Verwendung des  $\alpha$ -LbpA-Antikörpers konnte in der Immunodetektion LbpA spezifisch in *E. coli*- und in *Hyphomicrobium X*-Überexpressionskulturen mit dem Plasmid pBBR1p264HdenHdrTc (Abb. 26,  $\alpha$ -LbpA) nachgewiesen werden. Im Fall der *E. coli*-Überexpression handelte es sich um mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigtes Hden\_0696, während bei *Hyphomicrobium X* der Nachweis in Zellrohextrakten erfolgte. Durch den  $\alpha$ -Liponsäure-Antikörper (Abb. 26,  $\alpha$ -Liponsäure) konnte LbpA ebenfalls in der *Hyphomicrobium X*-Überexpressionskultur nachgewiesen werden. Dies deutete auf eine erfolgreiche Lipoylierung des rekombinanten Proteins hin. In Immunodetektionen mit dem  $\alpha$ -Liponsäure-Antikörper konnte LbpA in Zellrohextrakten von *Hyphomicrobium X*-Kulturen, die mit DMS oder aber Methylamin und Thiosulfat als Substrat kultiviert wurden, nachgewiesen werden. Ein Rohextrakt einer Kultur, die nur mit Methylamin als Substrat kultiviert wurde, lieferte kein Signal. Diese Ergebnisse korrespondierten mit den zuvor gemachten Beobachtungen zur Expression von HdrA (Abb. 24). Wenn schwefelhaltige Substrate zur Kultivierung verwendet wurden, fand eine Expression von HdrA und LbpA statt, während bei Wachstum ohne reduzierte Schwefelverbindung im Medium diese nicht oder nur schwach detektiert werden konnten.

#### 4.1.9 Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans* $\Delta$ hdr

Obgleich Hdr-ähnliche Komplexe seit 2009 unter Verdacht stehen, eine Rolle im mikrobiellen oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus zu spielen (Quatrini *et al.*, 2009), konnte dies bisher nicht experimentell nachgewiesen werden. Um diese Wissenslücke durch reverse Genetik zu schließen, wurde, wie unter 4.1.3 näher beschrieben, eine funktionelle Knock-out-Mutante im Modellorganismus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> (*Hyphomicrobium denitrificans*  $\Delta$ hdr) generiert. Vorangegangene Experimente (4.1.6–4.1.7) zeigten, dass *Hyphomicrobium X* mit DMS als Substrat wächst und den enthaltenen Schwefel komplett zu Sulfat oxidiert. Hierbei wurde die Expression von HdrA als Markerprotein für den Hdr-ähnlichen Komplex stark hochreguliert. Diese Beobachtungen deuteten auf eine Beteiligung der Hdr-ähnlichen Proteine am DMS-Stoffwechsel hin. Um zu überprüfen, ob die  $\Delta$ hdr-Mutante ebenfalls zum Wachstum mit DMS als Substrat fähig war, wurden Wachstumsversuche unter zuvor optimierten Bedingungen (4.1.6) durchgeführt (Abb. 27).

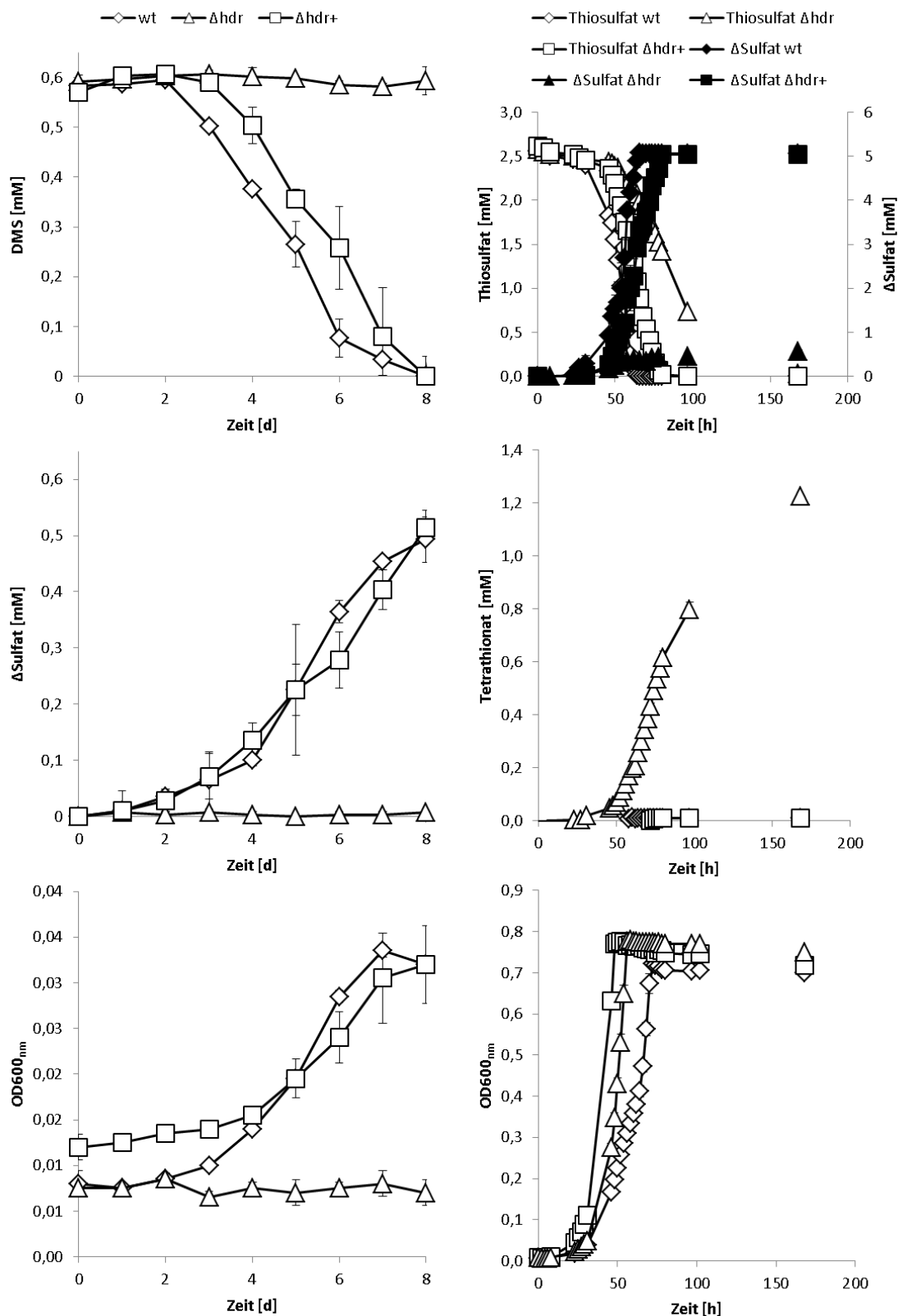
Während alle untersuchten wildtypischen Kulturen innerhalb von sieben Tagen eine Zunahme der OD<sub>600nm</sub> zeigten und durch eine erneute Zugabe von DMS nach 15 Tagen ein erneutes Wachstum initiiert werden konnte, wiesen die  $\Delta$ hdr-Mutanten einen Wachstums-Phänotyp auf. Innerhalb der 22 Tage der Inkubation konnte keine Zunahme der OD<sub>600nm</sub> verzeichnet werden. Dies deutete darauf hin, dass *Hyphomicrobium X* einen funktionalen Hdr-ähnlichen Komplex zum Wachstum mit DMS als Substrat benötigt.



**Abb. 27:** *H. denitrificans*  $\Delta hdr$  zeigte kein Wachstum mit DMS als Substrat. Die Kulturen wurden in 25 mL optimiertem 0-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS pH 7,2 in 100-mL-Serumflaschen mit 0,75 mM DMS als exklusivem Substrat kultiviert. Nach 15 Tagen wurden die Wildtypen-Kulturen erneut mit 0,75 mM DMS versetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von fünf biologischen Replikaten.

Da die  $\Delta hdr$ -Mutante kein messbares Wachstum mit DMS als Substrat zeigte, sollte überprüft werden, ob die Zellen trotzdem DMS verbrauchen oder Abbauprodukte bilden. Als Referenzen dienten der Wildtyp sowie *H. denitrificans*  $\Delta hdr^+$ , eine *in trans* komplementierte Version der  $\Delta hdr$ -Mutante (4.1.3). Ebenfalls sollte geklärt werden, ob die  $\Delta hdr$ -Mutante einen Phänotyp bei der Oxidation von Thiosulfat zeigt. Die Wachstumsversuche (Abb. 28) wurden unter zuvor optimierten Bedingungen durchgeführt (4.1.5–4.1.6), bei denen der Wildtyp DMS bzw. Thiosulfat komplett zu Sulfat oxidierte.

Der Wildtyp zeigte mit DMS als Substrat innerhalb von vier Tagen ein messbares Wachstum (Abb. 28, links, unten, Rauten). Dies ging einher mit einer Abnahme der DMS-Konzentration (Abb. 28, links, oben, Rauten) und einer Zunahme der Sulfat-Konzentration (Abb. 28, links, Mitte, Rauten). Im Gegensatz hierzu stand die  $\Delta hdr$ -Mutante (Abb. 28, links, Dreiecke). Die Mutante zeigte keinen Substratverbrauch, keine Veränderungen der Sulfat-Konzentration und kein messbares Wachstum. Der komplementierte Knock-out-Stamm hingegen (*H. denitrificans*  $\Delta hdr^+$ , Abb. 28, links, Quadrate) verhielt sich wildtypisch. Dies deutete darauf hin, dass ein funktionaler Hdr-ähnlicher Komplex essentiell für die Fähigkeit von *Hyphomicrobium* X zur DMS-Metabolisierung ist.



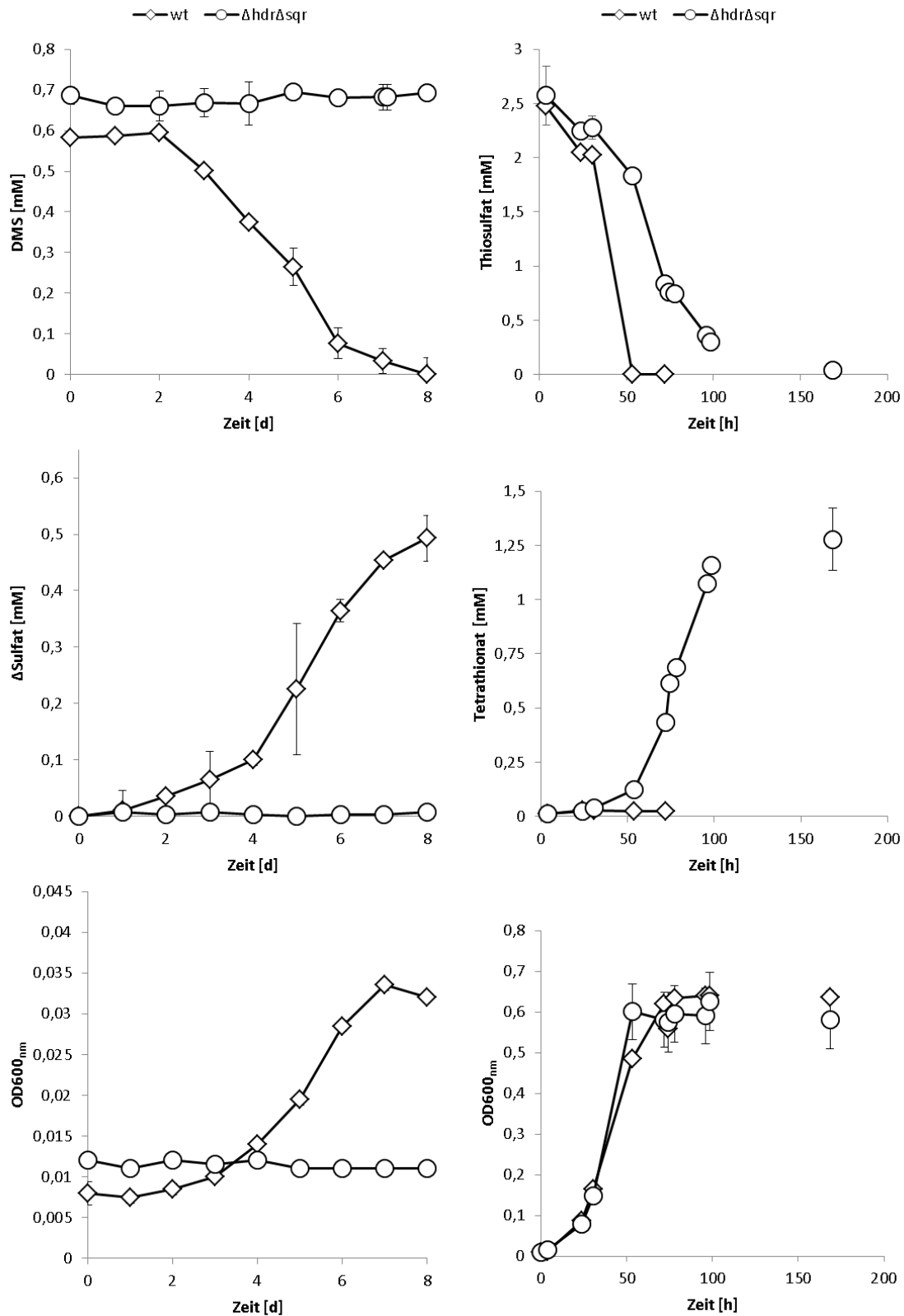
**Abb. 28: Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans*  $\Delta$ hdr und *H. denitrificans*  $\Delta$ hdr<sup>+</sup> im Vergleich zu wildtypischen Zellen beim Wachstum mit 0,6 mM DMS als Substrat (links) und 24,41 mM Methanol sowie 2,5 mM Thiosulfat (rechts). Rauten geben jeweils die Werte für den Wildtyp an, Dreiecke die der  $\Delta$ hdr-Mutante und Vierecke die der  $\Delta$ hdr<sup>+</sup>-Mutante. Die Kulturen wurden jeweils in optimiertem 0-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS pH 7,2 kultiviert (100 mL Medium in 500-mL-Serumflaschen beim Wachstum auf DMS und 200 mL in 500-mL-Erlenmeyerkolben beim Wachstum mit Thiosulfat). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.**

Beim Wachstum mit 24,41 mM Methanol und 2,5 mM Thiosulfat konnten ebenfalls Unterschiede zwischen wildtypischen Zellen (Abb. 28, rechts, Rauten) und der  $\Delta hdr$ -Mutante (Abb. 28, rechts, Dreiecke) festgestellt werden. Diese zeigten sich beim Wachstum (Abb. 28, rechts, unten). Die  $\Delta hdr$ -Mutante erreichte innerhalb von 48 h ihre finale OD<sub>600nm</sub>, während der Wildtyp langsamer wuchs. Das Wachstum konnte in zwei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase dauerte bis 60 h nach der Inokulation an, dann folgte eine zweite, schnellere Wachstumsphase bis zum Erreichen der finalen OD<sub>600nm</sub> nach 72 h. Es fiel auf, dass die beiden unterschiedlichen Wachstumsphasen des Wildtyps mit der beobachteten Thiosulfat-Oxidation korrelierten. Die Kultur oxidierte von Beginn an Thiosulfat (Abb. 28, rechts, oben), wobei nach 60 h kein Thiosulfat mehr im Kulturüberstand nachgewiesen werden konnte. Dann setzte das schnellere Wachstum ein. Im Gegensatz hierzu begann die Thiosulfat-Oxidation der  $\Delta hdr$ -Mutante mit dem Erreichen der stationären Phase. Ein weiterer Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bestand in den Oxidationsendprodukten. Der Wildtyp oxidierte Thiosulfat stöchiometrisch zu Sulfat (Abb. 28, rechts, oben), wohingegen die  $\Delta hdr$ -Mutante eine stöchiometrische Umsetzung von Thiosulfat zu Tetrathionat zeigte (Abb. 28, rechts, Mitte). Der *in trans* komplementierte  $\Delta hdr^+$ -Stamm (Abb. 28, rechts, Quadrate) zeigte ein wildtypisches Verhalten. Die beim Wildtyp beobachteten verschiedenen Wachstumsphasen zeigte der komplementierte Stamm nicht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Hdr-ähnliche Komplex essentiell für die vollständige Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat ist.

#### 4.1.10 Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans* $\Delta hdr\Delta sqr$

Bei der bioinformatischen Untersuchung von *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> (Tab. 15) konnte ein Operon (Hden\_0718-Hden\_0721) mit großer Ähnlichkeit zum *cst*-Operon aus *Staphylococcus aureus* (Grossoehme et al., 2011) gefunden werden. In *S. aureus* oxidiert eine Kombination der in diesem Operon kodierten Enzyme in einem detoxifizierenden Prozess Sulfid zu Sulfat. Deshalb wurde angenommen, dass die homologen Proteine in *Hyphomicrobium* X eine ähnliche Funktion besitzen könnten. Um eine mögliche Verfälschung der phänotypischen Analyse der  $\Delta hdr$ -Mutante durch die im *cst*-ähnlichen Operon kodierten Proteine ausschließen zu können, wurde eine  $\Delta hdr\Delta sqr$ -Doppelmutante generiert. In dieser Mutante wurde der komplette *cst*-Genlocus durch eine Rifampin-Resistenz ersetzt (4.1.3). Bei den zuvor beschriebenen Wachstumsversuchen mit der  $\Delta hdr$ -Mutante (Abb. 28) konnte, entgegen den zuvor beschriebenen Befürchtungen, ein klarer Phänotyp beschrieben werden. Trotzdem wurde auch die  $\Delta hdr\Delta sqr$ -Doppelmutante innerhalb eines Wachstumsversuchs mit DMS und in einem weiteren Experiment mit 24,41 mM MeOH und 2,5 mM Thiosulfat phänotypisch charakterisiert (Abb. 29)

Die  $\Delta hdr\Delta sqr$ -Doppelmutante verhielt sich mit DMS als Substrat (Abb. 29, links, Kreise) äquivalent zu  $\Delta hdr$ -Mutanten (Abb. 28, links, Dreiecke). Es konnte kein Verbrauch von DMS verzeichnet werden (Abb. 29, links, oben), darüber hinaus keine Veränderung der Sulfat-Konzentration (Abb. 29, links, Mitte) oder ein Wachstum (Abb. 29, links, unten).



**Abb. 29:** Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans*  $\Delta\text{hdr}\Delta\text{sqr}$  im Vergleich zu wildtypischen Zellen beim Wachstum mit 0,6 mM DMS als Substrat (links) und 24,41 mM Methanol sowie 2,5 mM Thiosulfat (rechts). Rauten geben jeweils die Werte für den Wildtyp an, Kreise die der  $\Delta\text{hdr}\Delta\text{sqr}$ -Mutante. Die Kulturen wurden jeweils in optimiertem 0-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS pH 7,2 kultiviert (100 mL Medium in 500-mL-Serumflaschen beim Wachstum auf DMS und 200 mL in 500-mL-Erlenmeyerkolben beim Wachstum mit Thiosulfat). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

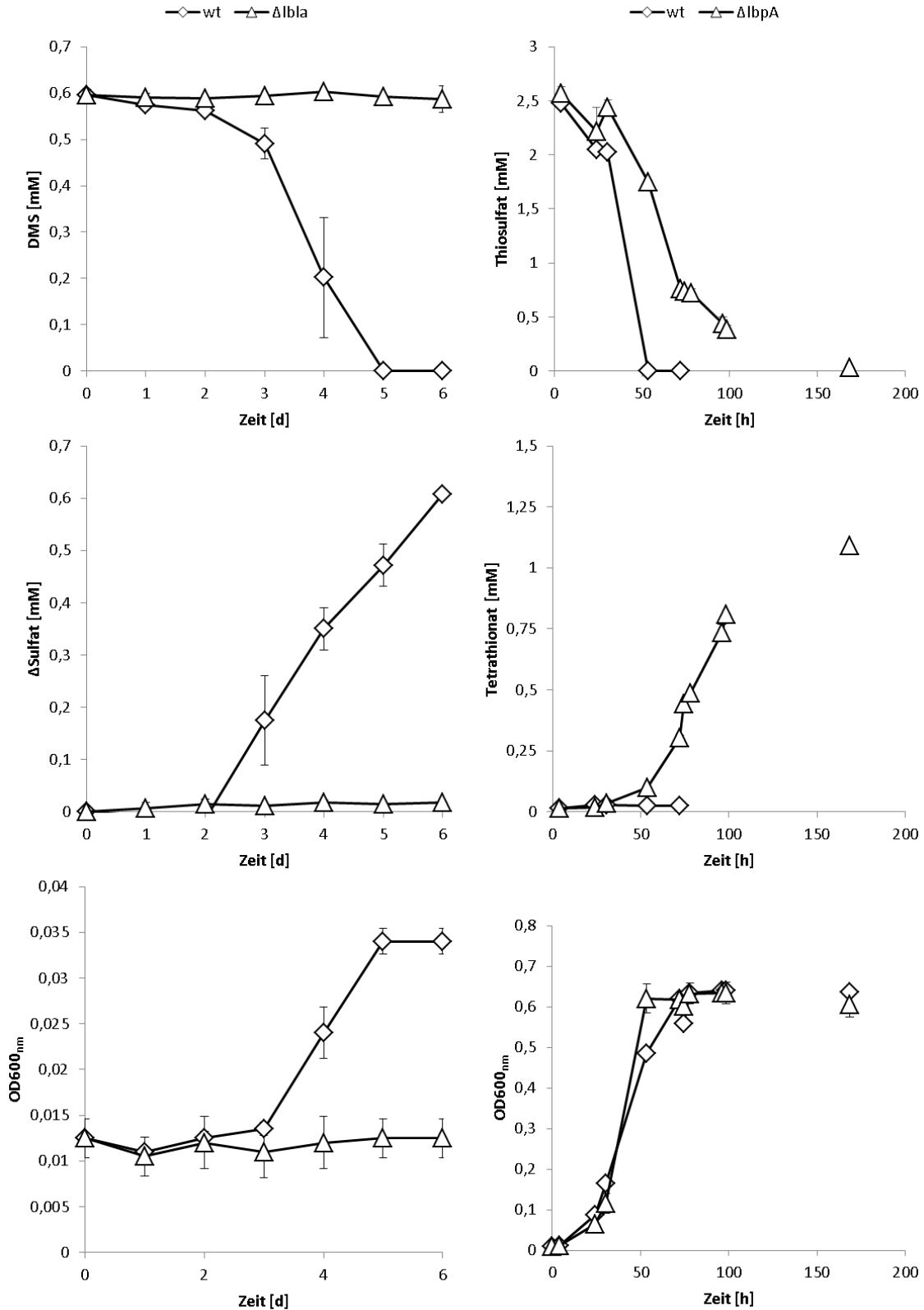
Ähnlich hierzu verhielten sich die Ergebnisse beim Wachstum mit Thiosulfat als Co-Substrat (Abb. 29, rechts). Wie die  $\Delta hdr$ -Mutante oxidierte auch die  $\Delta hdr\Delta sqr$ -Doppelmutante Thiosulfat stöchiometrisch zu Tetrathionat, während keine Sulfatbildung festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zur  $\Delta hdr$ -Mutante fiel hierbei auf, dass die  $\Delta hdr\Delta sqr$ -Doppelmutante bereits direkt nach der Inokulation mit der Oxidation von Thiosulfat begann (Abb. 29, rechts, oben), während die  $\Delta hdr$ -Mutante erst nach dem Erreichen der stationären Phase die Metabolisierung des Thiosulfats startete (Abb. 28, rechts, oben).

#### 4.1.11 Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans* $\Delta lbpA$

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hdr-ähnlichen Proteine essentiell für den DMS-Stoffwechsel und die Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat von *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> waren (4.1.9–4.1.10), sollte geklärt werden, ob LbpA eine essentielle Komponente des Hdr-ähnlichen Komplexes ist. Hierfür wurde eine markerlose *in frame* Deletion von *lbpA* (Hden\_0696) vorgenommen (4.1.3). Die dadurch erzeugte  $\Delta lbpA$ -Mutante sollte weiterhin einen vollständigen Hdr-ähnlichen Komplex (HdrC1B1AHpC2B2) bilden können. Ein möglicher Phänotyp der Mutante wurde durch Wachstumsversuche mit DMS (Abb. 30, links, Dreiecke) sowie mit Thiosulfat als Co-Substrat (Abb. 30, rechts, Dreiecke) durchgeführt.

Die  $\Delta lbpA$ -Mutante zeigte einen Phänotyp, der in seiner Ausprägung den zuvor bereits beobachteten Phänotypen der  $\Delta hdr$ -Mutante bzw. der  $\Delta hdr\Delta sqr$ -Doppelmutante ähnelte. Die Zellen oxidierten kein DMS (Abb. 30, links, oben), bildeten kein Sulfat (Abb. 30, links, Mitte) und zeigten kein messbares Wachstum (Abb. 30, links, unten). Der ähnliche Phänotyp wurde beim Wachstum mit Thiosulfat als Co-Substrat bestätigt (Abb. 30, rechts). Der Wildtyp oxidierte Thiosulfat komplett zu Sulfat (nicht gezeigt) und bildete dabei kein Tetrathionat (Abb. 30, rechts, Mitte). Die  $\Delta lbpA$ -Mutante oxidierte Thiosulfat nur unvollständig zu Tetrathionat und war nicht zur Sulfatbildung befähigt. Zusammengefasst deuteten diese darauf hin, dass LbpA in *Hyphomicrobium* X ebenfalls eine essentielle Rolle im Schwefelstoffwechsel spielt. Die  $\Delta lbpA$ -Mutante wies trotz eines intakten Hdr-ähnlichen Komplexes deutliche Unterschiede zum Wildtyp auf.

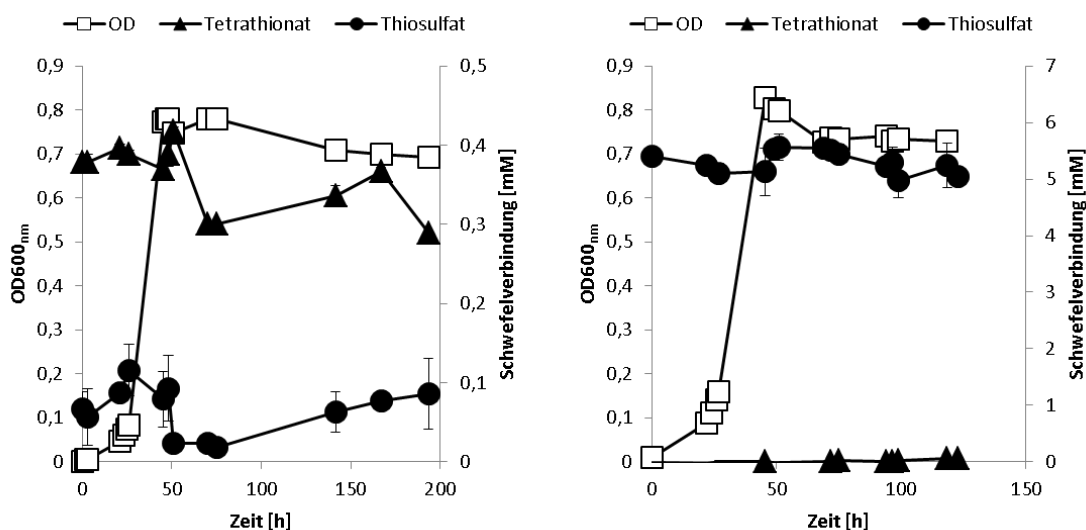




**Abb. 30: Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans*  $\Delta lbpA$  im Vergleich zu wildtypischen Zellen beim Wachstum mit 0,6 mM DMS als Substrat (links) und 24,41 mM Methanol sowie 2,5 mM Thiosulfat (rechts).** Rauten geben jeweils die Werte für den Wildtyp an, Dreiecke die der  $\Delta lbpA$ -Mutante. Die Kulturen wurden jeweils in optimiertem O-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS pH 7,2 kultiviert (100 mL Medium in 500-mL-Serumflaschen beim Wachstum auf DMS und 200 mL in 500-mL-Erlenmeyerkolben beim Wachstum mit Thiosulfat). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

#### 4.1.12 Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans* $\Delta tsdA$

Um zu prüfen, ob die im Genom von *Hyphomicrobium X* kodierte Thiosulfatdehydrogenase vom TsdA-Typ (Hden\_2748) eine physiologische Bedeutung für den Schwefelstoffwechsel des Organismus hat, wurde eine markerlose *in frame* Deletionen von *tsdA* vorgenommen (4.1.3). Zuvor konnten Bedingungen gefunden werden, unter denen wildtypische *Hyphomicrobium X*-Kulturen Thiosulfat stöchiometrisch zu Tetrathionat oxidieren. Zudem konnten andere Wachstumsbedingungen etabliert werden, bei denen Thiosulfat exklusiv zu Sulfat oxidiert wurde (4.1.5). Um zu überprüfen, ob Hden\_2748 als putative TsdA für die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat verantwortlich ist, wurde die  $\Delta tsdA$ -Mutante unter Bedingungen kultiviert, bei denen der Wildtyp Thiosulfat exklusiv zu Tetrathionat oxidiert (Abb. 31, rechts). Zudem wurde parallel überprüft, ob die  $\Delta tsdA$ -Mutante in der Lage ist, Tetrathionat zu verstoffwechseln (Abb. 31, links).



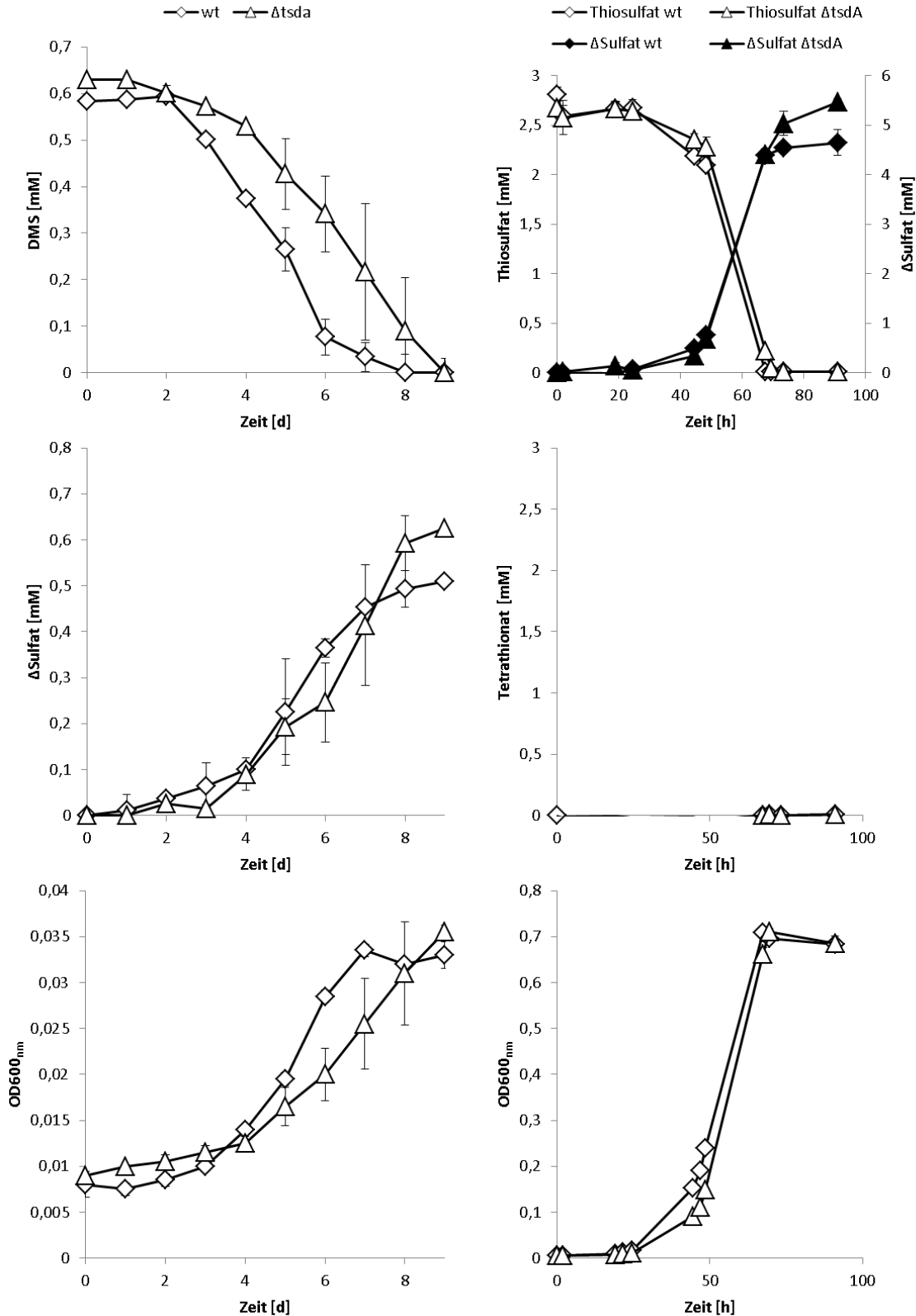
**Abb. 31: Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans*  $\Delta tsdA$  beim Wachstum mit 24,41 mM Methanol und 1 mM Tetrathionat als Substrat (links) und 24,41 mM Methanol sowie 5 mM Thiosulfat (rechts).** Die Kultivierung mit 1 mM Tetrathionat erfolgte in optimiertem 0-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS pH 7,2 (200 mL in 500-mL-Erlenmeyerkolben), die Kultivierung mit 5 mM Thiosulfat in 0-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS pH 7,2 (200 mL in 500-mL-Erlenmeyerkolben). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

Die  $\Delta tsdA$ -Mutante war nicht in der Lage, Tetrathionat zu verstoffwechseln (Abb. 31, links). Wie zuvor schon für den Wildtyp beobachtet (Abb. 19), wuchsen die Kulturen mit dem im Medium enthaltenen Methanol (Abb. 31, links, Quadrate). Das im Medium enthaltene Tetrathionat (Abb. 31, links, Dreiecke) blieb hierbei konstant. Verzeichnete Schwankungen in der Tetrathionat-Konzentration konnten, wie zuvor schon für den Wildtyp gezeigt (Abb. 19), auch innerhalb einer nicht beimpften Kontrolle (hier nicht gezeigt) verzeichnet werden. Selbiges galt für die Veränderungen der Thiosulfat-Konzentration. Im Wachstumsversuch mit 5 mM Thiosulfat (Abb. 31, rechts) konnte festgestellt werden, dass die  $\Delta tsdA$ -Mutante unter Bedingungen, bei denen der Wildtyp Thiosulfat ausschließlich zu Tetrathionat oxidiert (4.1.5), kein Thiosulfat verstoffwechselt. Die im Kulturüberstand gemessene Thiosulfat-Konzentration blieb konstant (Abb. 31, rechts, Kreise), Tetrathionat (Abb. 31, rechts, Dreiecke) oder Sulfat (nicht gezeigt) konnte nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass

Hden\_2748 für eine Thiosulfatdehydrogenase kodiert, die zusätzlich das einzige Enzym von *Hyphomicrobium X* ist, das Thiosulfat zu Tetrathionat umsetzen kann. Zudem wurden die vorher mit dem Wildtyp gemachten Beobachtungen (Abb. 19) bestätigt. Für *Hyphomicrobium X* stellt Tetrathionat ein Endprodukt im Rahmen des oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus dar, das nicht weiter metabolisiert werden kann.

Nachdem Hden\_2748 als einziges tetrathionat-bildendes Enzym in *Hyphomicrobium X* identifiziert werden konnte, sollte geklärt werden, ob die TsdA eine Rolle im Rahmen der Oxidation von DMS spielt. Hierfür wurden Wachstumsversuche mit DMS als Substrat (Abb. 32, links) durchgeführt. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob Hden\_2748 möglicherweise auch in die Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat involviert war. Um dies zu überprüfen, wurden mit der  $\Delta tsdA$ -Mutante Wachstumsversuche unter Bedingungen durchgeführt, bei denen der Wildtyp Thiosulfat ausschließlich zu Sulfat oxidiert (Abb. 32, rechts).

Die  $\Delta tsdA$ -Mutante (Abb. 32, links, Dreiecke) zeigte ein wildtypisches Verhalten bei der Oxidation von DMS und der damit verbundenen Bildung von Sulfat. DMS wurde vollständig verbraucht und der enthaltene Schwefel stöchiometrisch zu Sulfat oxidiert, was mit Wachstum einherging. Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 32, links, Rauten) konnten nicht festgestellt werden. Dies zeigte, dass Hden\_2748 keine Rolle im Rahmen des DMS-Stoffwechsels von *Hyphomicrobium X* spielt. Beim Wachstumsversuch mit Thiosulfat als Co-Substrate konnte ebenfalls kein Unterschied zum Wildtyp verzeichnet werden (Abb. 32, rechts). Mutante und Wildtyp oxidierten Thiosulfat stöchiometrisch zu Sulfat. Eine Bildung von Tetrathionat konnte nicht festgestellt werden. Dies zeigte, dass in *Hyphomicrobium X* zwei thiosulfat-oxidierende Systeme vorhanden sind, die in Abhängigkeit von den gegebenen Wachstumsbedingungen unabhängig voneinander funktionieren. Die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat konnte exklusiv der Aktivität der Thiosulfatdehydrogenase Hden\_2748 zugeschrieben werden. Das zweite System, das Thiosulfat zu Sulfat oxidiert, benötigte als essentielle Komponenten einen funktionalen Hdr-ähnlichen Komplex (Hden\_0689-Hden\_0694) sowie das Lipoatbindeprotein Hden\_0696.



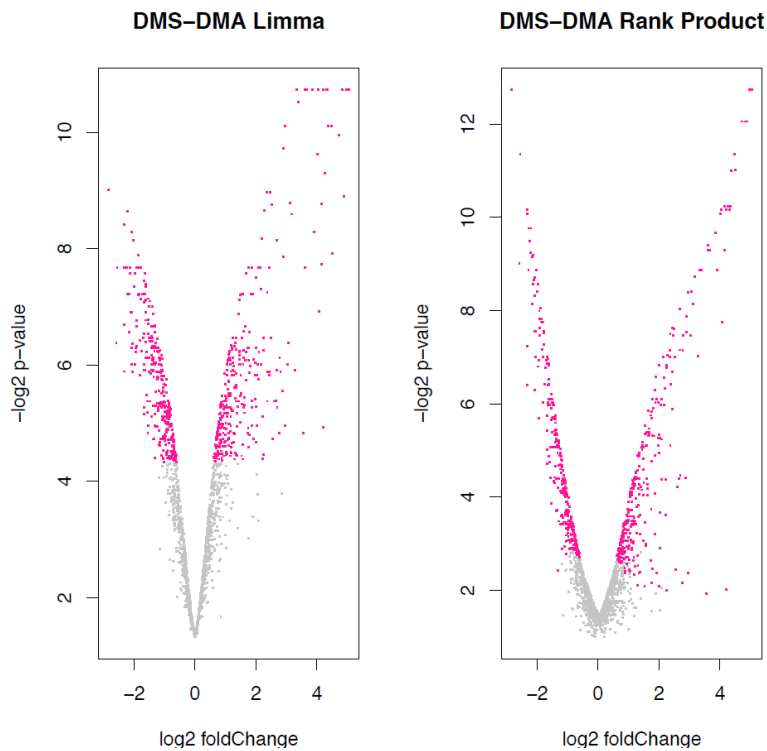
**Abb. 32: Phänotypische Charakterisierung von *H. denitrificans*  $\Delta$ tsdA im Vergleich zu wildtypischen Zellen beim Wachstum mit 0,6 mM DMS als Substrat (links) und 24,41 mM Methanol sowie 2,5 mM Thiosulfat (rechts). Rauten geben jeweils die Werte für den Wildtyp an, Dreiecke die der  $\Delta$ tsdA-Mutante. Die Kulturen wurden jeweils in optimiertem 0-Medium gepuffert mit 100 mM MOPS pH 7,2 kultiviert (100 mL Medium in 500-mL-Serumflaschen beim Wachstum auf DMS und 200 mL in 500-mL-Erlenmeyerkolben beim Wachstum mit Thiosulfat). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.**

#### 4.1.13 Proteom-basierte Einblicke in den Dimethylsulfid-Stoffwechsel von *H. denitrificans*

Da durch bioinformatische Untersuchungen (4.1.1) nur ein grobes Modell für den DMS-Stoffwechsel von *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> erstellt werden konnte, sollte eine vergleichende Proteom-Analyse durchgeführt werden. Ziel hierbei war es, mögliche neue Enzyme zu identifizieren, die im DMS-Stoffwechsel von *Hyphomicrobium* X eine Rolle spielen. Zudem sollte überprüft werden, ob Hdr-ähnliche Proteine beim Wachstum mit DMS als Substrat verstärkt gebildet werden. In den vorangegangenen immunologischen Untersuchungen (4.1.7) konnte dies bereits für HdrA gezeigt werden, jedoch nicht für die anderen Hdr-ähnlichen Proteine. Als zu vergleichende Bedingungen wurde das Wachstum mit Dimethylsulfid als schwefelhaltiges Substrat und Dimethylamin (DMA) als schwefelfreies Substrat gewählt. Die Wahl fiel hierbei auf DMA, da es von den verfügbaren schwefelfreien Substraten mit seinen zwei Methylgruppen chemisch die größte Ähnlichkeit zu DMS aufweist.

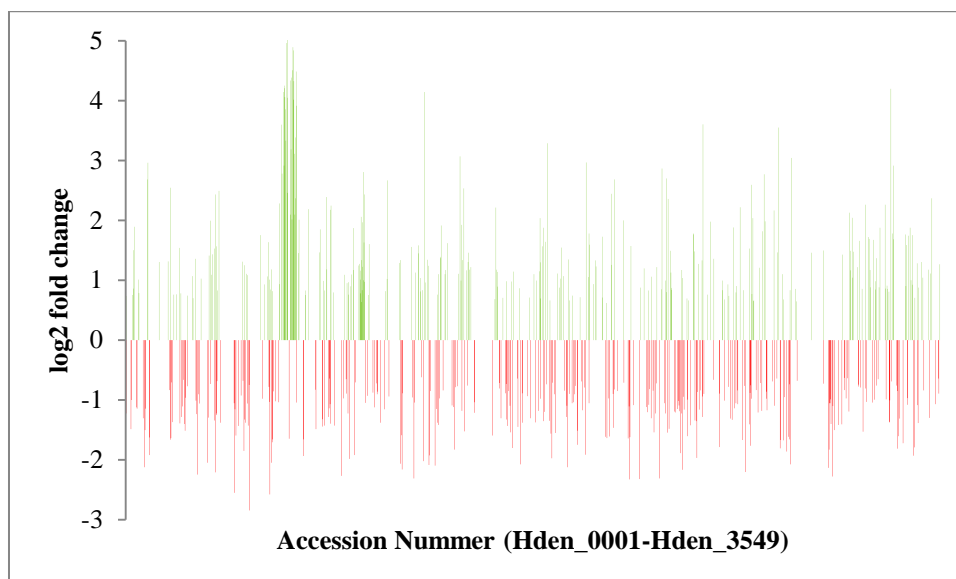
Gemäß NCBI besteht das Genom von *Hyphomicrobium* X<sup>T</sup> aus 3.549 Genen, die insgesamt 3.473 Proteine kodieren. In der durchgeführten Proteom-Analyse konnten insgesamt 1.954 verschiedene Proteine identifiziert werden. Da die Analyse mit drei biologischen Replikaten pro Bedingung durchgeführt wurde, konnten für die Auswertung nur Proteine berücksichtigt werden, die in allen drei Replikaten gefunden wurden (1.859 Proteine). Diese wurden einer statistischen Auswertung (limma und Rank Product) unterzogen (3.8). Es konnten 320 Proteine identifiziert werden, deren Häufigkeiten im Proteom bei Wachstum mit DMS signifikant erhöht waren, und 324, deren Häufigkeiten signifikant verringert waren. Damit war die Proteinhäufigkeit von 35 % aller identifizierten Proteine zwischen den beiden verglichenen Wachstumsbedingungen signifikant verändert. Zur grafischen Darstellung der statistischen Auswertung wurde ein Volcano-Plot erstellt (Abb. 33).

Zur Vereinfachung der Analyse der generierten Daten werden nachfolgend nur die Daten betrachtet, die unter Verwendung des limma-Tests eine signifikante, sehr signifikante oder höchstsignifikante Veränderung aufwiesen. Sämtliche Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten, die bei einem der beiden statistischen Tests als mindestens signifikant gefunden wurden, waren auch unter Anwendung des jeweils anderen Tests signifikant. Die absoluten Zahlenwerte der jeweiligen p-Werte unterschieden sich hierbei.



**Abb. 33: Ergebnisse der vergleichenden Proteom-Analyse mit *Hyphomicrobium X*.** Die normalisierte und zum Logarithmus der Basis 2 verrechneten Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten wurden gegen die logarithmierten (zur Basis 2) p-Werte aufgetragen. Magenta gefärbte Datenpunkte symbolisieren Proteine, deren Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten als signifikant, sehr signifikant oder höchstsignifikant klassifiziert wurden, während graue Datenpunkte nicht signifikante Veränderungen anzeigen.

Zur Überprüfung einer genetischen Vergesellschaftung wurden die Lokus-Tags von Proteinen, deren Häufigkeit statistisch mindestens signifikant beim Wachstum auf einem Substrat verändert war, gegen die jeweiligen logarithmierten Veränderungen der Proteinhäufigkeiten aufgetragen (Abb. 34).



**Abb. 34: Die kodierenden Gene der signifikant regulierten Proteine im Proteom von *Hyphomicrobium X* zeigten eine genetische Vergesellschaftung.** Die gemäß limma-Test mindestens signifikant hinsichtlich der relativen Proteinhäufigkeit veränderten Proteine wurden mit den jeweiligen Lokus-Tags gegen die normalisierte und zum Logarithmus der Basis 2 verrechneten Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten aufgetragen. Grüne Balken zeigen einen positiven Wert an, rote Balken einen negativen.

Es zeigte sich, dass die kodierenden Gene der Proteine, die beim Wachstum mit DMS oder DMA häufiger im Proteom von *Hyphomicrobium X* zu finden waren, über die gesamte Länge des Genoms verteilt vorlagen. Zudem konnte ein Bereich im Genom erkannt werden, der besonders viele Proteine kodiert, die beim Wachstum mit DMS häufiger im Proteom zu finden waren. Innerhalb der Operon-Strukturen von Hden\_0669 bis Hden\_0759, die insgesamt 86 Gene umfassen, werden 36 Proteine kodiert mit einer mindestens signifikant erhöhten Häufigkeit im DMS-Proteom. Von diesen 36 Proteinen waren 34 mindestens um einen log<sub>2</sub> fold change von 1,5 oder größer erhöht. Von allen mindestens signifikant im DMS-Proteom in ihrer Häufigkeit erhöhten Proteinen wiesen insgesamt nur 122 einen log<sub>2</sub> fold change von 1,5 oder auf. Damit liegt mehr als ein Viertel dieser Proteine innerhalb der angesprochenen Region des Genoms kodiert vor. Bei diesen Proteinen handelt es sich unter anderem um das Hdr-ähnliche System (Hden\_0689-Hden\_0694), das Sox-System (Hden\_0702-Hden\_0706), die Methanthioloxidase (Hden\_0743) und das *cst*-ähnliche Operon (Hden\_0718-Hden\_0721).

Weiterführend wurde geprüft, ob Proteine mit einer möglichen Rolle im Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium X* (Tab. 15) auch innerhalb der Proteom-Analyse gefunden werden konnten (Tab. 17).

**Tab. 17: Veränderungen der relativen Protein-Level von Proteinen mit einer möglichen Funktion im oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von *Hyphomicrobium X*.** p-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant klassifiziert (\*), p-Werte ≤ 0,01 wurden als sehr signifikant klassifiziert (\*\*), p-Werte ≤ 0,001 als höchstsignifikant (\*\*\*), nd = nicht detektiert.

Lokus-Tag	Name	Annotation	log <sub>2</sub> fold change / Signifikanz	Quelle
<b>Hden_0688</b>	DsrE-like	DsrE, sulfurtransferase	4,1**	Liu <i>et al.</i> (2014); Stockdreher <i>et al.</i> (2014)
<b>Hden_0689</b>	HdrC1	heterodisulfide reductase subunit C	nd	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
<b>Hden_0690</b>	HdrB1	heterodisulfide reductase subunit B	2,9**	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
<b>Hden_0691</b>	HdrA	heterodisulfide reductase subunit A	4,3**	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
<b>Hden_0692</b>	Hyp	hypothetical protein encoded in all <i>hdr</i> -like gene clusters	nd	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
<b>Hden_0693</b>	HdrC2	heterodisulfide reductase subunit C	4,2***	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
<b>Hden_0694</b>	HdrB2	heterodisulfide reductase subunit B	4,1**	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
<b>Hden_0696</b>	LbpA	glycine cleavage system H protein	3,9***	Liu <i>et al.</i> (2014)
<b>Hden_0698</b>	TusA	tRNA 2-thiouridine synthesizing protein A	3,3***	Stockdreher <i>et al.</i> (2014)
<b>Hden_0699</b>	YeeE/YedE	Transporter for sulfur-containing compounds	nd	Gristwood <i>et al.</i> (2011)
<b>Hden_0702</b>	SoxX	sulfur-oxidizing protein SoxX	5,0***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_0703</b>	SoxA	sulfur-oxidizing protein SoxA	4,7***	Dahl <i>et al.</i> , (2008)

Lokus-Tag	Name	Annotation	log2 fold change / Signifikanz	Quelle
<b>Hden_0704</b>	SoxY	sulfur-oxidizing protein SoxY	2,5**	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_0705</b>	SoxZ	sulfur-oxidation protein SoxZ	5,1***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_0706</b>	SoxB	sulfur-oxidizing protein SoxB	4,0***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_0718</b>	SqrB	sulfide:quinone oxidoreductase SqrB-type	2,1*	Shen <i>et al.</i> (2016)
<b>Hden_0719</b>		DUF442, cytoplasmic uncharacterized protein, conforms to rhodanese motif	nd	Bordo & Bork (2002); Shen <i>et al.</i> (2015)
<b>Hden_0720</b>		TauE sulfite exporter domain	nd	Weinitschke <i>et al.</i> (2007)
<b>Hden_0730</b>		putative dimethylsulfide monooxygenase / FMN-dependent NADH-azoreductase	4,0**	
<b>Hden_0740</b>	PDO	cytoplasmic persulfide dioxxygenase	2,4**	Shen <i>et al.</i> (2015)
<b>Hden_0743</b>	MTO	methanethiol oxidase	4,3***	Eyice <i>et al.</i> (2018)
<b>Hden_0756</b>	Sbp	periplasmic thiosulfate/sulfate-binding protein, sulfate/thiosulfate ABC transporter	2,0**	Sirko <i>et al.</i> (1995)
<b>Hden_0880</b>	Rhd	rhodanese cytoplasmic	0,5	
<b>Hden_1147</b>	SoxYZ	SoxY/SoxZ like fusion protein	-0,9*	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_1399</b>	SoxZ	SoxZ like	0,4	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_1400</b>	SoxY	SoxY like	-0,1	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_1401</b>	FccB	flavocytochrome c sulfide dehydrogenase flavin-binding protein	1,6*	Dahl <i>et al.</i> (2008)
<b>Hden_1960</b>	Rhd	rhodanese cytoplasmic	-0,8*	Gliubich <i>et al.</i> (1996); Bordo & Bork (2002)
<b>Hden_2748</b>	TsdA	thiosulfate dehydrogenase	-0,8*	Denkmann <i>et al.</i> (2012)

Teile des Hdr-ähnlichen Komplexes sowie des Sox-Systems waren sehr signifikant oder höchstsignifikant häufiger im DMS-Proteom zu finden. Lediglich HdrC1 und das hypothetische Protein aus dem *hdr*-ähnlichen Gencluster konnten nicht im Proteom detektiert werden. Mit einem log2 fold change von 5,1 bzw. 5,0 waren SoxZ bzw. SoxY dabei die am stärksten in ihrer Häufigkeit signifikant veränderten Proteine im gesamten Proteom (Tab. 18). Die putativen Sox-Homologe, die außerhalb des eigentlichen *sox*-Genclusters (Hden\_0702-Hden\_0706) kodiert vorliegen, unterlagen mit Ausnahme von Hden\_1147 keiner signifikanten Veränderung der Proteinhäufigkeit oder wurden nicht im Proteom gefunden. Von den im *cst*-ähnlichen Operon kodierten Proteinen konnte nur die Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (Hden\_0718) im Proteom detektiert werden. Andere Proteine mit einer nachgewiesenen oder postulierten Funktion im Schwefelstoffwechsel, wie die Persulfiddioxygenase (Hden\_0740), TusA (Hden\_0698) oder DsrE (Hden\_0688), wiesen signifikante positive



Veränderungen der Proteinhäufigkeiten auf. Die Thiosulfatdehydrogenase (Hden\_2748) hingegen war signifikant weniger häufig im DMS-Proteom zu finden. Unter den sehr signifikant häufiger im DMS-Proteom zu findenden Proteinen befand sich mit Hden\_0730 ein als ‚FMN-dependent NADH-azoreductase‘ annotiertes Protein (log<sub>2</sub> fold change 4,0). Von den insgesamt 320 signifikant häufiger beim Wachstum mit DMS vorkommenden Proteinen war Hden\_0730 an Stelle 17 gelistet. Unter Berücksichtigung, dass in anderen Organismen FMN-abhängige Oxidoreduktasen als DMS-Monooxygenase fungieren (Boden *et al.*, 2011), wurde Hden\_0730 in Tab. 17 als potentielle DMS-Monooxygenase von *Hyphomicrobium X* genannt.

Proteine, deren relative Häufigkeiten sich sehr signifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von mindestens 2,5 im DMS-Proteom erhöht hatten, wurden in Tab. 18 zusammengefasst.

**Tab. 18: Proteine, deren relative Häufigkeiten im Proteom von *Hyphomicrobium X* sich sehr signifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von mindestens 2,5 beim Wachstum mit DMS als Substrat erhöht haben.** p-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant klassifiziert (\*), p-Werte ≤ 0,01 wurden als sehr signifikant klassifiziert (\*\*) und p-Werte ≤ 0,001 als höchstsignifikant (\*\*\*).

Lokus-Tag	Name	Annotation	log <sub>2</sub> fold change / Signifikanz
Hden_0705	SoxZ	sulfur-oxidation protein SoxZ	5,1***
Hden_0702	SoxX	sulfur-oxidizing protein SoxX	5,0***
Hden_0729		hypothetical protein	4,9**
Hden_0731		peroxidase	4,8***
Hden_0703	SoxA	sulfur-oxidizing protein SoxA	4,7**
Hden_0728		hypothetical protein	4,5**
Hden_0743	MTO	methanethiol oxidase	4,5***
Hden_0723		conserved hypothetical protein, periplasmic	4,4***
Hden_0719		DUF442, cytoplasmic ncharacterized protein, conforms to rhodanese motif	4,3***
Hden_0733		globin	4,3***
Hden_0691	HdrA	heterodisulfide reductase subunit A	4,3**
Hden_0693	HdrC2	heterodisulfide reductase subunit C	4,2***
Hden_0688	DsrE-like	conserved hypothetical protein	4,1**
Hden_1301	OsmC	OsmC family protein	4,1**
Hden_0694	HdrB2	heterodisulfide reductase subunit B	4,1**
Hden_0706	SoxB	sulfur-oxidizing protein SoxB	4,0***
Hden_0730		putative dimethylsulfide monooxygenase / FMN-dependent NADH-azoreductase	4,0**
Hden_0745		alkylhydroperoxidase like protein, AhpD family	3,9**
Hden_0696	LbpA	glycine cleavage system H protein	3,9***
Hden_0732		fatty acid desaturase	3,7***
Hden_2517		conserved hypothetical protein	3,6**
Hden_0679		DsbA oxidoreductase	3,6***
Hden_0738		hypothetical protein	3,4***
Hden_0698	TusA	tRNA 2-thiouridine synthesizing protein A	3,3***
Hden_0721		beta-lactamase domain protein, periplasmic	3,2**

Lokus-Tag	Name	Annotation	log2 fold change / Signifikanz
Hden_0734		oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	3,1**
Hden_0096		alcohol dehydrogenase GroES domain protein	3,0***
Hden_3348		imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	2,9**
Hden_0690	HdrB1	heterodisulfide reductase subunit B	7,5**
Hden_0095		cold-shock DNA-binding domain protein	2,7**
Hden_1474		formaldehyde-activating enzyme	2,5**
Hden_0704	SoxY	sulfur-oxidizing protein SoxY	2,5**

Neben den zuvor bereits behandelten Proteinen mit einer potentiellen Rolle im oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus (Tab. 17) konnten zahlreiche weitere Proteine identifiziert werden, die beim Wachstum mit DMS sehr signifikant häufiger im Proteom zu finden waren. Viele dieser Proteine konnten mit bioinformatischen Methoden nicht näher charakterisiert werden, da sie nur geringe Homologien zu charakterisierten Proteinen aus anderen Organismen aufwiesen. Ausnahmen davon bildeten das Lipoatbindeprotein LbpA (Hden\_0696), ein Protein aus dem *cst*-ähnlichen Operon (Hden\_0721) sowie weiteres Protein mit einer Rolle im Rahmen von oxidativem Stress (Nývltová *et al.*, 2016) (OsmC, Hden\_1301). Auffällig war auch hier eine genetische Vergesellschaftung der kodierenden Gene. Nur sechs der 32 sehr signifikant mit einem positiven log2 fold change von mindestens 2,5 veränderten Proteine lagen außerhalb der Operon-Strukturen von Hden\_0669 bis Hden\_0759.

Neben den Proteinen, deren relative Proteinhäufigkeiten im DMS-Proteom sehr signifikant positiv verändert waren, wurden auch die Proteine zusammengefasst, deren relative Proteinhäufigkeiten eine sehr signifikante negative Veränderung aufwiesen (Tab. 19).

**Tab. 19: Übersicht über Proteine, deren relative Häufigkeiten im Proteom von *Hyphomicrobium* X sich sehr signifikant um einen log2 fold change von mindestens -1,5 beim Wachstum mit DMS als Substrat verringert haben. p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant klassifiziert (\*), p-Werte  $\leq 0,01$  wurden als sehr signifikant klassifiziert (\*\*), p-Werte  $\leq 0,001$  als höchstsignifikant (\*\*\*).**

Lokus-Tag	Name	Annotation / Quelle	log2 fold change / Signifikanz
Hden_0539	GcsT	glycine cleavage T protein (aminomethyl transferase)	-2,8**
Hden_0474	HpnC	squalene synthase HpnC	-2,6**
Hden_2197		carbonic anhydrase	-2,3**
Hden_1256		iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-2,3**
Hden_2327		hypothetical protein	-2,3**
Hden_3080		flagellar FlaF family protein	-2,3**
Hden_0941		sugar fermentation stimulation protein	-2,3**
Hden_0312		hypothetical protein	-2,2**
Hden_0390		hypothetical protein	-2,2**
Hden_2700	CobW	cobalamin biosynthesis protein	-2,2**

Lokus-Tag	Name	Annotation / Quelle	log2 fold change / Signifikanz
Hden_2427		conserved hypothetical protein	-2,2**
Hden_3065		response regulator receiver protein	-2,1**
Hden_1926		methylmalonyl-CoA epimerase	-2,1**
Hden_0082	DmmA	dimethylamine monooxygenase subunit DmmA (Lidbury <i>et al.</i> , 2017)	-2,1**
Hden_1348		conserved hypothetical protein	-2,1**
Hden_1321		cytochrome c class I	-2,1**
Hden_2899		processing peptidase	-2,1**
Hden_1296		hypothetical protein	-2,0**
Hden_0976		gamma-glutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase	-2,0**
Hden_1858		3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-2,0**
Hden_1324		conserved hypothetical protein	-1,9**
Hden_0103		methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	-1,9**
Hden_2004		ribonuclease T2	-1,9**
Hden_2419		OmpA/MotB domain protein	-1,9**
Hden_2882		putative disulfide bond formation protein D	-1,9**
Hden_0515		glutamine synthetase, type III	-1,9**
Hden_1433		molybdopterin dinucleotide-binding region	-1,8**
Hden_3066		response regulator receiver modulated CheB methylesterase	-1,8**
Hden_3363		3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	-1,8**
Hden_3439		Beta-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase III	-1,8**
Hden_2589		protein of unknown function DUF2093	-1,8**
Hden_2724		peptide deformylase	-1,8**
Hden_3389		glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	-1,7**
Hden_0196	EtfB	electron transfer flavoprotein alpha/beta-subunit	-1,7**
Hden_2895		conserved hypothetical protein	-1,7**
Hden_0712		conserved hypothetical protein	-1,7**
Hden_2190		3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	-1,6**
Hden_0197	EtfA	electron transfer flavoprotein alpha/beta-subunit	-1,6**
Hden_0102		methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	-1,6**
Hden_2198		hypothetical protein	-1,6**
Hden_2090		iron sulfur domain-containing, CDGSH-type	-1,6**

Lokus-Tag	Name	Annotation / Quelle	log2 fold change / Signifikanz
Hden_3369		3-isopropylmalate dehydratase, large subunit	-1,6**
Hden_2450		Sell domain protein repeat-containing protein	-1,6**
Hden_1677		cyclase/dehydrase	-1,5**
Hden_3214		hypothetical protein	-1,5**
Hden_0083	DmmB	dimethylamine monooxygenase subunit DmmB (Lidbury <i>et al.</i> , 2017)	-1,5**
Hden_0084	DmmC	dimethylamine monooxygenase subunit DmmC (Lidbury <i>et al.</i> , 2017)	-1,5**
Hden_0022		signal transduction protein	-1,5**

Durch BLASTP-Analysen konnten in den meisten Fällen keine charakterisierten homologen Proteine gefunden werden. Zusätzlich lag keine auffällige genetische Vergesellschaftung der kodierenden Gene vor (Abb. 34). Eine Ausnahme hiervon bildete Hden\_0539, das T-Protein des Glycinspaltungssystems, das gleichzeitig das Protein mit dem höchsten negativen, sehr signifikanten log2 fold change im DMS-Proteom war. Gleiches gilt für die drei Untereinheiten der Dimethylamin-Dehydrogenase DmmABC (Hden\_0082-Hden\_0084) sowie das elektronentransferierende Flavoprotein EtfAB (Hden\_0196-Hden\_0197). Diese Proteine konnten durch die Identifizierung von homologen Proteinen annotiert werden.

## 4.2 *Hyphomicrobium* EG-Ansatz

### 4.2.1 Bioinformatische Untersuchung zum Schwefelmetabolismus in *Hyphomicrobium denitrificans* EG

Für den Organismus *Hyphomicrobium denitrificans* EG ist keine öffentlich zugängliche Sequenz des Genoms des Organismus verfügbar. Im Jahr 2012 wurde *Hyphomicrobium* EG von dem niederländischen Unternehmen Koninklijke DSM N.V im Rahmen einer Patententwicklung (US-Patent: US20150147365A1) sequenziert. Die ermittelten Genom-Sequenzen wurden auf Nachfrage für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Sequenz lag in sieben Contigs vor, die zusammen eine Länge von 4.140.449 Bp aufweisen und insgesamt 3.615 Proteine kodieren. Die Qualität der Annotation des Genoms ist nicht hoch, da 1.522 der Proteine (42 %) als hypothetische neue Proteine annotiert sind. Um zu evaluieren, welche Enzyme für einen oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel im Genom von *Hyphomicrobium* EG vorliegen, wurde das Genom des Organismus einer ausführlichen bioinformatischen Untersuchung unterzogen (Tab. 20).

**Tab. 20: Proteine mit einer möglichen Funktion im oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von *Hyphomicrobium denitrificans* EG.** Die jeweils angegebenen Referenzproteine wurden mittels der Blast-Funktion von BioEdit gegen das translatierte Proteom von *Hyphomicrobium* EG geblastet.

Name	Lokus-Tag	Annotation	E-Value	Referenzprotein	Quelle
AprA	/	/	/	Alvin_1121	Dahl <i>et al.</i> (2008)

Name	Lokus-Tag	Annotation	E-Value	Referenzprotein	Quelle
AprB	/	/	/	Alvin_1120	Dahl <i>et al.</i> (2008)
AprM	/	/	/	Alvin_1119	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DMS-Monooxygenase	/	/	/	DmoA aus <i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	Boden <i>et al.</i> (2011)
DmsA	HdeA00819	Probable oxidoreductase YoaE	$7,0 \cdot 10^{-58}$	DmsA aus <i>Escherichia coli</i>	Bilous <i>et al.</i> (1988)
DmsB	/	/	/	DmsB aus <i>Escherichia coli</i>	Bilous <i>et al.</i> (1988)
DmsC	/	/	/	DmsC aus <i>Escherichia coli</i>	Bilous <i>et al.</i> (1988)
DMS-Oxidase	HdeA00801	Xylene monooxygenase electron transfer component	$2,0 \cdot 10^{-44}$	DsoF aus <i>Acinetobacter</i> strain 20B sp.	Horinouchi <i>et al.</i> (1997)
DoxA	/	/	/	DoxA aus <i>Acidianus ambivalens</i>	Müller <i>et al.</i> (2004)
DoxD	/	/	/	DoxD aus <i>Acidianus ambivalens</i>	Müller <i>et al.</i> (2004)
DsrA	/	/	/	Alvin_1251	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DsrB	/	/	/	Alvin_1252	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DsrC	/	/	/	Alvin_1256	Dahl <i>et al.</i> (2008)
DsrE3-like	HdeA00846	Hypothetical new protein	$8,0 \cdot 10^{-6}$	Mcup_0681	Liu <i>et al.</i> (2014)
FccA	HdeA03455	Sulfide dehydrogenase [flavocytochrome c] flavoprotein	$1,0 \cdot 10^{-91}$	Alvin_1092	Dahl <i>et al.</i> (2008)
	HdeA00827	Sulfide dehydrogenase [flavocytochrome c] flavoprotein	$2,0 \cdot 10^{-70}$		
FccB	HdeA03158	Cytochrome c4	$2,0 \cdot 10^{-7}$	Alvin_1093	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdrA	HdeA00843	CoB--CoM heterodisulfide reductase iron-sulfur subunit A	$1,0 \cdot 10^{-123}$	AFE_2553	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrB1	HdeA00844	Heterodisulfide reductase subunit B-like protein	0,0	AFE_2554	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrB2	HdeA00840	CoB--CoM heterodisulfide reductase 1 subunit B	$1,0 \cdot 10^{-113}$	AFE_2550	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrC1	HdeA00845	CoB--CoM heterodisulfide reductase 1 iron-sulfur subunit	$1,0 \cdot 10^{-102}$	AFE_2555	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdrC2	HdeA00841	Heterodisulfide reductase subunit C-like protein	$4,0 \cdot 10^{-75}$	AFE_2551	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
Hyp	HdeA00842	Hypothetical new protein	$7,0 \cdot 10^{-24}$	AFE_2552	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
LbpA	HdeA01679	Glycine cleavage system H protein 2	$2,0 \cdot 10^{-28}$	AFE_2549	Liu <i>et al.</i> (2014)

Name	Lokus-Tag	Annotation	E-Value	Referenzprotein	Quelle
	HdeA00838	Glycine cleavage system H protein 5	$3,0 \cdot 10^{-18}$		
Methanthioloxidase	HdeA00762	Selenium-binding protein 1-A	0,0	Methanthioloxidase aus <i>Hyphomicrobium</i> VS	Eyice <i>et al.</i> (2018)
	HdeA00789	Selenium-binding protein 1-A	0,0		
Persulfidoxxygenase-like	HdeA00783	Beta-lactamase hydrolase-like protein	$3,0 \cdot 10^{-91}$	PDO2 aus <i>Pseudomonas putida</i>	Sattler <i>et al.</i> (2015)
	HdeA00766	Beta-lactamase hydrolase-like protein	$6,0 \cdot 10^{-90}$		
	HdeA01337	Beta-lactamase hydrolase-like protein	$8,0 \cdot 10^{-87}$		
	HdeA03175	Protein ETHE1, mitochondrial	$1,0 \cdot 10^{-21}$		
QmoA	/	/	/	QmoA aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dahl <i>et al.</i> (2008)
QmoB	/	/	/	QmoB aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dahl <i>et al.</i> (2008)
QmoC	/	/	/	QmoC aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dahl <i>et al.</i> (2008)
Sat	/	/	/	Alvin_1118	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoeA	/	/	/	Alvin_2491	Dahl <i>et al.</i> (2013)
SoeB	/	/	/	Alvin_2490	Dahl <i>et al.</i> (2013)
SoeC	/	/	/	Alvin_2489	Dahl <i>et al.</i> (2013)
SorA	HdeA00734	Sulfite oxidase, mitochondrial	$1,0 \cdot 10^{-113}$	SorA aus <i>Starkeya novella</i>	Kappler <i>et al.</i> (2000)
SorB	HdeA00733	Hypothetical new protein	$1,0 \cdot 10^{-12}$	SorB aus <i>Starkeya novella</i>	Kappler <i>et al.</i> (2000)
SoxA	HdeA00831	Hypothetical new protein	$9,0 \cdot 10^{-13}$	Alvin_2169	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxB	HdeA00828	Protein 5NUC	$1,0 \cdot 10^{-142}$	Alvin_2167	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxC	HdeA00726	Nitrate reductase [NADH	$5,0 \cdot 10^{-84}$	SoxC aus <i>Paracoccus pantotrophus</i>	Wodara <i>et al.</i> (1997)
SoxD	/	/	/	SoxD aus <i>Paracoccus pantotrophus</i>	Wodara <i>et al.</i> (1997)
SoxF	HdeA03455	Sulfide dehydrogenase [flavocytochrome c] flavoprotein	$1,0 \cdot 10^{-103}$	SoxF aus <i>Paracoccus pantotrophus</i>	Quentmeier <i>et al.</i> (2004)
	HdeA00827	Sulfide dehydrogenase [flavocytochrome c] flavoprotein	$1,0 \cdot 10^{-93}$		
SoxX	HdeA00832	Uncharacterized lipoprotein aq_1806	$4,0 \cdot 10^{-7}$	Alvin_2168	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxY	HdeA00830	Hypothetical new protein	$5,0 \cdot 10^{-11}$	Alvin_2111	Dahl <i>et al.</i> (2008)
SoxZ	HdeA00829	Hypothetical new protein	$6,0 \cdot 10^{-12}$	Alvin_2112	Dahl <i>et al.</i> (2008)

Name	Lokus-Tag	Annotation	E-Value	Referenzprotein	Quelle
Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrB-Typ	HdeA00784	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	$3,0 \cdot 10^{-96}$	Sqr aus <i>Staphylococcus aureus</i>	Shen <i>et al.</i> (2016)
Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrD-Typ	/	/	/	Alvin_2145	Weissgerber <i>et al.</i> (2013)
Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrF-Typ	/	/	/	Alvin_1195	Weissgerber <i>et al.</i> (2013)
TauE	HdeA00781	protein of unknown function DUF81	$1,0 \cdot 10^{-122}$	Hden_0720	Weinitschke <i>et al.</i> (2007)
TetH	/	/	/	AFE_0029	Kanao <i>et al.</i> (2007)
TsdA	HdeA02384	Hypothetical new protein	$7,0 \cdot 10^{-45}$	Alvin_0091	Denkmann <i>et al.</i> (2012)
TusA	HdeA00836	UPF0033 protein NMB0681	$1,0 \cdot 10^{-19}$	Alvin_2600	Stockdreher <i>et al.</i> (2014)

Für die in der Literatur beschriebene Oxidation von Sulfid (Suylen *et al.*, 1986; Suylen *et al.*, 1987) konnten zwei FccA-ähnliche Proteine (HdeA03455, HdeA00827) identifiziert werden. Beide jeweils kodierenden Gene liegen im Genom ohne ein benachbartes Gen vor, das für ein FccB-ähnliches Protein kodiert. Ein Gen für ein mögliches FccB-Homolog (HdeA03158) liegt an einer anderen Stelle im Genom. Das FccA-ähnliche Protein HdeA03455, das als ‚Sulfide dehydrogenase [flavocytochrome c] flavoprotein‘ annotiert ist, besitzt auch eine Ähnlichkeit zu SoxF. Im Genom von *Hyphomicrobium* EG konnte ein *cst*-ähnliches Operon gefunden werden (HdeA00780-HdeA00784). Dieses beinhaltet neben einer Sqr vom B-Typ (HdeA00784) zusätzlich ein Gen für eine PDO (HdeA00783), ein Gen für ein Protein mit einem Rhodanese-Motiv (HdeA00782) und ein weiteres Gen für ein TauE-ähnliches Protein (HdeA00781). Ergänzt wird das Cluster mit einem weiteren Gen, dessen kodiertes Protein eine Ähnlichkeit zu Hden\_0721 aus dem *cst*-ähnlichen Operon von *Hyphomicrobium* X besitzt. Zur Oxidation von elementarem Schwefel konnte neben der PDO ein vollständiges Hdr-ähnliches System (HdeA00845-HdeA00840) inklusive LbpA (HdeA00838) und DsrE-ähnlichem Protein (HdeA00846) gefunden werden. Für die in der Literatur beschriebene Oxidation von Thiosulfat (Suylen *et al.*, 1986) wurden eine Thiosulfatdehydrogenase vom TsdA-Typ (HdeA02384) und ein unvollständiges Sox-System (SoxABXYZ, HdeA00828-HdeA00832) identifiziert. Ein Protein mit einer Ähnlichkeit zu SoxC (HdeA00726) wurde an einer anderen Stelle im Genom gefunden, ein SoxD-Homolog fehlte. Das putative SoxC-Homolog liegt als einzelnes Gen im Genom umgeben von zwei anderen Operon-Strukturen (in jeweils anderer Leserichtung) kodiert vor. Für die Oxidation von Sulfit zu Sulfat konnte ein Protein mit einer Ähnlichkeit zu SorA (HdeA00734) identifiziert werden, das in einem Operon mit einem möglichen SorB-Homolog (HdeA00733) liegt. Homologe zur Adenylylsulfat-Reduktase, ATP-Sulfurylase oder SoeABC konnten nicht gefunden werden.

In der Literatur ist belegt, dass *Hyphomicrobium* EG DMSO, DMS oder Methanthiol als Organoschwefelsubstrate verstoffwechseln kann (Suylen *et al.*, 1986; Suylen & Kuenen, 1986; Suylen *et al.*, 1987). Ähnlich wie bei *Hyphomicrobium* X sind auch bei *Hyphomicrobium* EG die in den

Abbau von Organoschwefelverbindungen involvierten Enzyme unklar. Für die Reduktion von DMSO verfügt der Organismus über ein Homolog von DmsA aus *E. coli* (HdeA00819), DmsB- und DmsC-Homologe fehlen. Eine DMS-Monooxygenase vom DmoAB-Typ (Boden *et al.*, 2011) konnte nicht im Genom identifiziert werden, dafür aber ein Homolog zur DsoF-Untereinheit einer DMS-Oxidase (HdeA00801). Die anderen Komponenten eines möglichen Oxidase-Komplexes (DsoA-DsoE) fehlten. Für die Oxidation von Methanthiol wurden zwei Gene identifiziert, die für Methanthioloxidasen kodieren (HdeA00789, HdeA00762). Auffällig war hierbei, dass HdeA00789 im Gegensatz zu HdeA00762 und sämtlichen weiteren bisher beschriebenen Methanthioloxidasen kein Signalpeptid aufwies.

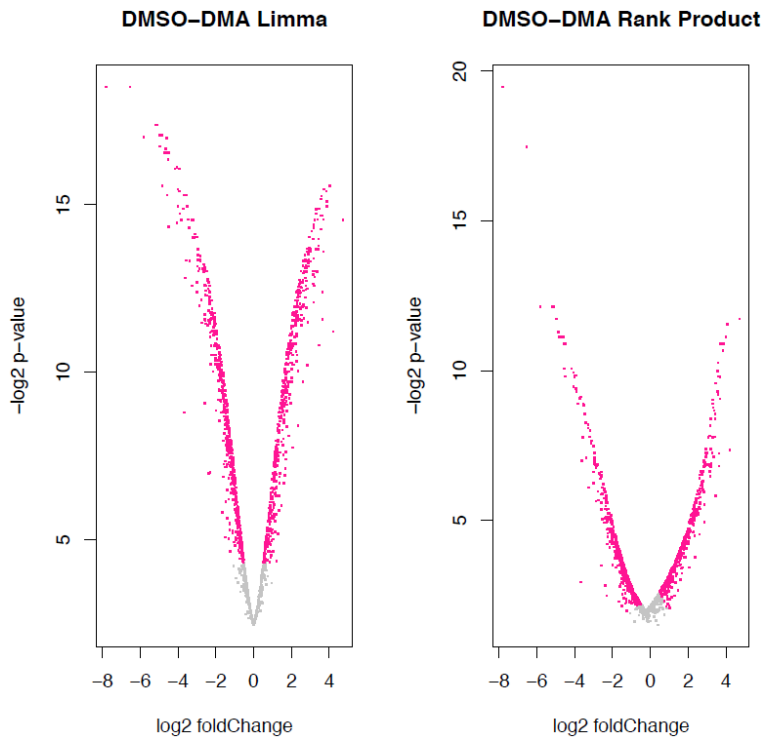
#### **4.2.2 Proteom-basierte Einblicke in den Dimethylsulfoxid-Stoffwechsel von *Hyphomicrobium denitrificans* EG**

*Hyphomicrobium denitrificans* EG verfügt über ein Operon, das für ein Hdr-ähnliches System kodiert (HdeA00845-HdeA00840, Tab. 20). Da der Organismus mesophil ist und für ihn in der Literatur bereits ein oxidativer dissimilatorischer Schwefelmetabolismus beschrieben wurde (Suylen *et al.*, 1986; Suylen *et al.*, 1987), wäre *Hyphomicrobium* EG ein potentieller Modellorganismus zur Erforschung von Hdr-ähnlichen Proteinen. Zur Untersuchung, ob die Hdr-ähnlichen Proteine eine Rolle im Rahmen des Schwefelstoffwechsels von *Hyphomicrobium* EG spielen, wurde eine vergleichende Proteom-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Proteome von mit DMSO kultivierten Zellen (schwefelhaltiges Substrat) mit denen von auf DMA als Substrat gewachsenen Zellen (schwefelfreies Substrat) verglichen.

Das Genom von *Hyphomicrobium* EG kodiert für 3.615 Proteine. Von diesen konnten 1.744 innerhalb der durchgeführten Proteom-Analyse identifiziert werden. Für die statistische Auswertung (limma und Rank Product) wurden nur Proteine berücksichtigt, die in allen drei Replikaten gefunden werden konnten (1.529 Proteine, Abb. 35). Die relative Häufigkeit von 493 Proteinen war beim Wachstum mit DMSO als Substrat mindestens signifikant erhöht. Ebenfalls war die relative Häufigkeit von 644 Proteinen mindestens signifikant verringert.

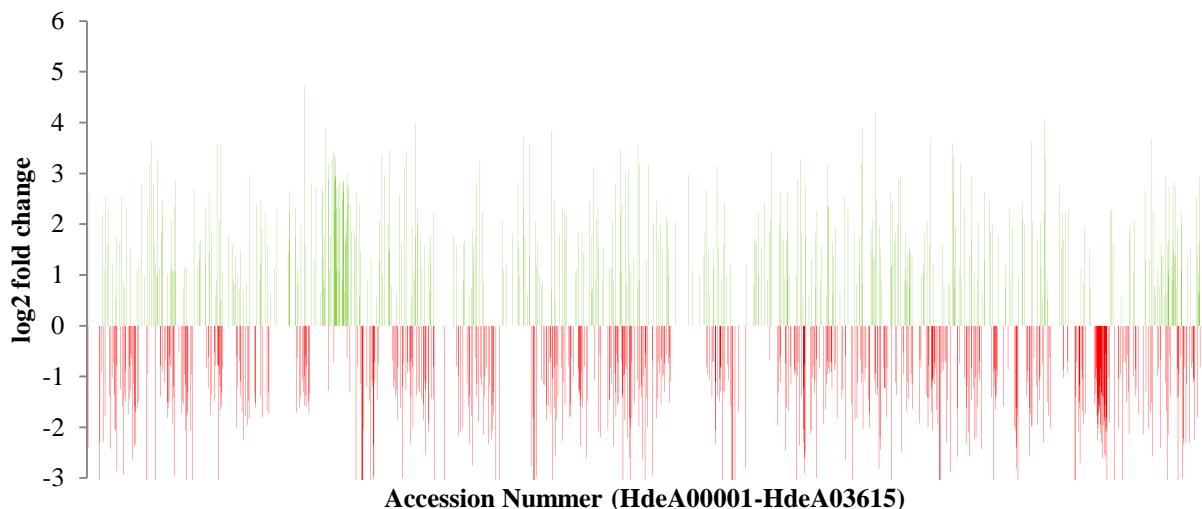
Für die weitere Analyse der Daten wurden – wie zuvor auch für die Daten von *Hyphomicrobium* X – nachfolgend nur die Daten betrachtet, die unter Verwendung des limma-Tests eine mindestens signifikante Veränderung aufwiesen. Hierbei muss beachtet werden, dass sich die ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson bei den beiden angewendeten statistischen Tests unterschieden. Unter Anwendung des limma-Tests konnten 1137 mindestens signifikant veränderte Proteinhäufigkeiten festgestellt werden, während bei der Verwendung vom Rank-Product-Tests insgesamt 359 Proteinhäufigkeiten signifikant verändert vorlagen.





**Abb. 35: Ergebnisse der vergleichenden Proteom-Analyse mit *Hyphomicrobium* EG.** Die normalisierte und zum Logarithmus der Basis 2 verrechneten Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten wurden gegen die logarithmierten (zur Basis 2) p-Werte aufgetragen. Magenta gefärbte Datenpunkte symbolisieren Proteine, deren Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten als mindestens signifikant klassifiziert wurden, während graue Datenpunkte nicht signifikante Veränderungen anzeigen.

Zur Überprüfung einer möglichen genetischen Vergesellschaftung von Genen, deren kodierte Proteine im Proteom signifikant verändert waren, wurden deren Lokus-Tags gegen die logarithmierten Veränderungen der Proteinhäufigkeiten aufgetragen (Abb. 36).



**Abb. 36: Die kodierenden Gene der signifikant regulierten Proteine im Proteom von *Hyphomicrobium* EG zeigten eine genetische Vergesellschaftung.** Die gemäß limma-Test mindestens signifikant hinsichtlich der relativen Proteinhäufigkeit veränderten Proteine wurden mit den jeweiligen Lokus-Tags gegen die normalisierte und zum Logarithmus der Basis 2 verrechneten Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten aufgetragen. Grüne Balken zeigen einen positiven Wert an, rote Balken einen negativen.

Die kodierenden Gene der Proteine, die beim Wachstum mit DMSO oder DMA häufiger im Proteom zu finden waren, lagen über die gesamte Länge des Genoms verteilt vor. Zusätzlich gab es Genomregionen, in denen auffällig viele dieser Proteine kodiert werden. Innerhalb der 99 Gene von HdeA00756 bis HdeA00855 wurden 45 Proteine kodiert, deren relative Häufigkeit im DMSO-Proteom sehr signifikant erhöht vorlag. Zu den hier gefundenen Proteinen gehören beide Methanthioloxidasen (HdeA00761, HdeA00789), eine putative cytoplasmatische PDO (HdeA00766), zwei der vier Proteine aus dem *cst*-ähnlichen Operon (HdeA00780-HdeA00784), eine putative DMS-Monooxygenase (HdeA00805), ein DmsA-Homolog (HdeA00819), SoxABFXYZ (HdeA00827-HdeA00834), ein TusA-Homolog (HdeA00836) sowie der Hdr-ähnliche Komplex (HdeA00845-HdeA00840) inklusive eines DsrE3-ähnlichen Proteins (HdeA00846).

Eine weitere auffällige Clusterung an Genen, deren Proteine im DMSO-Proteom signifikant weniger häufig vorkamen, lag zwischen den Genen HdeA03266 bis HdeA03305. Von den hier kodierten 39 Proteinen waren 36 signifikant weniger häufig im Proteom zu finden. Gemäß der Annotation handelt es sich bei 26 der hier kodierten Proteine um ribosomale Proteine. Weitere drei Proteine sind Bestandteile der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und zwei andere Translations-Elongationsfaktoren (Tab. 24). Proteinen mit einer möglichen Funktion im Schwefelstoffwechsel von *Hyphomicrobium* EG (Tab. 20) und deren veränderte Proteinhäufigkeiten im Rahmen der Proteom-Analyse wurden in Tab. 21 zusammengefasst.

**Tab. 21: Veränderungen der relativen Protein-Level von Proteinen mit einer möglichen Funktion im oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von *Hyphomicrobium* EG.** p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant klassifiziert (\*), p-Werte  $\leq 0,01$  wurden als sehr signifikant klassifiziert (\*\*) und p-Werte  $\leq 0,001$  als höchstsignifikant (\*\*\*), nd = nicht detektiert.

Lokus-Tag	Name	Annotation	log2 fold change / Signifikanz	Quelle
HdeA00726	SoxC	Nitrate reductase [NADH]	1,7*	Wodara <i>et al.</i> (1997)
HdeA00733	SorB	Hypothetical new protein	nd	Kappler <i>et al.</i> (2000)
HdeA00734	SorA	Sulfite oxidase, mitochondrial	nd	Kappler <i>et al.</i> (2000)
HdeA00762	Methanthioloxidase	Selenium-binding protein 1-A	2,7***	Eyice <i>et al.</i> (2018)
HdeA00766	Persulfidioxxygenase-like	Beta-lactamase hydrolase-like protein	0,9	Sattler <i>et al.</i> (2015)
HdeA00781	TauE	protein of unknown function DUF81	nd	Weinitschke <i>et al.</i> (2007)
HdeA00783	Persulfidioxxygenase-like	Beta-lactamase hydrolase-like protein	-1,3	Sattler <i>et al.</i> (2015)
HdeA00784	Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrB-Typ	Sulfide:quinone oxidoreduktase, mitochondrial	3,2***	Shen <i>et al.</i> (2016)
HdeA00789	Methanthioloxidase	Selenium-binding protein 1-A	1,8*	Eyice <i>et al.</i> (2018)
HdeA00801	DMS-Oxidase-like	Xylene monooxygenase electron transfer component	2,2**	Horinouchi <i>et al.</i> (1997)

Lokus-Tag	Name	Annotation	log2 fold change / Signifikanz	Quelle
HdeA00805		putative dimethylsulfide monooxygenase / FMN-dependent NADH-azoreductase	3,0***	
HdeA00819	DmsA-like	Probable oxidoreductase YoaE	2,3**	Bilous <i>et al.</i> (1988)
HdeA00827	FccA-like, SoxF-like	Sulfide dehydrogenase [flavocytochrome c] flavoprotein	0,9	Quentmeier <i>et al.</i> (2004); Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdeA00828	SoxB	Protein 5NUC	2,5***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdeA00829	SoxZ	Hypothetical protein	new 2,8***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdeA00830	SoxY	Hypothetical protein	new 2,9***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdeA00831	SoxA	Hypothetical protein	new 2,8***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdeA00832	SoxX	Uncharacterized lipoprotein aq_1806	2,6***	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdeA00836	TusA	UPF0033 protein NMB0681	1,6**	Stockdreher <i>et al.</i> (2014)
HdeA00838	LbpA	Glycine cleavage system H protein 5	nd	Liu <i>et al.</i> (2014)
HdeA00840	HdrB2	CoB--CoM heterodisulfide reductase 1 subunit B	2,1***	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdeA00841	HdrC2	Heterodisulfide reductase subunit C-like protein	1,8**	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdeA00842	Hyp	Hypothetical protein	new -0,6	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdeA00843	HdrA	CoB--CoM heterodisulfide reductase iron-sulfur subunit A	3,0***	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdeA00844	HdrB1	Heterodisulfide reductase subunit B-like protein	2,4***	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdeA00845	HdrC1	CoB--CoM heterodisulfide reductase 1 iron-sulfur subunit	nd	Quatrini <i>et al.</i> (2009)
HdeA00846	DsrE3-like	Hypothetical protein	new 2,8***	Liu <i>et al.</i> (2014)
HdeA01337	Persulfidooxygenase-like	Beta-lactamase hydrolase-like protein	-4,6***	Sattler <i>et al.</i> (2015)
HdeA01679	LbpA	Glycine cleavage system H protein 2	nd	Liu <i>et al.</i> (2014)
HdeA02384	TsdA	Hypothetical protein	new nd	Denkmann <i>et al.</i> (2012)
HdeA03158	FccB	Cytochrome c4	1,6**	Dahl <i>et al.</i> (2008)
HdeA03175	Persulfid Dioxigenase-like	Protein ETHE1, mitochondrial	0,5	Sattler <i>et al.</i> (2015)
HdeA03455	FccA-like, SoxF-like	Sulfide dehydrogenase [flavocytochrome c] flavoprotein	2,3**	Quentmeier <i>et al.</i> (2004); Dahl <i>et al.</i> (2008)

Ähnlich wie bei *Hyphomicrobium* X (Tab. 17) waren auch bei *Hyphomicrobium* EG beim Wachstum mit einem schwefelhaltigen Substrat Teile des Hdr-ähnlichen Komplexes sowie des Sox-Systems sehr

signifikant oder höchstsignifikant häufiger im Proteom zu finden. Eine Ausnahme hiervon bilden HdrC1, das nicht detektiert werden konnte, und das hypothetische Protein aus dem *hdr*-ähnlichen Gencluster (HdeA00842). Letzteres wurde im DMSO-Proteom wenig häufig gefunden. Die ermittelte Veränderung der Proteinhäufigkeit von HdeA00842 war allerdings nicht signifikant. Das außerhalb des eigentlichen *sox*-Genclusters kodierte SoxC-Homolog (HdeA00726) war ebenso wie ein SoxF-ähnliches Protein (HdeA03455) signifikant häufiger im Proteom zu finden. Auch das im erweiterten *hdr*-ähnlichen Genlokus kodierte DsrE3-ähnliche Protein (HdeA00846) konnte im Gegensatz zum Lipoatbindeprotein LbpA höchstsignifikant häufiger im DMSO-Proteom gefunden werden. Proteine mit einer möglichen Funktion innerhalb der ersten Schritte der DMSO-Degradation wie Methanthioloxidasen (HdeA00761, HdeA00789), ein DsoF-ähnliches Protein (HdeA00801), die putative DMS-Monooxygenase (HdeA00805) oder ein DmsA-ähnliches Protein (HdeA00819) wurden im DMSO-Proteom sehr signifikant oder höchstsignifikant häufiger gefunden. Von den vier putativen Persulfiddioxygenasen (HdeA00783, HdeA00766, HdeA01337, HdeA03175) konnten alle im Proteom detektiert werden. Hierbei wies HdeA01337 eine höchstsignifikant niedrigere Häufigkeit auf. Bei den drei anderen PDOs waren die Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten nicht signifikant. Das galt auch für das Homolog, das im *cst*-ähnlichen Operon kodiert wird (HdeA00783). Im Gegensatz hierzu war die im *cst*-ähnlichen Operon kodierte Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (HdeA00784) höchstsignifikant häufiger im DMSO-Proteom zu finden und wies mit einem log<sub>2</sub> fold change von 3,2 zudem die stärkste Veränderung aller Proteine mit einer potentiellen Rolle im Rahmen des Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium* EG auf. Innerhalb der Rangliste der Proteine, die höchstsignifikant häufiger beim Wachstum mit DMSO als Substrat gefunden werden konnten (Tab. 22), liegt die Sqr auf Platz 33.

Innerhalb der Proteom-Analyse wurden 98 Proteine gefunden, deren relative Häufigkeit im Proteom von auf DMSO gewachsenen Zellen mindestens sehr signifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von 2,5 oder größer verändert war (Tab. 25, Anhang). Dem Großteil dieser Proteine konnten mit bioinformatischen Tools keine bekannten Homologe aus anderen Organismen zugeordnet werden (47 „hypothetische neue Proteine“). Aus diesem Grund wurden für die weitere Analyse nur Proteine ausgewählt, deren relative Häufigkeiten höchstsignifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von mindestens 3 beim Wachstum mit DMSO als Substrat erhöht waren (Tab. 22).

**Tab. 22: Proteine, deren relative Häufigkeiten im Proteom von *Hyphomicrobium* EG sich höchstsignifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von mindestens 3 beim Wachstum mit DMSO als Substrat erhöht haben.**

Lokus-Tag	Name	Annotation	log <sub>2</sub> fold change
HdeA00706		dehydroquinat dehydratase 2	4,7
HdeA02557		Hypothetical new protein	4,2
HdeA03103		Hypothetical new protein	4,1
HdeA01065		Putative protease MJ0651	4,0
HdeA02514		protein of unknown function DUF1244	3,9
HdeA00773		Hypothetical new protein	3,9
HdeA01505		Hypothetical new protein	3,8

Lokus-Tag	Name	Annotation	log2 fold change
HdeA01415		Ethanolamine utilization protein EutQ	3,7
HdeA03449		Metallothiol transferase FosB	3,7
HdeA02734		Hypothetical new protein	3,7
HdeA00209		PQQ-dependent dehydrogenase, methanol/ethanol family	3,6
HdeA03062		Hypothetical new protein	3,6
HdeA02805	RlpA	Probable endolytic peptidoglycan transglycosylase RlpA	3,6
HdeA00422	TatB	Sec-independent protein translocase protein TatB	3,6
HdeA01435		GDP-mannose 4,6-dehydratase	3,6
HdeA01786		Hypothetical new protein	3,6
HdeA00434		Uncharacterized metalloprotease YcaL	3,6
HdeA00981		Hypothetical new protein	3,5
HdeA01729		Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	3,5
HdeA01036		Carboxymethylenebutenolidase	3,4
HdeA02219		Hypothetical new protein	3,4
HdeA00799		Homoserine O-acetyltransferase	3,4
HdeA00803		fatty acid desaturase	3,4
HdeA00956		protein of unknown function DUF461	3,4
HdeA02809		Hypothetical new protein	3,3
HdeA03107		Pseudoazurin	3,3
HdeA00804		Thioredoxin peroxidase	3,3
HdeA00794		Hypothetical new protein	3,3
HdeA02313		Hypothetical new protein	3,3
HdeA01273		ribosomal L11 methyltransferase	3,2
HdeA00227		glutathione-dependent formaldehyde-activating GFA	3,2
HdeA02830		Hypothetical new protein	3,2
HdeA00784	Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase SqrB-Typ	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	3,2
HdeA02510		Tetratricopeptide TPR_2 repeat protein	3,2
HdeA02399		cytochrome c class I	3,2
HdeA01790		Hypothetical new protein	3,2
HdeA01819	LolA	outer membrane lipoprotein carrier protein LolA	3,2
HdeA00203		protein of unknown function DUF488	3,2
HdeA01029		Hypothetical new protein	3,1
HdeA01642	HtpX	Protease HtpX homolog	3,1
HdeA02042	Ferredoxin 2	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain protein	3,1
HdeA01755		Hypothetical new protein	3,1
HdeA00843	HdrA	CoB--CoM heterodisulfide reductase iron-sulfur subunit A	3,0

Trotz der strengeren Auswahlkriterien konnten vielen höchstsignifikant in ihrer Häufigkeit veränderten Proteinen keine Funktionen anhand von bekannten Homologen zugewiesen werden. Sieben der 42 Proteine besitzen homologe Proteine mit beschriebener Funktion in anderen Organismen. Eine Zuweisung möglicher Funktionen für die übrigen Proteine durch die Nutzung

bioinformatischer Tools war nicht möglich. Mit Ausnahme der Sqr (HdeA00784) und HdrA (HdeA00843) befanden sich keine weiteren Proteine mit einer möglichen Involvierung in den Schwefelstoffwechsel von *Hyphomicrobium* EG (Tab. 20) unter den in Tab. 22 zusammengefassten Proteinen.

Ähnliche Schwierigkeiten hinsichtlich einer aussagekräftigen Annotation durch die Identifikation von Homologen in anderen Organismen ergaben sich für Proteine mit verringerten Häufigkeiten im DMSO-Proteom. Insgesamt 279 Proteine wiesen einen mindestens signifikanten und 277 einen mindestens sehr signifikanten log<sub>2</sub> fold change von -1,5 oder niedriger auf. Dem Großteil dieser Proteine konnte durch bioinformatische Tools keine Funktion zugewiesen werden. Deshalb wurden für eine nachfolgende nähere Analyse nur die Proteine ausgewählt, deren relative Häufigkeiten höchstsignifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von mindestens -3 beim Wachstum mit DMSO als Substrat verringert waren (Tab. 23).

**Tab. 23: Proteine, deren relative Häufigkeiten im Proteom von *Hyphomicrobium* EG sich höchstsignifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von mindestens -3,0 beim Wachstum mit DMSO als Substrat verringert haben.** p-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant klassifiziert (\*), p-Werte ≤ 0,01 wurden als sehr signifikant klassifiziert (\*\*) und p-Werte ≤ 0,001 als höchstsignifikant (\*\*\*).

Lokus-Tag	Name	Annotation	log <sub>2</sub> fold change / Signifikanz
HdeA02765		Hypothetical new protein	-7,8***
HdeA02764		Hypothetical new protein	-6,5***
HdeA03203		Probable NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	-5,8***
HdeA00893	GlxB	glutamine amidotransferase class-II	-5,2***
HdeA02299		O-methyltransferase small	-5,1***
HdeA01446		Heme dependent oxidative N-demethylase	-5,0***
HdeA00871		Hypothetical new protein	-5,0***
HdeA00918		Hypothetical new protein	-4,9***
HdeA01448		Hypothetical new protein	-4,8***
HdeA00341		tRNA-dihydrouridine synthase 2	-4,7***
HdeA00890		glutamine synthetase, type III	-4,7***
HdeA01337	Persulfidioxxygenase-like	Beta-lactamase hydrolase-like protein	-4,6***
HdeA03329		diguanylate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC sensor(s)	-4,6***
HdeA01808		Hypothetical new protein	-4,6***
HdeA00425	ScpA	chromosome segregation and condensation protein ScpA	-4,6***
HdeA00222		Sensor histidine kinase AruS	-4,5***
HdeA01125		Hypothetical new protein	-4,5***
HdeA02089		Sarcosine oxidase subunit alpha	-4,5***
HdeA02100		Flagellar motor switch protein FliN	-4,2***
HdeA00040		Uncharacterized sugar kinase YdjH	-4,1***
HdeA00193		Hybrid peroxiredoxin hyPrx5	-4,0***
HdeA00892	GlxC	glutamate synthase alpha subunit domain protein	-4,0***

Lokus-Tag	Name	Annotation	log2 fold change / Signifikanz
HdeA01449		amino acid permease-associated region	-4,0***
HdeA01159		Catechol-2,3-dioxygenase	-3,9***
HdeA0132		Protein DCL, chloroplastic	-3,9***
HdeA02058		nuclease (SNase domain protein)	-3,9***
HdeA02090		Sarcosine oxidase delta subunit heterotetrameric	-3,8***
HdeA01761		endonuclease III	-3,7***
HdeA02608	RhIE	ATP-dependent RNA helicase RhIE	-3,7***
HdeA00323		Phosphoglycolate phosphatase	-3,7**
HdeA01737		NADPH-dependent FMN reductase	-3,6***
HdeA00891	GlxD	ferredoxin-dependent glutamate synthase	-3,6***
HdeA03356		transcriptional regulator, MucR family	-3,5***
HdeA02481		ErfK/YbiS/Ycfs/YnhG family protein	-3,5***
HdeA02763		amino acid permease-associated region	-3,5***
HdeA03500		Anthranilate synthase component 2	-3,4***
HdeA03305		50S ribosomal protein L17	-3,4***
HdeA02937	SmB	SsrA-binding protein	-3,3***
HdeA03201		ribonucleoside-diphosphate reductase, adenosylcobalamin-dependent	-3,3***
HdeA03536		Tetrahydromethanopterin:alpha-L-glutamate ligase	-3,3***
HdeA02091		methylglutamate dehydrogenase subunit A	-3,2***
HdeA03017		Methylated-DNA-(protein)-cysteine S-methyltransferase DNA binding protein	-3,2***
HdeA00929		hydroxymethylbutenyl pyrophosphate reductase	-3,1***
HdeA01507		Hypothetical new protein	-3,1***

Wenngleich viele Proteine keine bekannten Homologe aufwiesen, bildeten die im Gencluster HdeA00890 bis HdeA00893 kodierten Proteine eine Ausnahme. GlxB, GlxC und GlxD sowie das als Glutamin-Synthetase annotierte Protein HdeA00890 spielen im Rahmen der Degradation des Stickstoffanteils von Dimethylamin eine Rolle (Meiberg & Harder, 1978). Zudem ist HdeA01337 ein Persulfiddioxygenase-ähnliches Protein (Tab. 20).

Eine abschließende Betrachtung der im Rahmen der Proteom-Analyse vom *Hyphomicrobium* EG erhobenen Daten zeigte, dass das Proteom des Organismus beim Wachstum mit den beiden unterschiedlichen Substraten einer starken Modifikation unterzogen wurde. Während bei *Hyphomicrobium* X von den 1.859 in allen drei biologischen Replikaten gefundenen Proteinen insgesamt 644 eine mindestens signifikante Veränderung der Proteinhäufigkeit aufwiesen (35 %), waren es bei *Hyphomicrobium* EG 74 % (1.137 von 1.529 Proteinen).

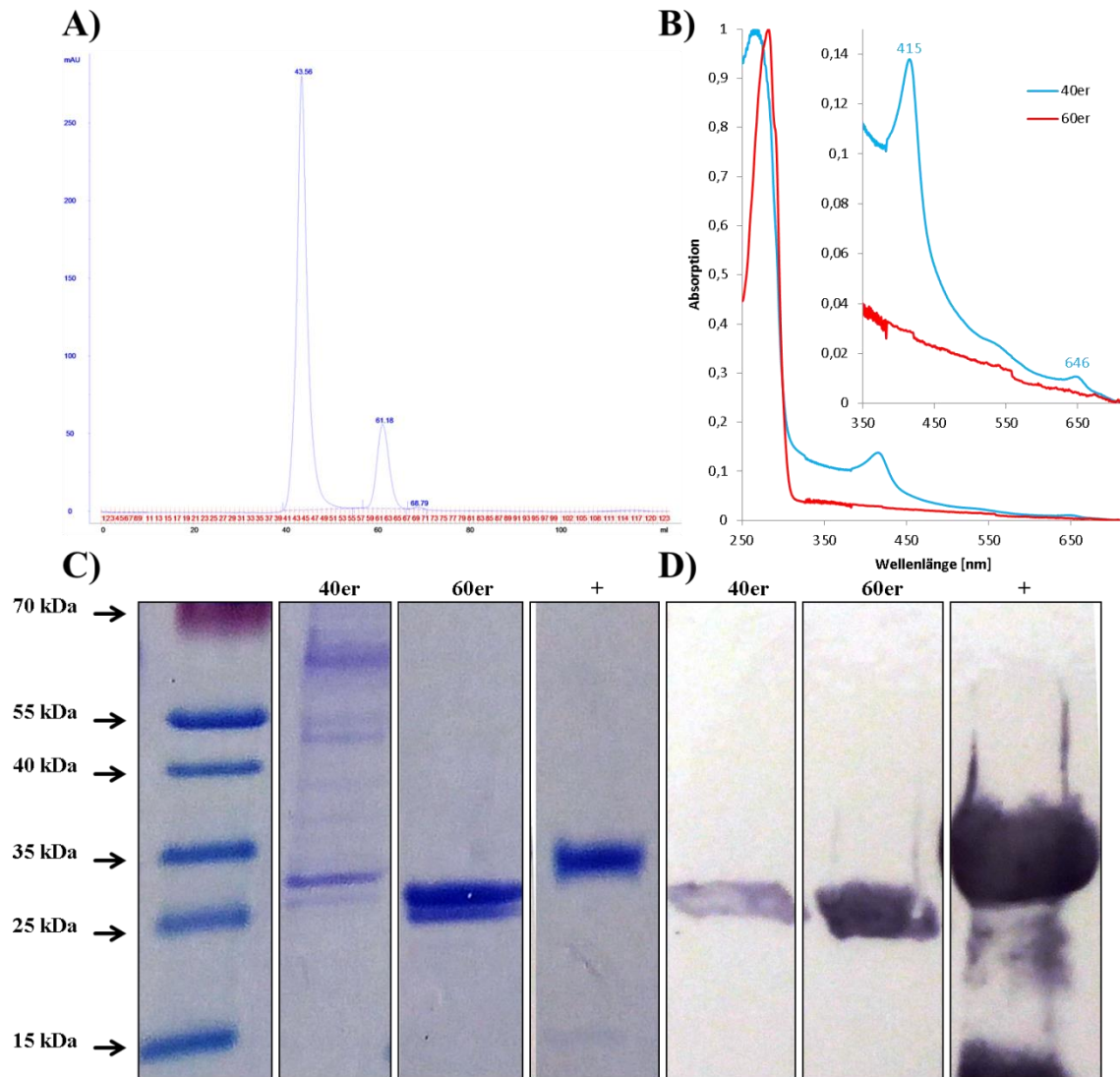
### 4.3 Rekombinanter Ansatz

#### 4.3.1 Heterologe Expression von rekombinantem TK90\_0635 und Hden\_0692 in *E. coli*

In allen Genloki, die Hdr-ähnliche Komplexe kodieren, wurde ein Gen gefunden, das für ein hypothetisches Protein (Hp) kodiert. Hp aus unterschiedlichen Organismen weisen weder untereinander größere konservierte Bereiche auf noch konnten durch den Einsatz von bioinformatischen Tools mögliche prosthetische Gruppen zugewiesen werden. Um Hinweise auf eine Funktion dieser Proteine zu finden, sollte TK90\_0635, das Hp aus *Thioalkalivibrio* sp. K90mix, heterolog in *E. coli* produziert, aufgereinigt und analysiert werden. Die Fraktionen der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wiesen eine leichte grünliche Färbung auf. Um rekombinantes TK90\_0635 möglichst ohne kontaminierende Proteine von *E. coli* aufzureinigen zu können und Informationen über einen möglichen Multimerisierungsgrad zu erhalten, wurde das aufgereinigte Protein einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Deren Elutionsfraktionen wurden spektroskopisch, mittels SDS-PAGE und einer chromogenen Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 37).

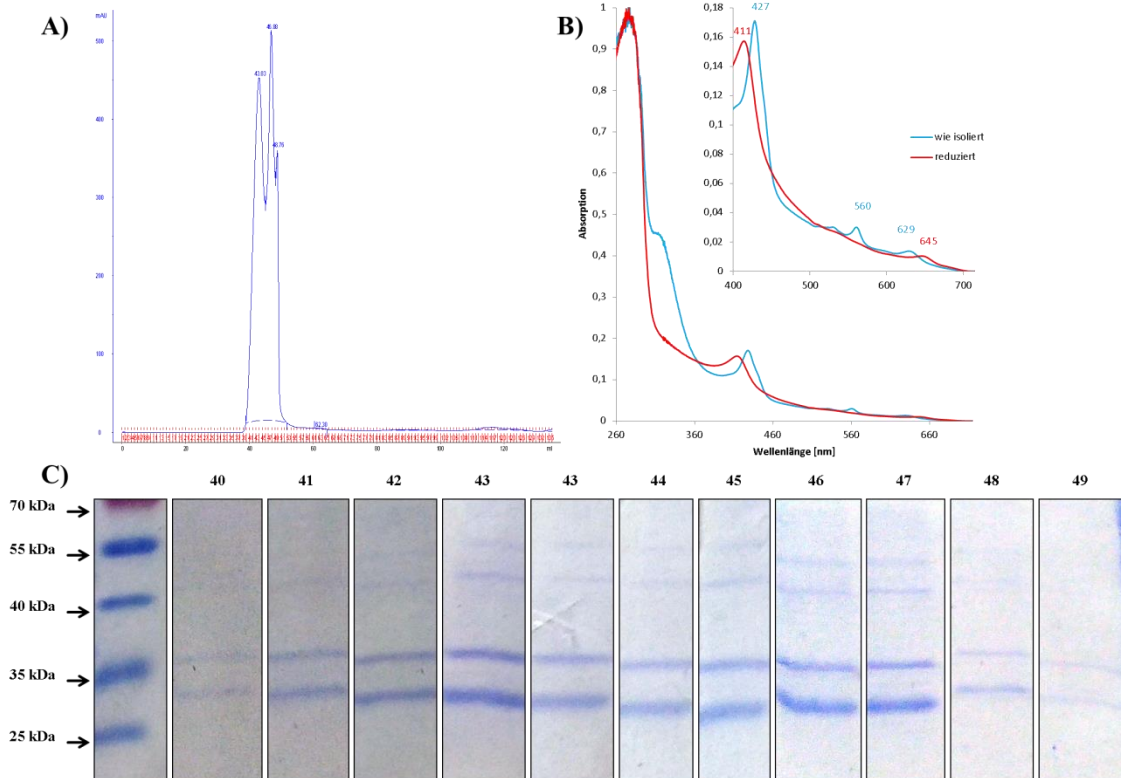
Das Elutionsspektrum (Abb. 37, A) zeigte zwei Peaks (Fraktionen 40–49, nachfolgend als 40er-Peak bezeichnet; Fraktionen 59–65, nachfolgend als 60er-Peak bezeichnet). Die Elutionsfraktionen des 60er-Peaks waren farblos, die Fraktionen des 40er-Peaks leicht grünlich gefärbt. Während die Fraktionen des 60er-Peaks im UV/Vis-Spektrum (Abb. 37, B) mit Ausnahme des Proteinpeaks keine erkennbaren weiteren Absorptionsmaxima aufwiesen, zeigte das Spektrum der 40er-Fraktionen Absorptionsmaxima bei 415 nm und 646 nm sowie bei 560 nm. Ähnliche Absorptionsmaxima für Proteine im Zustand ‚wie isoliert‘ sind für *b*-Typ-Cytochrome bekannt (Shabbiri *et al.*, 2010). Zur Überprüfung, ob die beobachteten spektralen Eigenschaften TK90\_0635 oder möglicherweise kontaminierenden *E. coli*-Proteinen zugeordnet werden konnten, wurden die vereinten Fraktionen des 40er- und des 60er-Peaks mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 37, C). Rekombinantes TK90\_0635 (inkl. Strep-tag) besitzt eine theoretische Größe von 31 kDa. Eine korrespondierende Bande konnte für die Probe des 60er-Peaks beobachtet werden. Die Probe des 40er-Peaks wies ebenfalls eine schwache Bande auf der erwarteten Höhe von TK90\_0635 auf. Zusätzlich zeigte diese Probe zahlreiche Banden von größeren Proteinen. In der chromogenen Western-Blot-Analyse wurde in der Probe vom 60er-Peak eine Bande detektiert, die mit der in der Coomassie-Färbung gefundenen Bande übereinstimmte. Die Proben des 40er-Peaks wiesen ebenfalls eine Bande auf gleiche Höhe mit einem schwächeren Signal auf. Die zahlreichen Banden, die durch größere Proteine in der Coomassie-Färbung verursacht wurden, führten zu keinem Signal beim Western Blot. Dies legte nahe, dass es sich hierbei um kontaminierende *E. coli*-Proteine handelte, die für die beobachteten spektralen Eigenschaften verantwortlich waren. Zusammengefasst zeigte dies, dass das TK90\_0635 keine spektralen Eigenschaften aufwies und unter den gewählten Bedingungen dazu tendierte, stabile Komplexe mit Proteinen aus *E. coli* zu bilden.





**Abb. 37: Charakterisierung von rekombinantem TK90\_0635.** Gezeigt ist das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mit via Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigtem rekombinanten TK90\_0635 (A) sowie die UV/Vis-Spektroskopie der vereinten Elutionsfraktionen der Elutionspeaks aus der Größenausschlusschromatographie (B, 40er = Fraktionen 40–49; 60er = Fraktionen 59–65). Die Spektren wurden auf 715 nm und den Proteinpeak normiert. Die vereinten Elutionsfraktionen der Elutionspeaks wurden zusätzlich in einer coomassiegefärbten SDS-PAGE (C) und in einer chromogenen Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Strep-Tactin-HRP-Konjugates (D) untersucht. Aufgetragen wurden jeweils 15  $\mu$ L der vereinten Elutionsfraktionen (40er, 60er) sowie 1  $\mu$ g der rekombinant in *E. coli* produzierten Thiosulfatdehydrogenase C8j0815 aus *Campylobacter jejuni*, die ein Strep-tag besitzt, als Positivkontrolle (+).

Um zu überprüfen, ob andere hypothetische Proteine, die in *hdr*-ähnlichen Genloki kodiert werden, sich anders verhalten, wurde der experimentelle Ansatz mit dem hypothetischen Protein aus *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> (Hden\_0692) wiederholt (Abb. 38).



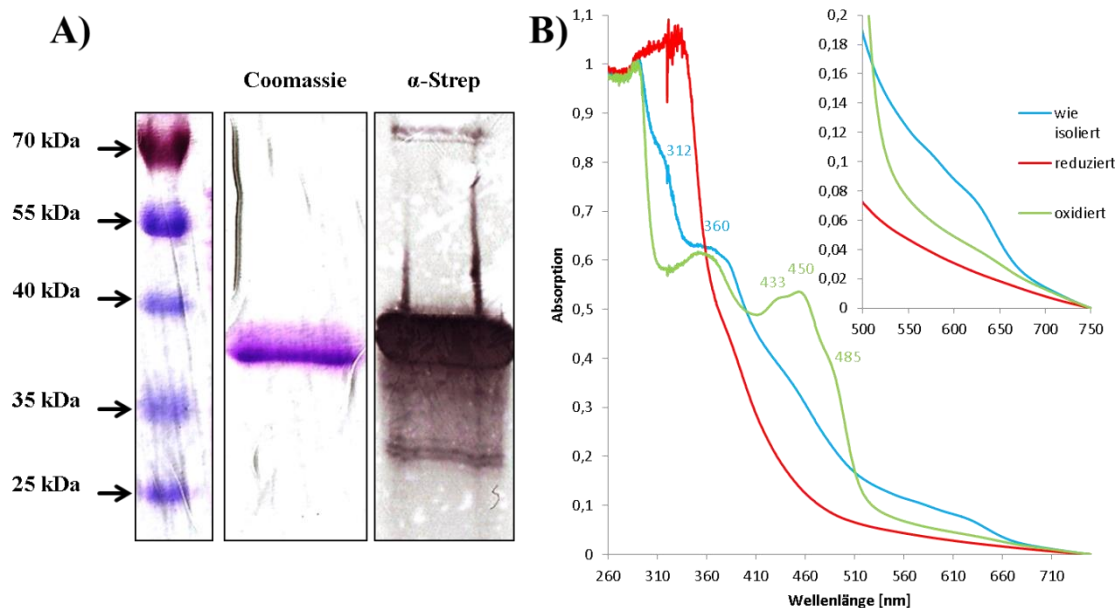
**Abb. 38: Charakterisierung von rekombinantem Hden\_0692.** Gezeigt ist das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mit via Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigtem rekombinanten Hden\_0692 (A) sowie die UV/Vis-Spektroskopie der vereinten Elutionsfraktionen der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie vor Größenausschlusschromatographie. Das frisch aufgereinigte Protein (50  $\mu$ L) wurde in 20 mM Tris-HCl (pH 7) gepuffert („wie isoliert“). Die Reduktion erfolgte mit 0,66 mM Natriumdithionit („reduziert“). Die Spektren wurden auf 715 nm und den Proteinpeak normiert. Jeweils 15  $\mu$ L der Elutionsfraktionen 40-40 der Größenausschlusschromatographie wurden mittels einer coomassiefärbten SDS-PAGE auf ihre Homogenität hin untersucht (C).

Die Elutionsfraktionen der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie zeigten eine deutliche grünliche Färbung und wurden einer Größenausschlusschromatographie (Abb. 38, A) und spektralen Analysen (Abb. 38, B) unterzogen. Für Proteine im Zustand ‚wie isoliert‘ konnten Absorptionsmaxima bei 427 nm, 560 nm und 629 nm sowie ein kleinerer Peak bei 530 nm festgestellt werden. Eine Reduktion der Probe führte zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 427 nm in den kurzwelligen Bereich zu 411 nm. Die Peaks bei 560 nm und 530 nm verschwanden und das Absorptionsmaximum bei 629 nm zeigte eine Verschiebung in den langwelligen Bereich zu 645 nm. Ähnliche spektrale Eigenschaften sind in der Literatur unter anderem für den Cytochrom-b558-d-Komplex von *E. coli* beschrieben (Kita *et al.*, 1984). Das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mit rekombinantem Hden\_0692 unterschied sich von jenem des rekombinanten TK90\_0635 (Abb. 37, A). Die aufgetrennte Proteinlösung eluierte in einem Bereich von Fraktion 40 bis Fraktion 50 von der Säule. Alle Fraktionen (40–50) wiesen eine leichte grünliche Färbung auf. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE (Abb. 38, C) zeigte, dass jede der betrachteten Fraktionen mehr als eine Bande aufwies, wobei zwei Banden mit einer Größe von etwa 32 kDa und 36 kDa in allen Proben erkennbar waren. Weitere Banden von größeren Proteinen konnten in den Fraktionen 42–47 verzeichnet werden. Da rekombinantes Hden\_0692 (inkl. Strep-tag) eine theoretische Größe von 32

kDa besitzt, wurde die in der SDS-PAGE beobachtete Bande bei 32 kDa dem Protein zugeordnet. Da es nicht möglich war, durch eine Größenausschlusschromatographie eine reine Fraktion mit rekombinantem Hden\_0692 zu erhalten, konnte entsprechend nicht geklärt werden, ob die beobachteten spektralen Eigenschaften Hden\_0692 oder den kontaminierenden *E. coli*-Proteinen zugeordnet werden mussten. Die zuvor erhobenen Daten zu rekombinantem TK90\_0635 ließen letzteren Fall jedoch wahrscheinlicher erscheinen.

#### 4.3.2 Heterologe Expression von rekombinantem HdrA in *E. coli*

Um zu klären, ob das in HdrA-Homologen aus Hdr-ähnlichen Komplexen enthaltene 4C-Motiv aus vier hochkonservierten Cysteinen möglicherweise ein Eisen-Schwefel-Cluster koordiniert, sollte Hden\_0691 als Modellprotein analysiert werden. Hierbei wurde der für die Produktion von FeS-Cluster-haltigen Proteinen optimierte Stamm *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR verwendet (Akhtar & Jones, 2008). Die Aufreinigung des Proteins via Strep-Tactin-Affinitätschromatographie und sämtliche weiteren Arbeiten erfolgten unter anaeroben Bedingungen. Durch eine Optimierung der Expressionsbedingungen konnten aus 3 Litern Kultur 20 mg rekombinantes Protein gewonnen werden. Die Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie wiesen eine bräunliche Farbe auf und wurden weiterführend mittels SDS-PAGE und Western Blot (Abb. 39, A) bzw. UV/Vis-Spektroskopie (Abb. 39, B) analysiert.



**Abb. 39: Rekombinantes Hden\_0691 konnte erfolgreich in *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR heterolog produziert und hochrein aufgereinigt werden.** Gezeigt ist das Ergebnis der Reinheitskontrolle mittels coomassiegefärbter SDS-PAGE (Coomassie) und einer chromogenen Western Blot Analyse unter Verwendung eines Strep-Tactin-HRP-Konjugates ( $\alpha$ -Strep, A). Aufgetragen wurde jeweils 1  $\mu$ g via Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigtes rekombinantes Hden\_0691. Zur UV/Vis-Spektroskopie unter anaeroben Bedingungen (B) wurden 59  $\mu$ M reines Hden\_0691 gepuffert in 200 mM Tris-HCl (pH 7,2) im Zustand ‚wie isoliert‘ sowie komplett reduziert mit 1 mM Natriumdithionit („reduziert“) und komplett oxidiert mit 90  $\mu$ M Ferricyanid („oxidiert“) untersucht. Die Spektren wurden auf 750 nm und den Proteinpeak normiert.

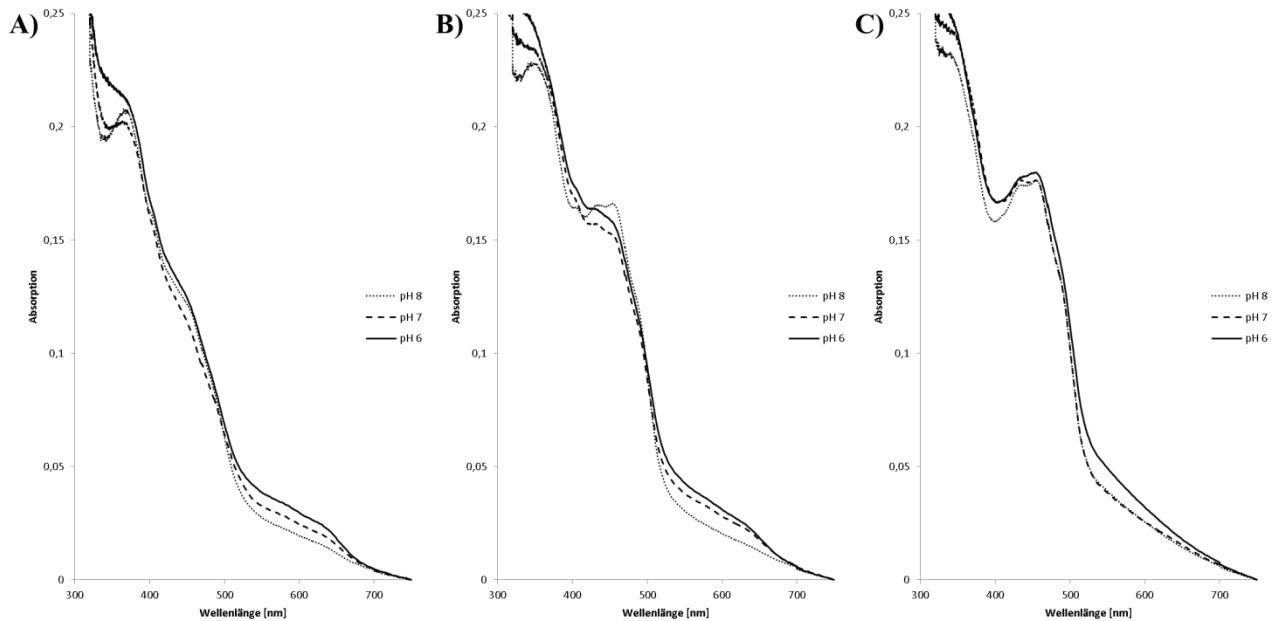
Rekombinantes HdrA (inkl. Strep-tag) besitzt eine theoretische Größe von 38 kDa. Eine korrespondierende Bande wurde in der coomassiegefärbten SDS-PAGE gefunden und mittels Western

Blot als HdrA identifiziert. Ferner zeigte sich, dass die aufgetragene Probe (1  $\mu\text{g}$  Protein) keine weiteren Proteine enthielt, die durch die Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden konnten.

Die spektrale Analyse des Proteins in den Zuständen ‚wie isoliert‘, ‚oxidiert‘ und ‚reduziert‘ führte zur Identifikation von verschiedenen spektralen Charakteristika. Das frisch aufgereinigte Protein wies neben dem Proteinpeak eine Schulter bei 312 nm, sowie ein Absorptionsmaximum bei 360 nm und eine weitere Schulter zwischen 600 nm und 650 nm Wellenlänge auf. Ähnliche Absorptionsmaxima sind für teilreduziertes FAD im Zustand als neutrales protoniertes Semichinon-Radikal charakteristisch (Massey & Palmer, 1966; Liu *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2013). Eine Oxidation des Proteins führte zu einem Verschwinden der Schultern im langwelligen Absorptionsbereich und bei 312 nm. Dafür traten die charakteristischen Absorptionsmaxima für Proteine mit FAD im Chinon-Zustand als Co-Faktor bei 433 nm, 450 nm und 485 nm Wellenlänge auf (Massey & Palmer, 1966; Liu *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2013). Eine Reduktion des Proteins ließ sämtliche Absorptionsmaxima mit Ausnahme des Proteinpeaks, der Eigenabsorption von Natriumdithionit und einer leichten Schulter bei 380 nm verschwinden. Die geringe Abflachung des Spektrums zwischen den Absorptionsmaxima bei 360 und 433 nm beim oxidierten Protein und die leichte Schulter bei 380 nm beim reduzierten Protein wurden als Hinweis auf das mögliche Vorhandensein eines Eisen-Schwefel-Clusters in Hden\_0691 gewertet (Freibert *et al.*, 2018). Um dies zu verifizieren, wurde rekombinantes Hden\_0691 aus verschiedenen Produktionschargen einer kolorimetrischen Eisen- und einer Schwefelbestimmung unterzogen. Die hierbei ermittelten Werte lagen zwischen 2,5 mol und 3,5 mol Eisen und Schwefel pro mol Protein. Dies zeigte, dass Hden\_0691 möglicherweise ein Eisen-Schwefel-Cluster enthält.

#### **4.3.3 UV/Vis-Spektroskopie von rekombinantem HdrA**

Wie zuvor beschrieben, wurden Hinweise darauf gefunden, dass das in Hden\_0691 enthaltene FAD einen stabilen Semichinon-Zustand ausbildet (Abb. 39, B). Da der Redoxzustand des FAD in einem Flavoprotein einen entscheidenden Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins haben kann, sollte dies näher untersucht werden. Für elektronenbifurkierende Proteine wie HdrA aus dem archaealen HdrABC-Komplex ist bekannt, dass die temporäre Ausbildung eines Semichinon-Zustandes essentiell für die Elektronen-Bifurkation ist (Wagner *et al.*, 2017). Das hierbei gebildete hochenergetische FAD-Semichinon, das die Elektronen an ein Eisen-Schwefel-Cluster mit einem sehr negativen Redoxpotential weiterleitet, zeichnet sich durch seine Instabilität aus. Entsprechend kann das FAD-Semichinon nicht durch UV/Vis-Spektroskopie untersucht werden. Im Rahmen der durchgeführten Experimente sollte deshalb überprüft werden, wie sich das in Hden\_0691 enthaltene FAD in Abhängigkeit vom Redoxzustand und des pH-Wertes spektral verhält (Abb. 40).



**Abb. 40: Das in Hden\_0691 enthaltene FAD zeigt einen pH-abhängigen stabilen Semichinon-Zustand.** Zur UV/Vis-Spektroskopie unter anaeroben Bedingungen wurden 18  $\mu\text{M}$  reines rekombinantes Hden\_0691 in den Zuständen ‚wie isoliert‘ (A), ‚teiloxidiert‘ mit 12  $\mu\text{M}$  Ferricyanid (B) und ‚oxidiert‘ mit 50  $\mu\text{M}$  Ferricyanid (C) bei verschiedenen pH-Werten betrachtet. Die Pufferung erfolgte mit 200 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6) bzw. 200 mM Tris-HCl (pH 7 & 8). Die Spektren wurden auf 750 nm und den Proteinpeak normiert.

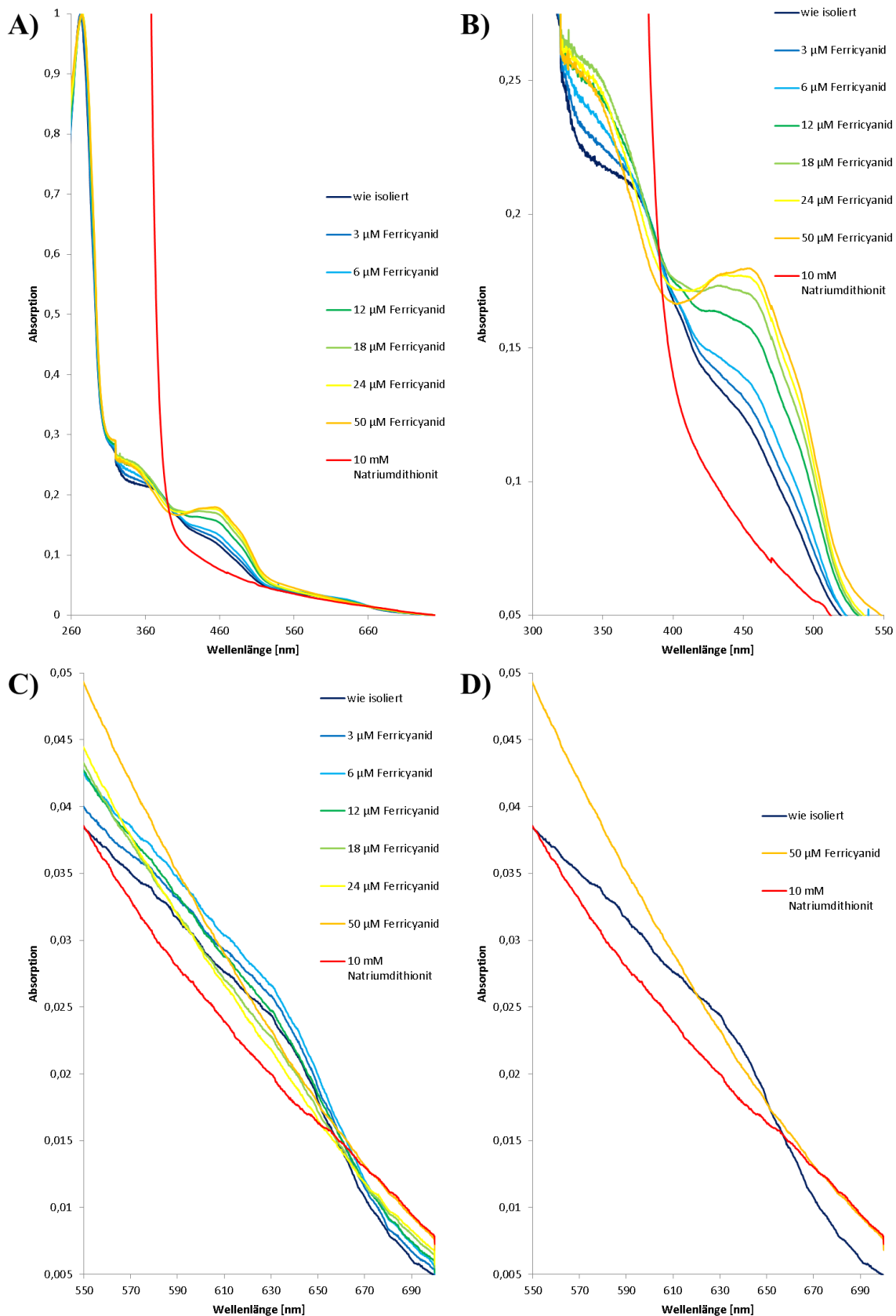
Die Analyse der Absorption des Proteins im Zustand ‚wie isoliert‘ (Abb. 40, A) bestätigt die zuvor (Abb. 39, B) gemachten Beobachtungen. Sowohl bei pH 6 als auch bei pH 7 konnte im Bereich zwischen 600 und 650 nm Wellenlänge eine verstärkte Absorption festgestellt werden, darüber hinaus eine Schulter bei 312 nm. Eine derartige Absorption ist charakteristisch für ein neutrales protoniertes FAD-Semichinon-Radikal (Massey & Palmer, 1966; Evans *et al.*, 2013). Bei einem pH-Wert von 8 hingegen waren die zuvor beschriebenen Eigenschaften deutlich schwächer ausgeprägt. Hinzu kam, dass der Peak bei 360 nm, der bereits bei pH 7 distinkter als bei pH 6 auftrat, bei einem pH-Wert von 8 ein Maximum zeigte. Ein ähnliches Absorptionsverhalten wäre für ein anionisches deprotoniertes FAD-Semichinon-Radikal zu erwarten (Massey & Palmer, 1966; Evans *et al.*, 2013). Ein ähnliches Bild ergab sich für das teilweise oxidierte Protein (Abb. 40, B). Während bei einem pH-Wert von 8 das Absorptionsspektrum von Hden\_0691 bereits die charakteristischen Absorptionsmaxima eines FAD-Chinons bei 433 nm, 450 nm und 485 nm zeigte, waren diese bei pH 7 nur schwach und bei pH 6 überhaupt nicht sichtbar. Zudem war bei pH 8 auch beim teiloxidierten Protein der Peak bei 360 nm distinkt erkennbar, was dafür sprach, dass eine Teilpopulation des FADs noch als deprotoniertes FAD-Semichinon-Radikal vorlag. In Gegensatz dazu waren bei pH 6 und pH 7 die für ein protoniertes FAD-Semichinon-Radikal zu erwartenden Absorptionen zwischen 600 nm und 650 nm noch vorhanden. Im Zustand ‚oxidiert‘ (Abb. 40, C) verschwanden die spektralen Eigenschaften, die auf ein Semichinon-Radikal hindeuteten, bei allen drei pH-Werten, während die für ein FAD-Chinon zu erwartenden Absorptionsmaxima (Massey & Palmer, 1966; Evans *et al.*, 2013) deutlich auftraten. Auffällig war, dass die bei pH 6 analysierte Probe sowohl im langwelligen Absorptionsbereich zwischen 550 nm und 650 nm als auch im Bereich zwischen 380 nm und 420 nm eine höhere

Absorption aufwies als die Proben bei pH 7 und pH 8. Ein derartiges spektrales Verhalten könnte ein Hinweis darauf gewesen sein, dass bei pH 6 trotz eines Überschusses an Oxidationsmitteln zumindest noch eine Teilpopulation des im Protein enthaltenen FAD als deprotoniertes Semichinon-Radikal vorlag.

Da das Hauptinteresse bei der UV/Vis-Spektroskopie des rekombinanten Hden\_0691 auf dem Redoxzustand des FAD-Cofaktors lag, sollte dieser durch eine schrittweise Oxidation näher untersucht werden. Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass die Ausbildung eines Semichinon-Zustandes am besten bei einem pH-Wert von 6 verfolgt werden konnte (Abb. 40). Aus diesem Grund wurde die schrittweise Oxidation bei pH 6 durchgeführt (Abb. 41).

Hden\_0691 konnte erfolgreich schrittweise oxidiert und anschließend komplett reduziert werden (Abb. 41, A), wobei das frisch aufgereinigte Protein teilreduziert vorlag. Mit steigender Konzentration des Oxidationsmittels konnte die Ausbildung von Absorptionsmaxima bei 360 nm, 433 nm und 450 nm sowie die Bildung einer Schulter bei 485 nm verzeichnet werden (Abb. 41, B). Derartige Absorptionsmaxima sind charakteristisch für FAD-Cofaktoren im Chinon-Zustand (Massey & Palmer, 1966; Evans *et al.*, 2013). Die Reduktion des Proteins ließ die zuvor beschriebenen spektralen Charakteristika verschwinden. Eine Absorption bei 360 nm, wie es für ein FAD im Hydrochinon-Zustand zu erwarten wäre (Massey & Palmer, 1966; Evans *et al.*, 2013), konnte durch die starke Eigenabsorption des eingesetzten Reduktionsmittels nicht verzeichnet werden.

Ein besonderes Interesse galt bei der Auswertung der Spektren möglichen Signalen, die auf ein FAD im Semichinon-Zustand hindeuteten. Im Zustand ‚wie isoliert‘ zeigt das teilreduzierte Protein zwischen 600 und 650 nm Wellenlänge ein spektrales Charakteristikum, das auf ein neutrales protoniertes Semichinon-Radikal hindeutet (Massey & Palmer, 1966; Evans *et al.*, 2013). Durch die schrittweise Zugabe von Ferricyanid nahm die Intensität der Absorption sukzessive ab und konnte bei einer äquimolaren Menge an Oxidationsmittel (18  $\mu\text{M}$ ) nicht mehr verzeichnet werden. Zu diesem Zeitpunkt lag der FAD-Cofaktor allerdings noch nicht komplett im Chinon-Zustand vor, da durch eine nachfolgende Zugabe von Ferricyanid die Intensität der Absorptionsmaxima zwischen 350 nm und 500 nm weiter zunahm. Eine vollständige Oxidation des Proteins wurde durch 24  $\mu\text{M}$  Ferricyanid erreicht. Weiteres Oxidationsmittel zeigte keine Auswirkungen auf das Spektrum. Der direkte Vergleich des Absorptionsbereichs der Spektren von 550 nm bis 700 nm Wellenlänge der Zustände ‚wie isoliert‘, ‚oxidiert‘ und ‚reduziert‘ (Abb. 41, D) verdeutlichte die zuvor beschriebenen Veränderungen der spektralen Eigenschaften von Hden\_0691.

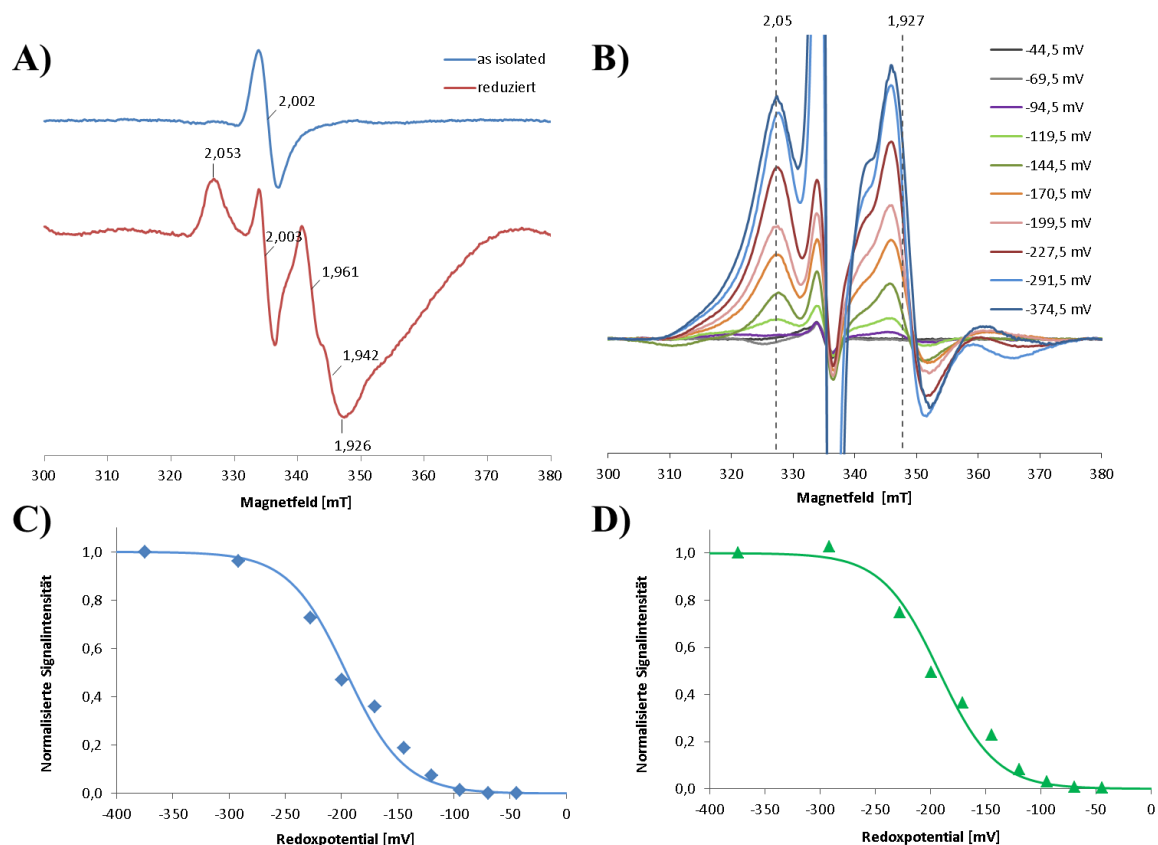


**Abb. 41: Titration von rekombinantem Hden\_0691.** Zur UV/Vis-Spektroskopie unter anaeroben Bedingungen wurden 18  $\mu\text{M}$  reines rekombinantes Hden\_0691 gepuffert mit 200 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6) schrittweise durch Zugabe von Ferricyanid oxidiert und abschließend komplett durch einen Überschuss an Natriumdithionit reduziert (A). Zum besseren Vergleich der spektralen Eigenschaften wurden die Bereiche von 300–600 nm (B), 550–700 nm (C) vergrößert dargestellt sowie die Zustände ‚wie isoliert‘, ‚oxidiert‘ (50  $\mu\text{M}$  Ferricyanid) und ‚reduziert‘ (oxidiertes Protein + 10 mM Natriumdithionit) miteinander verglichen (D). Die Spektren wurden jeweils auf 750 nm und den Proteinpeak normiert.

#### 4.3.4 Bestimmung der Redoxeigenschaften von HdrA

Wie unter 4.3.2 und 4.3.3 beschrieben, konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass Hden\_0691 ein Eisen-Schwefel-Cluster und ein FAD als Cofaktoren besitzt. Neben dem Nachweis von Cofaktoren in einem Protein sind deren Redoxeigenschaften von besonderem Interesse. Da aus den Redoxpotentialen von Cofaktoren Rückschlüsse auf mögliche Elektronenflüsse zwischen den Cofaktoren gezogen werden können, sollten die Redoxpotentiale des FAD und des Eisen-Schwefel-Clusters ermittelt werden. Hierfür wurden Redoxtitrationen in Kombination mit EPR-Spektroskopie und UV/Vis-Spektroskopie mit rekombinantem Hden\_0691 durchgeführt. Die nachfolgend gezeigten EPR-Spektren sowie die durchgeführten Redoxtitrationen für das 4Fe4S-Cluster und das FAD wurden in einer Kooperation mit Dr. Sofia S. Venceslau (ITQB, Universidade Nova des Lisboa, Oeiras/Portugal) generiert und ausgewertet.

Das frisch isolierte Protein zeigte hohe Intensitäten bei einem  $g$ -Wert von 2,002 (Abb. 42, A). Ein derartiges Signal ist typisch für FAD (Schleicher & Weber, 2012). Im Gegensatz hierzu wurden beim komplett reduzierten Protein Signale für die  $g$ -Werte 2,053 und 1,926 detektiert, die charakteristisch für Proteine mit einem reduzierten 4Fe-4S-Cluster sind (Rouault, 2017).

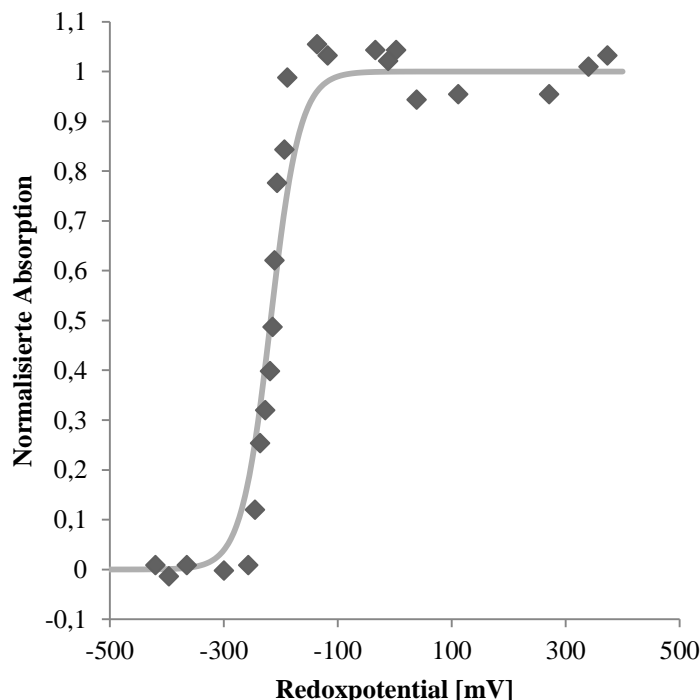


**Abb. 42: Ermittlung des Redoxpotentials des Eisen-Schwefel-Clusters von rekombinantem Hden\_0691.** Gezeigt werden die EPR-Spektren von 180  $\mu$ M rekombinantem Hden\_0691 ohne Redoxmediatoren in den Zuständen ‚wie isoliert‘ und ‚reduziert‘ (A) sowie die EPR-Spektren von 110  $\mu$ M rekombinantem Hden\_0691, die in Gegenwart von Redoxmediatoren während der Redoxtitration aufgenommen wurden (B). Zur Ermittlung des Redoxpotentials des Eisen-Schwefel-Clusters wurde das jeweilige Redoxpotential der Proben während der EPR-Spektroskopie gegen die normalisierte Signalintensität des  $g_{\max}$ -Wertes bei 2,05 (C) bzw. des  $g_{\text{med}}$ -Wertes bei 1,927 (D) aufgetragen. Die Ausgleichskurven entsprechen den theoretisch durch die Nernst-Gleichung zu erwartenden Werten unter Verwendung eines  $E_m$ -Werts von -196 mV (C) bzw. -192 mV (D).



Die Intensitäten der EPR-Spektren bei  $g_{\max}$  (2,05) und  $g_{\text{med}}$  (1,927) wurden nachfolgend bei Proteinproben analysiert, die zuvor einer Redox titration unterzogen worden waren (Abb. 42, B). Diese beiden  $g$ -Werte zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht durch Signale der in den Proben enthaltenen Redoxmediatoren überlagert werden. Die Spannungen wurden nachfolgend gegen die normalisierte Signalintensität von  $g_{\max}$  und  $g_{\text{med}}$  aufgetragen (Abb. 42, C und D), wodurch ein Redoxpotential von -196 mV ( $g_{\max}$ ) bzw. -192 mV ( $g_{\text{med}}$ ) für das Eisen-Schwefel-Cluster von Hden\_0691 ermittelt wurde. Die berechneten Werte wurden zusätzlich als  $E_m$ -Werte zur theoretischen Simulation der Redox titration unter Nutzung der Nernst-Gleichung verwendet und die jeweiligen Kurven in die jeweiligen Diagramme eingezeichnet. Der direkte Vergleich der berechneten und der tatsächlich gemessenen Werte zeigt, dass die Daten eine starke Überschneidung aufwiesen.

Da das Signal für FAD im EPR-Spektrum von Hden\_0691 durch die für die Redox titration essentiellen Redoxmediatoren überlagert wird, konnte das Redoxpotential des FAD nicht auf diesem Weg bestimmt werden. FAD-Cofaktoren besitzen jedoch charakteristische UV/Vis-spektroskopische Eigenschaften, sodass die Bestimmung des Redoxpotentials durch eine Redox titration im UV/Vis-Spektralphotometer möglich ist. Zur Bestimmung des Redoxpotentials des FAD-Cofaktors von Hden\_0691 wurde während einer Redox titration die Absorption der Proteinlösungen bei einer Wellenlänge von 456 nm gemessen. Anschließend wurden die jeweiligen Spannungen gegen die normalisierte Absorption aufgetragen (Abb. 43).



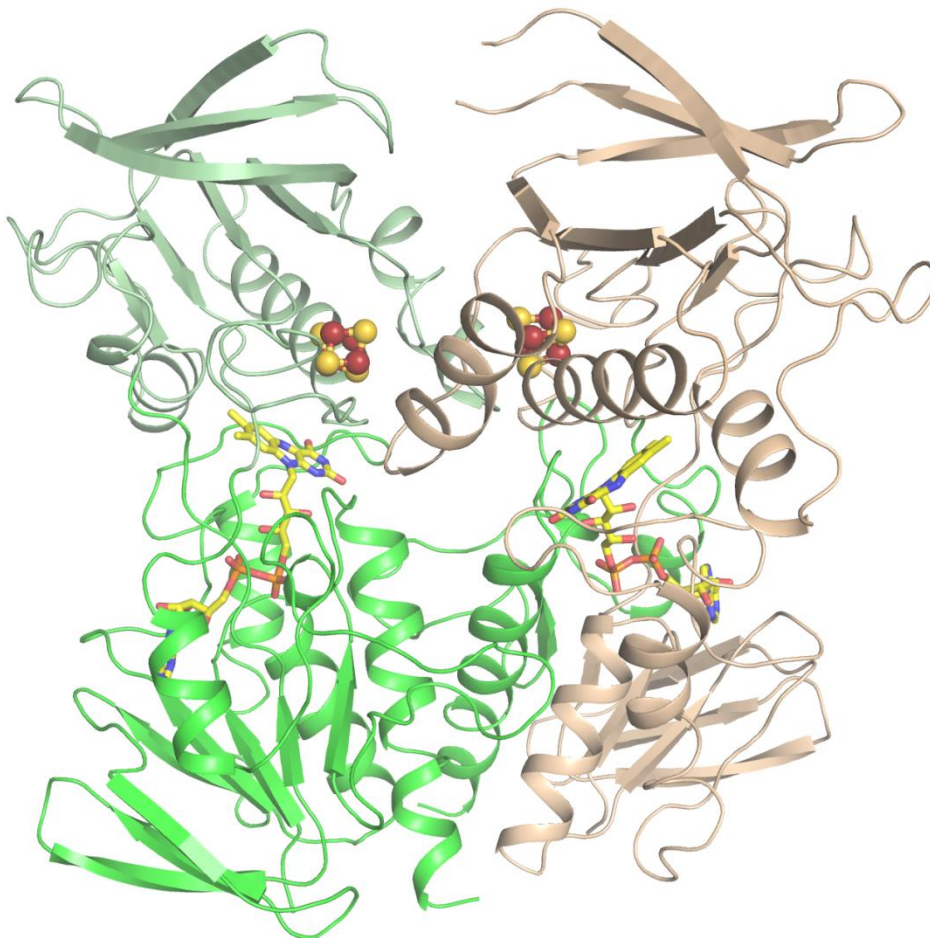
**Abb. 43: Ermittlung des Redoxpotentials des FAD in rekombinantem Hden\_0691.** Zur Ermittlung des Redoxpotentials des FAD wurden 50  $\mu\text{M}$  Hden\_0691 in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Redoxmediatoren analysiert. Hierbei wurde das Redoxpotential der Probe gegen die normalisierte Absorption bei 456 nm Wellenlänge aufgetragen. Die Ausgleichskurve entspricht den theoretisch durch die Nernst-Gleichung zu erwartenden Werten unter Verwendung eines  $E_m$ -Werts von -218 mV.

Es konnte ein Redoxpotential von -218 mV berechnet werden. Der experimentell ermittelte Wert liegt sehr nah am in der Literatur zu findenden Wert für freies FAD unter Standardbedingungen (-220 mV (Thauer *et al.*, 1977)). Mit dem experimentell ermittelten  $E_m$ -Wert wurde zusätzlich der theoretische Verlauf der Redox titration mittels Nernst-Gleichung simuliert und ergänzend in Abb. 43 eingetragen. Im Gegensatz zu der zuvor bei der Bestimmung des Redoxpotentials des FeS-Clusters simulierten Kurve (Abb. 42, C/D) wichen bei der in Abb. 43 dargestellten Kurve zahlreiche Messwerte von den theoretisch erwarteten Werten ab.

#### 4.3.5 Struktur von HdrA

Um durch die Untersuchung der Struktur neue Hinweise auf die mögliche Funktion der HdrA-Untereinheit in Hdr-ähnlichen Systemen zu erhalten, sollte Hden\_0691 kristallisiert werden. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse wurden in einer Kooperation mit Dr. Ulrich Ermler vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt generiert und ausgewertet.

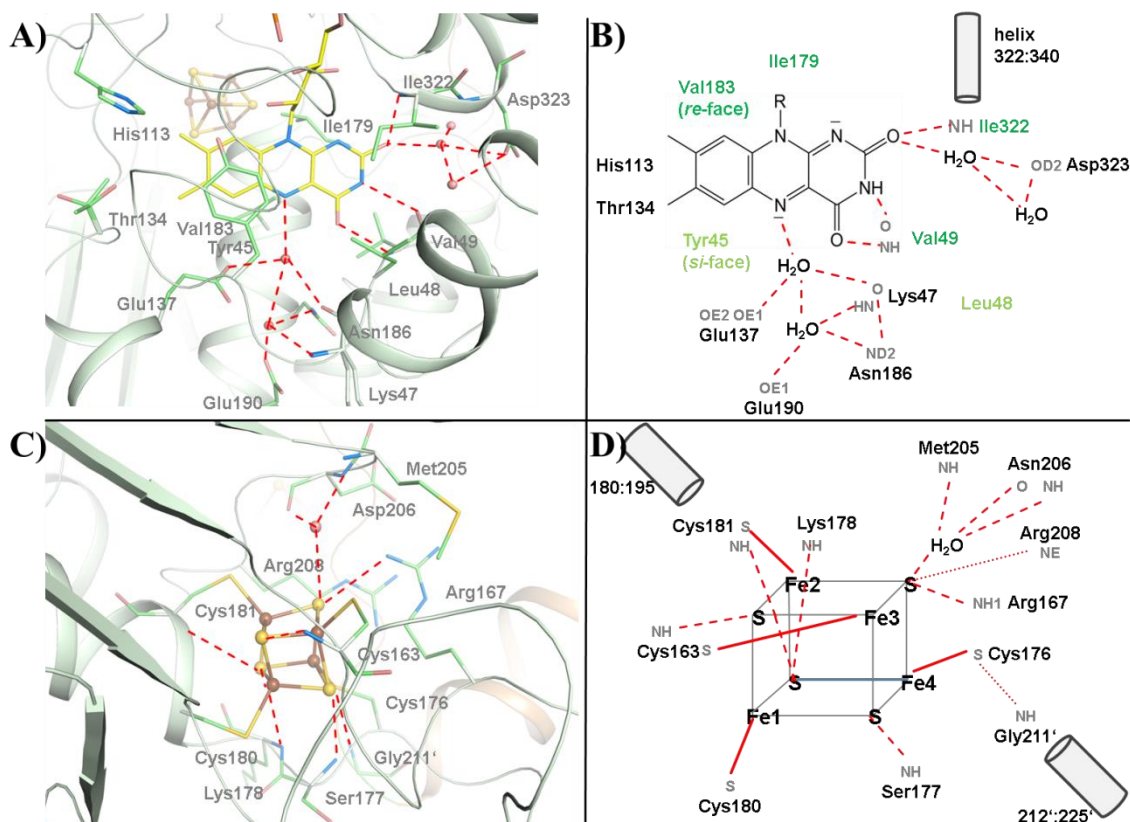
Die Kristallisation wurde mit rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta iscR$  produziertem Hden\_0691 unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Struktur von HdrA konnte mit einer Auflösung von 1,4 Å aufgeklärt werden (Abb. 44).



**Abb. 44: Kristallstruktur von rekombinantem Hden\_0691.** Gezeigt ist die ermittelte Kristallstruktur eines Dimeres von rekombinantem Hden\_0691 mit einer Auflösung von 1,4 Å. Das enthaltene FAD wird als Stäbchenmodell dargestellt und das Eisen-Schwefel-Cluster als farbige Sphären (Eisen rot, Schwefel gelb).

Das Protein bildete einen Homo-Dimer. Jede der Untereinheiten wies ein FAD und ein 4Fe-4S-Cluster als prosthetische Gruppen auf, wobei zwischen den FAD-Domänen und 4Fe-4S-Clustern eine Interphase mit einer Fläche von  $2470 \text{ \AA}^2$  vorlag. Die Distanz zwischen den beiden Isoalloxazinringen betrug  $18,8 \text{ \AA}$ , zwischen den beiden Eisen-Schwefel-Clustern  $11,5 \text{ \AA}$  und zwischen FAD und 4Fe-4S-Cluster der gegenüberliegenden Untereinheiten  $17,8 \text{ \AA}$ . Als Monomer betrachtet wies HdrA eine TrxR-Faltung bestehend aus zwei klassischen Dinukleotid-Binde-(Rossmann)-Domänen (Kuriyan *et al.*, 1991) auf. Die FAD-Binde-Domäne (2-115, 271-341) bindet den FAD-Cofaktor am C-terminalen Ende des zentralen  $\beta$ -Faltblattes, wobei der Isoalloxazinring zwischen den beiden Domänen gepackt vorliegt. In der gewonnenen Kristallstruktur lag das Flavin in seiner reduzierten Form als Hydrochinon vor. Das Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S) lag in der Eisen-Schwefel-Cluster-Bindedomäne (116-270) zwischen dem zentralen C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt und der N-terminalen Seite der  $\alpha$ -Helix (180:194) eingebettet vor. Der Kantenabstand zwischen den beiden Redoxzentren beträgt  $9,4 \text{ \AA}$  und würde damit einen physiologisch relevanten Elektronentransfer zwischen den beiden Zentren erlauben, wobei gemäß der zuvor ermittelten Redoxpotentiale (4.3.4) ein Elektronenfluss vom FAD zum Eisen-Schwefel-Cluster zu erwarten wäre.

Neben der Aufklärung der Struktur stand die Frage nach der Koordination der Cofaktoren in Hden\_0691 im Mittelpunkt des Interesses (Abb. 45).

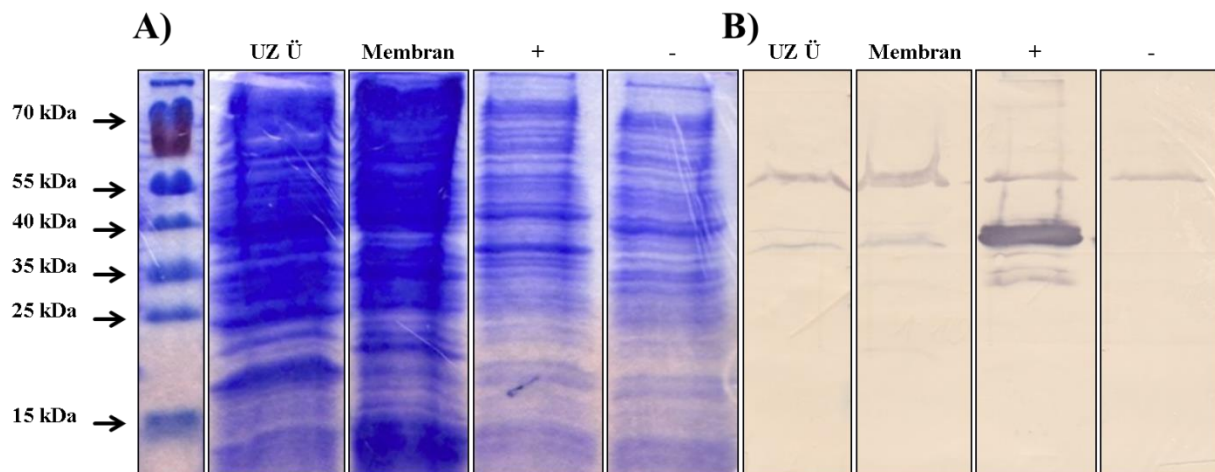


**Abb. 45: Die Cofaktor bindenden Regionen von rekombinantem Hden\_0691.** Gezeigt werden die Kristallstruktur (A) sowie ein Modell der FAD-Bindedomäne (B), ebenso wie die Kristallstruktur (C) und ein Modell der Eisen-Schwefel-Cluster-Bindedomäne (D).

Bei der Analyse der Bindung des FAD-Cofaktors konnten polare Interaktionen zwischen dem Isoalloxazinring und dem Polypeptidgerüst von HdrA festgestellt werden (Abb. 45, A/B). Diese wurden durch den funktionell wichtigen N5 und ein Wassermolekül, das über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lys47-O, Glu137-OE1 und über ein weiteres Wassermolekül mit Glu190-OE1 gebunden vorliegt, bewerkstelligt. Der Pyrimidin-Teil des Isoalloxazinrings und das Proteingerüst von HdrA bilden eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen O2 und Ile322-NH, das am N-terminalen Ende der Helix 322:340 liegt. Eine weitere durch ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrückenbindung konnte zwischen O2 und Asp323 festgestellt werden. Die Bindung des Eisen-Schwefel-Clusters wird durch ein hochkonserviertes 4C-Motiv vermittelt. Die vier Eisen sind koordiniert durch Cys163, Cys176, Cys180 und Cys181 und alle vier Schwefel interagieren mit wenigstens einem Protonen-Donor (Abb. 44, C/D). Arg167, Arg208 und die partiell positiv geladenen Reste der Helices 180:195 und 212':225' sorgen in diesem Zusammenhang für eine positiv geladene Bindetasche.

#### 4.3.6 Expression ganzer Hdr-Komplexe in *E. coli*

Mit dem Plasmid pBBR1p264HdenHdr bzw. Varianten hiervon wurde ein Konstrukt generiert, das die Expression des erweiterten *hdr*-ähnlichen Genlokus aus *Hyphomicrobium X* unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors erlaubte. Wie in den Abb. 24, 25 und 26 dargestellt, konnten sowohl in *E. coli* als auch in *Hyphomicrobium X* rekombinant produziertes HdrA (Hden\_0691) und LbpA (Hden\_0696) nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass die Gene Hden\_0688 bis Hden\_0696 eine Operon-Struktur ausbilden. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob Hden\_0691 (HdrA) – als Markerprotein für die Lokalisation des Hdr-ähnlichen Komplexes –, wenn es durch das Plasmid pBBR1p264HdenHdrTc rekombinant in *E. coli* produziert wird, löslich oder auch membranassoziiert vorliegt (Abb. 46).



**Abb. 46: Das Plasmid pBBR1p264HdenHdrTc erlaubt eine heterologe Expression von löslichem rekombinantem HdrA in *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ iscR.** Gezeigt ist das Ergebnis der coomassiegefärbten SDS-PAGE (A) und der chromogenen Western-Blot-Analyse mit dem  $\alpha$ -HdrA-Antiserum (B). Aufgetragen wurden jeweils 15  $\mu$ L der Fraktion der löslichen Proteine nach Zellaufschluss, Entfernung der Zelltrümmer und Ultrazentrifugation (UZ Ü) sowie von dem in einem gleichen Volumen resuspendierten Pellet der Membranen nach erfolgter Ultrazentrifugation (Membranen). Als Positivkontrolle (+) wurden 15  $\mu$ L verdünnter Rohextrakt einer *E. coli* BL21(DE3)-Überexpressionskultur mit dem Plasmid pET-22bHden0691 und als Negativkontrolle (-) Rohextrakt einer Leervektorüberexpressionskultur aufgetragen.

Rekombinantes HdrA (inkl. Strep-tag) besitzt eine theoretische Größe von 38 kDa und konnte in der Positivkontrolle detektiert werden (Abb. 46, B). Ein Signal auf ähnlicher Höhe konnte in der löslichen Fraktion und in der Membran-Fraktion verzeichnet werden. Dies zeigte, dass HdrA, das als Markerprotein die Lokalisation des ganzen Hdr-ähnlichen Komplexes anzeigen sollte, unter den gewählten Bedingungen in *E. coli* sowohl löslich als auch membranassoziiert vorlag.

Das zuvor beschriebene Experiment wurde ebenfalls mit den Plasmiden pASKIBA3+HdenHdr bzw. pET-22bHdenHdr durchgeführt (hier nicht gezeigt). In beiden Fällen konnte mit dem  $\alpha$ -HdrA-Antiserum im Zellrohextrakt nach erfolgtem Zellaufschluss kein lösliches HdrA und mit einem Strep-Tactin HRP Konjugat kein lösliches Hden\_0696 nachgewiesen werden.

## 5 Diskussion

Die Verstoffwechslung von anorganischen und organischen Schwefelverbindungen durch dissimilatorischen Schwefelmetabolismus ist wahrscheinlich eine der evolutionär ältesten Formen der Energiegewinnung (Canfield & Raiswell, 1999). Aktive enzymatische Umsetzungen von Schwefelverbindungen durch Mikroorganismen sind essentiell, um die globalen biogeochemischen Kreisläufe in Gang zu halten. Bereits seit 2009 wird ein neuartiger oxidativer mikrobieller Stoffwechselweg diskutiert, der eine Involvierung eines Heterodisulfidreduktase(Hdr)-ähnlichen Komplexes postuliert (Quatrini *et al.*, 2009). Ein experimenteller Nachweis der Funktion von Hdr-ähnlichen Komplexen durch die biochemische Charakterisierung von Wildtypen und Mutanten-Stämmen wurde bisher nicht erbracht. Diese Wissenslücke sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit adressiert werden.

### 5.1 *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> als Modellorganismus für den oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel

*Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> erfüllt die grundsätzlichen Anforderungen an einen Modellorganismus zur Erforschung des Schwefelstoffwechsels, er ist genetisch manipulierbar und nicht obligat lithotroph (Dijkhuizen *et al.*, 1984; Urakami *et al.*, 1995; Gliesche, 1997). Zudem verfügt er über ein vollständiges *hdr*-ähnliches Gencluster (Hden\_0689-Hden\_0694) (Venceslau *et al.*, 2014), wobei eine Unfähigkeit zu einem oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus für den Organismus beschrieben ist (Suylen *et al.*, 1986). Diese Beschreibung deckte sich nicht mit den Ergebnissen der bioinformatischen Untersuchung von *Hyphomicrobium* X (Tab. 15). Gemäß der genetischen Ausstattung verfügt *Hyphomicrobium* X über zwei Systeme zur Oxidation von Thiosulfat, eine im Periplasma lokalisierte Thiosulfatdehydrogenase vom TsdA-Typ (Hden\_2748) und ein ebenfalls periplasmatisches unvollständiges Sox-System (Hden\_0702-Hden\_0706). Zudem konnten auch potentielle SoxCD-Homologe (Hden\_1146/45) außerhalb des *sox*-Genclusters identifiziert werden (Tab. 15). Der direkte Vergleich mit dem biochemisch charakterisierten SoxD aus *Paracoccus pantotrophus* (Wodara *et al.*, 1997) zeigte, dass Hden\_1145 eine trunkierte SoxD-Version ist, der der gesamte C-Terminus inklusive des zweiten Cytochrom-*c*-Bindemotivs fehlt (Abb. 49). Entsprechend ist es unwahrscheinlich, dass Hden\_1145 ein funktionelles SoxD-Homolog ist.

Basierend auf der genetischen Ausstattung wäre zu erwarten, dass *Hyphomicrobium* X mit der TsdA Thiosulfat zu Tetrathionat oxidiert (Denkmann *et al.*, 2012). Das unvollständige Sox-System könnte gleichzeitig Thiosulfat zu Sulfat und zu einem proteingebundenen Sulfanschwefel umsetzen. Letzterer kann durch das Hdr-ähnliche System oder eine Persulfiddioxygenase zu Sulfit oxidiert werden. Diese Erwartungen konnten teilweise durch Wachstumsversuche bestätigt werden. Unter allen getesteten Bedingungen oxidierte *Hyphomicrobium* X Thiosulfat als Co-Substrat, sofern eine zusätzliche Kohlenstoffquelle zum Wachstum bereitgestellt wurde (Abb. 16, 17, 18). Ein autotrophes Wachstum nur mit Thiosulfat als Substrat konnte nicht beobachtet werden. Da der Organismus als obligat

chemoorganoheterotroph beschrieben ist (Urakami *et al.*, 1995), wäre dies auch nicht zu erwarten gewesen.

Das Oxidationsendprodukt-Spektrum der Thiosulfat-Oxidation gestaltete sich in Abhängigkeit von den gewählten Wachstumsbedingungen variabel. Als ausschlaggebende Faktoren wurden die als Substrat verwendete Kohlenstoffquelle, die Stickstoffmenge im Medium, die Thiosulfat-Konzentration und der pH-Wert festgestellt. Ungepuffertes Medium, Methylamin als Substrat, hohe Thiosulfat-Konzentrationen und erhöhte Stickstoffmengen begünstigten die Bildung von Tetrathionat (Abb. 16, 17, 18). Die Thiosulfatdehydrogenase TsdA (Hden\_2748) ist das einzige Tetrathionat-bildende Enzym, über das *Hyphomicrobium X* verfügt (Tab. 15). Entsprechend zeigten diese Beobachtungen, dass die zuvor skizzierten Bedingungen eine höhere Aktivität bzw. Expression der TsdA im Vergleich zum Sox-System begünstigen. Bei *in vitro* Enzym-Tests konnte für verschiedene rekombinante Thiosulfatdehydrogenasen gezeigt werden, dass diese Enzyme leicht acidophil sind und bei einem pH-Wert von 5 hohe spezifische Aktivitäten aufweisen (Denkmann *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Im Gegensatz hierzu ist für das Sox-System bekannt, dass die beteiligten Proteine *in vitro* bei einem leicht alkalischen pH-Wert (pH 7,5) aktiv sind (Friedrich *et al.*, 2000) und eine Erhöhung des pH-Werts auf 8 mit einer erhöhten Enzymaktivität einhergeht (Grabarczyk & Berks, 2017). Somit können erhöhte Tetrathionatbildungsraten in ungepuffertem Medium, das im Rahmen der Fermentation durch *Hyphomicrobium X* angesäuert wurde (Abb. 16), durch das pH-Optimum der TsdA erklärt werden. Dass die im Medium enthaltene Stickstoffmenge einen Einfluss auf das Oxidationsendprodukt-Spektrum der Thiosulfat-Oxidation hatte, war überraschend. Bei sonst identischen Versuchsbedingungen (optimiert für die Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat) bewirkte eine Stickstoffmenge von 1 g/L Ammoniumchlorid im Medium (18,7 mM) eine vollständige Umsetzung von Thiosulfat zu Sulfat (Abb. 18). In Medium mit der doppelten Stickstoffmenge (2 g/L Ammoniumchlorid, 37,4 mM) wurde ausschließlich Tetrathionat gebildet. Dies legt nahe, dass die Bedingungen inhibierend auf die Aktivität des Sox-Systems wirkten oder die Aktivität der TsdA begünstigten. Ein ähnlicher Mechanismus kann für die verwendeten Kohlenstoffquellen vermutet werden. Da mit Methylamin als Kohlenstoffquelle – unabhängig von den Wachstumsbedingungen – ausschließlich Tetrathionat als Oxidationsendprodukt detektiert wurde, ist der Stickstoffgehalt des Mediums eine wahrscheinliche Ursache. *Hyphomicrobium X* setzt den im Methylamin enthaltenen Stickstoff als Ammonium ins Medium frei (Meiberg & Harder, 1978). Die Verwendung von 50 mM Methylamin als Substrat resultierte entsprechend in Ammonium-Konzentrationen von 50 mM. In der Literatur finden sich keine Studien, die den Einfluss von hohen Stickstoff-Konzentrationen auf die Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen untersuchen. Allerdings ist beispielsweise für die Oxidation von Methan bekannt, dass Ammonium ein effektiver Inhibitor ist (King & Schnell, 1994; Dunfield & Knowles, 1995; van der Nat *et al.*, 1997; Hütsch, 1998). Ein ähnlicher Effekt wird für den Einfluss von Ammonium bzw. Ammoniak auf Methanogene beschrieben, wobei hier die inhibierenden Effekte erst bei deutlich höheren Ammonium-Konzentrationen beobachtet wurden

(Yenigün & Demirel, 2013). Bei der Betrachtung der Medienzusammensetzung bzw. des Stickstoffgehalts im Medium muss beachtet werden, dass das Medium nicht stickstofflimitiert ist. Bei kontinuierlicher Fütterung mit Methanol konnte mit *Hyphomicrobium X* in einem Fermenter innerhalb von 360 h eine  $OD_{600nm}$  von 9 erreicht werden (Finkensieper, 2017). Bis zu diesem Zeitpunkt wirkte der im Medium enthaltene Stickstoff (18,7 mM) nicht limitierend. Es wäre entsprechend für zukünftige Fermentationen denkbar, die Medienzusammensetzung dahingehend zu verändern, dass der Stickstoffgehalt weiter herabgesetzt wird, um mögliche ungewollte Einflüsse auf den Schwefelstoffwechsel zu verhindern.

In Experimenten, bei denen eine Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat durch *Hyphomicrobium X* beobachtet wurde, begann die Thiosulfat-Oxidation erst mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase oder aber unmittelbar davor (Abb. 16–17). Dies legt nahe, dass Thiosulfat im Vergleich zu den verwendeten reduzierten Kohlenstoffverbindungen (Methylamin, Methanol) kein durch den Organismus bevorzugtes Substrat darstellt. Eine Verwertung von Thiosulfat als zusätzliche Elektronen-Quelle fand nur statt, wenn das präferierte Substrat bereits aufgebraucht wurde. Für Thiosulfatdehydrogenasen aus anderen Organismen ist bekannt, dass diese Enzyme eine hohe Substrataffinität und hohe spezifische Umsatzraten aufweisen (Denkman *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Kurth *et al.*, 2016). Somit wäre zu erwarten gewesen, dass bereits geringe Mengen der TsdA eine effektive Umsetzung von Thiosulfat zu Tetrathionat ermöglichen. Da die Tetrathionatbildung erst mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase einsetzte, lässt dies die These zu, dass *tsdA* in *Hyphomicrobium X* nicht konstitutiv exprimiert wird. Eine reversible Inaktivierung des Proteins, die erst nach dem vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffquelle aufgehoben wird, wäre ebenfalls denkbar.

Neben Bedingungen, unter denen *Hyphomicrobium X* Thiosulfat durch die TsdA zu Tetrathionat umsetzte, konnten zusätzlich Bedingungen gefunden werden, bei denen Thiosulfat teilweise oder vollständig zu Sulfat oxidiert wurde (Abb. 17, 18). Ein neutraler und gepufferter pH-Wert (7,2), Methanol als Kohlenstoffquelle und höchstens 1 g/L Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle im Medium waren begünstigende Faktoren. Als ausschlaggebend dafür, ob eine vollständige Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat oder eine teilweise Oxidation zu Sulfat und gleichzeitig zu Tetrathionat stattfand, konnte die eingesetzte Thiosulfat-Konzentration ausgemacht werden. Unter für eine Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat optimierten Bedingungen bestand das Spektrum der Oxidationsendprodukte bei initial eingesetzten 5 mM Thiosulfat zu 70 % aus Tetrathionat und zu 30 % aus Sulfat (Abb. 17). Eine Halbierung der Thiosulfat-Konzentration auf 2,5 mM führte zu einer exklusiven Umsetzung von Thiosulfat zu Sulfat (Abb. 18). Dies zeigte, dass sich höhere Thiosulfat-Konzentrationen (> 2,5 mM) inhibierend auf das Sulfat-bildende Thiosulfat-Oxidationssystem in *Hyphomicrobium X* auswirken. Die initiale Oxidation von Thiosulfat wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das periplasmatische unvollständige Sox-System (SoxABXYZ) katalysiert,



wobei als Endprodukte Sulfat und ein proteingebundener Sulfanschwefel zu erwarten sind. Letzterer wird dann wahrscheinlich durch den im Cytoplasma lokalisierten Hdr-ähnlichen Komplex weiter oxidiert (Abb. 47). Durch die räumliche Trennung der Thiosulfat-Oxidation in zwei Zellkompartimente ist es unwahrscheinlich, dass hohe extrazelluläre oder periplasmatische Thiosulfat-Konzentrationen einen direkten inhibitorischen Effekt auf das Hdr-ähnliche System ausüben. Die These wird durch den immunologischen Nachweis der durch 5 mM Thiosulfat induzierten Expression von HdrA als Markerprotein für den Hdr-ähnlichen Komplex unterstützt (Abb. 24). Es ist wahrscheinlicher, dass die fehlende Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat bei hohen Thiosulfat-Konzentrationen durch eine Inhibierung oder eine Regulation des Sox-Systems verursacht wird. Für nahverwandte *Hyphomicrobium*-Spezies, die Thiosulfat zu Sulfat oxidieren, ist ein solches Verhalten nicht bekannt. *Hyphomicrobium* VS oxidiert Thiosulfat in Konzentrationen bis 5 mM ausschließlich zu Sulfat (Pol *et al.*, 1994). Eine Bildung von Tetrathionat wurde nicht dokumentiert. *Hyphomicrobium denitrificans* EG verfügt genau wie *Hyphomicrobium* X zur Oxidation von Thiosulfat über zwei verschiedene Stoffwechselwege (TsdA/HdeA02384, unvollständiges Sox-System/HdeA00828-HdeA00832, Tab. 20). Für diesen Organismus ist dokumentiert, dass er in Batch-Kulturen in Gegenwart von 0–25 mM Thiosulfat 0,5–2,5 mM des Thiosulfats unabhängig von der initialen Thiosulfat-Konzentration zu Sulfat oxidiert und entsprechend nur eine geringe Affinität zu Thiosulfat aufweist (Suylen *et al.*, 1986). Auch hier wurde von keiner Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat berichtet. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Thiosulfat-Oxidation durch *Hyphomicrobium* X stark abhängig von den gewählten Wachstumsbedingungen ist, wäre eine ähnliche Situation für *Hyphomicrobium* EG denkbar. Eine Optimierung der Fermentationsbedingungen könnte zu einer vollständigen Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat führen. Unabhängig davon zeigen die Beispiele von anderen Spezies der Gattung *Hyphomicrobium*, dass ein konzentrationsabhängiger Wechsel der Oxidationsendprodukte während der Oxidation von Thiosulfat ungewöhnlich ist. Die Erstellung und phänotypische Charakterisierung von potentiellen *sox*-Deletionsmutanten wäre eine Möglichkeit, die genaue Rolle des Sox-Systems in der Thiosulfat-Oxidation von *Hyphomicrobium* X zu untersuchen.

Ein weiterer Unterschied zwischen der beobachteten Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat bzw. zu Tetrathionat bestand im zeitlichen Verlauf der Oxidation. Unter Bedingungen für eine Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat oxidierte *Hyphomicrobium* X bereits zu Beginn der Fermentation das im Medium enthaltene Thiosulfat (Abb. 18). Im Gegensatz zu Experimenten, bei denen nur eine teilweise Umsetzung von Thiosulfat zu Sulfat (Abb. 17) oder eine vollständige Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat stattfand (Abb. 16), konnte in diesem Fall ein Einfluss der Thiosulfat-Oxidation auf das Wachstumsverhalten des Organismus beobachtet werden. Solange Thiosulfat im Medium vorhanden war, betrug die Verdopplungszeit 2,3 Tage. Nach Abschluss der Thiosulfat-Oxidation beschleunigte sich die Zunahme der OD<sub>600nm</sub> und die Verdopplungszeit sank auf 0,58 Tage. Dieses Verhalten stellt einen klaren Gegensatz zur Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat dar, bei der ein messbarer

Thiosulfat-Verbrauch erst mit dem Erreichen der stationären Phase oder unmittelbar davor beobachtet werden konnte (Abb. 16). Um einen Erklärungsansatz für dieses Phänomen zu finden, empfiehlt es sich, die Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen zugrunde liegenden Stoffwechselwegen zu betrachten. Die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat durch eine TsdA ist im Periplasma lokalisiert. Die gewonnenen Elektronen werden *in vivo* auf verschiedene Elektronenakzeptoren (Proteine) übertragen, die die Elektronen wahrscheinlich der Atmungskette oder in Phototropen dem photosynthetischen Reaktionszentrum zuführen (Kurth *et al.*, 2016). Im Fall von *Hyphomicrobium X* stellt Tetrathionat ein Stoffwechselendprodukt dar, das nicht weiter metabolisiert werden kann (Abb. 19). Die im Tetrathionat verbleibenden reduzierten Schwefel-Atome bleiben damit ungenutzt. Eine Oxidation von Thiosulfat durch das unvollständige periplasmatische Sox-System und das cytoplasmatische Hdr-ähnliche System würde nicht nur eine Trennung der Thiosulfat-Oxidation in zwei unterschiedliche Zellkompartimente bedeuten, sondern wäre auch energetisch günstiger. Obwohl die vollständige Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat dem Organismus theoretisch mindestens sechs (Thiosulfat zu Sulfat und Sulfit) Mol Elektronen pro Mol Thiosulfat zur Verfügung stellt, zeigten Kulturen mit und ohne Thiosulfat keinen Unterschied in der End-OD (Abb. 15). Eine ähnliche Situation wird in der Literatur für *Hyphomicrobium EG* in Batch-Kulturen beschrieben (Suylén *et al.*, 1986). Bei der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat und proteingebundenem Sulfanschwefel werden zwei Elektronen gewonnen, die über einen geeigneten Redox-Carrier (*c*-Typ-Cytochrom) weitergeleitet werden (Friedrich *et al.*, 2001). Der verbleibende proteingebundene Sulfanschwefel könnte durch das Hdr-ähnliche System im Cytoplasma zu Sulfit oxidiert werden, wobei hier insgesamt vier Elektronen freigesetzt würden. Als mögliche Elektronenakzeptoren sind proteingebundene Liponsäure und der Chinon-Pool im Gespräch (Chen *et al.*, 2012; Ehrenfeld *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2018; Koch & Dahl, 2018). Wenn die zentralen Unterschiede zwischen den beiden Thiosulfat-Oxidationswegen (Anzahl der freigesetzten Elektronen, Elektronenakzeptoren, subzelluläre Lokalisation) im Kontext des Kohlenstoff-Metabolismus von *Hyphomicrobium X* betrachtet werden, ergeben sich Hinweise auf das beobachtete unterschiedliche Wachstumsverhalten. Mit Methanol als Substrat findet die initiale Oxidation zu Formaldehyd im Periplasma durch eine PQQ-abhängige Methanol-Dehydrogenase (Hden\_1323) statt. Für den nah verwandten Stamm *H. denitrificans* A3151 konnte gezeigt werden, dass ein *c*-Typ-Cytochrom *in vivo* der Elektronenakzeptor bei dieser Reaktion ist (Nojiri *et al.*, 2006). Ein homologes Protein wird bei *Hyphomicrobium X* im gleichen Gencluster kodiert (Hden\_1321). Für eine weitere Energiegewinnung durch die Oxidation von Formaldehyd zu Formiat (Formaldehyd-Dehydrogenase, Hden\_0096 (Duine, 1990)) bzw. von Formiat zu CO<sub>2</sub> (Formiat-Dehydrogenase, Hden\_2466/67) oder eine Assimilation von Kohlenstoff durch den Serin-Weg ist ein Transport des Formaldehyds in das Cytoplasma nötig. Damit ergeben sich zwei potentielle Konfliktpunkte, bei denen die Thiosulfat-Oxidation über das Sox- und das Hdr-ähnliche System und die Methanol-Oxidation um zelluläre Ressourcen konkurrieren könnten. Beide Stoffwechselwege besitzen für den periplasmatischen Teil ähnliche Elektronenakzeptoren (*c*-Typ-Cytochrome). Eine

Einleitung der gewonnenen Elektronen in die Atmungskette an ähnlichen Stellen ist damit ebenfalls wahrscheinlich. Ein *c*-Typ-Cytochrom ist ebenfalls ein wahrscheinlicher *in vivo* Elektronenakzeptor der TsdA. Da die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat aber erst nach Beendigung des Wachstums und damit vermutlich nach der vollständigen Oxidation des verfügbaren Methanols einsetzt, besteht hier kein direkter Wettstreit um mögliche Ressourcen. Der zweite potentielle metabolische Engpass, der zu einer Verlangsamung des Wachstums während der Thiosulfat-Oxidation durch das Sox- und Hdr-ähnliche System führen könnte, besteht im Transfer der Intermediate aus dem Periplasma in das Cytoplasma. Sowohl der durch das Sox-System bei der Degradation von Thiosulfat gebildete proteingebundene Sulfanschwefel als auch Formaldehyd als Oxidationsprodukt der Methanol-Dehydrogenase müssen über die Barriere der Cytoplasmamembran transportiert werden. Es ist unwahrscheinlich, dass dieser Vorgang durch den gleichen Transporter vermittelt wird und die beiden Intermediate direkt konkurrieren. Da es sich bei der Aufnahme von Formaldehyd in die Zellen häufig um einen aktiven Prozess handelt (Bussineau & Papoutsakis, 1988; Köstler & Kleiner, 1989), besteht jedoch eine indirekte Konkurrenz, da für die Aufnahme von proteingebundenem Sulfanschwefel ebenfalls ein aktiver Transport angenommen wird. Damit kann diese Situation zusätzlich als mögliche Ursache für die verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit während der Oxidation von Thiosulfat in Betracht gezogen werden.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse zum Thiosulfat-Metabolismus eindeutig, dass *Hyphomicrobium X* im Gegensatz zu in der Literatur dokumentierten Berichten (Suylen *et al.*, 1986) zu einem oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel mit dem anorganischen Substrat Thiosulfat fähig ist. Damit erfüllt der Organismus eine weitere Anforderung, die im Vorfeld an einen Modellorganismus zur Erforschung von Hdr-ähnlichen Systemen formuliert wurde.

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass *Hyphomicrobium X* mit Dimethylsulfid als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Der im DMS enthaltene Schwefel wurde stöchiometrisch zu Sulfat oxidiert (Abb. 22). Da bei den Wachstumsversuchen mit DMS lag-Phasen von bis zu 10 Tagen beobachtet werden konnten und bereits Substrat-Konzentrationen > 0,75 mM eine Wachstumsinhibierung bewirkten (Abb. 20), könnte dies erklären, weshalb Suylen und Kollegen *Hyphomicrobium X* die Fähigkeit zur DMS-Metabolisierung abgesprochen haben (Suylen *et al.*, 1986). Andere *Hyphomicrobium*-Spezies wachsen in Batch-Kultur auch bei höheren DMS-Konzentrationen (de Bont *et al.*, 1981; Suylen & Kuenen, 1986; Pol *et al.*, 1994; Borodina *et al.*, 2000; Borodina *et al.*, 2002; Murakami-Nitta *et al.*, 2002; Eyice *et al.*, 2018). Entsprechend wäre dies für *Hyphomicrobium X* ebenfalls zu erwarten gewesen. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass DMS kein bevorzugtes Substrat von *Hyphomicrobium X* darstellt. *Hyphomicrobium X* verfügt über eine periplasmatische Methanthioloxidase (Hden\_0743), ein Hdr-ähnliches System, ein *cst*-ähnliches Operon sowie eine außerhalb hiervon kodierte PDO zur Oxidation des im DMS enthaltenen Schwefels (Tab. 15). Gene für eine klassische DMS-Monooxygenase vom DmoAB-Typ (Boden *et al.*, 2011)

konnten nicht im Genom gefunden werden. Dies zeigt, dass *Hyphomicrobium X* ein zum gegenwärtigen Zeitpunkt unbekanntes Enzym für die initiale Umsetzung von DMS zu Methanthiol verwendet. Bei der Proteom-Analyse (4.1.13) konnten Proteine identifiziert werden, die die zuvor beschriebene Funktion übernehmen könnten. Diese werden unter 5.2 diskutiert.

Eine essentielle Anforderung an *Hyphomicrobium X* als potentiellen Modellorganismus bestand in der Möglichkeit, den Organismus genetisch manipulieren zu können. In der Literatur sind zwei Wege beschrieben, Plasmid-DNS in *Hyphomicrobium X* einzubringen (Dijkhuizen *et al.*, 1984; Gliesche, 1997). Das von Dijkhuizen und Kollegen publizierte System zum Einbringen von Plasmiden mittels Konjugation konnte erfolgreich reproduziert werden. Aufgrund des höheren Aufwands bei einer Konjugation fand dieses System keine weitere Anwendung. Da das von Gliesche publizierte Protokoll zur Elektroporation nicht reproduziert werden konnte, wurde in Anlehnung an Borodina *et al.* (2004) ein neues Protokoll für die Elektroporation von *Hyphomicrobium X* entwickelt. Auffällig war, dass die verwendeten Kohlenstoffquellen einen Einfluss auf die Elektroporationseffizienz und die Ausbildung von Resistenzen gegen die zur Selektion verwendeten Antibiotika hatten (4.1.2). Die Unterschiede zwischen der Verwendung von Methanol, was sich als geeignetes Substrat herausstellte, und Methylamin, was sich als ungeeignetes Substrat entpuppte, könnten in veränderten Zellmorphologien begründet liegen. Es ist bekannt, dass verschiedene *Hyphomicrobium*-Spezies beim Wachstum mit Methanol eine normale Zellmorphologie aufweisen, in Gegenwart von Methylamin aber dazu neigen, kurze und stark verzweigte Filamente auf der gesamten Zelloberfläche auszubilden (Harder & Attwood, 1978). Es erscheint plausibel, dass die Anlagerung und die nachfolgende Aufnahme von Plasmid-DNS an bzw. durch eine derartig morphologisch veränderte Zelle im Vergleich zu einer normalen Zelle ineffizienter verlaufen.

Plasmide der pET-Vektor-Klasse besitzen einen in Bakterien der Familie Enterobacteriaceae replikativen Replikationsursprung (Bolivar *et al.*, 1977). Entsprechend war nicht zu erwarten, dass solche Plasmide in *Hyphomicrobium X* replikativ sind. Dies konnte erfolgreich demonstriert werden (4.1.3). Damit eigneten sich Plasmide mit einem pET-Vektorrückrad zur Generierung von Konstrukten für gerichtete Mutagenesen im Genom von *Hyphomicrobium X*. Der mittels PCR getätigte Nachweis der gerichteten Integration von Antibiotika-Resistenzen mit entsprechenden homologen flankierenden Sequenzen bestätigte diese Theorie und ermöglichte die Generierung der  $\Delta hdr$ - und der  $\Delta hdr\Delta sqr$ -Mutanten. Da bei der Herstellung von Mutanten Antibiotika-Resistenzen im Genom verblieben und zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur zwei Antibiotika als effektive Selektionsmarker für *Hyphomicrobium X* vorhanden sind, können maximal Doppelmutanten generiert werden. Eine Komplementierung *in trans* von Doppelmutanten ist nicht möglich. Deshalb wurde zusätzlich versucht, markerlos *in frame* Mutanten zu generieren. Da das Plasmid pk18*mobsacB* bzw. Derivate von diesem nicht replikativ in *Hyphomicrobium X* waren und der Organismus weder durch Saccharose im Medium inhibiert wurde noch diese verstoffwechselte, konnten pk18*mobsacB*-Derivate für die

markerlose *in frame* Deletion verwendet werden. Es wurde ein Protokoll zur gerichteten markerlosen Manipulation des Genoms von *Hyphomicrobium X* entwickelt, das zur Generierung der  $\Delta lbpA$ -,  $\Delta tsdA$ - und der Knock-in-Mutante verwendet wurde.

Plasmide mit einem auf der pBBR-Vektor-Klasse basierenden Rückgrat sind replikativ in *Hyphomicrobium X* (Gliesche, 1997). Entsprechend könnten Plasmide aus dieser Klasse mit einem Promotor, der vom Organismus erkannt wird, zur Komplementation von Knock-out-Mutanten oder zur Expression rekombinanter Proteine verwendet werden. Die generierten Stämme *H. denitrificans*  $hdr^+$  und *H. denitrificans*  $\Delta hdr^+$  bestätigten diese Theorie. Unter Kontrolle des konstitutiven Promotors p264 aus *Gluconobacter oxydans* (Kallnik *et al.*, 2010) konnten die nachfolgenden, in den jeweiligen Vektor klonierten Gene exprimiert und deren Genprodukte immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 24–26). Im Gegensatz zu den von Gliesche gemachten Angaben war es nicht möglich, die Plasmide aus *Hyphomicrobium X* aufzureinigen, wohingegen Nachweise mittels PCR erfolgreich waren. Eine konkrete Ursache hierfür zu finden, ist schwierig. Da die in *Hyphomicrobium X* elektroporierten replikativen Plasmide (pBBR1p264HdenHdrRif, pBBR1p264HdenHdrTc, Tab. 5) jeweils große Inserts enthielten, die homolog zu Bereichen im Genom von *Hyphomicrobium X* waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Plasmide im Rahmen einer homologen Rekombination in das Genom des Organismus integrierten und deshalb nicht mehr aufgereinigt werden konnten.

Die Eigenschaften, mesophil im Labormaßstab einfach kultiviert werden zu können, genetisch manipulierbar zu sein und mit organischen und anorganischen Schwefelverbindungen einen oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel zu betreiben, machen *Hyphomicrobium X* zu einem hervorragenden neuen Modellorganismus zur Erforschung der Hdr-ähnlichen Proteine. *Hyphomicrobium X* ist in natürlichen sowie industriellen terrestrischen und aquatischen Habitaten verbreitet (Koch & Dahl, 2018) und besitzt damit zusätzlich eine ökologische Relevanz.

## 5.2 Ein Modell für die Rolle Hdr-ähnlicher Proteine im oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in *Hyphomicrobium denitrificans X<sup>T</sup>*

Immunologische Untersuchungen (Abb. 24) und vergleichende Proteomik (4.1.13) zeigten, dass Hdr-ähnliche Proteine am Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium X* beteiligt sind. Mit Ausnahme von HdrC1 und dem hypothetischen Protein (Hden\_0692) waren alle Proteine aus dem *hdr*-ähnlichen Gencluster sehr signifikant oder höchstsignifikant häufiger im DMS-Proteom von *Hyphomicrobium X* zu finden (Tab. 17). Ähnliches ist aus Proteom-Analysen mit *Acidithiobacillus* spp. bekannt (Mangold *et al.*, 2011; 2013; Osorio *et al.*, 2013). Durch die Entwicklung eines genetischen Systems konnte erstmals eine funktionelle Knock-out-Mutante für einen Hdr-ähnlichen Komplex generiert und untersucht werden (*H. denitrificans*  $\Delta hdr$ , 4.1.3). Die  $\Delta hdr$ -Mutante zeigte weder Wachstum mit DMS als Substrat (Abb. 27) noch oxidierte sie es (Abb. 28). Eine Komplementierung *in trans* (*H. denitrificans*  $\Delta hdr^+$ ) stellte ein wildtypisches DMS-Oxidationsverhalten wieder her (Abb. 28). Diese

Beobachtungen stellen den ersten genetischen Nachweis für die Beteiligung Hdr-ähnlicher Proteine am oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel dar. Die  $\Delta hdr$ -Mutante verfügt über eine Methanthioloxidase (Hden\_0743) und ein unbekanntes Enzym zur Umsetzung von DMS zu Methanthiol, da lediglich der *hdr*-ähnliche Genlokus (Abb. 8) mutiert wurde. Für die Methanthioloxidase aus *Hyphomicrobium* EG ist bekannt, dass sie sowohl durch das natürliche Substrat Methanthiol ab Konzentrationen von 14  $\mu\text{M}$  ( $K_i$  42  $\mu\text{M}$ ) als auch durch das Produkt Sulfid ( $K_i$  90  $\mu\text{M}$ ) inhibiert wird (Suylen *et al.*, 1987). Dieser Effekt ist auch für die Methanthioloxidase aus *Hyphomicrobium* VS bekannt (Eyice *et al.*, 2018). Eine Unterbrechung der nachfolgenden Schwefeloxidation in der  $\Delta hdr$ -Mutante könnte in Form einer Feedback-Hemmung einen Einfluss auf die initiale DMS- und Methanthiol-Oxidation in *Hyphomicrobium* X haben und die ausbleibende Oxidation von DMS erklären. Die Daten aus der Proteom-Analyse zeigten, dass bei Wachstum mit DMS die Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (Hden\_0718) und die cytoplasmatische Persulfid dioxygenase (Hden\_0740) signifikant häufiger zu finden waren (Tab. 17). Trotzdem konnten diese *in vivo* den Hdr-ähnlichen Komplex nicht ersetzen. Dies wäre so nicht zu erwarten gewesen. Kombinationen aus Sqr und PDO, die häufig in *cst*-ähnlichen Operon-Strukturen zusammen mit einer Rhodanese kodiert werden, sind in *Staphylococcus aureus* ein effektives System zur Detoxifikation von Sulfid (Shen *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2016). Für rekombinant in *E. coli* produziertes Hden\_0740 konnten im Rahmen von *in vitro* Enzymtests mit Glutathionpersulfid als Substrat die kinetischen Parameter  $V_{\max}$  [172  $\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ] und der  $K_m$ -Wert [200  $\mu\text{M}$ ] ermittelt werden (Tanabe, 2017). Damit wäre auch eine Relevanz *in vivo* vorstellbar gewesen.

Dem im erweiterten *hdr*-ähnlichen Genlokus kodierten Lipoatbindeprotein LbpA (Hden\_0696) konnte eine essentielle Funktion im Rahmen des DMS-Metabolismus von *Hyphomicrobium* X zugewiesen werden. Die Deletionsmutante *H. denitrificans*  $\Delta lbpA$  (Abb. 30) zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie zuvor die  $\Delta hdr$ -Mutante. Das Ausbleiben von Wachstum mit DMS als Substrat verbunden mit keiner nachweisbaren Oxidation von DMS bewies, dass LbpA eine essentielle Rolle in der Oxidation von DMS bzw. der Verstoffwechslung der Abbauprodukte einnimmt. Der beobachtete Phänotyp der  $\Delta lbpA$ -Mutante wirft erneut die Frage auf, weshalb die Deletion eines Gens, dessen Genprodukt vermutlich an der Oxidation des im DMS enthaltenen Schwefels beteiligt ist, ein komplettes Ausbleiben der Oxidation von DMS bewirkt. Eine plausible Erklärung liefert in diesem Zusammenhang – wie zuvor für die  $\Delta hdr$ -Mutante ausführlich beschrieben – eine Feedback-Inhibierung der initialen DMS-Oxidation durch eine Akkumulation der Abbauprodukte Methanthiol und Sulfid.

Im Gegensatz zur  $\Delta hdr$ - und  $\Delta lbpA$ -Mutante konnte für *H. denitrificans*  $\Delta tsdA$  kein Phänotyp für das Wachstum mit oder die Oxidation von DMS als Substrat festgestellt werden (Abb. 32). Dieses wildtypische Verhalten zeigte, dass die TsdA während der von *Hyphomicrobium* X durchgeführten Oxidation von DMS zu Sulfat keine wichtige Funktion einnimmt. Diese Vermutung wurde durch die

vergleichende Proteomik (Tab. 17) sowie durch Analysen von Kulturüberständen von DMS oxidierenden Kulturen bestätigt (4.1.6). Die TsdA wurde im DMS-Proteom signifikant weniger häufiger gefunden (log<sub>2</sub> fold change -0,8, Tab. 17) und Tetrathionat konnte nicht als Intermediat der DMS-Oxidation nachgewiesen werden.

Eine grundsätzliche Frage bei der Betrachtung des oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus in *Hyphomicrobium X* besteht darin, mit welchem Enzym der Organismus die initiale Umsetzung von DMS zu Methanthiol vollzieht. Für den Schritt, bei dem Methanthiol zu Sulfid und Formaldehyd umgesetzt wird, konnte eine Methanthioloxidase (Hden\_0743) als Kandidat sowohl durch die bioinformatische Analyse (Tab. 15) als auch durch die vergleichende Proteomik (Tab. 17) identifiziert werden. Ein bekanntes DMS umsetzendes Protein wurde nicht gefunden, dafür aber Kandidaten für ein neuartiges DMS verstoffwechelndes Enzym. Einer dieser Kandidaten ist Hden\_0730. Das Protein war sehr signifikant um einen log<sub>2</sub> fold change von 4,0 häufiger im DMS-Proteom zu finden (Tab. 17). Zudem handelt es sich bei der bereits charakterisierten DmoA-Untereinheit der DMS-Monooxygenase aus *Hyphomicrobium sulfonivorans* um eine FMN-abhängige Oxidoreduktasen (Boden *et al.*, 2011), was gemäß der bioinformatischen Untersuchung auch auf Hden\_0730 zutrifft (Tab. 15). Ein Vergleich dieser Proteine zeigte, dass sie eine Ähnlichkeit von 12,6 % (Abb. 50) aufwiesen. Während der N- und der C-Terminus größere Ähnlichkeiten mit mehreren konservierten Aminosäuren zeigen, fehlte bei Hden\_0730 ein Bereich von fast 300 Aminosäuren, der bei DmoA in der Mitte der Primärsequenz vorhanden ist. Dieser Unterschied wird auch bei der ungleichen Länge der Proteine (Hden\_0730 – 207 Aminosäuren; DmoA – 480 Aminosäuren) deutlich. Im Fall von Hden\_0730 fehlte außerdem eine genetische Vergesellschaftung mit *dmoB* (NAD(P)H-anhängige Flavin-Oxidoreduktase). Die in die gleiche Leserichtung im Genom zusammen mit Hden\_0730 kodierten Proteine Hden\_0729 und Hden\_0728 wurden im DMS-Proteom sehr signifikant häufiger gefunden (log<sub>2</sub> fold change 4,9 bzw. 4,5), konnten bioinformatisch aber nicht näher charakterisiert werden. Zudem liegt zwischen Hden\_0730 und Hden\_0729 eine nicht kodierende Region von 191 Basenpaaren. Somit wäre es möglich, dass Hden\_0730 kein Bestandteil der Operon-Struktur von Hden\_0729-Hden\_0725 ist.

Neben Hden\_0730 ist Hden\_0734 ein weiterer Kandidat für die Rolle des DMS-degradierenden Enzyms in *Hyphomicrobium X*. Das cytoplasmatische Protein, das als Oxidoreduktase mit einer FAD/NAD-Bindedomäne annotiert ist, besitzt eine Ähnlichkeit von 50,5 % zur DsoF-Untereinheit der DMS-Oxidase aus *Acinetobacter* sp. strain 20B (Abb. 51). Im Originalorganismus besteht der DMS-Oxidase-Komplex (DsoABCDEF) aus sechs Untereinheiten und oxidiert DMS zu DMSO bzw. DMSO zu DMSO<sub>2</sub> (Horinouchi *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass DsoF essentiell für die Aktivität des Komplexes ist und eine DMS-Reduktase-Aktivität besitzt (Horinouchi *et al.*, 1999). Basierend auf Sequenz-Homologien zur DmpP-Untereinheit der Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. strain CF600 (Nordlund *et al.*, 1990) wurde zudem geschlussfolgert, dass DsoF ein FAD und ein 2Fe-2S-

Cluster vom Ferredoxin-Typ bindet. Sowohl die konservierten Cysteine, die im N-Terminus der Proteine zu finden sind, als auch die im Mittelteil von DsoF und DmpP gelegene FAD-Bindetasche konnten in Hden\_0734 gefunden werden. In Kombination mit der Tatsache, dass Hden\_0734 im DMS-Proteom sehr signifikant mit einem log<sub>2</sub> fold change von 3,1 häufiger zu finden war (Tab. 18), deuten diese Beobachtungen auf eine Rolle des Proteins im DMS-Stoffwechsel hin. Gene für Homologe zu den Untereinheiten DsoABCDE der DMS-Oxidase konnten nicht im Genom von *Hyphomicrobium X* gefunden werden. Allerdings wird Hden\_0734 in einem Gencluster zusammen mit vier weiteren Proteinen (Hden\_0731-0735) kodiert, von denen drei höchstsignifikant häufiger im DMS-Proteom zu finden waren (Tab. 18). Gemäß bioinformatischer Analysen der cytoplasmatischen Proteine handelt es sich bei Hden\_0731 (log<sub>2</sub> fold change 4,8) um ein Peroxidase-ähnliches Protein, bei Hden\_0732 (log<sub>2</sub> fold change 3,7) um eine putative Fettsäuredesaturase und bei Hden\_0733 (log<sub>2</sub> fold change 4,3) um ein Globin-ähnliches Protein. Das ebenfalls in gleicher Leserichtung im selben Gencluster kodierte Hden\_0735 ist als Regulator annotiert, konnte aber im Proteom nicht gefunden werden. Basierend auf der genetischen Vergesellschaftung verbunden mit der gleichzeitigen sehr signifikanten Erhöhung der Häufigkeit der Proteine im DMS-Proteom lässt sich die Hypothese formulieren, dass die Proteine Hden\_0731–Hden\_0734 einen Komplex zur cytoplasmatischen DMS-Degradation bilden.

Wenngleich die zuvor diskutierten Ergebnisse Anhaltspunkte dafür liefern, dass die genannten Kandidaten-Proteine die Funktion einer DMS-Monooxygenase in *Hyphomicrobium X* übernehmen könnten, fehlt ein experimenteller Beweis. In Anlehnung an die Arbeit von Horinouchi und Kollegen (Horinouchi *et al.*, 1999) könnten Knock-out-Mutanten für die Kandidaten erzeugt und mit einzelnen Genen oder einem kompletten Gencluster *in trans* komplementiert werden. Zusätzlich bietet sich die Option, das jeweilige Protein rekombinant in *E. coli* zu produzieren und zu versuchen, eine *in vitro* Aktivität zu dokumentieren, ähnlich wie es Boden und Kollegen für die DMS-Monooxygenase aus *Hyphomicrobium sulfonivorans* beschrieben haben (Boden *et al.*, 2011). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass im Beispiel aus der Literatur das Enzym aus dem Originalorganismus aufgereinigt wurde. Da gezeigt werden konnte, dass der Stamm *E. coli*  $\Delta$ *iscR* dazu geeignet ist, Eisen-Schwefel-Flavoproteine aus *Hyphomicrobium X* rekombinant zu produzieren (4.3.2), wäre ein analoges Vorgehen für die Expression einer putativen DMS-Monooxygenase denkbar.

Die Proteine des unvollständigen Sox-Systems (SoxABXYZ) zählten zu den Proteinen mit den höchsten signifikanten Veränderungen der relativen Protein-Level im DMS-Proteom (Tab. 17, 18). Diese Beobachtung kann in zwei verschiedene Richtungen interpretiert werden. Es ist denkbar, dass Thiosulfat als Intermediat während der DMS-Oxidation gebildet und durch das Sox-System teilweise verstoffwechselt wird. Ein direkter Nachweis von Thiosulfat in Kulturüberständen konnte weder mit kolorimetrischen Tests noch mittels HPLC-Analyse vollbracht werden (4.1.6). Eine Akkumulation des potentiellen Intermediates fand entsprechend nicht statt. Zum anderen wäre es möglich, dass das



unvollständige Sox-System in *Hyphomicrobium X* – in Ermangelung anderer Enzyme zur Sulfit-Oxidation (4.1.1) – an der Oxidation von Sulfit zu Sulfat beteiligt ist, ähnlich wie es *in vitro* für das Sox-System von *Paracoccus pantotrophus* beschrieben wurde (Friedrich *et al.*, 2000). Unabhängig von der genauen Rolle des Sox-Systems im Rahmen des Schwefelstoffwechsels von *Hyphomicrobium X* konnte durch Wachstumsversuche mit den generierten Mutanten-Stämmen gezeigt werden, dass die vollständige Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat einen funktionalen Hdr-ähnlichen Komplex benötigt. Unter Bedingungen, bei denen wildtypische Zellen Thiosulfat stöchiometrisch zu Sulfat oxidieren, setzte die  $\Delta hdr$ -Mutante das Substrat vollständig zu Tetrathionat um, während der *in trans* komplementierte  $\Delta hdr^+$ -Stamm ein wildtypisches Verhalten zeigte (Abb. 28). Die beobachtete Akkumulation von Tetrathionat konnte exklusiv auf eine enzymatische Bildung durch die TsdA zurückgeführt werden. Die  $\Delta tsdA$ -Mutante zeigte unter Bedingungen, bei denen der Wildtyp Thiosulfat ausschließlich zu Tetrathionat oxidierte, keine Oxidation von Thiosulfat (Abb. 31). Im Gegensatz hierzu verhielt sich die Mutante unter Bedingungen, bei denen der Wildtyp Thiosulfat ausschließlich zu Sulfat oxidierte, wildtypisch (Abb. 32).

Wenn das unvollständige Sox-System eine Thiosulfat oxidierende Funktion in *Hyphomicrobium X* besitzt und Thiosulfat zu Sulfat und proteingebundenem Sulfanschwefel umsetzt, verfügt der Organismus theoretisch über zwei Möglichkeiten, den verbleibenden reduzierten Schwefel zu Sulfit zu oxidieren. Eine Möglichkeit besteht in der Oxidation über das Hdr-ähnliche System, die andere basiert auf einer Kombination von Sqr und PDO (Tab. 15). Der Verlust eines funktionsfähigen Hdr-ähnlichen Komplexes in der  $\Delta hdr$ -Mutante führte dazu, dass der Stamm kein Thiosulfat mehr zu Sulfat umsetzen konnte, obwohl noch eine funktionelle Sqr und PDO verfügbar waren. Entsprechend kann äquivalent zu der Situation bei der Oxidation von DMS angenommen werden, dass ein Schwefeloxidationsweg via Sqr und PDO im Rahmen der Thiosulfat-Oxidation in *Hyphomicrobium X* keine entscheidende Rolle spielt oder zumindest nicht die Funktion des Hdr-ähnlichen Systems ersetzen kann. Sqr und PDO aus *cst*-ähnlichen Operon-Strukturen haben *in vivo* in der Regel eine detoxifizierende Funktion (Shen *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2016). Entsprechend ist es möglich, dass die Aktivität der Enzyme von *Hyphomicrobium X* nicht ausreicht, um größere Mengen an Substrat umzusetzen. Zudem ist eine Schwefeloxidation durch das Hdr-ähnliche System in Kombination mit dem unvollständigen Sox-System für *Hyphomicrobium X* energetisch attraktiver. Im direkten Vergleich zur Detoxifikation durch die Sqr und PDO, bei der nur zwei Elektronen auf Redox-Carrier übertragen werden (Sulfid zu Sulfit), würden hier mindestens sechs Elektronen (Thiosulfat zu Sulfat und Sulfit) gewonnen werden.

Eine weitere Verknüpfung zwischen dem DMS- und dem Thiosulfat-Stoffwechsel in *Hyphomicrobium X* zeigte die  $\Delta lbpA$ -Mutante. Die Deletion von *lbpA* führte dazu, dass die Mutante kein Thiosulfat zu Sulfat oxidierte (Abb. 30). Stattdessen zeigte die  $\Delta lbpA$ -Mutante einen Phänotyp, der zuvor bei der  $\Delta hdr$ -Mutante beobachtet wurde, sie oxidierte Thiosulfat stöchiometrisch zu Tetrathionat. Diese Beobachtung untermauert, dass das genetisch mit den *hdr*-ähnlichen Genen vergesellschaftete

Lipoatbindeprotein LbpA essentiell für die Funktion des Hdr-ähnlichen Komplexes ist. Gleichzeitig bleibt die Frage offen, welche Rolle LbpA im Rahmen des Schwefelstoffwechsels einnimmt. Die vergleichende Proteomik (Tab. 17) und die immunologischen Untersuchungen (Abb. 26) zeigten, dass die Expression von LbpA in Gegenwart von reduzierten Schwefelverbindungen spezifisch induziert wurde. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das erweiterte *hdr*-ähnliche Gencluster (Hden\_0688–Hden\_0696) eine Operon-Struktur bildet, die *lbpA* (Hden\_0696) einschließt. Das aus *E. coli* aufgereinigte rekombinante LbpA wies allerdings keine stabile Bindung an HdrA als Markerprotein für den Hdr-ähnlichen Komplex auf (Abb. 25). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Boughanemi und Kollegen, die zeigten, dass der Hdr-ähnliche Komplex aus *Aquifex aeolicus* aus den Untereinheiten HdrA, HdrB1, HdrB2, HdrC1 und HdrC2 sowie einem lose assoziierten DsrE-ähnlichen Protein besteht (Boughanemi *et al.*, 2016).

Aus der Analyse mit einem  $\alpha$ -Liponsäure-Antikörper ging hervor, dass LbpA lipoyliert vorlag (Abb. 26). Für das LbpA aus *Thioalkalivibrio* sp. K90mix konnte ebenfalls kürzlich eine Lipoylierung mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Cao *et al.*, 2018). Es kann entsprechend davon ausgegangen werden, dass der gebundene Liponsäurerest für die Funktion des Proteins entscheidend ist. Theoretisch wären in diesem Zusammenhang zwei mögliche Rollen für lipoyliertes LbpA in der Schwefeloxidation denkbar. Proteingebundener Sulfanschwefel könnte auf den Liponsäurerest von LbpA übertragen werden, was zur Ausbildung eines Persulfids führen würde, das dann als Substrat für den Hdr-ähnlichen Komplex dienen könnte. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang ein hochkonserviertes Cystein, das am äußersten Ende der C-Termini von LbpAs aus verschiedenen Organismen gefunden wurde (Cao *et al.*, 2018), ebenfalls eine Rolle. Für DsrC, das Substrat der dissimilatorischen Sulfit-Reduktase, konnte gezeigt werden, dass es ein proteingebundenes Trisulfid ausbildet (Santos *et al.*, 2015). Eine ähnliche Situation wäre für LbpA ebenfalls denkbar. Zum anderen wäre es möglich, dass LbpA als Elektronenakzeptor des Hdr-ähnlichen Komplexes fungieren könnte. Im Genom von *Metallosphaera cuprina* Ar-4<sup>T</sup> liegt direkt stromaufwärts vom *hdr*-ähnlichen Genlokus ein Gencluster, das für ein DsrE3-ähnliches Protein, eine Dihydrolipoyl-Dehydrogenase sowie ein Thioredoxin kodiert (Liu *et al.*, 2014). Es wäre möglich, dass die Elektronen, die bei der Oxidation einer reduzierten Schwefelverbindung durch den Hdr-ähnlichen Komplex freigesetzt werden, zunächst auf oxidiertes LbpA übertragen werden. Reduziertes LbpA könnte dann durch die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase reoxidiert und die Elektronen könnten auf NAD<sup>+</sup> übertragen werden. In Organismen, bei denen der Hdr-ähnliche Komplex nicht in einer genetischen Vergesellschaftung mit einer Dihydrolipoyl-Dehydrogenase liegt, wäre es denkbar, dass diese Aufgabe von der E3-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes übernommen werden könnte. Für *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass sich der Pyruvatdehydrogenase-, der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase- und der Glycin-Decarboxylase-Komplex eine E3-Untereinheit teilen (Steiert *et al.*, 1990). Diese Hypothese wirft allerdings die Frage auf, was das endogene Substrat des Hdr-ähnlichen Komplexes ist bzw. wie es sich um die Redox-Chemie der katalysierten Reaktion verhält.

Für reduzierte proteingebundene Liponsäure (GlyH-Protein) in Rahmen der Glycin-Degradation durch den Glycin-Decarboxylase-Komplex ist bekannt, dass diese ausreichend elektronegativ ist, um  $\text{NAD}^+$  zu reduzieren (Kikuchi & Hiraga, 1982). Für das Redox-Paar  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  wiederum wird unter physiologischen Bedingungen ein Redoxpotential von -280 mV angenommen (Buckel & Thauer, 2013). Basierend auf den in der Literatur zu findenden Standardredoxpotentialen für reduzierte Schwefelverbindungen ( $E^0$  Sulfid/Sulfat -515 mV, Sulfid/Schwefel -270 mV, Sulfid/Sulfit -116 mV, (Thauer *et al.*, 1977)) wäre lediglich die Oxidation von Sulfit zu Sulfat ausreichend elektronegativ, um Elektronen direkt auf  $\text{NAD}^+$  bzw. LbpA als Redox-Mediator übertragen zu können. Allerdings handelt es sich bei den aufgeführten Redoxpotentialen um Standardredoxpotentiale. Das Standardredoxpotential für die Oxidation von Malat zu Oxalacetat von -172 mV (Thauer *et al.*, 1977) wäre theoretisch auch nicht ausreichend elektronegativ, um die freigesetzten Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  zu übertragen. Dass diese Reaktion von der Malatdehydrogenase im Citratzyklus katalysiert wird (Krebs & Johnson, 1937), ist Lehrbuchwissen und zeigt, dass in der Literatur zu findende Standardredoxpotentiale von den tatsächlichen Potentialen unter physiologischen Bedingungen abweichen können. Eine ähnliche Situation kann für die durch den Hdr-ähnlichen Komplex katalysierten Reaktionen angenommen werden. Ebenfalls ist es nicht unwahrscheinlich, dass das eigentliche Substrat des Hdr-ähnlichen Komplexes keine anorganische Schwefelverbindung wie Sulfid, Thiosulfat oder ein niedermolekulares Persulfid wie Glutathionamid-Persulfid ist, sondern proteingebunden vorliegt (proteingebundener Sulfanschwefel) und ein bisher unbekanntes Redoxpotential besitzt. In der Literatur wird das Protein TusA als möglicher Substrat-Carrier diskutiert (Dahl, 2015). Homologe dieses Proteins, für das bereits eine Rolle im cytoplasmatischen Transport des Substrats der oxidativen dissimilatorischen Sulfit-Reduktase (DsrAB) in *Allochromatium vinosum* nachgewiesen werden konnte (Stockdreher *et al.*, 2014), befinden sich in einer Vielzahl von Mikroorganismen in direkter genetischer Vergesellschaftung mit *hdr*-ähnlichen Genen (Liu *et al.*, 2014; Stockdreher *et al.*, 2014). In *Hyphomicrobium* X liegt *tusA* (Hden\_0698) im *sox*-Gencluster unmittelbar stromabwärts vom *hdr*-ähnlichen Genlokus (Abb. 52). Zudem wurde das Protein im DMS-Proteom höchstsignifikant häufiger mit einem log<sub>2</sub> fold change von 3,3 gefunden (Tab. 17). Damit wäre ein TusA-gebundener Sulfanschwefel in Form eines Persulfids ein Kandidat als Substrat für den Hdr-ähnlichen Komplex.

Viele Organismen, die einen *hdr*-ähnlichen Genlokus besitzen, wie z.B. *Acidithiobacillus* spp. oder *Thioalkalivibrio* spp., wachsen chemolithoautotroph und sind darauf angewiesen, NADH durch reversen Elektronenfluss zu erzeugen (Cao *et al.*, 2018; Koch & Dahl, 2018). Für solche Prokaryoten wäre es energetisch günstig, bei der cytoplasmatischen Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen durch einen Hdr-ähnlichen Komplex NADH zu gewinnen. Diese wäre durch verschiedene Szenarien denkbar. Wenn das Redoxpotential des Substrats des Hdr-ähnlichen Komplexes ausreichend elektronegativ ist, können die freigesetzten Elektronen  $\text{NAD}^+$  direkt zu NADH reduzieren oder indirekt erst proteingebundenes Lipoat (LbpA) als Redox-Carrier. Die

Elektronen könnten dann durch eine Dihydrolipoyl-Dehydrogenase auf  $\text{NAD}^+$  übertragen werden. Falls das Substrat des Hdr-ähnlichen Komplexes elektropositiver als  $\text{NAD}^+$  sein sollte, wäre – analog zum Hdr-Komplex aus methanogenen Archaeen – eine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation vorstellbar.  $\text{NAD}^+$  oder proteingebundene Liponsäure könnte der elektronegative Elektronenakzeptor sein. Der Chinon-Pool wäre ein geeigneter elektropositiver Elektronenakzeptor. Da *Hyphomicrobium* X nicht über die Gene für die Biosynthese von Menachinon verfügt (1.5), wäre Ubichinon der Elektronenakzeptor. Das genaue Redoxpotential von Ubichinon ist unklar, die Literaturwerte variieren stark (0 mV (Green & Baum, 1970), 45 mV (Nelson *et al.*, 2005), 65 mV (Urban & Klingenberg, 1969), 113 mV (Thauer *et al.*, 1977)). Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro* Analysen von rekombinantem HdrA erscheint ein solches Szenario allerdings eher unwahrscheinlich (5.3). Die Ausbildung eines stabilen neutralen protonierten Semichinon-Radikals (Abb. 40–41) ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das FAD in HdrA keine Elektronen-Bifurkation vollzieht. Zudem ist es fraglich, ob im Fall des Hdr-ähnlichen Komplexes eine Elektronen-Bifurkation mit dem Chinon-Pool als elektropositivem Elektronenakzeptor eine ausreichend starke exergone Reaktion zur Verfügung stellt, um die endergone Reduktion von  $\text{NAD}^+$  oder Liponsäure zu bewerkstelligen. Im Fall des HdrABC-Komplexes in Methanogenen wird durch die Reduktion des Heterodisulfids ( $E^{\circ}$  -140 mV) mit Elektronen aus der Oxidation von Wasserstoff ( $E^{\circ}$  -296 mV, unter physiologischen Bedingungen) die Reduktion von Ferredoxin ( $E^{\circ}$  -500 mV, unter physiologischen Bedingungen) katalysiert (Buckel & Thauer, 2013). Entsprechend wird ein Potentialgefälle von -156 mV genutzt, um eine endergone Reaktion mit einem Potential von 204 mV zu katalysieren. Bei einem anderen Beispiel, dem BcdA-EtfBC Komplex aus *Clostridium kluyveri*, beträgt das Redoxpotential der exergonen Reaktion -270 mV und das der endergonen Reaktion 220 mV (Buckel & Thauer, 2013). Das endogene Substrat des Hdr-ähnlichen Komplexes und damit auch dessen entsprechendes Redoxpotential sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unbekannt. Wenn ein ähnliches Potential wie das für die Oxidation von Hydrogensulfid zu Hydrogensulfit ( $E^{\circ}$  -116 mV, (Thauer *et al.*, 1977)) angenommen wird, würde die exergone Teilreaktion mit Chinon als Elektronenakzeptor ein Redoxpotential zwischen -116 mV und -229 mV besitzen, abhängig davon, welches in der Literatur zu findende Standardpotential von Ubichinon für die Berechnung herangezogen wird. Die endergone Teilreaktion mit  $\text{NAD}^+$  würde ein Redoxpotential von 164 mV aufweisen. Die zuvor angestellten Berechnungen sind nur mathematische Überlegungen, die die Komplexität der Redox-Chemie in biologischen Systemen ignorieren. Die Tatsache, dass in der Literatur beschriebene Enzym-Komplexe mit Flavin-basierter Elektronen-Bifurkation größere Potentialgefälle in der exergonen Teilreaktion zum Antrieb der endergonen Teilreaktion verwenden, kann möglicherweise ein weiterer Hinweis darauf sein, dass der Hdr-ähnliche Komplex in Sulfurikanten keine Bifurkation katalysiert.

Wenn das Substrat des Hdr-ähnlichen Komplexes kein ausreichend negatives Redoxpotential besitzt, um einen Transfer der freigesetzten Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  zu erlauben, und der Komplex ebenfalls keine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation katalysiert, stellt sich die Frage nach dem tatsächlichen

Elektronenakzeptor. Denkbar wäre, dass der Chinon-Pool (Ubichinon) als Elektronenakzeptor fungiert. Der Transfer von Elektronen aus der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen in den Chinon-Pool ist beispielsweise für die Thiosulfat:Chinon-Oxidoreduktase (Müller *et al.*, 2004) oder die Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (Reinartz *et al.*, 1998) bekannt. Die Gewinnung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH müsste in einem solchen Fall durch reversen Elektronenfluss bewerkstelligt werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass FAD in einem elektroenzymatischen System zur Synthese von L-Laktat bei einem kontinuierlichen Potential von -500 mV als Elektronendonator für eine an eine Elektrode gebundene Dihydrolipoyl-Dehydrogenase fungieren kann (Leonida *et al.*, 1998). Hierbei werden die Elektronen von der Elektrode auf immobilisiertes FAD im Chinon-Zustand übertragen, was als Hydrochinon den proteingebundenen Liponsäurerest der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase, die ebenfalls immobilisiert auf der Elektrode vorliegt, reduziert. Die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase gibt die Elektronen an  $\text{NAD}^+$  ab, das als NADH durch eine lösliche L-Laktatdehydrogenase reoxidiert wird. Kontrollexperimente ohne FAD zeigten keinen direkten Elektronenfluss von der Elektrode auf die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (Leonida *et al.*, 1998). Ein solcher Versuchsaufbau ist artifiziell und direkte Übertragungen der beobachteten Elektronenflüsse auf *in vivo* Situationen sind spekulativ. Zudem ist das Standardredoxpotential von  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  ( $E^{0'}$  -220 mV (Thauer *et al.*, 1977)) theoretisch zu positiv, um eine direkte Übertragung von Elektronen von  $\text{FADH}_2$  auf proteingebundene oxidierte Liponsäure zu erlauben. Gleichwohl können diese Ergebnisse als Gedankenanstoß zur Erstellung eines Modells für den Funktionsmechanismus von Hdr-ähnlichen Komplexen verstanden werden.

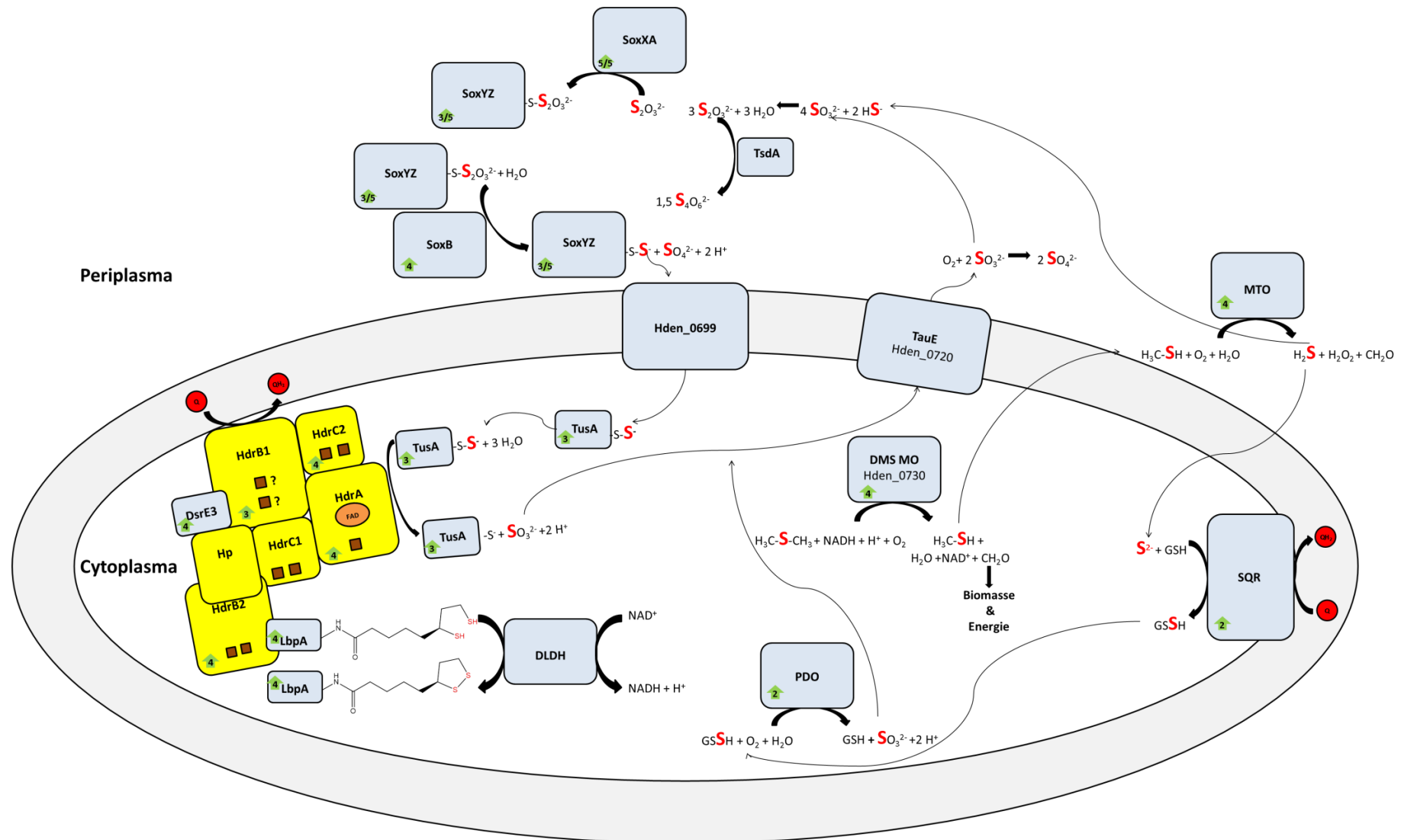
Die Komposition und die subzelluläre Lokalisation des Hdr-ähnlichen Komplexes sind bisher unklar. Für den aufgereinigten Hdr-ähnlichen Komplex aus *Aquifex aeolicus* ist beschrieben, dass er aus fünf Untereinheiten (HdrAB1B2C1C2) besteht, die entweder als Monomer oder als Dimer vorliegen (Boughanemi *et al.*, 2016). Das im *hdr*-ähnlichen Genlokus kodierte hypothetische Protein (Hp) wurde nicht gefunden. Der Hdr-ähnliche Komplex lag sowohl löslich im Cytoplasma als auch membranassoziiert vor (Boughanemi *et al.*, 2016). In der vergleichenden Proteom-Analyse konnten lediglich die Untereinheiten HdrA, HdrB1, HdrB2 und HdrC2 identifiziert werden (Tab. 17). Dabei wiesen mit Ausnahme von HdrB1 die anderen Untereinheiten des Hdr-ähnlichen Komplexes ähnliche log2 fold changes auf (3,9–4,3), was als Hinweis auf eine äquimolare Komposition der verschiedenen Untereinheiten des Hdr-ähnlichen Komplexes interpretiert werden kann. Bei Proteom-Analysen von *Acidithiobacillus* spp. konnten ebenfalls nur Teile des Hdr-ähnlichen Komplexes gefunden werden (Mangold *et al.*, 2011; Osorio *et al.*, 2013). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass in beiden Quellen 2D-Gelelektrophoresen mit anschließender Spot-Identifizierung zur vergleichenden Proteomik herangezogen wurden und nicht wie im Rahmen dieser Arbeit eine LC-MS-Analyse. Mögliche Hinweise dafür, dass bei der vergleichenden Proteomik nicht alle von Boughanemi und Kollegen beschriebenen Untereinheiten des Komplexes gefunden wurden, liefert der Vergleich der Methoden zur Präparation der Proteine. Bei Boughanemi wurde der Hdr-ähnliche Komplex aus

Membranfraktionen mittels Detergenzien solubilisiert, während in dieser Arbeit Ganzzellproteine ohne ergänzende Solubilisierung von Membranproteinen verwendet wurden. Es ist möglich, dass Membranproteine wie das im *cst*-ähnlichen Operon kodierte TauE-ähnliche Protein (Hden\_0720) im Proteom fehlen oder aber membranassoziierte Proteine hinsichtlich ihres log<sub>2</sub> fold changes unterrepräsentiert sind. Das zuletzt aufgeführte Szenario könnte im Fall von HdrB1 zutreffend sein. HdrB1 besitzt gemäß der bioinformatischen Analyse mit verschiedenen Tools zur Vorhersage von Transmembrandomänen keine ebensolchen, könnte aber – wie bereits für andere Enzyme mit konservierten CCG-Domänen beschrieben (Lemos *et al.*, 2002; Auernik & Kelly, 2008) – über amphipathische Helices eine Membranassoziiierung erfahren. Mit einem Tool zur Vorhersage von in-plane Membranankern (Sapay *et al.*, 2006) konnten potentielle amphipathische Helices in HdrB1 (eine Helix), HdrC1 (zwei Helices) und Hp (zwei Helices) identifiziert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der vergleichenden Proteomik. Während HdrB1 – wenn auch vermutlich unterrepräsentiert hinsichtlich des log<sub>2</sub> fold changes – im DMS-Proteom gefunden wurde, fehlen HdrC1 und Hp, obwohl sie zusammen mit den anderen Hdr-ähnlichen Proteinen als eine Transkriptionseinheit im Genom kodiert werden. Zusätzlich zeigten die Untersuchungen zu heterolog produziertem Hp (Hden\_0692, 4.3.1), dass das rekombinante Protein mit hoher Affinität an Proteine von *E. coli* assoziiert vorlag, die durch ihre spektralen Eigenschaften mit hoher Wahrscheinlichkeit als Cytochrom-b558-d-Komplex identifiziert werden konnten. Wenn im Originalorganismus eine ähnliche Situation vorliegt, könnte dies das Fehlen von Hp im Proteom erklären. Gleichzeitig stellt sich die Frage, weshalb der Hdr-ähnliche Komplex eine Membranassoziiierung benötigt. In dem Fall, dass der Hdr-ähnliche Komplex tatsächlich eine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation katalysiert und der Chinon-Pool als elektropositiver Elektronenakzeptor fungiert, könnte HdrB1, HdrC1 oder Hp die nötige Assoziierung zur Membran bewerkstelligen. Für den Fall, dass keine Elektronen-Bifurkation vollzogen wird und die Elektronen direkt in den Chinon-Pool eingespeist werden, würde den Proteinen eine ähnliche Aufgabe zukommen.

Da das Redoxpotential von möglichen anorganischen Substraten des Hdr-ähnlichen Komplexes nicht ausreichend elektronegativer ist, um Elektronen direkt auf NAD<sup>+</sup> oder oxidierte proteingebundene Liponsäure zu übertragen, stellt eine hypothetische Elektronen-Konfurkation einen weiteren Erklärungsansatz dar. Für den LDH/Etf-Komplex aus *Acetobacterium woodii* ist bekannt, dass dieser Organismus Elektronen aus der Oxidation von Laktat zur endergonen Reduktion von NAD<sup>+</sup> verwendet, indem er gleichzeitig Elektronen aus der Oxidation von reduziertem Ferredoxin nutzt (Weghoff *et al.*, 2015). Es ist jedoch fraglich, ob in Sulfurikanten stark elektronegative Redox-Carrier wie reduziertem Ferredoxin für eine solche Reaktion zur Verfügung stehen. Theoretisch wäre ein Szenario denkbar, bei dem Elektronen aus der Oxidation einer reduzierten Schwefelverbindung mit Elektronen aus der Atmungskette vereint werden, um Reduktionsäquivalente in Form von NADH zu generieren. Die vermeintliche Membranassoziiierung von Hp, HdrB1 und HdrC1 könnte als Hinweis auf eine solche Situation interpretiert werden.

Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmungen zum kristallisierten HdrC aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus* (mHdrC) (Wagner *et al.*, 2017) – inklusive sämtlicher konservierter Cysteine – kann davon ausgegangen werden, dass HdrC1 und HdrC2 jeweils zwei 4Fe-4S-Cluster binden. Damit kommen beide Proteine für eine Rolle als Elektronenüberträger innerhalb des Hdr-ähnlichen Komplexes in Frage. Bei HdrB1 ist eine Zuweisung einer möglichen Funktion schwieriger. Alignments mit HdrB aus *M. thermolithotrophicus* (mHdrB) zeigten, dass in HdrB1 zwei der vier Cysteine, die in mHdrB das N-terminale FeS-Cluster koordinieren, fehlen (Koch & Dahl, 2018). Im C-terminalen Bereich von HdrB1 sind nur drei der vier Cysteine zu finden, die in mHdrB das zweite Eisen-Schwefel-Cluster bilden. Dies deutet darauf hin, dass HdrB1 keine zwei 4Fe-4S-Cluster bindet. Neben der zuvor angesprochenen Rolle im Rahmen einer möglichen Membranassoziiierung bleibt die konkrete Funktion von HdrB1 damit unklar. Einen Gegensatz dazu stellt HdrB2 dar, bei dem alle konservierten Cysteine, die in die Bindung der beiden nicht-cubanen FeS-Cluster im mHdrB involviert sind, gefunden werden konnten (Koch & Dahl, 2018). Damit ist es wahrscheinlich, dass HdrB2 eine katalytisch aktive Untereinheit des Hdr-ähnlichen Komplexes ist. HdrA besitzt, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte (4.3.5), jeweils ein 4Fe-4S-Cluster und ein FAD. Es fehlen im Vergleich zu HdrA aus *M. thermolithotrophicus* (mHdrA) insgesamt fünf Eisen-Schwefel-Cluster. Dies legt nahe, dass HdrA im Hdr-ähnlichen Komplex eine Funktion ausübt, die sich von der von mHdrA unterscheidet. Die gewonnenen Erkenntnisse aus der aufgeklärten Struktur von HdrA werden unter 5.3 näher erläutert.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Proteom-Analyse (4.1.13), der immunologischen Untersuchungen (4.1.7–4.1.8.) und der biochemischen Charakterisierungen von wildtypischen Zellen und Mutanten-Stämmen (4.1.5–4.1.6, 4.1.9–4.1.12) wurde ein Modell für den oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von *Hyphomicrobium X* entwickelt (Abb. 47).



**Abb. 47: Thiosulfat- und DMS-Stoffwechsel in *Hyphomicrobium X*.** Normalisierte und statistisch relevante ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten (DMS/DMA logarithmiert zur Basis 2, gerundet auf ganze Zahlen) werden mit den grünen Pfeilen angegeben. Mögliche prosthetische Gruppen bei den Hdr-ähnlichen Proteinen: braune Vierecke = [4Fe-4S]; orange Ovale = FAD. Abkürzungen: DMS MO = DMS-Monooxygenase; DLDH = Dihydrolipoyl-Dehydrogenase; LbpA = Lipoprotein; MTO = Methanithioloxidase; PDO = Persulfidoxidase; SQR = Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase; Q = Chinon-Pool.



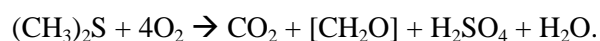
Das Modell für die Rolle des Hdr-ähnlichen Komplexes im Schwefelstoffwechsel von *Hyphomicrobium X* umfasst sowohl die Oxidation von DMS als auch die Oxidation von Thiosulfat. Da davon ausgegangen wird, dass Thiosulfat ein Intermediat während der DMS-Oxidation ist, wird das Modell nachfolgend nur ausgehend von DMS als Substrat beschrieben.

*Hyphomicrobium X* verfügt über kein beschriebenes Enzym, das DMS zu Methanthiol umsetzen kann. Ein möglicher zuvor bereits diskutierter Kandidat hierfür ist Hden\_0730, eine cytoplasmatische NADH-Dehydrogenase mit einem FMN-Bindemotiv. Das bei der Umsetzung von DMS zu Methanthiol gebildete Formaldehyd kann zur Energiegewinnung cytoplasmatisch zu Formiat und weiter zu CO<sub>2</sub> oxidiert oder zum Aufbau von Biomasse über den Serin-Weg verwendet werden (Meiberg & Harder, 1978). Der im DMS enthaltene Schwefel wird als Methanthiol freigesetzt, dem Substrat der periplasmatischen Methanthioloxidase (Hden\_0743). Methanthiol, das von der Methanthioloxidase zu Dihydrogensulfid und Formaldehyd umgesetzt wird (Suylen *et al.*, 1987; Eyice *et al.*, 2018), muss vor der weiteren Verstoffwechslung das zelluläre Kompartiment wechseln. Bei dieser Reaktion freigesetztes Formaldehyd kann erneut entweder zur Energiegewinnung oder zum Aufbau von Biomasse genutzt werden, während das Dihydrogensulfid über zwei verschiedene Stoffwechselwege oxidiert werden kann. Der erste Weg, der energetisch einer Detoxifikation gleicht, involviert die Sqr (Hden\_0718), die cytoplasmatisch Glutathionpersulfid generiert und dabei zwei Elektronen in den Chinon-Pool einspeist. Glutathionpersulfid dient der cytoplasmatischen PDO (Hden\_0740) als Substrat und wird ohne Energiekonservierung zu Sulfit oxidiert. Dieses wird durch ein TauE-ähnliches Protein (Hden\_0720) ins Periplasma exportiert, wo es abiotisch mit Sauerstoff zu Sulfat reagiert. Ebenfalls wäre eine abiotische Reaktion von Hydrogensulfit und Hydrogensulfid, die zur Bildung von Thiosulfat führt (Heunisch, 1977), denkbar. Diese Reaktion wird auch als Ausgangspunkt für den zweiten Weg zur Oxidation des durch die Methanthioloxidase freigesetzten Dihydrogensulfids postuliert. Das auf diese Weise gebildete Thiosulfat dient als Substrat des periplasmatischen unvollständigen Sox-Systems. Eines der beiden Schwefelatome wird vollständig zu Sulfat oxidiert, das zweite verbleibt als proteingebundener Sulfanschwefel an SoxYZ. Wie der Sulfanschwefel nachfolgend in das Cytoplasma gelangt, ist unklar, wobei in dem hier dargestellten Modell eine Involvierung von Hden\_0699 vorgeschlagen wird, einem potentiellen Schwefeltransporter, der im gleichen Gencluster wie SoxX, SoxA und TusA kodiert wird. Ebenso wäre denkbar, dass der Schwefel als niedermolekulare Verbindung wie Glutathionamid-Persulfid in das Cytoplasma gelangt. Ein ähnlicher Mechanismus wird für *Allochromatium vinosum* angenommen (Frigaard & Dahl, 2009). Eine Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat im Periplasma durch eine Thiosulfatdehydrogenase (Hden\_2748) ist metabolisch möglich, spielt aber im Rahmen der DMS-Oxidation nachweislich keine Rolle.

Es ist wahrscheinlich, dass TusA (Hden\_0698) in den weiteren Transport des Sulfanschwefels im Cytoplasma involviert ist. Ob ein proteingebundener Sulfanschwefel, der, wie im Modell dargestellt,

durch TusA transportiert wird, das Substrat des Hdr-ähnlichen Komplexes ist, muss durch zukünftige Experimente gezeigt werden. Eine Beteiligung eines DsrE-ähnlichen Proteins (Hden\_0688), das im DMS-Proteom sehr signifikant mit einem log<sub>2</sub> fold change von 4,1 häufiger gefunden wurde (Tab. 17), wäre ebenfalls denkbar. Ob ein DsrE-ähnliches Protein in den Transport des proteingebundenen Sulfanschwefels involviert ist, wie es für *Metallosphaera cuprina* postuliert wird (Liu *et al.*, 2014), oder selbst als Substrat fungiert, ist unklar. Selbiges gilt für die Frage, welche Untereinheit des Hdr-ähnlichen Komplexes die katalytisch aktive ist und wie der weitere Transport der durch die Oxidation freigesetzten Elektronen verläuft. Im hier dargestellten Modell werden zwei verschiedene Möglichkeiten gezeigt: der Transfer der Elektronen in den Chinon-Pool und der Transfer der Elektronen auf oxidierte proteingebundene Liponsäure. Eine Kombination beider Prozesse durch eine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation wäre theoretisch ebenfalls denkbar, erscheint aber unwahrscheinlich (5.3). Als Endprodukt der Oxidation des proteingebundenen Sulfanschwefels wird Sulfit angenommen. Unter aeroben Bedingungen reagiert Sulfit spontan mit Sauerstoff zu Sulfat. Die andere Möglichkeit besteht in der abiotischen Reaktion mit Hydrogensulfid zu Thiosulfat. *Hyphomicrobium* X verfügt über kein klassisches System zur Oxidation von Sulfit zu Sulfat, bildet aber Sulfat stöchiometrisch als Oxidationsendprodukt der DMS- oder Thiosulfat-Oxidation. Dies lässt die Theorie zu, dass der Hdr-ähnliche Komplex sein Substrat vollständig zu Sulfat oxidiert. Da in einer Vielzahl von anderen Mikroorganismen mit *hdr*-ähnlichem Genlokus etablierte Systeme zur Oxidation von Sulfit vorhanden sind, erscheint dieses jedoch eher abwegig. Im Fall von *Acidithiobacillus caldus* SM-1 ist der Sulfit oxidierende SoeABC-Komplex sogar direkt genetisch mit dem *hdr*-ähnlichen Gencluster vergesellschaftet (Abb. 4).

Ausgehend von DMS als Substrat lässt sich der skizzierte Stoffwechselweg wie folgt stöchiometrisch darstellen:



In *Hyphomicrobium* X wurde gezeigt, dass die Expression der *hdr*-ähnlichen Gene stark reguliert wird. Die Tatsache, dass der Organismus bisher als unfähig beschrieben wurde, einen oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel zu betreiben (Suylen *et al.*, 1986), ist entsprechend der strikten Regulation der Gene geschuldet. Als möglicher Regulator konnte das unmittelbar vor dem *hdr*-ähnlichen Genlokus kodierte Hden\_0682, das gemäß KEGG als Regulator aus der ArsR-Familie annotiert wird, identifiziert werden. Da ein Ziel für zukünftige Arbeiten mit den Hdr-ähnlichen Proteinen darin besteht, den gesamten Komplex aufzureinigen, könnte die Generierung einer Deletionsmutante ohne Hden\_0682 eine mögliche Strategie darstellen, eine verstärkte Bildung des Hdr-ähnlichen Systems zu erreichen. Im Fall von biotechnologisch relevanten Mikroorganismen wie *Metallosphaera* spp. oder *Acidithiobacillus* spp. liegt kein Gen für einen Regulator in der Nähe der *hdr*-ähnlichen Gene. Dies ist nicht verwunderlich, da Spezies aus beiden Genera für ihre Fähigkeit zum lithotropen Wachstum mit reduzierten Schwefelverbindungen bekannt sind (Dahl, 2017). Es

wäre denkbar, durch das Einbringen weiterer Kopien des *hdr*-ähnlichen Genclusters *in trans* unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors die Kapazität zur Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen entsprechender Organismen zu erhöhen. Dies könnte für biotechnologische Anwendungen wie Bioleaching oder die Reinigung von Industrieabwässern genutzt werden. Dass ein solches Projekt grundsätzlich möglich ist, konnte durch die Experimente mit der *in trans* komplementierten  $\Delta$ *hdr*-Mutante (*H. denitrificans*  $\Delta$ *hdr*<sup>+</sup>) demonstriert werden.

Die Relevanz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ist vielschichtig. Mit dem erstmaligen genetischen Nachweis der Funktion eines Hdr-ähnlichen Komplexes im Rahmen des oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus wurde eine wichtige Erkenntnis gewonnen, die bei zukünftigen Analysen von mikrobiellen Gemeinschaften eine Rolle spielen wird. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden bei der Analyse der mikrobiellen Diversität von Umweltproben in der Regel Gene aus dem *dsr*-Gencluster (Sulfit-Reduktase, *dsrAB*) bzw. die jeweiligen Proteine als Marker für den dissimilatorischen Schwefelmetabolismus verwendet (Loy *et al.*, 2009; Anantharaman *et al.*, 2016; Anantharaman *et al.*, 2018; Hausmann *et al.*, 2018; Probst *et al.*, 2018). Zukünftig muss die Liste der physiologischen Marker um das Hdr-ähnliche System ergänzt werden. In einer aktuellen Studie wurde durch die Verwendung von Hdr-ähnlichen Proteinen als Marker bereits verschiedenen Prokaryonten, für die noch kein oxidativer dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel bekannt war, ein Hdr-ähnlicher Weg der Schwefeloxidation zugeordnet (Koch & Dahl, 2018). Die hohe Diversität der Habitate, in denen Mikroorganismen mit einem vollständigen *hdr*-ähnlichen Genlocus gefunden werden konnten (unterirdische Ökosysteme, Grundwässer, terrestrische und marine Sedimente, Kläranlagen), zeigt, dass Hdr-ähnliche Komplexe ubiquitär eine Rolle innerhalb des biogeochemischen Schwefelkreislaufs spielen (Koch & Dahl, 2018). Die Tatsache, dass das Hdr-ähnliche System in einem Organismus sowohl in die Degradation von anorganischen Schwefelverbindungen wie Thiosulfat als auch in die von organischen wie DMS involviert ist, ist in der Literatur in dieser Form bisher nicht dokumentiert. Damit stellen Organismen wie *Hyphomicrobium X* oder *Hyphomicrobium EG* eine aktive Verbindung zwischen dem organischen und dem anorganischen Schwefelkreislauf dar. Zudem schließt das zuvor skizzierte Modell eines Hdr-ähnlichen Komplexes, der Sulfanschwefel zu Sulfonschwefel oxidiert, die Lücken im Rahmen des Schwefelstoffwechsels von zahlreichen biotechnologisch relevanten Mikroorganismen wie *Metallosphaera*- oder *Acidithiobacillus*-Spezies.

### **5.3 Zusammenhänge zwischen der Struktur, den Redoxpotentialen und möglichen Funktionen in Hdr-ähnlichen Proteinen**

Die HdrA-Untereinheit (Hden\_0691) des Hdr-ähnlichen Komplexes aus *Hyphomicrobium X*<sup>T</sup> konnte erfolgreich produziert und aufgereinigt werden (Abb. 39). Die spektralen Eigenschaften des aufgereinigten Proteins im oxidierten Zustand zeigten, dass das rekombinante Protein ein FAD als Cofaktor gebunden hatte (Abb. 39). Die hierbei im UV/Vis-Spektrum verzeichnete Schulter im Absorptionsbereich zwischen 600 nm und 650 nm, die durch eine schrittweise Oxidation des Proteins

ausgeblichen wurde (Abb. 41), ist charakteristisch für ein protoniertes FAD-Semichinon-Radikal (Massey & Palmer, 1966; Liu *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2013). Die spontane Ausbildung eines stabilen Semichinon-Radikals ohne eine vorangegangene spezielle Behandlung des Proteins zur Erzeugung eines Semichinons steht in Widerspruch zum Konzept der Flavin-basierten Elektronen-Bifurkation, die ein hochreaktives und damit instabiles Semichinon-Radikal postuliert (Nitschke & Russell, 2012; Buckel & Thauer, 2013, 2018). Für die kürzlich kristallisierten HdrABC-MvhAGD-Komplexe aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus* und *Methanothermobacter wolfeii* wird angenommen, dass der FAD-Cofaktor in der HdrA-Untereinheit als Chinon stabil und als Hydrochinon relativ stabil vorliegen muss, während das protonierte Semichinon-Radikal kurzlebig und damit via UV/Vis-Spektroskopie nicht messbar ist (Wagner *et al.*, 2017). Kürzlich ist es gelungen, durch eine Redox titration mit der bifurkierenden NADH-abhängigen Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase Nfn die Ausbildung eines stabilen FAD-Semichinons durch UV/Vis-Spektroskopie zu dokumentieren (Lubner *et al.*, 2017). Für potentiell bifurkierende Proteine im Zustand ‚wie isoliert‘, wie es nun erstmals im Fall von Hden\_0691 dokumentiert werden konnte (Abb. 39, 40, 41), war dies bisher nicht bekannt. Umso erstaunlicher war es, dass der FAD-Cofaktor von Hden\_0691 während der Redox titration zur Bestimmung des Redoxpotentials kein stabiles Semichinon ausbildete (Abb. 43). Die dokumentierten Messwerte deuteten hierbei darauf hin, dass das FAD in einem zwei Elektronen übertragenden Schritt direkt vom Chinon zum Hydrochinon reduziert wird. Das ermittelte Redoxpotential für den FAD-Cofaktor liegt mit -218 mV nur unwesentlich unterhalb des Wertes für freies FAD unter Standardbedingungen (-220 mV (Thauer *et al.*, 1977)). Für das bifurkierende L-FAD aus Nfn ist mit -276 mV (Chinon/Hydrochinon) ein deutlich negativeres Redoxpotential dokumentiert (Lubner *et al.*, 2017). Es ist bekannt, dass bei freiem FAD in wässriger Lösung die Reduktion des Semichinons zum Hydrochinon ein positiveres Redoxpotential als die Reduktion des Chinons zum Semichinon aufweist (Vogt *et al.*, 2014). Entsprechend ist lediglich das komplett oxidierte Chinon oder das doppelt reduzierte Hydrochinon stabil, wohingegen proteingebundenes FAD ein stabiles Semichinon ausbilden kann (Massey & Palmer, 1966). In Kombination mit der Tatsache, dass bei der Bestimmung des Redoxpotentials einige der gemessenen Werte von den theoretisch erwarteten Werten abwichen, kann das Ergebnis der Redox titration als fraglich angesehen werden. Bei der Redox titration des FAD-Cofaktors, die von Dr. Sofia S. Venceslau (ITQB, Universidade Nova des Lisboa, Oeiras/Portugal) durchgeführt wurde, wurden Proteinproben eingesetzt, die zuvor bereits einem wiederholten Einfrier- und Auftauprozess unterzogen waren. Eine derartige Behandlung von Proteinen führt nicht selten zur Präzipitation oder dem Verlust von Cofaktoren. Entsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass die bei der Redox titration verfolgte Absorption von FAD bei 456 nm auch durch freies FAD in der Probenlösung verursacht wurde. Eine Wiederholung der Redox titration mit einer frischen Proteinpräparation sollte die angesprochenen Unsicherheiten beseitigen können. Wenn hierbei ebenfalls ein Hinweis auf die Ausbildung eines stabilen Semichinons gefunden wird, würde dies die These untermauern, dass Hden\_0691 keine Elektronen-Bifurkation vollzieht.

Ein direkter Vergleich mit anderen HdrA-Untereinheiten aus Hdr-ähnlichen Komplexen aus Sulfurikanten ist nicht möglich. Für den aufgereinigten Hdr-ähnlichen Komplex aus *Aquifex aeolicus* ist bekannt, dass dieser nach Abschluss der Aufreinigung sämtliche prosthetischen Gruppen verloren hat und keine spektralen Eigenschaften mehr aufwies (Boughanemi *et al.*, 2016). Im Rahmen der gleichen Arbeit wurde zudem HdrA aus *A. aeolicus* rekombinant in *E. coli* produziert und aufgereinigt, wobei auch hier keine Informationen zu den spektralen Eigenschaften des Proteins verfügbar sind.

Weitere Hinweise darauf, dass HdrA aus Hdr-ähnlichen Komplexen keine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation katalysiert, ergibt der direkte Vergleich zwischen HdrA aus *Hyphomicrobium X* (xHdrA) und dem HdrA aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus* (mHdrA). Alignments zwischen xHdrA und mHdrA zeigen, dass in der Aminosäuresequenz von xHdrA fünf der sechs Eisen-Schwefelcluster-Bindemotive von mHdrA und damit sowohl die N-terminale Domäne, die C-terminale Ferredoxin-Domäne als auch die inserierte Ferredoxin-Domäne fehlen (Koch & Dahl, 2018). Die N-terminale und die inserierte Ferredoxin-Domäne werden als essentiell für die Elektronen-Bifurkation im HdrABC-MvhAGD-Komplex angesehen (Wagner *et al.*, 2017). Damit ist das Fehlen dieser Domänen in xHdrA ein Hinweis darauf, dass das Enzym eine strukturell andere Reaktion katalysiert. Diese These wird unterstützt durch die Umgebung des funktionell wichtigen Stickstoffs 5 (N5) des Isoalloxazinrings in xHdrA (Abb. 45 A, B). Da N5 überwiegend von negativ geladenen Aminosäuren umgeben ist, kann das Wassermolekül, das mit N5 interagiert, deprotoniert vorliegen. Ein deprotoniertes Wassermolekül würde vorzugsweise mit einem protonierten N5 von einem neutralen protonierten Semichinon-Radikal oder einem vollständig reduzierten anionischen Hydrochinon interagieren (Abb. 45 B). Dies stellt einen Gegensatz zur Situation in mHdrA dar, wo N5 mit dem positiv geladenen Lysin  $\alpha$ 409 interagiert und das FAD bevorzugt im oxidierten ungeladenen Chinon-Zustand vorliegt (Wagner *et al.*, 2017). Zudem zeigte die Struktur, dass in xHdrA das Aspartat323 anstelle des Lysins  $\alpha$ '524 in mHdrA der direkten Umgebung der N2-C=O1-Gruppe eine negativere Ladung verleiht. Dies würde ein FAD im Zustand eines neutralen protonierten Semichinon-Radikals im Gegensatz zu einem negativ geladenen Hydrochinon stabilisieren. Die daraus resultierende Ausbildung eines stabilen neutralen protonierten Semichinons konnte durch UV/Vis-Spektroskopie verifiziert werden (Abb. 41). Eine Konsequenz dieser Situation ist, dass sich für den FAD-Cofaktor in xHdrA im Vergleich zu mHdrA wahrscheinlich ein höheres Redoxpotential für das Redoxpaar ‚Chinon/neutralen protoniertes Semichinon-Radikal‘ ergibt. Zudem kann ein negatives Redoxpotential für das Redoxpaar ‚neutralen protoniertes Semichinon/Hydrochinon‘ angenommen werden. Zusammengefasst deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass die Struktur des Proteins dazu beiträgt, den FAD-Cofaktor im Zustand eines neutralen protonierten Semichinons zu stabilisieren. Dies spricht gegen ein bifurkierendes xHdrA.

Die Thioredoxin-Domäne von mHdrA koordiniert ein 4Fe-4S-Clutser (HA4) über ein konserviertes Motiv aus vier Cysteinen (4C-Motiv) (Wagner *et al.*, 2017). Die HdrA-Untereinheit aus Hdr-ähnlichen Komplexen in Sulfurikanten weist eine hohe Ähnlichkeit zur Thioredoxin-Domäne von auf, inklusive des konservierten 4C-Motives (Koch & Dahl, 2018). Entsprechend wurde vermutet, dass das Sulfurikanten-HdrA ebenfalls ein Eisen-Schwefel-Cluster besitzt. Die durchgeführten kolorimetrischen Eisen- und Schwefelbestimmungen in Kombination der UV/Vis-Spektroskopie ermöglichten einen qualitativen Nachweis eines Eisen-Schwefel-Clusters in rekombinantem Hden\_0691 (Abb. 39). Die Ergebnisse der EPR-Spektroskopie (Abb. 42) in Kombination mit der Struktur (Abb. 44, 45) verifizierten diese Beobachtung und zeigten, dass es sich hierbei um ein 4Fe-4S-Clutser mit einem Redoxpotential von 194 mV (+/- 2,8 mV) handelt. Unter der Annahme, dass das für den FAD-Cofaktor von Hden\_0691 ermittelte und zuvor bereits diskutierte Redoxpotential von -218 mV annäherungsweise stimmt, kann ein Elektronenfluss vom FAD zum FeS-Cluster angenommen werden. In mHdrA werden Elektronen während des exergonen Elektronenflusses der Bifurkation ebenfalls vom FAD auf das in der Thioredoxin-Domäne koordinierte 4Fe-4S-Clutser (HA4) und dann via HdrC auf HdrB übertragen (Wagner *et al.*, 2017). Eine ähnliche Situation wäre auch innerhalb eines Hdr-ähnlichen Komplexes in Sulfurikanten denkbar, wobei hier die Schwierigkeit besteht, dass zwei sehr ähnliche HdrC-ähnliche Proteine (HdrC1/HdrC2) und zwei sehr unterschiedliche HdrB-ähnliche Proteine (HdrB1/HdrB2) vorliegen.

Eine grundsätzliche Frage, die sich aus der Analyse von rekombinantem xHdrA ergibt, ist die nach der Funktion des FAD-Cofaktors in einem nicht bifurkierenden Komplex. Im Nfn-Komplex sind zwei FAD-Cofaktoren vorhanden, einer in Nfn-L und ein weiterer in Nfn-S, wobei das FAD in Nfn-L (L-FAD) eine Elektronen-Bifurkation vollzieht und das in Nfn-S (S-FAD) Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  überträgt (Lubner *et al.*, 2017). Entsprechend wäre es möglich, dass der FAD-Cofaktor in xHdrA ebenfalls in die Übertragung von Elektronen auf Redox-Carrier involviert sein könnte. Das ermittelte vorläufige Redoxpotential von -218 mV würde allerdings keine Übertragung von Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  erlauben.

Die Ergebnisse, die durch die Analyse von rekombinantem xHdrA gewonnen werden konnten, eröffnen Fragestellungen für zukünftige Projekte. Durch die Etablierung eines Protokolls zur heterologen Produktion eines Eisen-Schwefel-Flavoproteins ergibt sich Möglichkeit, das Protokoll bzw. eine abgewandelte Form von diesem zur Produktion weiterer Hdr-ähnlicher Proteine zu nutzen. Im Erfolgsfall könnten so die übrigen Untereinheiten des Hdr-ähnlichen Komplexes sowohl spektroskopisch als auch kristallografisch analysiert werden. Der Elektronenfluss innerhalb des Hdr-ähnlichen Systems stellt eine der zentralen Fragestellungen zum Verständnis der *in vivo* Funktion des Komplexes dar. Die Ermittlung der Redoxpotentiale der einzelnen prosthetischen Gruppen der verschiedenen Hdr-ähnlichen Proteine würde einen wichtigen Beitrag hierzu liefern. Zudem besteht die Möglichkeit, rekombinante Hdr-ähnliche Proteine in *in vitro* Enzymtests einzusetzen. Für den Hdr-

Komplex aus Methanogenen gibt es bereits etablierte *in vitro* Analysen zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität (Hedderich *et al.*, 1989), die ausreichend robust sind, um selbst in Schlamm aus Biogasanlagen eine Enzymaktivität nachzuweisen (Refai *et al.*, 2014). Es wäre denkbar, auch für den Hdr-ähnlichen Komplex geeignete *in vitro* Tests zu entwickeln. Basierend auf den Ergebnissen zur heterologen Expression des gesamten Hdr-ähnlichen Komplexes in *E. coli* (Abb. 25) erscheint es zudem möglich, alle im *hdr*-ähnlichen Gencluster kodierten Proteine in einem einzelnen Ansatz zu produzieren. Ob die hierbei gebildeten Proteine in *E. coli* einen Komplex bilden, konnte bisher nicht gezeigt werden. Eine Möglichkeit, diese Fragestellung zu adressieren, bestünde darin, an eines der Hdr-ähnlichen Proteine ein Tag für eine Affinitätschromatographische Aufreinigung zu fusionieren, um über dieses den gesamten Komplex aufzureinigen. Da es möglich war, den Phänotyp von *H. denitrificans*  $\Delta$ *hdr* durch eine Komplementation zu retten, formen zumindest in *Hyphomicrobium X* die durch die Plasmidexpression gebildeten rekombinanten Proteine einen funktionellen Komplex.

Wie unter 4.1.3 ausgeführt, wurde ein ‚*H. denitrificans* knock-in‘ ein Stamm generiert, bei dem die Gene für *hdrB1* und *hdrA* gegen Kopien ausgetauscht wurden, die die kodierenden Sequenzen für ein Strep- bzw. ein His-tag enthalten. Da das Hdr-ähnliche System essentiell für die Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat in *Hyphomicrobium X* ist (Abb. 28) und spezifisch während des Wachstums mit Thiosulfat als Substrat exprimiert wird (Abb. 24), besteht die Möglichkeit, *H. denitrificans* knock-in mit Thiosulfat zu kultivieren und so größere Mengen an Zellmasse zu gewinnen, die den Hdr-ähnlichen Komplex mit Tags für eine Affinitätschromatographische Aufreinigung enthält. Dieser könnte dann weiterführend – wie zuvor beschrieben – spektroskopisch, kristallografisch und kinetisch analysiert werden.

Für die dissimilatorische Sulfit-Reduktase DsrAB ist bekannt, dass das Enzym in Sulfurikanten eine essentielle Rolle in der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen spielt (Pott & Dahl, 1998), während es in Desulfurikanten eine entgegengesetzte Reaktion katalysiert (Santos *et al.*, 2015). Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der Literatur die Theorie vertreten wird, dass das Hdr-ähnliche System einen funktionellen Ersatz des Dsr-Systems in Sulfurikanten darstellt (Liu *et al.*, 2014; Venceslau *et al.*, 2014; Dahl, 2015; Boughanemi *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2018; Koch & Dahl, 2018), ergibt sich die Frage, ob dies auch in Desulfurikanten der Fall sein könnte. Die Ergebnisse aus den Analysen von rekombinantem HdrA deuten darauf hin, dass ein Hdr-ähnlicher Komplex in Sulfurikanten vermutlich keine Elektronen-Bifurkation katalysiert. Da eine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation irreversibel wäre, besteht in einem Modell mit einem nicht bifurkierenden Hdr-ähnlichen System zumindest die theoretische Möglichkeit, dass der Komplex auch eine Reduktion von oxidierten Schwefelverbindungen katalysieren könnte. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnten allerdings noch keine *hdr*-ähnlichen Gene in einem Desulfurikanten nachgewiesen werden.

#### 5.4 Oxidativer dissimilatorischer Schwefelstoffwechsel in *Hyphomicrobium denitrificans* EG

Für *Hyphomicrobium denitrificans* EG ist in der Literatur ein oxidativer dissimilatorischer Schwefelmetabolismus mit anorganischen und organischen Schwefelverbindungen beschrieben (Suylen *et al.*, 1986; Suylen & Kuenen, 1986). Da die Sequenz des Genoms des Organismus nicht öffentlich verfügbar ist, sind die involvierten Enzyme weitestgehend unbekannt. In dieser Arbeit konnte nun erstmals eine Analyse des genetischen Potentials des Organismus zur Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen durchgeführt werden (4.2.1). *Hyphomicrobium* X und *Hyphomicrobium* EG wiesen nur wenige Unterschiede hinsichtlich ihrer potentiellen enzymatischen Ausstattung auf (Tab. 15 und 20). Die Daten aus der vergleichenden Proteom-Analyse (Tab. 21–23) deuteten ebenfalls auf eine große Ähnlichkeit zwischen dem Schwefelmetabolismus in *Hyphomicrobium* EG und dem in *Hyphomicrobium* X hin. Als ein wesentlicher Unterschied konnte eine potentielle Sulfitoxidase vom SorAB-Typ (HdeA00734/00733) bei *Hyphomicrobium* EG, die in *Hyphomicrobium* X fehlt, ausgemacht werden. Allerdings wurden weder SorA noch SorB in der Proteom-Analyse detektiert (Tab. 21). Damit steht der Nachweis, dass die Proteine während der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen exprimiert werden, noch aus. Der EG-Stamm verfügt mit HdeA00762 und HdeA00789 über zwei potentielle Methanthioloxidasen (Tab. 20). Auffällig ist, dass HdeA00789 kein für Methanthioloxidasen vom MtoX-Typ typisches Signalpeptid (Sec-abhängig) aufweist. Da das Protein auch über kein Signalpeptid für einen Tat-abhängigen Transport in das Periplasma verfügt, kann von einer cytoplasmatischen Lokalisation ausgegangen werden. Dies ist ungewöhnlich, da Methanthioloxidasen bisher als periplasmatische Proteine beschrieben wurden (Eyice *et al.*, 2018). Zudem ergibt sich die Frage, welche der beiden Methanthioloxidasen im Rahmen der Arbeiten von Suylen (Suylen *et al.*, 1987) aufgereinigt und biochemisch charakterisiert wurde. Die vergleichende Proteomik zeigte, dass beide Proteine beim Wachstum mit DMSO als Substrat signifikant häufiger im Proteom gefunden werden konnten (Tab. 21). Damit ist es wahrscheinlich, dass beide Proteine eine physiologische Relevanz besitzen.

*Hyphomicrobium* EG ist als Organismus beschrieben, der methylierte Schwefelverbindungen bei hohen Substratkonzentrationen stöchiometrisch zu Sulfat oxidiert (Suylen *et al.*, 1986; Suylen & Kuenen, 1986). Ausgehend von DMS oder DMSO als Substrat ist bei diesem Stoffwechselweg der von der Methanthioloxidase katalysierte Schritt geschwindigkeitsbestimmend (Suylen *et al.*, 1987; Eyice *et al.*, 2018). Zwei MTOs in unterschiedlichen Zellkompartimenten könnten einen Anpassungsmechanismus zur effizienten Metabolisierung von methylierten Schwefelverbindungen durch den EG-Stamm darstellen.

Die initialen Schritte zu Degradation von methylierten Schwefelverbindungen sind auch für *Hyphomicrobium* EG unklar. Der EG-Stamm verfügt über keine Gene für eine klassische respiratorische DMSO-Reduktase (DMS R) vom DmsABC-Typ. Das für die Reduktion von DMSO zu DMS verantwortliche Enzym konnte zwar bereits aufgereinigt werden (Hatton *et al.*, 1994), die



Sequenz und damit das kodierende Gen sind aber unbekannt. Das Enzym, das wie die respiratorische DMSO R aus *Rhodobacter capsulatus* (McEwan *et al.*, 1985) im Periplasma lokalisiert ist, besitzt als Monomer eine Größe von rund 80 kDa und eine Kreuzreaktivität mit einem spezifischen Antikörper gegen die DMSO R aus *R. capsulatus* (Hatton *et al.*, 1994). Entsprechend hätte erwartet werden können, dass bei der vergleichenden Proteomik ein periplasmatisches Protein mit einer ähnlichen Größe identifiziert werden könnte, das während des Wachstums mit DMSO als Substrat häufiger in den Zellen vorkommt. Dies war jedoch nicht der Fall. Keines der gefundenen Proteine erfüllte die skizzierten Anforderungen. Hierfür können zwei Ursachen in Frage kommen. Es wäre möglich, dass die DMSO-Reduktase in *Hyphomicrobium* EG konstitutiv exprimiert wird und die Häufigkeit des Proteins nicht signifikant verändert vorlag. Zellfreie Extrakte von *Hyphomicrobium* EG, das mit schwefelfreien Substraten kultiviert wurde, besitzen eine DMSO-Reduktase-Aktivität (Suylén *et al.*, 1986). Das deutet auf eine konstitutive Expression des Proteins hin. Da ebenfalls gezeigt werden konnte, dass zellfreie Extrakte von mit DMSO kultivierten Zellen eine höhere DMSO-Reduktase-Aktivität aufweisen (Suylén *et al.*, 1986), sollte sich dies auch in einer verstärkten Expression der DMSO R und damit im Proteom widerspiegeln. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Veränderungen der DMSO-Reduktase-Aktivität auf einer Regulation auf Proteinebene beruhen. Die zweite Möglichkeit könnte mit der tatsächlichen subzellulären Lokalisation des Proteins in Verbindung stehen. Es wird spekuliert, dass die DMSO R in *Hyphomicrobium* EG, ähnlich wie in *R. capsulatus*, an eine protonentranslozierende Atmungskette gekoppelt ist (Hatton *et al.*, 1994). Eine Assoziation des Proteins an die Cytoplasmamembran könnte dazu führen, dass das Protein bei der Proteom-Analyse mit Ganzzellprotein ohne zusätzliche Solubilisierung nicht detektiert werden konnte. DMSO ist für *Hyphomicrobium* EG kein alternativer Elektronenakzeptor, da das durch die DMSO-Reduktase gebildete DMS weiter metabolisiert wird. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass DMSO R eine respiratorische Funktion besitzt.

Mit HdeA00819 verfügt der EG-Stamm über ein 77 kDa großes Protein mit Ähnlichkeiten (40,2 %) zu DmsA aus *E. coli* (Tab. 20) und DMSO R aus *R. capsulatus* (38,2 %). Das Protein wurde zusätzlich im DMSO-Proteom mit einem log<sub>2</sub> fold change von 2,3 sehr signifikant häufiger gefunden (Tab. 21). Allerdings besitzt HdeA00819 weder ein Sec- noch ein Tat-Signalpeptid, weshalb von einer cytoplasmatischen Lokalisation ausgegangen werden kann. Die hohe Ähnlichkeit zur DmsA-Untereinheit der respiratorischen DMSO R aus *E. coli* in Kombination mit dem gleichzeitigen Fehlen von *dmsB*- und *dmsC*-Homologen in *Hyphomicrobium* EG deutet darauf hin, dass HdeA00819 eine neuartige lösliche cytoplasmatische DMSO R sein könnte. Diese würde zusätzlich zu der von Hatton beschriebenen periplasmatischen DMSO R die cytoplasmatische Reduktion von DMSO zu DMS katalysieren. Ähnlich wie zuvor für die in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisierten Methanthioloxidasen angenommen, könnte das Vorhandensein von zwei unabhängigen Systemen zur Reduktion von DMSO in *Hyphomicrobium* EG eine Form der Adaption zur effizienten Umsetzung methylierter Schwefelverbindungen darstellen.

Die putative DMS-Monooxygenase (DMS MO) in *Hyphomicrobium* EG ist ebenfalls unbekannt. Das Genom des Organismus beinhaltet keine Gene für eine DMS MO vom DmoAB-Typ (Boden *et al.*, 2011). Allerdings konnten verschiedene andere Proteine identifiziert werden, die als putative DMS MO fungieren könnten. Für *Hyphomicrobium* X wurde, wie unter 5.2 näher erläutert, Hden\_0730 als potentielle DMS-Monooxygenase vorgeschlagen. Der EG-Stamm besitzt mit HdeA00805 ein Homolog zu Hden\_0730 (82,2 % Ähnlichkeit, Abb. 53), das mit einem log<sub>2</sub> fold change von 3 höchstsignifikant häufiger im DMSO-Proteom gefunden wurde (Tab. 21). Somit könnte das Protein in *Hyphomicrobium* EG die Funktion einer DMS-Monooxygenase übernehmen. Als weiterer Kandidat für die Rolle einer DMS MO kommt im EG-Stamm HdeA00801, ein Homolog zur DsoF-Untereinheit der DMS-Oxidase aus *Acinetobacter* sp. strain 20B, in Frage (Tab. 20). Das cytoplasmatisch lokalisierte HdeA00801 besitzt eine Ähnlichkeit von 40,4 % zu DsoF und weist sowohl die im N-Terminus liegenden konservierten Cysteine zur Bindung eines FeS-Clusters als auch die im Mittelteil des Proteins lokalisierte FAD-Bindedomäne auf (Abb. 54). HdeA00801 liegt im Genom zusammen mit vier weiteren Genen in der gleichen Leserichtung in einem putativen Gencluster (HdeA00804-800, Abb. 55). In der vergleichenden Proteom-Analyse konnten vier der in diesem Gencluster kodierten Proteine sehr signifikant häufiger mit log<sub>2</sub> fold changes zwischen 2,2 und 3,4 im DMSO-Proteom gefunden werden. Damit kann auch für *Hyphomicrobium* EG die Hypothese aufgestellt werden, dass diese Proteine einen funktionalen Komplex bilden, der in die cytoplasmatische Umsetzung von DMS involviert ist.

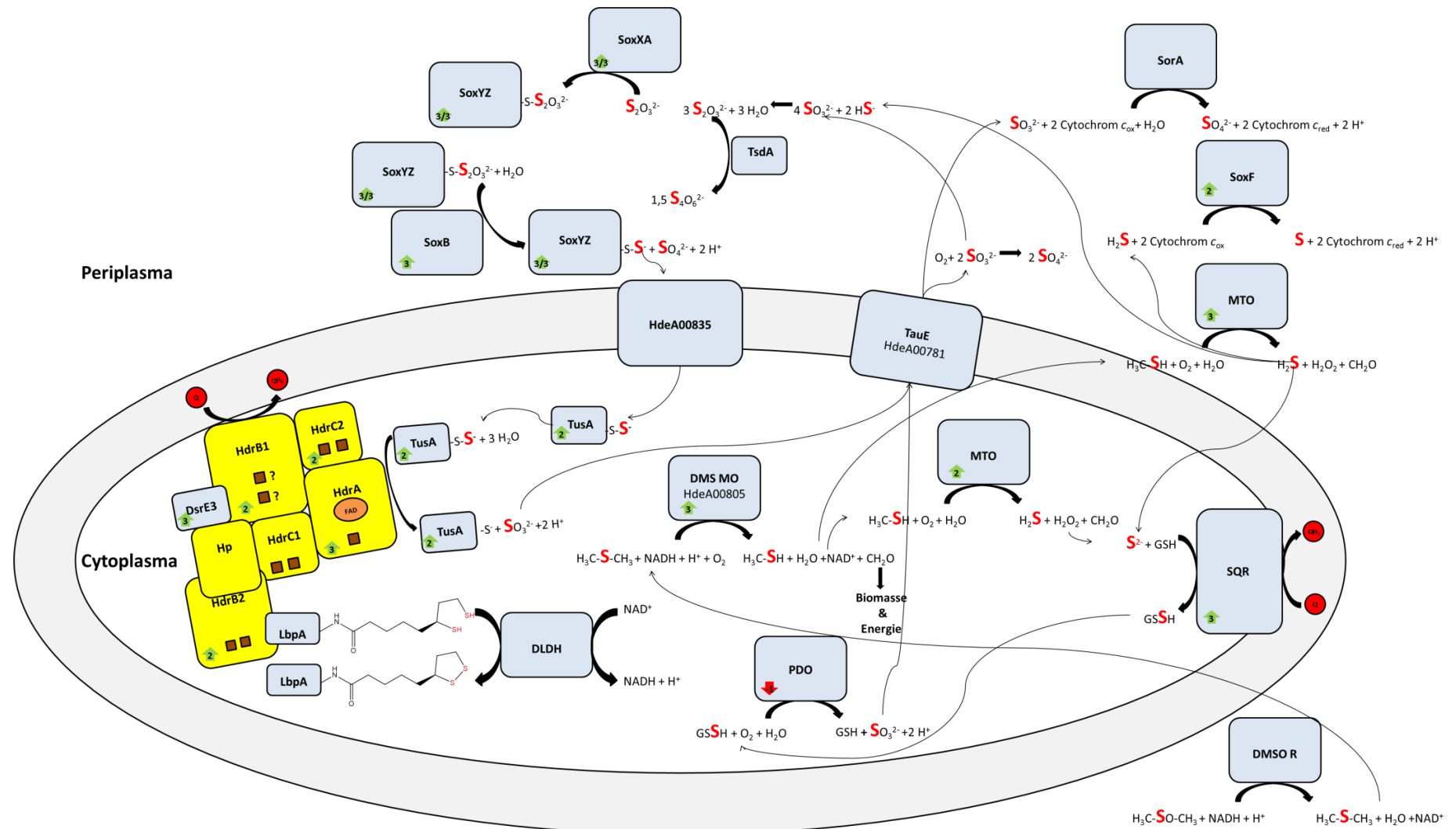
Abgesehen von den zuvor angesprochenen Unterschieden legen die Ergebnisse der bioinformatischen Untersuchung und der vergleichenden Proteomik nahe, dass die Oxidation des Schwefels aus organischen oder anorganischen Substraten im EG-Stamm analog zum unter 5.2 beschriebenen Modell für *Hyphomicrobium* X über eine Kombination aus einem unvollständigen Sox-System und einem Hdr-ähnlichen System bewerkstelligt wird.

Ein Vergleich der Proteom-Analyse von *Hyphomicrobium* X mit jener von *Hyphomicrobium* EG zeigte, dass die Anzahl der signifikant veränderten Proteine unterschiedlich war. Während beim EG-Stamm 74 % der in allen drei biologischen Replikaten pro Wachstumsbedingung detektierten Proteine eine mindestens signifikante Veränderung der Proteinhäufigkeit zeigten, waren es beim X-Stamm 34 %. Dies erscheint überraschend, da mit Ausnahme der initialen Schritte zur Reduktion von DMSO zu DMS für beide Organismen ein ähnlicher Stoffwechselweg postuliert wird. Einen möglichen Erklärungsansatz für diese Beobachtung liefert die exemplarische Betrachtung eines regulierten Proteins.

HdeA03305 zählte zu den Proteinen mit den höchsten negativen log<sub>2</sub> fold changes im DMSO-Proteom (Tab. 23). Das Protein, das als ribosomales Protein L17 annotiert ist, wird in einer Region des Genoms kodiert, in der weitere putative ribosomale Proteine kodiert werden. Zwischen den Genen HdeA03269 bis HdeA03305 werden insgesamt 26 Proteine kodiert, die gemäß der Annotation

ribosomale Proteine sind und im DMSO-Proteom negative log<sub>2</sub> fold changes aufwiesen (Tab. 24). Die hierbei verzeichneten Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten waren bei 23 der Proteine sehr signifikant. Diese legt nahe, dass in den mit DMSO kultivierten Zellen zum Zeitpunkt der Proteom-Analyse ebenfalls weniger Ribosomen vorhanden waren. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die mit DMSO kultivierten Zellen zum Zeitpunkt der Proteom-Analyse in einer anderen Wachstumsphase als die mit DMA kultivierten Zellen befanden. Für *E. coli* ist bekannt, dass es während des Übergangs aus der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase 100S-Ribosomen bildet, die aus Dimeren der 70S-Ribosomen bestehen (Wada *et al.*, 1990). Diese Dimere liegen bis zu 2,5 Tage nach dem Erreichen der stationären Phase im Cytoplasma vor und werden dann erst zu 70S-Ribosomen zerlegt, die nachfolgend komplett abgebaut werden (Wada *et al.*, 2000). Wenn für *Hyphomicrobium* EG eine vergleichbare Situation vorliegt, sollte eine Degradation von Ribosomen erst in der späten stationären Wachstumsphase zu erwarten sein. Die für die Proteom-Analyse herangezogenen Kulturen befanden sich alle in der exponentiellen Wachstumsphase. Entsprechend ist es unwahrscheinlich, dass die beobachteten verringerten relativen Proteinhäufigkeiten für verschiedene ribosomale Proteine im DMSO-Proteom auf die Wachstumsphase zurückgeführt werden können. Ein zweiter Erklärungsansatz beruht auf der Spezialisierung von *Hyphomicrobium* EG auf die Metabolisierung von methylierten Schwefelverbindungen. Der überwiegende Teil der bis heute beschriebenen Spezies aus dem Genus *Hyphomicrobium* kann mit Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, *Hyphomicrobium* EG hingegen nicht (Suylén & Kuenen, 1986). Ein Wachstum mit methylierten Aminen als Substrat ist zwar möglich, methylierte Schwefelverbindungen stellen aber das präferierte Substrat des Organismus dar, was sich auch in der konstitutiven Expression der für den Abbau benötigten Enzyme ausdrückt (Suylén *et al.*, 1986). Die Ergebnisse der vergleichenden Proteomik bestätigen diese Theorie. Im DMSO-Proteom waren 493 Proteine signifikant häufiger zu finden (32 % aller detektierten Proteine), während es im DMA-Proteom 644 waren (42 %, 4.2.2). Wenn die beschriebenen starken Veränderungen im Proteom einen größeren Bedarf an Kapazitäten zur Translation zur Folge haben, könnte dies die beobachteten Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten der ribosomalen Proteine erklären.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der bioinformatischen Untersuchung des Genoms (4.2.1), der vergleichenden Proteom-Analyse und der Daten, die in der Literatur zum Schwefelstoffwechsel des Organismus bekannt sind, wurde ein Modell für den oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium* EG entwickelt (Abb. 48).

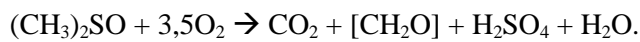


**Abb. 48: Thiosulfat- und DMSO-Stoffwechsel in *Hyphomicrobium* EG.** Normalisierte und statistisch relevante (p-Wert  $\leq 0,05$ ) Veränderungen der relativen Proteinhäufigkeiten (DMSO/DMA logarithmiert zur Basis 2, gerundet auf ganze Zahlen) werden mit grünen Pfeilen angegeben. Mögliche prosthetische Gruppen bei den Hdr-ähnlichen Proteinen: braune Vierecke = [4Fe-4S]; orange Ovale = FAD. Abkürzungen: DMSO R = DMSO-Reduktase; DMS MO = DMS-Monooxygenase; DLDH = Dihydrolipoyl-Dehydrogenase; LbpA = Lipoylbindeprotein; MTO = Methanthioloxidase; PDO = Persulfidoxysgenase; SorA = Sulfitoxidase; SQR = Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase; TsdA = Thiosulfatdehydrogenase; Q = Chinon-Pool.

Der oxidative dissimilatorische Schwefelmetabolismus in *Hyphomicrobium* EG mit DMSO als Substrat beginnt mit der initialen Reduktion von DMSO zu DMS (Suylen *et al.*, 1986; Suylen & Kuenen, 1986). Diese Reaktion wird von einer periplasmatischen DMSO-Reduktase (DMSO R) katalysiert (Hatton *et al.*, 1994). Nachfolgend wird DMS von einer DMS-Monooxygenase (DMS MO) zu Methanthiol und Formaldehyd umgesetzt. Letzteres kann zur Energiegewinnung zu CO<sub>2</sub> oxidiert oder über den Serin-Weg assimiliert werden. Das katalytisch aktive Enzym ist nicht charakterisiert. Das cytoplasmatisch lokalisierte HdeA00805 wird als Kandidat vorgeschlagen. Die weitere Oxidation des Schwefels wird in *Hyphomicrobium* EG durch eine Methanthioloxidase (MTO) katalysiert. Das Enzym ist biochemisch charakterisiert (Suylen *et al.*, 1987) und die Aminosäure-Sequenz ist bekannt (Kassel-Çati, 1999). Mit HdeA00762 und HdeA00789 verfügt der Organismus über eine periplasmatische und eine cytoplasmatische MTO. Als Endprodukte der Katalyse entsteht Formaldehyd, das zur Energiegewinnung oxidiert oder aber assimiliert werden kann. Das ebenfalls gebildete Dihydrogensulfid kann nachfolgend über drei verschiedene Stoffwechselwege oxidiert werden. Der erste Weg basiert auf der Umsetzung von Sulfid zu elementarem Schwefel durch eine periplasmatische Sulfid-Dehydrogenase vom Flavocytochrom *c*-Typ (SoxF). Die bei der Reaktion freigesetzten Elektronen werden wahrscheinlich auf ein Cytochrom vom *c*-Typ übertragen, das diese in die Atmungskette einspeisen könnte. Es ist nicht beschrieben, ob *Hyphomicrobium* EG elementaren Schwefel als Substrat verwerten kann (Suylen *et al.*, 1986; Suylen & Kuenen, 1986). Entsprechend wird bei dem in Abb. 48 dargestellten Modell eine weitere Oxidation des durch SoxF freigesetzten Schwefels nicht berücksichtigt.

Die beiden anderen Wege der Oxidation des Sulfids verlaufen analog zu dem unter 5.2 beschriebenen Modell für *Hyphomicrobium* X (Abb. 47). Der erste Weg basiert auf einer Kombination einer Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase vom SqrB-Typ (HdeA00784) und einer cytoplasmatischen Persulfiddioxygenase (PDO, mehrere Homologe vorhanden). Das auf diese Weise durch die Sqr bei der Oxidation von Sulfid gebildete Glutathionpersulfid wird durch die PDO zu Sulfit oxidiert. Sulfit kann entweder durch die periplasmatische Sulfitoxidase (SorA, HdeA00734) aktiv zu Sulfat oxidiert werden, abiotisch mit Sauerstoff zu Sulfat oxidieren oder ebenfalls abiotisch mit Hydrogensulfid zu Thiosulfat reagieren. Der zweite Stoffwechselweg verläuft ebenfalls analog zum für *Hyphomicrobium* X beschriebenen Modell. Abiotisch entstandenes Thiosulfat wird im Periplasma durch das unvollständige Sox-System zu Sulfat und proteingebundenem Sulfanschwefel oxidiert. Ferner wäre, ausgehend vom Intermediat Thiosulfat, eine unvollständige Oxidation des Schwefels zu Tetrathionat durch eine Thiosulfatdehydrogenase vom TsdA-Typ möglich. Die vergleichende Proteomik (Tab. 21) und die in der Literatur beschriebene stöchiometrische Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat (Suylen *et al.*, 1986) zeigen, dass dieser Weg keine *in vivo* Relevanz besitzt. Der proteingebundene Sulfanschwefel wird wahrscheinlich auf einem bisher unbekanntem Weg ins Cytoplasma transportiert. In dem in Abb. 48 dargestellten Modell wird das zusammen mit TusA in einem potentiellen Operon direkt zwischen dem *sox*-Gencluster und dem *hdr*-ähnlichen Gencluster kodierte HdeA00835 als

potentieller Transporter vorgeschlagen. HdeA00835 könnte als Homolog zu Hden\_0699 als Schwefeltransporter fungieren. Nach dem Transport des proteingebundenen Sulfanschwefels in das Cytoplasma wird dieser durch den Hdr-ähnlichen Komplex zu Sulfit oxidiert. Es wird in diesem Fall postuliert, dass der Sulfanschwefel auf TusA (HdeA00836) übertragen wird und in dieser Form das Substrat für den Hdr-ähnlichen Komplex darstellt. Die hierbei freigesetzten Elektronen werden entweder in den Chinon-Pool eingespeist oder auf eine oxidierte proteingebundene Liponsäure (LbpA) übertragen. Letztere könnte dann in reduzierter Form durch eine Dihydrolipoyl-Dehydrogenase reoxidiert werden, wobei Reduktionsäquivalente in Form von NADH gebildet würden. Ausgehend von DMSO als Substrat kann der skizzierte Stoffwechselweg wie folgt stöchiometrisch dargestellt werden:



Das Modell für den oxidativen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus in *Hyphomicrobium* EG basiert auf bioinformatisch erhobenen und Proteom-Daten in Kombination mit Werten aus der Literatur. Um das Modell zu verifizieren, ist es nötig, den im Rahmen der Untersuchung von *Hyphomicrobium* X praktizierten Ansatz auf *Hyphomicrobium* EG zu übertragen und durch Analysen von Knock-out-Mutanten die Funktion einzelner Proteine zu klären. Die Grundvoraussetzung hierfür besteht darin, dass es gelingt, das genetische System für *Hyphomicrobium* X auf *Hyphomicrobium* EG zu übertragen.

Grundsätzlich ist *Hyphomicrobium* EG ein spannender potentieller Modellorganismus zur Erforschung des mikrobiellen oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels. Der Vorteil gegenüber *Hyphomicrobium* X besteht darin, dass der Organismus DMSO als Substrat in Konzentrationen bis zu 20 mM in kontinuierlicher Kultur und 10 mM in Batch-Kultur verstoffwechselt (Suylen *et al.*, 1986; Suylen & Kuenen, 1986). Im Vergleich zu DMS, das bei *Hyphomicrobium* X bereits ab Konzentrationen von 0,75 mM eine Wachstumsinhibierung bewirkte und mit einer Verdopplungszeit von 71 Tagen oder länger umgesetzt wird (Abb. 21), ist DMSO ein besser zu handhabendes Substrat. Es ist bei Raumtemperatur nicht flüchtig, weder reizend noch brennbar, mittels HPLC (Thumm *et al.*, 1991) oder GC (Suylen & Kuenen, 1986) zu quantifizieren und wird von *Hyphomicrobium* EG stöchiometrisch zu Sulfat oxidiert, wobei der Organismus dabei eine Verdopplungszeit von etwa 9 Stunden erreicht. Damit ist es in Batch- oder kontinuierlichen Kulturen möglich, größere Mengen an Zellmaterial von mit DMSO kultivierten Zellen zu erhalten (Suylen *et al.*, 1986). Insbesondere für das zukünftige Ziel, den gesamten Hdr-ähnlichen Komplex für potentielle biochemische Untersuchungen oder zu Kristallisation aus einem Originalorganismus aufzureinigen, wäre *Hyphomicrobium* EG damit eine Alternative zu *Hyphomicrobium* X.

Abseits der Erforschung des Hdr-ähnlichen Komplexes bietet *Hyphomicrobium* EG zudem die Möglichkeit, weitere Fragestellungen im Rahmen der Oxidation von Organoschwefelverbindungen zu untersuchen. Besonders hervorzuheben sind hierbei die bisher unbekannte potentielle DMS-

Monooxygenase sowie die ebenfalls noch nicht identifizierte DMS-bildende DMSO-Reduktase. Da abiotische Degradationsprodukte von DMS in der Atmosphäre als Wolken-Kondensationskeime einen nachgewiesenen Einfluss auf die globale Klimaentwicklung haben (Charlson *et al.*, 1987), besitzt ein neuartiges DMS-bildendes mikrobielles Enzym eine nicht zu unterschätzende Bedeutung für die Identifizierung von DMS-emittierenden Habitaten. Im Fall von *Hyphomicrobium* EG ist es unwahrscheinlich, dass die DMSO-Reduktase eine respiratorische Funktion besitzt. Es besteht aber die Möglichkeit, dass das betreffende Enzym in anderen Organismen eine respiratorische Funktion einnimmt. Um solche Organismen zu identifizieren und beispielsweise in Metagenomen Gene, die für eine solche DMSO-Reduktase kodieren, als Marker für eine potentielle DMS-Emission suchen zu können, muss zunächst das entsprechende Gen in *Hyphomicrobium* EG identifiziert werden.

## 6 Zusammenfassung

Heterodisulfidreduktase-Komplexe vom ABC-Typ koppeln in methanogenen Archaeen durch eine Flavin-basierte Elektronen-Bifurkation die endergone Reduktion von Ferredoxin mit der exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB. Hdr-ähnliche Komplexe mit einer potentiellen Involvierung in den mikrobiellen dissimilatorischen Schwefelmetabolismus sind in Desulfurikanten und Sulfurikanten bekannt. Basierend auf Transkriptom- und Proteom-Analysen wird postuliert, dass Hdr-ähnliche Systeme in Sulfurikanten eine Funktion im Rahmen der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen einnehmen und das Dsr-System funktionell ersetzen.

In Ermangelung eines Modellorganismus konnte diese Hypothese bisher nicht experimentell bewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Alphaproteobakterium *Hyphomicrobium denitrificans* X<sup>T</sup> als Modellorganismus zur Untersuchung der Rolle Hdr-ähnlicher Systeme etabliert. Ein genetisches System erlaubt eine gerichtete Mutagenese des Genoms des Organismus einschließlich der Generierung von Deletionsmutanten und deren Komplementierung *in trans*. Im Gegensatz zu vorherigen Berichten konnte für *Hyphomicrobium* X ein oxidativer dissimilatorischer Schwefelmetabolismus mit organischen und anorganischen Substraten nachgewiesen werden. Immunologische, Genom- und Proteom-Analysen belegten die Beteiligung eines Hdr-ähnlichen Systems. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte eine Deletionsmutante ohne funktionellen Hdr-ähnlichen Komplex nicht mehr mit Dimethylsulfid als Substrat wachsen. Während einer Co-Fermentation mit Methanol und Thiosulfat oxidierte die Mutante Thiosulfat nur unvollständig zu Tetrathionat und nicht vollständig zu Sulfat. Die Komplementierung *in trans* der Deletionsmutante mit einem kompletten *hdr*-ähnlichen Gencluster resultierte in einem wildtypischen Phänotyp und lieferte den erstmaligen genetischen Beweis für eine Beteiligung Hdr-ähnlicher Systeme an der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen.

Eine Deletionsmutante für das im erweiterten *hdr*-ähnlichen Gencluster kodierte Lipoatbindeprotein LbpA glich in ihrem Phänotyp der  $\Delta$ *hdr*-Mutante und unterstützt damit die Theorie, dass LbpAs eine essentielle Rolle für die Funktion Hdr-ähnlicher Systeme in Sulfurikanten spielen. Damit konnte Liponsäure eine bisher unbekannte Funktion im oxidativen dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel zugewiesen werden.

Durch die heterologe Expression ganzer erweiterter *hdr*-ähnlicher Genloki wurde gezeigt, dass diese ein funktionelles Operon bilden. Mit HdrA aus *Hyphomicrobium* X konnte erstmalig eine Untereinheit eines Hdr-ähnlichen Systems mit ihren prosthetischen Gruppen rekombinant in *Escherichia coli* produziert, aufgereinigt und kristallisiert werden. Spektroskopische und kristallographische Analysen des Proteins zeigten, dass HdrA einen Homodimer ausbildet, der pro Untereinheit jeweils ein 4Fe-4S-Cluster und ein FAD bindet. Für beide Cofaktoren konnten die jeweiligen Redoxpotentiale ermittelt werden. Sowohl die Kristallstruktur als auch durch UV/Vis-Spektroskopie unterstützte Redox-titrationen des Eisen-Schwefel-Flavoproteins zeigten, dass der FAD-Cofaktor von HdrA ein stabiles Semichinon ausbildet. Damit ist es wahrscheinlich, dass HdrA in Sulfurikanten keine Elektronen-Bifurkation vollzieht.



## 7 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J.P. & Leslie, A.G. (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F1 ATPase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 52 (Pt 1):30–42, doi:10.1107/S0907444995008754.
- Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Chen, V.B., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Richardson, J.S., Richardson, D.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H. & Adams, P.D. (2010) phenix.model\_vs\_data: A high-level tool for the calculation of crystallographic model and data statistics. *Journal of applied crystallography* 43 (Pt 4):669–676, doi:10.1107/S0021889810015608.
- Aida, T. & Nomoto, K. (1988) Nitrate Removal from a Sewage by Supplementation of Methanol Using a Submerged Soil Column, and Changes in the Population of Methanol-Utilizing Denitrifiers in the Column Soil. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 59 (5):464–470, doi:10.20710/dojo.59.5\_464.
- Akhtar, M.K. & Jones, P.R. (2008) Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H<sub>2</sub>-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Applied microbiology and biotechnology* 78 (5):853–862, doi:10.1007/s00253-008-1377-6.
- Anantharaman, K., Brown, C.T., Hug, L.A., Sharon, I., Castelle, C.J., Probst, A.J., Thomas, B.C., Singh, A., Wilkins, M.J., Karaoz, U., Brodie, E.L., Williams, K.H., Hubbard, S.S. & Banfield, J.F. (2016) Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nature communications* 7:13219, doi:10.1038/ncomms13219.
- Anantharaman, K., Hausmann, B., Jungbluth, S.P., Kantor, R.S., Lavy, A., Warren, L.A., Rappé, M.S., Pester, M., Loy, A., Thomas, B.C. & Banfield, J.F. (2018) Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. *The ISME journal* 12 (7):1715, doi:10.1038/s41396-018-0078-0.
- Argall, M.E. & Smith, G.D. (1993) use of trehalose-stabilized lyophilized methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium* X for the detection of methanol. *Biochemistry and molecular biology international*.
- Attwood, M.M. & Harder, W. (1972) A rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 38 (1):369–377, doi:10.1007/BF02328108.
- Auernik, K.S. & Kelly, R.M. (2008) Identification of components of electron transport chains in the extremely thermoacidophilic crenarchaeon *Metallosphaera sedula* through iron and sulfur compound oxidation transcriptomes. *Applied and environmental microbiology* 74 (24):7723–7732, doi:10.1128/AEM.01545-08.
- Bak, F., Finster, K. & Rothfuß, F. (1992) Formation of dimethylsulfide and methanethiol from methoxylated aromatic compounds and inorganic sulfide by newly isolated anaerobic bacteria. *Archives of microbiology* 157 (6):529–534, doi:10.1007/BF00276773.
- Bilous, P.T., Cole, S.T., Anderson, W.F. & Weiner, J.H. (1988) Nucleotide sequence of the *dmsABC* operon encoding the anaerobic dimethylsulphoxide reductase of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 2 (6):785–795.
- Boden, R., Borodina, E., Wood, A.P., Kelly, D.P., Murrell, J.C. & Schäfer, H. (2011) Purification and characterization of dimethylsulfide monooxygenase from *Hyphomicrobium sulfonivorans*. *Journal of bacteriology* 193 (5):1250–1258, doi:10.1128/JB.00977-10.
- Boden, R., Kelly, D.P., Murrell, J.C. & Schäfer, H. (2010) Oxidation of dimethylsulfide to tetrathionate by *Methylophaga thiooxidans* sp. nov.: A new link in the sulfur cycle. *Environmental microbiology* 12 (10):2688–2699, doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02238.x.

- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. & Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (2):95–113.
- Bordo, D. & Bork, P. (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO reports* 3 (8):741–746, doi:10.1093/embo-reports/kvf150.
- Borodina, E., Kelly, D.P., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. & Wood, A.P. (2000) Dimethylsulfone as a growth substrate for novel methylotrophic species of *Hyphomicrobium* and *Arthrobacter*. *Arch Microbiol* 173 (5-6):425–437.
- Borodina, E., Kelly, D.P., Schumann, P., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. & Wood, A.P. (2002) Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. *Archives of microbiology* 177 (2):173–183, doi:10.1007/s00203-001-0373-3.
- Borodina, E., McDonald, I.R. & Murrell, J.C. (2004) Chloromethane-dependent expression of the *cmu* gene cluster of *Hyphomicrobium chloromethanicum*. *Applied and environmental microbiology* 70 (7):4177–4186, doi:10.1128/AEM.70.7.4177-4186.2004.
- Boughanemi, S., Lyonnet, J., Infossi, P., Bauzan, M., Kosta, A., Lignon, S., Giudici-Orticoni, M.-T. & Guiral, M. (2016) Microbial oxidative sulfur metabolism: Biochemical evidence of the membrane-bound heterodisulfide reductase-like complex of the bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEMS microbiology letters* 363 (15), doi:10.1093/femsle/fnw156.
- Buckel, W. & Thauer, R.K. (2013) Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et biophysica acta* 1827 (2):94–113, doi:10.1016/j.bbabi.2012.07.002.
- Buckel, W. & Thauer, R.K. (2018) Flavin-Based Electron Bifurcation, Ferredoxin, Flavodoxin, and Anaerobic Respiration With Protons (Ech) or NAD+ (Rnf) as Electron Acceptors: A Historical Review. *Front. Microbiol.* 9:3704, doi:10.3389/fmicb.2018.00401.
- Bussineau, C.M. & Papoutsakis, E.T. (1988) Evidence suggesting energy-dependent formaldehyde transport in an RuMP-type methylotroph (T15). *Archives of microbiology* 149 (3):214–219, doi:10.1007/BF00422007.
- Canfield, D.E. & Raiswell, R. (1999) The evolution of the sulfur cycle. *American Journal of Science* 299 (7-9):697–723, doi:10.2475/ajs.299.7-9.697.
- Cao, X., Koch, T., Steffens, L., Finkensieper, J., Zigann, R., Cronan, J.E. & Dahl, C. (2018) Lipoate-binding proteins and specific lipoate-protein ligases in microbial sulfur oxidation reveal an atypical role for an old cofactor. *eLife* 7, doi:10.7554/eLife.37439.
- Charlson, R.J., Lovelock, J.E., Andreae, M.O. & Warren, S.G. (1987) Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* 326 (6114):655–661, doi:10.1038/326655a0.
- Chen, K.Y. & Morris, J.C. (1972) Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by oxygen. *Environ. Sci. Technol.* 6 (6):529–537, doi:10.1021/es60065a008.
- Chen, L., Ren, Y., Lin, J., Liu, X., Pang, X. & Lin, J. (2012) Acidithiobacillus caldus sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant. *PloS one* 7 (9):e39470, doi:10.1371/journal.pone.0039470.

- Cho, K.-S., Hirai, M. & Shoda, M. (1991) Degradation characteristics of hydrogen sulfide, methanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW44 isolated from peat biofilter. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71 (6):384–389, doi:10.1016/0922-338X(91)90248-F.
- Costa, K.C., Wong, P.M., Wang, T., Lie, T.J., Dodsworth, J.A., Swanson, I., Burn, J.A., Hackett, M. & Leigh, J.A. (2010) Protein complexing in a methanogen suggests electron bifurcation and electron delivery from formate to heterodisulfide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (24):11050–11055, doi:10.1073/pnas.1003653107.
- Curson, A.R.J., Todd, J.D., Sullivan, M.J. & Johnston, A.W.B. (2011) Catabolism of dimethylsulphoniopropionate: Microorganisms, enzymes and genes. *Nature reviews. Microbiology* 9 (12):849–859, doi:10.1038/nrmicro2653.
- Dagert, M. & Ehrlich, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6 (1):23–28.
- Dahl, C. (2015) Cytoplasmic sulfur trafficking in sulfur-oxidizing prokaryotes. *IUBMB life* 67 (4):268–274, doi:10.1002/iub.1371.
- Dahl, C. (2017) Sulfur Metabolism in Phototrophic Bacteria. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics*, SpringerLink Bücher, edited by P.C. Hallenbeck, Springer, Cham, pp 27–66.
- Dahl, C., Franz, B., Hensen, D., Kesselheim, A. & Zigann, R. (2013) Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: Identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process. *Microbiology (Reading, England)* 159 (Pt 12):2626–2638, doi:10.1099/mic.0.071019-0.
- Dahl, C., Friedrich, C., & Kletzin, A. (eds). (2008) *Sulfur oxidation in Prokaryotes*, Encyclopedia of life sciences, John Wiley & Sons, Chichester.
- Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., Murray, L.W., Arendall, W.B., Snoeyink, J., Richardson, J.S. & Richardson, D.C. (2007) MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research* 35 (Web Server issue):W375-83, doi:10.1093/nar/gkm216.
- de Bont, J.A.M., van Dijken, J.P. & Harder, W. (1981) Dimethyl Sulphoxide and Dimethyl Sulphide as a Carbon, Sulphur and Energy Source for Growth of *Hyphomicrobium* S. *Microbiology* 127 (2):315–323, doi:10.1099/00221287-127-2-315.
- de Zwart, J.M.M. & Kuenen, J.G. (1992) C1-cycle of sulfur compounds: De Zwart, J.M.M; Kuenen, J. G. *Biodegradation* 3 (1):37–59, doi:10.1007/BF00189634.
- de Zwart, J.M.M., Nelisse, P.N. & Kuenen, J.G. (1996) Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans* sp. nov: An obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from a microbial mat. *FEMS Microbiology Ecology* 20 (4):261–270, doi:10.1111/j.1574-6941.1996.tb00324.x.
- Deligeer, Fukunaga, R., Kataoka, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, K., Tagawa, S. & Suzuki, S. (2002) Spectroscopic and functional characterization of Cu-containing nitrite reductase from *Hyphomicrobium denitrificans* A3151. *Journal of inorganic biochemistry* 91 (1):132–138.

- Denkmann, K., Grein, F., Zigann, R., Siemen, A., Bergmann, J., van Helmont, S., Nicolai, A., Pereira, I.A.C. & Dahl, C. (2012) Thiosulfate dehydrogenase: A widespread unusual acidophilic *c*-type cytochrome. *Environmental microbiology* 14 (10):2673–2688, doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02820.x.
- Dijkhuizen, L., Harder, W., Boer, L. de, van Boven, A., Clement, W., Bron, S. & Venema, G. (1984) Genetic manipulation of the restricted facultative methylotroph *Hyphomicrobium* X by the R-plasmid-mediated introduction of the *Escherichia coli* *pdh* genes. *Arch Microbiol* 139 (4):311–318.
- Drotar, A., Burton, G.A., Tavernier, J.E. & Fall, R. (1987) Widespread occurrence of bacterial thiol methyltransferases and the biogenic emission of methylated sulfur gases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (7):1626–1631.
- Duine, J.A. (1990) [48] NAD-linked, factor-independent, and glutathione-independent aldehyde dehydrogenase from *Hyphomicrobium* X. In *Hydrocarbons and methylotrophy*, Methods in Enzymology v. 188, edited by M.E. Lidstrom, Academic Press, San Diego, pp 327–330.
- Dunfield, P. & Knowles, R. (1995) Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (8):3129–3135.
- Ehrenfeld, N., Levicán, G. & Parada, P. (2013) Heterodisulfide Reductase from *Acidithiobacilli* is a Key Component Involved in Metabolism of Reduced Inorganic Sulfur Compounds. *AMR* 825:194–197, doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.825.194.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60 (Pt 12 Pt 1):2126–2132, doi:10.1107/S0907444904019158.
- Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M. & Thauer, R.K. (1997) Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: The key enzyme of biological methane formation. *Science (New York, N.Y.)* 278 (5342):1457–1462.
- Evans, E.W., Dodson, C.A., Maeda, K., Biskup, T., Wedge, C.J. & Timmel, C.R. (2013) Magnetic field effects in flavoproteins and related systems. *Interface focus* 3 (5):20130037, doi:10.1098/rsfs.2013.0037.
- Eyice, Ö., Myronova, N., Pol, A., Carrión, O., Todd, J.D., Smith, T.J., Gurman, S.J., Cuthbertson, A., Mazard, S., Mennink-Kersten, M.A., Bugg, T.D., Andersson, K.K., Johnston, A.W., Op den Camp, H.J. & Schäfer, H. (2018) Bacterial SBP56 identified as a Cu-dependent methanethiol oxidase widely distributed in the biosphere. *The ISME journal* 12 (1):145–160, doi:10.1038/ismej.2017.148.
- 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.
- Finkensieper, J.C. (2017) Analyse des Wachstums und des Schwefelmetabolismus von *Hyphomicrobium* sp. & die Lipoat-Biosynthese Hdr-assoziiierter Lipoatbindender Proteine [Masterarbeit], Bonn.
- Finster, K., Tanimoto, Y. & Bak, F. (1992) Fermentation of methanethiol and dimethylsulfide by a newly isolated methanogenic bacterium. *Archives of microbiology* 157 (5):425–430, doi:10.1007/BF00249099.

- Fish, W.W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods in enzymology* 158:357–364.
- Freibert, S.-A., Weiler, B.D., Bill, E., Pierik, A.J., Mühlenhoff, U. & Lill, R. (2018) Biochemical Reconstitution and Spectroscopic Analysis of Iron-Sulfur Proteins. *Methods in enzymology* 599:197–226, doi:10.1016/bs.mie.2017.11.034.
- Friedrich, C.G., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Rother, D., Kraft, R., Kostka, S. & Prinz, H. (2000) Novel Genes Coding for Lithotrophic Sulfur Oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *Journal of bacteriology* 182 (17):4677–4687.
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. & Fischer, J. (2001) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: Emergence of a common mechanism? *Applied and environmental microbiology* 67 (7):2873–2882, doi:10.1128/AEM.67.7.2873-2882.2001.
- Frigaard, N.-U. & Dahl, C. (2009) Sulfur Metabolism in Phototrophic Sulfur Bacteria. In *Advances in microbial physiology*, Advances in Microbial Physiology v. 54, edited by R.K. Poole, Academic Press, Amsterdam, Boston, MA, pp 103–200.
- Garcia Costas, A.M., Poudel, S., Miller, A.-F., Schut, G.J., Ledbetter, R.N., Fixen, K.R., Seefeldt, L.C., Adams, M.W.W., Harwood, C.S., Boyd, E.S. & Peters, J.W. (2017) Defining Electron Bifurcation in the Electron-Transferring Flavoprotein Family. *Journal of bacteriology* 199 (21), doi:10.1128/JB.00440-17.
- Gliesche, C.G. (1997) Transformation of methylotrophic bacteria by electroporation. *Can. J. Microbiol.* 43 (2):197–201, doi:10.1139/m97-026.
- Gliubich, F., Gazerro, M., Zanotti, G., Delbono, S., Bombieri, G. & Berni, R. (1996) Active site structural features for chemically modified forms of rhodanese. *J. Biol. Chem.* 271 (35):21054–21061.
- Gostelow, P., Parsons, S.A. & Stuetz, R.M. (2001) Odour measurements for sewage treatment works. *Water Research* 35 (3):579–597, doi:10.1016/S0043-1354(00)00313-4.
- 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, doi:10.1371/journal.pone.0173395.
- Grant, W.M. (1947) Colorimetric Determination of Sulfur Dioxide. *Anal. Chem.* 19 (5):345–346, doi:10.1021/ac60005a023.
- Green, D.E. & Baum, H. (1970) *Energy and the mitochondrion*, Academic Press, New York.
- Gristwood, T., McNeil, M.B., Clulow, J.S., Salmond, G.P.C. & Fineran, P.C. (2011) PigS and PigP regulate prodigiosin biosynthesis in *Serratia* via differential control of divergent operons, which include predicted transporters of sulfur-containing molecules. *Journal of bacteriology* 193 (5):1076–1085, doi:10.1128/JB.00352-10.
- Grossoehme, N., Kehl-Fie, T.E., Ma, Z., Adams, K.W., Cowart, D.M., Scott, R.A., Skaar, E.P. & Giedroc, D.P. (2011) Control of copper resistance and inorganic sulfur metabolism by paralogous regulators in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry* 286 (15):13522–13531, doi:10.1074/jbc.M111.220012.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4):557–580.

- Harder, W. & Attwood, M.M. (1978) Biology, physiology and biochemistry of hyphomicrobia. *Advances in microbial physiology* 17:303–359.
- Harder, W., Attwood, M.M. & Quayle, J.R. (1973) Methanol Assimilation by *Hyphomicrobium* sp. *Journal of General Microbiology* 78 (1):155–163, doi:10.1099/00221287-78-1-155.
- Hatton, A.D., Malin, G. & McEwan, A.G. (1994) Identification of a periplasmic dimethylsulphoxide reductase in *Hyphomicrobium* EG grown under chemolithoheterotrophic conditions with dimethylsulphoxide as carbon source. *Archives of microbiology* 162 (1):148–150, doi:10.1007/BF00264389.
- Hausmann, B., Pelikan, C., Herbold, C.W., Köstlbacher, S., Albertsen, M., Eichorst, S.A., Rio, T.G.d., Huemer, M., Nielsen, P.H., Rattei, T., Stingl, U., Tringe, S.G., Trojan, D., Wentrup, C., Woebken, D., Pester, M. & Loy, A. (2018) Peatland Acidobacteria with a dissimilatory sulfur metabolism. *The ISME journal* 12 (7):1729, doi:10.1038/s41396-018-0077-1.
- Hedderich, R., Berkessel, A. & Thauer, R.K. (1989) Catalytic properties of the heterodisulfide reductase involved in the final step of methanogenesis. *FEBS Letters* 255 (1):67–71, doi:10.1016/0014-5793(89)81062-2.
- Hedderich, R., Berkessel, A. & Thauer, R.K. (1990) Purification and properties of heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur J Biochem* 193 (1):255–261, doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb19331.x.
- Hedderich, R., Koch, J., Linder, D. & Thauer, R.K. (1994) The Heterodisulfide Reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Contains Sequence Motifs Characteristic of pyridine-Nucleotide-Dependent Thioredoxin Reductases. *Eur J Biochem* 225 (1):253–261, doi:10.1111/j.1432-1033.1994.00253.x.
- Heunisch, G.W. (1977) Stoichiometry of the reaction of sulfites with hydrogen sulfide ion. *Inorg. Chem.* 16 (6):1411–1413, doi:10.1021/ic50172a033.
- Holland, H.L. (1988) Chiral sulfoxidation by biotransformation of organic sulfides. *Chemical reviews* 88 (3):473–485, doi:10.1021/cr00085a002.
- Holm, L. & Laakso, L.M. (2016) Dali server update. *Nucleic acids research* 44 (W1):W351-5, doi:10.1093/nar/gkw357.
- Horinouchi, M., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H. & Omori, T. (1997) Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. *FEMS microbiology letters* 155 (1):99–105, doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12692.x.
- Horinouchi, M., Yoshida, T., Nojiri, H., Yamane, H. & Omori, T. (1999) Polypeptide Requirement of Multicomponent Monooxygenase DsoABCDE for Dimethyl Sulfide Oxidizing Activity. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 63 (10):1765–1771, doi:10.1271/bbb.63.1765.
- Horton, R.M. (1995) PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Molecular biotechnology* 3 (2):93–99, doi:10.1007/BF02789105.
- Hütsch, B.W. (1998) Methane oxidation in arable soil as inhibited by ammonium, nitrite, and organic manure with respect to soil pH. *Biology and Fertility of Soils* 28 (1):27–35, doi:10.1007/s003740050459.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66 (Pt 2):125–132, doi:10.1107/S09074444909047337.

- Käll, L., Storey, J.D., MacCoss, M.J. & Noble, W.S. (2008) Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *Journal of proteome research* 7 (1):29–34, doi:10.1021/pr700600n.
- Kallnik, V., Meyer, M., Deppenmeier, U. & Schweiger, P. (2010) Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of biotechnology* 150 (4):460–465, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.10.069.
- Kanagawa, T. & Kelly, D.P. (1986) Breakdown of dimethyl sulphide by mixed cultures and by *Thiobacillus thiooparus*. *FEMS microbiology letters* 34 (1):13–19, doi:10.1111/j.1574-6968.1986.tb01340.x.
- Kanao, T., Kamimura, K. & Sugio, T. (2007) Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of biotechnology* 132 (1):16–22, doi:10.1016/j.jbiotec.2007.08.030.
- Kappler, U., Bennett, B., Rethmeier, J., Schwarz, G., Deutzmann, R., McEwan, A.G. & Dahl, C. (2000) Sulfite:Cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. Purification, characterization, and molecular biology of a heterodimeric member of the sulfite oxidase family. *J. Biol. Chem.* 275 (18):13202–13212.
- Kappler, U. & Schäfer, H. (2014) Transformations of dimethylsulfide. *Metal ions in life sciences* 14:279–313, doi:10.1007/978-94-017-9269-1\_11.
- Kassel-Çati, K. (1999) Entwicklung einer Gensondenanalytik für die Mineralisation von DMSO sowie Untersuchungen an den Genen des  $\beta$ -Ketoacidweges in *Pseudomonas* sp. B13.
- Kaster, A.-K., Moll, J., Parey, K. & Thauer, R.K. (2011) Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (7):2981–2986, doi:10.1073/pnas.1016761108.
- Kelly, D.P., Chambers, L.A. & Trudinger, P.A. (2002) Cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate. *Anal. Chem.* 41 (7):898–901, doi:10.1021/ac60276a029.
- Kettle, A.J. & Andreae, M.O. (2000) Flux of dimethylsulfide from the oceans: A comparison of updated data sets and flux models. *J. Geophys. Res.* 105 (D22):26793–26808, doi:10.1029/2000JD900252.
- Kiene, R.P. & Bates, T.S. (1990) Biological removal of dimethyl sulphide from sea water. *Nature* 345 (6277):702–705, doi:10.1038/345702a0.
- Kikuchi, G. & Hiraga, K. (1982) The mitochondrial glycine cleavage system. Unique features of the glycine decarboxylation. *Molecular and cellular biochemistry* 45 (3):137–149.
- King, G.M. & Schnell, S. (1994) Ammonium and Nitrite Inhibition of Methane Oxidation by *Methylobacter albus* BG8 and *Methylosinus trichosporium* OB3b at Low Methane Concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (10):3508–3513.
- King, T.E. & Morris, R.O. (1967 (impr. 1973)) Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. In *Methods in enzymology*, Methods in Enzymology, edited by R.W. Estabrook, Academic Press, New York, London, pp 634–641.

- Kita, K., Konishi, K. & Anraku, Y. (1984) Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome b558-d complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electron-carrying systems. *J. Biol. Chem.* 259 (5):3375–3381.
- Koch, T. & Dahl, C. (2018) A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. *The ISME journal* 12 (10):2479–2491, doi:10.1038/s41396-018-0209-7.
- Köstler, M. & Kleiner, D. (1989) Assimilation of methylamine by *Paracoccus denitrificans* involves formaldehyde transport by a specific carrier. *FEMS microbiology letters* 65 (1-2):1–4, doi:10.1111/j.1574-6968.1989.tb03587.x.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. & Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166 (1):175–176.
- Krebs, H.A. & Johnson, W.A. (1937) Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochemical Journal* 31 (4):645–660.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology* 372 (3):774–797, doi:10.1016/j.jmb.2007.05.022.
- Kuriyan, J., Krishna, T.S.R., Wong, L., Guenther, B., Pahler, A., Jr, C.H.W. & Model, P. (1991) Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* 352 (6331):172, doi:10.1038/352172a0.
- 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., Archer, M. & Dahl, C. (2016) Electron Accepting Units of the Diheme Cytochrome c TsdA, a Bifunctional Thiosulfate Dehydrogenase/Tetrathionate Reductase. *The Journal of biological chemistry* 291 (48):24804–24818, doi:10.1074/jbc.M116.753863.
- La Fortelle, E. de & Bricogne, G. (1967 (impr. 1973)) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In *Methods in enzymology*, Methods in Enzymology, edited by R.W. Estabrook, Academic Press, New York, London, pp 472–494.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680–685, doi:10.1038/227680a0.
- Leifson, E. (1964) *Hyphomicrobium neptunium* sp. n. *Antonie van Leeuwenhoek* 30 (1):249–256, doi:10.1007/BF02046730.
- Lemos, R.S., Fernandes, A.S., Pereira, M.M., Gomes, C.M. & Teixeira, M. (2002) Quinol: Fumarate oxidoreductases and succinate:quinone oxidoreductases: phylogenetic relationships, metal centres and membrane attachment. *Biochimica et biophysica acta* 1553 (1-2):158–170.
- León, I.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N. & Sprenger, R.R. (2013) Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Molecular & cellular proteomics MCP* 12 (10):2992–3005, doi:10.1074/mcp.M112.025585.
- Leonida, M.D., Sobolov, S.B. & Fry, A.J. (1998) FAD-mediated enzymatic conversion of NAD<sup>+</sup> to NADH: Application to chiral synthesis of L-lactate. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8 (20):2819–2824.



- Lidbury, I., Mausz, M.A., Scanlan, D.J. & Chen, Y. (2017) Identification of dimethylamine monooxygenase in marine bacteria reveals a metabolic bottleneck in the methylated amine degradation pathway. *The ISME journal* 11 (7):1592–1601, doi:10.1038/ismej.2017.31.
- Liessens, J., Germonpré, R., Kersters, I., Beernaert, S. & Verstraete, W. (1993) Removing Nitrate With a Methylotrophic Fluidized Bed: Microbiological Water Quality. *Journal - American Water Works Association* 85 (4):155–161, doi:10.1002/j.1551-8833.1993.tb05973.x.
- Liu, B., Liu, H., Zhong, D. & Lin, C. (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Current opinion in plant biology* 13 (5):578–586, doi:10.1016/j.pbi.2010.09.005.
- Liu, L.-J., Stockdreher, Y., Koch, T., Sun, S.-T., Fan, Z., Josten, M., Sahl, H.-G., Wang, Q., Luo, Y.-M., Liu, S.-J., Dahl, C. & Jiang, C.-Y. (2014) Thiosulfate transfer mediated by DsrE/TusA homologs from acidothermophilic sulfur-oxidizing archaeon *Metallosphaera cuprina*. *The Journal of biological chemistry* 289 (39):26949–26959, doi:10.1074/jbc.M114.591669.
- Liu, Y.-W., Denkmann, K., Kosciow, K., Dahl, C. & Kelly, D.J. (2013) Tetrathionate stimulated growth of *Campylobacter jejuni* identifies a new type of bi-functional tetrathionate reductase (TsdA) that is widely distributed in bacteria. *Molecular microbiology* 88 (1):173–188, doi:10.1111/mmi.12176.
- Lomans, B.P., Maas, R., Luderer, R., Camp, Huub J. M. Op den, Pol, A., van der Drift, C. & Vogels, G.D. (1999) Isolation and Characterization of Methanomethylovorans hollandica gen. nov., sp. nov., Isolated from Freshwater Sediment, a Methylotrophic Methanogen Able To Grow on Dimethyl Sulfide and Methanethiol. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (8):3641–3650.
- Loy, A., Duller, S., Baranyi, C., Mußmann, M., Ott, J., Sharon, I., Béjà, O., Le Paslier, D., Dahl, C. & Wagner, M. (2009) Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. *Environmental microbiology* 11 (2):289–299, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01760.x.
- Lubner, C.E., Jennings, D.P., Mulder, D.W., Schut, G.J., Zadvornyy, O.A., Hoben, J.P., Tokmina-Lukaszewska, M., Berry, L., Nguyen, D.M., Lipscomb, G.L., Bothner, B., Jones, A.K., Miller, A.-F., King, P.W., Adams, M.W.W. & Peters, J.W. (2017) Mechanistic insights into energy conservation by flavin-based electron bifurcation. *Nature chemical biology* 13 (6):655–659, doi:10.1038/nchembio.2348.
- Mander, G.J., Pierik, A.J., Huber, H. & Hedderich, R. (2004) Two distinct heterodisulfide reductase-like enzymes in the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus profundus*. *Eur J Biochem* 271 (6):1106–1116, doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04013.x.
- Mangold, S., Valdés, J., Holmes, D.S. & Dopson, M. (2011) Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Frontiers in microbiology* 2:17, doi:10.3389/fmicb.2011.00017.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manza, L.L., Stamer, S.L., Ham, A.-J.L., Codreanu, S.G. & Liebler, D.C. (2005) Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics* 5 (7):1742–1745, doi:10.1002/pmic.200401063.
- Massey, V. & Palmer, G. (1966) On the Existence of Spectrally Distinct Classes of Flavoprotein Semiquinones. A New Method for the Quantitative Production of Flavoprotein Semiquinones \*. *Biochemistry* 5 (10):3181–3189, doi:10.1021/bi00874a016.

- Masuda, T., Tomita, M. & Ishihama, Y. (2008) Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *Journal of proteome research* 7 (2):731–740, doi:10.1021/pr700658q.
- McDonald, I.R., Doronina, N.V., Trotsenko, Y.A., McAnulla, C. & Murrell, J.C. (2001) *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51 (Pt 1):119–122, doi:10.1099/00207713-51-1-119.
- McEwan, A.G., Wetzstein, H.G., Ferguson, S.J. & Jackson, J.B. (1985) Periplasmic location of the terminal reductase in trimethylamine N-oxide and dimethylsulphoxide respiration in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 806 (3):410–417, doi:10.1016/0005-2728(85)90248-8.
- 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, doi:10.1099/00221287-106-2-265.
- Müller, F.H., Bandejas, T.M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M. & Kletzin, A. (2004) Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: Characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Molecular microbiology* 53 (4):1147–1160, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04193.x.
- 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.
- Murakami-Nitta, T., Kirimura, K. & Kino, K. (2003) Degradation of dimethyl sulfoxide by the immobilized cells of *Hyphomicrobium denitrificans* WU-K217. *Biochemical Engineering Journal* 15 (3):199–204, doi:10.1016/S1369-703X(03)00004-4.
- Murakami-Nitta, T., Kurimura, H., Kirimura, K., Kino, K. & Usami, S. (2002) Continuous degradation of dimethyl sulfoxide to sulfate ion by *Hyphomicrobium denitrificans* WU-K217. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94 (1):52–56.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 53 (Pt 3):240–255, doi:10.1107/S09074444996012255.
- Nelson, D.L., Beginnen, K., Cox, M.M., Lehninger, A.L. & Nelson-Cox. (2005) *Lehninger Biochemie: Mit 40 Tabellen*, Springer-Lehrbuch, Springer, Berlin.
- Nitschke, W. & Russell, M.J. (2012) Redox bifurcations: Mechanisms and importance to life now, and at its origin: a widespread means of energy conversion in biology unfolds... *BioEssays news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 34 (2):106–109, doi:10.1002/bies.201100134.
- Nojiri, M., Hira, D., Yamaguchi, K., Okajima, T., Tanizawa, K. & Suzuki, S. (2005) Preparation and Characterization of Ca<sup>2+</sup>-free Methanol Dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans* A3151. *Chem. Lett.* 34 (7):1036–1037, doi:10.1246/cl.2005.1036.
- Nojiri, M., Hira, D., Yamaguchi, K., Okajima, T., Tanizawa, K. & Suzuki, S. (2006) Crystal structures of cytochrome *c*(L) and methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans*: Structural and mechanistic insights into interactions between the two proteins. *Biochemistry* 45 (11):3481–3492, doi:10.1021/bi051877j.

- Nojiri, M., Xie, Y., Inoue, T., Yamamoto, T., Matsumura, H., Kataoka, K., Deligeer, Yamaguchi, K., Kai, Y. & Suzuki, S. (2007) Structure and function of a hexameric copper-containing nitrite reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (11):4315–4320, doi:10.1073/pnas.0609195104.
- Nordlund, I., Powlowski, J. & Shingler, V. (1990) Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of bacteriology* 172 (12):6826–6833.
- Nyberg, U., Aspegren, H., Andersson, B., La Jansen, J.C. & Villadsen, I.S. (1992) Full-Scale Application of Nitrogen Removal with Methanol as Carbon Source. *Water Science and Technology* 26 (5-6):1077–1086.
- Nývltová, E., Smutná, T., Tachezy, J. & Hrdý, I. (2016) OsmC and incomplete glycine decarboxylase complex mediate reductive detoxification of peroxides in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and biochemical parasitology* 206 (1-2):29–38, doi:10.1016/j.molbiopara.2016.01.006.
- Osorio, H., Mangold, S., Denis, Y., Ñancucheo, I., Esparza, M., Johnson, D.B., Bonnefoy, V., Dopson, M. & Holmes, D.S. (2013) Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (7):2172–2181, doi:10.1128/AEM.03057-12.
- Peinemann, S., Hedderich, R., Blaut, M., Thauer, R.K. & Gottschalk, G. (1990) ATP synthesis coupled to electron transfer from H<sub>2</sub> to the heterodisulfide of 2-mercaptoethanesulfonate and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate in vesicle preparations of the methanogenic bacterium strain Gö1. *FEBS Letters* 263 (1):57–60, doi:10.1016/0014-5793(90)80704-M.
- Pol, A., Op den Camp, H.J.M., Mees, S.G.M., Kersten, M.A.S.H. & van der Drift, C. (1994) Isolation of a dimethylsulfide-utilizing *Hyphomicrobium* species and its application in biofiltration of polluted air. *Biodegradation* 5 (2):105–112, doi:10.1007/BF00700635.
- Pott, A.S. & Dahl, C. (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* 144 (Pt 7):1881–1894, doi:10.1099/00221287-144-7-1881.
- Probst, A.J., Ladd, B., Jarett, J.K., Geller-McGrath, D.E., Sieber, C.M.K., Emerson, J.B., Anantharaman, K., Thomas, B.C., Malmstrom, R.R., Stieglmeier, M., Klingl, A., Woyke, T., Ryan, M.C. & Banfield, J.F. (2018) Differential depth distribution of microbial function and putative symbionts through sediment-hosted aquifers in the deep terrestrial subsurface. *Nature microbiology* 3 (3):328, doi:10.1038/s41564-017-0098-y.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D.S. & Bonnefoy, V. (2009) Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC genomics* 10:394, doi:10.1186/1471-2164-10-394.
- Quentmeier, A., Hellwig, P., Bardischewsky, F., Wichmann, R. & Friedrich, C.G. (2004) Sulfide dehydrogenase activity of the monomeric flavoprotein SoxF of *Paracoccus pantotrophus*. *Biochemistry* 43 (46):14696–14703, doi:10.1021/bi048568y.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Gliesche, C.G. & Stackebrandt, E. (1998) Phylogenetic analysis and intragenetic structure of the genus *Hyphomicrobium* and the related genus *Filomicrobium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 48 (3):635–639, doi:10.1099/00207713-48-3-635.

- Ramos, A.R., Grein, F., Oliveira, G.P., Venceslau, S.S., Keller, K.L., Wall, J.D. & Pereira, I.A.C. (2015) The FlxABCD-HdrABC proteins correspond to a novel NADH dehydrogenase/heterodisulfide reductase widespread in anaerobic bacteria and involved in ethanol metabolism in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Environmental microbiology* 17 (7):2288–2305, doi:10.1111/1462-2920.12689.
- Refai, S., Berger, S., Wassmann, K. & Deppenmeier, U. (2014) Quantification of methanogenic heterodisulfide reductase activity in biogas sludge. *Journal of biotechnology* 180:66–69, doi:10.1016/j.jbiotec.2014.04.001.
- Reinartz, M., Tschäpe, J., Brüser, T., Trüper, H.G. & Dahl, C. (1998) Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* 170 (1):59–68.
- Rethmeier, J., Rabenstein, A., Langer, M. & Fischer, U. (1997) Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography A* 760 (2):295–302, doi:10.1016/S0021-9673(96)00809-6.
- Rohlin, L. & Gunsalus, R.P. (2010) Carbon-dependent control of electron transfer and central carbon pathway genes for methane biosynthesis in the Archaeon, *Methanosarcina acetivorans* strain C2A. *BMC microbiology* 10:62, doi:10.1186/1471-2180-10-62.
- Rouault, T.A. (2017) Iron-sulfur clusters in chemistry and biology, De Gruyter, Berlin, Boston.
- Santos, A.A., Venceslau, S.S., Grein, F., Leavitt, W.D., Dahl, C., Johnston, D.T. & Pereira, I.A.C. (2015) A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. *Science (New York, N.Y.)* 350 (6267):1541–1545, doi:10.1126/science.aad3558.
- Sapay, N., Guermeur, Y. & Deléage, G. (2006) Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC bioinformatics* 7:255, doi:10.1186/1471-2105-7-255.
- Sattler, S.A., Wang, X., Lewis, K.M., DeHan, P.J., Park, C.-M., Xin, Y., Liu, H., Xian, M., Xun, L. & Kang, C. (2015) Characterizations of Two Bacterial Persulfide Dioxygenases of the Metallo- $\beta$ -lactamase Superfamily. *The Journal of biological chemistry* 290 (31):18914–18923, doi:10.1074/jbc.M115.652537.
- 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.
- Schäfer, H., Myronova, N. & Boden, R. (2010) Microbial degradation of dimethylsulphide and related C1-sulphur compounds: Organisms and pathways controlling fluxes of sulphur in the biosphere. *Journal of experimental botany* 61 (2):315–334, doi:10.1093/jxb/erp355.
- Schleicher, E. & Weber, S. (2012) Radicals in flavoproteins. *Topics in current chemistry* 321:41–65, doi:10.1007/128\_2011\_301.
- Schneider, T.R. & Sheldrick, G.M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 58 (Pt 10 Pt 2):1772–1779.
- Schwämmle, V., León, I.R. & Jensen, O.N. (2013) Assessment and improvement of statistical tools for comparative proteomics analysis of sparse data sets with few experimental replicates. *Journal of proteome research* 12 (9):3874–3883, doi:10.1021/pr400045u.

- Setzke, E., Hedderich, R., Heiden, S. & Thauer, R.K. (1994) H<sub>2</sub>: Heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Composition and properties. *Eur J Biochem* 220 (1):139–148, doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18608.x.
- Shabbiri, K., Ahmad, W., Syed, Q. & Adnan, A. (2010) Isolation and purification of complex II from *Proteus mirabilis* strain ATCC 29245. *Braz. J. Microbiol.* 41 (3):796–804, doi:10.1590/S1517-83822010005000004.
- Shen, J., Keithly, M.E., Armstrong, R.N., Higgins, K.A., Edmonds, K.A. & Giedroc, D.P. (2015) *Staphylococcus aureus* CstB Is a Novel Multidomain Persulfide Dioxygenase-Sulfurtransferase Involved in Hydrogen Sulfide Detoxification. *Biochemistry* 54 (29):4542–4554, doi:10.1021/acs.biochem.5b00584.
- Shen, J., Peng, H., Zhang, Y., Trinidad, J.C. & Giedroc, D.P. (2016) *Staphylococcus aureus* sqr Encodes a Type II Sulfide:Quinone Oxidoreductase and Impacts Reactive Sulfur Speciation in Cells. *Biochemistry* 55 (47):6524–6534, doi:10.1021/acs.biochem.6b00714.
- Sirko, A., Zatyka, M., Sadowy, E. & Hulanicka, D. (1995) Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate-binding proteins. *J. Bacteriol.* 177 (14):4134–4136.
- Slechts, E.S., Bunny, K.L., Kugelberg, E., Kofoed, E., Andersson, D.I. & Roth, J.R. (2003) Adaptive mutation: General mutagenesis is not a programmed response to stress but results from rare coamplification of *dinB* with *lac*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (22):12847–12852, doi:10.1073/pnas.1735464100.
- Sörbo, B. (1987) Sulfate: Turbidimetric and nephelometric methods. *Methods in enzymology* 143:3–6.
- Springer, A.M. (1985) Industrial environmental control: Pulp and paper industry, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.
- Steiert, P.S., Stauffer, L.T. & Stauffer, G.V. (1990) The *lpd* gene product functions as the L protein in the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *Journal of bacteriology* 172 (10):6142–6144.
- Stockdreher, Y., Sturm, M., Josten, M., Sahl, H.-G., Dobler, N., Zigann, R. & Dahl, C. (2014) New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochromatium vinosum*. *The Journal of biological chemistry* 289 (18):12390–12403, doi:10.1074/jbc.M113.536425.
- Stutzer, A. & Hartleb, R. (1898). *Abhandlungen und Mitteilungen des Landwirtschaftlichen Instituts der Königlich-Preussischen Universität Breslau* (1):75.
- Suylen, G.M. & Kuenen, J.G. (1986) Chemostat enrichment and isolation of *Hyphomicrobium* EG. A dimethyl-sulphide oxidizing methylotroph and reevaluation of *Thiobacillus* MS1. *Antonie van Leeuwenhoek* 52 (4):281–293.
- Suylen, G.M.H., Large, P.J., van Dijken, J.P. & Kuenen, J.G. (1987) Methyl mercaptan oxidase, a key enzyme in the metabolism of methylated sulphur compounds by *Hyphomicrobium* EG. *Journal of General Microbiology* 133(11), 2989-2997. (1987).
- Suylen, G.M.H., Stefess, G.C. & Kuenen, J.G. (1986) Chemolithotrophic potential of a *Hyphomicrobium* species, capable of growth on methylated sulphur compounds. *Archives of microbiology* 146 (2):192–198, doi:10.1007/BF00402350.
- Tanabe, T.S. (2017) Schwefeldioxygenasen aus dem Alpha-Proteobakterium *Hyphomicrobium denitrificans* [Bachelorarbeit], Bonn.

- Tanimoto, Y. & Bak, F. (1994) Anaerobic degradation of methylmercaptan and dimethyl sulfide by newly isolated thermophilic sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (7):2450–2455.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews* 41 (1):100–180.
- Thauer, R.K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W. & Hedderich, R. (2008) Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature reviews. Microbiology* 6 (8):579–591, doi:10.1038/nrmicro1931.
- Thumm, W., Freitag, D. & Kettrup, A. (1991) Determination and quantification of dimethyl sulphoxide by HPLC. *Chromatographia* 32 (9):461–462, doi:10.1007/BF02327979.
- 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* 76 (9):4350–4354.
- Urakami, T. & Komagata, K. (1986) Occurrence of isoprenoid compounds in gram-negative methanol-, methane-, and methylamine-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32 (4):317–341, doi:10.2323/jgam.32.317.
- Urakami, T., Sasaki, J., Suzuki, K.-I. & Komagata, K. (1995) Characterization and Description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 45 (3):528–532, doi:10.1099/00207713-45-3-528.
- Urban, P.F. & Klingenberg, M. (1969) On the Redox Potentials of Ubiquinone and Cytochrome *b* in the Respiratory Chain. *Eur J Biochem* 9 (4):519–525, doi:10.1111/j.1432-1033.1969.tb00640.x.
- Urban, P.J. (1961) Colorimetry of sulphur anions. *Z. Anal. Chem.* 180 (2):116–119, doi:10.1007/BF00494087.
- van der Nat, F., Brouwer, J.D., Middelburg, J.J. & Laanbroek, H.J. (1997) Spatial distribution and inhibition by ammonium of methane oxidation in intertidal freshwater marshes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (12):4734–4740.
- van Durme, G.P., McNamara, B.F. & McGinley, C.M. (1992) Bench-scale removal of odor and volatile organic compounds at a composting facility. *water environ res* 64 (1):19–27, doi:10.2175/WER.64.1.4.
- Venceslau, S.S., Stockdreher, Y., Dahl, C. & Pereira, I.A.C. (2014) The "bacterial heterodisulfide" DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1837 (7):1148–1164, doi:10.1016/j.bbabi.2014.03.007.
- Viahniac, W. & Santer, M. (1957) The thiobacilli. *Bacteriological reviews* 21 (3):195–213.
- Visscher, P.T. & Taylor, B.F. (1993) A new mechanism for the aerobic catabolism of dimethyl sulfide. *Applied and environmental microbiology* 59 (11):3784–3789.
- Visscher, P.T. & van Gemerden, H. (1991) Photo-autotrophic growth of *Thiocapsa roseopersicina* on dimethyl sulfide. *FEMS microbiology letters* 81 (3):247–250.
- Vogt, S., Schneider, M., Schäfer-Eberwein, H. & Nöll, G. (2014) Determination of the pH dependent redox potential of glucose oxidase by spectroelectrochemistry. *Analytical chemistry* 86 (15):7530–7535, doi:10.1021/ac501289x.

- Wada, A., Mikkola, R., Kurland, C.G. & Ishihama, A. (2000) Growth phase-coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 182 (10):2893–2899.
- Wada, A., Yamazaki, Y., Fujita, N. & Ishihama, A. (1990) Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (7):2657–2661.
- Wagner, T., Koch, J., Ermler, U. & Shima, S. (2017) Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane 4Fe-4S clusters for reduction. *Science (New York, N.Y.)* 357 (6352):699–703, doi:10.1126/science.aan0425.
- Weghoff, M.C., Bertsch, J. & Müller, V. (2015) A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Environmental microbiology* 17 (3):670–677, doi:10.1111/1462-2920.12493.
- Weinitschke, S., Denger, K., Cook, A.M. & Smits, T.H.M. (2007) The DUF81 protein TauE in *Cupriavidus necator* H16, a sulfite exporter in the metabolism of C2 sulfonates. *Microbiology* 153 (Pt 9):3055–3060, doi:10.1099/mic.0.2007/009845-0.
- Weissgerber, T., Dobler, N., Polen, T., Latus, J., Stockdreher, Y. & Dahl, C. (2013) Genome-wide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180T during growth on different reduced sulfur compounds. *Journal of bacteriology* 195 (18):4231–4245, doi:10.1128/JB.00154-13.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6 (5):359–362, doi:10.1038/nmeth.1322.
- Wodara, C., Bardischewsky, F. & Friedrich, C.G. (1997) Cloning and characterization of sulfite dehydrogenase, two c-type cytochromes, and a flavoprotein of *Paracoccus denitrificans* GB17: Essential role of sulfite dehydrogenase in lithotrophic sulfur oxidation. *J. Bacteriol.* 179 (16):5014–5023.
- Xie, Y., Inoue, T., Seike, N., Matsumura, H., Kanbayashi, K., Itoh, K., Kataoka, K., Yamaguchi, K., Suzuki, S. & Kai, Y. (2004) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of dissimilatory nitrite reductase isolated from *Hyphomicrobium denitrificans* A3151. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60 (Pt 12 Pt 2):2383–2386, doi:10.1107/S0907444904028008.
- Yamaguchi, K. (2003) Characterization of Nitrous Oxide Reductase from a Methylophilic Denitrifying Bacterium, *Hyphomicrobium denitrificans* A3151. *Journal of biochemistry* 134 (6):853–858, doi:10.1093/jb/mvg211.
- Yamaguchi, K., Kobayashi, M., Kataoka, K. & Suzuki, S. (2003) Characterization of two Cu-containing protein fragments obtained by limited proteolysis of *Hyphomicrobiumdenitrificans* A3151 nitrite reductase. *Biochemical and biophysical research communications* 300 (1):36–40, doi:10.1016/S0006-291X(02)02764-X.
- Yan, Z., Wang, M. & Ferry, J.G. (2017) A Ferredoxin- and F<sub>420</sub>H<sub>2</sub>-Dependent, Electron-Bifurcating, Heterodisulfide Reductase with Homologs in the Domains Bacteria and Archaea. *mBio* 8 (1), doi:10.1128/mBio.02285-16.
- Yenigün, O. & Demirel, B. (2013) Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry* 48 (5-6):901–911, doi:10.1016/j.procbio.2013.04.012.

- Zeyer, J., Eicher, P., Wakeham, S.G. & Schwarzenbach, R.P. (1987) Oxidation of Dimethyl Sulfide to Dimethyl Sulfoxide by Phototrophic Purple Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (9):2026–2032.
- Zhang, L., Hirai, M. & Shoda, M. (1991) Removal characteristics of dimethyl sulfide, methanethiol and hydrogen sulfide by *Hyphomicrobium* sp. 155 isolated from Peat Biofilter. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 72 (5):392–396, doi:10.1016/0922-338X(91)90093-V.





```

Hden_0734  MFGFFKKNKGFPSATIQPSGQVITVKSGSSENLLKAALEAGIKWPYSR VGS CGT CKRLL
DsoF      -----MSYQVTIEPAGTIIQVEED--QTILDAALRQGVWLPFA CGHGT CGT CKVQV
DmpP      -----MSYNTVIEPTGEVIEVEDG--QTILQALRQGVWLPFA CGHGT CAT CKVQV
          :..*:*:* * * *.. :..*:*:* * * *:* * *:* * *:* * * * * :

Hden_0734  ASGQIKPLADFSYVLSGEDLDAGYILACQTMLKSDIEVELETLDGSDGVDLAKSRKLNKG
DsoF      TDGFYDVGEEASPFALMDIEREENKVLACCKPESDMVIEADVDEDEDFLGY-LVQDYQAK
DmpP      VEVEVDIGEASPFALMDIERDERKVLACCAIPLSDLVIEADVADADPDLGH-PVEDYRGV
          ..* . :.* . : : : * * * * * : * : * . . * . . . . . . .

Hden_0734  IARLSPLTHDILEVQIELEGEFKDYLAGQYADVLLPGVVERARSYSFSKAPNNEPNQVS
DsoF      VIEITDLSPTIKGVRQLDRP-MQFQAGQYINIQLPNIE-GTRAFSIANTP--SEANLIE
DmpP      VSALVDLSPTIKGLHIKLDLRP-MPFQAGQYVNLALPGID-GTRAFSLANPP--SRNDEVE
          : : * : * : : : * : * * * * : * * : * : * : * : * : * : * : * :

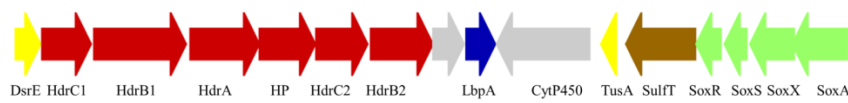
Hden_0734  FFVRRVKNGALTEWLHAADRVGEKIVLDGPHGAFYLRQSS-GPILLIAGGSGLAPIRALL
DsoF      LHIRKVGGAATRYVHDELSVGEEMALSGPYGQFFVRKSDQQNVIFIAGGSLSSPQSMI
DmpP      LHVRLVEGGAATGFHKLKVGDAVELSGPYGQFFVRDSQAGDLIFIAGGSLSSPQSMI
          : : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

Hden_0734  QQIENEGRSIDITLIFGARTQKDYCLDDIEKFASKAKGKFQFVPLSVETNESGWNQAV
DsoF      LDLEEQGDTRIYLFGQARDVAELYNREKFEQLVK-EYPNFRYI PALNAPKPEDQWTGFT
DmpP      LDLLERGDTRRITLFGARNRAELYNCELFEELAA-RHPNFSYV PALNQANDDPEWQGFK
          : : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Hden_0734  GNCPDAIKLDMLEP-QSSQAYLGGPPVMIDAAVDRKAMGLKESQIFFDKFLDSSSMPAG
DsoF      GYVHEAVANYFNKCSGHKAYLGGPPMIDAAISTLMQSRLEKDIHTERFLSAADGANG
DmpP      GFVHDAAKAHFDGRFGGQKAYLGGPPMIDAAITFLMQGRLEFERDIFMERFYTAADGAGE
          * : * : : . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

Hden_0734  RA----- 360
DsoF      QRSALFRHI 353
DmpP      SRSALFKRI 353
          :
    
```

**Abb. 51:** Alignment von Hden\_0734 und DsoF aus *Acinetobacter* sp. strain 20B und DmpP aus *Pseudomonas* sp. strain CF600. Konservierte Cysteine wurden farblich hervorgehoben. Ähnlichkeit von Hden\_0734 zu DsoF gemäß EMBOSS Needle 50,5 %. Ähnlichkeit von Hden\_0734 zu DmpP 51,5 %.



**Abb. 52:** Schematische Darstellung des erweiterten *hdr*-ähnlichen Genlokus in *Hyphomicrobium* X.

```

Hden_0730  MTRVLYIQASPRGARSASAQVAQAYIDALKKKGDVNVDDLVDVKKDDLPAFDGPALEAKYA 60
HdeA00805  MTRLLFIQASPRGQSSASTRVANTYIDS LKTKGDVSVDDLVDVKKEDLPPNGAALEAKYA 60
          ***:*:***** * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Hden_0730  GLSGQSLDEAQAAWVAISSLGARFRDAEIVLSVPMWNFGVPYKQLIDLVTQKDVTF 120
HdeA00805  GLGGQPLTTEQQAAWKASDLGARFRNADQIVIASPMWNFGVYRKLHLIDLVTQKDVTF 120
          **.* * * * : * * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Hden_0730  TFDENGFGLKQNAVVVCARGLEYVEGTPVSEENLDYQKAYLISWLSFLGVGEIKTIT 180
HdeA00805  TPDANGFGMLNGKRAVLVCARGLEYVDDTPMSEENLDYQRSYLTWLNFIGVSDVQSIR 180
          *** * * * * * : : * * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * : * * * * * : * : * : * : * : * : * :

Hden_0730  VEKTLMGADASSAALASGIAEATAMAT----- 207
HdeA00805  VEKTLGEEALSGSLAAGTTEAKAMALSLEKVA 213
          ***** * * * : * * * * * * * * * * *
    
```

**Abb. 53:** Alignment von Hden\_0730 und HdeA00805. Ähnlichkeit gemäß EMBOSS Needle 82,2 %.

```

HdeA00801   MFSFFKKNKGFPSAKILPLGKTIITVKSGSSENLLKAALENGIQWPFYNCRVGSCGTCKCKL 60
DsoF        -----MSYQVTIEPAGTIIQV--EEDQTILDAALRQGVWLPFACGHGTCGTCCKVQV 49
           :...* * * * * ..:.*.***.:* : * * :***** :

HdeA00801   VSGKIKPLNDFSYVLSGEELDAGYILACQTSLEDIEVEVDLESATNGVELAKSRTLNKG 120
DsoF        TDGFYVDGASPFALMDIEREENKVLACCCKPESDMVIEADVDEDEDFLGY-LVQDYQAK 108
           ..* . : : * . * : : :*** . . * : * . * . : : : : * . :

HdeA00801   IIDTKPLTHDILEVQLELDKEFKDYLPQQYADILVPGVVDRAVSYSFSKSPANKEPNQVS 180
DsoF        VIEITDLSPTIKGVRQLDRPM-QFQAGQYINIQLPNIEG-TRAFSIANTP--SEANLIE 164
           :. : * : * * : * : * : : : * * : * : : . : * : * : * : * :

HdeA00801   FFIRKVNSEGFTEWLHAGSRVQQIVLDGPHGNFYLRAPDG-PIVLIAGGSLAPIRALM 239
DsoF        LHIRKVGGAATRYVHDELSVGEEMALSGPYGQFFVRKSDQQNVIFIAGGSLSSPQSMI 224
           :.***:.* * : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

HdeA00801   QQITAEGVKSFVTLIFGARTQEDLYCLEEIEKFLSMMNGQFKFIPVLSVEKNSDKWQGAV 299
DsoF        LDLLEQGDTRIIYLPQGGARDVAELYNREKFEQLVK-EYPNFRYIPALNAPKPEDQWTGFT 283
           : : * . : : * * : * * * : * * : * : : . : * : * . * . * : * * .

HdeA00801   GYCPDAIAPEMIDV-KTSHAYLCGPPVMICDAAIEKLGKMGLEDEKRIYFDKFLDASSMPAG 358
DsoF        GYVHEAVANYFENKCSGHKAYLCGPPPMIDAAISTLMQSRLEKDIHTERFLSADGANG 343
           ** : * : * : : . : * * * * * * * * * * * * * * * * : * * : * : * : * .

HdeA00801   RG----- 360
DsoF        QRSALFRHI 353
           :.

```

**Abb. 54: Alignment von HdeA00801 und DsoF aus *Acinetobacter* sp. strain 20B.** Konservierte Cysteine wurden farblich hervorgehoben. Ähnlichkeit gemäß EMBOS Needle 40,4 %.



**Abb. 55: Schematische Darstellung des Genomregion von HdeA00800 - HdeA00804 in *Hyphomicrobium* EG.** Werte für die log<sub>2</sub> fold changes im Rahmen der vergleichenden Proteom-Analyse: HdeA00800 0,7; HdeA00801 2,2; HdeA00803 3,4; HdeA00804 3,3.

**Tab. 24: Rohdaten aus der vergleichenden Proteom-Analyse von *Hyphomicrobium* EG.** Gezeigt werden die Lokus-Tags zusammen mit der automatischen Annotation der Proteine und dem dazugehörigen log<sub>2</sub> fold change.

Lokus-Tag _ Automatische Annotation	log <sub>2</sub> fold change
HdeA03269_50S ribosomal protein L1	-1,3
HdeA03271_50S ribosomal protein L10	-0,8
HdeA03272_50S ribosomal protein L7/L12	-1,1
HdeA03273_DNA-directed RNA polymerase subunit beta	-1,8
HdeA03274_DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	-1,9
HdeA03275_30S ribosomal protein S12	-2,3
HdeA03276_30S ribosomal protein S7	-1,4
HdeA03277_Elongation factor G	-1,7
HdeA03278_Elongation factor Tu	-2,0
HdeA03279_30S ribosomal protein S10	-1,6
HdeA03280_50S ribosomal protein L3	-1,6
HdeA03281_50S ribosomal protein L4	-1,7
HdeA03282_50S ribosomal protein L23	-1,2
HdeA03283_50S ribosomal protein L2	-0,9
HdeA03284_30S ribosomal protein S19	-2,0
HdeA03285_50S ribosomal protein L22	-1,4
HdeA03286_30S ribosomal protein S3	-2,1
HdeA03287_50S ribosomal protein L16	-2,3

Lokus-Tag _ Automatische Annotation	log2 fold change
HdeA03288_Hypothetical new protein	-1,3
HdeA03289_30S ribosomal protein S17	-1,3
HdeA03290_50S ribosomal protein L14	-2,6
HdeA03291_50S ribosomal protein L24	-0,2
HdeA03292_50S ribosomal protein L5	-1,4
HdeA03293_30S ribosomal protein S14	-2,0
HdeA03294_30S ribosomal protein S8	-0,4
HdeA03295_50S ribosomal protein L6	-1,4
HdeA03296_50S ribosomal protein L18	-1,8
HdeA03297_30S ribosomal protein S5	-2,5
HdeA03298_50S ribosomal protein L30	-1,9
HdeA03299_50S ribosomal protein L15	-1,6
HdeA03300_Protein translocase subunit SecY	-2,6
HdeA03301_Adenylate kinase	-0,5
HdeA03302_30S ribosomal protein S13	-2,1
HdeA03303_30S ribosomal protein S11	-2,0
HdeA03304_DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	-1,8
HdeA03305_50S ribosomal protein L17	-3,4

**Tab. 25: Proteine, deren relative Häufigkeiten im Proteom von *Hyphomicrobium* EG sich sehr signifikant um einen log2 fold change von mindestens 2,5 beim Wachstum mit DMSO als Substrat erhöht haben. p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als signifikant klassifiziert (\*), p-Werte  $\leq 0,01$  wurden als sehr signifikant klassifiziert (\*\*), und p-Werte  $\leq 0,001$  als höchstsignifikant (\*\*\*)**.

Lokus-Tag _ Automatische Annotation	log2 fold change	Signifikanz
HdeA00706_3-dehydroquinate dehydratase 2	4,7	***
HdeA02557_Hypothetical new protein	4,2	***
HdeA03103_Hypothetical new protein	4,1	***
HdeA01065_Putative protease MJ0651	4,0	***
HdeA02514_Hypothetical new protein	3,9	***
HdeA00773_Hypothetical new protein	3,9	***
HdeA01505_Hypothetical new protein	3,8	***
HdeA01415_Ethanolamine utilization protein EutQ	3,7	***
HdeA03449_Metallothiol transferase FosB	3,7	***
HdeA02734_Hypothetical new protein	3,7	***
HdeA00209_Putative dehydrogenase XoxF	3,6	***
HdeA03062_Hypothetical new protein	3,6	***
HdeA02805_RlpA-like protein	3,6	***
HdeA00422_Sec-independent protein translocase protein TatB	3,6	***
HdeA01435_GDP-mannose 4,6-dehydratase	3,6	***
HdeA01786_Hypothetical new protein	3,6	***
HdeA00434_Uncharacterized metalloprotease YcaL	3,6	***
HdeA00981_Hypothetical new protein	3,5	***

Lokus-Tag _ Automatische Annotation	log2 fold change	Signifikanz
HdeA01729_Hypothetical new protein	3,5	***
HdeA01036_Protein usf	3,4	***
HdeA02219_Hypothetical new protein	3,4	***
HdeA00799_Homoserine O-acetyltransferase	3,4	***
HdeA00803_Xylene monooxygenase subunit 1	3,4	***
HdeA00956_Putative lipoprotein Lxx21020	3,4	***
HdeA02809_Hypothetical new protein	3,3	***
HdeA03107_Pseudoazurin	3,3	***
HdeA00804_Peroxiredoxin-like protein DDB_G0282517, mitochondrial	3,3	***
HdeA00794_Hypothetical new protein	3,3	***
HdeA02313_Hypothetical new protein	3,3	***
HdeA01273_Ribosomal protein L11 methyltransferase	3,2	***
HdeA00227_Centromere protein V	3,2	***
HdeA02830_Hypothetical new protein	3,2	***
HdeA00784_Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	3,2	***
HdeA02510_TPR repeat-containing protein RHE_CH03534,1	3,2	***
HdeA02399_Cytochrome c iso-1/iso-2	3,2	***
HdeA01790_Hypothetical new protein	3,2	***
HdeA01819_Outer-membrane lipoprotein carrier protein	3,2	***
HdeA00203_Uncharacterized protein YeaO	3,2	***
HdeA01029_Hypothetical new protein	3,1	***
HdeA01642_Protease HtpX homolog	3,1	***
HdeA02042_Ferredoxin-2	3,1	***
HdeA01755_Hypothetical new protein	3,1	***
HdeA00843_CoB--CoM heterodisulfide reductase iron-sulfur subunit A	3,0	***
HdeA01744_Inner membrane lipoprotein YiaD	3,0	***
HdeA01949_Hypothetical new protein	3,0	***
HdeA00527_Hypothetical new protein	3,0	***
HdeA00964_Iron uptake protein A2	3,0	***
HdeA00805_FMN-dependent NADH-azoreductase 9	3,0	***
HdeA03496_Molybdopterin molybdenumtransferase	3,0	***
HdeA02635_Hypothetical new protein	2,9	***
HdeA00806_Hypothetical new protein	2,9	***
HdeA02868_Uncharacterized HIT-like protein Rv1262c/MT1300	2,9	***
HdeA03604_Hypothetical new protein	2,9	***
HdeA00782_Beta-lactamase hydrolase-like protein	2,9	***
HdeA00802_Group 1 truncated hemoglobin trHbN	2,9	***
HdeA02629_Hypothetical new protein	2,9	***
HdeA02303_Hypothetical new protein	2,9	***
HdeA00830_Hypothetical new protein	2,9	***
HdeA00287_26 kDa periplasmic immunogenic protein	2,9	***
HdeA00820_Xylene monooxygenase electron transfer	2,8	***

Lokus-Tag _ Automatische Annotation	log2 fold change	Signifikanz
component		
HdeA03522_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA00831_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA00727_Na(+)/H(+) antiporter NhaA 2	2,8	***
HdeA00829_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA00846_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA01712_Organic hydroperoxide resistance protein	2,8	***
HdeA00177_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA00816_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA01397_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA01262_Hypothetical new protein	2,8	***
HdeA00215_Uncharacterized protein YJL213W	2,8	***
HdeA03151_Uncharacterized protein bbp_170	2,8	***
HdeA03526_UPF0264 protein MK1602	2,8	***
HdeA02329_Hypothetical new protein	2,7	***
HdeA03507_Hypothetical new protein	2,7	***
HdeA00742_2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase	2,7	***
HdeA00807_Hypothetical new protein	2,7	***
HdeA00762_Selenium-binding protein 1-A	2,7	***
HdeA00347_Nitrite reductase [NAD(P)H]	2,7	***
HdeA00847_Hypothetical new protein	2,7	***
HdeA02009_Hypothetical new protein	2,7	***
HdeA03429_Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2	2,7	***
HdeA00656_Hypothetical new protein	2,7	***
HdeA00832_Uncharacterized lipoprotein aq_1806	2,6	***
HdeA00006_Hypothetical new protein	2,6	***
HdeA02908_Regulator of nucleoside diphosphate kinase	2,6	***
HdeA02810_Hypothetical new protein	2,6	***
HdeA02603_Hypothetical new protein	2,6	***
HdeA00874_Probable TonB-dependent receptor HI_1217	2,6	**
HdeA02269_Peroxiredoxin-2E-1, chloroplastic	2,6	***
HdeA02246_Hypothetical new protein	2,6	***
HdeA00763_Hypothetical new protein	2,6	***
HdeA01012_Uncharacterized protein HI_1053	2,6	***
HdeA00396_Hypothetical new protein	2,6	***
HdeA02456_Cobyrinic acid A,C-diamide synthase	2,5	***
HdeA00060_47 kDa outer membrane protein	2,5	***
HdeA03596_Hypothetical new protein	2,5	***
HdeA00112_Persistence and stress-resistance toxin PasT	2,5	***

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

- Frau Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu verfassen, und jederzeit für Diskussionen und Probleme zur Verfügung stand;
- Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Übernahme des Korreferats und die Bereitstellung der Möglichkeit, in seinem Labor GC-Messungen durchführen zu können;
- Herrn Prof. Dr. Eberhard Schmidt von der Universität Wuppertal für die Bereitstellung von *Hyphomicrobium* EG;
- Herrn Dr. Hendrik Schäfer von der University of Warwick für die guten Hinweise zur Kultivierung von Methyloprophen mit DMS;
- Herrn Dr. Ulrich Ermler und Frau Ulrike Demmer vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt für die produktive Zusammenarbeit im Rahmen der Aufklärung der Struktur von HdrA;
- Herrn Dr. Eric Kofoed von der UC Davis für die Bereitstellung der Rifampicin-Resistenz-Kassette;
- Herrn Dr. Konrad Kosciow für die Überlassung des Plasmids pBBR1p264;
- Frau Dr. Sofia S. Venceslau von der Universidade Nova des Lisboa für die Durchführung der Redoxitrationen und der EPR-Analysen und den Input bei der Interpretation der Ergebnisse;
- Herrn Dr. Lupp Edens und der Firma Koninklijke DSM N.V. für die unbürokratische Bereitstellung der Genomsequenz von *Hyphomicrobium* EG;
- Herrn Simon Käfer für seine Hilfe bei der Aufbereitung der Genomsequenz von *Hyphomicrobium* EG;
- den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dahl, die jederzeit ein offenes Ohr für mögliche Fragen – gleich welcher Art – hatten und mit Rat und Tat zur Verfügung standen;
- Frau Vera Waffenschmidt und Frau Mara Kotthoff für ihre Unterstützung bei der Untersuchung der  $\Delta tsdA$ -Mutante;
- Herrn Christos Katsaros für die Sicherstellung einer ausreichenden Energieversorgung und der damit verbundenen Verbesserung der Raumluft in den Laboren an Donnerstagen;
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung dieses Projektes (Da 351/8-1);
- last but not least meiner Ehefrau Meike, die in den vergangenen vier Jahren täglich einen unbezahlbaren Beitrag dazu geleistet hat, dass ich das ‚Projekt Dissertation‘ jetzt (ENDLICH!) erfolgreich abschließen kann.

## Publikationen

### Artikel

- Cao, X., **Koch, T.**, Steffens, L., Finkensieper, J., Zigann, R., Cronan, J.E. & Dahl, C. (2018) Lipoate-binding proteins and specific lipoate-protein ligases in microbial sulfur oxidation reveal an atypical role for an old cofactor. *eLife* 7, doi:10.7554/eLife.37439.
- Koch, T.** & Dahl, C. (2018) A novel bacterial sulfur oxidation pathway provides a new link between the cycles of organic and inorganic sulfur compounds. *The ISME journal* 12 (10):2479–2491, doi:10.1038/s41396-018-0209-7.
- 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., Archer, M. & Dahl, C. (2016) Electron Accepting Units of the Diheme Cytochrome c TsdA, a Bifunctional Thiosulfate Dehydrogenase/Tetrathionate Reductase. *The Journal of biological chemistry* 291 (48):24804–24818, doi:10.1074/jbc.M116.753863.
- Liu, L.-J., Stockdreher, Y., **Koch, T.**, Sun, S.-T., Fan, Z., Josten, M., Sahl, H.-G., Wang, Q., Luo, Y.-M., Liu, S.-J., Dahl, C. & Jiang, C.-Y. (2014) Thiosulfate transfer mediated by DsrE/TusA homologs from acidothermophilic sulfur-oxidizing archaeon *Metallosphaera cuprina*. *The Journal of biological chemistry* 289 (39):26949–26959, doi:10.1074/jbc.M114.591669.

### Tagungsbeiträge

- Koch, T.**, Dahl, C. 2018. *A novel sulfur oxidation system revealed in dimethyl sulfide-degrading Hyphomicrobium denitrificans*. EFB Workshop on Bacterial electron transfer processes and their regulation. Saint-Tropez, France.
- Koch, T.**, Dahl, C. 2017. *Proteome-based new insights into dissimilatory sulfur metabolism of Hyphomicrobium denitrificans*. 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM. Würzburg, Germany.
- Koch, T.**, Job, J., Dahl, C. 2016. *Dimethylsulfide induces expression of heterodisulfide reductase-like proteins in different Hyphomicrobium strains*. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology. Jena, Germany.
- Koch, T.**, Dahl, C. 2015. *Bioinformatic analyses indicate a novel multi-enzyme system for sulfur oxidation in prokaryotes*. EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism. Helsingør, Denmark.
- Koch, T.**, Dahl, C. 2015. *Bioinformatic analyses indicate a novel multi-enzyme system for sulfur oxidation in prokaryotes*. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology. Marburg, Germany.