

Wolframabhängige Aldehydoxidoreduktase
**Neue Einblicke in Katalyse, Struktur und Kofaktor-
Maturation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

Dominik Alexander Hege

Aus Moosburg an der Isar

Marburg, 2022

Die Arbeit zur vorliegenden Dissertation wurde von September 2019 bis September 2022 unter der Betreuung von Prof. Dr. Johann Heider an der Philipps-Universität Marburg am Fachbereich Biologie in der Arbeitsgruppe für Mikrobielle Biochemie angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am 01.02.2023.

Erstgutachter: Prof. Dr. Johann Heider

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der Disputation: 10.03.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Zusammenfassung	8
	Summary	9
3	Einleitung	10
3.1	Molybdän- und Wolframenzyme	10
3.2	Eigenschaften und Struktur der Aldehydoxidoreduktasen	13
3.3	Die Biosynthese der Pterin-Kofaktoren	17
3.4	Zielsetzung	20
4	Material und Methoden	21
4.1	Chemikalien, Enzyme	21
4.2	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	21
4.3	Nährmedien und sonstige Lösungen	27
4.4	Mikrobiologische Methoden	32
4.4.1	Kultivierung von <i>Aromatoleum aromaticum</i>	32
4.4.2	Anaerobe Kultivierung von <i>Aromatoleum evansii</i>	32
4.4.3	Aerobe Kultivierung von <i>Aromatoleum evansii</i>	33
4.4.4	Kultivierung von <i>E. coli</i>	33
4.4.5	Kryokonservierung und Lagerung von Bakterienstämmen	33
4.4.6	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	33
4.4.7	Konjugation von <i>Aromatoleum evansii</i>	33
4.4.8	Generierung von Deletions- und Disruptionsmutanten von <i>A. evansii</i>	34
4.4.9	<i>In vivo</i> -Aktivitätstest Formiatdehydrogenase	34
4.5	Molekularbiologische Methoden	35
4.5.1	Isolation genomischer DNA	35
4.5.2	PCR	35
4.5.3	Stargate-Klonierung	36
4.5.4	Isolation von Plasmid-DNA	36
4.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	36
4.5.6	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	37
4.5.7	Gibson-Assembly	37
4.6	Proteinbiochemische Methoden	37
4.6.1	Rekombinante Expression in <i>Aromatoleum evansii</i> (anaerob)	37
4.6.2	Rekombinante Expression in <i>Aromatoleum evansii</i> (aerob)	38
4.6.3	Rekombinante Expression in <i>E.coli</i> (anaerob)	38
4.6.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
4.6.5	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	39
4.6.6	Proteinaufreinigung mittels Streptactin-Affinitätschromatografie	39

4.6.7	Proteinaufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie . . .	40
4.6.8	Größenbestimmung von Proteinkomplexen mittels Größenausschlusschromatographie	40
4.6.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	40
4.6.10	Flavinbestimmung	41
4.6.11	Aktivitätsbestimmung der AOR	41
4.6.12	Aktivitätsbestimmung der Nitratreduktase	41
4.6.13	Aktivitätsstain im nativen Polyacrylamidgel	41
4.6.14	Nachweis der Wasserstoffbildung	42
4.6.15	Proteinkristallisation	42
5	Ergebnisse	43
5.1	Heterologe Expression der AOR	43
5.1.1	Optimierung der Expressionsbedingungen	43
5.1.2	Elementaranalyse	45
5.1.3	Größenausschlusschromatographie	48
5.1.4	Hydrogenaseaktivität der AOR	48
5.2	Maturation des Wolfram-Kofaktors	49
5.2.1	Generierung von $\Delta moeA$ -Deletionsmutanten von <i>A. Evansii</i>	49
5.2.2	Rekombinante Expression von AOR in $\Delta moeA$ -Stämmen	50
5.2.3	Aktivität der Nitratreduktase in $\Delta moeA$ -Stämmen	54
5.2.4	Komplementation von <i>E. coli</i> $\Delta moeA$	54
5.2.5	Charakterisierung des Proteins MoeA1	55
5.2.6	Generierung einer <i>aorDE</i> -Disruptionsmutante von <i>A. Evansii</i>	59
6	Diskussion	61
6.1	Rekombinante Expression der AOR	61
6.2	Eigenschaften der rekombinanten AOR	61
6.3	Limitierungen des heterologen Expressionssystems	62
6.4	Charakterisierung von MoeA1	63
6.5	Die Rolle von MoeA1 und MoeA2 in der WCo-Maturation	64
6.6	Die Rolle von AorD und AorE	65
6.7	Maturation des Wolframkofaktors	67
6.8	Biotechnologisches Potential der AOR	70
7	Literaturverzeichnis	71
8	Danksagung	77
9	Lebenslauf	78
10	Erklärung	79

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über die MPT-Kofaktoren	11
2	Kristallstruktur der AOR aus <i>P. furiosus</i>	14
3	AOR-Modell und Operon-Struktur	16
4	Biosynthese des MoCo	19
5	FPLC-Chromatogramm bei der Reinigung rekombinanter AOR	43
6	SDS-Page bei der Reinigung rekombinanter AOR	44
7	Vektoren für die heterologe AOR-Expression	45
8	UV-Vis-Spektren zur Bestimmung des FAD-Gehalts	46
9	Elutionschromatogramme SEC	48
10	Aktivitätsstain im Nativgel	49
11	Deletionsvektoren zur Generierung von $\Delta moeA$ -Mutanten	51
12	Validierung der $\Delta moeA$ -Mutanten via PCR	52
13	Wachstum und NR-Aktivität im Zellextrakt der $\Delta moeA$ -Stämme	54
14	Überschichtungsassay zur Komplementation von <i>E.coli</i> $\Delta moeA$	55
15	Rekombinante Expression von MoeA1	56
16	Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie von MoeA1	57
17	Bestimmung der Regressionskurve der SEC	58
18	Proteinkristalle von MoeA1	58
19	Disruptionsmutagenese von <i>aorD</i> und <i>aorE</i>	60
20	Struktur verschiedener <i>aor</i> -Operons	66
21	Alignment von MoaD- und AorD-Sequenzen	67
22	Hypothetischer Mechanismus der AOR-Maturation	69

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Bakterienstämme	22
2	Verwendete Plasmide	23
3	Verwendete Oligonukleotide	24
4	Verwendete Medien und -zusätze	27
5	Verwendete Puffer und sonstige Lösungen	30
6	Elementanalyse und Aktivitäten der rekombinanten AOR	47
7	Metallgehalt und Aktivität der AOR in $\Delta moeA$ -Stämmen	53
8	K_d -Werte und ermittelte Massen der SEC von MoeA1	58

1 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AOR	Aldehydoxidoreduktase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Benzylviologen
Cam	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cPMP	zyklisches Pyranopterinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
cv	Säulenvolumen
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigungsäquivalent (9,81 m/s ²)
GC-TCD	Gaschromatographie mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
LB	Lysogeny Broth
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorptions-Ionisation
MCD	MPT-Cytosin-Dinukteotid

MGD MPT-Guanosin-Dinukleotid
MoCo Molybdän-Kofaktor
MOPS 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPT Molybdopterin / Metallopterin
MS Massenspektrometrie
MW Molekulare Masse
NAD Nicotinamidadenindinukleotid
NADP Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n.b. nicht bestimmt
NR Nitratreduktase
ORI Origin of Replication
PCR Polymerase-Kettenreaktion
PEG Polyethylenglycol
PIPES Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
RF Riboflavin
s. A. spezifische Aktivität
SAM S-Adenosylmethionin
SDS Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC Größenausschlusschromatographie
SET Saccharose-EDTA-TRIS
SOB Super Optimal Broth
SOX Sulfitoxidase
TAE TRIS-Acetat-EDTA
TE TRIS-EDTA
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMAO Trimethylaminoxid
TOF Time-of-Flight-Massenspektrometrie
TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U Enzymeinheit ($\hat{=}$ 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$)
WCo Wolfram-Kofaktor
wt Wildtyp
X-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XO Xanthinoxidase

2 Zusammenfassung

Die Aldehydoxidoreduktase aus *Aromatoleum aromaticum* ist eine bakterielle AOR, die aus drei Untereinheiten in der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_2\gamma$ besteht und die Oxidation verschiedener Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren katalysiert. Die β -Untereinheit enthält dabei einen Wolfram-*bis*-Pterin-Kofaktor (WCo) im aktiven Zentrum. Über ein [4Fe-4S]-Cluster in der β -Untereinheit und vier weitere [4Fe-4S]-Cluster in der α -Untereinheit können die Elektronen auf ein FAD in der γ -Einheit übertragen werden. *In vitro* kann die Aktivität sowohl mit Benzylviologen als auch mit NAD^+ gemessen werden, als physiologischer Elektronenakzeptor kommt daher neben NAD^+ mutmaßlich auch Ferredoxin in Frage. Unter Verwendung passender Reduktionsmittel wie Ti(III) oder Eu(II) kann auch die Reduktion von Carbonsäuren zu den entsprechenden Aldehyden beobachtet werden. Das Enzym besitzt außerdem eine Hydrogenaseaktivität, die elementaren Wasserstoff zur Reduktion von Benzylviologen, NAD^+ oder Carbonsäuren nutzt. Das *aor*-Operon enthält neben den drei Strukturgenen *aorA-C* außerdem zwei weitere Gene *aorD* und *aorE*, die für putative Maturationsfaktoren kodieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf *Aromatoleum evansii* KB740 ein Expressionssystem für die AOR erstellt, das es ermöglicht, das Enzym rekombinant zu produzieren und mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen. Dabei wurden die Bedingungen so weit optimiert, dass die Aktivität der rekombinanten AOR die des nativ gereinigten Enzyms deutlich übersteigt. Neben der Aktivität wurden außerdem unter anderem der Gehalt an Wolfram und Eisen sowie FAD bestimmt. Außerdem wurden Experimente zur Hydrogenaseaktivität des Enzyms durchgeführt.

Neben dem Enzym selbst und potentiellen biotechnologischen Anwendungen ist auch der Wolframkofaktor und dessen Maturation von besonderem Interesse. In weiten Teilen entspricht die Biosynthese des WCo der des Molybdän-Kofaktors (MoCo). Trotz der chemischen Ähnlichkeit von Wolframat und Molybdat erfolgt der Einbau des WCo in die AOR dennoch sehr spezifisch. Als möglicher Ansatzpunkt für diese Diskriminierung von Molybdän und Wolfram wurden in der Literatur die beiden Paraloge der Molybdopterin-Molybdotransferase MoeA1 und MoeA2 diskutiert.

Um die Rolle dieser beiden Proteine *in vivo* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit ΔmoeA -Deletionsmutanten von *A. evansii* generiert. Mithilfe dieser Stämme konnte gezeigt werden, dass MoeA2 für die Synthese des WCo zwingend notwendig ist, die Synthese des MoCo hingegen mit beiden MoeA-Paralogen abläuft. Zusammen mit der Beobachtung, dass die beiden Maturationsfaktoren AorD und/oder AorE ebenfalls eine wichtige Rolle für die Aktivität der AOR spielen, lässt sich ein Mechanismus für die Maturation des WCo postulieren, mit dem sich der selektive Einbau von Wolfram erklären lässt.

Summary

Aldehyde Oxidoreductase from *Aromatoleum aromaticum* belongs to the clade of bacterial AORs and consists of three different subunits in a $\alpha_2\beta_2\gamma$ composition. It catalyzes the oxidation of various aldehydes to the corresponding carbonic acids. The β subunit contains a tungsten-*bis*-pterin cofactor (WCo) in the active site. Via a [4Fe-4S] cluster in the β subunit and four further [4Fe-4S] clusters in the α subunit, electrons can be transferred to a FAD molecule located in the γ subunit. Activity measurements *in vitro* are possible with benzyl viologen or NAD^+ as electron acceptor suggesting that either NAD^+ or a ferredoxin acts as the physiological electron acceptor. By the use of suitable reductants like Ti(III) or Eu(II) it is also possible to observe the reduction of carbonic acids to the aldehydes. Furthermore, AOR possesses hydrogenase activity, which allows the reduction of benzyl viologen, NAD^+ or even carbonic acids using elementary hydrogen. Besides the three structural genes *aorA-C*, the *aor* operon contains the two additional genes *aorD* and *aorE* that code for putative maturation factors.

This work shows the generation of an expression system using *Aromatoleum Evansii* KB740 as host organism that allows recombinant production and affinity chromatography based purification of AOR. After optimization of the experimental conditions, the activity of the recombinant AOR exceeds the activity of natively purified AOR by considerable amounts. This work also shows determination of tungsten and iron contents as well as FAD and furthermore contains some experiments regarding the hydrogenase activity.

Besides the enzyme itself and its potential biotechnological applications, also the WCo and its maturation arise interest. The biosynthesis of the WCo mostly follows the well-investigated pathway of molybdenum cofactor (MoCo) synthesis, nevertheless WCo gets inserted very specifically into the AOR despite the chemical similarities between tungsten and molybdenum. The two paralogues of molybdopterin molybdotransferase MoeA1 and MoeA2 have been discussed in literature as a potential explanation for this discrimination process.

To elucidate the role of these two proteins *in vivo*, ΔmoeA deletion mutants of *A. Evansii* were constructed. Using these strains, it could be shown that synthesis of the WCo strictly relies on MoeA2 while assembly of the MoCo works with either of the two paralogues. Taken together with the observation that the activity of AOR heavily depends on the presence of the maturation factors AorD and/or AorE, it is possible to postulate a mechanism for WCo maturation that explains the selective incorporation of tungsten into the enzyme.

3 Einleitung

3.1 Molybdän- und Wolframenzyme

Molybdän und Wolfram sind Übergangsmetalle der sechsten Gruppe. Beide kommen in biologischen Prozessen vor, wo sie an der Katalyse bestimmter Redox-Prozesse beteiligt sind. Mit Ausnahme der Nitrogenase, bei denen sich das Molybdän in einem Eisen-Molybdän-Kofaktor (FeMo-Co) befindet, liegen die Metallionen in allen anderen Fällen gebunden an einen Metallopterin-Kofaktor (MPT) vor (lobbi-Nivol und Leimkühler, 2013; Schwarz *et al.*, 2009). Während sich Molybdänenzyme in den meisten lebenden Organismen finden, wurden Wolframenzyme bislang nur in Archaeen und einigen Bakterien beschrieben (Bever *et al.*, 2009). Beide Elemente kommen in ihrer bioverfügbaren Form als Oxoanionen (MoO_4^{2-} bzw. WO_4^{2-}) in nanomolaren Konzentrationen in der Umwelt vor, wobei Molybdän ca. um den Faktor 100 häufiger auftritt (Bever *et al.*, 2009), und besitzen ähnliche chemische Eigenschaften. Biologisch relevant sind dabei die Übergänge zwischen den Oxidationsstufen (+IV) und (+VI), wobei auch der intermediäre (+V)-Zustand auftreten kann, weswegen diese Enzyme sowohl an obligaten Zwei-Elektronen-Prozessen als auch an Reaktionen mit einzelnen Elektronen beteiligt sein können (Hille, 2002).

Während die Ionenradien von Molybdän- und Wolframionen nahezu identisch sind, unterscheiden sich die beiden Elemente jedoch hinsichtlich ihres Redoxpotentials. Während bei Molybdänenzymen die katalysierten Reaktionen Redoxpotentiale zwischen +700 mV und -400 mV aufweisen, sind Wolframenzyme typischerweise an Reaktionen mit Standardpotentialen unterhalb von -400 mV beteiligt (Leimkühler und lobbi-Nivol, 2015; Seelmann *et al.*, 2020). Außerdem ist die Bindung zwischen Wolfram und dem Schwefel des MPT stabiler als bei Molybdän. Aufgrund dieser Eigenschaften und der Tatsache, dass viele Wolframenzyme aus thermophilen Archaeen isoliert wurden, wird vermutet, dass Wolframenzyme die ursprünglichere Form darstellen (Hille, 2002).

Allen Enzymen gemein ist die Koordination des Metallions an der Dithiolengruppe des MPT, je nach Anzahl und Modifikation der Pterin-Moleküle werden die Molybdän- und Wolframenzyme in mehrere Enzymfamilien eingeteilt (s. Abb. 1).

Die Sulfitoxidase-Familie

Bei den Enzymen der Sulfit-Oxidase-Familie (SOX), in der sich ausschließlich Molybdänenzyme befinden, liegt der Kofaktor in der einfachsten Form vor. Das Molybdän ist hier an die beiden Thiolgruppen des MPT und üblicherweise zusätzlich über die Thiolgruppe eines Cystein-Rests koordiniert. Das Molybdän liegt im oxidierten Zustand als $\text{MPT-Mo}^{\text{IV}}\text{O}_2(\text{S-Cys})$ vor. Enzyme dieser Familie katalysieren typischerweise den Transfer von Sauerstoffatomen. Neben den Sulfitoxidasen aus Vertebraten und Pflanzen sowie bakteriellen Sulfitdehydrogenasen beinhaltet diese Enzymfamilie außerdem die eukaryotischen Nitratreduktasen sowie eine große Bandbreite an weiteren Enzymen, die oftmals die Dehydroxylierung von Hydroxyaminen und verwandter Substanzen katalysieren (Hille *et al.*, 2014).

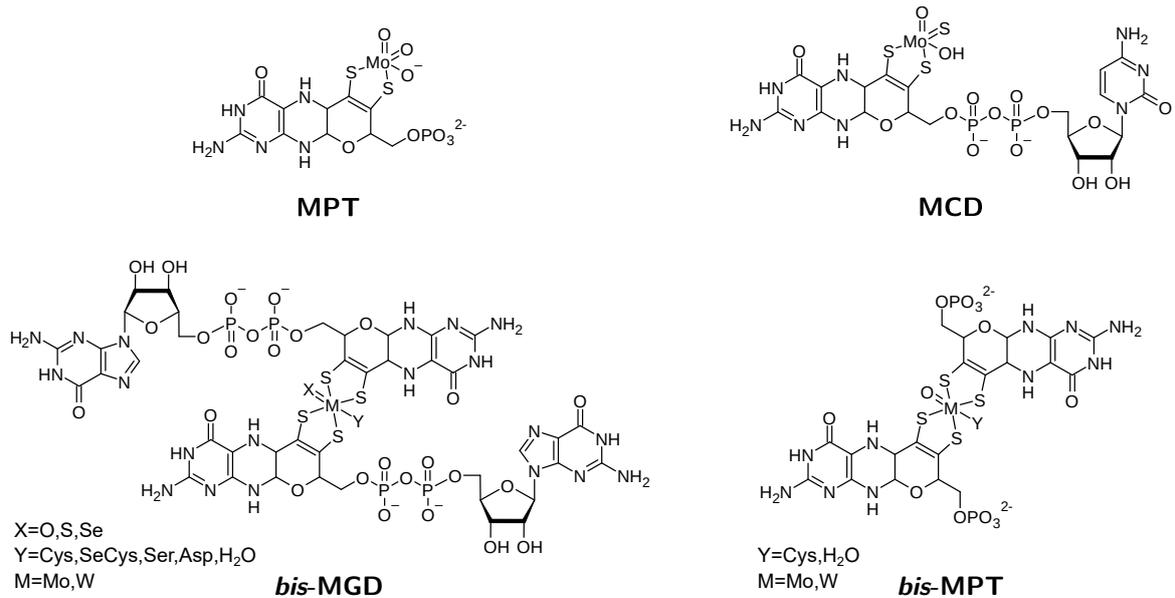


Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen MPT-Kofaktoren: MPT (SOX-Familie), MCD (XO-Familie), *bis*-MGD (DMSOR-Familie) und *bis*-MPT (AOR-Familie) (vgl. Seelmann *et al.*, 2020)

Die Xanthin-Oxidase-Familie

Bei den Enzymen der Xanthin-Oxidase-Familie (XO), die ebenfalls ausschließlich Molybdän enthalten, liegt der Kofaktor als Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD) vor, welcher einen Sulfidoliganden am Molybdän aufweist (MPT-Mo^{VI}OS(OH) im oxidierten Zustand). Diese Enzyme katalysieren oxidative Hydroxylierungen und Oxo-Transferreaktionen an ein Kohlenstoffzentrum, wobei ein Wassermolekül als Sauerstoffquelle dient (lobbi-Nivol und Leimkühler, 2013). Substrate sind dabei oft heterozyklische Aromaten oder Aldehyde (Hille *et al.*, 2014). Alle Enzyme dieser Familie enthalten weitere redoxaktive Zentren wie Eisen-Schwefel-Cluster oder FAD (Hille *et al.*, 2014). Neben den namensgebenden Xanthinoxidasen bzw. Xanthindehydrogenasen und den periplasmatischen Aldehydoxidoreduktasen finden sich in dieser Familie außerdem einige Enzyme, die aufgrund ihrer Besonderheiten bei den redoxaktiven Zentren oder Modifikationen des Kofaktors als „nicht-kanonische Mitglieder“ der XO-Familie bezeichnet werden. Beispiele hierfür sind die CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*, die Nicotinatdehydrogenase aus *Eubacterium barkeri* oder die 4-Hydroxybenzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* (Hille *et al.*, 2014).

Die DMSO-Reduktase-Familie

Die DMSO-Reduktasen bilden die dritte große Enzymfamilie. Hier finden sich sowohl Molybdän- als auch Wolframenzyme, wobei das Metall hier über zwei MPT-Guanosin-Dinukleotid-Moleküle koordiniert ist (*bis*-MGD). Als fünfter Ligand fungiert ein Sauerstoffatom, das in einigen Enzymen jedoch durch Schwefel ersetzt wird. Als sechster Li-

gand tritt entweder ein Sauerstoff-, Schwefel- oder Selenatom einer Aminosäureseitenkette oder ein Wassermolekül auf (Iobbi-Nivol und Leimkühler, 2013). Während einige Vertreter dieser Familie wie die respiratorische Nitratreduktase, die Ethylbenzaldehydrogenase, die Polysulfidreduktase oder die Arsenitreduktase bislang als reine Molybdänenzyme beschrieben wurden, finden sich bei vielen anderen Enzymen dieser Familie wie den DMSO-Reduktasen, den Trimethylaminoxid-Reduktasen (TMAOR), den dissimilatorischen Nitratreduktasen oder den Formiatdehydrogenasen sowohl Molybdän- als auch Wolframenzyme (Hille *et al.*, 2014; Seelmann *et al.*, 2020). Während die meisten dieser Enzyme nur mit einem der beiden Metalle funktionieren und bei einem Überschuss des jeweils anderen Elements ihre Aktivität verlieren, wurden auch einige Fälle beschrieben, in denen sowohl der Einbau von Molybdän als auch der Einbau von Wolfram ein aktives Enzym generiert (Seelmann *et al.*, 2020). Ein Beispiel hierfür ist die Thiosulfatreduktase von *Pyrobaculum aerophilum* (Haja *et al.*, 2019).

Viele Wolframenzyme finden sich in der Gruppe der Formiatdehydrogenasen. Die Acetylenhydratase als obligates Wolframenzym, die die Hydratisierung von Ethin zu Acetaldehyd katalysiert und für die bislang nur das Enzym aus *Pelobacter acetylenicus* beschrieben wurde, wird ebenfalls der DMSOR-Familie zugeordnet (Seelmann *et al.*, 2020).

Die Aldehydoxidoreduktase-Familie

In der Familie der Aldehydoxidoreduktasen finden sich nahezu ausschließlich Wolframenzyme. Das Metallion ist über zwei MPT-Moleküle koordiniert, die jedoch im Gegensatz zur DMSOR-Familie nicht weiter modifiziert sind. Als fünfter Ligand findet sich auch hier ein Sauerstoffatom, als sechster Ligand entweder die Thiolgruppe eines Cysteins oder ein Wassermolekül (Seelmann *et al.*, 2020).

Im Proteom des hyperthermophilen Archaeums *Pyrococcus furiosus* finden sich fünf AOR-Enzyme, die auch jeweils stellvertretend für eine Gruppe der AORs stehen. Das am längsten bekannte und daher am besten untersuchte dieser Enzyme ist die Aldehydoxidoreduktase (*sensu stricto*), die die Subfamilie der archaellen AORs begründet und die Oxidation verschiedener aliphatischer und aromatischer Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren katalysiert (Mukund und Adams, 1991). Die Formaldehydoxidoreduktase (FOR) oxidiert dagegen nur Formaldehyd und in geringem Umfang andere kurzkettige Aldehyde (Roy *et al.*, 1999). Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Oxidoreduktase (GAPOR) oxidiert spezifisch Glycerinaldehyd-3-Phosphat und ist bei *P. furiosus* Teil des Embden-Meyerhof-Wegs (Mukund und Adams, 1995). In allen drei genannten Subfamilien wurde Ferredoxin als physiologischer Elektronenakzeptor identifiziert (Mukund und Adams, 1991; Mukund und Adams, 1995; Roy *et al.*, 1999). Die beiden verbleibenden Wolframenzyme aus *P. furiosus* wurden aufgrund der damals unbekannt Substrate als WOR4 und WOR5 bezeichnet. Während die Funktion von WOR4 nicht bekannt ist (Roy und Adams, 2002), wurde für WOR5 mittlerweile gezeigt, dass es ebenfalls diverse Aldehyde oxidiert, wobei die höchsten Aktivitäten mit Hexanal und 2-Methoxybenzaldehyd gemessen wurden (Bever *et al.*, 2005).

Neben den fünf archaeellen AOR-Subfamilien existieren weitere Enzyme, die aus fakultativ oder obligat anaeroben Bakterien isoliert wurden. Zum einen sind dies die bakteriellen Aldehydoxidoreduktasen, die in ihrem Substratspektrum den archaeellen AORs ähneln, sowie die bakteriellen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Oxidoreduktasen (GOR), die mit der Gruppe der archaeellen GAPORs verwandt sind (Seelmann *et al.*, 2020).

Eine weitere Gruppe findet sich in den Klasse-II-Benzoyl-CoA-Reduktasen (BCRs), wie sie in *Geobacter metallireducens* und *Desulfosarcina cetonica* gefunden wurden (Seelmann *et al.*, 2020). Diese Proteine katalysieren im anaeroben Abbau von Aromaten die Reduktion von Benzoyl-CoA zu Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA und liegen als Komplex aus 20 Untereinheiten in der Zusammensetzung Bam[(BC)₂DEFGHI]₂ vor. Dabei enthält die Untereinheit BamB den Wolframkofaktor (Kung *et al.*, 2009).

Mit den Enzymen der YdhV-ähnlichen Proteine existiert außerdem eine Subfamilie, die anstelle des *bis*-W-MPT ein *bis*-Mo-MPT besitzen und somit als einzige Vertreter der AOR-Familie zu den Molybdänenzymen zählt. Über potentielle Substrate und die physiologische Funktion von YdhV ist bislang noch nichts bekannt (Reschke *et al.*, 2019).

3.2 Eigenschaften und Struktur der Aldehydoxidoreduktasen

Archaeelle AORs

Die bislang einzige Proteinstruktur der archaeellen AORs stammt von der AOR aus *Pyrococcus furiosus*. Es handelt sich um ein 136 kDa schweres Homodimer mit je einem *W-bis*-MPT im aktiven Zentrum, bei dem die Phosphatgruppen des Kofaktors an einem Mg²⁺-Ion koordiniert sind. Neben dem WCo befindet sich jeweils ein [4Fe-4S]-Cluster. Die Dimerisierung erfolgt über die Koordination eines Histidin- und eines Glutamatrests jeder Untereinheit an ein zentrales Fe(III)-Ion (Chan *et al.*, 1995).

Das Enzym katalysiert die Oxidation verschiedener aliphatischer und aromatischer Aldehyde, wobei die Substrate Acetaldehyd, Isovaleraldehyd, Phenylacetaldehyd und Indolacetaldehyd die höchsten Affinitäten zeigten (Roy *et al.*, 2001). Als Elektronenakzeptor fungieren *in vitro* Methylviologen, Benzylviologen oder das Ferredoxin von *Pyrococcus furiosus*, mit NAD⁺ oder NADP⁺ ist dagegen keine Aktivität beobachtbar (Hagedoorn, 2019; Mukund und Adams, 1991). Die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten werden bei Temperaturen von 80 °C und höher erreicht. Das pH-Optimum liegt im alkalischen Milieu. Die höchste Aktivität wurde bei pH 11 gemessen, wobei für höhere pH-Werte keine Daten vorliegen (Hagedoorn, 2019; Mukund und Adams, 1991).

Die AOR aus *Thermococcus* ES1 weist ähnliche Eigenschaften bezüglich Temperatur- und pH-Optimum auf. Es wurde außerdem gezeigt, dass das Enzym unter sauren Bedingungen (pH < 6) *in vitro* in der Lage ist, Acetat zu reduzieren (Heider *et al.*, 1995). Aufgrund des vielfältigen Substratspektrums, das viele Intermediate des Aminosäureabbaus beinhaltet, wird vermutet, dass die physiologische Funktion des Enzyms eine Entgiftung der Zelle durch die Oxidation anderenfalls toxischer Aldehyde ist (Heider *et al.*, 1995).

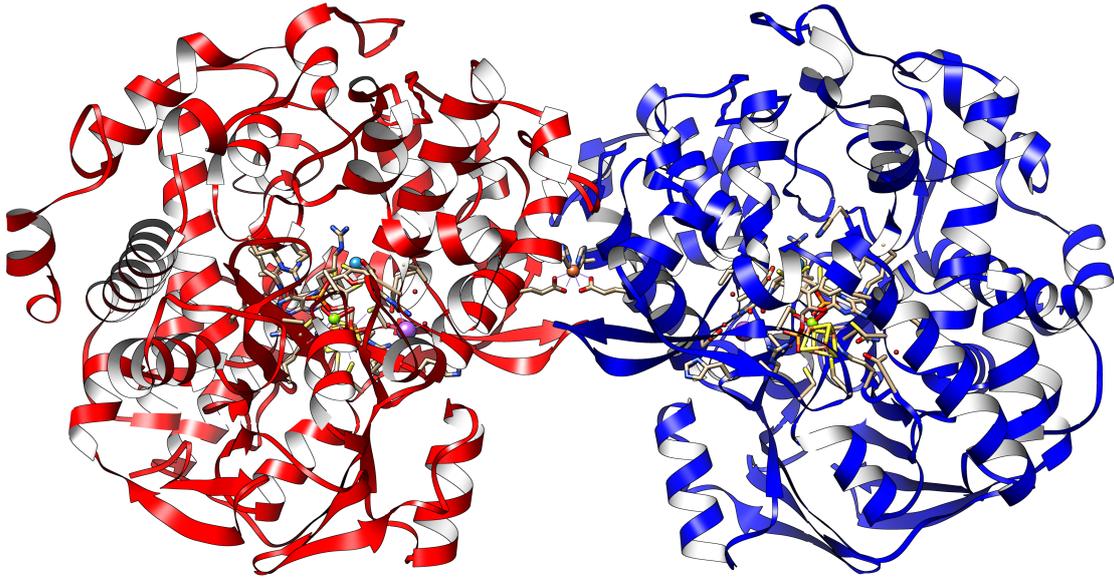


Abbildung 2: Kristallstruktur der AOR aus *P. furiosus*. Das W-Atom ist in hellblau, das Mg in grün dargestellt. Die Dimerisierung erfolgt an einem zentralen Fe(III)-Ion (Chan *et al.*, 1995).

Allen Enzymen gemein ist außerdem die extreme Sensitivität gegenüber molekularem Sauerstoff. So führen bereits wenige Minuten Exposition zur Luft zur (irreversiblen) Inaktivierung (Heider *et al.*, 1995; Mukund und Adams, 1991).

Bakterielle AORs

Auch bei den AORs bakteriellen Ursprungs gibt es einige Vertreter aus obligat anaeroben Bakterien, die als Homodimer vorliegen (Seelmann *et al.*, 2020). Aus *Eubacterium acidaminophilum* wurde außerdem eine monomere AOR isoliert (Rauh *et al.*, 2003). Daneben existiert jedoch eine weitere Gruppe von Enzymen, die sich aus drei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt. Die erste Beschreibung eines solchen Enzyms stammt von der AOR aus *Moorella thermoacetica* (ehemals *Clostridium thermoaceticum*), die aufgrund ihrer Aktivität zunächst als Carbonsäure-Reduktase (CAR) bezeichnet wurde, wobei *in vitro* je nach Reaktionsbedingungen sowohl Säurereduktion als auch Aldehydoxidation beobachtet werden können (White *et al.*, 1989). Die mit α , β und γ bezeichneten Untereinheiten besitzen Massen von 64, 14 und 43 kDa (Strobl *et al.*, 1992). Bei der chromatographischen Reinigung des Proteins lassen sich mehrere Formen des Enzyms isolieren: Während eine Form, die nur α - und β -Untereinheiten enthält, lediglich die Oxidation der Aldehyde mit Viologenen als Elektronenakzeptor katalysiert, ist der andere beschriebene Enzymkomplex, der zusätzlich die FAD enthaltende γ -Untereinheit besitzt, außerdem in der Lage, NADP⁺ als Elektronenakzeptor zu verwenden und Viologene in ihrer oxidierten Form mit NADPH zu reduzieren (Huber *et al.*, 1995; Strobl *et al.*, 1992). Der $\alpha\beta$ -Komplex besitzt eine native

Masse von 86 kDa und bildet weitere Multimere, für das vollständige Enzym wird aufgrund der Molekularmasse von ca. 300 kDa eine Zusammensetzung als $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplex vermutet (Strobl *et al.*, 1992).

Ein anderes im Detail beschriebenes bakterielles Enzym ist die AOR aus dem fakultativ anaeroben β -Proteobakterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1. Ursprünglich identifiziert wurde es als alternatives Enzym zur Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase im anaeroben Abbau von Phenylalanin (Debnar-Daumler *et al.*, 2014). Da dieses Protein Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, wird es im nachfolgenden Kapitel separat beschrieben.

Die AOR aus *Aromatoleum aromaticum*

Die AOR aus *Aromatoleum aromaticum* besteht aus den drei als α , β und γ bezeichneten Untereinheiten mit molekularen Massen von 66, 17 und 46 kDa. Die Nomenklatur richtet sich dabei nach der Reihenfolge der Gene *aorA-C*, die gemeinsam mit den Genen *aorD* und *aorE*, welche für putative Maturationsfaktoren kodieren, in einem Operon vorliegen (Arndt *et al.*, 2019). Die große β -Untereinheit (AorB) enthält das katalytische Zentrum mit dem Wolfram-Kofaktor sowie ein [4Fe-4S]-Cluster, was dem Aufbau der AOR aus *Pyrococcus furiosus* entspricht, zu der große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz besteht (49 % identische und 63 % ähnliche Aminosäuren). Daran anschließend sitzt die kleine α -Untereinheit, die vier weitere [4Fe-4S]-Cluster enthält. Die γ -Untereinheit (AorC) enthält einen FAD-Kofaktor (Arndt *et al.*, 2019). Bislang wurde eine heterohexamere $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Zusammensetzung des Enzyms angenommen (Arndt *et al.*, 2019), was jedoch durch neue Cryo-EM-Daten als widerlegt gilt und mittlerweile von einem Heteropentamer ($\alpha_2\beta_2\gamma$) ausgegangen wird (Agnieszka Winiarska und Jan Schuller, Publikation in Vorbereitung).

Auch diese AOR katalysiert die Oxidation einer Vielzahl von Aldehyden, wobei mit Phenylacetaldehyd und Benzaldehyd die höchsten Aktivitäten gemessen wurden. Auch mit Acetaldehyd, Propionaldehyd, Crotonaldehyd und vielen weiteren Verbindungen wurden nennenswerte Aktivitäten nachgewiesen (Arndt *et al.*, 2019). Als Elektronenakzeptor kam *in vitro* entweder Benzylviologen oder NAD^+ zum Einsatz, wobei die Aktivität mit letzterem bei jedem getesteten Substrat deutlich niedriger liegt (Arndt *et al.*, 2019). Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei pH 8,0, die Aktivität des Enzyms steigt bis ca. 40 °C an und fällt bei höheren Temperaturen schnell ab (Arndt *et al.*, 2019). Erwähnenswert ist außerdem die relativ geringe Anfälligkeit gegenüber molekularem Sauerstoff. Im Zell-extrakt von *A. aromaticum* behält das Enzym bei Exposition gegenüber Luft seine volle Aktivität für mindestens 24 h, in der isolierten Form geht innerhalb von 1 h die Hälfte der Aktivität verloren (Arndt *et al.*, 2019).

Auch für dieses Enzym konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist, unter entsprechenden Bedingungen die Reduktion von Carbonsäuren zu den entsprechenden Aldehyden zu katalysieren (Arndt *et al.*, 2019). Bislang sind die Aktivitäten, die *in vitro* erreicht werden aber so gering, dass es eine weitere enzymatische Umsetzung des Aldehyds oder sensitive Analytik wie Dünnschichtchromatographie oder HPLC erfordert, um die generierten Aldehyde nachweisen zu können.

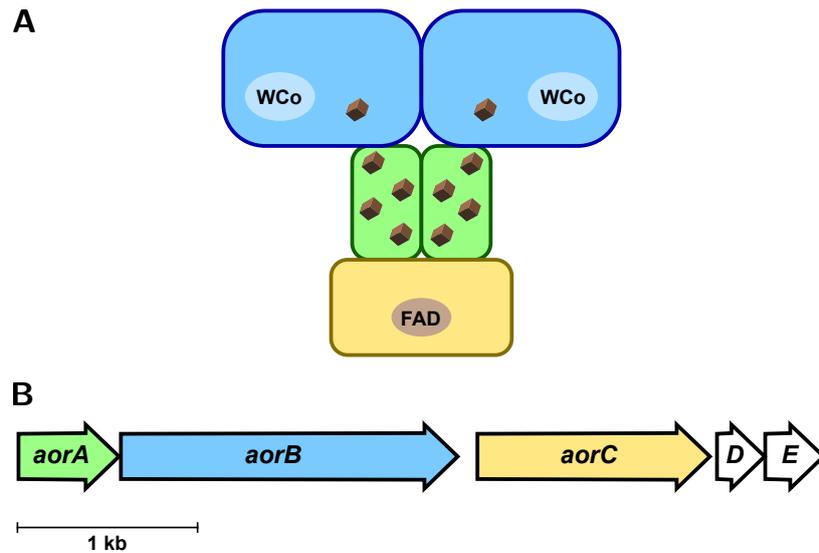


Abbildung 3: **(A)**: Modell des $\alpha_2\beta_2\gamma$ -Heteropentamers. Die β -Einheit enthält den *W-bis-MPT*-Kofaktor und ein [4Fe-4S]-Cluster. Die Elektronen können über vier weitere [4Fe-4S]-Cluster in der α -Einheit auf ein FAD-Molekül in der γ -Einheit transportiert werden.

(B): Struktur des *aor*-Operons im Genom von *A. aromaticum*. Neben den drei Strukturgenen *aorA-C* finden sich außerdem die Gene *aorD* und *aorE*, die für putative Maturationsfaktoren kodieren.

3.3 Die Biosynthese der Pterin-Kofaktoren

Die Aufnahme von MoO_4^{2-} und WO_4^{2-} in die Zelle

Die Aufnahme von Molybdat und Wolframat in die Zelle erfolgt über zu diesem Zweck exprimierte ABC-Transporter, was eine selektive Aufnahme der Übergangsmetalle gegenüber den chemisch verwandten Sulfat-, Selenat- und Selenitionen ermöglicht (Aguilar-Barajas *et al.*, 2011). Für Molybdän sind allein in *E. coli* drei verschiedene Aufnahmewege beschrieben worden. Mit dem ModABC-System liegt ein Transporter vor, der hochaffin für Molybdat ist, wobei auch Wolframat und mit geringerer Affinität außerdem auch Sulfat transportiert werden (Grunden und Shanmugam, 1997). Außerdem kann Molybdat über die Sulfat/Thiosulfat-Permease SulT und bei hohen MoO_4^{2-} -Konzentrationen im Medium auch über ein nicht weiter beschriebenes unspezifisches Anionentransportsystem aufgenommen werden (Aguilar-Barajas *et al.*, 2011). In anderen Bakterien wurden weitere Mo-transportierende Proteine gefunden (Aguilar-Barajas *et al.*, 2011).

Für die Aufnahme von Wolframat sind bislang drei verschiedene ABC-Transporter bekannt. Neben dem bereits erwähnten ModABC-System, das für Molybdat und Wolframat ähnlich hohe Affinitäten besitzt (Seelmann *et al.*, 2020), wurden die Systeme TupABC und WtpABC beschrieben. TupABC wurde erstmals in *Eubacterium acidaminophilum* beschrieben und kommt in vielen Bakterien und Archaeen vor. Das WtpABC-System, das erstmals in *Pyrococcus furiosus* beschrieben wurde, kann dagegen in Archaeen gefunden werden, die weder ModABC noch TupABC besitzen (Seelmann *et al.*, 2020). Sowohl das Tup-System als auch das Wtp-System transportieren selektiv Wolframat und weisen gegenüber Molybdat eine um Größenordnungen niedrigere Affinität auf (Bever *et al.*, 2006; Makdessi *et al.*, 2001).

Biosynthese des MoCo

Die Biosynthese des Molybdänkofaktors ist ein in allen drei Domänen des Lebens hochgradig konservierter Prozess. Die MoCo-Synthese in *E. coli* ist mittlerweile gut untersucht und beinhaltet mindestens 9 Proteine, deren Gene auf fünf verschiedenen Loci vorliegen (Leimkühler, 2020). Eine Übersicht findet sich in Leimkühler und Iobbi-Nivol (2015) und Leimkühler (2020). Die Synthese des WCo ist schematisch in Abb. 4 wiedergegeben.

Die Synthese des Kofaktors geht vom GTP aus, das durch die Proteine MoaA und MoaC zu cPMP umgesetzt wird. Diese Substanz stellt das erste isolierbare Intermediat dar und wurde zunächst als *Precursor Z* bezeichnet. Dabei ist MoaA ein SAM-Radikal-Enzym, das die Zyklisierung von GTP zum (8S)-3',8-cyclo-7,8-dihydroguanosintriphosphat katalysiert, welches von MoaC zum cPMP umgelagert wird (Hover *et al.*, 2013).

Im anschließenden Schritt wird die zyklische Phosphatgruppe gespalten und die an den Positionen C1 und C2 kovalent gebundenen Sauerstoffatome in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten durch Schwefel ersetzt. Beide Teilreaktionen werden von einem als MPT-Synthase bezeichneten Enzymkomplex katalysiert, der aus je zwei Einheiten der Proteine MoaD und MoaE besteht. Dabei bildet ein MoaE-Dimer den Kern des Komplexes. Die MoaD-Einheiten binden an der Außenseite des Komplexes und weisen an ihren

C-terminalen Glycinresten eine Thiocarboxylatgruppe auf. MoeE bindet das cPMP, worauf das Schwefelatom von MoeD auf cPMP übertragen wird. Während das hemisulfurierte Intermediat am Komplex gebunden bleibt, dissoziiert MoeD und wird durch eine wiederum mit Schwefel beladene MoeD-Untereinheit ersetzt. Nach dem Einbau des zweiten Schwefelatoms dissoziiert das entstandene MPT vom Komplex (Daniels *et al.*, 2007; Leimkühler, 2020). Die Regeneration des C-terminalen Thiocarboxylats von MoeD erfolgt durch MoeB, welches MoeD in einem ersten Schritt am C-Terminus adenyliert (Leimkühler *et al.*, 2001). Für *E. coli* wurde gezeigt, dass die Proteine IscS und TusA involviert sind, die beladen mit einem Persulfid auf einem Cysteinrest als Schwefel-Carrier fungieren. Als Quelle für das Schwefelatom wurde Cystein identifiziert, die genauen Mechanismen sind bislang aber noch nicht abschließend geklärt (Leimkühler, 2020).

Die Ligation des Molybdats in das MPT-Molekül erfolgt durch die Proteine MogA und MoeA. Dabei bildet sich durch die Adenylierung von MPT durch MogA ein Intermediat (MPT-AMP), das weiter zu MoeA transferiert wird. Hier erfolgt die Ligation mit dem Molybdat bei gleichzeitiger Abspaltung des Adenosins. MogA und MoeA ermöglichen die Ligation bei physiologischen Konzentrationen von MoO_4^{2-} , bei hohen Konzentrationen kann die Reaktion auch in Abwesenheit der beiden Proteine stattfinden (Neumann und Leimkühler, 2008). Es wird außerdem vermutet, dass MogA und MoeA für den bevorzugten Einbau von Molybdat gegenüber Wolframat verantwortlich sind (Leimkühler, 2020; Llamas *et al.*, 2006). In anderen Organismen sind teilweise andere Proteine für die Ligation verantwortlich. So wird die Adenylierung des MPT in Archaeen nicht von MogA, sondern vom homologen MoeB durchgeführt (Bever *et al.*, 2007). In Pflanzen übernimmt Cnx1 die Funktionen von MogA und MoeA (Bever *et al.*, 2007).

Je nach Enzymfamilie sind weitere Modifikationen des Mo-MPT erforderlich. Das Protein MobA katalysiert in einer zweistufigen Reaktion die Dimerisierung des Mo-MPT zum *bis*-Mo-MPT und die anschließende Ligation mit GTP zum *bis*-MGD (DMSOR-Familie). MCD (XOR-Familie) entsteht durch die Ligation von Mo-MPT mit CTP durch das Protein MocA. Die Sulfurierung des Molybdäns, wie sie in den Enzymen der XOR-Familie und in einigen DMSOR-Enzymen vorkommt, erfordert zunächst die Bindung des Kofaktors an spezielle Chaperone, wo der Sauerstoffligand von einer Cysteindesulfurase durch Schwefel ausgetauscht wird. (Leimkühler, 2020).

WCo-Synthese und Diskriminierung zwischen Molybdän und Wolfram

Nur in einigen Fällen sind Molybdän- und Wolframenzyme auch bei Einbau des jeweils anderen Metalls aktiv. So wurde für die Formiatdehydrogenase aus *Desulfovibrio alaskensis* gezeigt, dass abhängig von den Konzentrationen im Medium sowohl MoO_4^{2-} als auch WO_4^{2-} verbaut werden, wobei die Wolframvariante eine um den Faktor 20 höhere spezifische Aktivität aufweist (Mota *et al.*, 2011). Auch für einige andere einzelne Enzyme aus den Subfamilien der Thiosulfatreduktasen, TMAO-Reduktasen und Nitratreduktasen wurde gezeigt, dass sowohl die Moco- als auch die WCo-haltige Variante aktiv sind (Seelmann *et al.*, 2020).

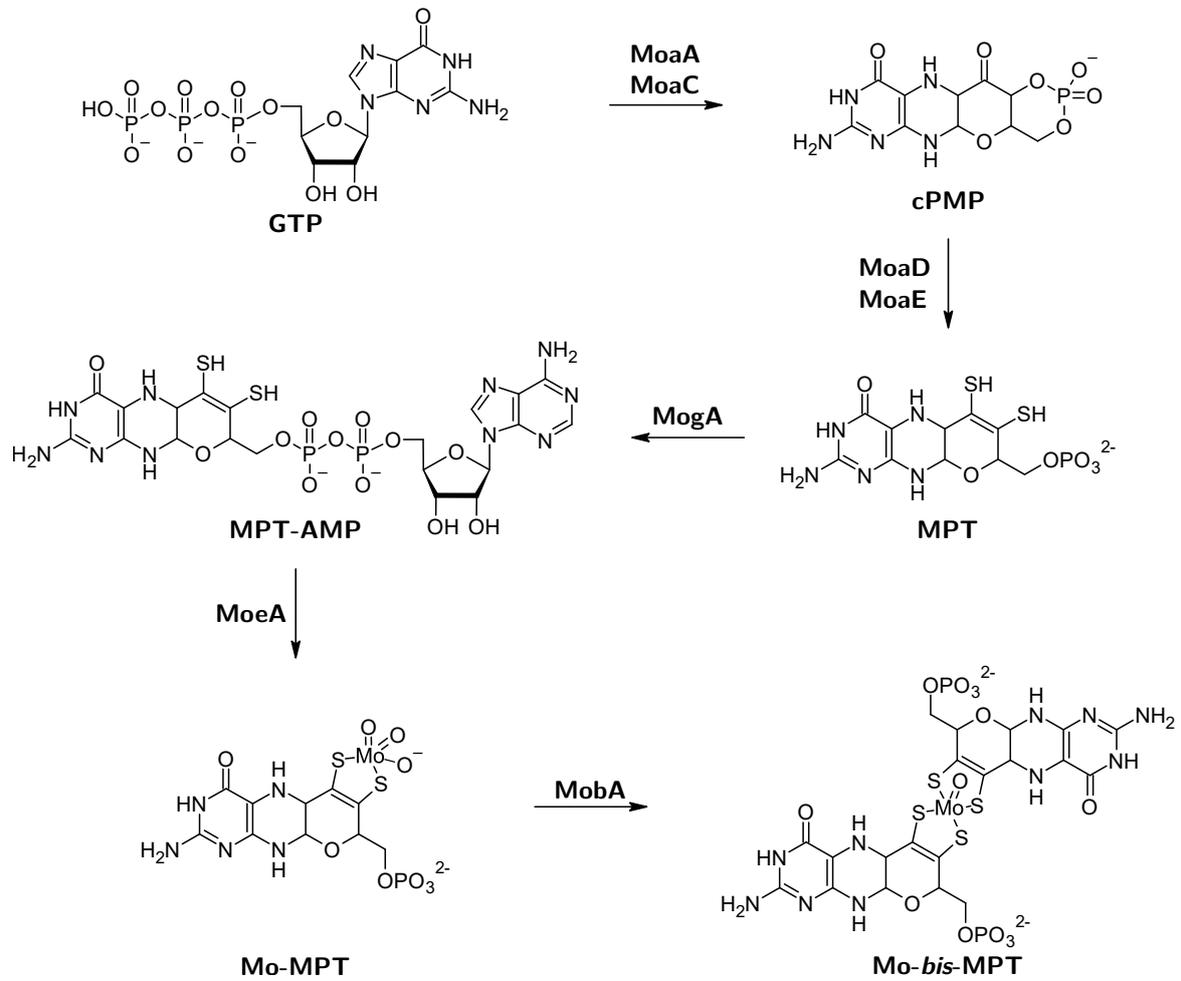


Abbildung 4: Biosynthese des MoCo und an der Synthese beteiligte Proteine in *E. coli*.

Im Allgemeinen stellen diese Beispiele jedoch Einzelfälle dar. Die meisten Enzyme sind nur mit einem der beiden Metalle aktiv. So wurde unter anderem für die Nitratreduktasen von *E. coli* und *Paracoccus pantotrophus in vivo* ein inhibierender Effekt von Wolfram beschrieben, der daraus resultiert, dass anstelle des MoCo ein WCo verbaut wird. (Gates *et al.*, 2003). Umgekehrt führten auch Versuche, das Wolfram in den Enzymen von *P. furiosus* durch Molybdän oder Vanadium zu ersetzen, zum Verlust der Enzymaktivität (Mukund und Adams, 1996). Für Organismen, die neben Molybdänenzymen auch Wolframenzyme besitzen, ist der selektive Einbau des entsprechenden Metallions also von großer Bedeutung.

Trotz der ähnlichen Eigenschaften von Molybdän und Wolfram erfolgt der Einbau des WCo in die entsprechenden Enzyme in vielen Fällen sehr spezifisch. Der Mechanismus dieser Diskriminierung ist bislang ungeklärt. Einen möglichen Ansatzpunkt für Erklärungen bietet die Ligation des Metallions in das MPT durch MoeA: Während *E. coli* nur ein *moeA*-Gen besitzt, liegen in den Genomen vieler anderer Bakterien und aller Archaeen zwei *moeA*-Paraloga vor. Es wird daher spekuliert, ob die beiden Genprodukte die Ligation des MPT jeweils spezifisch für eines der beiden Elemente katalysieren (Bever *et al.*, 2009). Zum Ablauf der Dimerisierung des W-MPT zum W-*bis*-MPT existiert bislang kein gesichertes Wissen.

3.4 Zielsetzung

Vor Beginn der hier beschriebenen Arbeiten wurden alle Experimente mit der AOR mit nativ gereinigtem Enzym aus *Aromatoleum aromaticum* EbN1 Δpdh durchgeführt (siehe Arndt *et al.*, 2019). Dieses Verfahren ist sowohl bei der Kultivierung der Zellen als auch bei der Reinigung des Proteins mit einem hohen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden, da die Zellen im Fermenter angezogen werden müssen und die anschließende Reinigung des Proteins drei konsekutive Chromatographieschritte beinhaltet. Eine rekombinante Expression in *E. coli* gestaltet sich aufgrund der fehlenden Proteine für die Maturation des Wolfram-Kofaktors schwierig. Versuche, die Expression von AOR heterolog in *Acidovorax* sp. JS42 durchzuführen, waren bislang nicht erfolgreich. Wie jedoch in Arndt (2020) erstmals beschrieben wurde, lässt sich die AOR in *Aromatoleum evansii* KB740 heterolog exprimieren und aufreinigen. Dieses Expressionssystem sollte mit der vorliegenden Arbeit etabliert werden, um größere Mengen des Enzyms herstellen zu können und die AOR für molekularbiologische Fragestellungen zugänglich zu machen.

Zu den Vorgängen, die zur Diskriminierung zwischen Molybdän und Wolfram bei der Assemblierung des Kofaktors bzw. bei dessen Einbau ins Enzym führen, existieren bislang nur Vermutungen. Es wird angenommen, dass die paralogen Gene *moeA1* und *moeA2* für diesen Prozess verantwortlich sein könnten (Bever *et al.*, 2009). Im Genom von *A. aromaticum* finden sich insgesamt drei als *moeA* annotierte Gene, wobei das Expressionsprodukt von *moeA3* sehr wahrscheinlich ein Enzym aus der Gruppe der Nicotinamid-Mononukleotid-Deaminasen und ADP-Ribose-Pyrophosphatasen darstellt und nicht an der Ligation der Übergangsmetalle an MPT beteiligt ist (Arndt, 2020). Bei den anderen beiden Proteinen MoeA1 und MoeA2 konnte bislang keine Zuordnung zu den Elementen Mo

und W getroffen werden. Beide Proteine können in *E. coli* rekombinant exprimiert werden, von MoeA2 liegt zudem eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,1 Å vor (Arndt, 2020). *In vitro*-Experimente zum Bindungsverhalten mit den jeweiligen Metallionen blieben jedoch bislang ohne eindeutige Ergebnisse.

Vor diesem Hintergrund sollte die Charakterisierung der beiden MoeA-Proteine fortgeführt werden. Neben der rekombinanten Expression der Proteine – unter anderem mit dem Ziel, auch MoeA1 zu kristallisieren – sollte außerdem versucht werden, die physiologische Rolle der Proteine mittels eines *in vivo*-Ansatzes aufzuklären. Zu diesem Zweck sollten $\Delta moeA$ -Deletionsmutanten von *A. Evansii* erstellt werden, die jeweils nur eines der beiden *moeA*-Paraloge besitzen. Diese Stämme sollten auf ihr Wachstumsverhalten unter verschiedenen Bedingungen und ihre Fähigkeit zur Produktion aktiver Molybdän- und Wolframenzyme untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Enzyme

Die Hauptbestandteile der Kulturmedien wurden von den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Applichem (Darmstadt) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Für anaerobe Arbeiten kam als Atmosphäre Formiergas 5 der Firma Nippon Gases (Düsseldorf) zum Einsatz. Wo nicht anders angegeben, wurden für molekularbiologische Arbeitsschritte Enzyme von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet.

4.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten und neu generierten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgeführt. Alle Plasmide sind in Tab. 2 aufgelistet. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) bezogen und sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete und während dieser Arbeit neu generierte Bakterienstämme

Name	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , ϕ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (rK-mK ⁺), λ ⁻	Woodcock <i>et al.</i> (1989)
<i>E. coli</i> WM3064	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> Δ M15 RP4 1360 Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341::[erm pir]</i>	Dehio und Meyer (1997)
<i>E. coli</i> JW0811-1	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787::rrnB-3</i> , λ ⁻ , Δ <i>moeA727::kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Baba <i>et al.</i> (2006)
<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1		Rabus und Widdel (1995)
<i>Aromatoleum evansii</i> KB740		Anders <i>et al.</i> (1995), Rabus <i>et al.</i> (2019)
<i>Aromatoleum evansii</i> pASG105_AORshort	<i>Aromatoleum evansii</i> KB740 mit Plasmid	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> pASG105_AORfull	<i>Aromatoleum evansii</i> KB740 mit Plasmid	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> Δ <i>moeA1</i>	Δ GO615_RS10170:: <i>cat</i> (Cam ^R)	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> Δ <i>moeA2</i>	Δ GO615_RS12815:: <i>cat</i> (Cam ^R)	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> Δ <i>moeA1</i> pASG105_AORfull	Δ GO615_RS10170:: <i>cat</i> (Cam ^R) mit Plasmid	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> Δ <i>moeA2</i> pASG105_AORfull	Δ GO615_RS12815:: <i>cat</i> (Cam ^R) mit Plasmid	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> aorDE ki	GO615_RS08755::pK19mobsacB_aorDEki	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> Δ <i>moeA2</i> pASG105_AOR_moeA2	Δ GO615_RS12815:: <i>cat</i> (Cam ^R) mit Plasmid	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> Δ <i>moeA2</i> pASG105_AOR_moeA2	Δ GO615_RS12815:: <i>cat</i> (Cam ^R) mit Plasmid	diese Arbeit
<i>Aromatoleum evansii</i> aorDE ki pASG105_AORshort	GO615_RS08755::pK19mobsacB_aorDEki mit Plasmid	diese Arbeit

Tabelle 2: Verwendete und in dieser Arbeit neu generierte Plasmide

Name	Eigenschaften / Inserts	Referenz
pEntry	Km ^R , <i>lacZ</i> ⁺ ColE1 ori	IBA, Göttingen
pASG5	Amp ^R , <i>lacZ</i> ⁺ ColE1 ori	IBA, Göttingen
pASG105	Amp ^R , <i>lacZ</i> ⁺ ColE1 ori	IBA, Göttingen
pASG5mob_ori(-)	Amp ^R , <i>lacZ</i> ⁺ pBBR ori, mob-site	AG Heider
pASG105mob_ori(-)	Amp ^R , <i>lacZ</i> ⁺ pBBR ori, mob-site	AG Heider
pK19mobsacB	Km ^R , pMB1ori, <i>sacB</i> , <i>lacZ</i> ⁺ , <i>mob</i> (oriTRP4)	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pEntry-AORshort-EbN1	Km ^R , EB_RS13980 - 13990	Arndt (2020)
pASG105-AORshort-EbN1	Amp ^R , EB_RS13980 - 13990	Arndt (2020)
pEntry_AORfull	Km ^R , EB_RS13980 - 14000	diese Arbeit
pASG105_AORfull	Amp ^R , EB_RS13980 - 14000	diese Arbeit
pK19mobsacB_moeA1del_camRP	Km ^R , Deletionsvektor für GO615_RS10170, <i>aacC1</i>	diese Arbeit
pK19mobsacB_moeA2del_camRP	Km ^R , Deletionsvektor für GO615_RS12815, <i>aacC1</i>	diese Arbeit
pEntry_moeA1_JS42	Km ^R , AJS_RS15895	Arndt (2020)
pASG105_moeA1_JS42	Amp ^R , AJS_RS15895	diese Arbeit
pEntry_moeA1_EbN1	Km ^R , EB_RS18635	Arndt (2020)
pASG105_moeA1_EbN1	Amp ^R , EB_RS18635	diese Arbeit
pASG5_moeA2_EbN1	Amp ^R , EB_RS02905	Arndt (2020)
pK19mobsacB_aorDEki	Km ^R , Fragment von GO615_RS08755-08750	diese Arbeit
pASG105_AOR_moeA1	Amp ^R , EB_RS13980 - 14000, EB_RS18635	diese Arbeit
pASG105_AOR_moeA2	Amp ^R , EB_RS13980 - 14000, EB_RS02905	diese Arbeit

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz	Zweck
1-29	AorA_ ebA5004fw	AAGCTCTTCAATGTGGAAATCGCTTCACATTGACCC	Stargate-Klonierung <i>aor</i> -Operon
1-43	AorE_ ebA5010stop3rv	AAGCTCTTCACCCCATTGCTTGCTGCGCTCGTCTG	Stargate-Klonierung <i>aor</i> -Operon
1-48	moeA1_Flanke_rv	CGCGTAGCCGTCCATC	Validierung der Δ <i>moeA1</i> -Mutante
1-49	moeA1_Flanke_fw	ATCGTGTGGGCCGAGGGGC	Validierung der Δ <i>moeA1</i> -Mutante
1-50	moeA2_Flanke_rv	GGCACGTTGCACGGCGC	Validierung der Δ <i>moeA2</i> -Mutante
1-56	MoeA2delV5fw	CTATGACCATGATTACGCCATGATGGCACTCGACTTGCC	Generierung <i>moeA2</i> - Deletionsvektor
1-59	MoeA2delCamR3rv	GTTGGTATGTCGCGTTTAAGGGCACCAATAAC	Generierung <i>moeA2</i> - Deletionsvektor
1-60	MoeA2delCamR3fw	CCTTAAACGCGACATACCAACAGGATGACG	Generierung <i>moeA2</i> - Deletionsvektor
1-61	MoeA2del3Vrv	GCTCGGTACCCGGGGATCCTGCGATGACGTGGATACAGG	Generierung <i>moeA2</i> - Deletionsvektor
1-62	MoeA1delV5fw	CTATGACCATGATTACGCCACAGTTCCTGCAGACGCTG	Generierung <i>moeA1</i> - Deletionsvektor
1-65	MoeA1delCamR3rv	TCATCTCACCGCGTTTAAGGGCACCAATAAC	Generierung <i>moeA1</i> - Deletionsvektor
1-66	MoeA1delCamR3fw	CCTTAAACGCGGTGAGATGATCCGCTTCC	Generierung <i>moeA1</i> - Deletionsvektor
1-67	MoeA1del3Vrv	GCTCGGTACCCGGGGATCCTATGCCGATCACCGACCAG	Generierung <i>moeA1</i> - Deletionsvektor

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide (Forts.)

Nr.	Name	Sequenz	Zweck
1-73	MoeA2del5CamRpriv	TCACAGGTATCTGGATGCTGCGTTCGCTC	Generierung <i>moeA2</i> -Deletionsvektor
1-74	MoeA2del5CamRpfw	CAGCATCCAGATACCTGTGACGGAAGATCAC	Generierung <i>moeA2</i> -Deletionsvektor
1-75	MoeA1del5CamRpriv	TCACAGGTATCACGAACGCGCTTCGTCGAAC	Generierung <i>moeA1</i> -Deletionsvektor
1-76	MoeA1del5CamRpfw	AGCGCGTTCGTGATACCTGTGACGGAAGATCAC	Generierung <i>moeA1</i> -Deletionsvektor
1-79	AORseq1	GACATGGTGATCTTCGAAGG	Sequenzierung <i>aor</i> -Operon
1-80	AORseq2	CTGTCGATGAGCGTCAAG	Sequenzierung <i>aor</i> -Operon
1-81	AORseq3	CGACGGCCACTTCGAATC	Sequenzierung <i>aor</i> -Operon
2-3	CamR_Flanke_rv	GGTACATTGAGCAACTGACTG	Validierung von Deletionsmutanten
2-4	CamR_Flanke_fw	GCAAGATGTGGCGTGTTACG	Validierung von Deletionsmutanten
2-5	<i>moeA1</i> _5UTR3	AGACACCAACACGATGATCG	Validierung der Δ <i>moeA1</i> -Mutante
2-6	<i>moeA1</i> _3UTR3	TGGAGTCTCTTCGAGTTTCC	Validierung der Δ <i>moeA1</i> -Mutante
2-7	<i>moeA2</i> _5UTR3	CGTTCCTGCTGCTCTCG	Validierung der Δ <i>moeA2</i> -Mutante
2-8	<i>moeA2</i> _3UTR3	CAGGAAGTTGCCGCGACG	Validierung der Δ <i>moeA2</i> -Mutante

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide (Forts.)

Nr.	Name	Sequenz	Zweck
2-9	moeA2_Flanke_fw2	GACCTTCTACCAGTTCGTCC	Validierung der Δ moeA2-Mutante
2-10	Gibson_aorDki_for	GCTCGGTACCCGGGGATCCTATCGCCTTCCTCGACTCG	Disruptionsmutante Δ aorDE in <i>A. Evansii</i>
2-11	Gibson_aorDki_rev	CTATGACCATGATTACGCCAATACGGTTGCCCTTGCGATC	Disruptionsmutante Δ aorDE in <i>A. Evansii</i>
2-12	pAor_moeA1_for	AAGCTGAGCCTCGCCCACTCACATTTACG	Klonierung Komplementationsplasmid
2-13	pAor_moeA1_rev	AAAAGCTTCATGATTTTCAGTATAACAACCTCGC	Klonierung Komplementationsplasmid
2-14	pAor_moeA2_for	AAGCTGAGCGCAATGATAATCAGCAGTGTGG	Klonierung Komplementationsplasmid
2-15	pAor_moeA2_rev	AAAAGCTTTCCATCCGGTGAAACGTCCG	Klonierung Komplementationsplasmid
2-24	AORseq4	GCCTGCAGTTCAAGGACG	Sequenzierung aor-Operon
2-25	AORseq5	TCGTGCGCTATCGCTTCG	Sequenzierung aor-Operon
	pEntry_for	GGGTTATTGTCTCATGAGCG	Sequenzierung pEntry-Vektoren
	pEntry_rev	CCCCTGATTCTGTGGATAACCG	Sequenzierung pEntry-Vektoren
	pASG_for	GAGTTATTTTACCACTCCCT	Sequenzierung pASG-Vektoren
	pASG_rev	CGCAGTAGCGGTAAACG	Sequenzierung pASG-Vektoren

4.3 Nährmedien und sonstige Lösungen

Alle Nährmedien und Medienzusätze sind in Tab. 4 aufgelistet, alle Puffer, Färbelösungen und sonstigen Reagenzien finden sich in Tab. 5. Alle Medien und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Medien und Medienzusätze wurden entweder durch Autoklavieren (121 °C , min. 20 min) oder durch Sterilfiltration (Porendurchmesser < 0,22 µm) sterilisiert.

Tabelle 4: Verwendete Medien und –zusätze

Lösung	Bestandteil	Endkonzentration
Anhydrotetracyclinlösung	gelöst in DMF	2 mg/ml
LB-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	für Festmedium: Agar	15 g/l
SOB-Medium	Trypton	50 g/l
	Hefeextrakt	12,5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	2,0 g/l
	KCl	2,5 mM
Transformationspuffer ^c	PIPES	10 mM
	CaCl ₂	15 mM
	KCl	250 mM
		titrieren bis pH 6,7
	MnCl ₂	55 mM
<i>Thauera aromatica</i> -Medium (anaerob)	NH ₄ Cl	530 mg/l
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200 mg/l
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	25 mg/l
	KNO ₃	1000 mg/l
	Na-Benzoesäure	500 mg/l
	Phosphatpuffer (s.u.) ^a	2,5 % (v/v)
	Spurenelemente (SL-10) ^a	1 % (v/v)
	Vitamine (VL-7) ^b	0,5 % (v/v)
	Se/W-Lösung ^a	0,1 % (v/v)
	für Festmedium: Agar	15 g/l

Tabelle 4: Verwendete Medien und –zusätze (Forts.)

Lösung	Bestandteil	Endkonzentration
<i>Thauera aromatica</i> -Medium (aerob)	NH ₄ Cl	530 mg/l
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200 mg/l
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	25 mg/l
	Na-Succinat	5 mM
	Phosphatpuffer (s.u.) ^a	2,5 % (v/v)
	Spurenelemente (SL-10) ^a	1 % (v/v)
	Vitamine (VL-7) ^b	0,5 % (v/v)
	Se/W-Lösung ^a	0,1 % (v/v)
Phosphatpuffer 1,28 M pH 7,8	K ₂ HPO ₄	178,22 g/l
	KH ₂ PO ₄	35,32 g/l
Spurenelementlösung SL-10	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5200 mg/l
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2100 mg/l
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100 mg/l
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	24 mg/l
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	29 mg/l
	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36 mg/l
	H ₃ BO ₃	30 mg/l
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	144 mg/l
	NaOH	titrieren pH 6,5
Vitaminlösung VL-7	Cyanocobalamin	100 mg/l
	Pyridoxamindihydrochlorid	300 mg/l
	Thiamindichlorid	20 mg/l
	Ca-D(+)-Pantothenat	100 mg/l
	4-Aminobenzoessäure	80 mg/l
	D(+)-Biotin	20 mg/l
	Nicotinsäure	200 mg/l
Se/W-Lösung	NaOH	400 mg/l
	Na ₂ SeO ₃	4 mg/l
	Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	8 mg/l

Tabelle 4: Verwendete Medien und –zusätze (Forts.)

Lösung	Bestandteil	Endkonzentration
Grundmedium (<i>Aromatoleum aromaticum</i>)	KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
	NH ₄ Cl	0,3 g/l
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g/l
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g/l
	NaNO ₃	0,3 g/l
	KH ₂ PO ₄ ^a	4 mM
	K ₂ HPO ₄ ^a	16 mM
	Spurenelemente (SL-10) ^a	0,1 % (v/v)
	Vitamine (VL-7) ^a	0,1 % (v/v)
	Se/W-Lösung ^a	0,1 % (v/v)
	Phenylalanin ^a	0,5 mM
	Mating-Agar	Na ₂ SO ₄
NaCl		1,0 g/ml
NaNO ₃		2,55 g/l
NH ₄ Cl		1,6 g/l
Trypton		10 g/l
Agar		15 g/l
Na-Benzoat ^a		4 mM
KH ₂ PO ₄ ^a		4 mM
K ₂ HPO ₄ ^a		16 mM
MgCl ₂ ^a		1,2 mM
CaCl ₂ ^a		0,6 mM
Na-Pyruvat ^b		5 mM
Na-Acetat ^b		5 mM
Spurenelemente (SL-10) ^a		0,1 % (v/v)
Vitamine (VL-7) ^a		0,1 % (v/v)
Se/W-Lösung ^a		0,1 % (v/v)
2,6-Diaminopimelinsäure ^b		50 µM
TGYEP-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	K ₂ HPO ₄	8,3 g/l
	KH ₂ PO ₄	6,8 g/l
	Agar	15 g/l
	Glucose-Lösung 40 % (w/v) ^a	1,25 % (v/v)
	Na ₂ MoO ₄ ^a	10 µM
	für Festmedium: Agar	15 g/l

Tabelle 4: Verwendete Medien und –zusätze (Forts.)

Lösung	Bestandteil	Endkonzentration
Formiat-Topagar	Natriumformiat	250 mM
	Benzylviologen	1 mg/ml
	Anhydrotetracyclin	0,2 ppm
	Agarose	8 g/l

(a) Lösung wurde separat autoklaviert und erst vor Verwendung zugegeben.

(b) Lösung wurde separat sterilfiltriert und erst vor Verwendung zugegeben.

(c) Siehe Inoue *et al.* (1990)

Tabelle 5: Verwendete Puffer und sonstige Lösungen

Lösung	Bestandteil	Endkonzentration
Aktivitätsstain Färbelösung	NAD ⁺	1 mM
	Phenazinmethosulfat	1,3 mM
	Nitroblautetrazoliumchlorid	0,5 mM
Isothermaler Reaktionspuffer 5x	MgCl ₂	42 mM
	dNTPs	je 0,84 mM
	DTT	42 mM
	NAD ₊	4,2 mM
	PEG-8000	210 mg/ml
SET-Puffer	TRIS	50 mM
	EDTA	65 mM
	Saccharose	200 g/l titrieren bis pH 7,6
TE-Puffer	TRIS	10 mM
	EDTA	1 mM
TAE-Puffer	TRIS	4,84 g/l
	Essigsäure	1,14 ml/l
	EDTA 0,5 M pH 8,0	2 ml/l
Gibson-Assembly-Mix	Isothermaler Reaktionspuffer 5x	20 % (v/v)
	T5 Exonuklease	4 U/ml
	Phusion DNA-Polymerase	ca. 2 µg/ml
	Taq Ligase	4 U/ml

Tabelle 5: Verwendete Puffer und sonstige Lösungen (Forts.)

Lösung	Bestandteil	Endkonzentration
Grundpuffer (Affinitätschromatographie)	TRIS	100 mM
	KCl	150 mM
	Glycerol	10 % (v/v)
		titrieren bis pH 8,0
Nativ-Ladepuffer	TRIS/HCl pH 6,8	125 mM
	Glycerol	20 % (v/v)
	Bromphenolblau	
Nativ-Laufpuffer	TRIS	3 g/l
	Glycin	14,4 g/l
Nativ-PAGE	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	7 %
	TRIS/HCl pH 8,8	383 mM
PAGE-Entfärbelösung	Ethanol	20 % (v/v)
	Essigsäure	20 % (v/v)
PAGE-Färbelösung	Ethanol	20 % (v/v)
	Essigsäure	20 % (v/v)
	Coomassie Brillantblau R-250	0,25 % (w/v)
P1 (alkalische Lyse)	TRIS	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAse	0,1 mg/ml
		titrieren bis pH 8,0
P2 (alkalische Lyse)	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
P3 (alkalische Lyse)	Kaliumacetat	2,2 M
	Essigsäure	0,8 M
SDS-Probenpuffer	TRIS/HCl pH 6,8	100 mM
	β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
	SDS	4 % (w/v)
	Glycerol	39 % (v/v)
	Bromphenolblau	

Tabelle 5: Verwendete Puffer und sonstige Lösungen (Forts.)

Lösung	Bestandteil	Endkonzentration
SDS Sammelgel	TRIS/HCl pH 6,8	115 mM
	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	7 %
	SDS	0,1 % (w/v)
SDS Trenngel	TRIS/HCl pH 8,8	410 mM
	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	variabel
	SDS	0,1 % (w/v)
	optional: Glycerol	8 % (v/v)
SDS-Laufpuffer	Glycin	14,4 g/l
	TRIS	3,02 g/l
	SDS	1 g/l

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Kultivierung von *Aromatoleum aromaticum*

Zur Gewinnung genomischer DNA von *Aromatoleum aromaticum* EbN1 wurden 100 ml anaerobes Grundmedium in Müller-Krempel-Flaschen (siehe Tab. 4) mit 2 % (v/v) Bakteriensuspension einer alten Kulturflasche beimpft und anschließend bei 28 °C bebrütet. Der Nitratgehalt der Kultur wurde mehrmals wöchentlich mit Nitratteststäbchen überprüft (Nitrat/Nitrit Quantofix, Macherey-Nagel, Düren). Falls kein Nitrat mehr vorhanden war, wurde 2 mM NaNO₃ und 0,5 mM Phenylalanin aus anaerobisierten und autoklavierten Stocklösungen nachgefüttert. Nach 2-3 Wochen konnte die Kultur geerntet werden.

4.4.2 Anaerobe Kultivierung von *Aromatoleum evansii*

Die anaerobe Kultivierung von *Aromatoleum evansii* KB 740 erfolgte in 100 ml anaerobem *Thauera aromatica*-Medium in Müller-Krempel-Flaschen. Bei Expressions- und Deletionsstämmen wurden die entsprechenden Selektionsantibiotika zugegeben. Dauerkulturen wurden jeweils mit 2 % (v/v) in frisches Medium überimpft und bei 28 °C inkubiert. Der Nitratgehalt der Kultur wurde mehrmals wöchentlich mit Nitratteststäbchen überprüft (Nitrat/Nitrit Quantofix, Macherey-Nagel, Düren). Falls kein Nitrat mehr vorhanden war, wurde 10 mM KNO₃ und 3,5 mM Natriumbenzoat aus anaerobisierten und autoklavierten Stocklösungen nachgefüttert. Die Anzucht einer Flüssigkultur aus einer Einzelkolonie erfolgte analog, wobei mit der Kolonie zunächst 10 ml Medium im Hungate-Röhrchen und hieraus nach 3-4 Tagen die Kulturflasche beimpft wurde.

4.4.3 Aerobe Kultivierung von *Aromatoleum evansii*

Die aerobe Kultivierung von *Aromatoleum evansii* wurde lediglich zum Zweck der rekombinanten Expression von Proteinen durchgeführt, es wurden keine Dauerkulturen gehalten. Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden zunächst 10 ml aerobes *Thauera aromatica*-Medium beimpft und im Rollinkubator bei 28 °C inkubiert. Bei Expressions- und Deletionsstämmen wurden die entsprechenden Selektionsantibiotika zugegeben. Nach 2-3 Tagen wurde die Kultur jeweils mit 1-2 % (v/v) zunächst in 100 – 200 ml, am nächsten Tag in das Zielvolumen überimpft.

4.4.4 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E.coli*-Stämmen erfolgte wo nicht anders angegeben in LB-Medium, ggf. mit den entsprechenden Antibiotika. Volumina bis 6 ml wurden in Kulturröhrchen angesetzt und auf dem Rollinkubator bei 37 °C oder 30 °C inkubiert. Größere Volumina (20 bis 250 ml) wurden in Erlenmeyerkolben mit dem drei- bis fünffachen Nennvolumen angesetzt und auf dem Schüttler inkubiert.

4.4.5 Kryokonservierung und Lagerung von Bakterienstämmen

Zur dauerhaften Lagerung von *Aromatoleum*-Stämmen wurden ca. 8 ml einer gut gewachsenen Flüssigkultur sukzessive in einem Kryoröhrchen abzentrifugiert (7500 g, 5 min, 4 °C), in einem Volumen von 1 ml resuspendiert und mit 8 % (v/v) sterilem DMSO versetzt. Die so behandelten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

4.4.6 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen wurden 100 ml SOB-Medium (siehe Tab. 4) mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stamms inokuliert und bei 28 °C unter Schütteln inkubiert, bis die OD₅₇₈ bei ca. 0,6 lag. Das weitere Vorgehen folgte dem Protokoll von Inoue *et al.* (1990) in verkleinertem Maßstab. Ausgehend von einem Endvolumen von 5 ml wurden Aliquots von 60 µl abgefüllt und in flüssigem N₂ eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zur Transformation der Zellen wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, die entsprechende DNA zugegeben (bis zu 50 ng bei fertigen Plasmiden, bis zu 8 µl Reaktionslösung bei Klonierungsarbeiten) und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für ca. 60 s. Die Reaktionsgefäße wurden wieder auf Eis gekühlt, 0,7 ml LB-Medium zugegeben und für 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren auf LB-Agar mit entsprechenden Selektionsantibiotika.

4.4.7 Konjugation von *Aromatoleum evansii*

Die Konjugation von *Aromatoleum evansii* KB740 erfolgte mithilfe des Donorstamms *E. coli* WM3064. Der Donorstamm wurde mit dem zu konjugierenden Plasmid transformiert

(siehe 4.4.6) und eine Übernachtkultur in 5 ml LB-Medium mit 0,25 mM DAP angesetzt. Eine 2-3 Tage alte anaerobe Kultur von *A. evansii* ($OD_{578} > 1,0$) wurde im Gesamtvolumen von 2 ml mit dem Donorstamm im Verhältnis 3:1 vermischt. Die Zellen wurden zweimal abzentrifugiert (7500 g, 5 min) und mit *Thauera aromatica*-Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in ca. 50 μ l Medium resuspendiert, als einzelner Tropfen auf eine Mating-Agarplatte aufgebracht und bei 28 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienmasse mit einer Impföse von der Platte geschabt, in 500 μ l *Thauera aromatica*-Medium resuspendiert und im Schüttler für 4 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Suspension angesetzt und bis zur Verdünnungsstufe 10^{-3} jeweils 100 μ l auf *Thauera aromatica*-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden in Plastikfolie eingeschweißt und die Luft durch mehrmaliges Aufpumpen und Aussaugen des Beutels durch Stickstoff ersetzt. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert, wobei nach 4-8 Tagen Kolonien sichtbar wurden.

4.4.8 Generierung von Deletions- und Disruptionsmutanten von *A. evansii*

Zur Deletion der *moeA*-Gene in *Aromatoleum evansii* kam der Vektor pk19mob_sacB zum Einsatz (Schäfer *et al.*, 1994). Diesem Plasmid wurde an der multiple cloning site eine jeweils ca. 1 kb lange Sequenz der genomischen Bereiche der 5'- und 3'-Regionen des jeweiligen *moeA*-Gens eingebaut, wobei das *moeA*-Gen selbst durch den Promotor und das Gen der Chloramphenicolacetyltransferase aus *Corynebacterium glutamicum* ersetzt wurde. Die beiden Flankensequenzen und das *catA1*-Gen wurden hierzu mittels PCR amplifiziert und mittels Gibson-Assembly in den Vektor gebaut (siehe 4.5.7). Das fertige Deletionsplasmid wurde für die Konjugation von *A. evansii* verwendet (siehe 4.4.7), wobei auf Kanamycin- und Chloramphenicolresistenz selektiert wurde.

Aus einem Klon wurde eine Flüssigkultur in anaerobem *Thauera aromatica*-Medium angesetzt, wobei hier nur noch mit Chloramphenicol selektiert wurde. Diese Kultur wurde nach 3 Tagen auf *Thauera aromatica*-Agar mit Chloramphenicol ausplattiert, dem zusätzlich 10 % (w/v) Saccharose zugesetzt war. Die so erhaltenen Klone wurden auf den Verlust der Kanamycinresistenz geprüft und anschließend in Flüssigkultur überführt. Die Validierung der Integration an der korrekten Stelle des Genoms erfolgte mittels Colony-PCR mit eigens hierfür entwickelten Primern.

4.4.9 *In vivo*-Aktivitätstest Formiatdehydrogenase

Um die Aktivität der Formiatdehydrogenase in *E. coli* nachzuweisen, wurden die zu testenden Bakterienstämme auf TGYEP-Agar (siehe Tab. 4) ausgestrichen. Die Platten wurden für ca. 16 h unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C bebrütet und anschließend mit lauwarmem Formiat-Topagar überschichtet, wobei es bei aktiver Formiatdehydrogenase durch die Reduktion des Benzylviologens zur Violettfärbung der Kolonien kam.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Isolation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA wurden 100 ml einer frischen, gut gewachsenen anaeroben Kultur ($OD_{578} < 0,8$) von *A. aromaticum* oder *A. evansii* abzentrifugiert (2300 g, 25 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 10 ml SET-Puffer (siehe Tab. 5) resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 3,5 ml SET-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots à 560 µl in 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit je 60 µl SDS-Lösung (10 % (w/v)) und 6 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml in TE-Puffer) versetzt. Der Ansatz wurde vermischt und für 1 h bei 55 °C inkubiert. Es wurden 200 µl 5 M NaCl zugegeben und für weitere 10 min bei 55 °C inkubiert. Es wurden 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung zugegeben (ROTI Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und das Reaktionsgefäß mit der Hand mehrmals kräftig geschwenkt. Nach einem Zentrifugationsschritt (21.000 g, 20 min, 4 °C) wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und der Extraktionsprozess wiederholt. Um RNA zu entfernen, wurden 20 µl RNase-Lösung (10 mg/ml in TE-Puffer) zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die so gereinigte DNA wurde durch die Zugabe von 1,3 Volumenanteilen Isopropanol und anschließender Zentrifugation (21.000 g, 20 min, 4 °C) gefällt. Das Pellet wurde mit 300 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (21.000 g, 15 min, 4 °C), der Überstand abgegossen, das Pellet an der Vakuumentrifuge getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

4.5.2 PCR

Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion kam eine hausinterne Präparation von Phusion-DNA-Polymerase zum Einsatz (AG Heider). Für präparative Zwecke wurden die Reaktionen im Volumen von 50 bis 200 µl (mit max. 50 µl pro Reaktionsgefäß), für analytische Zwecke im Volumen von 15 bis 20 µl angesetzt. Der fertige Reaktionsansatz enthielt 20 % GC-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 0,2 mM je dNTP, 0,5 µM jedes Primers und 20 µl/ml Phusion DNA-Polymerase (\cong 20-40 µg/ml). Als Template kamen entweder genomische DNA (Endkonzentration ca. 2-4 ng/ µl), Plasmid-DNA (Endkonzentration ca. 0,1-1 ng/ µl) oder ein Abstrich einer Bakterienkolonie (Colony-PCR) zum Einsatz. Alle Komponenten wurden auf Eis gemischt, wobei die Polymerase zuletzt zugegeben wurde.

Nach einer initialen Denaturierungsphase (30 s, 98 °C) folgten 32 Zyklen bestehend aus Denaturierung (10 s, 98 °C), Annealing (30 s, Temperatur primerabhängig) und Elongation (30 s pro kb, 72 °C). Abgeschlossen wurde die Reaktion mit einer finalen Elongation (60-90 s pro kb, 72 °C), danach wurde das Reaktionsprodukt bis zur weiteren Verwendung bei 8-10 °C gelagert. Colony-PCRs wurden im allerersten Schritt zusätzlich für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die DNA aus den Zellen freizusetzen. Die Annealingtemperatur wurde jeweils 2 °C unter dem berechneten Schmelzpunkt der verwendeten Primer gesetzt (siehe Kibbe, 2007) und bei Bedarf modifiziert.

4.5.3 Stargate-Klonierung

Zur Klonierung von Genen in die Expressionsvektoren kam das Stargate-Klonierungssystem zum Einsatz (IBA Lifesciences, Göttingen). Hierbei werden die mittels PCR amplifizierte Gene zunächst in einen Klonierungsvektor (pEntry) eingebracht und von dort in die gewünschten Expressionsvektoren umklont. Die Effizienz des Verfahrens beruht dabei auf einer parallel ablaufenden Restriktions- und Ligationsreaktion, die durch Seitenschneider-Restriktionsendonukleasen und entsprechend angepasste Überhangsequenzen ermöglicht wird. Die Handhabung erfolgte wie im Handbuch beschrieben¹. Im Falle größerer Konstrukte und längerer Gene wurde die eingesetzte DNA-Menge bis um den Faktor 10 erhöht. Es wurden 8 µl des Reaktionsansatzes für die Transformation von *E. coli* DH5α eingesetzt (siehe 4.4.6). Falls die Zielsequenz interne Schnittstellen für LglI oder Esp3I aufwies und Versuche nach dem normalen Protokoll scheiterten, wurden die Enzyme des Reaktionsansatzes hitzeinaktiviert (80 °C, 20 min), erneut ATP und T4-Ligase zugegeben, und der Ansatz für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss folgte die Transformation.

4.5.4 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse und anschließender Präzipitation der DNA. Hierfür wurden 4 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (5500 g, 2 min, RT) und in 300 µl P1 (siehe Tab. 5) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 300 µl P2 zugegeben und die Reaktionsgefäße mehrmals invertiert. Nach 5 min Inkubationszeit erfolgte die Neutralisation mit 300 µl P3. Auch hier wurde vorsichtig durch mehrmaliges Invertieren gemischt, das Präzipitat abzentrifugiert (21.000 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Gegebenenfalls wurde die Zentrifugation wiederholt, um alle festen Bestandteile zu entfernen. Durch die Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und mittels Zentrifugation pelletiert (21.000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (21.000 g, 15 min, 4 °C), der Überstand abgegossen und das Pellet mittels Vakuumzentrifugation getrocknet. Die DNA wurde in 300 µl H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Für Plasmidpräparationen mit höherer Reinheit kam stattdessen das GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zum Einsatz. Abweichend von der Herstellervorschrift erfolgte die Elution der DNA mit H₂O.

4.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe kam die Agarose-Gelelektrophorese zum Einsatz. Es wurden je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente Gele aus TAE-Puffer mit einem Agaroseanteil zwischen 0,7 und 1,2% eingesetzt. Der Lauf der Gele erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung von ca. 6 V/cm zur analytischen Auftrennung und ca. 4 V/cm zur präparativen Auftrennung. Die Gele wurden

¹https://www.iba-lifesciences.com/media/3e/7b/f0/1655818475/Manual_StarGate.pdf

anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt (3 ppm in H₂O, je nach Dicke des Gels zwischen 10 und 30 min). Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Gel kam der GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zum Einsatz, wobei die Elution von der Säule abweichend vom Handbuch nicht mit Puffer, sondern mit Wasser erfolgte.

4.5.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentration von DNA in Lösung wurde mithilfe eines Nanodrop-Spektrophotometers durchgeführt (NanoDrop ND-1000, PeqLab, Erlangen). Durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm konnte anhand des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 0,021 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) die Konzentration gereinigter PCR-Produkte und Plasmide abgeschätzt werden. Bei konventionell präparierten Plasmiden (siehe 4.5.4) konnte diese Methode aufgrund von störenden RNA-Fragmenten nur bedingt angewendet werden.

4.5.7 Gibson-Assembly

Um ein Plasmid mittels Gibson-Assembly in einem Schritt aus mehreren DNA-Fragmenten zusammensetzen, wurden zunächst entsprechende Primer zur Amplifikation der einzelnen Fragmente via PCR erstellt. Die Primer enthielten neben dem zur Sequenz des Zielfragments komplementären Bereich am 5'-Ende zusätzlich einen Überhang mit der Sequenz des im fertigen Vektor angrenzenden Fragments. Die Überhänge wurden dabei so gewählt, dass jedes Fragment ca. 20 bp identische Sequenz mit den angrenzenden Fragmenten aufwies. Die einzelnen Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert und mittels Silica-Säulchen oder wo notwendig mittels Gelextraktion gereinigt (siehe 4.5.2 und 4.5.5).

Der Vektor wurde mithilfe zweier passender Restriktionsenzyme verdaut und ebenfalls mittels Silica-Säulchen aufgereinigt. Für den Reaktionsansatz wurden die einzelnen DNA-Fragmente im Gesamtvolumen von 5 μl in äquimolarem Verhältnis gemischt, 15 μl Gibson-Assembly-Reaktionsmix zugegeben und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Danach wurden 8 μl des Reaktionsansatzes für die Transformation von *E. coli* DH5 α eingesetzt. Der Erfolg der Reaktion wurde außerdem mittels Gelelektrophorese überprüft.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Rekombinante Expression in *Aromatoleum evansii* (anaerob)

Die rekombinante Expression unter anaeroben Bedingungen wurde in 2l-Schottflaschen durchgeführt. Das Medium wurde nach Supplementation und Zugabe des Antibiotikums mit 2% (v/v) einer 2 Tage alten Vorkultur beimpft und bei 28 °C bis zum Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,6 - 0,7 inkubiert. Es wurden 10 mM KNO₃ und 3,5 mM Natriumbenzoat nachgefüttert und die rekombinante Expression durch die Zugabe von 0,2 ppm Anhydrotetracyclin induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei 16 °C für 12-16 h. Im Anschluss wurden die Zellen per Zentrifugation (30 min, 5000 g, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden in ca. 30 ml Grundpuffer (siehe Tab. 5) resuspendiert, erneut pelletiert (2300 g, 25 min,

4 °C) und der Überstand verworfen. Je nach Versuchsplanung wurden die Zellen entweder in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert, oder direkt mit dem Zellaufschluss fortgefahren.

Für die Gewinnung größerer Mengen an rekombinanter AOR wurde die Kultivierung und Expression im 30l-Fermenter von Gabriele Höff durchgeführt. Das Vorgehen entsprach weitestgehend dem oben beschriebenen Prozess. Die Fermentationsprotokolle sind in der AG Heider einsehbar.

4.6.2 Rekombinante Expression in *Aromatoleum Evansii* (aerob)

Die rekombinante Expression unter aeroben Bedingungen wurde in 5l-Erlenmeyerkolben durchgeführt. Das Medium wurde nach Supplementation und Zugabe der entsprechenden Antibiotika mit 1,5 - 2,0 % der Vorkultur beimpft und bei 28 °C unter Rühren inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ zwischen 0,5 und 0,7 wurden 5 mM Natriumsuccinat nachgefüttert und die Expression durch die Zugabe von 0,2 ppm Anhydrotetracyclin induziert. Die weitere Inkubation erfolgte unter Rühren bei 16 °C für 12-16 h. Die Zellernte erfolgte wie unter 4.6.1 beschrieben.

4.6.3 Rekombinante Expression in *E. coli* (anaerob)

Die rekombinante Expression der Proteine MoeA1 und MoeA2 erfolgte im Stamm *E. coli* DH5 α unter nitratreduzierenden Bedingungen. Die Vorkultur wurde aerob in LB-Medium angezogen. Für die Expressionskultur kam TGYEP-Medium in 2l-Schottflaschen zum Einsatz, dem nach dem Autoklavieren zusätzlich 10 g/l NaNO₃ zugesetzt wurden (siehe Tab. 4). Das Medium wurde nach Supplementation und Zugabe von Ampicillin mit 1,5 - 2,0 % der Vorkultur beimpft und bei 28 °C inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ zwischen 0,5 und 0,6 wurde durch die Zugabe von 0,2 ppm Anhydrotetracyclin induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei 16 °C für 12-16 h. Die Zellernte erfolgte wie unter 4.6.1 beschrieben.

4.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die verwendeten SDS-Gele wurden mithilfe des Mini-PROTEAN-Systems (Biorad, München) aus einer fertig gemischten Lösung aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Carl Roth GmbH, Karlsruhe), hergestellt (siehe Tab. 5). Die Gele wurden als diskontinuierliche Elektrophorese mit Trenn- und Sammelgel angefertigt. Wo nicht anders angegeben, enthielt das Trenngel einen Acrylamidanteil von 15 %. Die Polymerisation wurde jeweils durch Zugabe von 0,05 % (v/v) TEMED und 1,6 % APS-Lösung (10 % (w/v)) gestartet. Nach dem Einfüllen des Trenngels wurde dieses bis zum Auspolymerisieren mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Abgießen des Isopropanols wurde das Trenngel eingefüllt und ein Kamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden ggf. mit H₂O auf ein Volumen von 12 μ l verdünnt, mit 4 μ l SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Nach dem Beladen des Gels wurde zunächst eine Spannung von 4 V/cm angelegt, die nach dem Einlaufen der Proben in das Gel auf 8 V/cm erhöht wurde. Als Größenstandard kamen jeweils 2 µl des PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zum Einsatz. Nachdem das Bromphenolblau des Ladepuffers das komplette Gel durchlaufen hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel gefärbt. Hierzu wurde das Gel zunächst für 15 min in Coomassie-Färbelösung (siehe Tab 5) und anschließend zunächst in Entfärbelösung, dann in Wasser bis zum Erreichen der gewünschten Färbung geschwenkt.

4.6.5 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die verwendeten Nativ-Gele wurden mithilfe des Mini-PROTEAN-Systems (Biorad, München) aus einer fertig gemischten Lösung aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Carl Roth GmbH, Karlsruhe), hergestellt (siehe Tab. 5). Die fertige Mischung aus Acrylamid und Puffer wurde durch das Anlegen von Vakuum entgast und mit Stickstoff gespült. Alle weiteren Schritte fanden im Anaerobenzelt unter Formiergasatmosphäre statt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,02 % (v/v) TEMED und 0,5 % APS-Lösung (10 % (w/v)) gestartet.

Die Proteinproben wurden ggf. mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl verdünnt, mit 4 µl Nativ-Probenpuffer versetzt, und auf das Gel geladen. Es wurde eine Spannung von 6 V/cm angelegt, bis das Bromphenolblau des Ladepuffers das komplette Gel durchlaufen hatte. Als Referenzprotein wurde BSA verwendet. Die Färbung erfolgte entweder mit Coomassie-Brillantblau (siehe 4.6.4) oder als Aktivitätsstain (siehe 4.6.13).

4.6.6 Proteinaufreinigung mittels Streptactin-Affinitätschromatografie

Um die Zielproteine der Reinigung zugänglich zu machen, wurden die Zellen der Expressionskultur mittels Sonifikation aufgeschlossen. Hierfür wurde das Zellpellet mit dem selben Volumen Grundpuffer versetzt und die Zellen mittels Vortexen und/oder auf- und abpipettieren resuspendiert. Soweit möglich erfolgte dieser und alle nachfolgenden Schritte auf Eis, um der Degradation des Zielproteins vorzubeugen. Es wurde je eine kleine Spatelspitze DNase und Lysozym zugegeben. Die Zellen wurden mittels Sonotrode aufgeschlossen. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile des Lysats in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert (90.000 g, 4 °C, 1 h). Der Überstand mit der löslichen Proteinfraction wurde dekantiert, mittels Spritzenfilter (0,45 µm Porendurchmesser) von Schwebstoffen befreit und in der FPLC eingesetzt.

Die Reinigung der Proteine erfolgte mithilfe eines FPLC-Systems. Hierbei kamen selbst gepackte Streptactin-Säulen (Strep-Tactin Superflow, IBA Lifesciences, Göttingen) mit Volumina von 8 – 14 ml zum Einsatz. Nach erfolgter Äquilibrierung mit Grundpuffer (2 cv) wurde das Lysat auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurde das Zielprotein auf der Säule abhängig von der gewünschten Reinheit mit 1 – 6 cv Puffer gewaschen und mit Grundpuffer mit zugesetztem Desthiobiotin (2 mM) eluiert. Die Regeneration der Säule erfolgte entweder mit glycerolfreiem Grundpuffer mit zusätzlich 1 mM HABA oder mit 0,5 M NaOH.

Die Lagerung der Säule erfolgte in Grundpuffer ohne Glycerol mit 1 mM HABA oder in Grundpuffer ohne Glycerol mit 0,03 % NaN₃.

4.6.7 Proteinaufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Um die Reinheit von mittels Strep-Tag gereinigten Proteinen weiter zu erhöhen, kam die Größenausschlusschromatographie zum Einsatz. Hierzu wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg- Säule (GE Healthcare Life Science, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min zunächst mit 2 cv SEC-Puffer äquilibriert, dann wurde die zuvor mittels Filtration oder Zentrifugation von Schwebstoffen befreite Proteinprobe mittels Loop auf die Säule injiziert.

4.6.8 Größenbestimmung von Proteinkomplexen mittels Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung der Masse von nativen Proteinen kam ebenfalls die Größenausschlusschromatographie zum Einsatz. Nach Reinigung des zu analysierenden Proteins (siehe 4.6.6) wurde unter den selben Bedingungen 1 ml eines Gemischs von Standards auf die Säule gegeben. Hierzu kamen Blue Dextran (2 MDa), Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom c (12,4 kDa) und Cyanocobalamin (1,3 kDa, nur als sichtbarer Marker, nicht für die Standardkurve) in einer jeweiligen Endkonzentration zwischen 1,5 und 0,5 mg/ml zum Einsatz. Anhand der unterschiedlichen Retentionsvolumina V_r wurde für jedes Protein der zur Verfügung stehende Anteil am inneren Volumen V_i der Säulenmatrix errechnet (1). Das Retentionsvolumen des Blue Dextran entspricht dabei dem Ausschlussvolumen V_o der Säule.

$$K_d = \frac{V_r - V_o}{V_i} = \frac{V_r - V_o}{V_t - V_o} \quad (1)$$

Die so errechneten K_d -Werte der Proteine wurden gegen deren Molekulargewicht aufgetragen. In der halblogarithmischen Darstellung lässt sich so mittels linearer Regression eine Ausgleichsgerade bestimmen, mit der sich die molekulare Masse anhand des Retentionsvolumens (bzw. K_d) berechnen lässt (2).

$$\ln(MW) = -k \cdot K_d + a \quad (2)$$

4.6.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde nach der Methode von Bradford mit dem Protein Assay von Biorad (München) durchgeführt. Hierzu wurden 180 μ l angesetztes Reagenz mit 20 μ l Probe in einer 96-well-Mikrotiterplatte vermischt und anschließend im Plattenphotometer die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Standards wurden BSA-Lösungen in Konzentrationen von 20 – 150 μ g/ml verwendet. Unbekannte Proben wurden vor dem Ansetzen der Platte auf diesen Konzentrationsbereich verdünnt. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.6.10 Flavinbestimmung

Zur Bestimmung des FAD-Gehalts in der AOR wurden 750 μl einer Enzympräparation (ca. 1 mg/ml) mit 50 μl 25 %-iger Salzsäure versetzt und das so gefällte Protein für 5 min bei 21.000 g abzentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Absorptionsspektrum von 200 bis 800 nm aufgenommen. Da die Spektren eine unspezifische Extinktion von ca. 0.015 bis in den roten Bereich zeigten, wurden zur FAD-Bestimmung die Extinktionsdifferenz $\Delta A = A_{450} - A_{600}$ verwendet. Diese wurde mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in die FAD-Konzentration umgerechnet. Mit der molekularen Masse der AOR und der Proteinkonzentration errechnet sich so das Verhältnis von FAD pro AOR.

4.6.11 Aktivitätsbestimmung der AOR

Wo nicht anders angegeben, erfolgten die Messungen zur Bestimmung der Enzymaktivität in 100 mM TRIS/HCl pH 8,0. Als Elektronenakzeptor kam entweder Benzylviologen (Endkonzentration 1,6 mM) oder NAD^+ (Endkonzentration 1 mM) zum Einsatz. Den so vorbereiteten Küvetten wurde das Enzym (oder das zu testende Zellextrakt) zugegeben. Die Reaktionen mit Benzylviologen wurden zusätzlich mit 20 μM Natriumdithionit versetzt, um potentielle Oxidationsmittel und Restsauerstoff zu entfernen. Die Messung der Aktivität erfolgte photometrisch, wobei die Reduktion von Benzylviologen bei 600 nm, die Reduktion von NAD^+ bei 340 nm verfolgt wurde. Nach Messung der Hintergrundaktivität für ca. 30 – 60 s wurde die Reaktion durch die Zugabe von Substrat gestartet. Wo nicht anders angegeben kam Benzaldehyd in einer Endkonzentration von 0,8 mM zum Einsatz. Die Zunahme der Absorption wurde für mehrere Minuten verfolgt.

Zur Bestimmung der Aktivität wurden die gemessenen Absorptionsänderungen mithilfe der Extinktionskoeffizienten (reduziertes Benzylviologen: $7,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, NADH: $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in Reaktionsraten umgerechnet. Ausgehend davon konnte mit der Proteinkonzentration (siehe 4.6.9) die spezifische Aktivität errechnet werden.

4.6.12 Aktivitätsbestimmung der Nitratreduktase

Die Messung der Nitratreduktaseaktivität erfolgte in 100 mM TRIS/HCl pH 8,0. Der Reaktionspuffer wurde mit Benzylviologen in einer Endkonzentration von 0,4 mM versetzt und durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ bis zu einer OD_{600} von ca. 1,7 vorreduziert. Die Messung der Aktivität erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Nach Zugabe des Zelllysats und Messung der Hintergrundaktivität wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mM KNO_3 gestartet. Die Aktivität wurde wie in 4.6.11 beschrieben bestimmt.

4.6.13 Aktivitätsstain im nativen Polyacrylamidgel

Um die Aktivität der AOR im Nativgel nachzuweisen, wurde das Gel zunächst unter anaeroben Bedingungen hergestellt. Zum Größenvergleich wurde zusätzlich BSA als Marker geladen. Zur Visualisierung der Hydrogenaseaktivität wurde das fertige Gel im Anaerobenzelt mit Färbelösung überschichtet (siehe Tab. 5) und für ca. 20 min in der Zeltatmosphäre

(H₂ ca. 3%) inkubiert. Zur Visualisierung der Aktivität mit Benzaldehyd wurde das Gel dagegen nach dem Lauf in einen Anaerobtopf überführt, wo die Zelatmosphäre durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N₂ ersetzt wurde. Im Anschluss wurde mithilfe einer Spritze die anaerobisierte Färbelösung zugegeben, die zusätzlich 0,5 mM Benzaldehyd enthielt. Die Banden wurden sofort nach Zugabe der Lösung sichtbar.

4.6.14 Nachweis der Wasserstoffbildung

Um die Bildung von elementarem Wasserstoff durch die Hydrogenaseaktivität der AOR zu untersuchen, wurden Reaktionsansätze in 50 mM MOPS/NaOH pH 7,0 im Gesamtvolumen von 1,5 ml in Glasfläschchen mit Gummistopfen mit einem Volumen von ca. 8 ml hergestellt. Jedem Ansatz wurden 0,1 mg/ml AOR sowie verschiedene Elektronendonoren zugesetzt (3 mM Benzaldehyd, 3 mM Acetaldehyd, 5 mM Ti(III)-citrat, 5 mM Eu(II)-EGTA, 5 mM NADH oder 1 mM NADH mit 5 mM Natriumformiat und Formiatdehydrogenase). Alle Komponenten wurden im Anaerobenzelt angesetzt und vor dem Mischen mit N₂ gespült, um den restlichen Wasserstoff zu entfernen. Nach dem Mischen der Komponenten wurden die Fläschchen für 3 h kopfüber bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Gasphase mittels GC-TCD auf ihren Wasserstoffgehalt untersucht. Als Standards kamen N₂/H₂-Gemische mit H₂-Gehalten zwischen 0,5 und 4,0 % zum Einsatz. Siehe auch Winiarska *et al.* (2022).

4.6.15 Proteinkristallisation

Für die Kristallisation von MoeA1 wurde das Protein zunächst per Streptactin-Affinitätschromatographie und im Anschluss über Größenausschlusschromatographie gereinigt. Das Protein wurde mittels Ultrafiltration ankonzentriert. Die Kristallisation wurde von Ralf Pöschke (AG Essen, FB Chemie, Uni Marburg) durchgeführt. Zum Einsatz kamen die Kits JCSG Core I-IV (NeXtal Biotechnologies, Holland OH, USA) und MoeA1 in Konzentrationen von 32 und 16 mg/ml. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 20 °C. Die unten gezeigten Kristalle (siehe S. 58) wurden bereits nach einer Woche sichtbar. Nach vier weiteren Wochen wurden die Kristalle gepickt und röntgenkristallographisch vermessen (AG Essen, FB Chemie, Uni Marburg).

5 Ergebnisse

5.1 Heterologe Expression der AOR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein heterologes Expressionssystem für AOR etabliert. Als Expressionsstamm kam *Aromatoleum evansii* KB740 zum Einsatz. Als naher Verwandter zu *Aromatoleum aromaticum* besitzt *A. evansii* ebenfalls die für die Maturation des WCo notwendige Zellmaschinerie. Da sich die direkte Transformation der Bakterien bei diesem Stamm schwierig gestaltet, ist es notwendig, den Expressionsvektor mittels Konjugation einzubringen.

Der Expressionsvektor leitet sich von modifizierten Vektoren des Stargate-Expressionssystems ab (siehe Abb. 7) und enthält neben einem *broad-host-range*-ORI auch eine *mob*-site, um die Konjugation des Expressionsorganismus zu ermöglichen. Eine N-terminale Fusion des ersten Gens (*aorA*) mit einem twin-Strep-Tag ermöglicht eine Aufreinigung der AOR via Streptactin-Affinitätschromatographie. Das zu exprimierende Konstrukt befindet sich unter der Kontrolle eines Tetracyclin-Promotors, wodurch die Expression durch die Zugabe von AHT zum Medium induziert werden kann. Die Anzucht der Zellen erfolgte entweder unter nitratreduzierenden Bedingungen oder mit Luftsauerstoff. Da die AOR empfindlich gegenüber Sauerstoff ist, wurde die Zellyse und die chromatographische Reinigung des Proteins unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.

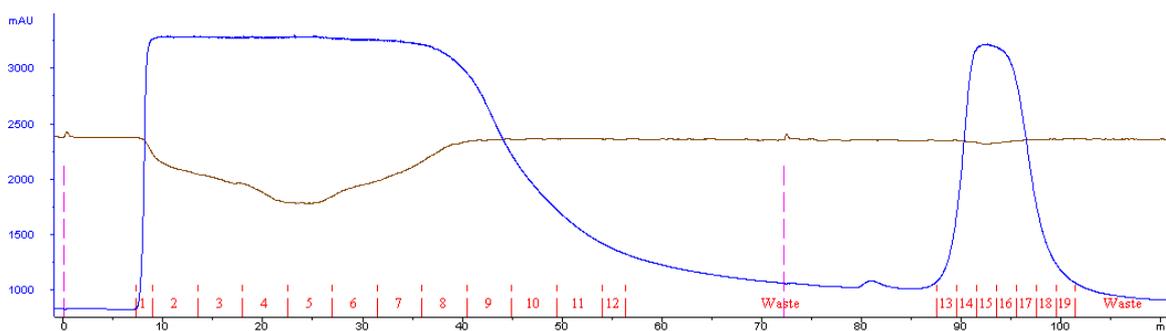


Abbildung 5: Exemplarischer FPLC-Lauf bei der Streptactin-basierten Reinigung von AOR. Nach dem Auftrag des Zellextrakts auf die Streptactinsäule erfolgte ein Waschschrift, bevor die AOR durch Desthiobiotin von der Säule eluiert wurde.

5.1.1 Optimierung der Expressionsbedingungen

Nachdem in einem ersten Versuch gezeigt werden konnte, dass es mit *A. evansii* möglich ist, rekombinant aktive AOR zu produzieren (siehe auch Arndt, 2020), wurden die Expressionsbedingungen zur Produktion des Enzyms optimiert. Das wichtigste Kriterium stellte hierbei die spezifische Aktivität des Enzyms mit Benzaldehyd als Substrat und Benzylviologen oder NAD^+ als Elektronenakzeptor dar. Elementaranalysen via ICP-MS und die

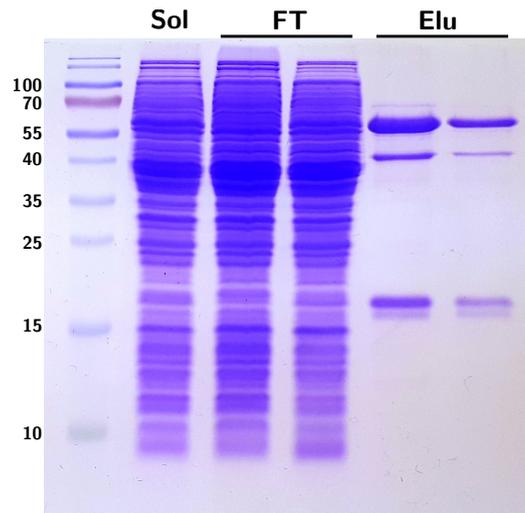


Abbildung 6: Exemplarisches SDS-Gel einer Affinitätschromatographie der AOR. Sol: Löslicher Zellextrakt, FT: Durchlaufaktionen, Elu: gepoolte Eluatfraktionen. Die drei Hauptbanden entsprechen den drei Untereinheiten AorB (66 kDa), AorC (46 kDa) und AorA (20 kDa). Bei der untersten Bande handelt es sich um endogenes AorA von *A. Evansii*.

spektrophotometrische Bestimmung des FAD-Gehalts lieferten weitere Daten (siehe auch 5.1.2).

Zunächst wurden nur die drei Strukturgene *aorA*, *aorB* und *aorC* überexprimiert. Bei Induktion wurden zusätzlich Na_2WO_4 und Na_2MoO_4 bis zur Endkonzentration von jeweils $2\ \mu\text{M}$ zugegeben. Auf diese Weise war es möglich, aktive AOR zu reinigen, wobei die Aktivität des Enzyms mit $4,5\ \text{U}/\text{mg}$ noch deutlich unter der des nativ gereinigten Enzyms aus *Aromatoleum aromaticum* lag (vgl. Tab. 6).

Die zusätzliche Expression der beiden Gene *aorD* und *aorE* führte zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität. Selbst dann, wenn kein zusätzliches Wolframat zugegeben wurde (Endkonzentration im Medium ca. $24\ \text{nM}$), erhöhte sich die Aktivität des Enzyms um den Faktor 3-4, wobei die Elementanalyse mittels ICP-MS zeigt, dass der W-Gehalt deutlich verringert ist, folglich also der Großteil der katalytischen Zentren inaktiv ist (Tab. 6 Spalte 3).

Durch die Zugabe von WO_4^{2-} bei der Induktion der Kultur überstieg die Aktivität des rekombinanten Proteins die der nativ gereinigten AOR um das Drei- bis Vierfache. Die Endkonzentration an Wolframat wurde dabei so gewählt, dass sie mit $10\text{-}15\ \mu\text{M}$ deutlich über der Molybdatkonzentration von $2\ \mu\text{M}$ liegt und damit in einen Bereich fällt, der für *A. Evansii* bereits leicht toxisch ist (siehe Bachelorarbeit Vanessa Reitz).

Eine zusätzliche Supplementation des Mediums mit Riboflavin, wie sie früher teilweise auch bei der nativen Reinigung der AOR erfolgte und die den Einbau von FAD begünstigen sollte, erwies sich hingegen als kontraproduktiv. Während die Aktivität mit Benzylviologen

unverändert hoch war, sank die Aktivität mit NAD^+ um 70%. Dieser Wert korreliert mit einem niedrigeren FAD-Gehalt im Enzym.

Die Ausbeuten an AOR variierten leicht zwischen den einzelnen Ansätzen und lagen jeweils zwischen 1,5 mg und 2,5 mg pro Liter Kultur. Ob die Zellen unter nitratreduzierenden Bedingungen mit Benzoat oder an Luftsauerstoff mit Succinat als Energie- und Kohlenstoffquelle kultiviert wurden, spielte hinsichtlich der Ausbeute und der Aktivität der AOR keine Rolle. Die aerobe Anzucht benötigt aufgrund des schnelleren bakteriellen Wachstums aber deutlich weniger Zeit (t_D aerob ca. 1,5 h, anaerob 6-8 h).

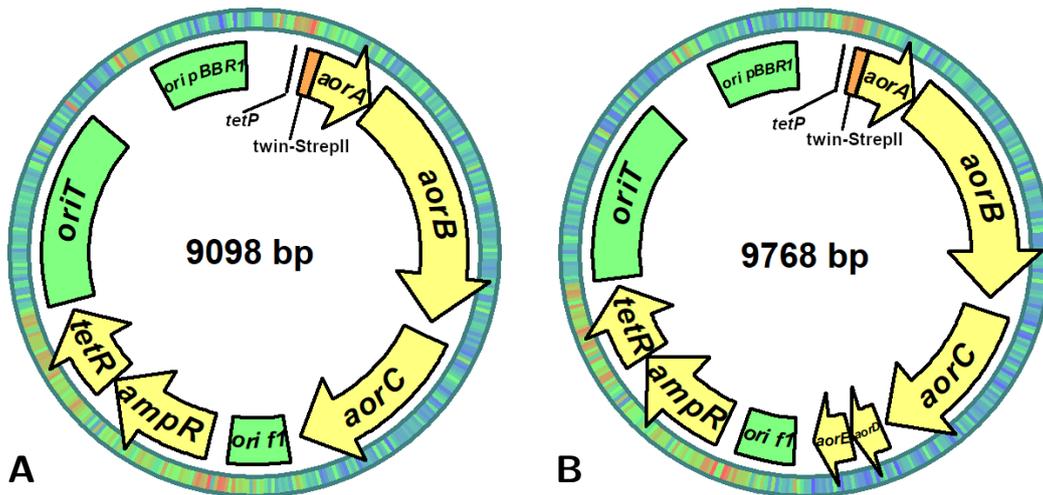


Abbildung 7: Plasmide für die Heterologe Expression von AOR.

Die Vektoren enthielten entweder die drei Strukturgene (**A**) oder das komplette *aor*-Operon (**B**) unter der Kontrolle eines Tetracyclin-Promotors. Eine N-terminale Fusion von AorA mit einem twin-Strep-Tag ermöglicht eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Der *broad-host-range*-ORI (pBBR1) und die *mob*-site (oriT) ermöglichen eine Konjugation von *Aromatoleum Evansii*.

5.1.2 Elementanalyse

Neben den bereits erwähnten Bestimmungen des Wolframgehalts wurden mittels ICP-MS weitere Elemente quantifiziert (siehe Tab. 6). Der Magnesiumgehalt (theoretisch 1 Mg pro WCo) liegt in jedem Versuch etwas oberhalb des W-Gehalts. Der Gehalt an Phosphor beträgt bei einem vollständig besetzten Heteropentamer theoretisch 6 Atome pro Holoenzym (2 P pro WCo, 2 P in FAD), die Werte weichen hier also eher nach oben ab. Bei der Bestimmung des Eisens zeigt sich, dass die Besetzung mit Fe/S-Clustern vermutlich nicht vollständig ist, da bei kompletter Besetzung aller 10 Cluster 40 Eisenatome zu erwarten wären. In keiner der Proben wurden größere Mengen an Molybdän nachgewiesen, was die Spezifität für Wolfram beim Einbau des Kofaktors in die AOR unterstreicht.

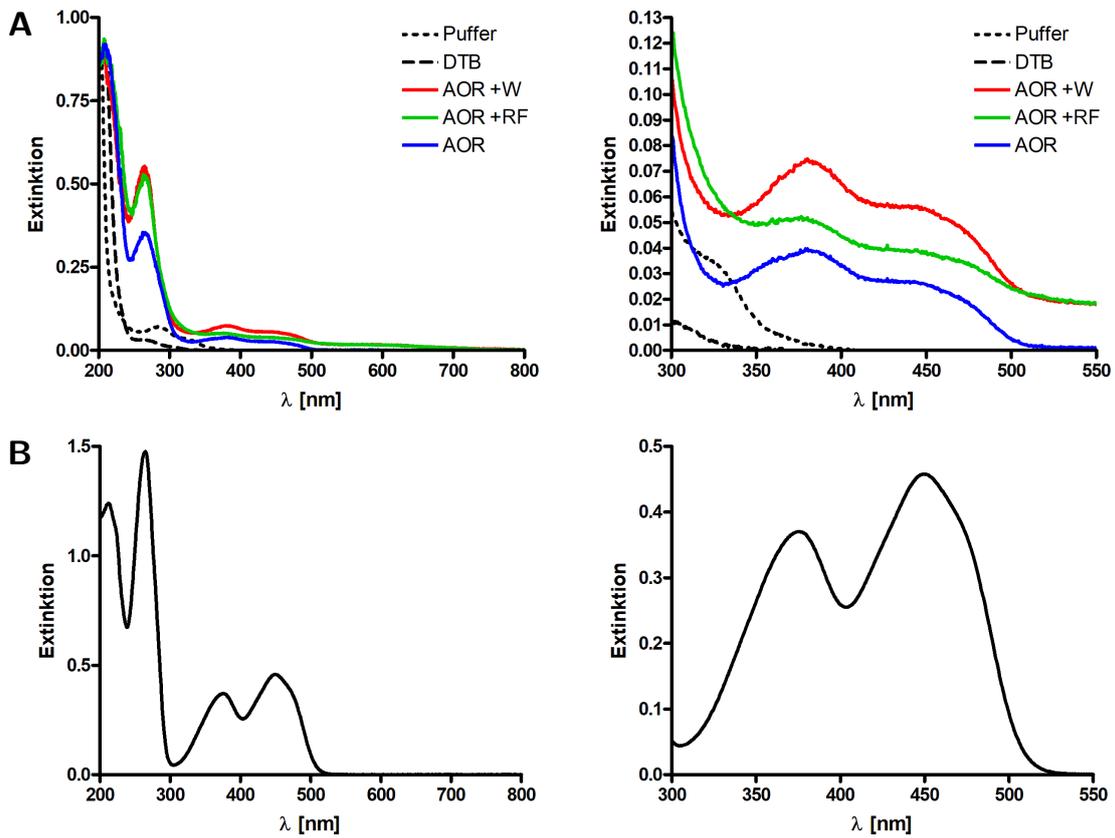


Abbildung 8: **(A)** UV-Vis-Spektren zur FAD-Bestimmung nach Säuredenaturierung. DTB: Puffer mit Desthiobiotin, die AOR-Proben entsprechen den letzten drei Spalten in Tab. 6
(B) Referenzspektrum FAD 50 µM

Tabelle 6: Elementanalyse und spezifische Aktivitäten der gereinigten AOR. In die Ansätze der beiden rechten Spalten wurde bei Induktion der Expressionskultur 10 μM Na_2WO_4 , bei der letzten Spalte zusätzlich 10 μM Riboflavin zugegeben. Angaben in Atome bzw. FAD pro Heteropentamer, Aktivitäten in U/mg, Ausbeute in mg Protein pro l Kultur

	native AOR ^a	AorABC 2 μM W	AorA-E 24 nM W	AorA-E 10 μM W	AorA-E 10 μM W 10 μM RF
Mg	1,92	1,43	0,91	1,80	1,74
P	5,12	5,22	7,39	10,01	6,04
Fe	32,1	36,2	27,0	23,3	23,6
Mo	0	0	0,06	0	0
W	1,46	1,06	0,32	1,53	1,51
FAD	0,50	n.b.	0,89	0,72	0,39
s.A. (BV)	23,6	4,5	16	85	82
s.A. (NAD ⁺)	6,6	1,6	6	23	7
Ausbeute [mg/l]	1,5	1,1	2,5	2,2 - 2,5	2,1

(a) alle Werte aus Arndt *et al.* (2019), neu berechnet

Zusätzlich wurde der Gehalt an Calcium, Mangan, Cobalt, Nickel, Kupfer, Zink und Selen quantifiziert. Da hier aber in keiner Probe nennenswerte Konzentrationen vorlagen, sind die Ergebnisse für diese Elemente nicht aufgeführt.

5.1.3 Größenausschlusschromatographie

Führt man mit dem mittels Affinitätschromatographie gereinigten Protein eine Größenausschlusschromatographie durch, so zeigt sich, dass die rekombinante AOR aus mehreren Spezies besteht, von denen bis zu drei in der SEC sichtbar werden (Abb. 9). Neben dem mutmaßlichen Heteropentamer ($\alpha_2\beta_2\gamma$), das als Erstes eluiert, findet sich ein Peak, bei dem es sich dem Laufverhalten nach um ein $\alpha\beta$ -Dimer handeln könnte. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass besagte Fraktion zwar Aktivität mit Benzylviologen, nicht aber mit NAD^+ zeigt. Klarheit könnte hier eine Analyse mittels MALDI-TOF schaffen. Als dritter Peak findet sich die freie α -Untereinheit. Nicht alle Spezies treten in jedem Lauf auf. Es ist daher nicht klar, ob es sich um einen Zerfall des Proteins während des Reinigungsprozesses handelt –teilweise wurden hier unterschiedliche Puffer genutzt–, oder ob Abweichungen bei den Expressionsbedingungen dafür verantwortlich sind.

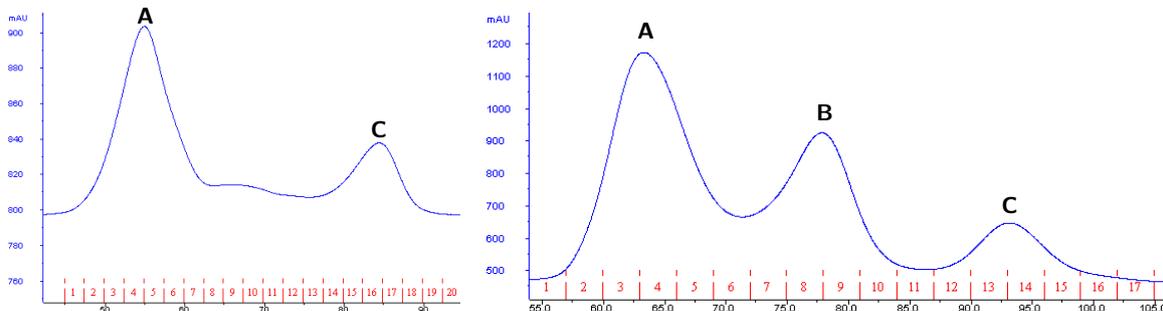


Abbildung 9: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie von zwei verschiedenen AOR-Batches.

Wie zu erkennen ist, handelt es sich bei dem durch Affinitätschromatographie gereinigten Protein um eine Mischung mehrerer Spezies. Peak A entspricht dem Heteropentamer ($\alpha_2\beta_2\gamma$). Bei Peak B handelt es sich vermutlich um ein $\alpha\beta$ -Dimer. Peak C entspricht der freien α -Untereinheit.

5.1.4 Hydrogenaseaktivität der AOR

Neben der Aldehydoxidation weist die AOR als Nebenreaktion zusätzlich eine Aktivität als Hydrogenase auf. Hierbei wird elementarer Wasserstoff als Reduktionsmittel genutzt, um damit Benzylviologen, NAD^+ oder Carbonsäuren zu reduzieren. Diese Hydrogenaseaktivität wurde erstmals in Winiarska *et al.* (2022) beschrieben und erreicht unter günstigen Bedingungen ca. 10% der Aktivität, die das Enzym mit Benzaldehyd zeigt. Im Gegensatz zur Aktivität mit Aldehyden reagiert die Hydrogenaseaktivität sehr sensitiv auf vorhandenen Sauerstoff und wird bereits durch geringe Spuren von O_2 gehemmt.

Die Aktivität der AOR lässt sich mit einem Aktivitätsstain im nativen Polyacrylamidgel visualisieren. Dabei wird die Bildung von NADH über eine Reduktion und den damit verbundenen Farbumschlag von Nitroblautetrazoliumchlorid nachgewiesen. Bei Zugabe von Benzaldehyd werden so nach wenigen Sekunden Banden sichtbar. Ohne Zugabe von Aldehyd werden die Banden bei Inkubation in Zeltatmosphäre (2 - 3,5 % H₂) nach einigen Minuten ebenfalls sichtbar (siehe Abb. 10).

Es wurde außerdem untersucht, ob die AOR auch in der Lage ist, selbst elementaren Wasserstoff freizusetzen. Trotz einer Bandbreite an verschiedenen Elektronendonoren wie Aldehyden, Ti(III), Eu(II) und NADH (siehe 4.6.14) konnte keine Wasserstoffbildung oberhalb des Detektionslimits (ca. 0,1 %) nachgewiesen werden (siehe auch Winiarska *et al.*, 2022).

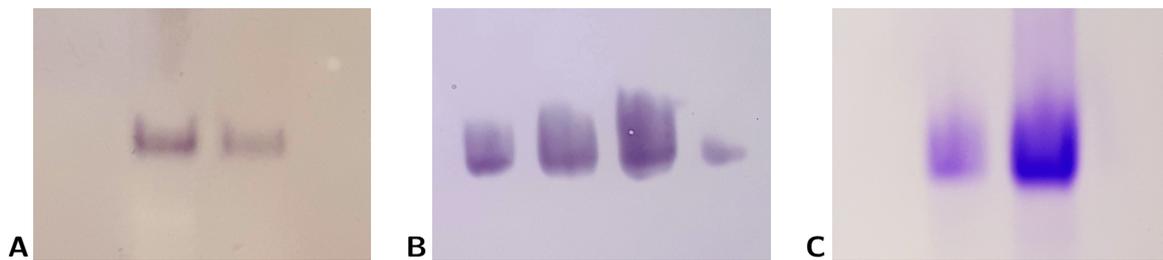


Abbildung 10: Aktivitätsstain der AOR auf NADH-Bildung im Nativgel.

Die Färbung erfolgte durch Inkubation mit Nitroblautetrazoliumchlorid entweder (A) in Zeltatmosphäre (2,0 - 3,5 % H₂) oder (B) in N₂-Atmosphäre unter Zugabe von Benzaldehyd. (C): Coomassie-Färbung als Kontrolle

5.2 Maturation des Wolfram-Kofaktors

5.2.1 Generierung von Δ *moeA*-Deletionsmutanten von *A. evansii*

Um die Rolle der Proteine MoeA1 und MoeA2 *in vivo* zu untersuchen, wurden zwei Deletionsstämme von *Aromatoleum evansii* generiert, bei denen jeweils eines der beiden *moeA*-Gene durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette ersetzt wurde (double crossover-Deletion). Hierzu kam der Vektor pK19mob_*sacB* zum Einsatz (siehe Abb. 11). Da dieses Plasmid in *A. evansii* nicht repliziert, wird nach erfolgter Konjugation durch die Selektion mit Kanamycin und Chloramphenicol dessen Integration ins Genom forciert. Der zweite Selektionsschritt mit Saccharose, bei dem *sacB* als Letalfaktor den Verlust des Plasmids forcieren soll (siehe Schäfer *et al.*, 1994), erwies sich in *A. evansii* als sehr ineffizient, weswegen zusätzlich auf den Verlust der Kanamycinresistenz selektiert wurde.

Die korrekte Integration des *cat*-Gens und der Verlust des jeweiligen *moeA*-Gens wurden mittels PCR überprüft. Hierzu wurden Colony-PCRs durchgeführt, bei denen der eine Primer jeweils außerhalb des deletierten Genomabschnitts, und der andere entweder im *moeA*-Gen oder in der Resistenzkassette bindet (siehe Abb. 12). Bis auf eine Reaktion,

die die 3'-Region von *moeA2* im Wildtypstamm amplifizieren sollte (Abb. 12 Lane 15), konnten alle vorhergesagten Produkte nachgewiesen werden.

5.2.2 Rekombinante Expression von AOR in Δ *moeA*-Stämmen

Die so generierten Stämme von *A. Evansii* wurden für die rekombinante Expression von AOR benutzt. Hierzu wurde das Plasmid pASG105_AORfull mittels Konjugation eingebracht. Da die Kultivierung unter nitratreduzierenden Bedingungen keine reproduzierbaren Wachstumsbedingungen lieferte, erfolgte die Anzucht der Zellen und die Expression in allen hier beschriebenen Versuchen aerob. Die AOR wurde wie unter 4.6.6 beschrieben gereinigt und auf die Aktivität mit Benzaldehyd und Benzylviologen untersucht. Mittels ICP-MS wurde auch hier der Gehalt an den Elementen Mg, P, Fe, Mo und W bestimmt. Alle Ergebnisse finden sich in Tabelle 7.

Während die AOR aus *A. Evansii* Δ *moeA1* verglichen mit rekombinantem Enzym aus dem Wildtyp-Stamm noch ca. ein Viertel der Aktivität aufwies, führte die Deletion von *moeA2* zum vollständigen Verlust der AOR-Aktivität. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Elementanalyse der gereinigten Proteine. In der AOR aus *A. Evansii* Δ *moeA1* findet sich ca. halb so viel Wolfram, wie in der AOR aus dem Wildtypstamm (vgl. Tab. 6 auf S. 47), in der inaktiven AOR aus *A. Evansii* Δ *moeA2* findet sich auch kein Wolfram mehr.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die Δ *moeA2*-Mutante durch das *moeA2*-Gen aus *A. aromaticum* komplementieren lässt. Hierzu wurde *moeA2* im Expressionsvektor hinter das *aorE*-Gen gesetzt, sodass MoeA2 zusammen mit der AOR koexprimiert wurde. Eine Komplementation von *A. Evansii* Δ *moeA2* mit *moeA1* führte dagegen wie erwartet weiterhin zur Bildung von inaktiver AOR.

Einige Werte in Tab. 7 erscheinen unplausibel. Die hohen Wolfram-Konzentrationen in den Spalten 1 und 4 lassen sich möglicherweise damit erklären, dass bei der Reinigung des Proteins nur sehr kurz gewaschen wurde und sich somit noch freies Wolframat aus dem Zellysat in der Präparation befand (siehe hierzu auch 6.3).

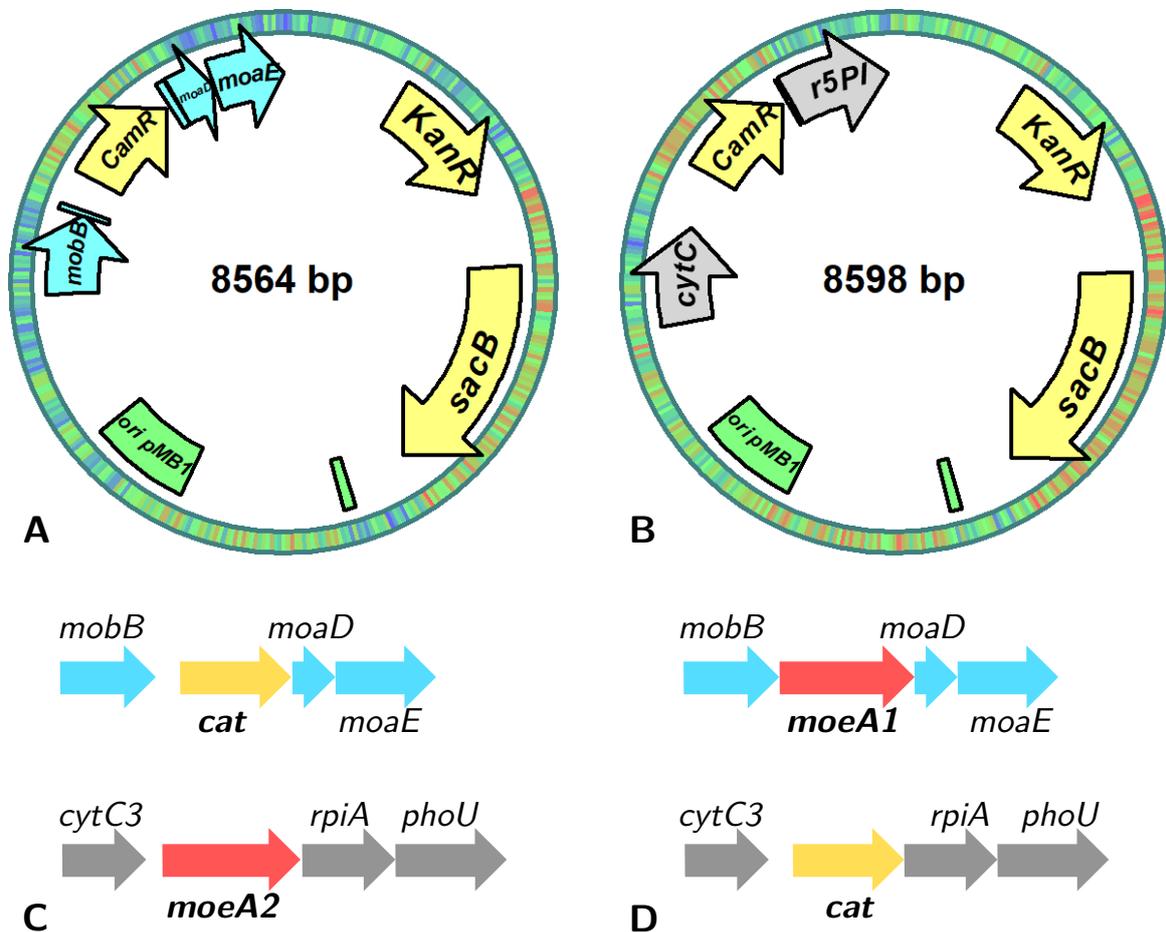


Abbildung 11: Oben: Vektoren basierend auf pK19mob_sacB zur Deletion der Gene *moeA1* (A) bzw. *moeA2* (B) im Genom von *A. Evansii*. Die Vektoren enthalten einen ca. 2,2 kb großen Ausschnitt aus dem Genom (Gene in hellblau bzw. grau eingezeichnet), bei dem das jeweilige *moeA*-Gen durch Promotor und Gen einer Chloramphenicol-Acetyltransferase ersetzt wurde. Unten: Durch Integration des Deletionsvektors und anschließendes looping-out entstehen Stämme von *A. Evansii*, bei denen entweder *moeA1* (C) oder *moeA2* (D) durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette ersetzt ist.

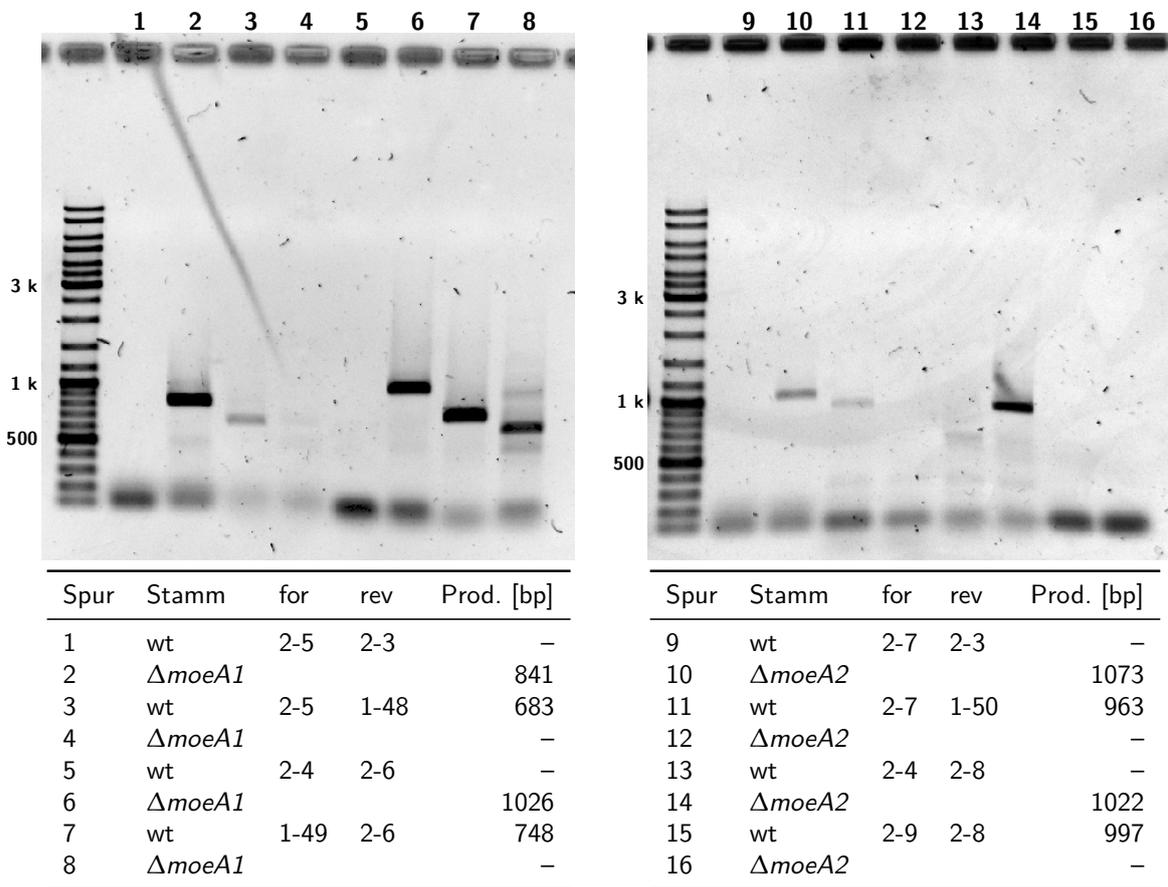


Abbildung 12: Validierung der erfolgreichen Deletion der Gene *moeA1* bzw. *moeA2* im Genom von *A. Evansii* mittels Colony-PCR. Die Tabellen listen alle verwendeten Primer (for, rev) sowie die Größe des zu erwartenden PCR-Produkts auf. Als Kontrolle wurde der Wildtyp-Stamm von *A. Evansii* eingesetzt. Bis auf die Reaktion in Lane 15 konnten alle erwarteten PCR-Produkte nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Metallgehalt und Aktivität rekombinanter AOR in $\Delta moeA$ -Stämmen.
Mit * markierte Werte erscheinen unplausibel

	<i>A. evansii</i> wt	$\Delta moeA1$	$\Delta moeA2$	$\Delta moeA2$ + <i>moeA2</i>	$\Delta moeA2$ + <i>moeA1</i>
Mg	1,07	*0,31	1,46	2,24	n.b.
P	8,89	8,64	*26,32	*45,62	n.b.
Fe	35,97	43,13	42,19	28,32	n.b.
Mo	0	0,05	0	0,02	n.b.
W	*4,87	0,86	0,06	*3,70	n.b.
s.A. (BV) [U/mg]	93	26	0	14	0
Ausbeute [mg/l]	2,2	1,9	0,6	0,9	n.b.

5.2.3 Aktivität der Nitratreduktase in $\Delta moeA$ -Stämmen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MoeA2 für die Aktivität des Wolframenzym AOR zwingend notwendig ist, sollte auch die Aktivität von Molybdänenzymen in den $\Delta moeA$ -Mutanten untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte die Aktivität der Nitratreduktase als Vertreter der DMSO-Reduktase-Familie bei limitierter Verfügbarkeit von Molybdän bestimmt werden. Alleine die Tatsache, dass sich beide Deletionsstämmen unter nitratreduzierenden Bedingungen kultivieren lassen, zeigt, dass prinzipiell beide MoeA-Paraloge in der Lage sind, Molybdat in den Kofaktor zu ligieren.

Da sich die verwendeten $\Delta moeA$ -Stämme von *A. Evansii* in molybdänfreiem Medium nicht reproduzierbar kultivieren ließen, wurden dem Medium 15 nM Na_2MoO_4 zugegeben. Dabei zeigten beide Deletionsstämmen vergleichbare Wachstumsraten mit Verdopplungszeiten von 11 bzw. 11,5 h. Das Wachstum des Wildtyp-Kontrollstamms fällt schneller aus, was darauf zurückzuführen ist, dass hier – anders als bei den Deletionsstämmen – kein Antibiotikum im Medium vorliegt.

Zur Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität wurden die Zellen mittels Sonifikation lysiert und die Aktivität im Zellextrakt über die Reduktion von Nitrat mittels vorreduziertem Benzylviologen gemessen. Dabei zeigen beide Deletionsstämmen eine deutlich reduzierte Aktivität. Während beim $\Delta moeA1$ -Stamm verglichen mit dem Wildtyp noch ca. ein Viertel der Aktivität nachweisbar ist, reduziert sich die Aktivität bei *A. Evansii* $\Delta moeA2$ auf ca. 13%. Alle Ergebnisse sind in Abb. 13 aufgeführt.

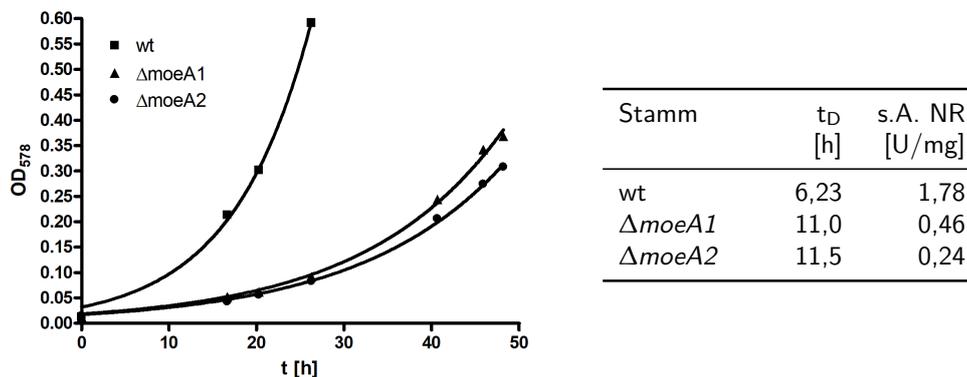


Abbildung 13: Wachstum und Nitratreduktaseaktivität bei der anaeroben Anzucht der $\Delta moeA$ -Stämme bei 15 nM MoO_4^{2-} .

5.2.4 Komplementation von *E. coli* $\Delta moeA$

Bereits in der Arbeit von Fabian Arndt wurde gezeigt, dass zwar das *moeA2*-Gen, nicht aber das *moeA1*-Gen in der Lage ist, die Funktion des *moeA*-Gens aus *E. coli* zu komplementieren und so die Aktivität der anderenfalls inaktiven Formiatdehydrogenase FdhH wiederherzustellen (Arndt, 2020). Da dort andere Expressionskonstrukte für MoeA1 zum

Einsatz kamen, wurde dieser Versuch mit den neuen Expressionsvektoren nochmals wiederholt. Dabei wurden sowohl *moeA1* aus *A. aromaticum* als auch *moeA1* aus *Acidovorax* sp. JS42 getestet. Hierzu wurden die Expressionsplasmide pASG105_*moeA1*_EbN1, pASG105_*moeA1*_JS42 und pASG5_*moeA2*_EbN1 in den *moeA*-defizienten *E. coli*-Stamm JW0811-1 eingebracht und unter anaeroben Bedingungen auf Komplexmedium kultiviert. Eine Überschichtung der Kolonien mit Formiat und Benzylviologen führte im Fall einer aktiven FdhH innerhalb von Sekunden zur Violettfärbung durch die Reduktion des Benzylviologens.

Mit den in dieser Arbeit generierten Expressionsvektoren konnten die Ergebnisse aus Arndt (2020) reproduziert werden. Die getesteten *moeA1*-Gene aus *A. aromaticum* und *Acidovorax* waren nicht in der Lage, die FdhH-Aktivität wiederherzustellen. Lediglich *moeA2* führte zu einer erfolgreichen Komplementation.

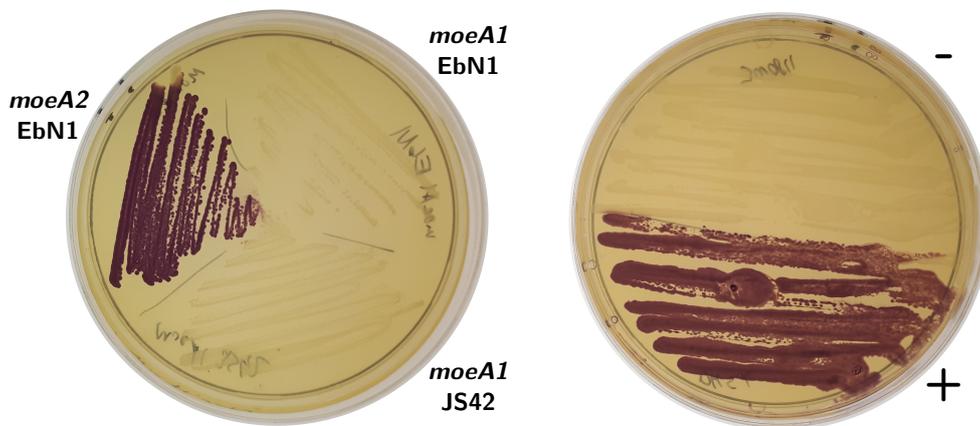


Abbildung 14: Überschichtungsassay zur Komplementation der Aktivität der Formiatdehydrogenase. Der *moeA*-defiziente Stamm JW0811-1 wurde mit Expressionsplasmiden der angegebenen *moeA*-Gene ausgestattet und auf die Aktivität der FdhH getestet. Als Negativkontrolle (-) kam *E. coli* JW0811-1 mit leerem pASG5-Vektor zum Einsatz, als Positivkontrolle (+) *E. coli* DH5 α mit leerem pASG5.

5.2.5 Charakterisierung des Proteins MoeA1

Nachdem Wolframat – wie die oben beschriebenen Experimente zeigen – exklusiv von MoeA2, nicht aber von MoeA1 verbaut wird, liegt es nahe, dass sich diese beiden Proteine strukturell unterscheiden. Von MoeA2 existiert bereits eine Kristallstruktur, während die Kristallisation von MoeA1 bislang nicht erfolgreich war (Arndt, 2020). Deshalb sollte ein erneuter Versuch zur Kristallisation von MoeA1 unternommen werden. Da sich die in Arndt (2020) beschriebene Expression von MoeA1 nicht reproduzieren ließ und nur sehr geringe Ausbeuten lieferte (s. Abb. 15), wurde hier das *moeA1*-Gen aus *Acidovorax* sp. JS42 verwendet, welches zur Aminosäuresequenz von *A. aromaticum* 62 % identische und 74 %

ähnliche Aminosäuren aufweist. Als Expressionsvektor kam auch hier das Stargate-System zum Einsatz, wobei das Zielprotein N-terminal mit einem twin-Strep-Tag fusioniert wurde.

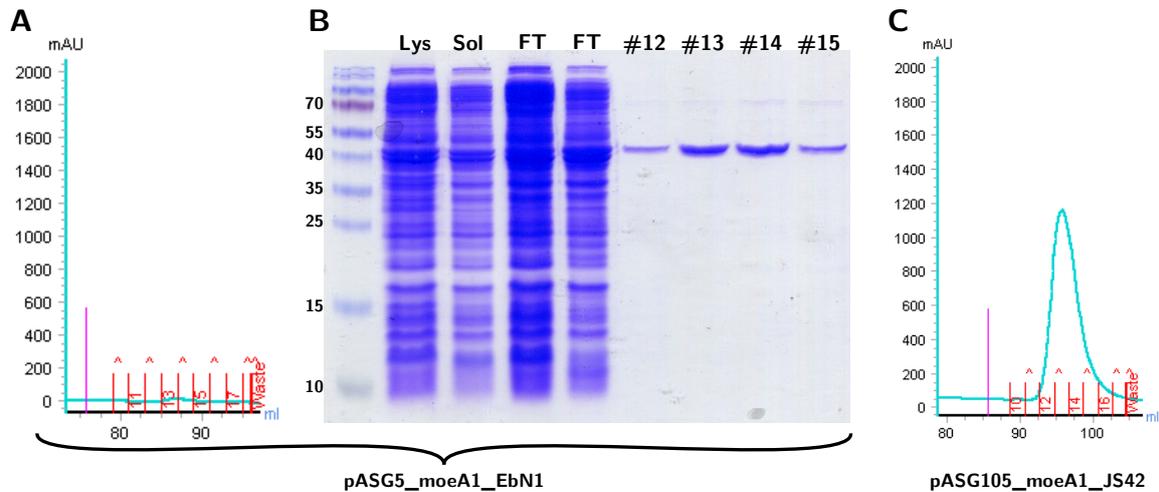
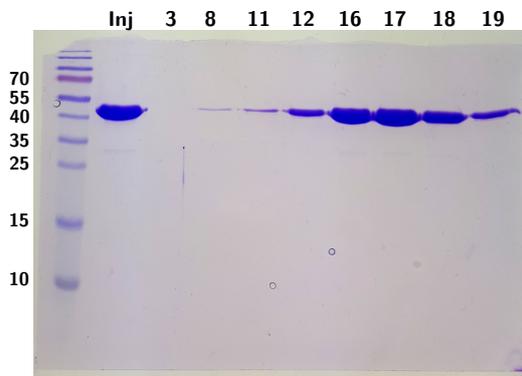
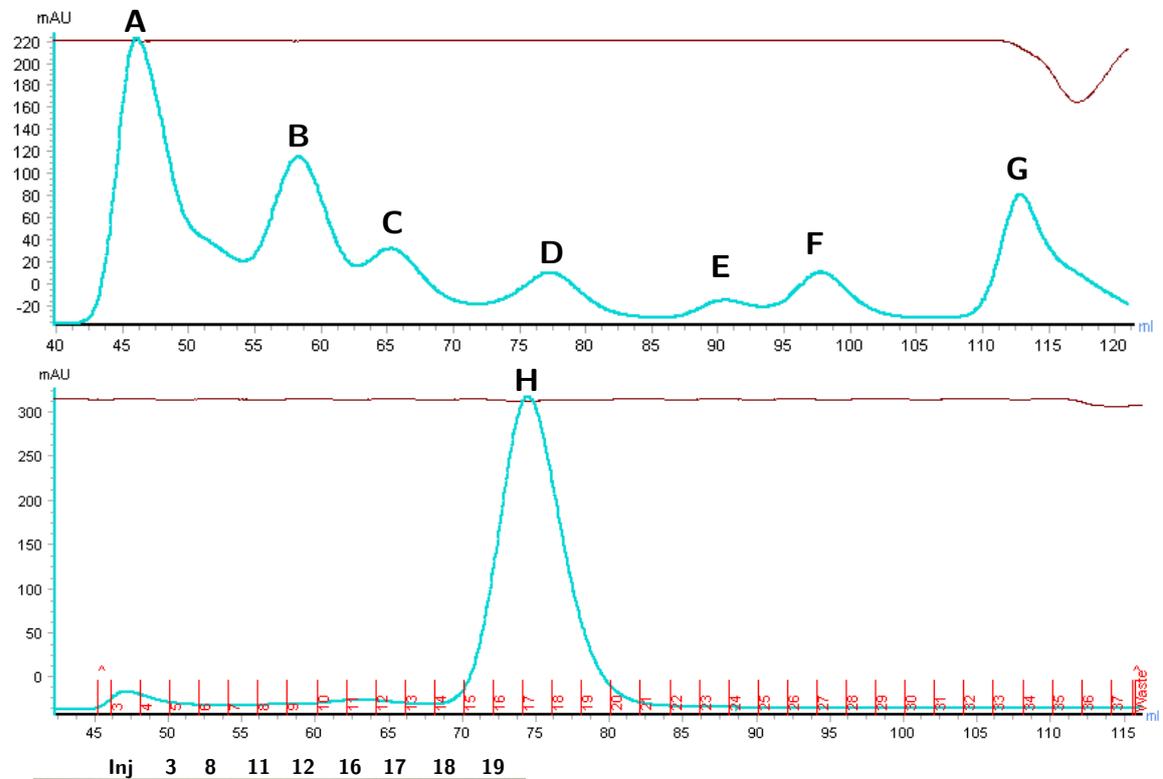


Abbildung 15: **(A)**: UV-Signal bei Elution von rekombinantem MoeA1 aus *A. aromaticum* mit einfachem Strep-Tag (4l Expressionskultur)
(B): SDS-PAGE der links gezeigten Expression von MoeA1. Der Großteil des rekombinanten Proteins befindet sich im Durchlauf. Lys: Lysat nach Zellaufschluss, Sol: Löslicher Zellextrakt, FT: Durchlaufaktionen
(C): Vergleich mit der rekombinanten Expression von MoeA1 aus *Acidovorax* mit twin-Strep-Tag. Hier bindet deutlich mehr Protein an die Säule.

MoeA1 wurde unter anaeroben Bedingungen in *E. coli* exprimiert und mittels Streptactin-Affinitätschromatographie gereinigt. Aus 4l Kultur konnten so 31 mg Protein gewonnen werden. Um die Reinheit des Proteins für die Kristallisation weiter zu erhöhen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Durch den Vergleich des Elutionsprofils mit den Elutionsvolumina von Standardproteinen wurde außerdem eine Bestimmung der nativen Molekülmasse durchgeführt (siehe Abb. 16, Abb. 17 und Tab. 8). Dabei ergab sich mit der ermittelten Funktion für das Molekulargewicht $\ln(MW) = -6,386 \cdot K_d + 7,042$ eine native Molekülmasse von ca. 98 kDa. Bei einer theoretischen Masse des Monomers von 47 kDa liegt MoeA1 unter den verwendeten Bedingungen folglich als Dimer vor.

Aus dem gereinigten MoeA1 konnten einige Proteinkristalle gewonnen werden (siehe Abb. 18). Die röntgenkristallographische Vermessung am Synchrotron durch die AG Essen (Uni Marburg) zeigte, dass diese Kristalle aber nur bis zu einer Auflösung von ca. 3,3 Å streuten, wodurch eine Strukturaufklärung aus den gewonnenen Datensätzen schwierig ist. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit liegt leider noch keine Struktur des Proteins vor.



Peak	Protein	Elutionsvol. [ml]
A	Blue Dextran	46,11
B	Apoferritin	58,31
C	β -Amylase	64,40
D	BSA	77,44
E	Carboanhydrase	90,62
F	Cytochrom c	97,80
G	Cyanocobalamin	112,86
H	MoeA1	74,50

Abbildung 16: Elutionsprofile der GröÙenausschlusschromatographie von MoeA1 (Mitte) und den Standardproteinen (oben).
Unten links: SDS-PAGE von MoeA1 vor (Inj) und nach der SEC (Fraktionen 3-19).

Tabelle 8: Aus den Retentionszeiten der Größenausschlusschromatographie ermittelte K_d -Werte und daraus errechnete molekulare Massen

Protein	M [kDa]	V [ml]	K_d	M_{calc} [kDa]
Apoferritin	443	58,31	0,1651	398
β -Amylase	200	64,40	0,2611	216
BSA	66	77,44	0,4240	76
Carboanhydrase	29	90,62	0,6024	24
Cytochrom c	12,4	97,80	0,6996	13,1
MoeA1		74,50	0,3842	98

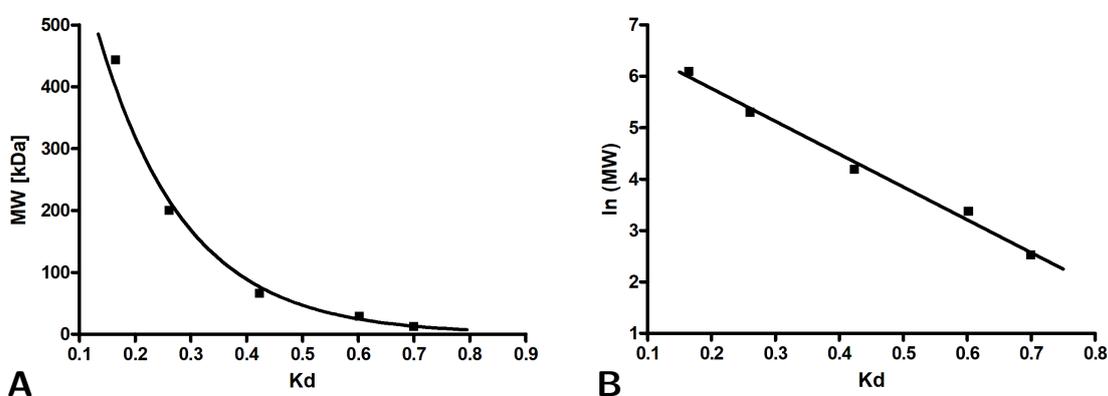


Abbildung 17: Nach Auftrag der K_d -Werte der Standardproteine gegen deren molekulare Masse (**A**) bzw. die logarithmierte molekulare Masse (**B**) wurde mittels Regression eine Funktion zur Berechnung der molekularen Masse bestimmt. Details siehe Kap. 4.6.8 auf S. 40.

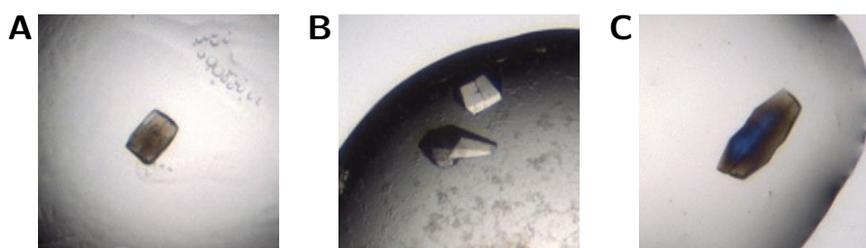


Abbildung 18: Proteinkristalle von MoeA1 ca. 5 Wochen nach dem Ansetzen der Platten
(A) 200 mM $Mg(NO_3)_2$, 20 % PEG 3.350, 32 mg/ml MoeA1
(B) 200 mM $Mg(NO_3)_2$, 20 % PEG 3.350, 16 mg/ml MoeA1
(C) 1 M LiCl, 100 mM Na-Citrat pH 5,0, 20 % PEG 6.000, 32 mg/ml MoeA1

5.2.6 Generierung einer *aorDE*-Disruptionsmutante von *A. Evansii*

Bereits mit den Versuchen in Kap. 5.1.1 konnte gezeigt werden, dass zwar bereits die Expression der drei Strukturgene *aorA-C* zur Produktion von aktiver AOR führt, sich die Aktivität aber durch die Koexpression der Gene *aorD* und *aorE* um ein Vielfaches erhöht (vgl. Tab 6). Da *A. Evansii* ein eigenes *aor*-Operon in seinem Genom besitzt, liegt die Vermutung nahe, dass bei rekombinanter Expression der Strukturgene auch die endogenen Varianten von AorD und eventuell auch AorE (siehe 6.6) an der Maturation der AOR beteiligt sind.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde auf Basis des Vektors pK19mob_sacB eine Disruptionsmutante von *A. Evansii* generiert, bei der die Gene *aorD* und *aorE* durch Integration des Plasmids nicht mehr transkribiert werden (siehe Abb. 19). Wird der so erzeugte Stamm mit dem Expressionsplasmid, das lediglich die Strukturgene der AOR besitzt (pASG105-AORshort-EbN1), konjugiert, sollte eine Expression der AOR in Abwesenheit von AorD und AorE erfolgen.

Die auf diese Weise erzeugte rekombinante AOR zeigte mit Benzaldehyd und Benzylviologen eine Aktivität von ca. 1,4 U/mg. Die Aktivität der AOR, die mit demselben Expressionsvektor im Wildtyp-Stamm von *A. Evansii* produziert wurde, liegt bei 4,5 U/mg (vgl. Tab. 6). Die Disruption an der Position des *aorD*-Gens verringert die Aktivität des Enzyms also um ca. zwei Drittel.

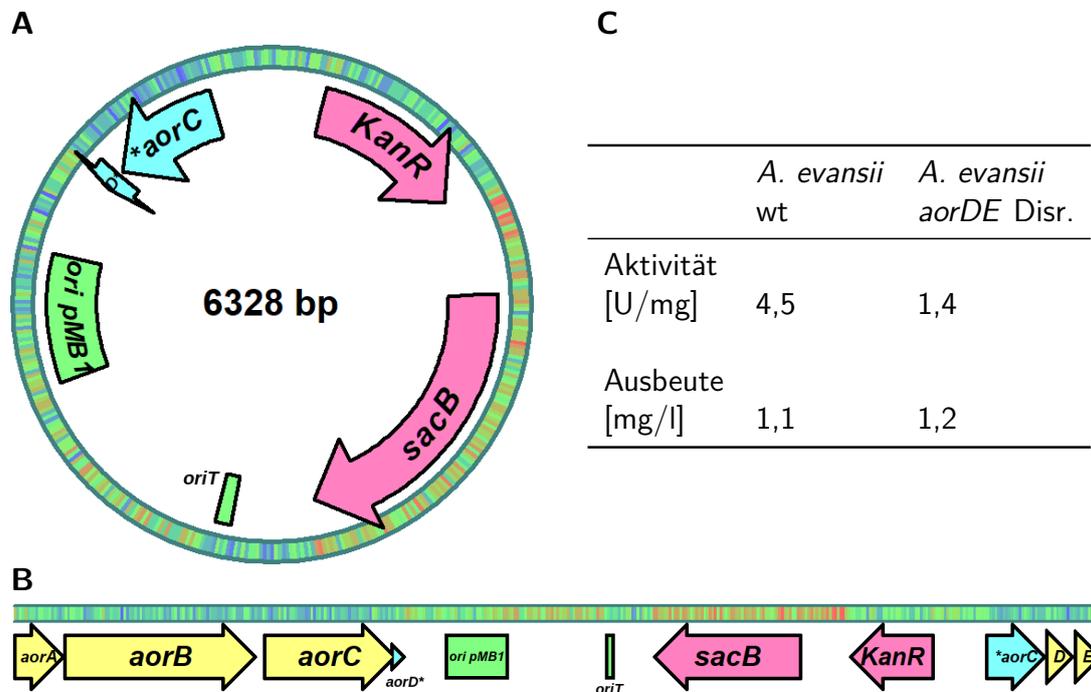


Abbildung 19: (A) pK19mob_sacB-Derivat zur Disruptionsmutagenese von *aorD* und *aorE*.

Der Vektor enthält ein 676 bp großes Fragment mit dem 3'-Ende von *aorC* und den ersten 91 bp von *aorD*.

(B) Nach erfolgter Integration ins Genom von *A. Evansii* wird das *aor*-Operon (gelb) nach den ersten 91 bp von *aorD* vom Disruptionsvektor unterbrochen. Die intakten Kopien von *aorD* und *aorE* sollten aufgrund des fehlenden Promotors nicht mehr transkribiert werden.

(C) Die Aktivität der gereinigten AOR bei rekombinanter Expression der Strukturgene *aorA-C* ist in der Disruptionsmutante deutlich niedriger als im Wildtyp-Stamm.

6 Diskussion

6.1 Rekombinante Expression der AOR

Die vorliegende Arbeit knüpft an die vorangegangene Charakterisierung der Aldehydoxidoreduktase aus *Aromatoleum aromaticum* an (Arndt, 2020; Arndt *et al.*, 2019). Während die AOR vormals nativ aus *A. aromaticum* EbN1 Δpdh gereinigt werden musste (siehe Arndt *et al.*, 2019), wurde im Rahmen dieser Arbeit ein heterologes Expressionssystem etabliert.

Vorangegangene Versuche der heterologen Expression mit *Acidovorax* sp. JS42 blieben weitestgehend erfolglos, es konnte dort lediglich ein moderater Anstieg der AOR-Aktivität im Zellextrakt beobachtet werden (Arndt, 2020). Durch die Nutzung von *Aromatoleum Evansii* KB740 als Expressionsstamm konnte die AOR erstmals aktiv heterolog produziert und gereinigt werden. Dabei führt eine Expression der drei Strukturgene *aorA-C* zwar zur Überproduktion von aktivem Enzym, gute Aktivitäten lassen sich jedoch nur erreichen, wenn die für die für putativen Maturationsfaktoren codierenden Gene *aorD* und *aorE* ebenfalls überexprimiert werden (siehe 6.6).

Die Wolframatkonzentration wurde mit 10-15 μM so gewählt, dass sie die Molybdatkonzentration (2 μM) um ein mehrfaches übersteigt und dabei in einem Bereich liegt, der für den Expressionsstamm bereits leicht toxisch ist (vgl. Bachelorarbeit Vanessa Reitz). Ob der Einsatz von geringeren Wolframatkonzentrationen die Aktivität des Enzyms negativ beeinflusst, wurde nicht überprüft. Der Einbau von Wolframat ins rekombinante Enzym scheint aber sehr effizient zu sein: Bei einer Expressionskultur ohne zusätzliches Wolframat (24 nM Endkonzentration) fanden sich rechnerisch ca. 15 % des gesamten Wolframs im isolierten Enzym wieder (vgl. Tab. 6 Spalte 3, S. 47).

6.2 Eigenschaften der rekombinanten AOR

Die rekombinante AOR weist – soweit untersucht – ähnliche Eigenschaften wie das nativ gereinigte Enzym auf. Beim Vergleich mit den in Arndt *et al.* (2019) aufgeführten Daten muss berücksichtigt werden, dass die Autoren hier noch von einer hexameren Zusammensetzung der AOR ausgehen ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$, 264 kDa). Alle hier zitierten Werte (vgl. Tab. 6 S. 47) wurden deshalb mit der molekularen Masse des Heteropentamers ($\alpha_2\beta_2\gamma$, 218 kDa) neu berechnet.

Sowohl das native Enzym als auch die rekombinante AOR unter optimierten Bedingungen besitzen ca. 1,5 Wolframatome pro Holoenzym, der Wert ist also etwas niedriger, als man bei einer vollständigen Besetzung mit dem WCo erwarten würde (theoretisch 2 W / Heteropentamer). Auch beim Eisen finden sich regelmäßig deutlich weniger als die erwarteten 40 Atome. Vor diesem Hintergrund fällt auf, dass das rekombinante Enzym trotz des vergleichbaren Wolfram- und niedrigeren Eisengehalts das native Enzym in der Aktivität um den Faktor 3-4 übersteigt. Der Grund hierfür dürfte in der deutlich längeren Reinigungsprozedur bei Isolation der nativen AOR liegen, bei der mutmaßlich ein Teil der Aktivität verloren geht.

Der Gehalt an FAD ist im rekombinanten Enzym etwas höher als im nativen Enzym (0,7 bzw. 0,5 Moleküle). Da es sich bei der rekombinanten Enzympräparation nicht um ein reines Heteropentamer handelt (s.u.), dürfte der tatsächliche FAD-Gehalt in den γ -Einheiten hier noch höher liegen. Das Verhältnis der Aktivität mit NAD im Vergleich zur Aktivität mit Benzylviologen ist dagegen dennoch annähernd identisch, was ein Indiz dafür ist, dass der Elektronentransport über die α -Einheit die Aktivität vermutlich stärker beeinflusst, als der Besetzungsgrad mit FAD.

Durch Größenausschlusschromatographie konnte gezeigt werden, dass das isolierte Enzym aus mehreren Spezies besteht, die sich in ihrer Zusammensetzung aus den einzelnen Untereinheiten unterscheiden. Das Pentamer ($\alpha_2\beta_2\gamma$) stellt die größte und gemessen am Absorptionssignal häufigste Spezies dar. Es konnten jedoch weitere Proteine beobachtet werden, die entsprechend ihrer (geschätzten) Masse und ihrer AOR-Aktivität mit BV und NAD^+ vermutlich einem $\alpha\beta$ -Dimer und der freien α -Untereinheit entsprechen. Eine Mischung von unterschiedlichen Spezies wurde auch für die AOR aus *Moorella thermoacetica* beschrieben, wobei hier mutmaßlich Proteine mit der Zusammensetzung $\alpha_3\beta_3\gamma$ und ebenfalls das $\alpha\beta$ -Dimer auftraten (Huber *et al.*, 1995; Strobl *et al.*, 1992). Ob es sich im vorliegenden Fall um ein Artefakt der Reinigung handelt, oder ob die verschiedenen Zusammensetzungen auch eine physiologische Relevanz besitzen, ist mit den vorliegenden Daten nicht zu beantworten. In jedem Fall relativiert das Vorliegen einer Mischung die Aussagekraft der Elementanalysen, da die tatsächlichen Werte je nach Zusammensetzung der Mischung abweichen. So dürfte der Eisengehalt noch deutlich unterhalb des in Tab. 6 errechneten Werts liegen, der FAD-Gehalt der γ -Einheit dagegen höher.

Die Hydrogenaseaktivität der AOR wurde in Winiarska *et al.* (2022) vorgestellt und ausführlich beschrieben, daher wird hier auf eine weitergehende Diskussion verzichtet.

6.3 Limitierungen des heterologen Expressionssystems

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte rekombinante Expression von AOR in *A. Evansii* macht dieses Enzym für weitere Charakterisierungen und Anwendungen zugänglich. Musste die AOR vormals nativ aus *A. aromaticum* EbN1 Δpdh konventionell in drei Chromatographieschritten gereinigt werden (siehe Arndt *et al.*, 2019), genügt bei dem rekombinanten System eine einfache Affinitätschromatographie, um weitestgehend sauberes und hochaktives Enzym zu erhalten. Durch die aerobe Anzucht der Expressionskultur, die zu Verdopplungszeiten von ca. 1,5 h führt, lässt sich außerdem viel Zeit bei der Kultivierung einsparen.

Nichts desto trotz weist das vorliegende System noch einige Unzulänglichkeiten auf, die Potential für Verbesserungen bieten. Die Ausbeute an rekombinantem Protein liegt mit 1,5 - 2,5 mg/l Kultur zwar etwas über den Proteinnengen, die bei der Reinigung des nativen Proteins gewonnen werden konnten (44 mg aus 30l Zellkultur, vgl. Arndt *et al.*, 2019), verglichen mit etablierten Expressionssystemen für viele andere Enzyme ist diese Menge aber relativ niedrig.

Die Bindung der rekombinanten AOR an die Streptactinsäule ist nicht allzu gut, was zur Folge hat, dass eine nicht zu vernachlässigende Menge des Enzyms bereits mit dem

Waschschritt wieder von der Säule gespült wird und so beim Reinigungsprozess verloren geht. Sichtbar wird dieser Umstand bei Betrachtung des UV-Signals des FPLC-Monitors, das nach dem Auftrag des Lysats deutlich oberhalb der Grundlinie abflacht. Korrelierend dazu lässt sich in den Durchlaufaktionen AOR-Aktivität nachweisen. Mit dem vorliegenden System muss also bei jeder Reinigung ein Kompromiss zwischen der Ausbeute und der Reinheit des Enzyms gefunden werden, was auch an den Daten in Tab. 7 (S. 53) sichtbar wird: Bei einigen der aufgeführten Experimente führte eine sehr kurze Waschphase mutmaßlich zur Verschleppung von Wolframat und Phosphat aus dem Zellextrakt. Die unzureichende Bindung ans Säulenmaterial könnte an einer ungünstigen Platzierung des Strep-Tags liegen. Diese Vermutung wird durch erste Strukturdaten gestützt (Agnieszka Winiarska und Jan Schuller, Publikation in Vorbereitung). Für eine verbesserte Ausbeute bei der Reinigung sollte deshalb ein Konstrukt mit zugänglicherem Strep-Tag erstellt werden. Im Rahmen weiterer strukturbiochemischer Versuche ist geplant, den Affinitätstag an die katalytische Untereinheit (AorB) zu fusionieren.

Ein weiterer Nachteil des vorliegenden Systems ist die Tatsache, dass *A. evansii* bislang nur mittels Konjugation zugänglich ist. Die weitere molekularbiologische Charakterisierung über gezielte Mutagenese gestaltet sich so deutlich zeitaufwändiger als bei einem System, bei dem der Expressionsvektor via Transformation eingebracht werden kann.

Durch das endogene *aor*-Operon von *Aromatoleum evansii* kommt es außerdem zu einer Mischpopulation von Untereinheiten, bei der im gereinigten Enzym sowohl Untereinheiten der rekombinanten AOR (*A. aromaticum*) als auch der endogenen AOR (*A. evansii*) verbaut sind. Bei der kleinen Untereinheit (AorA) lässt sich dieser Umstand aufgrund der zusätzlichen Masse des Strep-Tags im SDS-Gel beobachten, aber auch bei den anderen Untereinheiten lassen sich endogene Proteine per Massenspektrometrie nachweisen. Für technische Anwendungen der AOR mag dies keine große Rolle spielen, bei strukturbiochemischen Fragestellungen kann dieser Umstand jedoch problematisch sein. Um dieses Problem zu eliminieren, könnte ein Deletionsstamm von *A. evansii* generiert werden, dem die endogenen *aor*-Gene fehlen. Somit könnte man AOR herstellen, die vollständig aus rekombinantem Protein besteht.

6.4 Charakterisierung von MoeA1

Strukturelle und biochemische Unterschiede zwischen MoeA1 und MoeA2 waren bereits Gegenstand der Dissertation von Fabian Arndt. Während von MoeA2 eine Kristallstruktur gezeigt werden konnte und mittels Elementanalyse dessen Bindungsverhalten mit MoO_4^{2-} und WO_4^{2-} untersucht wurde, lieferten dieselben Experimente mit MoeA1 keine belastbaren Ergebnisse (Arndt, 2020). Bei der Bestimmung der nativen Masse mittels Ferguson-Plot und mittels Crosslinking konnte nur für MoeA2 eine Dimerisierung gezeigt werden, MoeA1 lag dagegen nur in monomerer Form vor (Arndt, 2020). Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den Daten dieser Arbeit. Hier konnte mittels Größenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass MoeA1 von *Acidovorax* ebenfalls als Dimer vorliegt.

Diese Unterschiede lassen sich als Artefakt der Proteinreinigung erklären. Das Expressionskonstrukt, das in Arndt (2020) verwendet wurde, beinhaltet eine N-terminale Fusion

eines einfachen Strep-Tags an MoeA1 von *A. aromaticum*. Mit diesem Konstrukt ließen sich nur geringe Mengen von MoeA1 mittels Affinitätschromatographie aufreinigen, während sich gleichzeitig im Durchlauf noch Protein befindet, das im SDS-Gel auf selber Höhe läuft (siehe Abb. 15 S. 56). Da die auf diese Weise gewonnenen Proteinmengen nicht ausreichend für Kristallisationsexperimente waren, wurde in dieser Arbeit ein neues Konstrukt erstellt, das eine N-terminale Fusion eines doppelten Strep-Tags an MoeA1 aus *Acidovorax* enthält. Die hier gewonnenen Proteinmengen übersteigen diejenigen des alten Konstrukts um ein Vielfaches, weshalb vermutet werden kann, dass der Einfach-Strep-Tag des alten Konstrukts nicht geeignet war, um das Protein im nativen Zustand an die Säule zu binden. Das auf diese Weise gewonnene MoeA1 dürfte deshalb in einem disfunktionalen Zustand vorliegen, in dem der Strep-Tag dem Säulenmaterial zugänglich ist, während korrekt assembliertes MoeA1 mit den übrigen Proteinen des Zellextrakts ausgewaschen wird. Vor diesem Hintergrund müssen die in Arndt (2020) gezeigten experimentellen Daten zu MoeA1 in Frage gestellt werden, da bei allen *in vitro*-Experimenten, bei denen rekombinantes MoeA1 zum Einsatz kam, mit mutmaßlich disfunktionalem Protein gearbeitet wurde. Die Experimente zur Bindung von Metallionen sollten in jedem Fall wiederholt werden.

Die Expression wurde in dieser Arbeit nur mit MoeA1 aus *Acidovorax* gezeigt. Verglichen mit MoeA1 aus *A. aromaticum* weisen beide Proteine zwar über weite Bereiche konservierte Sequenzabschnitte auf, sind jedoch nur zu 63 % identisch (75 % ähnliche Aminosäuren). Für MoeA1 aus *A. aromaticum* sind zwar ähnliche Ergebnisse zu erwarten, nichts desto trotz sollte auch die Expression und Reinigung dieses Proteins mit N-terminal fusioniertem twin-Strep-Tag durchgeführt werden, um die hier aufgeführten Vermutungen bestätigen zu können. Ein entsprechendes Expressionsplasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits erstellt.

Die erhaltenen Proteinkristalle eignen sich aufgrund des geringen Streuvermögens leider nur bedingt zur Strukturaufklärung, sodass hier eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen oder eine erneute Kristallisation von MoeA1 aus *A. aromaticum* erwogen werden sollte.

6.5 Die Rolle von MoeA1 und MoeA2 in der WCo-Maturation

Es wurde bereits postuliert, dass die beiden Paraloge MoeA1 und MoeA2 für den selektiven Einbau von Wolfram in das MPT verantwortlich sind (Bever *et al.*, 2009). Mit den in dieser Arbeit generierten *moeA*-Deletionsstämmen von *A. Evansii* konnte gezeigt werden, dass MoeA2 essentiell für die Maturation des WCo ist: Rekombinante AOR aus einem *moeA2*-defizienten Expressionsstamm ist inaktiv und enthält kein Wolfram. Ein *moeA1*-defizienter Stamm generiert dagegen aktive AOR. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Komplementation des Δ *moeA2*-Stamms durch Koexpression von *moeA2* zusammen mit den Genen der AOR möglich ist.

Während MoeA2 also eindeutig als für den Wolframateinbau notwendiges Paralog identifiziert werden konnte, bleibt die Rolle von MoeA1 weiterhin unklar. Sowohl MoeA1 als auch MoeA2 sind in der Lage, Molybdat an MPT zu ligieren. Dieser Umstand wird da-

durch sichtbar, dass sowohl der $\Delta moeA1$ - als auch der $\Delta moeA2$ -Stamm von *A. Evansii* in der Lage sind, aktive Nitratreduktase zu produzieren. In *E. coli* $\Delta moeA$ komplementiert *moeA2*, nicht aber *moeA1* den Aktivitätsverlust der Formiatdehydrogenase FdhH. Letzteres kann dadurch erklärt werden, dass MoeA2 verglichen mit MoeA1 eine höhere Verwandtschaft zu MoeA aus *E. coli* besitzt (siehe hierzu auch Arndt, 2020).

Die Hypothese, dass eines der beiden MoeA-Paraloge exklusiv die Ligation von Molybdat katalysiert, muss also verworfen werden. Es bleibt unklar, wie stark sich die Affinitäten der beiden Proteine zu Molybdat unterscheiden. In dieser Arbeit konnte lediglich gezeigt werden, dass beide Deletionsstämme unter nitratreduzierenden Bedingungen in molybdatfreiem Medium nicht reproduzierbar wachsen und in Medium mit 15 nM MoO_4^{2-} vergleichbare Wachstumsraten aufweisen. Die Aktivität der Nitratreduktase im Zellextrakt unterscheidet sich zwar um den Faktor 2, bedingt durch die Vielzahl der möglichen Ursachen, unter anderem der schlechten Reproduzierbarkeit der Zellyse in dem verwendeten 500 μ l-Maßstab, lässt sich hieraus aber keine Aussage ableiten. Das Experiment sollte mit einer Reihe an niedrigeren Molybdatkonzentrationen wiederholt werden, um zu sehen, ob die beiden $\Delta moeA$ -Stämme hier deutliche Unterschiede im Wachstum und/oder der Nitratreduktaseaktivität zeigen. Außerdem sind *in vitro*-Versuche wie Metallbindungs- oder Microscale-Thermophoreseexperimente denkbar, wie sie in Arndt (2020) gezeigt wurden.

6.6 Die Rolle von AorD und AorE

Die Aktivität der rekombinanten AOR ist stark von der Anwesenheit der Maturationsfaktoren AorD und AorE abhängig. Werden nur die Strukturgene *aorA-C* exprimiert, lassen sich nur ca. 5 % der Aktivität erzielen, die bei Expression des kompletten Operons *aorA-E* erreicht wird. Dabei muss berücksichtigt werden, dass auch in diesem Fall noch endogenes AorD, eventuell auch AorE von *A. Evansii* vorhanden sind. Ein Versuch, diese Gene durch Insertion eines Plasmids stillzulegen, führt zu einer weiteren deutlichen Verringerung der Aktivität.

Bei AorD handelt es sich um ein Protein, das in der Primärstruktur Ähnlichkeiten mit MoaD besitzt. MoaD fungiert bei der Synthese von MPT als Schwefelcarrier, bei dem das Glycin am C-Terminus als Thiocarboxylat vorliegt und so der Schwefel auf cPMP übertragen werden kann (siehe Abb. 4 auf S. 19). AorD besitzt in den letzten ca. 20 Aminosäuren des C-Terminus eine große Ähnlichkeit zu MoaD, insbesondere findet sich C-terminal die konservierte Sequenz PPXXGG, was nahelegt, dass AorD ebenfalls als Schwefelcarrier fungieren könnte. Das *aor*-Operon in *Moorella thermoacetica* enthält ebenfalls ein Gen für ein MoaD-ähnliches Protein, das hier zwischen den Genen *aorB* und *aorC* liegt (siehe Abb. 20). Auch hier beschränkt sich die Homologie auf die letzten 20 Aminosäuren der Sequenz, der C-Terminus endet ebenfalls mit zwei Glycinresten.

AorE weist keine Sequenzhomologie zu bekannten Proteinen auf, es finden sich allerdings am C-Terminus ebenfalls konservierte Glycinreste, weswegen postuliert wurde, dass AorE ebenfalls am Schwefeltransfer beteiligt sein könnte (Arndt, 2020). Während *aorE* in *A. aromaticum* Bestandteil des *aor*-Operons ist, wird dieses Operon in *A. Evansii* durch ein insertiertes Phosphotransferase-Gen unterbrochen (s. Abb. 20). Ob *A. Evansii* also

endogenes AorE produziert, oder das Gen nicht transkribiert wird, ist noch nicht bekannt. Die (nahezu) vollständige Abwesenheit von endogenem AorE in *A. evansii* wäre jedoch eine plausible Erklärung für die große Zunahme der Aktivität der rekombinanten AOR bei der Koexpression von *aorD* und *aorE*. In *Moorella* findet sich kein Ortholog von AorE.

In *A. evansii* und *M. thermoacetica* findet sich außerdem in unmittelbarer Nähe ein σ^{54} -abhängiger Transkriptionsfaktor. Für andere Vertreter der Genera *Azoarcus* und *Thauera* wird vermutet, dass dieser an der Expressionsregulation der AOR beteiligt sein könnte (Schmitt *et al.*, 2017).

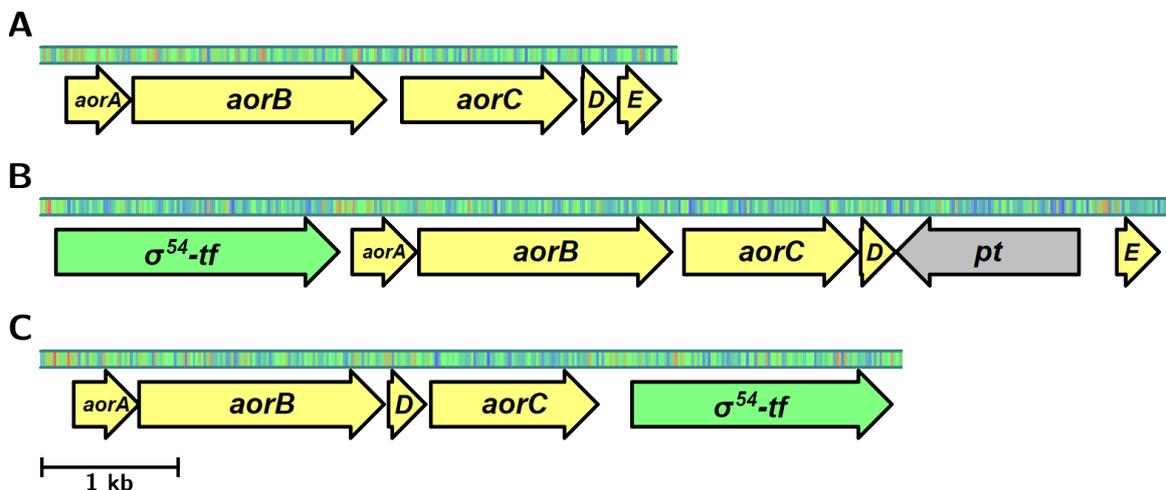


Abbildung 20: Struktur der *aor*-Operons in *A. aromaticum* (A), *A. evansii* (B), und *Moorella thermoacetica* (C).

In *A. evansii* wird das Operon von einem Phosphotransferasegen unterbrochen. Ob *aorE* exprimiert wird, ist unbekannt. *M. thermoacetica* besitzt kein *aorE*. In *A. evansii* und *M. thermoacetica* – nicht aber in *A. aromaticum* – findet sich in unmittelbarer Nähe das Gen eines σ^{54} -abhängigen Transkriptionsfaktors, der an der Expressionsregulation der AOR beteiligt sein könnte (vgl. Schmitt *et al.*, 2017).

Ob AorD und/oder AorE für die Maturation der AOR essentiell sind und die Insertionsmutagenese keinen hundertprozentigen knock-down verursacht oder ob deren Funktion in der Mutante von anderen Proteinen wie MoaD zumindest in geringerem Maße übernommen wird, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht sagen. In den hier gezeigten Experimenten wurden AorD und AorE immer nur gemeinsam betrachtet. Während für AorD wie oben beschrieben eine Rolle als Schwefeltransporter vermutet werden darf, gibt es derzeit noch keine Anhaltspunkte zur Rolle von AorE. Zur weiteren Untersuchung der Proteine bieten sich sowohl *in-vitro*- als auch *in vivo*-Experimente an. So könnte rekombinantes Protein neben der Kristallisation zur Strukturaufklärung beispielsweise für Bindungsexperimente zwischen AorD und AorE sowie zu AorB eingesetzt werden. *In vivo* könnte versucht werden, Expressionskonstrukte für AOR zu erstellen, die nur eines der beiden Gene beinhalten, um zu sehen, ob sich die resultierenden Enzyme in ihrer Aktivität

unterscheiden. Auch hier wäre eine Deletionsmutante von *A. evansii* ohne das *aor*-Operon von Vorteil.

```

AorD M. thermoacetica      ...QLKAGIAAILINGRNINFLQGLDTPLNPRDKATIIPPAAGG
AorD Acidovorax sp. JS42  ...PPDMVHLVLVNGRYIAPAARATTTLHEGDALAIWPPIAGG
AorD A. aromaticum        ...PEGRAHLVLVNGHFVPPAARATHRLGDDELAVWPPIAGG
AorD A. evansii           ...PERSAHLVLVNGHFVPAQRASRALADGDELAIWPPIAGG
MoaD M. thermoacetica     ...PLKGGCFVSVNGKMGVEE----YKLVEGDEVIFFPAVSSG
MoaD P. furiosus          ...DEDADVNIAVNGRYVSWD----EELKGDVVGVPVSSG
MoaD E. coli              ...LEDGKLLAAVNQTLVSFD----HPLTDGDEVAFFPPVTGG
MoaD A. aromaticum       ...AEGRNVRAARNQRMAGPT----DPVGPGEIAFFPPVTGG
MoaD A. evansii          ...GEGRNVRAARNQRMAAPA----DPVLPGEIAFFPPVTGG

```

Abbildung 21: Alignment des C-Terminus der MoaD- und AorD-Sequenzen der in dieser Arbeit angesprochenen Stämme. MoaD agiert als Schwefelcarrier, wobei das C-terminale Glycin sulfuriert wird und als Thiocarboxylat vorliegt. AorD weist C-terminal das selbe Sequenzmotiv (PPXXGG) auf.

6.7 Maturation des Wolframkofaktors

Die Notwendigkeit von MoeA2 sowie die Homologie von AorD zu MoaD erlauben es, einen Mechanismus für die Maturation des WCo zu postulieren, mit dem sich die Selektivität für Wolfram erklären lässt (siehe Abb. 22). Es ist denkbar, dass eines der beiden MPT-Moleküle des WCo bereits als cPMP in der *apo*-AOR gebunden wird und dort sulfuriert wird, wobei nicht MoaD, sondern AorD als Schwefeldonor fungiert. Ob und wie AorE oder andere Proteine an diesem Schritt beteiligt sind, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Aufgrund des konservierten Dreifach-Glycins am C-Terminus von AorE wurde vorgeschlagen, dass dieser ebenfalls als Thiocarboxylat vorliegen könnte (Arndt, 2020). Das andere cPMP-Molekül wird über die bekannte Kaskade via MoaD und MoaE sulfuriert und von MogA adenyliert. Die selektive Ligation mit Wolframat bei zeitgleichem Einbau in die AOR wird von MoeA2 katalysiert, wobei auch hier denkbar ist, dass weitere Proteine beteiligt sind. An der Synthese des Molybdän-Kofaktors sind dagegen – wie in den Experimenten gezeigt wurde – sowohl MoeA1 als auch MoeA2 beteiligt.

Der vorgeschlagene Mechanismus liefert eine Erklärung für die beobachtete Notwendigkeit von AorD und AorE für die Maturation der AOR. Außerdem bieten sich auch Ansätze, die den selektiven Einbau von Wolframat in die AOR erklären lassen, während MoeA2 prinzipiell auch in der Lage ist, die Ligation von Molybdat an MPT zu katalysieren. Um diese Theorie weiter zu überprüfen, würde sich neben der bereits erwähnten separaten Betrachtung von AorD und AorE ein Versuchsansatz anbieten, mit dem die Maturation der Proteine *in vitro* nachgestellt werden kann. Ein ähnliches System wurde bereits für die *in vitro*-Maturation von Molybdänenzymen vorgestellt: Ausgehend von einer Präparation

von cPMP wurde hier die Umsetzung zu Mo-MPT durch Zugabe von MoaD in der sulfurierten Form (MoaD-SH), MoaE, MogA und MoeA gezeigt, die über die Rekonstitution einer *apo*-Sulfitoxidase nachgewiesen wurde (Nichols und Rajagopalan, 2005).

Als *apo*-Enzym für den Nachweis der WCo-Synthese kommt hier die rekombinante AOR aus *A. evansii* Δ moeA2 in Frage, die nachgewiesenermaßen frei von Wolfram ist. Da aber neben cPMP und den direkt beteiligten Proteinen MoaD, MoaE, MogA, AorD, AorE und MoeA2 auch ein System zur Regeneration der Thiocarboxylate an MoaD (und AorD) berücksichtigt werden muss, gestaltet sich die praktische Umsetzung sehr umfangreich. Die Präparation von cPMP wurde ausgehend von einem Δ moaD-Stamm von *E. coli* mittels drei konsekutiver HPLC-Schritte beschrieben (Santamaria-Araujo *et al.*, 2011). Möglicherweise lassen sich cPMP und Teile der Regenerationsmaschinerie aber durch Zellextrakte passender *E. coli*-Stämme ersetzen.

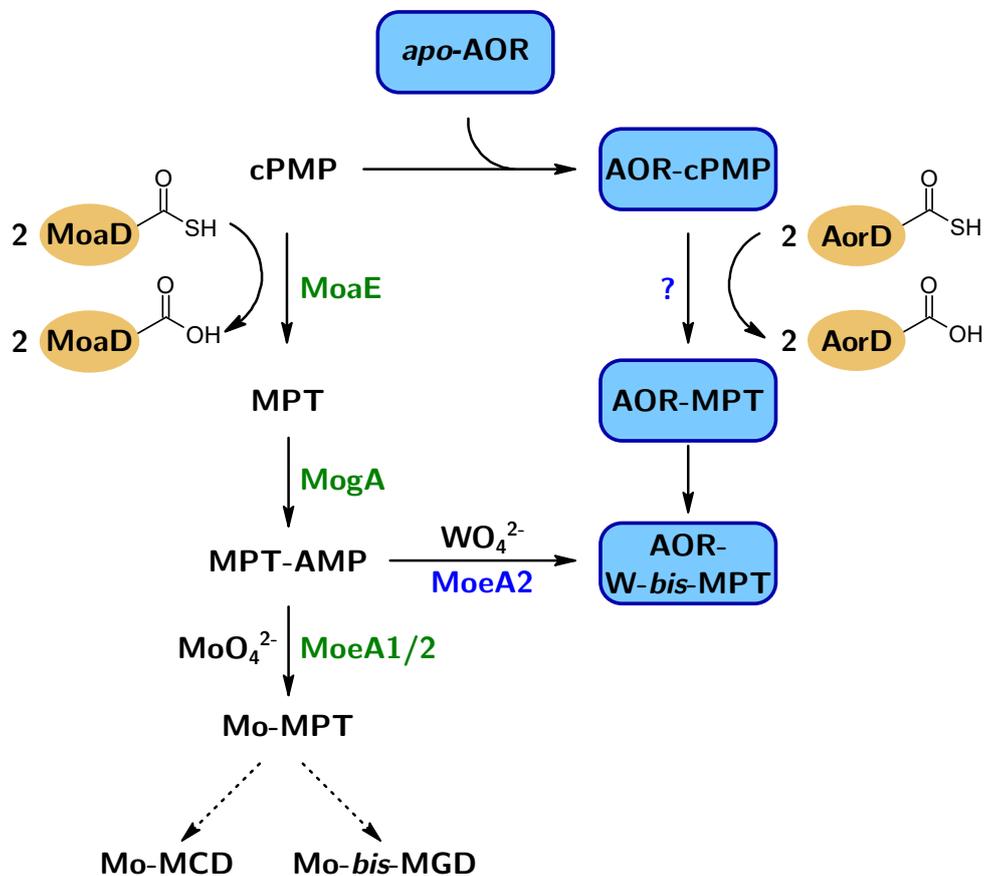


Abbildung 22: Hypothetischer Mechanismus der AOR-Maturation:

Der selektive Einbau von Wolfram könnte dadurch zustande kommen, dass eines der cPMP-Moleküle direkt an die *apo*-AOR bindet und dort sulfuriert wird, wobei der Schwefel von AorD übertragen wird. Ob AorE oder andere Proteine in diesem Schritt involviert sind, bleibt offen. Das andere cPMP-Molekül wird über die bekannte Kaskade via MoaD, MoaE und MogA sulfuriert und adenyliert. Das MPT-AMP wird von MoeA2 selektiv mit Wolframat ligiert und in die AOR eingebaut. Die Synthese der Molybdän-Kofaktoren erfolgt durch die Ligation des freien MPT-AMP mit Molybdat katalysiert durch MoeA1 oder MoeA2.

6.8 Biotechnologisches Potential der AOR

Die rekombinante Expression der AOR macht das Enzym sowohl für molekularbiologische Fragestellungen als auch prinzipiell für technische Anwendungen zugänglich. Biotechnologisch ist dabei die Reduktion von Carbonsäuren zu den entsprechenden Aldehyden die interessantere Reaktionsrichtung. Besonderes Augenmerk verdient die Tatsache, dass als Reduktionsmittel direkt elementarer Wasserstoff eingesetzt werden kann und das Enzym auch bei Exposition gegenüber Kohlenstoffmonoxid seine Aktivität behält (Winiarska *et al.*, 2022).

Eine mögliche biotechnologische Anwendung stellt die Kopplung der Säurereduktion der AOR mit Alkoholdehydrogenasen dar, die die Aldehyde zu den entsprechenden Alkoholen reduzieren. Insbesondere die Produktion längerkettigerer Alkohole ist dabei sowohl als Synthesebaustein in der chemischen und pharmazeutischen Industrie als auch für eine Anwendung als erneuerbarer Biokraftstoff interessant (Nissen und Basen, 2019). Entsprechende Reaktionskaskaden, die eine AOR involvieren, wurden bereits in *Pyrococcus furiosus* als Ganzzellkatalysesystem beschrieben (Basen *et al.*, 2014). Die *in vitro*-Kopplung der homodimeren AOR aus *Thermoanaerobacter* an ADHs ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung (Hitschler *et al.*, 2021; Nissen *et al.*, 2022).

Auch für die AOR aus *A. aromaticum* wurde bereits gezeigt, dass eine Kopplung mit ADHs prinzipiell möglich ist (Winiarska *et al.*, 2022). Ein Vorteil gegenüber den homodimeren AORs aus *Pyrococcus* oder *Thermoanaerobacter* stellt dabei die deutlich geringere Sensitivität gegenüber Sauerstoff dar. Die Promiskuität des Enzyms erlaubt eine Anwendung mit einem breiten Spektrum an möglichen Substraten und in Mischungen verschiedener Substrate, wie sie beispielsweise in Ligninhydrolysaten auftreten. Auch eine Modifikation des Substratspektrums über gezielte Mutagenese ist denkbar.

Neben physiologischen Elektronendonoren kommt als Reduktionsmittel außerdem ebenfalls Wasserstoff in Frage, wobei die Reaktion hier relativ empfindlich gegenüber Sauerstoff ist (Winiarska *et al.*, 2022). Die Hydrogenaseaktivität erlaubt es zusätzlich, H₂ auch zur Regeneration von NAD⁺ einzusetzen, was in Kombination mit einer NAD-abhängigen Alkoholdehydrogenase die Reduktion von Säure zum Alkohol mit Wasserstoff als alleinigem Reduktionsmittel ermöglicht (Winiarska *et al.*, 2022). Über die Interaktion der AOR mit diversen redoxaktiven Farbstoffen sind außerdem auch elektrochemische Anwendungen denkbar.

7 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Barajas, Esther, César Díaz-Pérez, Martha I. Ramírez-Díaz, Héctor Riveros-Rosas und Carlos Cervantes (Feb. 2011). »Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions«. In: *BioMetals* 24.4, S. 687–707. DOI: 10.1007/s10534-011-9421-x.
- Anders, H.-J., A. Kaetzke, P. Kampfer, W. Ludwig und G. Fuchs (Apr. 1995). »Taxonomic Position of Aromatic-Degrading Denitrifying Pseudomonad Strains K 172 and KB 740 and Their Description as New Members of the Genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., Respectively, Members of the Beta Subclass of the Proteobacteria«. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 45.2, S. 327–333. DOI: 10.1099/00207713-45-2-327.
- Arndt, Fabian (2020). »Wolframabhängige Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR): Katalytische Eigenschaften und Maturation«. Diss. Philipps-Universität Marburg.
- Arndt, Fabian, Georg Schmitt, Agnieszka Winiarska, Martin Saft, Andreas Seubert, Jörg Kahnt und Johann Heider (Jan. 2019). »Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes«. In: *Frontiers in Microbiology* 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00071.
- Baba, Tomoya, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A Datsenko, Masaru Tomita, Barry L Wanner und Hirotada Mori (Jan. 2006). »Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection«. In: *Molecular Systems Biology* 2.1. DOI: 10.1038/msb4100050.
- Basen, Mirko, Gerrit J. Schut, Diep M. Nguyen, Gina L. Lipscomb, Robert A. Benn, Cameron J. Prybol, Brian J. Vaccaro, Farris L. Poole, Robert M. Kelly und Michael W. W. Adams (Nov. 2014). »Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.49, S. 17618–17623. DOI: 10.1073/pnas.1413789111.
- Bevers, Loes E., Emile Bol, Peter-Leon Hagedoorn und Wilfred R. Hagen (Okt. 2005). »WOR5, a Novel Tungsten-Containing Aldehyde Oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* with a Broad Substrate Specificity«. In: *Journal of Bacteriology* 187.20, S. 7056–7061. DOI: 10.1128/jb.187.20.7056-7061.2005.
- Bevers, Loes E., Peter-Leon Hagedoorn und Wilfred R. Hagen (Feb. 2009). »The bioinorganic chemistry of tungsten«. In: *Coordination Chemistry Reviews* 253.3-4, S. 269–290. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.01.017.
- Bevers, Loes E., Peter-Leon Hagedoorn, Gerard C. Krijger und Wilfred R. Hagen (Sep. 2006). »Tungsten Transport Protein A (WtpA) in *Pyrococcus furiosus*: the First Member of a New Class of Tungstate and Molybdate Transporters«. In: *Journal of Bacteriology* 188.18, S. 6498–6505. DOI: 10.1128/jb.00548-06.
- Bevers, Loes E., Peter-Leon Hagedoorn, José A. Santamaria-Araujo, Axel Magalon, Wilfred R. Hagen und Guenter Schwarz (Dez. 2007). »Function of MoaB Proteins in the Biosynthesis of the Molybdenum and Tungsten Cofactors«. In: *Biochemistry* 47.3, S. 949–956. DOI: 10.1021/bi7020487.

- Chan, Michael K., Swarnalatha Mukund, Arnulf Kletzin, Michael W. W. Adams und Douglas C. Rees (März 1995). »Structure of a Hyperthermophilic Tungstopterin Enzyme, Aldehyde Ferredoxin Oxidoreductase«. In: *Science* 267.5203, S. 1463–1469. DOI: 10.1126/science.7878465.
- Daniels, Juma N., Margot M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan und Hermann Schindelin (Dez. 2007). »Crystal Structure of a Molybdopterin Synthase-Precursor Z Complex: Insight into Its Sulfur Transfer Mechanism and Its Role in Molybdenum Cofactor Deficiency«. In: *Biochemistry* 47.2, S. 615–626. DOI: 10.1021/bi701734g.
- Debnar-Daumler, C., A. Seubert, G. Schmitt und J. Heider (Jan. 2014). »Simultaneous Involvement of a Tungsten-Containing Aldehyde:Ferredoxin Oxidoreductase and a Phenylacetaldehyde Dehydrogenase in Anaerobic Phenylalanine Metabolism«. In: *Journal of Bacteriology* 196.2, S. 483–492. DOI: 10.1128/jb.00980-13.
- Dehio, C und M Meyer (Jan. 1997). »Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*«. In: *Journal of Bacteriology* 179.2, S. 538–540. DOI: 10.1128/jb.179.2.538-540.1997.
- Gates, Andrew J, Richard O Hughes, Sarah R Sharp, Paul D Millington, Arjaree Nilavongse, Jeffrey A Cole, Emily-Rose Leach, Brian Jepson, David J Richardson und Clive S Butler (März 2003). »Properties of the periplasmic nitrate reductases from *Paracoccus pantotrophus* and *Escherichia coli* after growth in tungsten-supplemented media«. In: *FEMS Microbiology Letters* 220.2, S. 261–269. DOI: 10.1016/s0378-1097(03)00122-8.
- Grunden, A. M. und K. T. Shanmugam (Okt. 1997). »Molybdate transport and regulation in bacteria«. In: *Archives of Microbiology* 168.5, S. 345–354. DOI: 10.1007/s002030050508.
- Hagedoorn, Peter-Leon (Dez. 2019). »Steady-state kinetics of the tungsten containing aldehyde: ferredoxin oxidoreductases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*«. In: *Journal of Biotechnology* 306, S. 142–148. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.10.005.
- Haja, Dominik K., Chang-Hao Wu, Farris L. Poole, John Sugar, Samuel G. Williams, Anne K. Jones und Michael W. W. Adams (Juli 2019). »Characterization of thiosulfate reductase from *Pyrobaculum aerophilum* heterologously produced in *Pyrococcus furiosus*«. In: *Extremophiles* 24.1, S. 53–62. DOI: 10.1007/s00792-019-01112-9.
- Heider, J, K Ma und M W Adams (Aug. 1995). »Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1«. In: *Journal of Bacteriology* 177.16, S. 4757–4764. DOI: 10.1128/jb.177.16.4757-4764.1995.
- Hille, Russ (Juli 2002). »Molybdenum and tungsten in biology«. In: *Trends in Biochemical Sciences* 27.7, S. 360–367. DOI: 10.1016/s0968-0004(02)02107-2.
- Hille, Russ, James Hall und Partha Basu (Jan. 2014). »The Mononuclear Molybdenum Enzymes«. In: *Chemical Reviews* 114.7, S. 3963–4038. DOI: 10.1021/cr400443z.
- Hitschler, Lisa, Laura Sofie Nissen, Michelle Kuntz und Mirko Basen (Sep. 2021). »Alcohol dehydrogenases AdhE and AdhB with broad substrate ranges are important enzymes

- for organic acid reduction in *Thermoanaerobacter* sp. strain X514«. In: *Biotechnology for Biofuels* 14.1. DOI: 10.1186/s13068-021-02038-1.
- Hover, Bradley M., Anna Lokszejn, Anthony A. Ribeiro und Kenichi Yokoyama (Apr. 2013). »Identification of a Cyclic Nucleotide as a Cryptic Intermediate in Molybdenum Cofactor Biosynthesis«. In: *Journal of the American Chemical Society* 135.18, S. 7019–7032. DOI: 10.1021/ja401781t.
- Huber, Claudia, Haik Skopan, Richard Feicht, Hiltrud White und Hilmut Simon (Aug. 1995). »Pterin cofactor, substrate specificity, and observations on the kinetics of the reversible tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium thermoacetum*«. In: *Archives of Microbiology* 164.2, S. 110–118. DOI: 10.1007/bf02525316.
- Inoue, Hiroaki, Hiroshi Nojima und Hiroto Okayama (Jan. 1990). »High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids«. In: *Gene* 96.1, S. 23–28. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.
- lobbi-Nivol, Chantal und Silke Leimkühler (Aug. 2013). »Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*«. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827.8-9, S. 1086–1101. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.11.007.
- Kibbe, W. A. (Mai 2007). »OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator«. In: *Nucleic Acids Research* 35.Web Server, W43–W46. DOI: 10.1093/nar/gkm234.
- Kung, Johannes W., Claudia Löffler, Katerina Dörner, Dimitri Heintz, Sébastien Gallien, Alain Van Dorsselaer, Thorsten Friedrich und Matthias Boll (Okt. 2009). »Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.42, S. 17687–17692. DOI: 10.1073/pnas.0905073106.
- Leimkühler, Silke (Apr. 2020). »The biosynthesis of the molybdenum cofactors in *Escherichia coli*«. In: *Environmental Microbiology* 22.6, S. 2007–2026. DOI: 10.1111/1462-2920.15003.
- Leimkühler, Silke und Chantal lobbi-Nivol (Okt. 2015). »Bacterial molybdoenzymes: old enzymes for new purposes«. In: *FEMS Microbiology Reviews* 40.1. Hrsg. von Marie-Therese Giudici-Ortoni, S. 1–18. DOI: 10.1093/femsre/fuv043.
- Leimkühler, Silke, Margot M. Wuebbens und K.V. Rajagopalan (Sep. 2001). »Characterization of *Escherichia coli* MoeB and Its Involvement in the Activation of Molybdopterin Synthase for the Biosynthesis of the Molybdenum Cofactor«. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.37, S. 34695–34701. DOI: 10.1074/jbc.m102787200.
- Llamas, Angel, Tanja Otte, Gerd Multhaupt, Ralf R. Mendel und Guenter Schwarz (Juli 2006). »The Mechanism of Nucleotide-assisted Molybdenum Insertion into Molybdopterin«. In: *Journal of Biological Chemistry* 281.27, S. 18343–18350. DOI: 10.1074/jbc.m601415200.
- Makdessi, Kathrin, Jan R. Andreesen und Andreas Pich (Jan. 2001). »Tungstate Uptake by a Highly Specific ABC Transporter in *Eubacterium acidaminophilum*«. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.27, S. 24557–24564. DOI: 10.1074/jbc.m101293200.
- Mota, Cristiano S., Odile Valette, Pablo J. González, Carlos D. Brondino, José J. G. Moura, Isabel Moura, Alain Dolla und Maria G. Rivas (Juni 2011). »Effects of Molyb-

- date and Tungstate on Expression Levels and Biochemical Characteristics of Formate Dehydrogenases Produced by *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491«. In: *Journal of Bacteriology* 193.12, S. 2917–2923. DOI: 10.1128/jb.01531-10.
- Mukund, S und M W Adams (Jan. 1996). »Molybdenum and vanadium do not replace tungsten in the catalytically active forms of the three tungstoenzymes in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*«. In: *Journal of Bacteriology* 178.1, S. 163–167. DOI: 10.1128/jb.178.1.163-167.1996.
- (Aug. 1991). »The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway«. In: *J Biol Chem* 266.22, S. 14208–14216. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)98669-2.
- Mukund, Swarnalatha und Michael W.W. Adams (Apr. 1995). »Glyceraldehyde-3-phosphate Ferredoxin Oxidoreductase, a Novel Tungsten-containing Enzyme with a Potential Glycolytic Role in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*«. In: *Journal of Biological Chemistry* 270.15, S. 8389–8392. DOI: 10.1074/jbc.270.15.8389.
- Neumann, Meina und Silke Leimkühler (Okt. 2008). »Heavy metal ions inhibit molybdoenzyme activity by binding to the dithiolene moiety of molybdopterin in *Escherichia coli*«. In: *FEBS Journal* 275.22, S. 5678–5689. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06694.x.
- Nichols, Jason D. und K.V. Rajagopalan (März 2005). »In Vitro Molybdenum Ligation to Molybdopterin Using Purified Components«. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.9, S. 7817–7822. DOI: 10.1074/jbc.m413783200.
- Nissen, Laura, Jimyung Moon und Mirko Basen (2022). »Purification and characterization of heterologously produced aldehyde:ferredoxin oxidoreductase (AOR) from *Thermoanaerobacter* sp. X514«. In: *VAAM Annual Conference 2022*. URL: https://www.dghm-vaam.de/fileadmin/congress/media/dghmvaam2020/druckelemente/VAAM2022_abstract_booklet.pdf.
- Nissen, Laura Sofie und Mirko Basen (Dez. 2019). »The emerging role of aldehyde:ferredoxin oxidoreductases in microbially-catalyzed alcohol production«. In: *Journal of Biotechnology* 306, S. 105–117. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.09.005.
- Rabus, Ralf und Friedrich Widdel (Feb. 1995). »Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria«. In: *Archives of Microbiology* 163.2, S. 96–103. DOI: 10.1007/bf00381782.
- Rabus, Ralf, Lars Wöhlbrand, Daniela Thies, Markus Meyer, Barbara Reinhold-Hurek und Peter Kämpfer (Apr. 2019). »*Aromatoleum* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Azoarcus evansii* and related species, and proposal of *Aromatoleum aromaticum* sp. nov., *Aromatoleum petrolei* sp. nov., *Aromatoleum bremense* sp. nov., *Aromatoleum toluolicum* sp. nov. and *Aromatoleum diolicum* sp. nov.« In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69.4, S. 982–997. DOI: 10.1099/ijsem.0.003244.
- Rauh, David, Andrea Graentzdoerffer, Katrin Granderath, Jan R. Andreesen und Andreas Pich (Dez. 2003). »Tungsten-containing aldehyde oxidoreductase of *Eubacteri-*

- um acidaminophilum*«. In: *European Journal of Biochemistry* 271.1, S. 212–219. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.03922.x.
- Reitz, Vanessa (2020). »Experimente zur in vitro Maturation eines Wco zur Vervollständigung einer inaktiven AOR aus *Aromatoleum aromaticum*«. Bachelorarb. Philipps-Universität Marburg.
- Reschke, Stefan, Benjamin R. Duffus, Peer Schrapers, Stefan Mebs, Christian Teutloff, Holger Dau, Michael Haumann und Silke Leimkühler (Apr. 2019). »Identification of YdhV as the First Molybdoenzyme Binding a Bis-Mo-MPT Cofactor in *Escherichia coli*«. In: *Biochemistry* 58.17, S. 2228–2242. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00078.
- Roy, Roopali und Michael W. W. Adams (Dez. 2002). »Characterization of a Fourth Tungsten-Containing Enzyme from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*«. In: *Journal of Bacteriology* 184.24, S. 6952–6956. DOI: 10.1128/jb.184.24.6952-6956.2002.
- Roy, Roopali, Angeli L. Menon und Michael W.W. Adams (2001). »[11] Aldehyde Oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus*«. In: *Hyperthermophilic enzymes Part B*. Elsevier, S. 132–144. DOI: 10.1016/s0076-6879(01)31052-2.
- Roy, Roopali, Swarnalatha Mukund, Gerrit J. Schut, Dianne M. Dunn, Robert Weiss und Michael W. W. Adams (Feb. 1999). »Purification and Molecular Characterization of the Tungsten-Containing Formaldehyde Ferredoxin Oxidoreductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: the Third of a Putative Five-Member Tungstoenzyme Family«. In: *Journal of Bacteriology* 181.4, S. 1171–1180. DOI: 10.1128/jb.181.4.1171-1180.1999.
- Santamaria-Araujo, Jose Angel, Victor Wray und Guenter Schwarz (Aug. 2011). »Structure and stability of the molybdenum cofactor intermediate cyclic pyranopterin monophosphate«. In: *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 17.1, S. 113–122. DOI: 10.1007/s00775-011-0835-2.
- Schäfer, Andreas, Andreas Tauch, Wolfgang Jäger, Jörn Kalinowski, Georg Thierbach und Alfred Pühler (Juli 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*«. In: *Gene* 145.1, S. 69–73. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90324-7.
- Schmitt, G., F. Arndt, J. Kahnt und J. Heider (Okt. 2017). »Adaptations to a Loss-of-Function Mutation in the Betaproteobacterium *Aromatoleum aromaticum*: Recruitment of Alternative Enzymes for Anaerobic Phenylalanine Degradation«. In: *Journal of Bacteriology* 199.20. Hrsg. von Conrad W. Mullineaux. DOI: 10.1128/jb.00383-17.
- Schwarz, Günter, Ralf R. Mendel und Markus W. Ribbe (Aug. 2009). »Molybdenum cofactors, enzymes and pathways«. In: *Nature* 460.7257, S. 839–847. DOI: 10.1038/nature08302.
- Seelmann, Carola S., Max Willistein, Johann Heider und Matthias Boll (Juli 2020). »Tungstoenzymes: Occurrence, Catalytic Diversity and Cofactor Synthesis«. In: *Inorganics* 8.8, S. 44. DOI: 10.3390/inorganics8080044.
- Strobl, Gerhard, Richard Feicht, Hiltrud White, Friedrich Lottspeich und Helmut Simon (Jan. 1992). »The Tungsten-Containing Aldehyde Oxidoreductase from *Clostridium*

- thermoaceticum* and its Complex with a Viologen-Accepting NADPH Oxidoreductase«. In: *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 373.1, S. 123–132. DOI: 10.1515/bchm3.1992.373.1.123.
- White, Hiltrud, Gerd Strobl, Richard Feicht und Helmut Simon (Sep. 1989). »Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes«. In: *European Journal of Biochemistry* 184.1, S. 89–96. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14993.x.
- Winiarska, Agnieszka, Dominik Hege, Yvonne Gemmecker, Joanna Kryściak-Czerwenka, Andreas Seubert, Johann Heider und Maciej Szaleniec (Juli 2022). »Tungsten Enzyme Using Hydrogen as an Electron Donor to Reduce Carboxylic Acids and NAD⁺«. In: *ACS Catalysis* 12.14, S. 8707–8717. DOI: 10.1021/acscatal.2c02147.
- Woodcock, D.M., P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S.S. Smith, M.Z. Michael und M.W. Graham (1989). »Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants«. In: *Nucleic Acids Research* 17.9, S. 3469–3478. DOI: 10.1093/nar/17.9.3469.

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Johann Heider für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie für die Betreuung und Unterstützung, die ich die Jahre über erhalten habe. Ebenfalls ein Dankeschön an Prof. Lars-Oliver Essen für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danke auch an Prof. Andreas Seubert für die ICP-MS-Messungen sowie an Jörg Kahnt für die MALDI-TOF-Analysen.

Ich bedanke mich außerdem herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, die mich bei meiner Arbeit in irgendeiner Form unterstützt haben und die hier aus datenschutztechnischen Gründen nicht namentlich genannt werden können. Dasselbe gilt für die Personen, mit denen ich im Rahmen unserer Kooperationen zusammenarbeiten durfte. Wenn ihr euch an dieser Stelle angesprochen fühlt: Danke!

9 Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf nur in der gedruckten Fassung dieser Arbeit enthalten.

10 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Wolframabhängige Aldehydoxidoreduktase – neue Einblicke in Katalyse, Struktur und Kofaktor-Maturation“ selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 21.11.2022

Dominik Hege