Anaerober Toluol-Stoffwechsel in *Thauera aromatica*: Biochemische und spektroskopische Untersuchungen zur Reaktion der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Markus Hilberg
aus Wetter (Hessen)

Marburg/Lahn 2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2008 bis März 2012 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Heider durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. J. Heider
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung:

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:

Hilberg, M., Pierik, A.J., Bill, E., Friedrich, T., Lippert, M.L., and Heider, J. (2011) Identification of FeS clusters in the glycyl-radical enzyme benzylsuccinate synthase via EPR and Mössbauer spectroscopy. *J Biol Inorg Chem*.

Hilberg, M., Pierik, A.J., Szaleniec, M., and Heider, J. (2012) Binding of a product radical analog inactivates the glycyl-radical enzyme benzylsuccinate synthase. *In Bearbeitung.*

„Erfolg kommt durch Geduld“

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung **1**

Summary **3**

Einleitung **5**

Material und Methoden **16**

1. Material **16**

1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Gase 16

1.2 Chromatographiematerial 16

2. Stämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide **16**

3. Medien und Puffer **19**

3.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli* 19

3.2 Medium für die Kultivierung von *Thauera aromatica* Stamm K172 20

4. Bakterienkultivierung und Herstellung von Zellextrakten **22**

4.1 Kultivierung von *E. coli* 22

4.2 Kultivierung von *Thauera aromatica* auf Toluol 22

4.3 Anaerobe Zellernte und Präparation von *Thauera aromatica* Zellextrakt 23

4.4 Anaerobe Präparation von *E. coli* Zellextrakt 24

5. Molekularbiologische Methoden **24**

5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 24

5.2 Reinigung der PCR-Produkte 25

5.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA 25

5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* 26

6. Klonierungstechniken **26**

6.1 Kombinatorisches Klonieren 26

6.1.1 Klonierung von Donorvektoren 26

6.1.2 Klonierung von Expressionsvektoren 27

6.1.3 Fusionieren von mehreren Genen 28

6.2 Konstruktion des Expressionsvektors pJoe2775_BSS-geo 30

6.3 Synthese von DNA-Sequenzen 30

6.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 31

6.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 31

6.6 DNA-Sequenzierung 31

7. Biochemische Methoden 32

7.1 In-vivo Überexpression Plasmid-kodierter Gene in *E. coli* 32

7.2 Überproduktion der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase in *E. coli* 32

7.3 Überproduktion des aktivierenden Enzyms (BssD) der BSS in *E. coli* 33

7.4 Reinigung rekombinant produzierter Proteine aus *E. coli* Zellextrakt 34

7.4.1 Reinigung der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase 34

7.4.2 Reinigung des aktivierenden Enzyms (BssD) 34

7.5 Konzentrierung von Proteinlösungen 35

7.6 SDS-Plyacrylamidgelelektrophorese 35

7.7 Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern 36

8. Enzymatische Tests 37

8.1 Aktivitätsbestimmung der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase 37

9. Inhibitionskinetische Untersuchungen 37

10. Analytische Methoden 39

10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 39

10.2 Eisenquantifizierung 39

10.3 Metallanalyse mittels ICP-OES 40

10.4 Kolorimetrische Bestimmung der säurelabilen Sulfid-Ionen 40

10.5 Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) 41

11. Spektroskopische Methoden 41

11.1 UV/Vis Spektroskopie 41

11.2 Elektronenparamegnetische Resonanz-Spektroskopie (EPR-Spektroskopie) 42

11.2.1 Probenvorbereitung zur Charakterisierung von Eisen-Schwefel-Clustern 42

11.2.2 Probenvorbereitung zur Messung von Glycylradikalsignalen 42

11.2.3 Ausrüstung und Messbedingungen 43

11.3 Mössbauer-Spektroskopie mit ^{57}Fe-angereicherter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase 43

12. Elektrochemische Methoden (Redoxtitration) 43

13. Proteinmodifikation 45

14. Bioinformatische Methoden 46

Ergebnisse 47

1. Charakterisierung rekombinant produzierter, nicht-aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase 47

1.1 Reinigung der rekombinanten, nicht-aktivierten BSS 47

1.2 UV/Vis-spektroskopische Analyse und Bestimmung des Eisen-Schwefel-Gehalts 48

1.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster 49

1.4 Bestimmung der Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Cluster 51

1.5 Mössbauer-spektrokopische Analyse der Eisen-Schwefel-Cluster 52

1.6 Lokalisierung der Eisen-Schwefel-Cluster 54

1.6.1 Aminosäuresequenzvergleich der kleinen β- und γ-Untereinheiten der BSS 54

1.6.2 Modifikation der Cystein-Reste in gereinigter BSS 56

1.7 Erstellung eines Strukturmodells der BSS 57

2. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase 58

2.1 Biochemische Untersuchungen 59

2.1.1 Produktnachweis mittels RP-HPLC 59

2.1.2 Bestimmung der BSS-Enzymaktivität mit isotopenmarkierten Substraten 61

2.1.3 Inaktivierung der BSS durch Benzylalkohol und Benzylfumarat/Benzylmaleat 61

2.1.4 Inhibitionskinetik mit Benzylalkohol und Benzylfumarat/Benzylmaleat 62

2.2 EPR-spektroskopische Analyse von *T. aromatica* Rohextrakt 65

2.2.1 Einfluss bekannter Inhibitoren auf das Glycylradikalspektrum der BSS 67

2.2.2 Einfluss weiterer Inhibitoren auf das Glycylradikalspektrum der BSS 70

3. Charakterisierung des aktivierenden Enzyms (BssD) der BSS aus *T. aromatica* 74

3.1 Überproduktion und Reinigung 74

3.2 UV/Vis-Spektroskopie und Elementaranalyse 76

3.3 EPR-spektroskopische Analyse 77

3.4 Erstellung eines Strukturmodells 77

4. Klonierung der BSS und BssD in broad-host-range Vektoren 78

5. Klonierung der BSS aus *Geobacter metallireducens*..... 79

5.1 Expression des bssD-Gens aus *Geobacter metallireducens* in *E. coli* 80

Diskussion..... 81

1. Die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase..... 81

1.1 Die BSS als Glycylradikalenzym 81

1.2 Verbreitung der BSS und BSS-ähnlicher Enzyme 81

1.3 Kofaktor-Charakterisierung 83

1.4 Kristallisationsversuche 85

2. Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase 86

2.1 Biochemische Untersuchungen 86

2.2 Theoretische Berechnungen 87

2.3 EPR-spektroskopische Untersuchungen 89

3. Das aktivierende Enzym (BssD) der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase..... 91

3.1 Sequenzmotive aktivierender Enzyme 91

3.2 Spektroskopische Charakterisierung 92

Literaturverzeichnis..... 94

Abkürzungsverzeichnis..... 102

Anhang..... 104

Danksagung..... 106

Erklärung..... 107

Lebenslauf..... 108

Zusammenfassung

Der initiale Schritt des anaeroben Toluol-Abbaus in dem denitrifizierenden β-Proteobakterium *Thauera aromatica* wird durch eine stereospezifische Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat unter Bildung des Produkts (*R*)-Benzylsuccinat eingeleitet. Die Reaktion wird von der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase (BSS) katalysiert, die ein Mitglied der Glycylradikal-Enzymfamilie ist, zu deren Vertretern auch die anaerobe Ribonukleotid Reduktase, die Pyruvat-Formiat-Lyase und die 4-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase zählen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Glycyradikalenzymen ist die BSS aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Komposition) und besitzt zudem Eisen-Schwefel-Cluster als Kofaktoren mit bisher unbekannter Funktion. Alle Mitglieder der Glycylradikal-Enzymfamilie können eindeutig anhand ihrer Sequenzähnlichkeit und ihres charakteristischen Glycylradikalsignals in EPR-spektroskopischen Analysen identifiziert werden. Die katalytisch aktive Form aller Glycylradikal-Enzyme wird erst durch die posttranslationale Generierung des Glycylradikals mit Hilfe des jeweils spezifischen aktivierenden Enzyms erhalten. Das Gen für das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase ist zusammen mit den Genen für die BSS-Untereinheiten in einem Operon kodiert (*bss*-Operon).

I

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zusammensetzung und weitere Eigenschaften der FeS-Cluster in rekombinant produzierter BSS mit Hilfe von UV/Vis-, EPR- und Mössbauer-spektroskopischen Analysen untersucht. In rekombinanter, nicht-aktivierter BSS wurden mindestens zwei unterschiedliche Typen magnetisch gekoppelter [4Fe4S]-Cluster mit sehr niedrigen Redoxpotentialen (< -450 mV) nachgewiesen, die eine sehr geringe Distanz (< 10 Å) relativ zueinander aufweisen. Eine Lokalisation der Eisen-Schwefel-Cluster wird basierend auf einem Aminosäure-Sequenzalignment mit anderen Fumarat-addierenden Enzymen für die kleinen β- und γ- Untereinheiten vorhergesagt. Rekombinant produzierte BSS wurde außerdem für Röntgenstrukturanalysen verwendet. Die erhaltenen Kristalle streuten mit einer Auflösung von 4 Å, was zwar noch keine vollständige Strukturaufklärung zulässt, jedoch die Zusammensetzung der BSS-Untereinheiten in $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Komposition mit Hilfe der „Cell-Content"-Analyse bestätigt.

II

Es wurden biochemische und spektroskopische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase mit aktivierter BSS in *T. aromatica* Rohextrakt durchgeführt. Aufgrund der signifikanten Reduktion der Enzymaktivität mit [$^2H_2$]Toluol, wurde die Abstrahierung des Wasserstoffatoms von der Methylgruppe von Toluol als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Enzymreaktion identifiziert. Weiterhin wurden Studien mit bereits bekannten und neuen Inhibitoren

der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase durchgeführt. Durch detaillierte inhibitionskinetische Studien mit Benzylalkohol und einer Mischung aus Benzylfumarat/Benzylmaleat wurden neue Erkenntnisse bezüglich des Reaktionsmechanismus der BSS gewonnen. Benzylalkhol wurde als gemischter Inhibititor und Benzylfumarat/Benzylmaleat als unkompetitiver identifiziert.

Für die weitere Aufklärung des Reaktionsmechanismus ist die Identifizierung stabiler radikalischer Intermediate sehr wertvoll. Durch EPR-spektroskopische Analysen mit *T. aromatica* Rohextrakt wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal ein kohlenstoff-basiertes Radikalintermediat in einem Glycylradikalenzym nachgewiesen. Die Ergebnisse stützen signifikant den Reaktionsmechanismus der BSS und grundlegend den für alle Glycylradikalenzyme postulierten radikalischen Reaktionsmechanismus.

III

Die Produktion des aktivierenden Enzyms (BssD) der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase wurde optimiert und das Enzym mittels Affinitätschromatographie unter strikt anaeroben Bedingungen gereinigt. Durch UV/Vis- und EPR-spektroskopischen Analysen wurden redoxaktive [4Fe4S]-Cluster identifiziert, entsprechend der Vorhersage des Aminosäure-Sequenzalignments. Basierend auf diesen Ergebnissen können in Zukunft weitere Studien zur Aktivierbarkeit der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase durchgeführt werden.

Summary

Anaerobic degradation of toluene in *Thauera aromatica* is initiated by stereospecific addition of the methyl group of toluene to the double bond of a fumarate cosubstrate to form the first intermediate (*R*)-benzylsuccinate. This reaction is catalyzed by the enzyme (*R*)-benzylsuccinate synthase (BSS), which is a member of the glycyl-radical family together with the well characterized anaerobic ribonucleotide reductase, pyruvate formate lyase, glycerol dehydratase and 4-hydroxyphenylacetate decarboxylase. In contrast to other glycyl-radical enzymes BSS consists of three different subunits ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$-composition) and contains iron-sulfur cofactors with so far unknown function. All members of the glycyl-radical family can be identified on the basis of the characteristic glycyl-radical signal in EPR-spectroscopic analysis. For catalytic activity, glycyl-radical enzymes require a posttranslational activation by dedicated activating enzymes. All enzymes involved in the degradation of toluene to (*R*)-benzylsuccinate are encoded in the toluene-inducible *bss*-operon.

I

The FeS-cofactors of the recombinant non-activated BSS were characterized by UV/vis-, EPR- and Mössbauer-spectroscopy. With these methods at least two different types of magnetically coupled [4Fe4S]-clusters per holoenzyme were identified. The redox potential of the FeS-clusters seems to be lower than – 450 mV and the magnetic coupling suggests a close distance of the clusters relative to each other (< 10 Å). Based on aminoacid sequence alignments of other fumarate adding enzymes, the clusters are predicted to be localized in the small β- and γ- subunits of BSS. Furthermore recombinant BSS was used for crystallization experiments yielding a resolution of 4 Å. The achieved resolution is not sufficient for solving the crystal structure in detail, but the cell content analysis confirmed the postulated $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-composition of BSS.

II

We also investigate the reaction mechanism of (*R*)-benzylsuccinate synthase by biochemical and EPR-spectroscopic studies of native BSS. The significant reduction of the reaction rate in enzyme assays with [$^2H_2$]toluene implies, that the abstraction of the hydrogen atom from toluene is indeed the rate limiting step of the BSS-reaction, as expected from the theoretical prediction. Detailed kinetic studies were achieved with substrate- and product-related inhibitors. The received kinetic parameters support the postulated BSS reaction mechanism.

Identification and characterization of radical intermediates in the BSS-reaction are extremely helpful to investigate the reaction mechanism. During the time-course of this work a first direct observation of an organic radical intermediate in a glycyl radical enzyme was accomplished by EPR-spectroscopy. The results support significantly the proposed reaction mechanism of BSS and in general the assumed mechanisms via radical intermediates of all glycyl radical enzymes.

III

The activating enzyme (BssD) was recombinantly produced in *E. coli* and purified by His-Tag affinity-chromatography under strict anaerobic conditions. The enzyme was characterized by UV-Vis spectroscopy, EPR spectroscopy and chemical analysis and contains redox-active [4Fe4S]-clusters as predicted from aminoacid sequence alignments. Based on these results, further studies on the activation reaction of BSS can be accomplished.

Einleitung

Aromatische Verbindungen

Aromatische Verbindungen kommen sowohl in der belebten wie auch in der unbelebten Natur vor. Sie sind Bestandteil des pflanzlichen Lignins, welches einen Anteil von 20 bis 30 Prozent der Biomasse verholzter Pflanzen ausmacht, und stellen damit neben Cellulose und Chitin die zweithäufigste organische Stoffklasse der Erde dar. Sie sind außerdem Bestandteil sekundärer Pflanzenstoffe wie Flavonoiden, Anthocyanen und Tanninen, zudem weisen einige essentielle Aminosäuren einen aromatischen Charakter auf wie zum Beispiel Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Aromatische Verbindungen kommen ebenfalls in der unbelebten Natur vor, und zwar in Form von fossilen Brennstoffen wie beispielsweise Erdöl und Kohle.

Um eine Verbindung als aromatische Verbindung zu bezeichnen, muss diese verschiedene Kriterien erfüllen. So muss es sich um ein Molekül handeln, welches mindestens ein Ringsystem mit delokalisiertem Eletronensystem aufweist; die Elektronenzahl dieses Systems muss mit konjugierten Doppelbindungen, freien Elektronen oder unbesetzten p-Orbitalen der Hückel-Regel mit der Formel $(4n + 2)$ delokalisierten Elektronen entsprechen. Bezüglich aromatischer Kohlenwasserstoff-verbindungen müssen alle Kohlenstoffatome des Rings in einem sp^2-hybridisierten Zustand vorliegen, was zu einer planaren Struktur dieser Verbindungen führt.

Aufgrund der verstärkten industriellen Nutzung von fossilen Brennstoffen in den vergangenen Jahrhunderten gelangten immer größere Mengen Mineralölkohlenwasserstoffe (aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe) in die Umwelt. Bedingt durch ihre toxische Wirkung für die Umwelt stellen sowohl die Gewinnung, als auch der sichere Transport und die Lagerung fossiler Brennstoffe ein großes Problem dar. In jüngster Vergangenheit kam es immer wieder zu Zwischenfällen und teilweise tragischen Unfällen bei denen beispielsweise im Falle der gesunkenen Ölplattform *Deepwater Horizon* bis zu 636 -Millionen Liter Rohöl in die Umwelt gelangt sind (Camilli *et al.*, 2010). Toxische oder ökologisch bedenkliche aromatische Verbindungen werden aber nicht nur durch ungewollten Eintrag in die Natur freigesetzt; sie gelangen auch in Form von Insektiziden, Pflanzenschutzmitteln oder einer Vielzahl von Abfallprodukten aus industriellen Prozessen in die Umwelt. Der Abbau dieser Verbindungen in kontaminierten Böden oder Gewässern ist durch ihre hohe Stabilität und Persistenz ein langwieriger Prozess (Boll *et al.*, 2002).

Aus der Notwendigkeit heraus, mit aromatischen Verbindungen belastete Böden und Gewässer für den Erhalt der Natur oder die Nutzung durch den Menschen biologisch zu sanieren, wurde in den letzten

Jahren viel in die sogenannte Bioremediation investiert, die einen Zweig der Biotechnologie darstellt (Wackett und Bruce, 2000). Es wird versucht, durch den gezielten Einsatz von ausgewählten Mikroorganismen, kontaminierte Böden oder Gewässer von Schadstoffen zu befreien. Eine Voraussetzung für einen möglichst effektiven Einsatz dieser Mikroorganismen ist es, die metabolischen Eigenschaften und Abläufe sowie zelluläre Anpassungsmechanismen der Organismen zu kennen um die Prozesse der Bioremediation zu optimieren. Seit 20 Jahren wird intensiv daran gearbeitet, ungewöhnliche enzymatische Reaktionen dieser Organismen aufzuklären, um einerseits ein besseres Verständnis der genauen Abbauwege von Schadstoffen zu bekommen und diese andererseits gezielt biotechnologisch anzuwenden (Wackett und Bruce, 2000).

Aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen

Kohlenwasserstoffe bestehen ausschließlich aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen und werden in verschiedene Untergruppen wie Aliphate, Alicyclen und Aromaten eingeteilt. Aliphaten sind lineare oder verzweigte Verbindungen, die gesättigt oder ungesättigt vorliegen können (z.B. n-Hexan oder 2-Methylpentan). Alicyclen hingegen bestehen aus einer ringförmigen Struktur, die im Gegensatz zu den aromatischen Kohlenwasserstoffen, wie beispielweise Benzol, kein vollständig konjugiertes π-Elektronensystem aufweist (z.B. Cyclohexen). Kohlenwasserstoffverbindungen, die zu den aromatischen Kohlenwasserstoffen zählen, erfüllen im Gegensatz zu den Alicyclen und Aliphaten die zuvor genannten Kriterien für aromatische Verbindungen. Eine Untergruppe der Aromaten sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen, die aus mehreren aneinandergehängten Benzolringen bestehen (z.B. Naphtalin).

Das in dieser Arbeit verwendete Toluol ist der einfachste Vertreter der Alkylbenzole und besitzt eine substituierte Methylgruppe am aromatischen Ring. Toluol gehört zur Gruppe der BTEX-Kohlenwasserstoffe, zu denen neben **T**oluol auch **B**enzol, **E**thylbenzol und die drei isomeren Formen von **X**ylol (*ortho*-, *meta*- und *para*-Xylol) zählen (Abb. 1). Diese Stoffe werden industriell sehr häufig verwendet, da sie für die Herstellung verschiedener Produkte wie beispielsweise Kunststoff, Agrochemikalien aber auch Arzneimitteln essentiell sind. Toluol wird zudem als Lösemittel zu Farbstoffen, Lacken und Harzen zugesetzt und dient als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Sprengstoff (Trinitrotoluol, TNT). BTEX-Kohlenwasserstoffe werden als gesundheits- und umweltschädlich eingestuft und werden nur langsam abgebaut (Service, 1989). Dies liegt hauptsächlich an ihrer chemischen Reaktionsträgheit bedingt durch die Stabilität des aromatischen Rings. Der menschliche Organismus kann die Stoffe durch die Atemwege, den Verdauungstrakt oder die Haut aufnehmen. Benzol ist unter den BTEX-Kohlenwasserstoffen für den Menschen am gefährlichsten, weil es im menschlichen Körper über ein karzinogenes Epoxid-Intermediat abgebaut

wird (Lovern *et al.*, 2001). Dagegen wird Toluol aufgrund der enthaltenen Methylgruppe im menschlichen Körper hauptsächlich durch Oxidation zu Benzoesäure abgebaut, während nur geringfügige Mengen eines Epoxid-Intermediats entstehen. In der Niere wird Benzoesäure zu Hippursäure umgesetzt und schließlich über den Harn ausgeschieden. Toluol wirkt dennoch nerven-, nieren- und auch leberschädigend (Cohr und Stokholm, 1979).

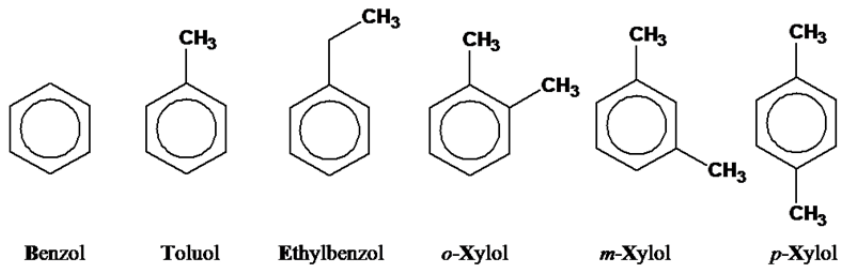


Abb. 1: Gruppe der BTEX-Kohlenwasserstoffe. Aromatische Kohlenwasserstoffe mit der größten technischen Bedeutung werden in der BTEX-Gruppe zusammengefasst. Die Abkürzung BTEX steht für **B**enzol, **T**oluol, **E**thylbenzol und die drei Isomere o-**X**ylol, m-**X**ylol und p-**X**ylol.

Aerober mikrobieller Abbau von Toluol

Gelangt Toluol in nicht-toxischen Konzentrationen in die Umwelt kann es dort von verschieden aerob lebenden Mikroorganismen (Bakterien und Pilze) als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden (Zylstra und Gibson, 1991, Schlegel, 1992, Gottschalk, 1998). Sämtliche dieser Toluol abbauenden Spezies besitzen entweder Mono- oder Dioxygenasen, die unter Verwendung von molekularem Sauerstoff (O_2) das reaktionsträge Toluol aktivieren (Gibson, 1970, Dagley, 1984, Harayama *et al.*, 1992, Smith, 1994). Dabei werden entweder ein oder aber zwei Sauerstoffatome in Form von Hydroxylgruppen in die Methylgruppe oder den aromatischen Ring eingebaut, der so für den weiteren Abbau zugänglich gemacht wird. Die weiteren enzymatischen Schritte des Abbaus sind während der letzten 20 Jahre detailliert untersucht und charakterisiert worden (Harwood und Parales, 1996).

Anaerober mikrobieller Abbau von Toluol

Es gibt in der Natur viele mit Toluol kontaminierte Bereiche wie beispielsweise das Grundwasser oder tiefe Bodenschichten in denen kein molekularer Sauerstoff als Kosubstrat für die Aktivierung des aromatischen Rings durch Mono- oder Dioxygenasen zur Verfügung steht. Vor etwa 24 Jahren wurde erstmals nachgewiesen, dass auch unter diesen Bedingungen ein Abbau von Toluol und anderen

aromatischen Kohlenwasserstoffen möglich ist (Vogel und Grbìc-Galìc, 1986, Zeyer *et al.*, 1986). Diese Entdeckung ist nicht nur aus ökologischer Sicht von Bedeutung, sie hat auch eine ökonomischen Relevanz für die Ölindustrie, da beispielsweise in Pipelines Toluol von Sulfat-reduzierenden Bakterien abgebaut wird, was zu einer Freisetzung von Schwefelwasserstoff führt. Dies stellt zum Einen eine Gefahr für Arbeiter dar und führt zum anderen zur Korrosion von Pipelines und Öltanks (Rabus *et al.*, 1996).

Mittlerweile ist eine Vielzahl von Bakterien bekannt, die in der Lage sind, unter anaeroben Bedingungen Toluol abzubauen. Diese lassen sich jedoch keiner phylogenetisch einheitlichen Gruppe zuordnen, daher unterteilt man sie nach ihrem jeweiligen Stoffwechseltyp in

denitrifizierende (Rabus und Widdel, 1995, Zengler*, et al.*, 1999),
Eisen(III)-reduzierende (Lovley und Lonergan, 1990),
Sulfat-reduzierende (Beller *et al.*, 1996),
Protonen-reduzierende und
phototrophe Spezies (Zengler *et al.*, 1999).

Die Mehrheit der isolierten Bakterien bauen Toluol unter denitrifizierenden Bedingungen ab und gehören zu den der β-Proteobakterien. Zu ihnen gehören mehrere Stämme der Gattungen *Thauera, Azoarcus, Georgfuchsia* und *„Aromatoleum“*, die häufig in der Natur vorkommen (Anders *et al.*, 1995, Rabus und Widdel, 1995, Weelink *et al.*, 2009). Die in unserem Labor verwendeten Stämme sind *Thauera aromatica* Stamm K172 (Anders *et al.*, 1995) und *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1(früher *Azoarcus sp.*; Rabus und Widdel, 1995).

Seit kurzem werden auch Sulfat-reduzierende Toluol-abbauende Bakterien in unserem Labor kultiviert, zu ihnen gehört die Art *Desulfobacula toluolica*, die verschiedene aromatische Verbindungen, einschließlich Toluol, zu CO_2oxidiert. Ein weiterer Modellorganismus, der in unserem Labor untersucht wird, ist das Eisen(III)-reduzierende Bakterium *Geobacter metallireducens* (Lovley und Lonergan, 1990), das ebenfalls Toluol als Elektronen-Donor verwenden kann. Dieser Organismus könnte im Umweltschutz zur Dekontamination von belasteten Gewässern eingesetzt werden, da diese - bedingt durch zusätzlich Verschmutzung - oftmals einen hohen Eisengehalt aufweisen.

Außer den erwähnten Gattungen wurden auch Bakterien identifiziert, die ihre Energie nicht durch Elektronentransport und Atmung generieren, sondern durch Vergären von aromatischen Verbindungen. Diese können jedoch nur in Kokultur mit Sulfat-reduzierenden Bakterien oder methanogenen Archaea existieren, welche die Wasserstoff-Konzentration in der unmittelbaren Umgebung niedrig halten (Vogel und Grbìc-Galìc, 1986). Neben diesen chemotrophen Organismen wurden weiterhin phototrophe Bakterien identifiziert, die aromatische Kohlenwasserstoffe abbauen können. Ein Vertreter ist *Blastochloris*, der seine Energie aus Sonnenlicht generiert und Toluol als Kohlenstoff- und Elektronenquelle verwendet (Zengler *et al.*, 1999).

Im anaeroben Abbau von Toluol sind alle sauerstoffabhängigen Schritte des aeroben Abbaus durch alternative enzymatische Reaktionen ersetzt, in denen kein molekularer Sauerstoff als Kosubstrat benötigt wird. 1992 wurde bei der Untersuchung des Stoffwechselwegs erstmals Benzylsuccinat im Überstand von auf Toluol gewachsenen Zellen gefunden. Zunächst ging man davon aus, dass es sich hierbei um ein Sackgassenprodukt handelt (Beller *et al.*, 1992, Evans *et al.*, 1992, Seyfried *et al.*, 1994, Frazer *et al.*, 1995); vier Jahre später wurde jedoch nachgewiesen, dass es sich bei dem identifizierten Benzylsuccinat um das Produkt der initialen Reaktion beim anaeroben Abbau von Toluol handelt (Biegert *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese intitiale Reaktion durch das Enzym (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert wird.

Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (BSS)

Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (BSS) katalysiert die Reaktion von Toluol zu Benzylsuccinat durch Addition der Methylgruppe des Substrats Toluol an die Doppelbindung eines Fumarat-Kosubstrats (Leuthner und Heider, 1998, Beller und Spormann, 1999; Abb. 2). Das Enzym konnte 1996 aus dem Zellextrakt von auf Toluol gewachsen *Thauera aromatica* Zellen anaerob gereinigt und näher charakterisiert werden. Es handelt sich dabei um ein cytoplasmatisches Enzym mit einer Molekülmasse von 220 kDa, welches aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist. Diese Untereinheiten bilden vermutlich eine hexamere Struktur mit der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Die α-Untereinheit unterscheidet sich aufgrund ihrer Masse von 98 kDa deutlich von den beiden kleineren Untereinheiten β mit einer Masse von 8,5 kDa und γ mit einer Masse von 6,4 kDa. Die BSS wird erst posttranslational in die katalytisch aktive Form überführt. Dies geschieht durch die Einführung eines Radikals mit Hilfe des entsprechenden aktivierenden Enzyms. Aufgrund der Inkubation mit Luftsauerstoff kommt es zu einer oxygenolytischen Spaltung am C-terminus dieser Polypetitkette (Knappe *et al.*, 1984), wodurch eine um etwa 4 kDa verkürzte α`-Untereinheit entsteht, sichtbar durch eine charakteristische Doppelbande im SDS-Gel (Wagner *et al.*, 1992). Dies lässt darauf schließen, dass im aktiven Enzym nur eine der beiden großen Untereinheiten ein Glycylradikal im Rückgrat seiner Polypeptitkette trägt. Weiterhin bestätigten EPR-spektroskopische Untersuchungen des aktiven Enzyms und eine zusätzliche Sequenzanalyse der großen α-Untereinheit die Zugehörigkeit der BSS zur Klasse der Glycylradikalenzyme. Die bekanntesten Vertreter dieser Enzymklasse sind die Pyruvat-Formiat-Lyase (Knappe *et al.*, 1984, Becker *et al.*, 1999), die anaerobe Ribonucleotidreduktase (Sawers und Watson, 1998), die *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus *Clostridium difficile* (Selmer und Andrei, 2001) und die Coenzym B_{12}-unabhängige Glycerin-Dehydratase aus *Clostridium butyricum* (O'Brien *et al.*, 2004), die mit 31 Prozent die größte Sequenzähnlichkeit zur BSS aufweist. Außer der *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase, die zusätzlich zur Glycylradikal tragenden Untereinheit noch eine weitere kleine Untereinheit besitzt, bestehen die anderen Vertreter der

Glycylradiaklenzyme ausschließlich aus nur einer Polypeptitkette. Interessanterweise besitzt die BSS sogar zwei kleine Untereinheiten mit noch unbekannter Funktion, in denen mittels konservierter Cysteinmotive Eisen-Schwefel-Clustern koordiniert sind (Feil, 2006, Hogg, 2008).

Es wird postuliert, dass die Bildung von Benzylsuccinat über verschiedene radikalische Intermediate erfolgt. Zunächst wird im radikalischen Zentrum des Enzyms ein Wasserstoffatom der Methylgruppe des Toluols abstrahiert, wodurch ein Benzylradikal ensteht. Dieses Substratradikal wird anschließend an die Doppelbindung des Fumarat-Kosubstrats addiert. Das dadurch gebildete Produktradikal, (*R*)-Benzylsuccinylradikal, abstrahiert wiederum ein Wasserstoffatom im aktiven Zentrum des Enzyms unter Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat. Das radikalische Zentrum des Enzyms ist damit für den nächsten Reaktionszyklus wiederhergestellt (Abb. 2).

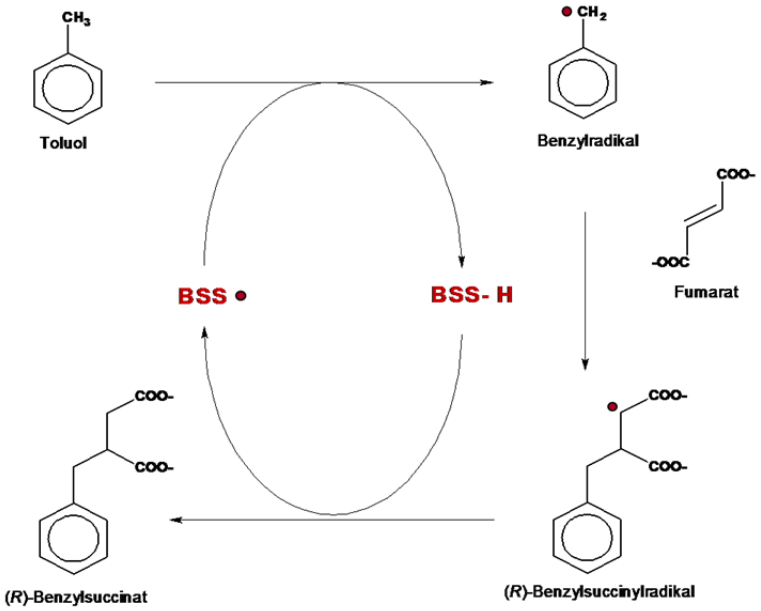


Abb. 2: Vereinfachtes Modell des Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Nach der Umwandlung von Toluol in das Substratradikal (Benzylradikal), wird dieses an die Doppelbindung des Fumarat-Kosubstrates addiert. Das dadurch gebildete Produktradikal ((*R*)-Benzylsuccinyradikal) reagiert anschließend zu (*R*)-Benzylsuccinat. Das Enzym wird am Ende der Reaktion für einen erneuten Zyklus reaktiviert.

Dieser Mechanismus wird auch durch die theoretische Berechnung der Energie und der Energiebarrieren der einzelnen BSS-Teilreaktionen untermauert (Himo, 2002). Bei dieser theoretischen Betrachtung geht man davon aus, dass das Glycylradikal eine Speicherform des reaktiven Radikals darstellt. Die eigentliche Reaktion findet erst nach Übertragung des Radikals an ein konserviertes Cystein unter Bildung eines Thiylradikals statt (Abb. 3). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Umsetzung von Toluol und Fumarat zu (*R*)-Benzylsuccinat, ist die Addition des Benzylradikals an die Doppelbindung des Fumarat-Kosubstrats, bei der eine Energiebarriere von 15 kcal/mol überwunden werden muss (Abb. 3). Nach

der Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat ist das Thiylradikal im aktiven Zentrum des Enzyms wiederhergestellt und kann entweder direkt mit einem weiteren Substratmolekül reagieren, oder der katalytische Zyklus ist beendet indem das Glycylradikal regeneriert wird (Abb. 3).

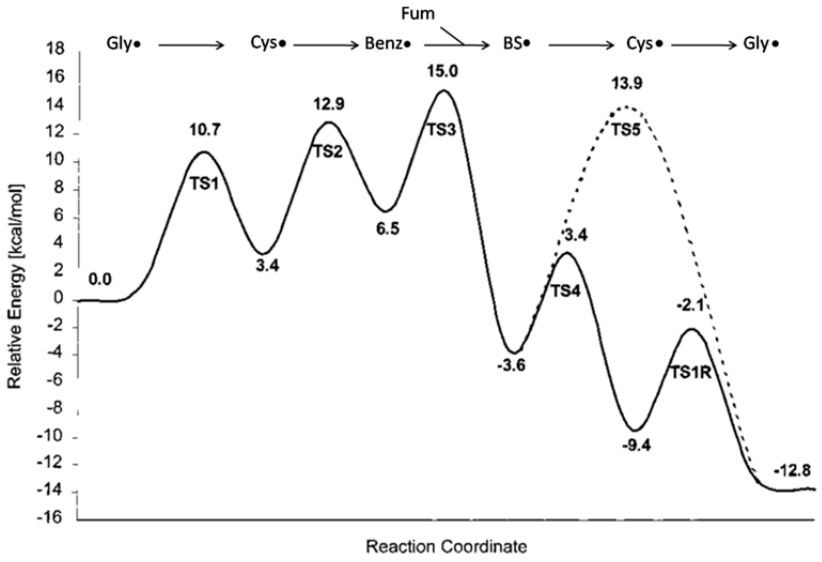


Abb. 3: Energiediagramm der einzelnen BSS-Teilreaktionen basierend auf theoretischen Berechnungen (Himo, 2002). Im ersten Schritt aktiviert das Glycylradikal einen konservierten Cysteinrest unter Bildung eines Thiylradikals. Die Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat läuft entsprechend des in Abb. 2 gezeigten Mechanismus ab.

Das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (BssD)

Um die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase posttranslational in ihre katalytisch aktive Form zu überführen, wird durch ein aktivierendes Enzym (BssD) ein Glycylradikal in das aktive Zentrum einer der beiden großen α-Untereinheiten des Enzyms eingefügt. Die abgeleitete Proteinsequenz des *bssD*-Gens aus *T. aromatica* weist starke Ähnlichkeit zu anderen Aktivatoren bekannter Glycylradikalenzyme auf wie beispielsweise der *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus *Clostridium difficile* und der Glycerin-Dehydratase aus *Clostridium butyricum* (Yu *et al.*, 2006). Eine Gemeinsamkeit aller Aktivatoren ist ein ungewöhnlich koordinierter [4Fe4S]-Cluster im aktiven Zentrum. Dieser Cluster wird von einem Cysteinmotiv koordiniert, welches aus nur drei konservierten Cysteinresten besteht. Die vierte Koordinationsstelle des Clusters bleibt dadurch unbesetzt und dient zur Bindung des Kosubstrates S-Adenosylmethionin (SAM; Abb. 4). SAM wird dabei nicht wie bei anderen Enzymen üblich als Methylgruppen-Donor verwendet, sondern zur Generierung eines Radikals. Bei der Bindung von SAM an den Eisen-Schwefel-Cluster wird ein Elektron auf das Kosubstrat übertragen, so dass dieses unter Bildung eines S-Adenosylradikals und Methionin homolytisch gespalten wird. Mit Hilfe des entstandenen S-Adenosylradikals wird anschließend das Glycylradikal im aktiven Zentrum der BSS

erzeugt (Abb. 4). Das aktivierende Enzym der BSS besitzt im Vergleich zu den Aktivatoren der Pyruvat-Formiat-Lyase und anaeroben Ribonukleotidreduktase eine zusätzliche Domäne. Diese Domäne enthält zwei konservierte Cysteinmotive, die wahrscheinlich für die Koordination von zwei weiteren Eisen-Schwefel-Clustern mit unbekannter Funktion verantwortlich sind.

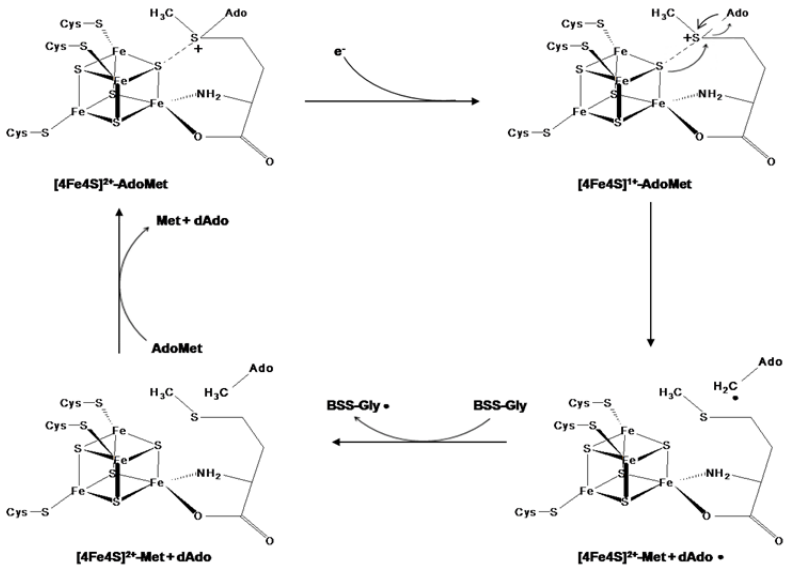


Abb. 4: Postulierter Mechanismus zur Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch das aktivierende Enzym. Nach der Bindung von SAM an den ungewöhnlich koordinierten $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster im aktiven Zentrum des aktivierenden Enzyms, wird ein Elektron auf den Schwefel des SAM-Moleküls übertragen. Dies bewirkt die homolytischen Spaltung des Moleküls in Methionin und ein S-Adenosylradikal. Letzteres wird verwendet um ein Wasserstoffatom eines konservierten Glycyin-Restes im aktiven Zentrum einer der beiden α-Untereinheit der BSS zu abstrahieren um dadurch das Enzym in die katalytisch aktive Form zu überführen.

Das (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-Operon (*bss*-Operon)

Das *bss*-Operon beginnt mit dem Gen *bss*D, welches für das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase kodiert, gefolgt von den drei Genen *bss*CAB, die für die Untereinheiten der BSS kodieren. Stromabwärts des *bss*B-Gens finden sich im *bss*-Operon - abhängig vom jeweiligen Organismus und der verfügbaren Sequenzinformation - bis zu vier zusätzliche offene Leserahmen (*bss*EFGH; Abb. 5). Diese werden mit *bssDCAB* kotranskribiert (Hermuth *et al.*, 2002) und sind damit wahrscheinlich ebenfalls am ersten Schritt des anaeroben Toluolabbaus beteiligt. Es konnte zumindest teilweise eine Toluol-Induzierbarkeit der entsprechenden Genprodukte nachgewiesen werden, jedoch ist deren genaue Funktion bisher unklar (Leuthner *et al.*, 1998, Kube *et al.*, 2004). Die Aminosäuresequenz des BssE-Proteins zeigt unter anderem Sequenzähnlichkeit zu einer

ATP-bindenden Enzymklasse. Ein Vertreter dieser Klasse ist NorQ, ein Chaperon aus *Paracoccus halodenitrificans*, mit einer Aminosäureidentität von 29 Prozent. Das *Bss*H-Gen kodiert möglicherweise für ein membranständiges Transportprotein (Kube *et al.*, 2004). Geht man davon aus, dass Toluol die Cytoplasmamembran ohne Transportsystem passieren kann, könnte das *bss*H-Gen für ein Effluxsystem kodieren, das bei zu hohen und damit toxischen Toluol-Konzentrationen dieses aktiv aus der Zelle hinaus transportiert (Kube *et al.*, 2004).

β-Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat

Das im initialen Schritt gebildete (*R*)-Benzylsuccinat wird zunächst von einer Succinyl-CoA:Benzylsuccinat-CoA-Transferase (BbsEF) zum CoA-Thioester (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA aktiviert (Leutwein und Heider 1999; Leuthner und Heider, 2000; Leutwein und Heider, 2001). Dieser CoA-Thioester wird dann durch die flavinhaltige Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG) zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA oxidiert (Leutwein und Heider, 2002), wobei die Elektronen wahrscheinlich auf ein „Elektronen transferierendes Flavoprotein“ (ETF) übertragen werden. Nach der Hydratisierung der Doppelbindungdes (*E*)-Phenylitaconyl-CoA durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH) wird das gebildete 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA durch die 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD) anschließend zu Benzoylsuccinyl-CoA oxidiert (Feil, 2006). Dieses wird dann thiolytisch durch die Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsAB) zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA gespalten. Das enstandene Succinyl-CoA wird von der Succinat-Dehydrogenase weiter zu Fumarat oxidiert und steht damit der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wieder als Kosubstrat zur Verfügung (Abb. 5). Der weitere Abbau von Benzoyl-CoA bis hin zum Acetyl-CoA ist gut untersucht und wird durch die Benzoyl-CoA-Reduktase eingeleitet (Boll *et al.*, 1997, Boll, 2005, Boll, 2005, Peters *et al.*, 2007).

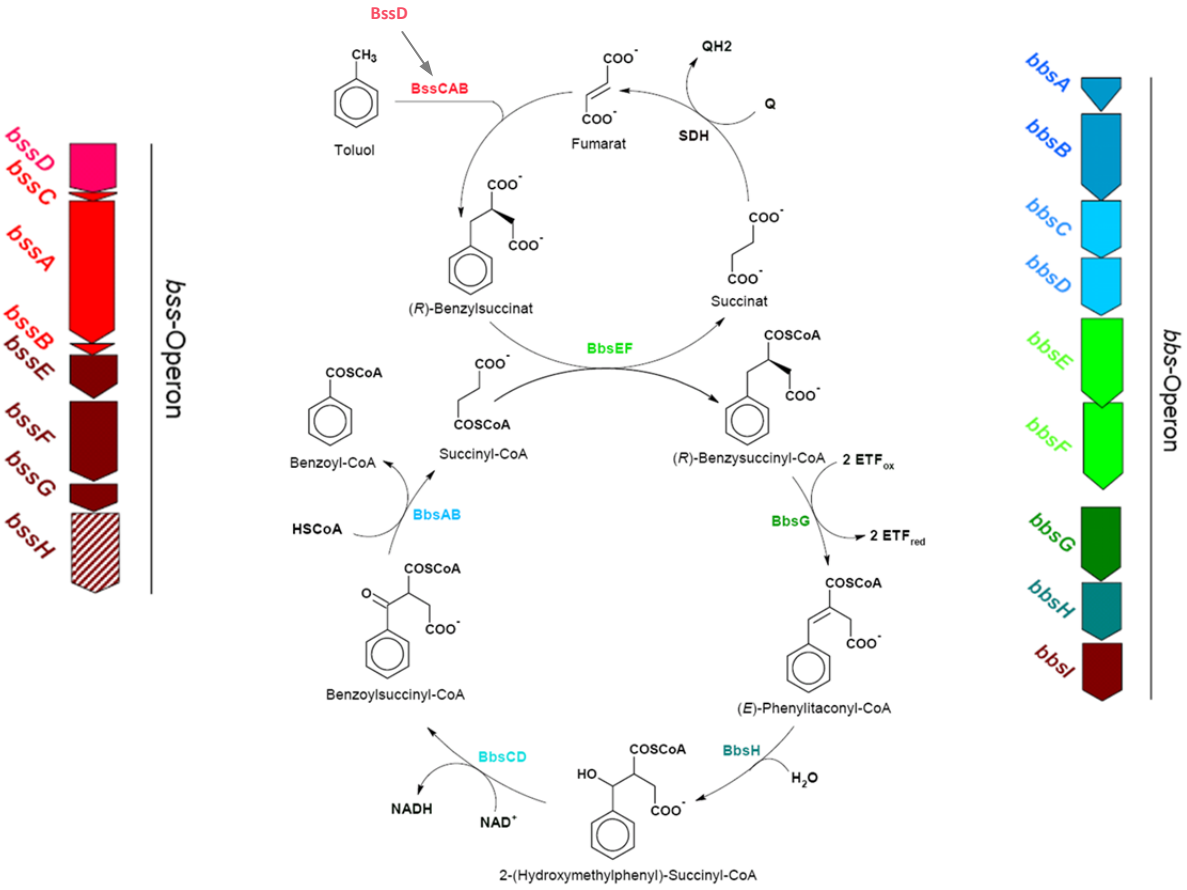


Abb. 5: Übersicht über den Bizyklus und die beteiligten Gene des anaeroben Toluolabbaus in *Thauera aromatica*. Der initiale Schritt beim anaeroben Abbau von Toluol in *Thauera aromatica* wird durch die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (BssCAB) katalysiert. Nach Aktivierung des Enzyms durch den Aktivator (BssD) wird die Methylgruppe des Substrats Toluol an die Doppelbindung des Fumarat-Kosubstrats addiert wodurch (*R*)-Benzylsuccinat gebildet wird. Alle Enzyme, die für diese initiale Reaktion benötigt werden sind im *bss*-Operon kodiert. Der nachfolgende Abbauweg verläuft über eine modifizierte β-Oxidation. Die beteiligten Enzyme sind im *bbs*-Operon kodiert und lauten: Succinyl-CoA:Benzylsuccinat-CoA-Transferase (BbsEF), Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase (BbsG), (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (BbsH), 2-(Hydroxymethylphenyl)-Succinyl-CoA Dehydrogenase (BbsCD), Benzoylsuccinyl-CoA-Thiolase (BbsAB) und Succinat-Dehydrogenase (SDH).

Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Aufklärung des anaeroben Toluol-Abbaus durch das denitrifizierende Bakterium *Thauera aromatica* Stamm K172. Der Schwerpunkt lag auf biochemischen und spektroskopischen Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase, die den initialen Schritt des anaeroben Toluol-Stoffwechsels katalysiert. Dazu waren kinetische Studien mit Inhibitoren, Aktivitätsmessungen mit isotopenmarkierten Substraten sowie EPR-spektroskopische Analysen notwendig, die Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus des Enzyms zulassen. Darüber hinaus sollten die Eisen-Schwefel-Cluster in rekombinant-produzierter, nicht aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Techniken charakterisiert werden. Als weiteres Projekt sollte die rekombinante Produktion und affinitätschromatographische Reinigung des aktivierenden Enzyms der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase optimiert werden um eine erste Kofaktoranalyse des Enzyms durchzuführen.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Gase

Sämtliche Chemikalien wurden, wenn nicht speziell vermerkt, von den Firmen Alpha Aesar (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.
Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und Polymerasen wurden von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen; Lysozym, Deoxyribonuklease und Ribonuklease stammten von den Firma Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).
Die verwendeten Gase Stickstoff (99,999 %) und Formiergas (95 % Stickstoff, 5 % Wasserstoff) wurden von der Firma Airliquide (Düsseldorf) geliefert.

1.2 Chromatographiematerial

Material und Zubehör zur Reinigung rekombinanter Proteine mittels Affinitätschromatographie wurde von GE Healthcare (Freiburg) und IBA (Göttingen) bezogen. HPLC-Analysen wurden an einem Sykam HPLC-System mit der Säule Supercosil^{TM} LC-DAPS (3 µm) durchgeführt.

2. Stämme, Plasmide und synthetische Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt, Plasmide und synthetischen Ologonukleotide sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefasst.

Tab. 1: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Thauera aromatica Stamm K172	Wildtyp (DSM-Nr.: 6984)	(Tschech und Fuchs, 1987)
Escherichia coli DH5α	F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+),λ–	(Woodcock *et al.*, 1989)
Escherichia coli Rosetta(DE3)pLysS	F^- ompT $hsdS_B(R_B^- m_B^-)$ galdcmλ(DE3 [lacI lacUV5T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam^R)	(Novagen)
Escherichia coli BL21 (DE3)	*E.coli* B ; *F^-hsdS gal λ (DE3)*	(Studier und Moffatt, 1986)
Escherichia coli ArcticExpress™ (DE3) RIL	*E. coli* B F^- *ompT hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*$^+$ Tet^r *gal endA* Hte [*cpn10 cpn60* $Gent^r$][*argU ileY leuW* Str^r]	(Stratagene)
Escherichia coli S17-1	hsdr17, endA, pro, recA, NxS, integriertesRP4-2 (Tc::Mu, Km,::Tn7),Mobilisatorstamm	(Simon *et al.*, 1983)
Aromatoleum aromaticum Stamm EbN1	Wildtyp	(Rabus und Widdel, 1995)

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Stamm	Genotyp	Referenz
pBSS-Strep	Amp^R	Doktorarbeit J. Hogg, 2008
pBAD/D102-TOPO-*bssD*	Amp^R	(Woodcock*, et al.*, 1989)
pE-IBA20	Kan^R	IBA-GmbH
pASG3_mob$^-$_BSS-Strep + BssD-Txn (ohne *E.coli* ori)	Amp^R	Diese Arbeit
pASG3_mob$^+$_BSS-Strep + BssD-Txn (mit *E.coli* ori)	Amp^R	Diese Arbeit
pASG3_*bssD*-geo	Amp^R	Diese Arbeit
pASG3_*bssD*-geo-synth	Amp^R	Diese Arbeit
pASG5_*bssD*-geo-synth	Amp^R	Diese Arbeit
pJoe2775_BSS-geo	Amp^R	Diese Arbeit

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide

Stamm	Genotyp
BssC_s (*T.aromatica*)	AAGCTCTTCAATGACGACCTGCAAGGACTGTGCTTTCTTTTTTTC
BssB_as (*T.aromatica*)	AAGCTCTTCACCCCACGTGGTCGCGGAAGCTCAG
BssD-Txn_s (*T.aromatica*)	AAGCTCTTCAATGGGATCTGATAAAATTATTCATCTGACTG
BssD-geo_s (*G.met.*)	AAGCTCTTCAATGCTCACTCCACTCATCACCGAAAT
BssD-geo_as (*G.met.*)	AAGCTCTTCACCCGCGTTGAGTGACCACCACC
pE_IBA20_seq_fwd	GGGTTATTGTCTCATGAGCG
pE_IBA20_seq_rev	CCCCTGATTCTGTGGATAACC
pFUSE_seq_fwd	GGGAATAAGGGCGACACG
pFUSE_seq_rev	GAGCGTCGATTTTTGTGATGC
BssC_s	GGCATATGACCACTTGTAAG
BssB_as	AAGCTCTTCACCCCACGTGGTCGCGGAAGC

3. Medien und Puffer

Für die Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Medien und Puffer wurde entionisiertes Wasser verwendet. Alle Medien und Supplemente wurden durch Autoklavieren (45 Minuten, 121 °C, 1 Atmosphäre Überdruck) sterilisiert oder bei gegebener Hitzelabilität steril filtriert (0,2 µm; Millipore, Eschborn). Medien und Supplemente, die zur anaeroben Kultivierung von Bakterien verwendet wurden, sind vor dem Autoklavieren durch mehrfachen Austausch der Atmosphäre mit Stickstoff (99,99 %) anaerobisiert worden. Eine erhöhte Effektivität dieses Vorgangs wurde durch vorheriges Erhitzen der Medien und Supplemente erreicht. Diese Methode wurde ebenfalls bei der Herstellung von Puffern angewendet, die anschließend in Versuchen unter strikt anoxischen Bedingungen eingesetzt wurden.

3.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Kulturen wurde Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet (Tab. 4). Für die Kultivierung auf LB-Agar wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar-Agar zugesetzt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °C und 15 °C.

Tab. 4: Luria-Bertani (LB)-Medium

Luria-Bertani (LB)-Medium	Einwaage
NaCl	10 g/l
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l

Dem Medium wurde bei der Expression verschiedener Plasmid-codierter Gene in *E. coli* die entsprechenden Antibiotika zugegeben. Diese wurden als Stammlösung 1000 x konzentriert angesetzt und vor der Zugabe steril filtriert (Tab. 5).

Tab. 5: Antibiotika und Supplemente

Antibiotikum	Stamm-Lsg.	Endkonzentration
Carbenicillin	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol	30 µg/ml
Gentamycin	20 mg/ml	20 µg/ml
Eisen(III)Citrat (autoklaviert)	100 mM	50 µM
L-Cystein (steril filtriert)	2 M	2,5 mM

LB-Agar, der für die Klonierung von Plasmiden nach dem Prinzip des kombinatorischen Klonierens verwendet wurde, ist zur zusätzlichen Selektion positiver Klone x-Gal (40 µg/ml) zugegeben worden („Blau-Weiss-selektion“ siehe Lehrbücher der Genetik). Den Kulturen wurde für die Induktion rekombinanter Gene nach Bedarf Arabinose (0,2 %), IPTG (1 mM) oder AHT (200 µg/l) zugegeben.

3.2 Medium für die Kultivierung von *Thauera aromatica* Stamm K172

Das Grundmedium für die Kultivierung von *Thauera aromatica* wurde vor dem Autoklavieren aufgekocht und für mindestens vier Stunden durch zyklisches Be- und Entgasen mit Stickstoff (99,99 %) anaerobisiert (1 Zyklus = 4 min).

Tab. 6: Grundmedium *Thauera aromatica* Stamm K172

Grundmedium; pH 8	Einwaage	Endkonzentration
NaH_2PO_4	0,6 g/l	7,9 mM
K2HPO4	5,6 g/l	32,1 mM
NH4Cl	0,5 g/l	10,0 mM

Tab. 7: Stammlösungen für die Supplementierung des Grundmediums

Stamm-Lsg.	Einwaage	Endkonzentration
0,8 M $MgSO_4$ x 7 H_2O	200 g/l	0,8 mM
0,1 M $CaCl_2$ x 2 H_2O	15 g/l	0,1 mM
2 M $NaNO_3$	170 g/l	2,0 mM

Die einzelnen Lösungen wurden separat autoklaviert und dem Grundmedium in den entsprechenden Mengen (Tab. 10) steril zugegeben.

Tab. 8: Vitamin-Lsg.

Vitamin-Lsg. VL10 (1000 fach)	Einwaage
4-Aminobenzoat (Vitamin H_1)	80 mg/l
D(+)-Biotin	20 mg/l
Ca-D(+)-Pantothenat	100 mg/l
Cyanocobalamin (Vitamin B_{12})	100 mg/l
Nicotinat	200 mg/l
Pyridoxin HCl (Vitamin B_6)	300 mg/l
Thiamin (Vitamin B_1)	200 mg/l

Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter (0,2 µm) in eine mit einem Gummistopfen verschlossene Schottflasche filtriert, deren Atmosphäre zuvor durch zyklisches Be- und Entgasen mit Stickstoff ausgetauscht wurde.

Tab. 9: Spurenelement-Lsg.

Spurenelement-Lsg. SL10 (1000 fach)	Einwaage
HCl (25 %)	50 ml/l
H_3BO_3	30 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	10 mg/l
$ZnCl_2$	350 mg/l
$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	120 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	180 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	500 mg/l
$Fe(II)Cl_2 \cdot 4\ H_2O$	7500 mg/l

Tab. 10: Stamm-Lsg. Selen/Wolframat

	Einwaage
$Na_2SeO_3 \cdot 5\ H_2O$	2 mg/l
$Na_2WO_4 \cdot H_2O$	4 mg/l
NaOH	0,5 mg/l

Tab.11: Komplementierung des Grundmediums für die Kultivierung von *T. aromatica*

	Zugegebene Menge
0,8 M $MgSO_4$ x 7 H_2O	1 ml/l
0,1 M $CaCl_2$ x 2 H_2O	1 ml/l
2 M $NaNO_3$	2 ml/l
Vitamin-Lsg. (VL10)	1 ml/l
Spurenelement-Lsg. (SL10)	1 ml/l
Selen/Wolframat	1 ml/l
Toluol	0,1 ml/l

4. Bakterienkultivierung und Herstellung von Zellextrakten

4.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung aller in Tab. 1 aufgelisteten *E. coli*-Stämme erfolgte nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Material und Methoden 3.1; Tab. 5) unter aeroben Bedingungen vor Induktion rekombinanter Gene bei 37 °C in LB-Medium (Material und Methoden 3.1; Tab. 4). Kulturen im kleinen Maßstab (bis 200 ml) wurden schüttelnd in Erlenmeyerkolben bei 180 rpm angezogen. Die Inkubation von Kulturen im größeren Maßstab (2 l) erfolgte hingegen in 5-Liter-Erlenmeyerkolben auf einem Rührer bei 900 rpm. Nach Induktion rekombinanter Gene wurden die Kulturen bei Raumtemparatur weiter inkubiert um die Löslichkeit synthetisierter Proteine zu erhöhen. Für die Optimierung der Proteinsynthese in *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) RIL erfolgte die Inkubation der Kulturen bei 15 °C. Das Wachstum wurde über die optische Dichte (OD) photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm verfolgt. Sämtliche *E. coli*-Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen geerntet und entweder direkt verwendet oder bei – 80 °C gelagert.

4.2 Kultivierung von *Thauera aromatica* auf Toluol

Die Anzucht von *Thauera aromatica* erfolgte in 2-Liter-Kulturflaschen in dem zuvor beschriebenen Mineralsalzmedium (Material und Methoden 3.2, Tab. 6-10). Toluol (2 mM) diente dabei als alleinige Kohlenstoffquelle, Nitrat (4 mM) als Elektronenakzeptor (Verhältnis Kohlenstoffquelle/Elektronenakzeptor: 1:2). Da Toluol in einer Konzentration von 1-2 mM für die Zellen toxisch wirkt, wurde das Medium mit 2 % (v/v) Paraffinöl (Roth, Karlsruhe) überschichtet, in dem sich der größte Teil des Toluols löst und als Reservoir für die Kohlenstoffquelle fungiert. Das komplementierte Medium wurde mit 1 % (v/v) einer gut gewachsenen *Thauera aromatica*-Kultur angeimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte unter schütteln (< 80 rpm) bei 28 °C bis maximal

30 °C. Der Verbrauch der Kohlenstoffquelle wurde indirekt über den Verbrauch des Elektronenakzeptors mit Hilfe von Nitrat-Stäbchen (Quantofix® Nitrat; Macherey-Nagel, Düren) gemessen. Das Wachstum der Kulturen wurde photometrisch über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm verfolgt. Da Paraffinöl die photometrische Messung beeinflusst, wurde zuvor 1 ml der Kultur abzentrifugiert (10 Minuten bei 4 °C und 5000 rpm) und in frischem Grundmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578nm} von 3-5 unter anaeroben Bedingungen geerntet (Material und Methoden 4.3).

4.3 Anaerobe Zellernte und Präparation von *Thauera aromatica* Zellextrakt

Die Zellernte unter strikt anaeroben Bedingungen wurde ausschließlich mit *Thauera aromatica*-Kulturen durchgeführt. Diese befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase und hatten eine OD_{578nm} zwischen 3 und 5 erreicht. Vor der Ernte wurden 2 mM Toluol und 2 mM Nitrat in das Medium gegeben und die Kulturen für ca. zwei Stunden weiterinkubiert bis sowohl Nitrat als auch Nitrit vollständig verbraucht worden waren. Die Kulturen wurden anschließend in ein Anaerobenzelt eingeschleust und nach Zugabe von 2,5 mM DTT in 400 ml Zentrifugenbecher transferiert (ohne die Verwendung der in vorherigen Arbeiten beschriebenen Vorrichtung zur Abtrennung des Paraffinöls). Die Zentrifugenbecher waren mindestens drei Tage zuvor in das Anaerobenzelt eingeschleust, damit im Plastik gelöster Sauerstoff ausdiffundieren konnte. Die verschlossenen Zentrifugenbecher wurden aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Für eine Zellernte waren drei 2-Liter-Kulturen verwendet worden, die direkt nacheinander abzentrifugiert wurden. Die Zellpellets wurden im Anaerobenzelt mit einem Löffel herausgenommen und direkt (ohne Waschschritt) in einem Volumen (w/w) 20 mM TEA/NaOH (pH 8) unter Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und DNase I resuspendiert. Dem Puffer wurde kurz vor der Verwendung ebenfalls DTT in einer Konzetration von 2,5 mM zugegeben. Das resuspendierte Zellpellet wurde anschließend mehrfach durch eine dünne Kanüle gepresst, was die Effektivität des darauffolgenden Zellaufschlusses erheblich verbesserte. Der Zellaufschluss erfolgte mittels *French-Press*- Zelle (American Instruments Company, Maryland, USA). Dazu wurde die Zellsuspension in die *French-Press*-Zelle eingefüllt und aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust. Der Zellaufschluss erfolgte durch einmaliges Passagieren bei einem Druck von 137 mPa und wurde direkt über eine Kanüle in eine anaerobe Anzuchtsflasche eingeleitet, die mit einem Gummistopfen verschlossen war. Anschließend wurde die Anzuchtsflasche inkl. *French-Press*- Zelle wieder in das Anaerobenzelt eingeschleust und die aufgeschlossenen Zellen wurden in einen Ultrazentrifugenbecher (Ti-70) überführt. Dieser war ebenfalls mindestens drei Tage zuvor in das Anaerobenzelt eingeschleust worden. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für eine Stunde bei 35000 rpm und 4 °C in einer Ultrazentrifuge (Beckman Ultrazentrifuge, Ti-70-Festwinkelrotor) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Ultrazentrifugenbecher erneut in das Anaerobenzelt eingeschleust, der klare Zellextrakt mit einer

Pasteurpipette abgenommen und entweder direkt verwendet oder nach dem Schockfrieren in Flüssigstickstoff in luftdicht verschließbaren Gefäßen bei - 80 °C gelagert.

4.4 Anaerobe Präparation von *E. coli* Zellextrakt

E. coli-Kulturen mit produzierter BSS aus *T. aromatica* und dem aktivierenden Enzym (BssD) aus *T. aromatica* und *G. metallireducens* (Material und Methoden 7.1, Tab. 16) wurden unter aeroben Bedingungen geerntet und entweder direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert. Die Zellpellets für die anaerobe Präparation von Zellextrakten wurden in ein Anaerobenzelt überführt und in dem entsprechenden anaeroben Grundpuffer für die anschließende Proteinreinigung mittels Strep-Tag- oder His-Tag-Affinitätschromatographie resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels *French-Press*-Zelle durch mehrmaliges Passagieren bei einem Druck von 137 mPa.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) wurden gezielt DNA-Bereiche aus dem Genom von *Thauera aromatica* amplifiziert. Als Primer für die Reaktion dienten Oligonukleotide, die vom 5` -bzw 3` -Ende des zu amplifizierenden Bereichs abgeleitet wurden und für weitere Klonierungsschritte mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen für Endonukleasen versehen wurden. Als Template für die Amplifikation der Gene aus *T. aromatica* dienten Zellen, die bei -80 °C gelagert worden waren. Zunächst wurde eine Zellsuspension auf OD_{578nm} = 1,0 eingestellt, was ca. 1×10^6 Zellen pro Mikroliter entspricht. Die Zellsuspension wurde dann seriell in drei Schritten jeweils 1:10 verdünnt. Von den unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurden 1 – 3 µl Zellsuspension vorgelegt und mit 99 µl eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes gemischt (Tab. 12) und die Reaktion entsprechend dem in Tab. 13 aufgeführten Programm durchgeführt.

Tab. 12: Zusammensetzung eines Standard PCR-Reaktionsansatzes

Komponenten	Endkonzentration im Reaktionsansatz
GC-Puffer	1 x
Primer forward	0,2 µM
Primer reverse	0,2 µM
dNTP-Mix	200 µM
verdünnte Zellsuspension	1-3 µl
Polymerase*	0,02 U/µl
H_2O bidest.	Ad 100 µl

* Phusion® High-Fidelity-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)

Tab. 13: PCR-Standardprogramm

	Dauer	Temperatur
Denaturierung	10 min	98 °C
Denaturierung	10 sec	98 °C
Annealing	20 sec	40 °C - 60 °C
Elongation	45 sec	72 °C
Terminale Elongation	5 min	72 °C

29 Zyklen

5.2 Reinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des GeneJet™ PCR Purification Kits der Firma Fermentas Life Science nach dem Standardprotokoll des Herstellers. Das Prinzip dieser Aufreinigungsmethode ist das Binden der DNA an eine Matrix und das anschließende Eluieren mit dem dafür vorgesehenen Elutionspuffer, Wasser oder TE- Puffer.

5.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit Horizontalgelen durchgeführt. Dazu wurden Gele mit 0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) aufgekocht und auf eine Glasplatte gegossen. Zur Taschenbildung wurde ein Teflonkamm eingesteckt. Die DNA wurde 1:5 mit Probenpuffer (50% (w/v) Glycerin; 0,1 M EDTA; 1% (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenol-blau) gemischt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 Volt für 30-60 Minuten durchgeführt. Nach der Auftrennung wurden die DNA-

Fragmente mittels Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) gefärbt und anschließend unter UV-Licht bei 302 nm fotografiert. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente der „GeneRuler^{TM} Middle-range bzw. High-Range“ DNA-Marker der Firma Fermentas Life Science.

5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde aus 5-Milliliter-Übernachtkulturen in LB/Antibiotika präpariert. Für die Präparation wurde das“ GeneJet^{TM} Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Fermentas Life Science gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

6. Klonierungstechniken

6.1 Kombinatorisches Klonieren

Die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurden mit Ausnahme des pJoe2775_BSS-geo Konstruktes (Material und Methoden 2, Tab. 2) nach dem Prinzip des kombinatorischen Klonierens erstellt. Dazu wurde im ersten Schritt ein durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment mit definierten Basenüberhängen mittels *Lgu*I-Restriktionsendonuklease in einen „Entryvektor“ (pE-IBA20) inseriert. Das entstandene Produkt ist der „Donorvektor“. Dieser Vektor wurde dann in einer weiteren Reaktion genutzt, um das inserierte DNA-Fragment mittels *Esp*3I-Restriktionsendonuklease auszuschneiden und in den gewünschten Expressionsvektor (pASG5/3) zu inserieren. Diese spezielle Methode des Klonierens erfolgte mit sehr hoher Effizienz, da Restriktionsenzyme des Typs IIS verwendet wurden, und somit Restriktion und Ligation der Fragmente/Vektoren zeitgleich in demselben Reaktionsgefäß stattfinden konnten.

6.1.1 Klonierung von Donorvektoren

Gereinigte PCR-Produkte wurden im ersten Schritt mittels *Lgu*I-Restriktionsendonuklease in „Entryvektoren“ inseriert und anschließend für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Restriktion und Ligation erfolgten zeitgleich in demselben Reaktionsgefäß. Bei dem verwendeten „Entryvektor“ handelt es sich um das Plasmid pE-IBA20.

Tab. 14: Klonierung von Donovektoren

Komponenten	Endkonzentration im Reaktionsansatz
Entry-Vektor	25 ng
Insert	100 ng
Tango-Puffer	1 x
DTT	1 mM
ATP	0,5 mM
*Lgu*I	5 U/µl
T4-DNA-Ligase	2 U/µl
H_2O	ad 50 µl

Der Reaktionsansatz (Tab. 14) wurde für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes zur Transformation von chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Falls erforderlich wurde der Reaktionsansatz zur Erhöhung der Klonierungseffizienz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen eingesetzt. Die Selektion auf positive Klone erfolgte über Kanamycin (50 µg/ml) und X-Gal (20 µg/ml; blau-weiß-Test). Von positiven Klonen wurde eine Restriktionsanalyse mit *Esp*3I durchgeführt sowie eine Sequenzierung (Material und Methoden 2., Tab. 3) wenn die Klone nach Restriktion ein Insert der richtigen Größe enthielten.

6.1.2 Klonierung von Expressionsvektoren

Die Klonierung der Expressionsvektoren erfolgte analog zur Erstellung der „Donorvektoren“. Statt der PCR-Fragmente wurden in diesem Reaktionsansatz die „Donorvektoren“ eingesetzt, die das gewünschte Insert beinhalteten. Die Klonierung der verschiedenen Expressionsvektoren mittels *Esp*3I-Restriktionsendonuklease ist nachfolgend zusammengefasst (Tab. 15).

Tab. 15: Klonierung von Expressionsvektoren

Komponenten	Endkonzentration im Reaktionsansatz
Donor-Vektor	100 ng
Expressionsvektor	25 ng
Tango-Puffer	1 x
DTT	1 mM
ATP	0,5 mM
*Esp*3I	10 U/µl
T4-DNA-Ligase	2 U/µl
H_2O	ad 50 µl

Der Reaktionsansatz (Tab. 15) wurde für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes zur Transformation von chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Die Selektion erfolgte über Carbenicillin (50 µg/ml) und X-Gal (25µg/ml; blau-weiß-Test. Von positiven Klonen wurden eine Restriktionsanalyse mit *Xba*I und *Hin*dIII durchgeführt.

6.1.3 Fusionieren von mehreren Genen

Mit Hilfe der pNFuse-IBA- und pCFuse-IBA-Vektoren war es möglich gezielt die Gene der BSS (*bssCAB*) und BssD (*bssD*) hintereinander in einen Expressionsvektor zu klonieren (Material und Methoden 6.1.3, Abb. 6). Dazu wurden die entsprechenden PCR-DNA-Fragmente zunächst wie beschrieben (Material und Methoden 6.1.1) in pEntry-IBA20-Vektoren kloniert (Transferreaktion mit *Lgu*I-Restriktionsendonuklease) um diese in einem nachfolgenden Schritt in die gewünschten „Fusionsvektoren“ (pCFuse-IBA; pNFuse-IBA) zu inserieren (Transferreaktion mit *Esp*3I-Restriktionsendonuklease). Die Reaktion läuft analog zu der Transferreaktion von Genen aus den Entryvektoren in die Expressionsvektoren ab (Material und Methoden 6.1.2, Tab. 15; statt Exprssionvektor wird der entsprechende pNFuse-IBA- oder pCFuse-IBA-Vektor eingesetzt). In einem nachfolgenden Schritt wurden die Gene in einer *Lgu*I-Restriktionsendonuklease-abhängigen Transferreaktion aus den Fusionsvektoren in den pEntry-IBA20-Vektor transferiert (Material und Methoden 6.1.1, Tab. 14; Analog zu der Klonierung von Donorvektoren). Der entstandene „pFUSE-Donorvektor“ wurde anschließend für den Transfer der Gene in die entsprechenden Expressionsvektoren verwendet.

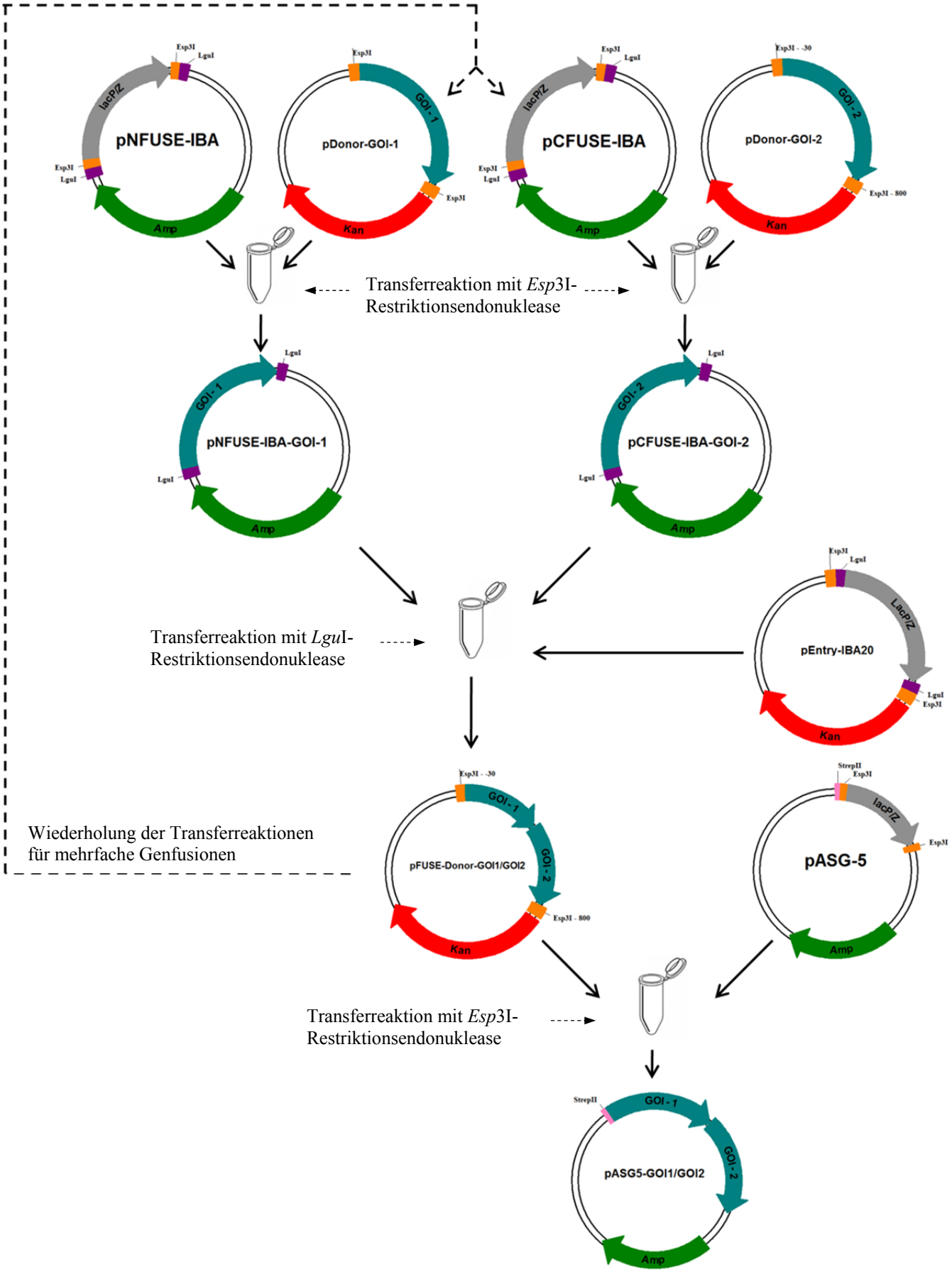


Abb. 6: Fusionieren von mehreren Genen durch kombinatorisches Klonieren.

6.2 Konstruktion des Expressionsvektors pJoe2775_BSS-geo

Das Plasmid pJoe2775_BSS-geo entstand durch Amplifikation der Gene *bssCAB* in einer PCR-Reaktion mit *G. metallireducens* Zellen. Für die Amplifikation der drei Gene wurden die Primer BSS_s und BSS_as verwendet (Material und Methoden 2., Tab. 3). Das erhaltene PCR-Fragment wurde gereinigt und anschließend einem Restriktionverdau mit den Endonukleasen NdeI und BamHI unterzogen. Im nächsten Schritt wurden die Fragmente gereinigt und in den ebenfalls mit NdeI und BamHI restringierten Vektor pJoe2775 ligiert. Chemisch kompetente *E. coli* DH5α Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Korrektheit des Expressionsvektors wurde durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert.

6.3 Synthese von DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenz für das *bssD*-Gen aus *G. metallireducens* wurde durch die Firma Genescript (NJ, USA) synthetisiert. Dazu wurde zunächst die in silico ermittelte DNA-Sequenz über ein Webinterface an die Firma Genescript übermittelt, welche die Sequenz für den gewünschten Wirtsorganismus (*E. coli*) nachträglich optimieren. Dabei wurden die Codon-Usage, der GC-Gehalt und weitere störende Einflüsse berücksichtigt und angepasst. Die *bssD*-Gensequenz wurde nach der Synthese in einem pUC57-Vektor geliefert. Für die Klonierung in einen Expressionsvektor wurde das Gen in 5´- und 3´-Richtung mit Schnittstellen für die *Lgu*I-Restriktionsendonuklease versehen. Dadurch war es möglich in einer *Lgu*I-Restriktionsendonuklease abhängigen Reaktion das *bssD*-Gen aus dem pUC 57-Vektor in den pEntry-Vektor des Stargate® Systems zu transferieren und anschließend mit dem *E. coli* Stamm DH5α zu transformieren. Im Anschluss wurde der entstandene Donorvektor mittels Sequenzierung auf die Richtigkeit der DNA-Sequenz des *bssD*-Gens überprüft.

6.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Ausgehend von einer Einzelkolonie des betreffenden *E. coli* Stammes wurde eine 5-Milliliter-Übernachtkultur angezogen. Mit dieser Kultur wurden 400-Milliliter-SOB-Medium [2,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$] angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 0,4 bis 0,6 bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für zehn Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 4 °C und 5000 rpm (Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 25 ml kaltem Transformationspuffer [10 mM PIPES; 15 mM $CaCl_2$; 250 mM KCl (pH 6,7); 55 mM $MnCl_2$] resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für zehn Minuten und anschließende Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 10 Minuten. Nach Aufnahme der Zellen in 5 ml Transformationspuffer wurden 7 % (v/v) steriles DMSO hinzugefügt, Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

6.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen (Material und Methoden 5.8) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (10-40 ng) bzw. kompletten Ligationsansätzen (20 µl) versetzt. Der Ansatz wurde für 10-14 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 30 Sekunden) wurden die Zellen nochmals für 2 bis 5 Minuten auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 100 µl LB-Medium für 30-60 Minuten bei 37 °C inkubiert (800 rpm; Thermomixer5436; Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

6.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzierungen zur Verifizierung der korrekten Sequenz von klonierten PCR Produkten wurden von der Firma Seqlab durchgeführt.

7. Biochemische Methoden

7.1 In-vivo Überexpression Plasmid-kodierter Gene in *E. coli*

Verschiedene Plasmidkonstrukte, welche die Gene der BSS (*bssCAB*) oder des aktivierenden Enzyms (*bssD*) tragen, wurden für die Transformation von unterschiedlichen *E. coli* Stämmen verwendet (Tab. 16).

Tab. 16: Verwendete *E. coli* Stämme mit den jeweiligen Plasmiden und eingesetzten Induktoren

Plasmid	Promotor	*E. coli* Stamm	Konzentration Induktor
pBSS-Strep	T7	BL21 (DE3)	1 mM IPTG*
pBADTOPO/D102-*bssD*	*araBAD*	ArcticExpress™ (DE3) RIL	0,02 % Arabinose
pASG3_*bssD*-geo	tetA	ArcticExpress™ (DE3) RIL	50-200 µg/l AHT**
pASG3_*bssD*-geo-synth	tetA	ArcticExpress™ (DE3) RIL	50-200 µg/l AHT**
pASG5_*bssD*-geo-synth	tetA	ArcticExpress™ (DE3) RIL	50-200 µg/l AHT**
pJoe2775_BSS-geo	*rhaBAD*	BL21 (DE3)	0,2 % L-Rhamnose

* IPTG: Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid

** AHT: Anhydrotetracyclin

7.2 Überproduktion der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase in *E. coli*

Für die Produktion der BSS aus *T. aromatica* und *G. metallireducens* wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet (Material und Methoden 7.1, Tab 16). Mit einer Einzelkolonie wurden aerobe Übernachtkulturen in 10-100 ml LB-Medium (mit Carbenicillin) angeimpft (Material und Methoden 3.1, Tab. 4 und 5). Diese dienten als Inokulum für die Überexpressionskulturen (200 ml bis 2 l LB-Medium). Die Kulturen wurden auf einem Rührer bei 900 rpm bis zum Erreichen einer OD_{578nm} von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Nach Induktion mit dem entsprechenden Induktor (Material und Methoden 7.1, Tab. 16) wurden die Überexpressionskulturen für 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur weiter inkubiert und in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{578nm} von 2,0 bis 4,0 geerntet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h und 4 h) wurden Proben (1 ml) entnommen. Neben den transformierten Zellen mit verschiedenen Plasmiden zur Produktion der BSS (Material und Methoden 7.1, Tab. 16) wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen ohne Vektor als Negativkontrolle unter denselben Bedingungen angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf) geerntet und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Pro 1 ml Kultur mit einer OD578nm =1 wurden 40 µl Probenpuffer eingesetzt. Die Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend 5 µl auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Die Zellernte fand unter aeroben

Bedingungen statt, die Präparation des Zellextraktes hingegen unter strikt anaeroben Bedingungen (Material und Methoden 4.1 und 4.4).

7.3 Überproduktion des aktivierenden Enzyms (BssD) der BSS in *E. coli*

Für die Produktion des BssD-Proteins aus *T.aromatica* und *G. metallireducens* wurde der *E. coli* Stamm ArcticExpress™ (DE3) RIL gewählt, der über zusätzliche Kopien verschiedener tRNA-Gene verfügt (*argU*, *ileY* und *leuW*) und außerdem die Gene kälteadaptierter Chaparone (Cpn10; Cpn60) für die Verbesserung der Löslichkeit rekombinanter Proteine co-exprimiert (Material und Methoden 2, Tab. 1). Mit einer Einzelkolonie wurden aerobe Übernachtkulturen in 50-200 ml LB-Medium (mit Gentamycin und Carbenicillin) angeimpft (Material und Methoden 3.1, Tab. 4 und 5). Diese dienten als Inokulum für die Überexpressionskulturen (200 ml bzw. 2 l LB-Medium). Die Kulturen wurden entweder unter Schütteln bei 180 rpm (200 ml Kulturen) oder auf einem Rührer bei 900 rpm (2 l Kulturen) bis zum Erreichen einer OD_{578nm} von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Kurz vor der Induktion des rekombinanten *bssD*-Gens mit 0,02 % Arabinose (pBAD-TOPO-*bssD*) bzw. 20 µg/l AHT (pASG3_*bssD*-geo; pASG3_*bssD*-geo-synth; pASG5_*bssD*-geo-synth) wurden die Überexpressionskulturen für 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden diese mit 2,5 mM L-Cystein und 50 µM Eisen(III)Citrat supplementiert (Material und Mathoden 3.1, Tab. 5) und für 24 Stunden bei 14 °C auf einem Rührer bei 900 rpm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 , 1 , 5 und 24 h) wurden Proben (1 ml) entnommen. Neben den transformierten Zellen mit verschiedenen Plasmiden zur Expression des *bssD*-Gens aus *T. aromatica* und *G. metallireducens* (Material und Methoden 7.1, Tab. 16) wurden *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) RIL-Zellen ohne Vektor als Negativkontrolle unter denselben Bedingungen angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C (Centrifuge 5417R, Eppendorf) geerntet und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Pro 1 ml Kultur mit einer OD578nm =1 wurden 40 µl Probenpuffer eingesetzt. Die Proben wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend 5 µl auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Die Zellernte und Präparation des Zellextraktes wurde wie beschrieben durchgeführt (Material und Methoden 4.1 und 4.4).

7.4 Reinigung rekombinant produzierter Proteine aus *E. coli* Zellextrakt

7.4.1 Reinigung der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Die Reinigung der BSS mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurde unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden sowohl anaerobisierte Puffer als auch sämtliches Material (Ultrazentrifugenbecher, Strep-Tactin-Superflow-Säule, Plastikbecher, Falcontubes) meherere Tage vor der Reinigung in ein Anaerobenzelt eingeschleust. *E. coli* Zellextrakt mit überproduzierter BSS wurde auf eine Strep-Tactin-Superflow-Säule (10 ml; IBA, Göttingen) aufgetragen. Diese wurde zuvor mit Grundpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) äquilibriert, der auch für die Herstellung des Zellextraktes verwendet wurde. Die Säule wurde nach Auftragen des Zellextraktes mit zwei Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit drei Säulenvolumen 0,5 M NaCl in Grundpuffer gewaschen, bevor erneut mit drei Säulenvolumina Grundpuffer gespült wurde. Nach diesen Waschschritten wurde durch Anlegen von Grundpuffer mit 2,5 mM D-Desthiobiotin reine BSS mit Strep-Tag eluiert. Die Säule wurde nach der Anwendung gemäß der Anleitung des Herstellers mit 1 mM HABA (2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoat) regeneriert und bei 4 °C gelagert.

7.4.2 Reinigung des aktivierenden Enzyms (BssD)

Die Reinigung des BssD-Proteins mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie wurde ebenfalls unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Auch hier wurden sowohl die benötigten anaerobisierten Puffer als auch sämtliches Material (Ultrazentrifugenbecher, Ni-NTA-Säule , Plastikbecher, Falcontubes) meherere Tage vor der Reinigung in ein Anaerobenzelt eingeschleust. Eine Ni-NTA-Säule (10 ml; GE Healthcare) wurde mit 5 Säulenvolumen Grundpuffer äquilibriert (Tab. 17), der auch für die Herstellung des Zellextrakts (Grundpuffer mit 5 mM ATP und 5 µg/ml DNase/RNase) verwendet wurde. Nach Auftragen des Zellextraktes wurde die Säule für 1 Stunde bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} mit Grundpuffer, der zusätzlich 90 mM Imidazol, 150 mM KCl und 10 mM ATP enthielt gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte anschließend durch Anlegen des Grundpuffers mit 250 mM Imidazol. Die Regeneration der Säule erfolgte entsprechend des Herstellers mit 5 Säulenvolumen 0,1 M Nickelsulfat.

Tab. 17: Zusammensetzung des Grundpuffers für die Reinigung des aktivierenden Enzyms der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Komponenten	Konzentration
Tris/HCl	10 mM
NaCl	200 mM
$MgCl_2$	5 mM
Argenin	50 mM
Glutamat	5 mM
L-Cystein	5 mM
Ammoniumeisen(II)sulfat	200 µM
pH 7,5	

7.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Gereinigte Proteine wurden sofort nach den jeweiligen Chromatographieschritten durch Ultrafiltration mittels "Amicon Ultra"-Filtereinheiten (Millipore, Eschborn) auf die gewünschte Proteinkonzentration konzentriert. Die Konzentrierung erfolgte jeweils durch Zentrifugation für verschiedene Zeiten bei 2500 rpm bei Raumtemperatur im Anaerobenzelt (Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg).

7.6 SDS-Plyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihren apparenten Molekülmassen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Die Proben für eine SDS-Page wurden wie folgt vorbehandelt: Zunächst wurden die Probenpellets mit 5 x SDS-Probenpuffer (20 % (v/v) 0,5 M Tris pH 6.8; 23 % (w/v) Glycerin; 40 % (v/v) einer 10 % SDS-Lösung (w/v); 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; ad 10 mL H_2O demin.; Zugabe von Bromphenolblau bis zum Erreichen der charakteristischen Blaufärbung) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Als Proteinstandard wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder" (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Der Proteinstandard wurde ebenfalls wie oben beschrieben vorbehandelt. Die diskontinuierliche SDS-Page besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel (siehe Tab. 19). Die SDS-Page wurde bei Raumtemperatur in 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS) durchgeführt. Die Proben wurden so vorbereitet, dass eine ungefähre Menge von 25 µg Protein auf das Gel aufgetragen wurde (bei gereinigtem Protein etwa 5 -8 µg). Es wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt. Diese konnte nach Durchlaufen des Sammelgels auf 200 Volt erhöht werden. Die Elektrophorese wurde beendet, bevor die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Gele in einer Färbelösung aus 0,25 % (w/v) Coomassie

Blue R 250; 5 % (v/v) Essigsäure und 50 % (v/v) Ethanol gefärbt. Hierzu wurde das Gel in der Färbelösung aufgekocht und mindestens 30 min schwenkend inkubiert. Zur Entfärbung des Gels wurde dieses in Entfärber-Lösung (10 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Eisessig) aufgekocht und bis zum Verlust der überflüssigen Färbung inkubiert. Die Gele konnten in Wasser gelagert werden.

Tab. 18: Zusammensetzung des verwendeten Polyacrylamidgels (15 %)

Komponenten	Trenngel (ml)	Sammelgel (ml)
1 M Tris/HCl pH8,8	1,95	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	0,235
H_2O bidest.	0,275	1,27
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2,41	0,480
10 % SDS	0,0545	0,02
5 % TEMED	0,0545	0,02
10 % Ammoniumperoxydisulfat (APS)	0,078	0,04

7.7 Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern

Die Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster in gereinigter BSS wurde unter strikt anaeroben Bedingungen mit einer 30 µM Proteinlösung durchgeführt. Zunächst wurde das Protein mit 5 mM DTT für 1 Stunde bei Raumtemperatur reduziert bevor anschließend Fe(III)Ammoniumcitrat in 3 molaren Äquivalenten hinzugegeben und die Proteinlösung für weitere 10 Minuten inkubiert wurde. Im nächsten Schritt wurde Lithiumsulfid in ebenfalls 3 molaren Äquivalenten hinzugegeben und die Proteinlösung nochmals für 1 Stunde unter leichtem Schwenken inkubiert. Für das Abtrennen von überschüssigem Eisen wurde eine PD10-Gelfiltrationssäule verwendet.

8. Enzymatische Tests

8.1 Aktivitätsbestimmung der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Die Bestimmung der Enzymaktivität nativer BSS wurde im Rohextrakt von auf Toluol gewachsenen *T. aromatica* Zellen (70-85 mg ml^{-1}) in einem diskontinuierlicher Enzymtest durchgeführt. Alle Testansätze wurden unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt und mittels RP-HPLC analysiert. Das gesamte Material und alle benötigten Stocklösungen (50 mM Natriumfumarat, Toluol, 20 mM TEA/NaOH Puffer pH 8,0) wurden anaerobisiert und mehrere Tage vor der Durchführung der Tests in ein Anaerobenzelt eingeschleust. Für den Testansatz wurde der Rohextrakt in einem Gesamtvolumen von 1 ml 1:5 verdünnt und zunächst für 2 Minuten mit dem Kosubstrat (Fumarat, [2,3-$^2H_2$]Fumarat, [1,2,3,4-$^{13}C_4$]Fumarat) inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates (Toluol, [$^2H_8$]Toluol, o-Cresol), welches zuvor in 2-Propanol gelöst wurde, gestartet. Für die Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung (V_{max}) wurde das Substrat in einer Konzentration von 2 mM, das Fumarat-Kosubstrat in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (1 min, 2 min, 4 min) wurden 100 µl Proben genommen und die Reaktion durch Zugabe von 40 µl 10 % (v/v) TFA (mit 8,75 mM Benzoat als interner Standard) gestoppt. Die Proben wurden nach Beendigung der Tests aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und säurepräzipitierte Proteine für 30 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in HPLC-Fläschchen gefüllt und wie beschrieben auf die Produktbildung (Benzylsuccinat) analysiert (Material und Methoden 10.5).

9. Inhibitionskinetische Untersuchungen

Inhibitionskinetische Untersuchungen der BSS wurden unter strikt anaeroben Bedingungen nach Inkubation von frisch präpariertem *T. aromatica* Rohextrakt (~ 60-80 mg/ml) mit den Inhibitoren Benzylalkohol und Benzylfumarat/Benzylmaleat durchgeführt (Material und Methoden 4.3). Zunächst wurde der Zellextrakt in einem Assayvolumen von 1 ml mit 20 mM TEA Puffer 1:5 verdünnt und mit verschiedenen Konzentrationen Benzylalkohol (1 µM – 2 mM) bzw. Benzylfumarat/Benzylmaleat (50 µM – 2 mM), welches zuvor in 2-Propanol gelöst wurde, für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde Fumarat in einer Konzentration von 5 mM zugegeben und erneut für 5 Minuten inkubiert. Die Enzymaktivitäten wurden nach dem Start der Reaktion durch die Zugabe des Substrats Toluol (2 mM) wie in Material und Methoden 8.1 beschrieben ermittelt. In den Kontrollansätzen wurde der Volumenanteil des Inhibitors durch Zugabe des verwendeten TEA Puffers ersetzt.

Die Darstellung der ermittelten Enzymaktivitäten wurde mit Hilfe eines Standard- Graphikprogramms (Prism 4.00, GraphPad, San Diego, Kanada) durchgeführt. Für die Berechnungen der kinetischen Inhibitionskonstanten wurde das Programm „LEONORA“ verwendet (Steady-state Enzyme Kinetics on the IBM ® PC and Compatibles Version 1.0, Athel Cornish-Browden, 1995, Oxford University Press, New York, USA). Dabei wurden die ermittelten spezifischen Aktivitäten zu jeder Inhibitionskinetik bei allen getesteten Inhibitor- und Substratkonzentrationen gegen die jeweiligen Gleichungen für eine gemischte Inhibition (Gleichung 1) und unkometitive Inhibition (Gleichung 1; $K_{ic} = K_{iu}$) gefittet. Die einzelnen Inhibitionskonstanten (K_{ic} und K_{iu}) wurden so berechnet, ebenso die Konstanten V_{max} und K_m der jeweiligen Inhibitionskinetiken. Die Variable [I] in der Gleichung entspricht den eingesetzten Inhibitorkonzentrationen.

Gleichung 1:

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right)}$$

(gemischte Inhibition)

Die Regressionsgraphen der Lineweaver-Burk-Plots wurden anhand der aus Leonora 1.0 berechneten Inhibitionskonstanten und kinetischen Parametern angepasst, wobei mit Hilfe des Graphikprogramms GraphPad Prism 4.0 theoretische Kurven simuliert wurden. Für die Darstellung der gemischten Hemmung (Gleichung 1) nach Lineweaver-Burk wurde jeweils die reziproke Form gebildet (Gleichung 2).

Gleichung 2:

$$v^{-1} = \underbrace{\left(K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{ic}}\right) * (V_{max})^{-1}\right)}_{\text{Steigung (m)}} * [S]^{-1} + \underbrace{\left(\left(1 + \frac{[I]}{K_{iu}}\right) * (V_{max})^{-1}\right)}_{\text{Ordinatenabschnitt (b)}}$$

In der allgemeinen Geraden-Gleichung y = mx + b entspricht die Variable y dabei v^{-1}, die Variable x entspricht $[S]^{-1}$. Die Steigungen (m) und Ordinatenabschnitte (b) können daher abgeleitet werden (Gleichung 2).

10. Analytische Methoden

10.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des BssD-Proteins wurde nach der Methode von Bradford *et al.* (1976) durchgeführt. Als Standardprotein für die Erstellung von Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) und Lowry (Lowry *et al.*, 1951) eigneten sich nicht für die Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter BSS, da diese den Wert um etwa 42 % überbestimmen. Daher wurde die Proteinkonzentration gereinigter BSS photometrisch mit Hilfe des berechneten Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Die Proteinlösung wurde zuvor 40 fach verdünnt und in 6 M Guanidin-Hydrochlorid gelöst. Durch die schonende Denaturierung des Proteins wurden störende Einflüsse der Eisen-Schwefel-Cluster minimiert.

10.2 Eisenquantifizierung

Die Quantifizierung des Eisengehaltes gereinigter BSS und des BssD-Proteins wurde nach der Methode von Lovenberg (Lovenberg *et al.*, 1963) durchgeführt. Die benötigten Lösungen sind in Tab. 20 aufgelistet. Die Kalibriergerade wurde mit 0, 10, 20, 30, 40 und 50 nmol Fe (entspricht 0, 20, 40, 60, 80, 100 µl Lösung C) erstellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Lösung D auf 250 µl mit H_2O demin. aufgefüllt und 7,5 µl HCl (25 %) hinzugegeben. Diese wurde anschließend für 10 Minuten bei 80 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Lösungen wurden 750 µl H_2O demin., 50 µl Lösung B und 250 ml Lösung C hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Absorption der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 512 nm photometrisch gemessen. Proben der gereinigten BSS und des gereinigten BssD-Proteins wurden entsprechend den Proben für die Erstellung der Kalibriergeraden behandelt. Diese wurden vorverdünnt, um bei der photometrischen Analyse dem Absorptionsbereich der Kalibriergeraden zu entsprechen. Zusätzlich wurde der Eisengehalt gereinigter BSS in einer UV/Vis-spektroskopischen Analyse mit Hilfe des berechneten Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 390 nm unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinkonzentration bestimmt. Bezogen auf einen durchschnittlichen Extinktionskoeffizienten von 4 mM^{-1} cm^{-1} pro Mol Eisen wurde die Stoichiometrie der Eisenatome pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym berechnet (Boll und Fuchs, 1998).

Tab. 19: Lösungen zur Bestimmung des Eisengehaltes

Lösungen	Komponenten
A	HCl (25 %)
B	10 % Hydroxylamin/HCl (1 g/10 ml) frisch ansetzen
C	0,1 % Phenanthrolin (10 mg/10 ml)
D	Eisenstandard: 500 µM $Fe(NH_4)(SO_4)$ (196 mg/l)

10.3 Metallanalyse mittels ICP-OES

Um die photometrische Messung der Eisengehalte gereinigter BSS und des BssD-Proteins zu validieren, wurden diese zudem mittels ICP-OES in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Seubert (Universität Marburg, Fachbereich Chemie) gemessen. Für eine präzise Analyse sollten die Proben kein Desthiobiotin oder Imidazol und nur geringe Salzkonzentrationen enthalten. Daher wurden die gereinigten Proteine mit Hilfe von PD-10 Gelfiltrationssäulen in Niedrigsalz-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8) überführt und anschließend konzentriert. Die Proteinkonzentrationen wurden wie beschrieben bestimmt (Material und Methoden 10.1). Darüber hinaus muss eine Puffer-Probe zur Normalisierung vorliegen.

10.4 Kolorimetrische Bestimmung der säurelabilen Sulfid-Ionen

Zusätzlich zu der Bestimmung des Eisengehaltes der gereinigten BSS wurde auch der Anteil an säurelabilen Sulfid-Ionen im Protein photometrisch bestimmt (Beinert, 1983). Als Referenz diente eine Eichlösung (Na_2S x 9 H_2O in 50 ml 0.1 N anaerober NaOH). Die verwendeten Lösungen sind in Material und Methoden, Tab. 20 zusammengefasst. Zu 100 µl Proteinlösung wurden unter strikt anaeroben Bedingungen 0,3 ml Lösung A gegeben und anschließend mit 15 µl Lösung B versetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss mit 75 µl Lösung C unterschichtet und vorsichtig gemischt. Sofort danach wurden 30 µl Lösung D zugegeben und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfogend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 670 nm photometrisch bestimmt. (Extinktionkoeffizient (ε) ca. 3.05 x 104 M^{-1} cm^{-1}).

Tab. 20: Lösungen zur Bestimmung der Sulfid Ionen in gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Lösungen	Komponenten
A	1 % Zn-Acetat
B	3 M NaOH
C	0,1 % N,N-dimethyl-1,4-phenylene Diammonium Chlorid (DMPD) in 5 N HCl
D	50 mM FeCl3 in 1.2 N HCl

10.5 Reversed-phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Die Hochleistungschromatographie wurde angewandt, um (*R*)-Benzylsuccinat als Produkt der BSS-Reaktion aus dem Rohextrakt von *T. aromatica* nachzuweisen. Dazu wurde ein HPLC-System der Firma Sykam (Fürstenfeldbruck) mit einem gekoppelten Dioden-Array- Detektor (Variodetect UV DAD, Sykam) verwendet. Die Proben wurden isokratisch mit 20 % Acetonitril (v/v) und 0,1 % TFA (v/v) als Laufmittel über 20 min unter Verwendung einer RP-C18-Säule (Supelcosil® LC-DABS, 150 x 4,6 mm, 3 µm; Sigma Aldrich, Steinheim) aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. Die Flussrate bei den beschriebenen Läufen betrug 0,75 ml min^{-1}. Als interner Standard für die Quantifizierung der gebildeten Menge (*R*)-Benzylsuccinat wurde 2,5 mM Benzoat verwendet. Die Retentionszeit von Benzoat betrug 8 Minuten, die von (*R*)-Benzylsuccinat 10-11 Minuten. Die HPLC-Läufe wurden mit Hilfe der Software „ChromStar 7“ (SCPA, Weyhe-Leeste) ausgewertet.

11. Spektroskopische Methoden

11.1 UV/Vis Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit einem Spektral-Photometer Ultrospec 1100 pro der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) aufgenommen. Die verwendeten Proteinlösungen wurden über einen Wellenlängenbereich von 200-800 nm gescannt. Die Messungen wurden in Quartzküvetten durchgeführt und gegen den entsprechenden Puffer gemessen in der die gereinigten Proteine gelöst vorlagen.

11.2 Elektronenparamegnetische Resonanz-Spektroskopie (EPR-Spektroskopie)

Die EPR-Spektroskopie wurde im Institut für Zytobiologie in Marburg von PD Dr. Antonio Pierik durchgeführt. Die Methode wurde zum Einen verwendet um die Eisen-Schwefel-Cluster rekombinanter nicht-aktivierter BSS näher zu charakterisieren und zum Andern um Änderungen des Glycylradikalsignals der aktiven BSS im Rohextrakt von *T. aromatica* durch Zugabe bekannter Inhibitoren und anderer potentieller Effektor-Verbindungen zu verfolgen.

11.2.1 Probenvorbereitung zur Charakterisierung von Eisen-Schwefel-Clustern

EPR-Proben zur Charakterisierung von Eisen-Schwefel-Clustern in gereinigter BSS wurden unter strikt anaeroben Bedingungen angefertigt. Die Messungen wurden sowohl mit rekonstituiertem (73 µM; Material und Methoden 7.7), als auch nicht-rekonstituiertem Protein (157 µM) durchgeführt. Dazu wurde das Enzym entweder direkt nach der Reinigung oder nach Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster konzentriert, durch Zugabe von 2 mM Natriumdithionit reduziert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde das unbehandelte Enzym verwendet, das nach der Reinigung im oxidierten Zustand vorlag. Die EPR-Röhrchen wurden mit einem Volumen von 300 µl befüllt und mit Hilfe eines Latexschlauch luftdicht verschlossen. Im Anschluss wurden diese aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Einfrieren wurde in den Latexschlauch ein Loch geschnitten um die Lagerung in flüssigem Stickstoff zu ermöglichen. Die Probenvorbereitung zur Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster des aktivierenden Enzyms der BSS erfolgte analog.

11.2.2 Probenvorbereitung zur Messung von Glycylradikalsignalen

Die Probenvorbereitung für die Untersuchung von Glycylradikalsignalen im Rohextrakt von *T. aromatica* wurde ebenfalls unter strikt anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt durchgeführt. Dazu wurde Rohextrakt von *T. aromatica* Zellen (~80 mg/ml) für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit verschiedenen Effektor-Verbindungen (isotopenmarkierte und nicht-markierte Substrate/ Inhibitoren) inkubiert. Alle Verbindungen wurden für EPR-spektroskopische Analysen in einer Endkonzentration von 2 mM (mit Außnahme nicht-markiertes Fumarat (5 mM), Itaconat (10 mM) und Kaliumphosphatpuffer (1 M) mit Rohextrakt von anaerob auf Toluol gewachsenen *T. aromatica* Zellen inkubiert. Anschließend wurden die verwendeten EPR-Röhrchen mit 300 µl Rohextrakt befüllt. Das Ausschleusen, Einfrieren und die Lagerung der Proben erfolgte wie beschrieben (Material und Mathoden 11.2.1).

11.2.3 Ausrüstung und Messbedingungen

EPR-Spektren wurden an einem Bruker EMX-6/1 X-Band-EPR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Die Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Temperatur 10 K, Mikrowellenleistung 2 mW, Mikrowellenfrequenz 9,5 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 0,6 mT. Messungen von Glycylradikalsignalen im Rohextrakt von *T. aromatica* wurden unter den nachfolgenden Bedingungen durchgeführt: Temperatur 70 K, Mikrowellenleistung 13 µW, Mikrowellenfrequenz 9.454 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe des Programms WINEPR (Bruker, Karlsruhe).

11.3 Mössbauer-Spektroskopie mit ^{57}Fe-angereicherter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Mössbauer-spekroskopische Untersuchungen rekombinanter ^{57}Fe-angereicherter BSS wurden in Mülheim am Max-Planck Institut für Bioanorganische Chemie von Dr. Eckhard Bill durchgeführt. Die Mössbauer-Spektroskopie stellt eine ergänzende Methode für die nähere Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster in rekombinant produzierter BSS dar. Für die Messungen von ^{57}Fe-Mössbauer-Spektren wurde rekombinant produzierte BSS mit ^{57}Fe angereichert. Dazu wurden zunächst 11,5 mg ^{57}Fe-Metall über Nacht in 0,4 ml HCl (8 M) bei Raumtemperatur gelöst und anschließend einer 4 Liter Überexpressionskultur nach Induktion der *bss*-Gene zugegeben (Konzentration ^{57}Fe im Medium: 50 µM; Gesamtkonzentration Fe im Medium: 65 µM). Der pH-Wert der Überexpressionskultur änderte sich durch die Zugabe des ^{57}Fe nicht. Das Enzym wurde wie beschrieben gereinigt (Material und Methoden 7.4.1) und ohne Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster für die Präparation einer Mössbauerprobe verwendet. Dazu wurde die Proteinlösung auf eine Konzentration von 0,7 mM und ein Volumen von etwa 250 µl ankonzentriert und in eine Mössbauerkapsel gefüllt. Diese wurde im Anaerobenzelt in flüssigem Stickstoff eingefroren, aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und in flüssigem Stickstoff gelagert.

12. Elektrochemische Methoden (Redoxtitration)

Die Redoxtitration ist eine Methode um das Redoxpotential einer redoxaktiven Spezies zu bestimmen Durch die Zugabe von Reduktions- bzw. Oxidationsmitteln zu einer Lösung ist es möglich ein definiertes Potential dieser Lösung und damit auch der Probe einzustellen. Die Änderung des Potentials wird mittels einer Ag/AgCl Elektrode verfolgt, die in die Proteinlösung eingetaucht wird. Damit das Potential der Lösung dem des Potentials der Probe entspricht muss diese unter ständigem Rühren für längere Zeit äqulibriert werden. Um eine schnellere und effizientere Äquilibrierung zu

erhalten, werden Mediatoren verwendet. Diese sind niedermolekulare Redoxsysteme, die ein oder zwei Elektronen aufnehmen bzw. abgeben können.

Für die Bestimmung der Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Cluster der rekombinant produzierten BSS wurden Proteinlösungen mit 46,5 µM nicht-rekonstituierter und 20 µM rekonstituierter BSS verwendet. Zu den Proteinlösungen wurde ein Mediatormix zugegeben und anschließend für die Reduktion der Eisen-Schwefel-Cluster schrittweise mit Natriumdithionit titriert. Um das Standard Wasserstoffpotential (SHE) zu erhalten wurden aufgrund der verwendeten Ag/AgCl Elektrode + 207 mV den gemessenen Werten hinzuaddiert. Bei Erreichen bestimmter Redoxpotentiale (-343 mV, -400 mV, -423 mV, -494 mV) wurden 300 µl Proben entnommen, in EPR-Röhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Einfluss der verschiedenen Potentiale auf die Eisen-Schwefel-Cluster der BSS wurde EPR-spektroskopisch wie in Material und Methoden 11.2 beschrieben durchgeführt. Mit Hilfe eines Graphikprogramms (GraphPad Prism, San Diego, Kanada) wurden anschließend die relativen Signalamplituden bei einem g-Wert von 1,96 gegen die entsprechenden Potentiale aufgetragen. Die Mittelpunkt-Redoxpotentiale wurde bestimmt, indem der Plot gegen die Nernst-Gleichung (Gleichung 3) gefittet wurde. Der Wendepunkt der Kurve gibt das Mittelpunkt-Redoxpotential an.

Gleichung 3: $$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}$$ (Nernst Gleichung)

E (Elektrodenpotential), E° (Mittelpunkt-Redoxpotential), R (Universelle Gaskonstante), T (absolute Temperatur), n (Anzahl der übertragenen Elektronen), F (Faraday-Konstante), [ox]/ [red] (Konzentration des betreffenden Redoxpartners).

Tab. 21: Zusammenfassung der verwendeten Mediatoren

Mediator	**E_m [mV]**
Methylviologen	- 443
Benzylviologen	- 350
Neutralrot	- 325
Safranin	- 289
Phenosafranin	- 252
2-Hydroxy-1,4-naphthoquinon	- 145

13. Proteinmodifikation

Für die Lokalisation der Eisen-Schwefel-Cluster in rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase wurden die an der Koordinierung der Eisenatome beteiligten Cystein-Reste mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend unter UV-Licht detektiert. Alle Schritte wurden unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt. Da eine quantitative Cysteinmodifikation nur an reduzierten Cystein-Resten möglich ist wurde zunächst die Proteinlösung (2-3 mg gereinigte (*R*)-Benzylsuccinat Synthase) durch Inkubation mit 0,1 M TCEP (Tris-2-Carboxyethylphosphin-Hydrochlorid) für 2 Stunden auf Eis reduziert. TCEP wird anschließend durch Gelfiltration entfernt. Für die Maskierung freier Cystein-Reste, die nicht an der Koordinierung von Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt sind, wurde die Proteinlösung mit 0,5 mM Iodacetamid ebenfalls für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Durch die irreversible Alkylierung mit Iodacetamid werden frei zugängliche Cystein-Reste in das stabile Carboxyamidomethylcystein überführt und können den später zugegeben Fluoreszenzfarbstoff nicht binden. Nachfolgend wurde die Proteinlösung mit 5 mM DTT und 5 mM TCEP für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Damit die Cystein-Reste der Eisen-Schwefel-Cluster für eine Reduktion durch die zugegebenen Reagenzien zugänglich sind, wurde das Protein durch Zugabe von 25 %iger Salzsäure präzipitiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Das Proteinpellet wurde im nächsten Schritt 2 x mit 90 % Aceton gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Damit Cystein-Reste im Inneren der großen Untereinheit, die nicht mit Iodacetamid maskiert wurden auch weiterhin nicht für die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffs zugänglich sind, wurde eine weitere Probe nicht mit Salzsäure, sondern mit einem Chelator (EDTA) behandelt um ein vollständiges Denaturieren des Proteins zu verhindern. Diese Probe wurde ebenfalls für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Reduktionsmittel durch Gelfiltration entfernt. Für die Detektion der Cysteine, die an der Koordination von Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt sind, wurden die Proben in einem SDS-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol aufgenommen, für 10 Minuten geschüttelt und anschließend mit einem Cystein-modifizierender Fluoreszenzfarbstoff (Bromobimane) in einer Endkonzentration von 0,5 mM für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Schritt wurde zu den Proteinlösungen Mercaptoethanol (1 % Endkonz.) gegeben und diese nach dem Aufkochen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion fluoreszierender Cystein-Reste erfolgte in nicht-gefärbten SDS-Gelen auf einem UV-Schirm.

14. Bioinformatische Methoden

Da die Kristallstrukturen der BSS aus *T. aromatica* und des aktivierenden Enzyms (BssD) noch nicht gelöst sind, wurden diese in-silico modelliert. Basierend auf den Identitäten der Aminosäuresequenzen zu homologen Enzymen, deren Kristallstrukturen bereits aufgeklärt sind, wurden 3-D Strukturen der BSS (α-Untereinheit) und des aktivierenden Enzyms (BssD) mit Hilfe des Programms Swissmodel (Arnold *et al.*, 2006) angefertigt.

Ergebnisse

1. Charakterisierung rekombinant produzierter, nicht-aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase (BSS) gehört zu der Familie der Glycylradikalenzyme und katalysiert den initialen Schritt des anaeroben Toluolabbaus in *T. aromatica* (Leuthner *et al*., 1998). In dieser Reaktion wird die Methylgruppe von Toluol über einen radikalischen Mechanismus an die Doppelbindung des Fumarat-Kosubstrats addiert. Das resultierende Intermediat der Reaktion ist (*R*)-Benzylsuccinat, welches in einem modifizierten β-Oxidationsweg über Succinyl-CoA bis hin zu dem zentralen Intermediat des anaeroben Toluolabbaus, Benzoyl-CoA, abgebaut wird. Die BSS ist aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Dabei unterscheidet sich die α-Untereinheit (98 kDa) deutlich aufgrund ihrer Größe von den beiden kleinen Untereinheiten β (8,5 kDa) und γ (6,4 kDa). Die Untereinheiten bilden vermutlich eine hexamere Struktur in einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Komposition aus. Als einziger Vertreter der Glycylradikalenzyme mit Ausnahme der p-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus *Clostridium difficile* besitzt die BSS zusätzliche Kofaktoren in Form von Eisen-Schwefel-Clustern mit bisher noch unbekannter Funktion. Bisherige Erkenntnisse deuteten darauf hin, dass es sich dabei um zwei unterschiedliche [3Fe4S]-Cluster handelt (C. Feil, 2006). Die Gene für die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica* Stamm K172 wurden von B. Leuthner (1998) in einen Überexpressionsvektor kloniert und für eine schnelle und effiziente Reinigung des überproduzierten Proteins durch den Einbau eines Strep-Tags am N-Terminus der großen α-Untereinheit modifiziert (Hogg, 2008). In dieser Arbeit wurde die BSS als Strep-Tag Fusionsprotein in *E. coli* überproduziert, gereinigt und eine spektroskopische Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster des nicht-aktivierten Enzyms durchgeführt.

1.1 Reinigung der rekombinanten, nicht-aktivierten BSS

Die rekombinante Produktion, Präparation von Zellextrakt und Reinigung der BSS wurde optimiert und wie in Material und Methoden 4.4, 7.2 und 7.4.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde auf die Einhaltung strikt anaerober Bedingungen sowohl bei der Präparation des Zellextrakts als auch der Reinigung des Enzyms geachtet. Für jede Reinigung wurden 20 Gramm Zellen eingesetzt, von denen etwa 20 mg gereinigtes Enzym erhalten wurde. Gereinigte BSS wies schon vor dem Konzentrieren eine deutliche Braunfärbung auf, was ein erster Hinweis für den Einbau von Eisen-Schwefel-Cluster darstellt. Nach Auftrennung der BSS mittels SDS-PAGE war die große α-Untereinheit stets als Einzelbande erkennbar (Abb. 7). Dies ist ein Indiz dafür, dass das Enzym nach Überproduktion in *E. coli* im nicht-aktivierten Zustand vorliegt. Für eine nähere Charakterisierung des Enzyms wurde gereinigte, nicht-aktivierte BSS in verschiedenen spektroskopischen Analysen eingesetzt.

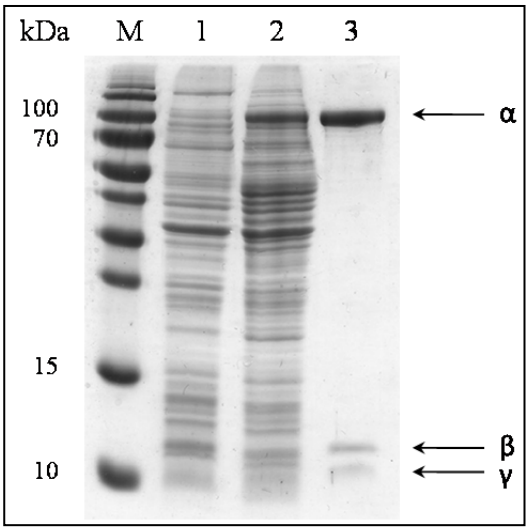


Abb. 7: SDS-PAGE gereinigter Strep-getagter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase. Gezeigt ist die Reinigung der rekombinant produzierten BSS mittels Strep-Tactin Affinitätschromatographie. Aufgetragen wurden ganze *E. coli* Zellen, die das Plasmid pBSS-Strep enthielten vor und nach Induktion der *bss*-Gene mit 1 mM IPTG sowie das nach Strep-Tactin Affinitätschromatographie erhaltene Eluat. Zu sehen ist die große α-Untereinheit mit einer Masse von 98 kDa, sowie die kleinen β- und γ-Untereinheiten mit den Massen 8,5 bzw. 6,4 kDa. Spur 1: Ganze *E. coli* Zellen (BL21(DE3) mit pBSS-Strep) vor Induktion der *bssCAB*-Gene (25 µg Protein); Spur 2: Ganze *E. coli* Zellen 3 Stunden nach Induktion der *bssCAB*-Gene mit 1 mM IPTG (25 µg Protein); Spur 3: Eluat (8 µg Protein); M: Marker.

1.2 UV/Vis-spektroskopische Analyse und Bestimmung des Eisen-Schwefel-Gehalts

Gereinigte BSS wurde in einer Konzentration von 8,1 µM für eine UV/Vis-spektroskopische Analyse im Bereich von 300-600 nm verwendet (Abb. 8). Das unbehandelte Protein zeigte ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm, welches nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen Natriumdithionit (0,1 mM; 0,2 mM; 1 mM; 2 mM) abnahm. Dies deutet auf die Anwesenheit reduzierbarer Eisen-Schwefel-Cluster hin. Die Bestimmung des Eisengehalts des Proteins erfolgte durch mehrere Methoden. Zum einen wurde dafür die Absorption der FeS-Cluster bei 390 nm zugrunde gelegt. Anhand der UV/Vis-spektroskopischen Analyse wurde basierend auf der eingesetzten Proteinkonzentration (8,1 µM) und einer Absorption von 0,54 ein Extintionskoeffizienten von 66,7 mM^{-1} cm^{-1} bei einer Wellenlänge von 390 nm berechnet. Unter Annahme eines mittleren Extinktionskoeffizienten für FeS-Proteine von 4 mM^{-1} cm^{-1} pro Mol Eisen (Boll and Fuchs, 1998) erhält man eine Stoichiometrie von 16,7 Eisenatomen pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym. Zusätzlich wurde der Eisengehalt durch eine chemische Analyse bestimmt (Material und Methoden 10.2), die einen Wert von 16,3 Eisenatomen pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym lieferte und damit das Ergebnis der UV/Vis-spektroskopischen Analyse bestätigte. Schließlich zeigte die Metallanalyse des Enzyms mittels ICP-OES (Lovenberg *et al.*, 1963) einen Eisengehalt von 16,5 Eisenatomen pro Holoenzym (Material und Methoden 10.3) und belegte außerdem, dass Eisen als einziges Metall in signifikanten Mengen in

gereinigter BSS enthalten ist. Durch chemische Rekonstitution des Proteins mit Fe(II)Ammoniumcitrat und Lithiumsulfid (Material und Methoden 7.7) konnte der Gehalt an Eisen lediglich auf einen Wert von 17,9 Eisenatomen pro Holoenzym erhöht werden. Die Auswertung der Eisenquantifizierung verschiedener Enzympräparationen zeigte, dass aufgrund optimierter Reinigungsbedingungen die Anzahl der Eisenatome pro Holoenzym ohne zusätzliche Rekonstitution erhöht werden konnte und dabei die Stoichiometrie zwischen 16 und 18 Eisenatomen pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym variiert. Der Anteil an säurelabilen Sulfid-Ionen wurde kolorimetrisch bestimmt und betrug 17,2-18,9 Sulfid-Ionen pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym (Material und Methoden 10.4).

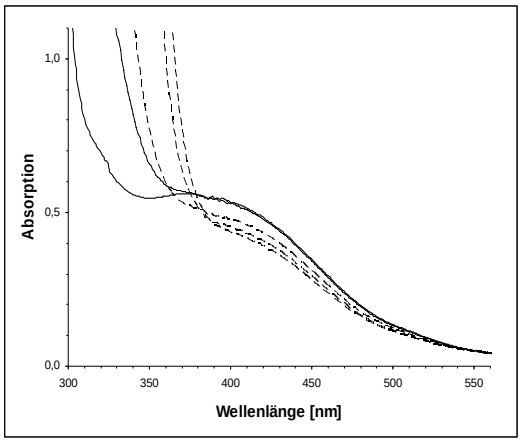


Abb. 8: UV/Vis Spektren gereinigter strep-getagter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase. Gezeigt ist das UV/Vis Spektrum von 8,1 µM gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase unbehandelt und nach schrittweiser Reduktion mit Natriumdithionit. Charakteristisch für Eisen-Schwefel-Cluster ist die Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm nach Inkubation des Proteins mit Natriumdithionit. Das Enzym war in einem Puffer mit 100 mM Tris pH 8.0 und 150 mM NaCl gelöst.

1.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster

Um die Beschaffenheit und Eigenschaften der Eisen-Schwefel-Cluster in gereinigter, nicht-aktivierter BSS näher zu charakterisieren, wurden EPR-spektroskopische Analysen durchgeführt. Frühere Analysen zeigten ausschließlich EPR-Signale unter oxidierten Bedingungen, die charakteristisch für $[3Fe4S]^{1+}$-Cluster sind und um g = 2,02 auftreten. Diese waren reproduzierbar und zeigten sehr ähnliche Abhängigkeiten von Temperatur und Mikrowellenleistung, wiesen jedoch sehr variierende Signalintensitäten in verschiedenen Enzympräparationen auf (Maximal 1,5 Spins pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym). Unter reduzierenden Bedingungen nach Zugabe von Natriumdithionit wurden keine EPR-aktiven Spezies beobachtet (C. Feil, 2006).

Bei der Reinigung und Probenvorbereitung für eine erneute Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster der BSS mittels EPR-Spektroskopie wurde verstärkt auf die Einhaltung und Verbesserung

strikt anaerober Bedingungen geachtet. Für die Reduktion der Kofaktoren wurden 300 µl frisch gereinigtes Enzym unbehandelt oder mit relativ hohen Konznetrationen von 2 mM Natriumdithionit reduziert, in EPR-Röhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren (Material und Methoden 11.2.1). Da während der Proteinreinigung Eisen-Schwefel-Cluster teilweise zerfallen, wurde ein Teil des gereinigten Enzyms mit Fe(III)Ammoniumcitrat und Lithiumsulfid rekonstituiert (Material und Methoden 7.7), bevor die Proben angesetzt wurden. Bereits die nicht rekonstituierten Enzympräparationen wiesen unter oxidierten Bedingungen deutlich schwächere Signale für $[3Fe4S]^{1+}$-Cluster auf als dies in früheren Präparationen beobachtet wurde (Abb. 9A). Eine Quantifizierung der Signale lieferte einen Wert von 0,3 Spins pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym. Die Rekonstitution des Enzyms bewirkte eine weitere Verringerung der Signalintensität für $[3Fe4S]^{1+}$-Cluster. Nach Inkubation des Enzyms mit Natriumdithionit wurden unter reduzierenden Bedingungen erstmals EPR-Signale detektiert, die charakteristisch für gekoppelte $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster sind (g = 2.06 und g = 1.94; Abb.9A). Durch Erhöhung der Mikrowellenleistung wurden sowohl für das rekonstituierte als auch für das nicht-rekonstituierte Enzym weitere spektrale Hinweise für eine Signalkopplung beobachtet, nämlich „Flügelstrukuren“, welche die Resonanz-Peaks der $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster an den Seiten flankieren (Abb. 9B). Eine Spinquantifizierung war aufgrund der Signalkopplung und der offensichtlich nur partiellen Reduktion nur bedingt möglich und lieferte Werte von maximal 0,7 Spins pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym sowohl für das rekonstituierte, als auch das nicht-rekonstituierte Enzym. Die Quantifizierung der Signalintensitäten weisen darauf hin, dass eine vollständige Reduktion der $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster mit Natriumdithionit nicht möglich ist.

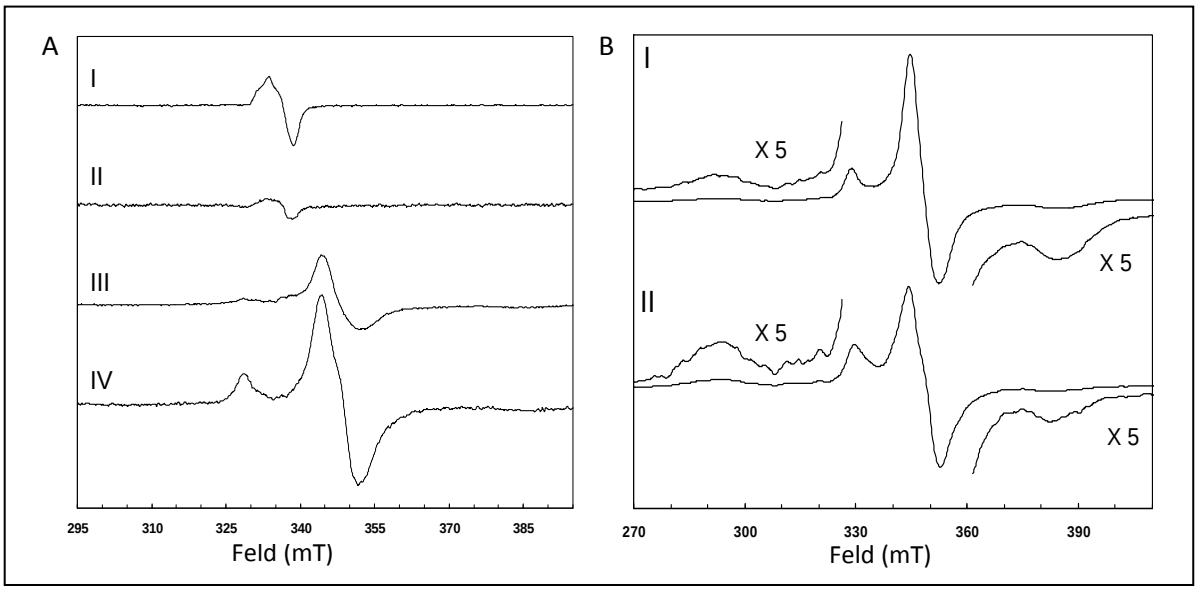


Abb. 9A: EPR-Spektrum von oxidierter und reduzierter (2 mM Natriumdithionit) gereinigter BSS gemessen mit 2 mW Mikrowellenleistung. Nicht-rekonstituierte BSS im oxidierten Zustand (I) zeigt ein Signal, welches charakteristisch für $[3Fe4S]^{1+}$-Cluster ist, dessen Intensität nach Rekonstitution des Enzyms

abnimmt (II). Das Signal für die reduzierte Form des Enzyms (III) ist charakteristisch für gekoppelte $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster, dessen Intensität nach Rekonstitution des Enzyms zunimmt (IV).

Abb. 9B: EPR-Spektrum von reduzierter (2 mM Natriumdithionit) gereinigter BSS mit 200 mW Mikrowellenleistung. Das Spektrum für nicht-rekonstituierte (I) und rekonstituierte (II) BSS. Die Spektren zeigen „Flügelstrukturen", welche die Spektren der $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster flankieren (5 fach vergrößert) und ein weiteres Charakteristikum für eine Signalkopplung darstellen. Die Spektren wurden unter fogenden Bedingungen aufgenommen: Temperatur 10 K, Mikrowellenfrequnz 9,5 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 0,6 mT. Proteinkonzentration: Nicht-rekonstituiertes Enzym 157 µM, rekonstituiertes Enzym 73 µM.

1.4 Bestimmung der Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Cluster

Als Versuch zur Auflösung des gekoppelten Signals der $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster und zur Bestimmung der Mittelpunkt-Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Cluster wurde eine Redoxtitration mit rekonstituierter (Daten nicht gezeigt) und nicht-rekonstituierter BSS durchgeführt. Dazu wurden in einem Potentiostaten in Gegenwart eines Gemisches verschiedener Redoxmediatoren steigende Konzentrationen Natriumdithionit zu den Proteinlösungen titriert und bei Erreichen verschiedener Redoxpotentiale (-350 mV, -400 mV, -423 mV, -500 mV) Proben entnommen (Material und Methoden 12.). Die Reduzierbarkeit der Eisen-Schwefel-Cluster bei unterschiedlichen Potentialen wurde mit Hilfe von EPR-Spektren verfolgt und die erhaltenen Signale wie in Material und Methoden 12. beschrieben ausgewertet. Signale für $[3Fe4S]^{1+}$-Cluster waren schon bei einem Potential von -350 mV nicht mehr detektierbar. Erst ab einem Potential von -400 mV wurden Signale für $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster beobachtet, welche die gleichen Eigenschaften wie die zuvor beobachteten Signale aufwiesen, ohne eine Auflösung der Signalkopplung. Dies bedeutet, dass die $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster in rekombinater BSS ähnlich niedrige Mittelpunkt-Redoxpotentiale besitzen. Die Signalintensitäten wurden bis zu einem Potential von -500 mV stetig stärker, erreichten jedoch keinen Titrationsendpunkt (Abb. 10A). Die Signalamplituden wurden als Funktion der angelegten Potentiale aufgezeichnet, aber die Kurven konnten nicht gegen die Nernst-Gleichung gefittet werden, da zu wenige Datenpunkte zur Verfügung standen und der Titrationsendpunkt unbekannt war. Dennoch kann man für das Mittelpunkt-Redoxpotential der $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster einen Wert von -450 mV bis -500 mV abschätzen(Abb. 10B).

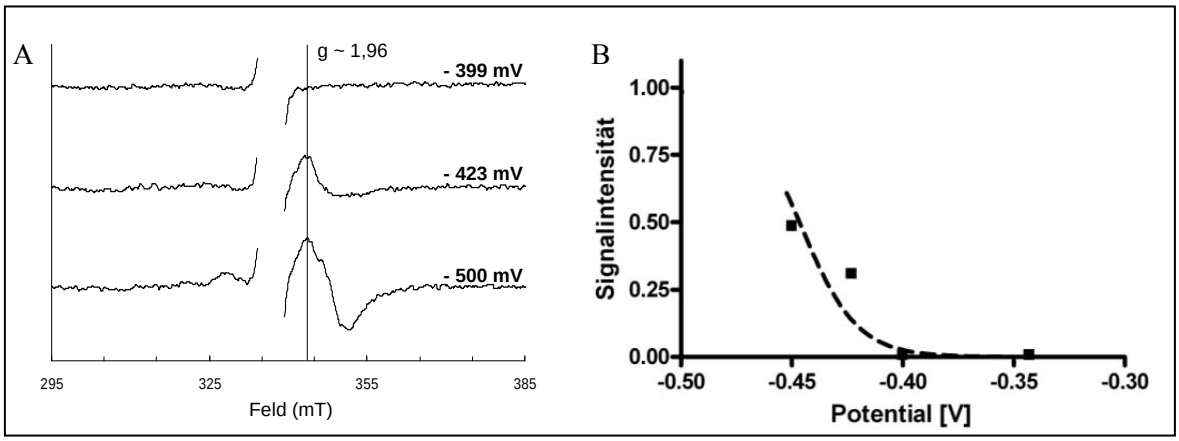


Abb. 10A: Redox-potentiometrische Titration der [4Fe4S]$^{1+}$-Cluster in gereinigter BSS verfolgt mit Hilfe der EPR-Spektroskopie. Gezeigt sind EPR-Spektren von nicht-rekonstituierter BSS, aufgenommen von verschiedenen Proben bei Redoxpotentialen zwischen 350-500 mV. Die Proteinkonzentration betrug vor der Titration mit Natriumdithionit 46 µM in 100 mM Tris Puffer pH 7.5 und 150 mM NaCl. Signale für gekoppelte [4Fe4S]$^{1+}$-Cluster wurden ab einem Potential von -400 mV beobachtet. Der Eisengehalt der Enzympräparation betrug 16,3 Eisenatome pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym.

Abb. 10B: Auftragung der Signalamplituden (g ~ 1,96) als Funktion der angelegten Potentiale. Der Graph wurde mit Hilfe der Nernst-Gleichung unter Annahme einer Ein-Elektronen-Übertragung ohne genaue Kenntnis des Titrationsendpunkts gefittet.

1.5 Mössbauer-spektrokopische Analyse der Eisen-Schwefel-Cluster

Um weitere Informationen über die Eigenschaften der Eisen-Schwefel-Cluster der BSS zu erhalten, wurde eine Mössbauer-spektroskopische Analyse durchgeführt. Für diese Analyse wurde die BSS mit ^{57}Fe angereichert und ohne Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster auf 0,7 mM konzentriert. Anschließend wurde das Enzym für 30 Minuten mit 2 mM Natriumdithionit reduziert, in eine Mössbauerkapsel gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Null-Feld Spektrum wurde mit vier Lorentzischen Quadrupol Dubletten simuliert (Abb. 11A). Zwei dieser Subspektren wurden für die Anteile an Fe(III) und gemischt-valentem Fe(II/III) in reduzierten [3Fe4S]^0-Cluster simuliert (δ = 0.35, 0.42 mm/s, ΔE_Q = 0.53, 1.08 mm/s, Verhältnis 1:2), deren Anteile am Gesamtspektrum zusammengenommen lediglich 5 ± 2 % betragen. Ein weiteres Subspektrum wurde für unspezifisch gebundenes Fe(II) mit einem Anteil am Gesamtspektrum von 2 % simuliert (δ = 1.39 mm/s, ΔE_Q = 3.22 mm/s). Der Hauptanteil des Gesamtspektrums mit einer relativen Intensität von 92 % wird durch das vierte Subspektrum dargestellt, welches typisch für delokalisierte Fe(II/III)-Paare in ausschließlich Cystein-koordinierten [4Fe4S]$^{2+}$-Cluster ist (δ = 0.43 mm/s, ΔE_Q = 1.09 mm/s). Bei angelegtem magnetischen Feld zeigte das Mössbauer-Spektrum trotz Reduktion des Enzyms mit Natriumdithionit ein diamagnetisches Verhalten, ähnlich zum S = 0 Grundzustand von Eisen-Schwefel-Cluster

(Abb. 11B). Selbst nach Zugabe von 10 mM Titancitrat konnte keine weitere Reduktion der Eisen-Schwefel-Cluster beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend bedeutet dies, dass rekombinant produzierte BSS ausschließlich oxidierte $[4Fe4S]^{2+}$-Cluster besitzt, die selbst mit Titancitrat nicht zu reduzieren sind. Die geringen Anteile von [3Fe4S]-Clustern ist durch den partiellen Zerfall von [4Fe4S]-Clustern während der Enzympräparation zu erklären.

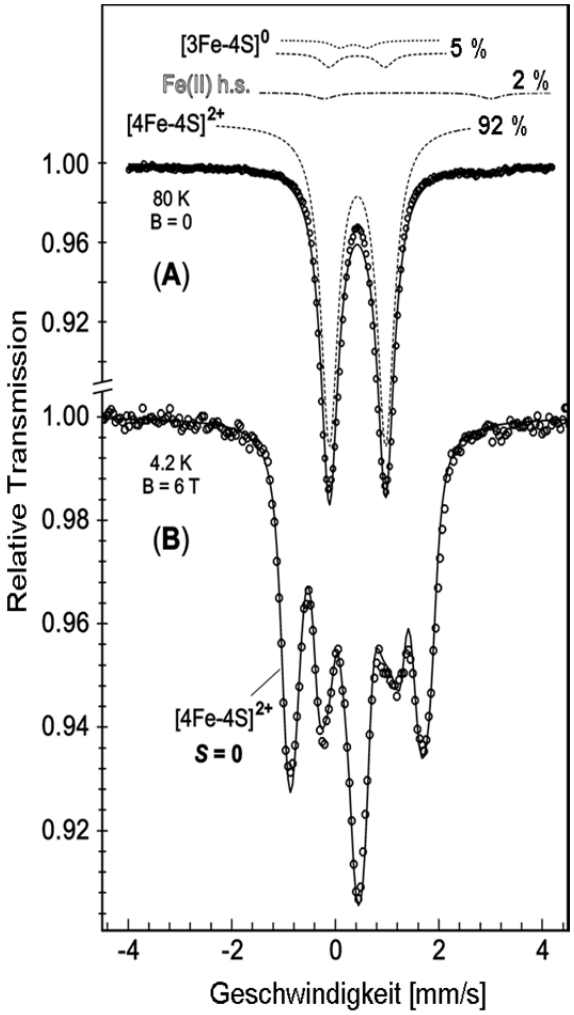


Abb. 11: Mössbauer-Spektren gereinigter BSS (in Gegenwart von 2 mM Natriumdithionit präpariert). Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 80 K in Abwesenheit (**A**) und bei 4,2 K in Gegenwart eines magnetischen Feldes von 6 T (**B**) gemessen. Die Spektren in (A) repräsentieren simulierte Lorentzische Quadrupol Dupletten mit folgenden Isomerverschiebungen (δ) und Quadrupolaufspaltungen ΔE_Q (in mm/s): 0.43, 1.09 für $[4Fe4S]^{2+}$-Cluster (92 % relative Intensität), 0.35, 0.53 und 0.42, 1.08 für den Fe(III) und Fe(II/III) Anteil reduzierter $[3Fe4S]^{0}$-Cluster (zusammen 5 ± 2 % relative Intensität) und 1.39, 3.22 für unspezifisches Binden von Fe(II) am Protein (2 % relative Intensität). Das Spektrum in (B) stellt eine Simulation bei angelegtem Magnetfeld von $[4Fe4S]^{2+}$-Cluster im S = 0 Zustand dar. Der Einflüsse von $[3Fe4S]^{0}$-Cluster und unspezifisch gebundenem Fe(II) ist zu gering um diese im Spektrum aufzulösen.

1.6 Lokalisierung der Eisen-Schwefel-Cluster

Für eine Vorhersage zur Lokalisation der Eisen-Schwefel-Cluster in der BSS wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der kleinen β- und γ-Untereinheiten von verschiedenen BSS und BSS-ähnlichen Enzymen durchgeführt. Weiterhin wurden die Cystein-Reste, die an der Koordinierung von Eisen-Schwefel-Cluster in gereinigter BSS beteiligt sind, mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert und anschließend unter UV-Bestrahlung analysiert.

1.6.1 Aminosäuresequenzvergleich der kleinen β- und γ-Untereinheiten der BSS

Alle bekannten BSS und BSS-ähnliche Enzyme wurden für einen Sequenzvergleich der kleinen β- und γ-Untereinheiten herangezogen (Abb. 12). Diese sind sowohl an der Aktivierung von cyclischen als auch nicht-cyclischen Kohlenwasserstoffen wie Toluol, Alkanen und 2-Methylnaphtalin zu den entsprechenden Succinat Addukten beteiligt. Sowohl die β- als auch die γ-Untereinheiten aller im Vergleich dargestellten Enzyme weisen je vier konservierte Cysteine in ihren Aminosäuresequenzen auf, die zwar in ungewöhnlichen Motiven angeordnet sind (Leuthner *et al.*, 1998), jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Koordinierung von einem [4Fe4S]-Cluster pro Untereinheit beteiligt sind. Bei einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Komposition des Proteins hätte dies eine Anzahl von vier [4Fe4S]-Cluster pro Holoenzym zur Folge. Die Sequenzanalyse stützt die EPR-spektroskopische Beobachtungen sowie die mittels ICP-OES und chemischer Analyse durchgeführte Eisenquantifizierung.

β-Untereinheit

γ-Untereinheit

Abb. 12: Aminosäuresequenzvergleich der kleinen Untereinheiten von BSS und BSS-ähnlichen Enzymen. In rot hervorgehoben sind konservierte Cystein-Reste in den Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten von BSS und BSS-ähnlichen Enzymen, die an der Aktivierung von Toluol, oder anderen Kohlenwasserstoffen wie Alkane und 2-Methylnaphtalen zu den entsprechenden Succinat Addukten beteiligt sind. Die konservierten Cystein-Reste sind in ungewöhnlichen Motiven angeordnet, kommen aber für die Koordinierung von einem Eisen-Schwefel-Cluster pro Untereinheit in betracht. Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm Genedoc erstellt.

1.6.2 Modifikation der Cystein-Reste in gereinigter BSS

Die Modifikation der Cystein-Reste in gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase basiert auf einer Fluoreszenzmarkierung von Cystein-Resten, die an der Bindung von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt sind und einer Maskierung aller nicht-beteiligten Cystein-Reste. Nach Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE erfolgt die Detektion des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs durch UV-Bestrahlung.

Vor der Inkubation des Enzyms mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde gereinigte BSS mit Iodacetamid behandelt, um alle nicht an der Koordination von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligten Cystein-Reste zu maskieren. Um die Cystein-Reste, die für die Koordination der Eisen-Schwefel-Clustern verantwortlich sind, für den Fluoreszenzfarbstoff zugänglich zu machen, wurde das Protein in einem ersten Ansatz säurepräzipitiert und in einem zweiten Ansatz mit einem Chelator (EDTA) behandelt. Bei der Behandlung mit EDTA sollten dabei ausschließlich die an der Koordinierung der FeS-Cluster beteiligten Cystein-Reste zugänglich für den Fluoreszenzfarbstoff werden, ohne das Proteins vollständig zu denaturieren. Hingegen werden bei der Säurepräzipitation des Enzyms auch die Cystein-Reste für den Fluoreszenzfarbstoff zugänglich, die aufgrund ihrer Lage im Inneren des Proteins zuvor nicht für die Maskierung mit Iodacetamid zugänglich waren. Nach Auftrennung der BSS-Untereinheiten mittels SDS-PAGE wurde im UV-Licht in beiden Proben eine ähnliche Fluoreszenzintensität der beiden kleinen β- und γ-Untereinheiten beobachtet (Abb. 13A; Spur 1 und 3). Es zeigte sich jedoch eine deutlich schwächere Fluoreszenzintensität der großen α-Untereinheit der EDTA behandelten Probe im Vergleich zu dem säurepräzipitierten Protein (Abb. 13A; Spur 1 und 3). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Eisen-Schwefel-Cluster der BSS in den kleinen β- und γ-Untereinheiten lokalisiert sind und stützt damit die Vorhersage des Aminosäuresequenzvergleichs (Ergebnisse 1.6.1). Als Kontrolle wurde gereinigte BSS verwendet, die nicht mit dem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert wurde, jedoch genauso vorbehandelt wurde wie die säurepräzipitiert Probe (Abb. 13 Spur 2; Material und Methoden 13.).

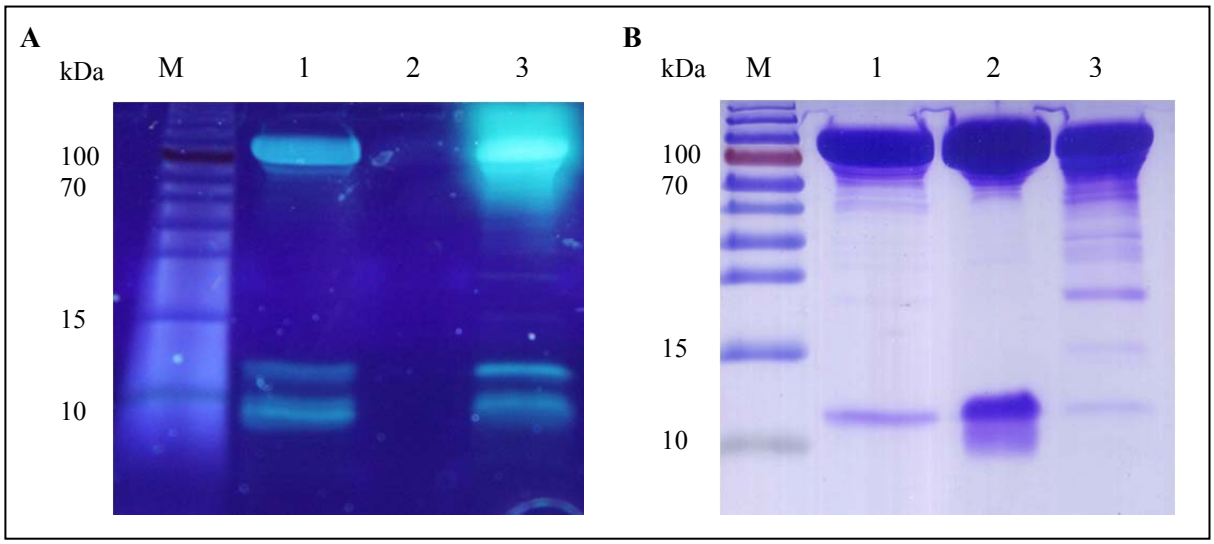


Abb. 13: Fluoreszenzdetektion modifizierter Cystein-Reste in gereinigter BSS. Gezeigt ist ein SDS-Gel gereinigter BSS vor der Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau unter UV-Bestrahlung (**A**) und nach der Coomassie-Färbung (**B**). Spur 1: Modifikation der zugänglichen Cystein-Reste mit Bromobimane nach Inkubation des Enzyms mit EDTA. Spur 2: Vorbehandeltes Enzym ohne Inkubation mit Bromobimane. Spur 3: Modifikation der zugänglichen Cystein-Reste mit Bromobimane nach Proteinpräzipitation mit 25 % Salzsäure. Die Fluoreszenzintensität der großen α-Untereinheit der EDTA behandelten Probe ist deutlich schwächer als die des säurepräzipitierten Proteins. Hingegen ist die Fluoreszenzintensität der kleinen β- und γ-Untereinheiten annähernd gleich. Aufgetragen sind zwischen 15 und 25 µg Protein. Zusätzliche Proteinbanden in Spur 3 des SDS-Gels sind Abbauprodukte der großen α-Untereinheit bedingt durch die Säurebehandlung des Proteins.

1.7 Erstellung eines Strukturmodells der BSS

Da die Kristallstruktur der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase noch nicht gelöst ist, wurden zwei Strukturmodell der α-Untereinheit der BSS mit Hilfe des Online-Tools „SWISS Model“ (Arnold *et al.*, 2006) vom Protein Modelling Server des Biozentrums Basel (http://swissmodel.expasy.org) generiert. Hierbei wird auf Basis der Aminosäure-Sequenzidentität nach Proteinen mit bereits gelöster Kristallstruktur als Template für die Modellierung einer theoretischen 3-D Struktur gesucht. Als Template wurde zum Einen die Struktur der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) und zum Andern die Struktur der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase (4-HPD) verwendet. Beide erstellten Strukturmodelle zeigten entsprechend des postulierten Reaktionsmechanismus eine sehr geringe Distanz der konservierten Aminosäuren Cys489 und Gly825 im aktiven Zentrum des Enzyms (Abb.14). Zudem ist in der Struktur eine offene Tasche in direkter Nähe zu dem vorhergesagten Thiyl-Radikal zu erkennen, die für eine potentielle Bindung des Substrats/Produkts in Frage kommt.

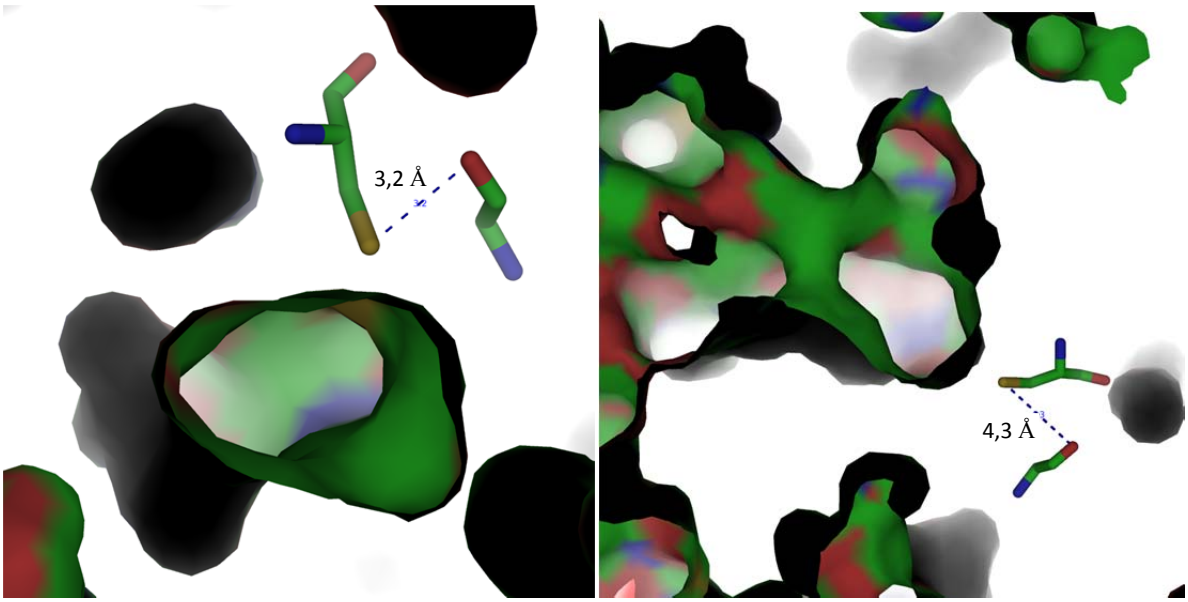


Abb. 14: Strukturmodell des aktiven Zentrums in der α-Untereinheit basierend auf den Strukturen der PFL (links) und 4-HPD (rechts). Die Aminosäuren Cys489 und Gly825 im aktiven Zentrum des Enzyms sind hervorgehoben. Die Distanz dieser Aminosäuren relativ zueinander betragen 3,2 Å (links) und 4,3 Å (rechts) und sind konsistent mit der postulierten Abstrahierung eines Wasserstoff-Atoms von der Thiol-Gruppe des Cys489 durch das Glycylradikal. Ebenfalls zu erkennen ist die große Tasche, die für eine Bindung des Substrat/Produkt in Frage kommt.

2. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

Nach Optimierung der Anzucht von *T. aromatica* Zellen und der Präparatation des Rohextrakts wurden sowohl biochemische als auch spektroskopische Untersuchungen an aktivierter BSS zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus durchgeführt. Die Untersuchungen wurden nicht mit gereinigtem Enzym durchgeführt, da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass eine Anreicherung nativer (*R*)-Benzylsuccinatsynthase mittels säulenchromatographischer Verfahren zu annähernd vollständigem Verlust der Enzymaktivität führt (Verfürth, 2005). Basierend auf einem DFT-Modell („Density function theoretical-model“) geht man bei der theoretischen Betrachtung des Reaktionsmechanismus davon aus, dass das Gleichgewicht der radikalischen Reaktionsintermediate auf der Seite des energetisch günstigen Glycylradikals liegt, welches damit eine Speicherform der reaktiven Radikalspezies darstellt (Himo, 2002). Der weitere Verlauf der Reaktion wird über verschiedene radikalische Zwischenstufen bis hin zum (*R*)-Benzylsuccinat postuliert (Einleitung, Abb. 2). Für die weitere Aufklärung des Reaktionsmechanismus der BSS wäre die Identifizierung radikalischer Intermediate sehr wertvoll, jedoch war es bisher nicht möglich diese aufgrund ihrer Kurzlebigkeit mit Hilfe spektroskopischer Methoden zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, durch Aktivitätsmessungen mit isotopenmarkierten Substraten/Kosubstaten und durch kinetischen Studien mit neuen und auch bereits bekannten Inhibitoren, den Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase weiter aufzuklären. Zudem wurde der Einfluss von isotopenmarkierten und nicht-markierten Substraten/Kosubstraten, sowie Inhibitoren und weiterer strukturell verwandter Effektor-Verbindungen auf das EPR-Spektrum der BSS im Rohextrakt von *T. aromatica* Zellen untersucht. Ziel war es dabei stabile radikalischer Intermediate im aktiven Zentrum der BSS zu generieren und diese EPR-spektroskopisch zu charakterisieren.

2.1 Biochemische Untersuchungen

2.1.1 Produktnachweis mittels RP-HPLC

Für die Bestimmung der Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase wurde ein diskontinuierlicher Enzymtest in *T. aromatica* Rohextrakt unter strikt anaeroben Bedingungen durchgeführt (Material und Methoden 8.1). Schon nach 1 Minute Reaktionszeit konnte mittels RP-HPLC Analyse ein Produkt detektiert werden, welches nach 10 Minuten eluierte und im UV/Vis-Spektrum für (*R*)-Benzylsuccinat charakteristische Absorptionsmaxima bei 210 nm und 258 nm zeigte (Abb. 15 und 16). Über den Anstieg der Signalintensität des Produktpeaks nach 2 Minuten und 4 Minuten Reaktionszeit konnte durch Integration der Peakflächen und einer anschließenden Normalisierung über den internen Standard (Benzoat), eine spezifische Enzymaktivitäten von 16-30 nmol/min*mg^{-1} (Protein) ermittelt werden. Die Daten sind konsistent mit den Enzymaktivitäten, die in früheren Arbeiten von K. Verfürth (2005) und M-L. Lippert (2009) erhalten wurden.

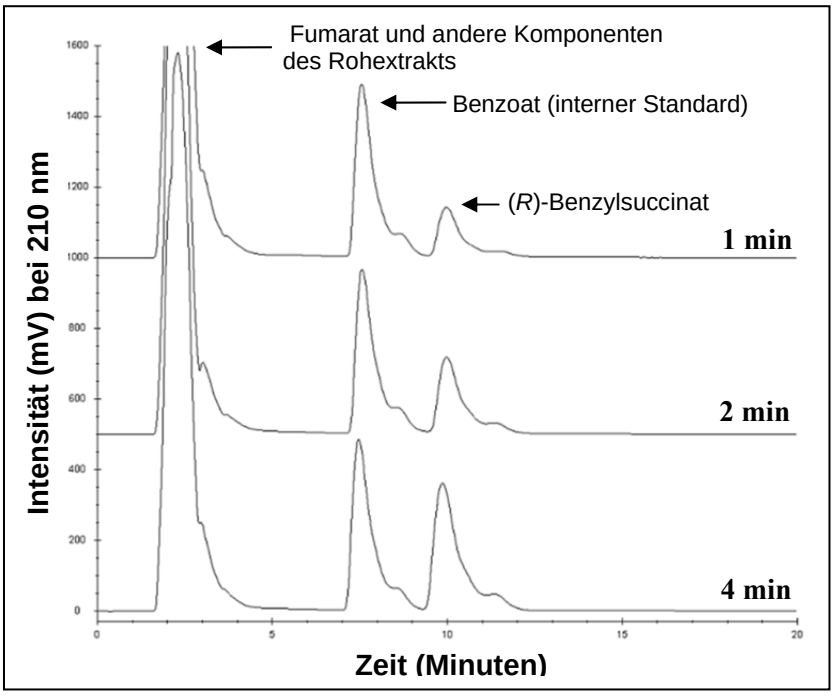


Abb. 15: Produktnachweis nativer (*R*)-Benzylsuccinat Synthase im Rohextrakt von auf Toluol gewachsenen *T. aromatica* Zellen. Die Abbildung zeigt die RP-HPLC Analyse eines Aktivitätstests, der zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von Säure (10 % TFA) gestoppt wurde. Die Abstopplösung enthielt zur exakten Quantifizierung des gebildeten Reaktionsprodukts ((*R*)-Benzylsuccinat) einen internen Standard (Benzoat). Die Analyse erfolgte unter isokratischen Bedingungen (Laufmittel: 20 % Acetonitril; 0,1 % TFA) bei einer Wellenlänge von 210 nm. (*R*)-Benzylsuccinat eluiert nach etwa 10 Minuten und ist bereits nach 1 Minute Reaktionszeit detektierbar. Ein Anstieg der Signalintensität ist nach 2 Minuten und 4 Minuten Reaktionszeit zu beobachten.

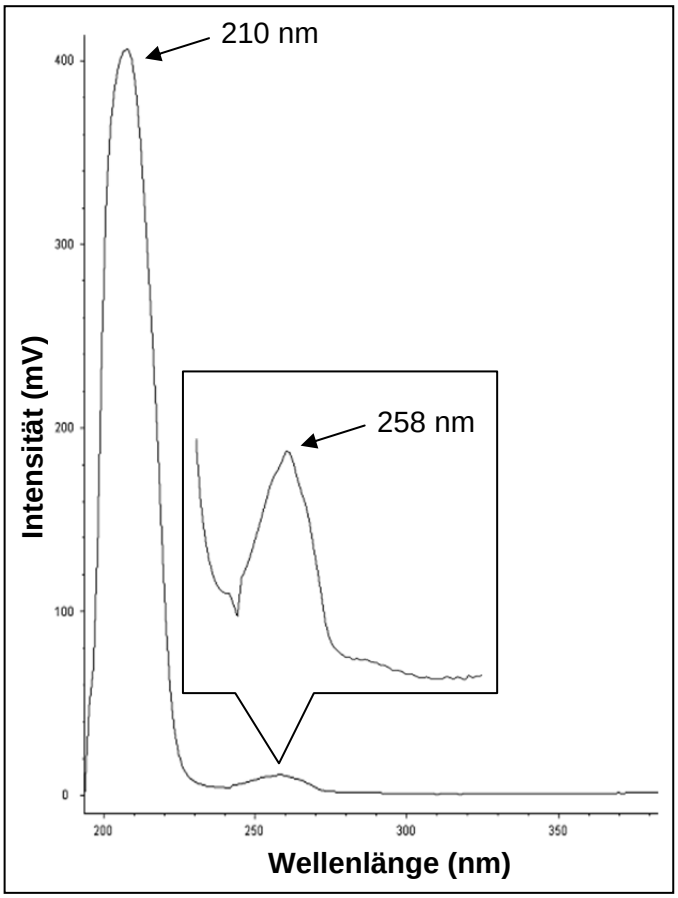


Abb. 16: UV/Vis Spektrum von (*R*)-Benzylsuccinat als Produkt der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase Reaktion. Die Abbildung zeigt das UV/Vis Spektrum des Produkts der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase nach 4 Minuten Reaktionszeit. Das Spektrum wurde im Intensitätsmaximum des Produktpeaks bei einer Retentionszeit von 10 Minuten mit Hilfe eines Dioden-Array Detektors aufgenommen. Das Spektrum weist für (*R*)-Benzylsuccinat charakteristische Maxima bei einer Wellenlänge von 210 nm und 258 nm auf.

2.1.2 Bestimmung der BSS-Enzymaktivität mit isotopenmarkierten Substraten

Um weitere Informationen bezüglich des Reaktionsmechanismus der BSS zu erhalten, wurden Aktivitätsmessungen mit aktivierter BSS in *T. aromatica* Rohextrakt unter Einsatz isotopenmarkierter Substrate durchgeführt (Material und Methoden 8.1). Dazu wurde die Umsetzung von isotopenmarkiertem [$^2H_8$]Toluol zusammen mit Fumarat, sowie Toluol zusammen mit isotopenmarkiertem [2,3-$^2H_2$]Fumarat analysiert. Für die anschließende Bestimmung eines Isotopeneffektes wurden die ermittelten Enzymaktivitäten in Relation zu der spezifischen Aktivität der BSS mit nicht-markierten Substraten gesetzt. Bei Verwendung von $^2[H]_8$Toluol als Substrat betrug die spezifische Enzymaktivität der BSS nur noch 25 % im Vergleich zu der Kontrolle mit nicht-markierten Substraten. Isotopenmarkiertes [2,3-$^2H_2$]Fumarat hatte hingegen keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. In Reaktionsansätzen mit isotopenmarkiertem [$^2H_8$]Toluol ist ein deutlicher Deuterium-Isotopeneffekt im Vergleich zu den Ansätzen mit nicht-markierten Substraten oder mit isotopenmarkiertem [2,3-$^2H_2$]Fumarat zu beobachten. Dieses Ergebnis belegt, dass die Abstrahierung eines Wasserstoffatoms von der Toluol-Methylgruppe der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. In Ansätzen mit Fumarat-Monomethylester als Kosubstrat wurde eine Reduktion der BSS Aktivität auf 56 % im Vergleich zu Fumarat beobachtet. Das gebildete Produkt eluierte in der HPLC-Analyse mit der gleichen Retentionszeit wie (*R*)-Benzylsuccinat. Dies lässt den Schluss zu, dass der Fumarat-Monomethylester zunächst im Zellextrakt hydrolysiert wird, bevor das entstandene Fumarat von der BSS umgesetzt werden kann.

Tab. 22: Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase unter Verwendung isotopenmarkierter Substrate

Substrate	Spezifische Aktivität (nmol/min*mg^{-1} (Protein))	Aktivität (%)
2 mM Toluol + 5 mM Fumarat	16	100
2 mM [$^2H_8$]Toluol + 5 mM Fumarat	4	26
2 mM Toluol + 5 mM [2,3-$^2H_2$]Fumarat	18	110

2.1.3 Inaktivierung der BSS durch Benzylalkohol und Benzylfumarat/Benzylmaleat

Um den Reaktionsmechanismus der BSS weiter aufzuklären wurden kinetische Untersuchungen mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt. Dazu wurde der bereits bekannte substratanaloge Inhibitor Benzylalkohol verwendet und zudem eine Mischung aus Benzylfumarat (27 %) und Benzylmaleat (73 %), welches im Rahmen dieser Arbeit erstmals als produktanaloger Inhibitor identifiziert wurde. Letzteres wurde im Rahmen einer Kooperation von der AG von Prof. Golding (Newcastle, England) chemisch synthetisiert. Als Grundlage der kinetischen Untersuchungen wurde zunächst die

Abhängigkeit der Enzymaktivität von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt (Abb. 17). Es zeigte sich, dass die BSS sehr empfindlich sowohl auf die Inkubation mit Benzylalkohol als auch Benzylfumarat/Benzylmaleat reagierte. Während bereits mit 14 µM Benzylalkohol eine Verringerung der Enzymaktivität um 80 % verzeichnet wurde, wurde die gleiche Inhibition erst bei einer Konzentration von 1,7 mM Benzylfumarat/Benzylmaleat erreicht. Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurden jeweils drei geeignete Inhibitorkonzentrationen für kinetische Untersuchungen gewählt.

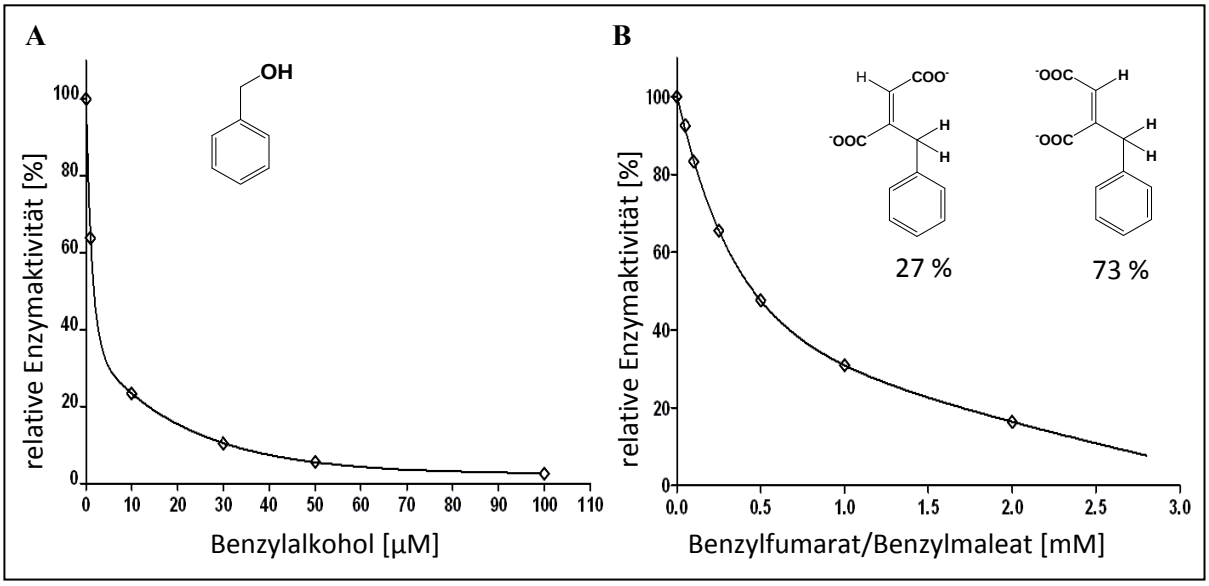


Abb. 17: Auswirkung von Benzylalkohol und Benzylfumarat/Benzylmale auf die Enzymaktivität der BSS im Rohextrakt von *T. aromatica*. Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der relativen Enzymaktivität der BSS von verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren Benzylalkohol (**A**) und Benzylfumarat/Benzylmaleat (**B**). Die absolute Aktivität der BSS ohne Zugabe der Inhibitoren betrug 27 (**A**) bzw. 30 (**B**) nmol/min*mg^{-1} (Protein).

2.1.4 Inhibitionskinetik mit Benzylalkohol und Benzylfumarat/Benzylmaleat

Ziel der kinetischen Untersuchungen ist die Bestimmung des jeweiligen Hemmtyps der Inhibitoren Benzylalkohol und Benzylfumarat/Benzylmaleat. Dazu wurden die Inhibitoren in drei Konzentrationen (1µM, 5µM, 20µM für Benzylalkohol; 0,25 mM, 0,5 mM, 1,5 mM für Benzylfumarat/Benzylmaleat) eingesetzt und die BSS-Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen Toluol (2 mM; 1 mM; 0,5 mM; 0,2 mM; 0,1 mM) und gleichbleibender Fumaratkonzentration (5 mM) bestimmt. Die ermittelten Enzymaktivitäten wurden graphisch mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4.0 dargestellt.

Anhand einer Kurvenanpassung und des hyperbolen Verlaufs der Sättigungskurven ist zu erkennen, dass die untersuchten Inhibitionskinetiken einer normalen Michaelis-Menten Kinetik folgen (Abb. 18A und 19A). Die ermittelten Daten zu jeder Inhibitionskinetik wurden mit Gleichungen

verschiedener Inhibitionstypen mit Hilfe des Programms Leonora 1.0 (Cornish-Bowden, 1995) gefittet. Auf Basis dieser Auswertung wurde entschieden um welchen Hemmtyp es sich bei den genannten Inhibitoren handelt. Eine kompetitive Hemmung des Enzyms liegt vor, wenn der Inhibitor ausschließlich an das Enzym, und nicht an den Enzym-Substrat-Komplex bindet. Bei steigenden Inhibitorkonzentrationen bleibt die maximale Geschwindigkeit der Reaktion (V_{max}) unverändert, während der apparente K_m größer wird. Die Geraden der Lineweaver-Burk Darstellung schneiden sich bei diesem Hemmtyp auf der Ordinate des Graphen in einem Punkt. Bei der gemischten Hemmung bindet der Inhibitor sowohl an das freie Enzym, als auch an den Enzym-Substrat Komplex. Dies hat zur Folge, dass bei steigender Inhibitorkonzentration V_{max} kleiner und der apparente K_m Wert größer wird. Ein Schnittpunkt der Geraden im zweiten Quadranten des Lineweaver-Burk Plots bedeutet, dass die Inhibition sowohl kompetitive, als auch nicht-kompetitive Anteile enthält. Ein Schnittpunkt im dritten Quadranten des Graphen deutet hingegen auf Anteile einer nicht-kompetitive und unkompetitiven Hemmung hin. Eine reine unkompetitive Hemmung hingegen stellt die Umkehr einer kompetitiven Hemmung dar, bei der der Inhibitor ausschließlich an den Enzym-Substratkomplex bindet und nicht an das freie Enzym. Die Geraden in der Lineweaver-Burk Darstellung zeigen im Falle einer unkompetitiven Inhibition einen parallelen Verlauf ohne einen gemeinsamen Schnittpunkt.

Die Auswertung der Daten zeigte, dass es sich bei der Benzylalkohol-Hemmung um eine gemischte Inhibition handelt (Abb. 18). Die Inhibitionskonstanten betragen K_{ic} = 3,0 ± 0,3 mM und K_{iu} = 4,60 ± 0,80 mM. Der apparente K_m-Wert ändert sich mit steigender Inhibitorkonzentration nicht und beträgt 1,20 ± 0,15 mM. Die maximale Geschwindigeit (V_{max}) der Reaktion fällt hingegen von 20,85 ± 1,80 nmol/min*mg^{-1} (Protein) ohne Inhibitor, auf 4,70 ± 0,35 nmol/min*mg^{-1} (Protein) bei der höchsten Benzylalkoholkonzentration von 20 µM (Abb. 18A). Der Schnittpunkt der Geraden des Lineweaver-Burk Plots liegt im zweiten Quadranten des Graphen (Abb. 18B).
Bei Benzylfumarat/Benzylmaleat handelt es sich hingegen um eine unkompetititve Inhibition (Abb. 19). Die Inhibitionskonstante K_{iu} beträgt 0,30 ± 0,05 mM. Der apparente K_m-Wert bleibt bei steigender Inhibitorkonzentartion konstant und beträgt 1,0 ± 0,1 mM. Die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) der Reaktion fällt von 44,50 ± 3,80 nmol/min*mg^{-1} (Protein) ohne Inhibitor auf 7,80 ± 0,70 nmol/min*mg^{-1} (Protein) bei der höchsten Inhibitorkonzentration (Abb. 19A). Die Geraden der Lineweaver-Burk Darstellung zeigen einen parallelen Verlauf ohne gemeinsamen Schnittpunkt (Abb. 19B). Die daraus resultierenden Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus der BSS werden im nachfolgenden Kapitel erörtert (siehe Diskussion 4.).

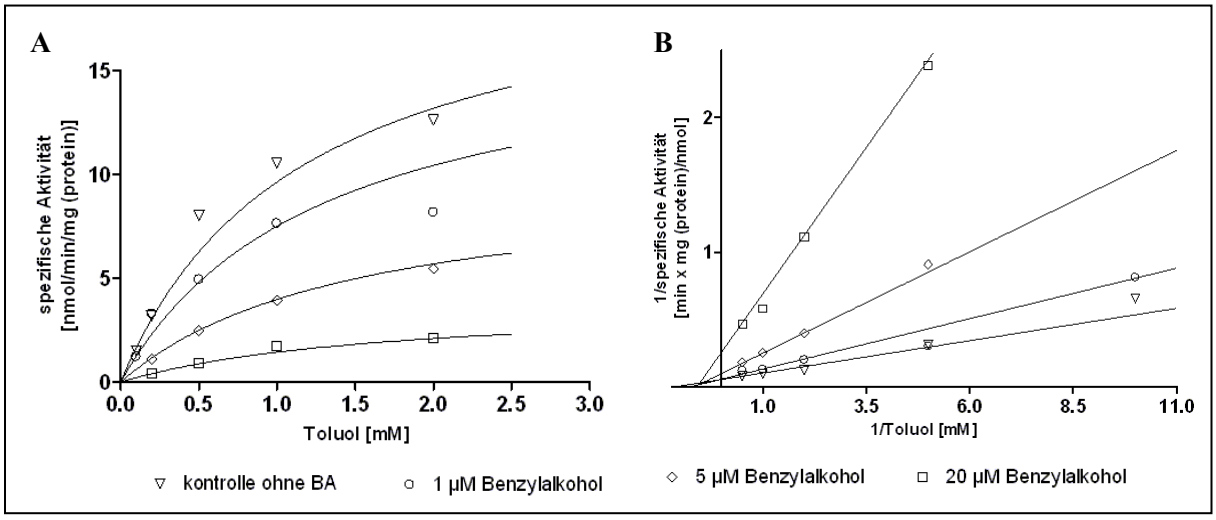


Abb. 18: Kinetische Untersuchungen der BSS-Reaktion in Abhängigkeit von Benzylalkohol. (**A**) Michaelis-Menten-Darstellung der BSS-Aktivität nach Zugabe von Benzylalkohol (1µM, 5 µM, 20 µM). (**B**) Die Doppelt-reziproke Darstellung (Lineweaver-Burk-Plot) der gemessenen Aktivitäten. Die Parameter zur Erstellung der eingezeichneten Graphen wurden mit Hilfe der Software „Leonora" für eine gemischt kompetitive Hemmung ermittelt und auch für die Kurvenanpassung in (**A**) verwendet. Eingesetzte Toluolkonzentration: 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,2 mM, 0,1 mM. Konzentration Fumarat-Kosubstrat: 5 mM.

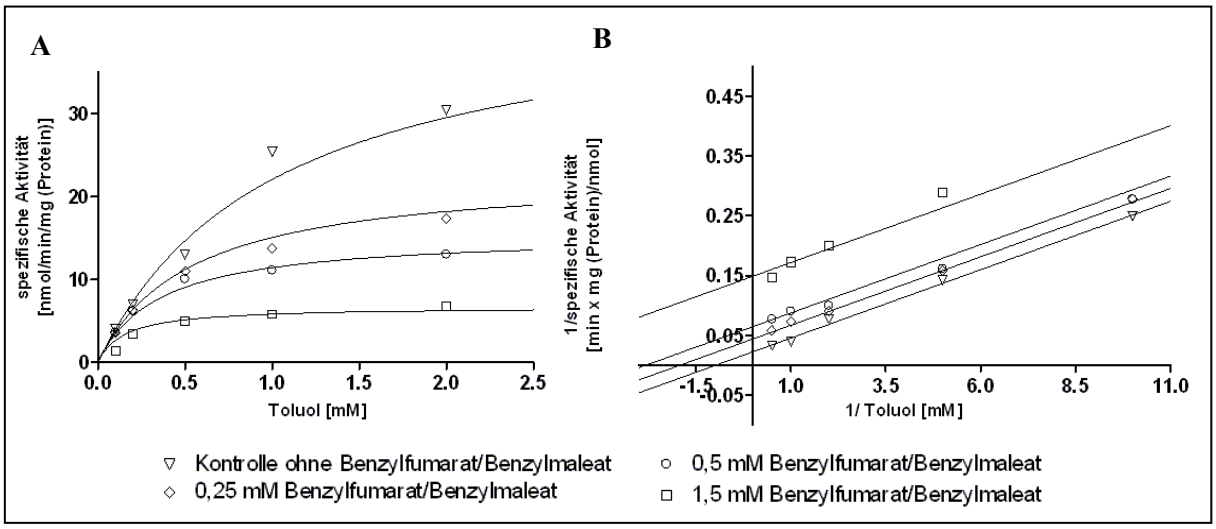


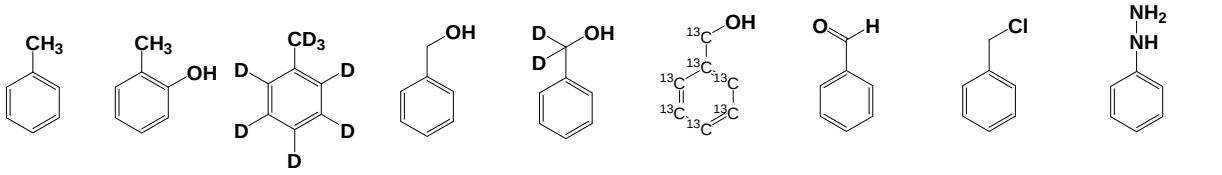
Abb. 19: Kinetische Untersuchungen der BSS-Reaktion in Abhängigkeit von Benzylfumarat/Benzylmaleat. (**A**) Michaelis-Menten-Darstellung der BSS-Aktivität nach Zugabe von Benzylfumarat/Benzylmaleat (0,25 mM, 0,5 mM, 1,5 mM). (**B**) Die Doppelt-reziproke Darstellung (Lineweaver-Burk-Plot) der gemessenen Aktivitäten. Die Parameter zur Erstellung der eingezeichneten Graphen wurden mit Hilfe der Software „Leonora" für eine unkompetitive Hemmung ermittelt und auch für die Kurvenanpassung in (**A**) verwendet. Eingesetzte Toluolkonzentration: 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,2 mM, 0,1 mM. Konzentration Fumarat-Kosubstrat: 5 mM.

2.2 EPR-spektroskopische Analyse von *T. aromatica* Rohextrakt

Alle Glycylradikalenzyme lassen sich anhand ihres charakteristischen EPR-Spektrums eindeutig identifizieren. Die charakteristischen Eigenschaften des Glycylradikalspektrums beruhen auf der Aufspaltung des EPR-Signals bedingt durch die Kopplung des ungepaarten Elektrons mit dem Kern des Wasserstoff-Atoms am C2 des Glycylradikals. Die Detektion eines Glycylradikalsignals im Rohextrakt von *T. aromatica* wird mit dem Vorhandensein aktivierter BSS korreliert. Die Signalintensität erlaubt die Konzentration der aktivierten BSS zu bestimmen. Um die mögliche Entstehung anderer radikalischer Intermediate zu untersuchen, wurde Rohextrakt mit verschiedenen isotopenmarkierten und nicht-markierten Substraten/Kosubstraten, Inhibitoren und weiteren potentiellen Effektorverbindungen inkubiert (Abb. 20). Die Auswahl der potentiellen Effektor-Verbindungen wurde aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu dem Substrat und Kosubstrat der BSS-Reaktion getroffen.

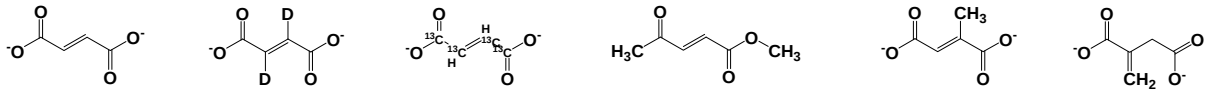
Isotopenmarkierte und nicht-markierte Substrate/Substratanaloga

Toluol



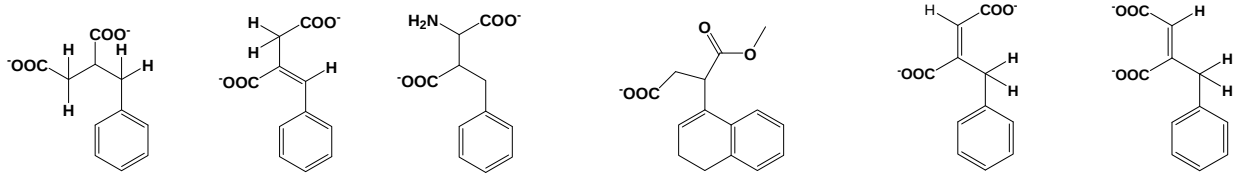
Toluol | *o*-Cresol | [$^{2}H_8$]Toluol | **Benzylalkohol** | **[$^{2}H_2$]Benzyl-alkohol** | **[$^{13}C_7$]Benzyl-alkohol** | **Benzaldehyd** | **Benzylchlorid** | **Phenylhydrazin**

Fumarat



Fumarat | [2,3-$^{2}H_2$]Fumarat | [1,2,3,4-$^{13}C_4$] Fumarat | Methyl-trans-4-oxo-2-Pentenoat | Mesaconat | Itaconat

Produkte/Produktanaloga



Benzylsuccinat | Phenylitaconat | L-β -Threo-Benzyl-Aspartat | 2-(3,4-dihydro-naphtalen-1yl)-Succinat 1-Methylester | **Benzylfumarat** | **Benzylmaleat**

Abb. 20: Verwendete potentielle Effektor-Verbindungen der BSS. Die dargestellten Inhibitoren der BSS (rot) sowie weitere potentielle Effektor-Verbindungen (schwarz) wurden mit Rohextrakt von anaerob auf Toluol gewachsene *T. aromatica* Zellen inkubiert und EPR-spektroskopisch analysiert.

Die EPR-spektroskopische Analyse von *T. aromatica* Rohextrakten nach Inkubation mit verschiedenen isotopenmarkierten und nicht-markierten Substraten/Kosubstraten der BSS bewirkte weder eine Änderungen der Amplitude noch der Form des Glycylradikalspektrums (Abb. 21).

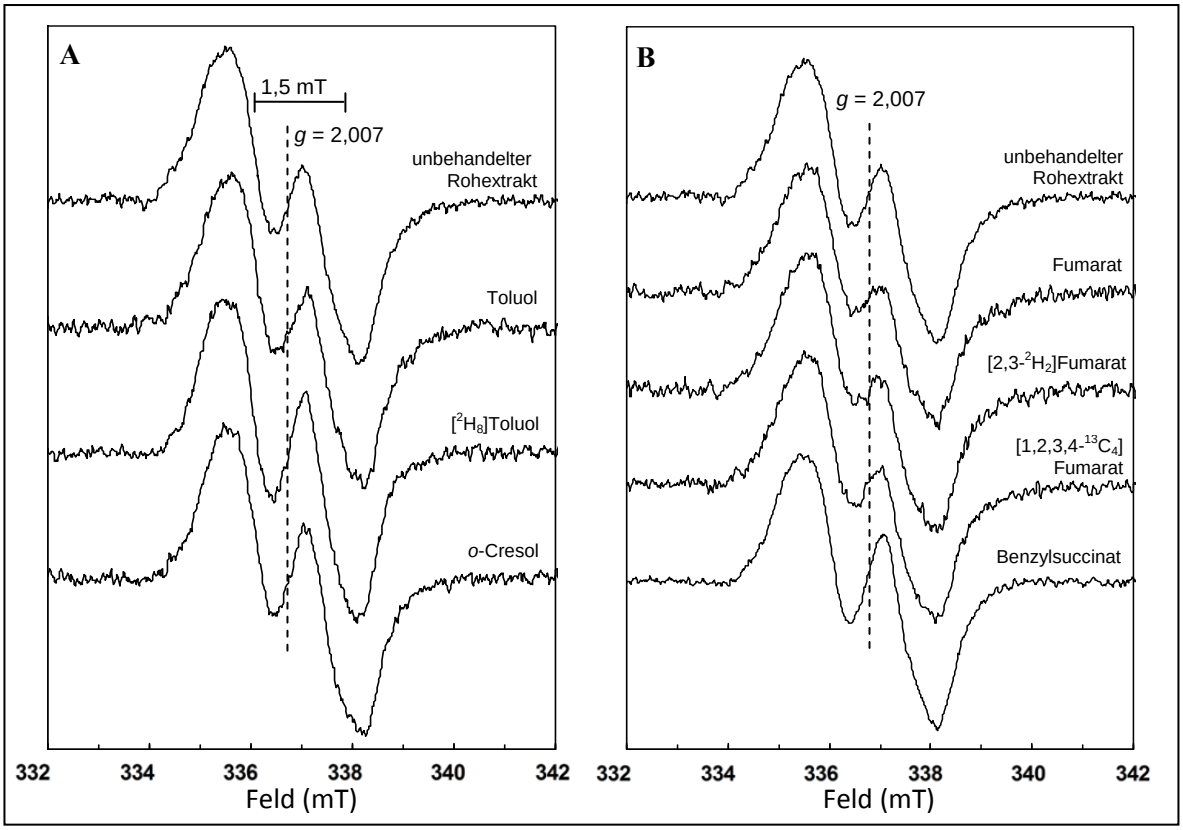


Abb. 21: Glycylradikalsignal aktivierter BSS im Rohextrakt von *T. aromatica*. Die Abbildung zeigt das charakteristische Spektrum eines Glycylradikals. Das Signal wurde in verschiedenen Rohextrakten von *T. aromatica* Zellen vor und nach Inkubation mit 2 mM isotopenmarkierten und nicht-markierten Substraten (Toluol, [$^2H_8$]Toluol, *o*-Cresol und Benzylsuccinat) und Kosubstraten ([2,3-$^2H_2$]Fumarat, [1,2,3,4-$^{13}C_4$]Fumarat) detektiert. Der *g*-Wert sowie die Kopplungskonstante des Glycylradikalspektrums sind angezeigt. Messbedingungen: Temperatur 70 K, Mikrowellenleistung 13 µW, Mikrowellenfrequenz 9.454 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT. Proteinkonzentration des Zellextrakts: ~ 60 – 80 mg/ml. BSS-Aktivität: 16-25 nmol/min*mg^{-1} (Protein).

2.2.1 Einfluss bekannter Inhibitoren auf das Glycylradikalspektrum der BSS

T. aromatica Rohextrakte wurden mit bekannten Inhibitoren der BSS inkubiert und anschließend in Zusammenarbeit mit PD Dr. Antonio Pierik EPR-spektroskopisch analysiert, ob sich das Glycylradikal-Spektrum verändert hat und/oder neue radikalische Spezies gebildet wurden. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Benzylalkohol, Benzaldehyd und Phenylhydrazin in einer Endkonzentration von 3 mM die Bildung von Benzylsuccinat vollständig inhibieren (Verfürth, 2005). Eine Wiederholung der Aktivitätsmessungen bestätigte die inhibitorische Wirkung der Verbindungen und zeigte zudem, dass eine vollständige Inhibition der BSS bereits in einer Endkonzentration von 2 mM erreicht wird. Benzylchlorid zeigte in einer in einer Konzentration von 3 mM keine vollständige Inhibition der BSS (Verfürth, 2005), zählt jedoch im Vergleich zu anderen Effektorverbindungen zu den stärksten bekannten Inhibitoren des Enzyms (Verfürth, 2005) und wurde deshalb ebenfalls für dieses Experiment ausgewählt.

Der Einsatz von Benzylchlorid bewirkte entgegen den Erwartungen der biochemischen Untersuchungen keine signifikante Änderung des charakteristischen Glycylradikalspektrums der BSS (Abb. 22A II). Hingegen war nach Inkubation von *T. aromatica* Rohextrakt mit 2 mM Benzylalkohol bzw. Benzaldehyd eine deutliche Änderung der Form des Glycylradikalspektrums erkennbar. Im Falle von Benzaldehyd wies das resultierende Spektrum keine ausgeprägte Merkmale einer neuen organischen Radikalspezies auf, da der Anteil des verbliebenen Glycylradikalsignals überwiegt (Abb. 22A III). Im Spektrum der Probe mit Benzylalkohol wurde das Glycylradikalsignal fast vollständig in eine neue Radikalspezies umgewandelt und kann aufgrund des *g*-Wertes einem kohlenstoff-basierten organischen Radikal zugeordnet werden. Da keine Stickstoffatome im Benzylalkohol vorliegen, liefert die Spaltung der Signale und Kopplungskonstanten von 1,2-1,5 mT Indizien für zwei bis drei stark koppelnde Protonen (Abb. 22A IV). Spinquantifizierungen belegten zudem die vollständige Umwandlung des Glycylradikalsignals in die neue organische Radikalspezies. Aufgrund der unvollständigen Umwandlung des Glycylradikalsignals durch Benzaldehyd wurde auf weitere Experimente verzichtet. Für die nähere Charakterisierung der neuen Radikalspezies wurde deswegen mit Benzylalkohol weitergearbeitet.

Zunächst wurden die Inkubationszeit und die benötigte Endkonzentration für eine maximale Bildung der neuen Radikalspezies optimiert (Abb. 23AB). Das beste Ergebnis wurde bereits bei einer Konzentration von 2 mM Benzylalkohol und einer Inkubationszeit von 8 Minuten erzielt. In weiteren Studien wurde die Abhängigkeit der durch Benzylalkohol gebildeten Radikalspezies in Anwesenheit von Fumarat untersucht. Die EPR-Signale wiesen nach Inkubation des Rohextrakts mit Benzylalkohol alleine oder zusammen mit Fumarat keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 22B I/II). Auch die Verwendung von [$^2H_2$]Benzylalkohol zusammen mit Fumarat hatte keinen Einfluss auf das Benzylalkohol induzierte Radikal der BSS (Abb. 22B III). Hingegen bewirkte der Einsatz von

Benzylalkohol zusammen mit [2,3-$^{2}H_2$]Fumarat den vollständigen Verlust der Kopplung mit Protonen in der organischen Radikalspezies und produzierte ein fast isotropes Signal ohne Protonenkopplung (Abb. 22B IV). Weiterhin wurde eine Verbreiterung des EPR-Spektrums nach Inkubation von Rohextrakt mit [$^{13}C_7$]Benzylalkohol zusammen mit Fumarat (Abb. 22B V) festgestellt. Dieses Verhalten zeigt deutlich die Abhängigkeit der Radikalbildung von der Reaktion des Benzylalkohols mit Fumarat. Zudem legt das EPR-Spektrum des Rohextrakts nach Inkubation mit Benzylalkohol ohne zusätzliche Zugabe von Fumarat nahe, dass bereits die im Zellextrakt vorliegende Menge Fumarat (Biegert *et al.,* 1996) ausreichend ist um zusammen mit Benzylalkohol die neue Radikalspezies vollständig auszubilden.

Die Inkubation von Rohextrakt mit Phenylhydrazin bewirkte im Vergleich zu den zuvor genannten Inhibitoren ebenfalls eine starke Abnahme des Glycylradikalsignals, ohne eine neue Radikalspezies zu produzieren. Das resultierende Spektrum weist neben geringen Anteilen verbleibenden Glycylradikalsignals nur noch Hintergrund-Signale auf, die neben dem Glycylradikalsignal der BSS ebenfalls im *T. aromatica* Rohextrakt zu finden sind, vergleichbar mit den EPR-Signalen in Rohextrakten von auf Benzoat gewachsene Zellen (Verfürth *et al.*, 2004; Abb. 22A V).

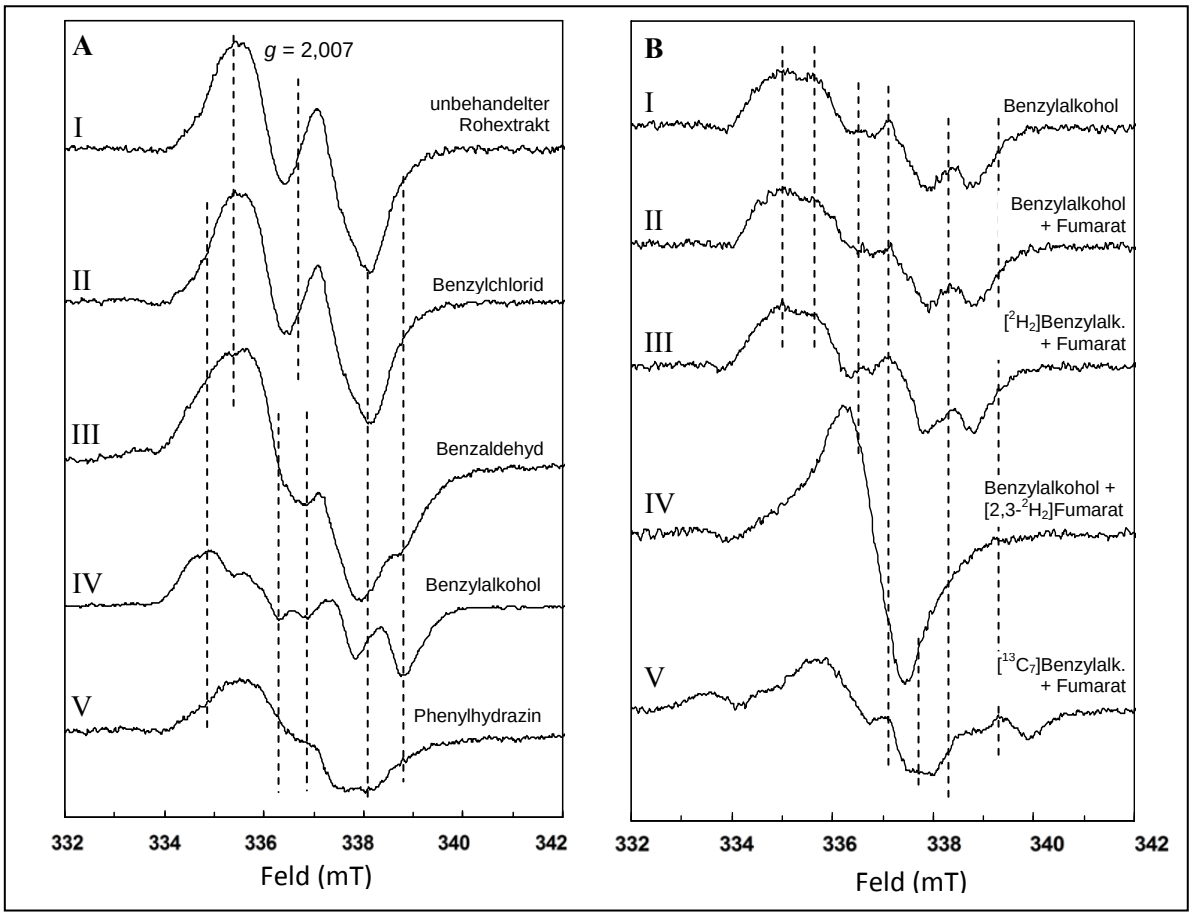


Abb. 22: Einfluss von bekannten Inhibitoren auf das Glycylradikalspektrum der BSS. Proben von *T. aromatica* Rohextrakt wurden für 20 Minuten mit bekannten Inhibitoren inkubiert und anschließend EPR-spektroskopisch analysiert. Messbedingungen: Temperatur 70 K, Mikrowellenleistung 13 µW,

Mikrowellenfrequenz 9.454 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT. Proteinkonzentration des Rohextrakts: ~ 80 mg/ml. BSS-Aktivität: 20-25 nmol/min*mg^{-1} (Protein).

22A: Vergleich der EPR-Spektren des unbehandelten Rohextrakts (I) und nach Inkubation mit 2 mM Benzylchlorid (II), Benzaldehyd (III), Benzylalkohol (IV) bzw. Phenylhydrazin (V). Die EPR-Spektren von Benzaldehyd und Benzylalkohol behandeltem Rohextrakt deuten auf die Bildung eines kohlenstoff-basierten organischen Radikals hin. Benzylchlorid hatte keinen Einfluss auf das Glycylradikalspektrum der BSS, hingegen bewirkte Phenylhydrazin eine starke Verringerung des Glycylradikalsignals.

22B: Vergleich der EPR-Spektren nach Inkubation des Rohextrakts mit 2 mM Benzylalkohol allein (I) und zusammen mit 5 mM Fumarat (II) bzw. 5 mM isotopenmarkiertem [2,3-$^{2}H_2$]Fumarat (IV). Zusätzlich wurde Rohextrakt mit 2 mM isotopenmarkiertem [$^{2}H_2$]Benzylalkohol (III) bzw. [$^{13}C_7$]Benzylalkohol (V) zusammen mit 5 mM Fumarat inkubiert. Die Spektren IV und V zeigen den Einfluss der Isotopenmarkierungen in den eingesetzten Verbindungen.

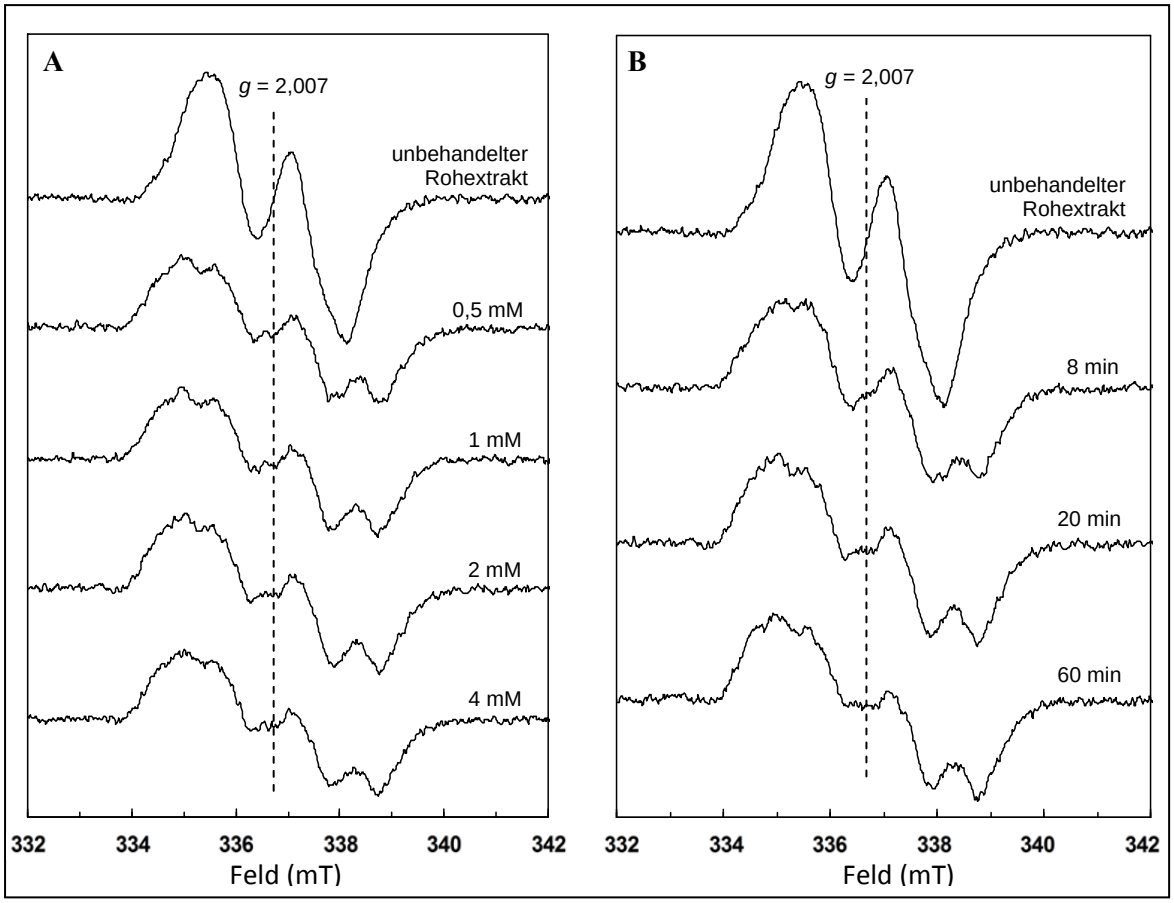


Abb. 23: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Änderung des Glycylradikalsignals durch Benzylalkohol. Proben von *T. aromatica* Rohextrakt wurden mit unterschiedlichen Benzylalkoholkonzentrationen (0,5, 1, 2, 4 mM) für 20 Minuten inkubiert **(A)** sowie mit 2 mM Benzylalkohol inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten eingefroren (8, 20, 60 Minuten) **(B)**. Anschließend wurden die Proben EPR-spektroskopisch analysiert. Als Kontrolle diente unbehandelter *T. aromatica* Rohextrakt. Messbedingungen: Temperatur 70 K, Mikrowellenleistung 13 µW, Mikrowellenfrequenz 9.454 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT. Proteinkonzentration des Rohextrakts: ~ 80 mg/ml. BSS-Aktivität: 20-25 nmol/min*mg^{-1} (Protein).

2.2.2 Einfluss weiterer Inhibitoren auf das Glycylradikalspektrum der BSS

Für die Generierung stabiler radikalischer Intermediate wurde nach weiteren Verbindungen gesucht, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu dem Substrat/Kosubstrat oder dem Produkt der BSS Reaktion aufweisen. Zu den untersuchten strukturanalogen Substraten und Produkten zählen Phenylitaconat, Benzylfumarat/Benzylmaleat und Itaconat. Der Einfluss dieser Verbindungen auf die BSS wurde sowohl biochemisch in Aktivitätstests als auch EPR-spektrokopisch in Zusammenarbeit mit PD Dr. Antonio Pierik analysiert.

Zunächst wurde der Effekt von (*E*)-Phenylitaconat und (*Z*)-Phenylitaconat untersucht, die jedoch weder einen Einfluss auf das Glycylradikalspektrum (Abb. 24A I), noch auf die BSS-Aktivität hatte. Neu synthetisiertes (*E*)-Phenylitaconat, welches nicht einem zusätzlichen chromatographischen Reinigungsschritt unterzogen wurde, bewirkte hingegen eine signifikante Abnahme des Glycylradikalsignals aktivierter BSS unter Bildung einer neuen Radikalspezies (Abb. 24A III). Das resultierende EPR-Spektrum weist charakteristische Merkmale eines kohlenstoff-basierten organischen Radikals auf, gekoppelt mit zwei Protonen (Abb. 24A III). In diesem Fall sind die spektralen Eigenschaften der organischen Radikalspezies deutlich ausgeprägter. Nach partieller Substraktion des Hintergrundspektrums wofür die Phenylhydrazin-behandelte Probe benutzt wurde, lies sich dieses Spektrum mit den Kopplungskonstanten 1,5 und 1,2 mT, einem *g*-Wert von 2,0059 und einer Linienbreite von 0,58 mT simulieren (Abb. 24A IV). Die Verbindung, welche ursächlich für die Bildung dieser organischen Radikalspezies ist, konnte bisher noch nicht identifiziert werden. In HPLC-Analysen der eingesetzten Phenylitaconat-Probe ist jedoch deutlich eine Kontamination erkennbar (Abb. 25). Aufgrund der Phenylitaconatsynthese wurde zunächst davon ausgegangen, dass es sich bei der Kontamination um Benzylfumarat und/oder Benzylmaleat handelt, welches bereits biochemisch als Inhibitor der BSS-Reaktion identifiziert wurde (Ergebnisse 2.1.3 und 2.1.4) Der Zusatz einer Benzylfumarat/Benzylmaleat–Mischung (MD-59-1; NMR-Spektrum siehe Anhang Abb. 39) hatte jedoch entgegen den Erwartungen der DFT-Berechnungen (siehe Diskussion) keinen Einfluss auf das Glycylradikalspektrum der BSS (Abb. 24A II). Die Kontamination in der Phenylitaconatpräparation, die etwa 5 % der Gesamtmasse ausmacht, konnte als Benzoat identifiziert werden (Abb. 25). Benzoat ist bereits als Verunreinigung des in der Phenylitaconat-Synthese verwendeten Ausgangsprodukts, Benzaldehyd, vorhanden. Es ist zwar unwahrscheinlich, dass Benzoat das EPR-Spektrum beeinflusst, jedoch werden weitere Versuche eindeutig Aufschluss über den Einfluss von Benzoat liefern. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass andere Bestandteile der Phenylitaconatprobe, die nicht durch RP-HPLC mittels UV/Vis-Detektion identifiziert werden konnten, die Änderung des EPR-Signals bewirken.

Nach Inkubation des Rohextrakts mit Itaconat ist nur ein geringfügiger Effekt auf das Glycylradikaspektrum erkennbar (Abb. 24B II). Das Spektrum eines mit zwei Protonen gekoppelten organischen Radikals wird erst nach Subtraktion des Glycylradikalspektrums erkennbar

(Abb. 24B III). Die geringe Signalintensität lies keine weiteren Experimente zur näheren Charakterisieung der Radikalspezies mit Hilfe von isotopenmarkiertem Itaconat zu.

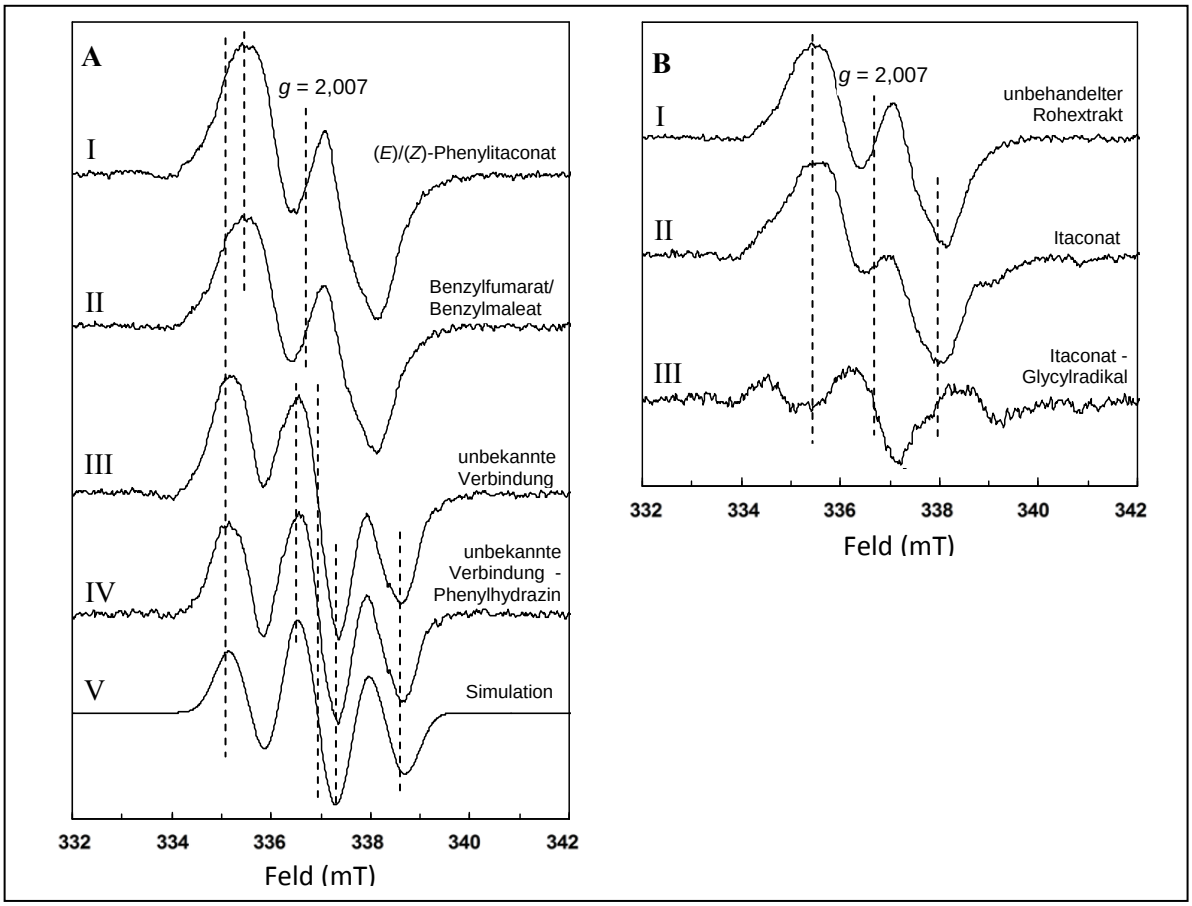


Abb. 24: Einfluss von Benzylfumarat/Benzylmaleat und Itaconat auf das EPR-Spektrum der BSS. Proben von *T. aromatica* Rohextrakt wurden für 20 Minuten mit unterschiedlichen Effektor-Verbindungen inkubiert und anschließend EPR-spektroskopisch analysiert. Messbedingungen: Temperatur 70 K, Mikrowellenleistung 13 µW, Mikrowellenfrequenz 9.454 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT. Proteinkonzentration des Rohextrakts: ~ 80 mg/ml. BSS-Aktivität: 20-25 nmol/min*mg^{-1} (Protein).

24A: Vergleich der EPR-Spektren des behandelten Rohextrakts mit (*E*)/(*Z*)-Phenylitaconat (I), mit 2 mM einer Mischung aus Benzylfumarat/Benzylmaleat (II) und der kontaminierten Phenylitaconatprobe (III). Spektrum IV zeigt Spektrum III nach partieller Subtraktion des Phenylhydrazin Spektrums aus Abb. 22. Die Simulation eines vollständig ausgeprägten kohlenstoff-basierten organischen Radikals ist in Spektrum V gezeigt.

24B: Vergleich der EPR-Spektren des unbehandelten Rohextrakts (I) und nach Inkubation mit 10 mM Itaconat (II). Spektrum III zeigt das Spektrum von Itaconat behandeltem Rohextrakt nach Subtraktion des Glycylradikalsignals.

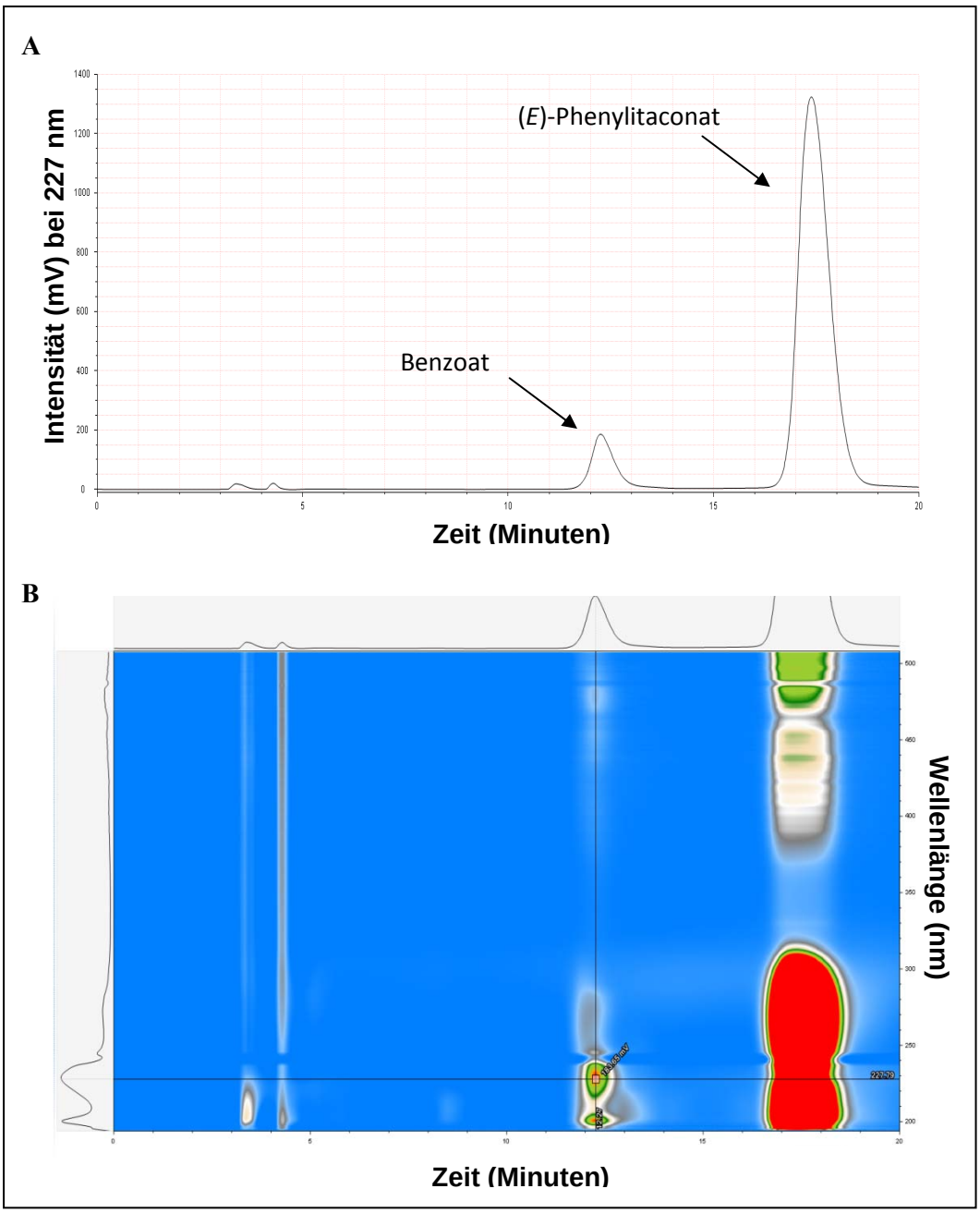


Abb. 25 HPLC-Analyse der kontaminierten Phenylitaconatprobe. Synthetisiertes Phenylitaconat (4 mM), welches einen Effekt auf das Glycylradikalspektrum der BSS zeigte, wurde mittels RP-HPLC unter isokratischen Bedingungen (20 % Acetonitril; 0,1 % TFA) durch UV/Vis-Detektion bei 227 nm analysiert. **Chromatogramm (A):** Phenylitaconat eluiert nach etwa 17,5 Minuten und stellt die Hauptkomponente der Probe dar. Zusätzlich ist eine Kontamination mit Benzoat zu sehen, das nach etwa 12,5 Minuten eluiert. **DAD-Spektrum (B):** UV/Vis-Spektrum der unbekannten Verbindung.

Ob ein Einfluss der getesteten Verbindungen auf das Glycylradikalspektrum beobachtet wurde, ist noch einmal in Tab. 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Einfluss von Inhibitoren und potentiellen Effektor-Verbindungen auf das Glycylradikalsignal der BSS

Effektor-Verbindung	Änderung des Glycylradikalsignals	Bildung neuer Spezies
Toluol	=	-
o-Cresol	=	-
[$^{2}H_{8}$]Toluol	=	-
Benzaldehyd	↓	+
Fumarat	=	-
[2,3-$^{2}H_{2}$]Fumarat	=	-
[1,2,3,4-$^{13}C_{4}$]Fumarat	=	-
Toluol + Fumarat	=	-
Toluol + [2,3-$^{2}H_{2}$]Fumarat	=	-
Benzylalkohol	↓	+ +
Benzylalkohol + Fumarat	↓	+ +
Benzylalkohol + [2,3-$^{2}H_{2}$]Fumarat	↓	+ + +
[$^{13}C_{7}$]Benzylalkohol + Fumarat	↓	+ +
[$^{2}H_{2}$]Benzylalkohol + Fumarat	↓	+ +
Mesaconat	=	-
Methyl-trans-4-oxo-2-Pentenoat	↓	+
Benzylsuccinat	=	-
(*E*)- und (*Z*)-Phenylitaconat	=	-
Unbekannte Verbindnung in einer Phenylitaconat Probe	↓	+ + +
Itaconat	↓	+
Phenylhydrazin	↓	-
2-(3,4-dihydro-naphtalen-1yl)-Succinat 1-Methylester	=	-
L-β -Threo-Benzyl-Aspartat	=	-
Benzylchlorid	=	-
Kaliumphosphatpuffer	=	-
Benzylfumarat/ Benzylmaleat	=	-

(↓) Abnahme des Glycylradikalsignals (=) keine Veränderung des Glycylradikalsignals (-) keine Bildung einer neuen Radikalspezies (+) schwache Merkmale einer neuen Radikalspezies (+ +) starke Ausprägung einer neuen Radikalspezies (+ + +) sehr starke Ausprägung einer neuen Radikalspezies

3. Charakterisierung des aktivierenden Enzyms (BssD) der BSS aus *T. aromatica*

Um die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase posttranslational in ihre katalytisch aktive Form zu überführen, wird durch das zugehörige aktivierende Enzym (BssD) ein Glycylradikal in das aktive Zentrum einer der beiden großen α-Untereinheiten des Enzyms eingefügt. Eine Gemeinsamkeit aller Aktivatoren verschiedener Glycylradikalenzymen ist ein ungewöhnlich koordinierter [4Fe4S]-Cluster im aktiven Zentrum. Dieser Cluster wird von einem Cysteinmotiv koordiniert, welches aus nur drei konservierten Cystein-Resten besteht, und dient der Bindung des Kosubstrates S-Adenosylmethionin (SAM; Einleitung Abb. 4). Die abgeleitete Proteinsequenz des *bssD*-Gens aus *T. aromatica* Stamm K172 weist neben dem konservierten Cysteinmotiv für die SAM-Bindung zwei weitere Cysteinmotive ($Cx_2Cx_2Cx_3C$) in einer Ferredoxin-ähnlichen Domäne auf (Yu *et al.*, 2006). Diese Domäne ist wahrscheinlich für die Koordination von zwei weiteren Eisen-Schwefel Clustern mit unbekannter Funktion verantwortlich (Yu *et al.*, 2006; Blaser, 2007).

3.1 Überproduktion und Reinigung

Das aktivierenden Enzyms der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica* wurde mit Hilfe des Plasmids pBADTOPO/D102-*bssD* (Abb. 28) in *E. coli* ArcticExpress™ (DE3) RIL überproduziert. Das Enzym wird dazu als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Thioredoxin-Tag (N-Trx) und einem C-terminalen His-Tag (C-6His) produziert (Abb. 26; Hogg, 2008; Feil, 2006). Dies ermöglicht zum Einen eine einfache Reinigung des Enzyms mittels His-Tag Affinitätschromatographie zum Andern trägt der Trx-Tag zu Erhöhung der Löslichkeit des Proteins bei. Der Txn-Tag kann nach der Reinigung durch eine Enterokinase vom synthetisierten Protein entfernt werden. Die Molekülmasse des Fusionsproteins ($BssD_{\text{-N-Trx/C-6His}}$) beträgt etwa 54 kDa (37 kDa BssD; 13,5 kDa N-terminaler Thioredoxin-Tag und 3,4 kDa C-terminaler His-Tag). Das *bssD*-Gen steht unter der Kontrolle des pBAD-Promotors und wurde mit 0,02 % Arabinose induziert. Durch die zusätzliche Koexpression kälteadaptierter Chaparone (Cpn10; Cpn60) konnte der Anteil löslichen BssD-Proteins auf 10-20 % gesteigert werden im Vergleich zu 3 % (Hogg, 2008; Feil, 2006) bzw. maximal 10 % (Lippert, 2009) in früheren Arbeiten. Das rekombinant produzierte Protein wurde mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie unter strikt anaeroben Bedingungen gereinigt (Material und Methoden 7.4.2). Für jede Reinigung wurden ca. 15 Gramm Zellen verwendet, aus denen etwa 8-10 mg gereinigtes Protein erhalten wurde. Das Enzym wies schon vor dem Konzentrieren eine deutliche Braunfärbung auf, was auf die Existenz von Eisen-Schwefel-Cluster im Protein hindeutet. Nach Auftrennung des gereinigten Fusionsproteins mittels SDS-PAGE ist eine 54 kDa große Proteinbande mit einer Reinheit von etwa 90-95 % zu erkennen (Abb. 27).

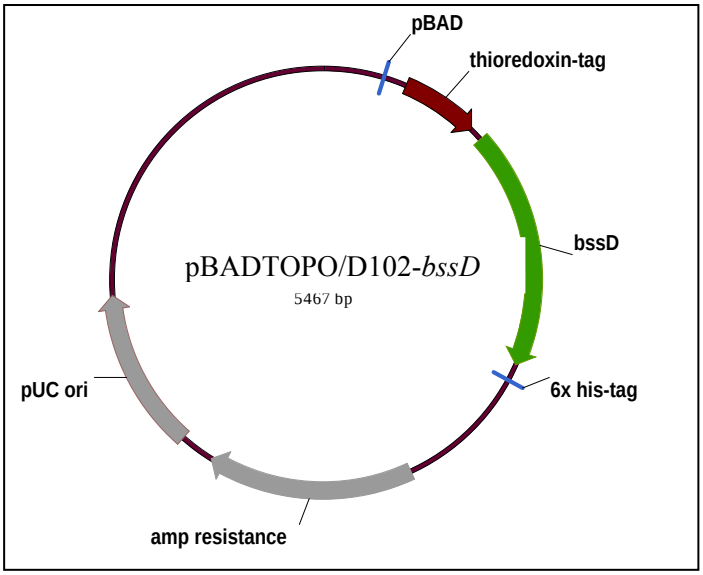


Abb. 26: Expressionsvektor für die Produktion des aktivierenden Enzyms (BssD) der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica* Stamm K172. Das *bssD*-Gen steht unter der Kontrolle eines Arabinose induzierbaren Promotors. Das Enzym wird als Fusionsprotein mit N-terminalem Thioredoxin-Tag und C-terminalem His-Tag produziert.

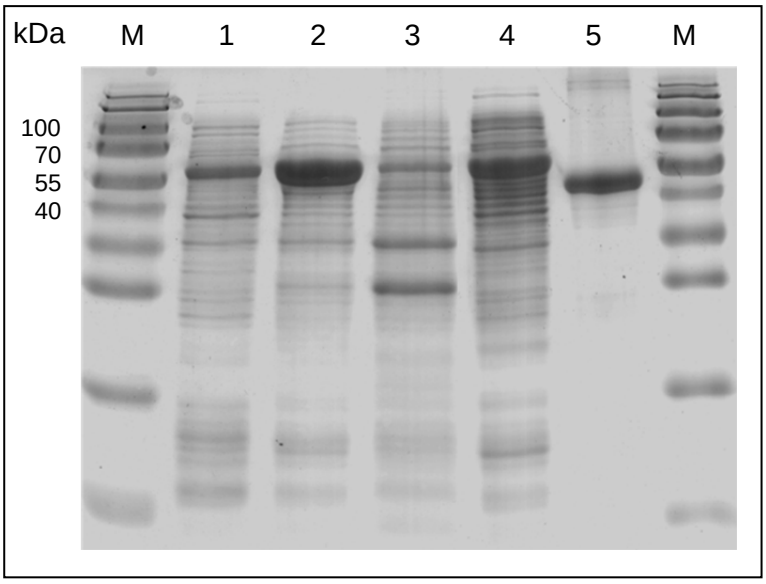


Abb. 27: SDS-PAGE des gereinigten His-getagten BssD-Proteins.
Gezeigt ist die Reinigung des rekombinant produzierten BssD-Proteins aus *T. aromatica* Stamm K172 mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie. Aufgetragen wurden ganze *E. coli* Zellen, die das Plasmid pBAD/D102-TOPO-*bssD* enthielten vor und nach Induktion des *bssD*-Gens mit 0,02 % Arabinose sowie das nach der Affinitätschromatographie erhaltene Eluat. Zu sehen ist das BssD-Fusionsprotein mit einer Masse von 54 kDa. Spur 1: Ganze *E. coli* Zellen (ArcticExpress™ (DE3) RIL pBADTOPO/D102-*bssD*) vor Induktion des *bssD*-Gens (25 µg Protein); Spur 2: Ganze *E. coli* Zellen 3 Stunden nach Induktion des *bssD*-Gens (25 µg Protein); Spur 3: Unlösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation (25 µg Protein); Spur 4: Lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation (30 µg Protein); Spur 5: Eluat (10 µg Protein); M: Marker.

3.2 UV/Vis-Spektroskopie und Elementaranalyse

Gereinigtes BssD-Protein wurde in einer Konzentration von 53 µM für eine UV/Vis-spektroskopische Analyse im Bereich von 300-800 nm eingesetzt. Das unbehandelte Protein zeigte ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 420 nm, welches nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen Natriumdithionit (0,1 mM; 0,325 mM; 0,66 mM; 1,1 mM; 1,5 mM) abnahm und damit auf den Einbau von reduzierbaren Eisen-Schwefel-Cluster im Protein hindeutet (Abb. 28). Eine Metallanalyse mittels ICP-OES zeigte, dass Eisen als einziges Metall in signifikanten Mengen in gereinigtem BssD-Protein enthalten ist und dieses in einer Stoichiometrie von 4,1 Eisenatomen pro Holoenzym vorliegt. Dieses Ergebnis wurde durch eine chemische Analyse des Eisengehalts (Lovenberg *et al.*, 1963; Material und Methoden 10.2 und 10.3) bestätigt, welches eine Stoichiometrie von 3,8 Eisenatomen pro Holoenzym lieferte. Als Grundlage für die Berechnung der Eisen-Stoichiometrie pro Holoenzym wurde die Konzentration der Proteinlösung mit der Methode nach Bradford *et al.* (1976) bestimmt (Material und Methoden 10.1).

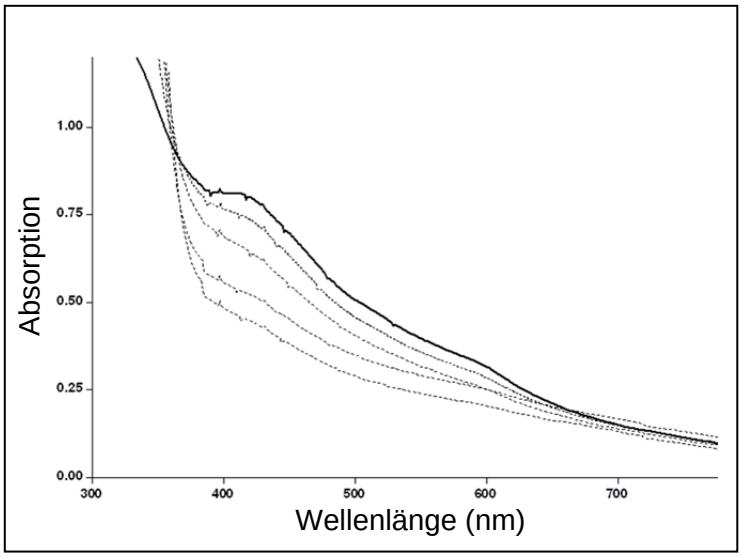


Abb. 28: UV/Vis Spektrum des rekombinant produzierten BssD-Proteins. Gezeigt ist das UV/Vis Spektrum von 2,8 mg/ml gereinigtes BssD-Protein unbehandelt und nach schrittweiser Reduktion mit Natriumdithionit. Charakteristisch für Eisen-Schwefel-Cluster ist die Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm nach Inkubation des Proteins mit Natriumdithionit. Das Enzym war in einem Puffer mit 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM Mg_2Cl, 50 mM Argenin, 5 mM Glutamat, 150 mM Imidazol, pH 7,5 gelöst.

3.3 EPR-spektroskopische Analyse

Um den Einfluss der SAM-Bindung auf die Eigenschaften der Eisen-Schwefel-Cluster des BssD-Proteins zu untersuchen, wurde 360 µM gereinigtes Enzym mit 2 mM Natriumdithionit reduziert und anschließend ohne Zugabe von SAM und nach Inkubation mit 250 µM SAM EPR-spektroskopisch analysiert. Das Spektrum des Enzyms ohne Zugabe von SAM zeigt ein Signal für [4Fe4S]-Cluster (Abb. 29A), dessen Intensität und Ausprägung nur geringfügig durch die Zugabe von SAM beeinflusst wird (Abb. 29B).

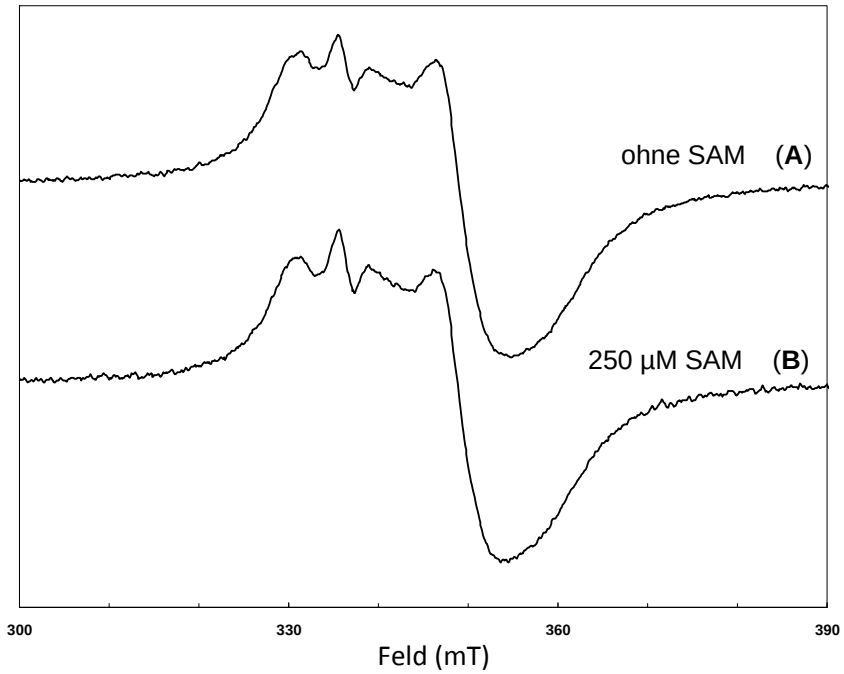


Abb. 29: EPR-Spektren des reduzierten BssD-Proteins vor und nach Zugabe von 250 µM SAM. Gereinigtes BssD-Protein wurde mit 2 mM Natriumdithionit reduziert und anschließend vor (**A**) und nach Zugabe von 250 µM SAM (**B**) EPR-spektroskopisch analysiert. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgenommen: Temperatur 10 K, Mikrowellenleistung 2 mW, Mikrowellenfrequnz 9,46 GHz, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1,2 mT. Proteinkonzentration: 360 µM.

3.4 Erstellung eines Strukturmodells

Analog zum Strukturmodell der großen Untereinheit der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase wurde auch ein Strukturmodell des aktivierenden Enzyms aus *T. aromatica* Stamm K172 basierend auf sequenzähnlichen Proteinen mit bereits gelöster Kristallstruktur generiert. Die Struktur der SAM-Domäne wurde durch Anpassung an die Kristallstruktur des aktivierenden Enzyms der Pyruvat Formiat Lyase aus *Escherichia coli* erstellt, das eine Sequenzidentität von 55 % aufweist (pdb-file: 3C8F; Vey *et al.*, 2008). Zudem wurde das Strukturmodell der Ferredoxin-ähnlichen Domäne durch Anpassung an die Kristallstruktur der FeS-Cluster Domäne (β-Untereinheit) der

Adenosylsulfat Reduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* (pdb-file: 1JNR; Fritz *et al.*, 2002) modelliert. Die Sequenzidentität des Templates zur Ferredoxin-ähnlichen Domäne des aktivierenden Enzyms der BSS beträgt 32,5 %. Beide Strukturmodelle wurden anschließend mit Hilfe der Software „PyMOL“ zusammengefügt und graphisch dargestellt (Abb. 30). Im Modell hervorgehoben sind die [4Fe4S]-Cluster sowie die drei Cystein-Reste, die das SAM-Kuban koordinieren. Der Abstand der Eisen-Schwefel-Cluster zueinander wurde berechnet und beträgt innerhalb der Ferredoxin-Domäne 10,1 Å, sowie 14,6 Å bis zum SAM-Cluster.

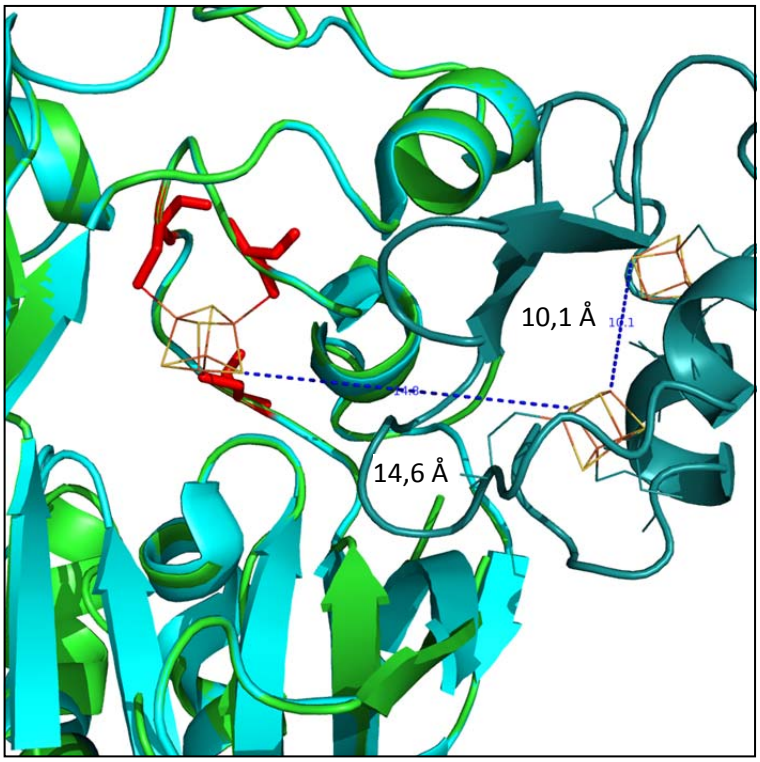


Abb. 30: Strukturmodel des aktivierenden Enzyms (BssD) aus *T. aromatica.* Das Modell basiert auf der Kristallstruktur des aktivierenden Enzyms der Pyruvat Formiat Lyase aus *Escherichia coli* mit einer Sequenzidentität von 55 % (SAM-Domäne) und der Adenosylsulfat Reduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* mit einer Sequenzidentität von 24,2 % (Ferredoxin-Domäne). Eingezeichnet ist der Abstand der drei Eisen-Schwefel-Cluster zueinander (innerhalb der Ferredoxin-Domäne: 10,1 Å; Ferredoxin-Domäne zu SAM-Kuban: 14,6 Å) sowie die, an der Koordination des SAM-Kubans beteiligten Cystein-Reste. Hellgrün: Model der SAM-Domäne; Dunkelgrün: Model der Ferredoxin-Domäne; Türkis: Template

4. Klonierung der BSS und BssD in broad-host-range Vektoren

Für eine Überproduktion der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase und des aktivierenden Enzyms (BssD) aus *Thauera aromatica* in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 wurden die entsprechenden Gene in die Broad-host-range Vektoren pASG3_mob$^-$ (ohne zusätzlichen *E. coli* ori) und pASG3_mob$^+$

(mit zusätzlichem *E. coli* ori) kloniert (Abb. 31). Als Template für die Amplifizierung der *bss*-Gene diente das Plasmid pBSS-Strep, welches für die BSS als Fusionsprotein mit Strep-Tag am N-terminus der großen α-Untereinheit kodiert. Das Plasmid pBADTOPO/D102-*bssD* diente als Template für die Amplifizierung des *bssD*-Gens, welches für das aktivierende Enzym als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Thioredoxin-Tag kodiert. Die Gensequenz wurde beginnend mit der Thioredoxinsequenz amplifiziert, ohne die stromabwärts befindliche Sequenz, die für einen C-terminalen His-Tag kodiert. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden zunächst jeweils in den pEnry-IBA20 Vektor und anschließend mittels Fusionsklonierung in die Expressionsvektoren kloniert (Material und Methoden 6.1). Die in Abb. 26 dargestellten Plasmide pASG3_mob$^-$_BSS-Strep + BssD-Txn (ohne *E.coli* ori) und pASG3_mob$^+$_BSS-Strep + BssD-Txn (mit *E.coli* ori) wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit noch nicht für eine Expression in *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 verwendet.

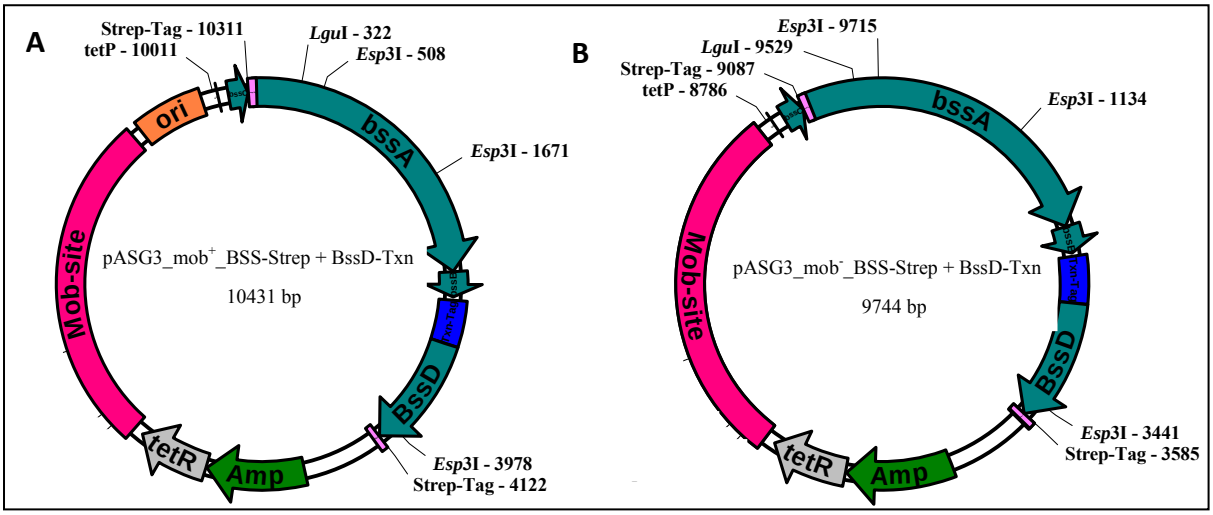


Abb. 31: Broad-host-range Expressionsvektoren für die Produktion der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase und des aktivierenden Enzyms (BssD). Die Gene stehen unter der Kontrolle eines AHT induzierbaren Promotors. Die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase wird als Fusionsprotein mit N-terminalem Strep-Tag an der großen α-Untereinheit, das aktivierende Enzym mit N-terminalem Thioredocin-Tag und C-terminalem His-Tag produziert. **(A)**: Expressionsvektor mit einem zusätzlich für *E. coli* optimierten origin of replication (orange). **(B)**: Expressionsvektor mit nur einem „origin of replication" in der Mob-site.

5. Klonierung der BSS aus *Geobacter metallireducens*

Die Gene für die drei BSS-Untereinheiten aus *G. metallireducens*, wurden wie beschrieben ohne Fusion eines Affinitäts-Tags in den Expressionsvektor pJoe2775 kloniert und nach Induktion mit 0,2 % L-Rhamnose in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Unter diesen Bedingungen wurde eine Überproduktion beobachtet (Daten nicht gezeigt wird), jedoch wurden keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Löslichkeit des Proteins und des Einbaus von Kofaktoren durchgeführt.

5.1 Expression des bssD-Gens aus *Geobacter metallireducens* in *E. coli*

Für die Produktion des aktivierenden Enzyms der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase aus *G. metallireducens* wurde das mittels PCR amplifizierte *bssD*-Gen in den pASG3 Expressionsvektor kloniert (Material und Methoden 6.1). Für die heterologe Expression des Gens wurde analog zur Produktion des BssD-Proteins aus *T. aromatica* der *E.coli* Stamm ArcticExpress™ (DE3) RIL verwendet und die Produktion des Enzyms unter den gleichen Bedingungen wie zuvor beschrieben durchgeführt. Das Protein konnte zwar überproduziert werden, jedoch lag dieses nach dem Zellaufschluss und Ultrazentrifugation ausschließlich unlöslich in „Inclusionbodies“ vor (Daten nicht gezeigt). In einem zweiten Ansatz wurde das *bssD*-Gen nach Optimierung der Codon Usage, des GC-Gehalts und weiterer störender Einflüsse von der Firma Genescript synthetisiert. Das Konstrukt wurde anschließend in die Vektoren pASG3 und pASG5 kloniert und ebenfalls in *E.coli* ArcticExpress™ (DE3) RIL unter den genannten Bedingungen überexprimiert. Das Protein konnte sowohl überproduziert als auch unter anaeroben Bedingungen mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Auftrennung des Eluats mittels SDS-PAGE zeigt ein Protein mit der Masse von 41 kDa und einer Reinheit von etwa 80-90 % (Abb. 32). Das gereinigte Protein war jedoch farblos und zeigte auch im UV/Vis Spektrum bei einer Wellenlänge von 420 nm keine charakteristische Schulter für den Einbau von Eisen-Schwefel-Cluster (Daten nicht gezeigt).

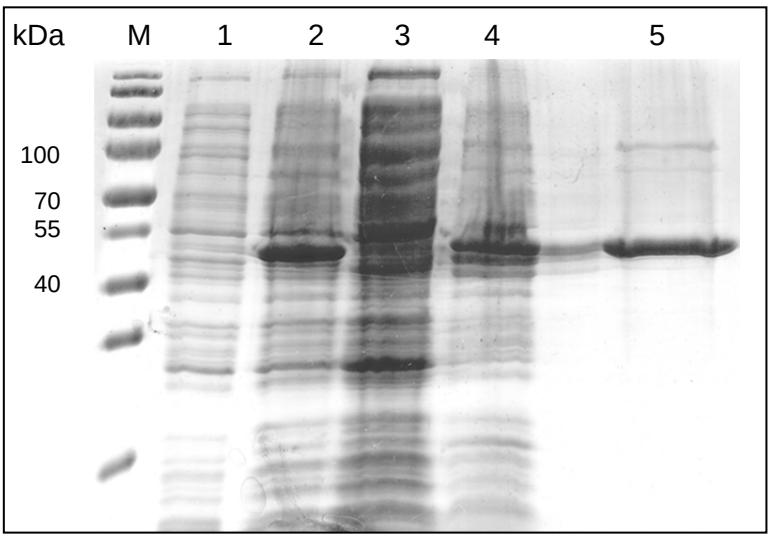


Abb. 32: SDS-PAGE des gereinigten Strep-getagten BssD-Proteins aus *G. metallireducens*. Gezeigt ist die Reinigung des rekombinant produzierten BssD-Proteins aus *G. metallireducens* mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Aufgetragen wurden ganze *E. coli* Zellen, die das Plasmid pASG5_*bssD*-geo-synth enthielten, vor und nach Induktion des *bssD*-Gens mit 20 µg/l AHT sowie das nach der Affinitätschromatographie erhaltene Eluat. Zu sehen ist das BssD-Fusionsprotein mit einer Masse von 41 kDa. Spur 1: Ganze *E. coli* Zellen (ArcticExpress™ (DE3) RIL mit pASG5_*bssD*-geo-synth) vor Induktion des *bssD*-Gens (25 µg Protein); Spur 2: Ganze *E. coli* Zellen 24 Stunden nach Induktion des *bssD*-Gens (25 µg Protein); Spur 3: Unlösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation (30 µg Protein); Spur 4: Lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation (25 µg Protein); Spur 5: Eluat (8 µg Protein); M: Marker.

Diskussion

1. Die (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

1.1 Die BSS als Glycylradikalenzym

Die stetig wachsende Familie der Glycylradikalenzyme setzt sich aus einer großen Gruppe verschiedener Enzyme zusammen, deren Vertreter als charakteristisches Merkmal ein Glycylradikal im Rückgrat ihrer Polypeptidkette tragen. Das Radikal ist für die enzymatische Katalyse essentiell, wird jedoch durch Exposition an Sauerstoff zerstört und führt dabei zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms. Die BSS war der erste Vertreter dieser Enzymklasse mit einer neuartigen Funktion nach der Pyruvat-Formiat-Lyase (Knappe *et al.*, 1984) und der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase von *E. coli* (Sawers und Watson, 1998). Seitdem wurden weitere neue Glycylradikalenzyme identifiziert. Die Enzymfamilie wird zurzeit in acht verschiedene Gruppen eingeteilt, von denen fünf Vertreter bekannte Funktionen besitzen (Selmer *et al.*, 2005). Neben den Pyruvat-Formiat-Lyasen und anaeroben Ribonukleotid-Reduktasen sind dies die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen und verwandte Fumarat-addiernde Enzyme (Leuthner *et al.*, 1998, Heider, 2007), eine *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase und verwandte Enzyme (Selmer und Andrei, 2001), sowie die Coenzym B_{12}-unabhängigen Glycerin-Dehydratasen (Raynaud *et al.*, 2003). Alle Glycylradikalenzyme enthalten eine orthologe große Untereinheit mit dem aktiven Zentrum, während bisher nur die Fumarat-addierenden Enzyme und die *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase zusätzliche kleine Untereinheiten besitzen.

1.2 Verbreitung der BSS und BSS-ähnlicher Enzyme

Die Addition von Fumarat als initialer Schritt des bakteriellen Abbaus von Kohlenwasserstoffen unter anaeroben Bedingungen, ist in der Natur weit verbreitet. Dieses Prinzip konnte für Toluol, m-Xylol, m- und p-Cresol, sowie Ethylbenzol bereits in verschiedenen nitrifizierenden, Sulfat-reduzierenden und Eisen-reduzierenden Bakterien, sowie einem phototrophen Bakterium und methanogenen Konsortien nachgewiesen werden. Basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen wurden alle Fumarat-addierenden Reaktionen BSS-ähnlichen Enzymen zugeordnet. Neue Untersuchungen an Sulfat-reduzierenden Bakterien (Anreicherungskultur N47) zeigten, dass auch der Abbau von 2-Methylnaphtalin über eine Fumarat-Addition zu dem entsprechenden Succinat-Addukt eingeleitet wird (Musat *et al.*, 2009, Selesi *et al.*, 2010). Die Reaktion wird von der Naphtyl-2-Methyl-Succinat Synthase (Nms) katalysiert, die analog zur BSS aus drei Untereinheiten aufgebaut ist (α: 96 kDa; β und γ: 7,9 und 7,8 kDa; (Selesi *et al.*, 2010). Die Nms α-Untereinheit (NmsA) weist mit 50 % Aminosäuresequenzidentität eine starke Ähnlichkeit zur α-Untereinheit der BSS aus *T. aromatica* auf.

Auch für die β-Untereinheit konnte eine Sequenzidentität von 33 % zu einem Toluol abbauenden Konsortium nachgewiesen werden (Selesi *et al.*, 2010). Weiterhin wurde in Sulfat-reduzierenden und denitrifizierenden Bakterien der Abbau von *n*-Alkanen durch BSS-ähnliche Enzyme (Ass/Mas) nachgewiesen (Rabus *et al.*, 2001, Grundmann *et al.*, 2008). Am Beispiel des denitrifizierende Betaproteobakteriums HxN1 wurde die Initiierung des *n*-Hexan Abbaus durch eine (1-Methylalkyl)succinat Synthase abhängige Fumarat-Addition an die subterminale Methylengruppe des Hexans gezeigt. Die (1-Methylalkyl)succinat Synthase setzt sich aus den Genprodukten MasC, MasD und MasE zusammen. MasD (97 kDa) besitzt dabei 37,5 % Sequenzidentität zur BSS aus *T. aromatica* und wird als katalytisch aktive Untereinheit angesehen (Grundmann*, et al.*, 2008). Die beiden kleinen Untereinheiten MasA und MasB weisen hingegen nur geringe Sequenzidentitäten zu den kleinen Untereinheiten der BSS auf (Grundmann *et al.*, 2008). Aufgrund der stetig wachsenden Gruppe Fumarat-addierender Glycylradikalenzyme ist es möglich, diese anhand ihrer katalytischen Funktionen in phylogenetische Untergruppen einzuteilen. Basierend auf einem Aminosäuresequenzalignment ist in Abb. 33 der Verwandtschaftsgrad der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica* Stamm K172 zu weiteren BSS und BSS-ähnlichen Enzymen dargestellt.

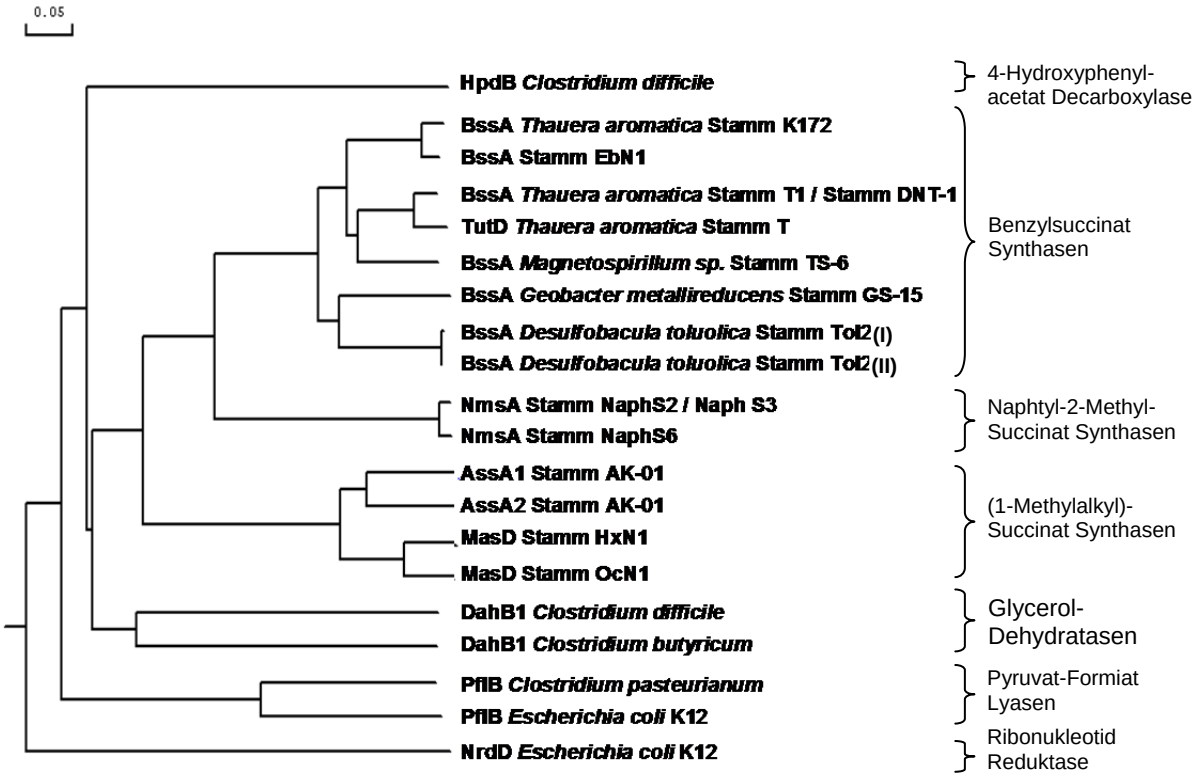


Abb. 33: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener BSS und BSS-ähnlicher Enzyme. Die Abbildung zeigt die Verwandtschaft der BSS aus *T. aromatica* Stamm K172 mit anderen Glycylradikal Enzymen. Der Stammbaum wurde basierend auf einem Alignment der Aminosäuresequenzen der großen Untereinheiten der BSS erstellt. Bss: (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase; Tut: Ortholog zu Bss; Nms: Naphtyl-2-Methyl-Succinat Synthase; MasD/AssA: (1-Methylalkyl)-Succinat Synthase; Dah: Glycerol-Dehydratase; Pfl: Pyruvat-Formiat-Lyase; Nrd: Ribonukleotid-Reduktase; Hpd: 4-Hydroxyphenylacetat Decaboxylase. Die Maßstabskala repräsentiert 5 % Sequenzunterschied.

1.3 Kofaktor-Charakterisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach Optimierung des Reinigungsprotokolls eine spektroskopische Kofaktoranalyse mit rekombinant produzierter und nicht-aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase durchgeführt. Mit Hilfe von verschiedenen spektroskopischen Techniken wurde die Anwesenheit von mindestens zwei unterschiedlichen Typen magnetisch gekoppelter [4Fe4S]-Cluster nachgewiesen. Obwohl noch keine weiteren Details bezüglich der Kristallstruktur bekannt sind, weist die magnetische Kopplung der EPR-Signale auf eine starke räumliche Nähe der Eisen-Schwefel-Cluster hin. Für die Bestimmung der Eisen-Stoichiometrie pro Holoenzym ist eine möglichst exakte Bestimmung der Proteinkonzentration erforderlich. Im Verlauf des Projekts stellte sich heraus, dass die Proteinkonzentration mit den bisher verwendeten Methoden nach Bradford (Bradford, 1976) und Lowry (Lowry *et al.*, 1951) um etwa 42 % überbestimmt wurde. Erst eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des berechneten Extinktionskoeffizienten pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym lieferte exakte Werte, die für die eine Berechnung der Eisen-Stoichiometrie geeignet waren. Aufgrund des Verhaltens in der EPR- und Mössbauer- spektroskopischen Analyse scheinen die Eisen-Schwefel-Cluster sehr niedrige Mittelpunktpotentiale zu besitzen (< - 450 mV vs. NHE). Selbst die Reduktion mit Titan(III)citrat (E_0' = - 840 mV; pH 8) hatte keinen Einfluss auf das Mössbauerspektrum der BSS, obwohl das Redoxpotential von Titan(III)citrat deutlich niedriger ist im Vergleich zu Natriumdithionit (E_0' = - 660 mV; Mayhew, 1978, Hans *et al.*, 2008). Zusätzlich wurden sowohl in der EPR- als auch in der Mössbauer-spektroskopischen Analyse variierende Anteile von $[3Fe4S]^{1+}$-Cluster in unabhängigen Enzympräparationen gefunden (siehe Anhang Abb. 40). Dies lässt den Schluss zu, dass das Vorkommen der [3Fe4S]-Cluster auf einen partiellen Abbau von [4Fe4S]-Clustern während der Proteinreinigung zurückzuführen ist. Für die rekombinante und rekonstituierte BSS aus *T. aromatica* Stamm T1 wurden zuvor ebenfalls Signale für $[4Fe4S]^{1+}$-Cluster detektiert, jedoch weisen diese andere spektrale Eigenschaften auf, ohne eine magnetische Kopplung der EPR-Signale (Li *et al.*, 2009).

Die Eisen-Schwefel-Cluster der BSS sind wahrscheinlich analog zur 4-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase aus *Clostridium difficile* (4-HPD) in den kleinen β- und γ-Untereinheiten lokalisiert. Diese Vermutung wird durch das Aminosäure-Sequenzalignment der kleinen β- und γ-Untereinheiten anderer Fumarat-addierender Enzyme unterstützt, die den initialen Schritt zum Abbau von Toluol, 2-Methylnaphtalen oder Alkane katalysieren. Das Sequenzalignment weist pro Untereinheit vier konservierte Cystein-Reste auf, die zwar in einem ungewöhnlichen Motiv angeordnet sind, aber dennoch für eine Koordinierung von [4Fe4S]-Cluster in Frage kommen (Leuthner *et al.*, 1998). Untermauert wird die Hypothese durch die berechnete Eisen-Stöchiometrie von vier [4Fe4S]-Cluster pro $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Holoenzym und das Ergebnis einer Fluoreszenzmarkierung der zugänglichen Cystein-Reste in gereinigter BSS, das ebenfalls auf eine Lokalisierung der Eisen-Schwefel-Cluster in den kleinen β- und γ-Untereinheiten hindeutet.

Die Funktion der Eisen-Schwefel-Cluster der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase ist bisher noch nicht aufgeklärt. Sie könnte im Elektronentransfer zur Generierung des Glycylradikals im Polypeptidrückgrat einer der beiden α-Untereinheiten liegen, jedoch ist eine Funktion ohne Beteiligung an Redoxprozessen ebenso denkbar. Die Eisen-Schwefel-Cluster könnten zur Bindung der Carboxylgruppen des Fumarat-Kosubstrats beitragen, vergleichbar der Substrat-Bindung der Aconitase mit Hilfe eines [4Fe4S]-Clusters (Berg und Stryer, 2003). Bisher ist nur ein weiteres Glycylradikalenzym bekannt, das aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist und Eisen-Schwefel-Cluster als Kofaktoren besitzt, die 4-HPD (Selmer und Andrei, 2001, Andrei *et al.*, 2004). Das Enzym ist an der fermentativen Bildung von *p*-Cresol beteiligt und besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die in einer hetero-oktameren $\beta_4\gamma_4$–Zusammensetzung angeordnet sind. Frühere Untersuchungen und die erst kürzlich gelöste Kristallstruktur liefern eindeutig Aufschluss über die Lokalisation und Eigenschaften der Eisen-Schwefel-Cluster (Selmer und Andrei, 2001, Yu *et al.*, 2006, Martins *et al.*, 2011). Pro γ-Untereinheit sind zwei [4Fe4S]-Cluster lokalisiert (N- und C-terminaler Cluster). Es wurde gezeigt, dass nur einer der beiden Eisen-Schwefel-Cluster redoxaktiv ist und trotz Bindung über ein HiPIP-Motiv ein Mittelpunktpotenial von - 287 mV ± 4 mV (vs. NHE) besitzt (Martins *et al.*, 2011). Das niedrige Redoxpotential lässt sich durch die direkte Umgebung der Eisen-Schwefel-Cluster erklären: Im Vergleich zum N-terminalen Cluster ist die direkte Umgebung des C-terminalen Clusters deutlich hydrophober. Zudem ist dieser im Interface der beiden β- und γ-Untereinheiten lokalisiert und durch Interaktion mit der großen β-Untereinheit vor direktem Kontakt mit der Lösemittelumgebung abgeschirmt (Martins *et al.*, 2011). Dies macht eine Beteiligung des C-terminalen Eisen-Schwefel-Clusters an Redoxprozessen unwahrscheinlich. Ebenfalls ist die direkte Umgebung des N-terminalen Clusters dafür verantwortlich, dass dieser trotz HiPIP-Bindemotiv ein niedriges Mittelpunktpotential ähnlich eines Ferredoxins aufweist (Martins *et al.*, 2011). Die Funktion der Eisen-Schwefel-Cluster bei der Enzym-Katalyse der 4-HPD ist trotz vorhandener Kristallstruktur weiterhin unbekannt. Im Hinblick auf die $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Struktur der BSS besteht analog zu den Eisen-Schwefel-Clustern der 4-HPD die Möglichkeit, dass nur der Eisen-Schwefel-Cluster einer kleinen BSS-Untereinheit an Redoxprozessen beteiligt ist, während der der zweiten kleinen Untereinheit zum Erhalt der strukturellen Integrität des Enzyms beiträgt . Weitere Untersuchungen sind daher notwendig um die Funktion und Lokalisation der Eisen-Schwefel-Cluster der BSS vollständig aufzuklären.

1.4 Kristallisationsversuche

Um weitere Information bezüglich des Reaktionsmechanismus der BSS, sowie der Lokalisierung und Funktion der Eisen-Schwefel-Cluster zu erhalten, wurden erste Kristallisationsversuche zur Strukturaufklärung mit rekombinant-produzierter BSS in vergangenen Arbeiten durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Dr. Berta Martins (Humboldt Universität Berlin) fortgeführt. In der Vergangenheit wurde eine Auflösung der Proteinkristalle von 6-8 Å erreicht (Feil, 2006). Nach Optimierung der Proteinreinigung wurde in neuen Enzympräparationen eine deutlich höhere Uniformität bezüglich des Einbaus von [4Fe4S]-Cluster erreicht, was zur Verbesserung der Kristallisationsergebnisse beitragen sollte. Mit Hilfe der „sitting-drop"-Technik wurde unter Einhaltung strikt anaerober Bedingungen konzentrierte BSS (35 mg/ml) mit verschiedenen Puffern inkubiert um geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden. In einem Ansatz wurde die Bildung von Kristallen beobachtet, die für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet waren (Abb.34). Die getesteten Kristalle wiesen eine schwache anisotropen Fragmentierung auf und erzielten eine Auflösung von bis zu 4 Å (BESSY Synchrotron). Zwar ist die erreichte Auflösung für strukturelle Aussagen über die einzelnen BSS-Untereinheiten zu gering, jedoch lässt die „cell content analysis" bereits auf eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Komposition des Holoenzyms schließen. Eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen ist daher erforderlich. Zusätzlich können Inhibitoren der BSS, welche die Reaktion auf Stufe radikalischer Intermediate arretieren für eine Cokristallisation eingesetzt werden. Diese binden mit hoher Wahrscheinlichkeit in direkter Nähe der konservierten Aminosäuren Cys489 und Gly825 im aktiven Zentrum des Enzyms und lassen weitere Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus zu.

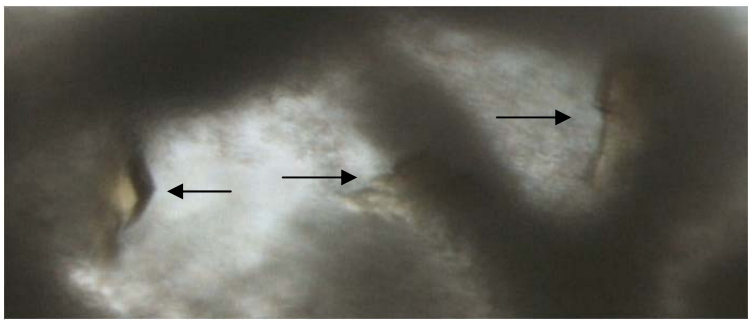


Abb. 34: Anaerober Kristallisationsansatz rekombinant-produizierter (*R*)-Benzylsuccinat Synthase aus *T. aromatica*. Zu sehen ist ein rhombus-förmiger Proteinkristall (links), der eine deutliche Braunfärbung aufweist. Dieser ging jedoch während der Vorbereitungen für die Strukturanalyse verloren. Die Kristallplatten (rechts) wurden schockgefroren und für eine Röntgenstrukturanalyse verwendet.

2. Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

2.1 Biochemische Untersuchungen

Zur weiteren Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurden biochemische Untersuchungen mit isotopenmarkierten Substraten durchgeführt. In Ansätzen mit [$^{2}H_{8}$]Toluol wurde eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität um 75 % im Vergleich zu nicht-markiertem Toluol beobachtet. Im Gegensatz dazu hatten isotopenmarkierte Fumarat-Kosubstrate ([2,3-$^{2}H_{2}$]Fumarat, [1,2,3,4-$^{13}C_{4}$]Fumarat) keinen Effekt auf die Enzymaktivität der BSS. Folglich wurde die Abstrahierung des Wasserstoffatoms von der Methylgruppe von Toluol als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der BSS-Reaktion entsprechend des postulierten Reaktionsmechanismus identifiziert. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen mit [1-$^{2}H_{3}$]Toluol durchgeführt werden, welches ausschließlich an der substituierten Methylgruppe Isotopenmarkierungen mit Deuterium aufweist. Zudem könnte ein Markierungsmuster dieser Methylgruppe mit zwei unterschiedlichen Wasserstoffisotopen (Deuterium und Tritium) in Kombination mit einem Wasserstoffatom, genauen Aufschluss über die Stereospezifität der Wasserstoffabstrahierung geben.

Außerdem wurden biochemische Untersuchungen mit Inhibitoren der BSS durchgeführt. In früheren Arbeiten wurden bereits verschiedene Substratanaloga wie Benzylalkohol, Benzaldeyd, Phenylhydrazin und Benzylchlorid als starke Inhibitoren der BSS identifiziert (Verfürth, 2005). Die Inhibition der BSS durch diese Verbindungen wurde in Aktivitätstests im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Zudem wurden detaillierte kinetische Studien zur Bestimmung des Hemmtyps mit Benzylalkohol (Substratanalog) und einer Mischung aus Benzylfumarat/Benzylmaleat (Produktanalog) durchgeführt. Im Fall von Benzylalkohol handelt es sich um einen gemischten Inhibitor, der sowohl an das freie Enzym, als auch an den Enzymsubstratkomplex bindet. Nach Bindung des substratanalogen Inhibitors im aktiven Zentrum der BSS könnte durch Abstrahierung eines Wasserstoffatoms vom C1-Atom des Benzylalkohols ein organisches Radikal gebildet werden, welches nicht mehr auf den konservierten Cystein-Rest (Cys489) im aktiven Zentrum des Enzyms übertragen werden kann. Dadurch kann der katalytisch aktive Zustand des Enzyms nicht wiederhergestellt werden. Weitere Informationen zum Mechanismus der Inhibition lieferten EPR-spektroskopische Untersuchungen von *T. aromatica* Rohextrakt nach Inkubation mit Benzylalkohol (siehe unten).

Bei der Mischung aus Benzylfumarat/Benzylmaleat handelt es sich hingegen um einen unkompetitiven Inhibitor, der nicht mit dem natürlichen Substrat konkurriert. Auch hier ist denkbar, dass die produktanaloge Verbindung im aktiven Zentrum der BSS bindet und nach Abstrahierung eines Wasserstoffatoms eine neue Radikalspezies ausgebildet wird. Ebenso könnte Benzylfumarat/Benzylmaleat ohne Bildung einer neuen Radikalspezies die Enzymkatalyse aus sterischen Gründen inhibieren, indem es im aktiven Zentrum der BSS bindet und das Enzym in der

katalytisch aktiven Glycylradikal-haltigen Form arretiert. Weitere Hinweise zum Mechanismus der Inhibition wurden durch EPR-spektroskopische Untersuchungen erhalten (siehe unten).
In weiteren Studien wurde die Substrat- und Kosubstrat-Spezifität der BSS untersucht. Als Fumarat-Analog wurde 2-Methylfumarat getestet, welches allerdings nicht von der BSS umgesetzt wurde. Ein enzymatischer Umsatz wurde lediglich für Maleinsäure als Fumarat-Analog nachgewiesen (Biegert *et al.*, 1996). Die ist jedoch möglicherweise auf sekundäre Effekte durch die Inhibition der Fumarase mit Maleinsäure und die dadurch resultierende Erhöhung des endogenen Fumaratspiegels zurückzuführen (Biegert *et al.*, 1996, Beller und Spormann, 1999). Bisher wurde noch nie sichere Enzymaktivität mit Fumarat-Analogen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die Bindung des Fumarat-Kosubstrats sehr stark von sterischen Faktoren im aktiven Zentrum der BSS abhängig ist. Im Gegensatz dazu werden verschiedene Toluol-Analoga wie Cresole und Xylene von der BSS als Substrat erkannt (Verfürth *et al.*, 2004). Andere Fumarat-addierende Enzyme, die eine hohe Ähnlichkeit zur BSS aufweisen, verwenden 2-Methylnaphtalin (Selesi *et al.*, 2010), *n*-Alkane (Grundmann *et al.*, 2008) oder Ethylbenzol (Heider, 2007) als Substrate. Dies zeigt eine hohe Variabilität von BSS und BSS-ähnlichen Enzymen bezüglich des aromatischen Substrats unter strikter Verwendung von Fumarat als Kosubstrat.

2.2 Theoretische Berechnungen

Der postulierte Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase verläuft über verschiedene radikalische Intermediate. Die Energiezustände der einzelnen Reaktionsintermediate wurden in Kooperation mit M. Szaleniec (PAS, Krakau) basierend auf einem DFT-Modell neu berechnet. Die erhaltenen Werte weichen nur geringfügig von den bereits publizierten Daten ab (Himo, 2002) und belegen, dass die vorhergesagten radikalischen Reaktionsintermediate unter normalen Reaktionsbedingungen äußerst kurzlebig sind (Abb. 35). Im thermodynamischen Gleichgewicht liegt das Verhältnis von Substrattradikal (Benzylradikal) zu Glycylradikal liegt bei 1 : 3300, das von Produktradikal (Benzylsuccinylradikal) zu Glycylradikal bei 1 : 7400. Dadurch befindet sich das Gleichgewicht der radikalischen Intermediate stets auf der Seite des Glycylradikals. Eine Arretierung der Reaktion auf Stufe radikalischer Intermediate ist daher nur durch substratanaloge oder produktanaloge Verbindungen möglich, die in der radikalischen Form energetisch niedriger liegen als das Glycylradikal. Die DFT-Berechnung für ein organisches Produktradikal ausgehend von dem Produktanalog Benzylfumarat ist in Abb. 36 dargestellt. Nach Abstrahierung eines Wasserstoffatoms ist der Energiezustand des gebildeten Produktradikals deutlich niedriger im Vergleich zum Benzylsuccinylradikal und auch zum Glycylradikal-Zustand des Enzyms. Das gebildete Radikal kann aufgrund des konjugierten π-Elektronensystems zu einem stabilen allylischen Radikal mesomeriestabilisieren und sollte dadurch die BSS-Reaktion inhibieren.

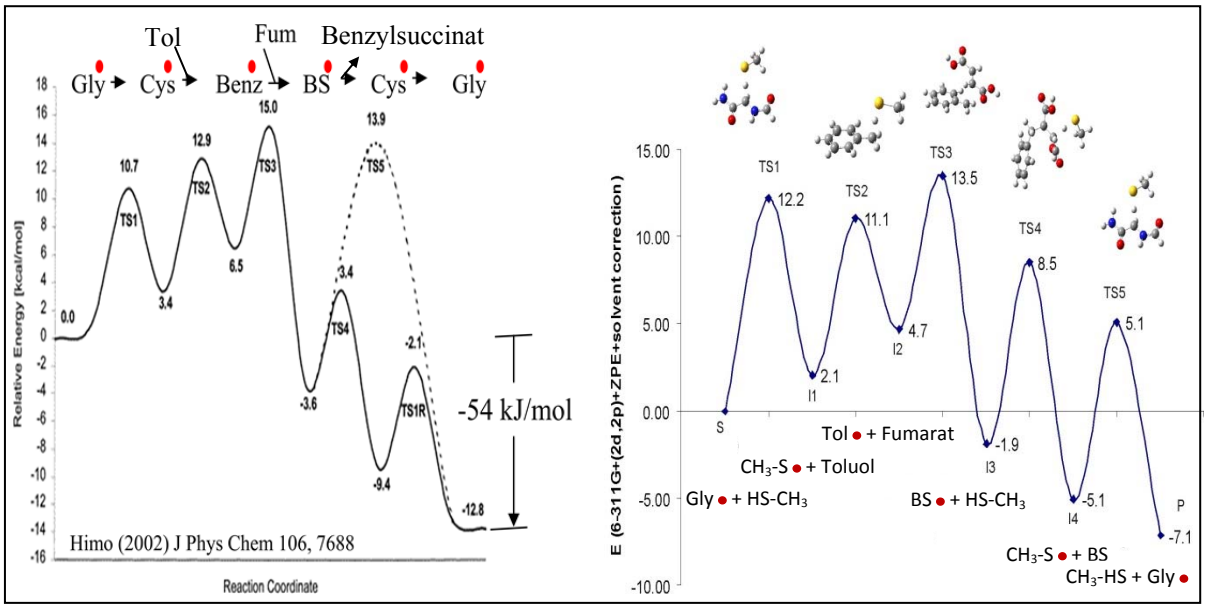


Abb. 35: „Density function theoretical (DFT)" Modelle des postulierten Reaktionsmechanismus der BSS basierend auf Berechnungen von Himo *et al.* 2002 (links) und M. Szaleniec (PAS, Krakau; rechts). Die neuen Berechnungen sagen einen Nettoenergiebetrag der Gesamtreaktion von ΔG°' = -30 kJ/mol voraus. Die Energiedifferenz zwischen dem Glycylradikal-Zustand und dem Substrat- bzw. Produktradikal beträgt im publizierten Modell 20 kJ/mol und in den neuen Berechnungen 22 kJ/mol.

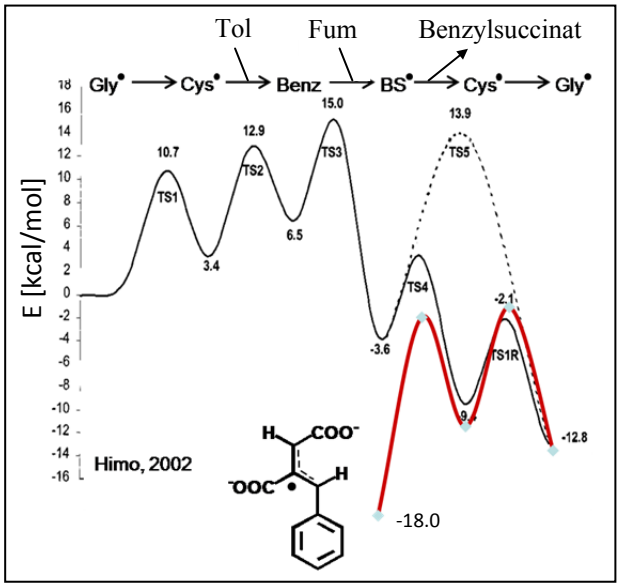


Abb. 36: „Density function theoretical (DFT)" Modell für die Generierung eines allylischen Produktradikals (rot) nach Reaktion der BSS mit Benzylfumarat. Nach Abstrahierung eines Wasserstoffatoms von Benzylfumarat sagen die Berechnungen einen Energiebetrag des gebildeten allylischen Produktradikals von – 18,0 kcal/mol voraus (M. Szaleniec (PAS, Krakau)).

2.3 EPR-spektroskopische Untersuchungen

Die Identifizierung und Charakterisierung radikalischer Intermediate der BSS-Reaktion leistet einen großen Beitrag zur weiteren Aufklärung des Reaktionsmechanismus. Im Rahmen dieser Arbeit ist zum ersten Mal der Nachweis eines kohlenstoff-basierten organischen Radikalintermediats in einem Glycylradikalenzym gelungen. Die Ergebnisse stützen grundlegend den für alle Glycylradikalenzyme postulierten radikalischen Reaktionsmechanismus.

Die Inkubation von *T. aromatica* Rohextrakt mit der substratanalogen Verbindungen Benzylalkohol bewirkt die Umwandlung des Glycylradikalsignals der BSS in eine neue Radikalspezies. Diese lässt sich einem kohlenstoff-basierten organischen Radikal zuordnen, das mit bis zu drei Protonen koppelt. BiochemischeUntersuchungen legen den Schluss nahe, dass eine vollständige Umwandlung des Glycylradikalsignals in die neue Radikalspzies erfolgt ist, da bereits geringe Konzentrationen Benzylalkohol ausreichen um das Enzym vollständig zu inhibieren. Durch die Effekte von [$^{13}C_7$]-Benzylalkohol und Benzylalkohol zusammen mit [2,3-$^{2}H_2$]Fumarat wurde die Bildung eines organischen Radikals aufgebaut aus Fumarat und Benzylalkohol festgestellt. Auch in diesem Zusammenhang ist noch einmal zu erwähnen, dass bereits die natürlich im Zellextrakt vorkommende Menge Fumarat ausreichend ist, um nach Inkubation von Rohextrakt mit Benzylalkohol allein die neue organische Radikalspezies vollständig auszuprägen. Die Reaktion zur Bildung des organischen Radikals könnte entsprechend dem in Abb. 37 vorgeschlagenen Mechanismus verlaufen. Durch Abstrahierung eines Wasserstoffatoms vom C1-Atom wird Benzylakohol zu einem Benzylalkohol-Radikal aktiviert. In einer ersten Reaktion wird dieses Radikal durch Addition an Fumarat zu einem 2-(hydroxymethylphenyl)succin-3-yl Radikal (Radikal A) umgewandelt. Anschließend könnte aus dem gebildeten Radikal durch Wassereleminierung ein mesomeriestabilisiertes allylisches Radikal entstehen (Radikal B):

Der Einsatz von Benzylalkohol zusmmen mit isotopenmarkiertem [2,3-$^{2}H_2$]Fumarat hatte den vollständigen Verlust des „doublet splittings“ des Glycylradikalsignals zur Folge. Dieses Resultat spricht für die Entstehung der „Radikalspezies A“ des vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus, da in dieser Verbindung eine Protononkopplung nicht möglich ist. Der ausbleibende Effekt von [$^{2}H_2$]Benzylalkohol spricht ebenfalls für die Entstehung der „Radikalspezies A“, da das vom Benzylakohol stammende Deuterium einen starken Einfluss auf die Signalkopplung der radikalischen Spezies haben sollte. Im Falle einer reversiblen Abstrahierung des Deuterium-Atoms von der Hydroxymethylgruppe des Benzylalkohols durch das an der Reaktion beteiligte Thiyl-Radikal, ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein Austausch der Deuterium Atome gegen Wasserstoffatome aus dem Lösemittel stattfindet. Daher sind Rückschlüsse auf die Struktur der Radikalspezies mit [$^{2}H_2$]Benzylalkohol erst dann möglich wenn zuvor ein Austausch des Rohextraktlösemittels gegen D_2O durchgeführt wurde.

Die Verbreiterung des EPR-Spektrums durch [$^{13}C_7$]Benzylalkohol setzt hingegen die Anwesenheit von Spindichte auf der Hydroxymethylgruppe des Benzylalkohols voraus. Dieses Ergebnis würde in

Übereinstimmung mit der Bildung der allylischen „Radikalspezies B“ sein (Abb. 37). Anhand der bisherigen Erkenntnisse kann die mit Benzylalkohol und Fumarat gebildete Radikalspezies nicht eindeutig identifiziert werden. In Zusammenarbeit mit PD Dr. Antonio Pierik wurden bereits weiterführende Experimente mit isotopenmarkiertem Benzylalkohol und Fumarat ausgearbeitet, die eine vollständige Strukturaufklärung der Radikalspezies ermöglichen. Diese Experimente beinhalten die EPR-spektroskopische Analyse von *T. aromatica* Rohextrakt nach Inkubation mit folgenden Verbindungen:

1. [$^{2}H_2$]Benzylalkohol zusammen mit Fumarat, nach Austausch des Rohextraktlösemittels gegen D_2O
2. Benzylalkohol zusammen mit [1,2,3,4-^{13}C, 2,3-$^{2}H_2$]Fumarat
3. Benzylalkohol zusammen mit [1,2,3,4-^{13}C]Fumarat
4. [$^{13}C_7$]Benzylalkohol zusammen mit [2,3-$^{2}H_2$]Fumarat

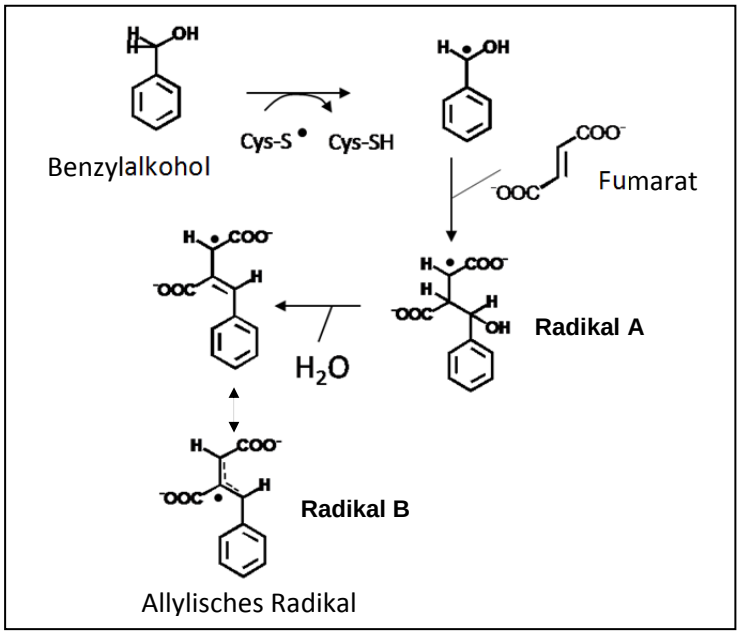


Abb. 37: Möglicher Mechanismus zur Bildung eines Produktradikals mit Benzylalkohol und Fumarat. Durch Abstrahierung eines Wasserstoffatoms vom C1-Atom wird Benzylakohol zu einem Benzylalkohol-Radikal aktiviert. Dieses wird anschließend durch Addition an Fumarat zu einem 2-(hydroxymethylphenyl)succin-3-yl Radikal (Radikal A) umgewandelt. Aus dem gebildeten Radikal könnte durch Wassereleminierung ein mesomeriestabilisiertes allylisches Radikal entstehen (Radikal B).

Synthetisiertes (*E*)-Phenylitaconat, welches nicht einem zusätzlichen chromatographischen Reinigungsschritt unterzogen wurde, bewirkte ebenfalls die Bildung einer neuen Radikalspezies in aktivierter BSS. Die spektralen Eigenschaften dieses Radikals stimmen mit denen der Simulation für ein kohlenstoff-basiertes organisches Radikal überein. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der neuen Radikalspezies um ein vollständig ausgeprägtes allylisches Radikal handelt. Für die Bestätigung dieser Annahme müssen weitere Eigenschaften der Radikalspezies aufgeklärt werden. Dazu ist es notwendig die unbekannte Kontamination der

Phenylitaconat Probe zu identifizieren und diese zusätzlich in Deuterium- und ^{13}C-isotopenmarkierter Form zu synthetisieren. Die resultierenden Signaleigenschaften sollten sich dadurch drastisch entsprechend den Vorhersagen ändern.
Schließlich wurde nach Inkubation des *T. aromatica* Rohextrakts mit Itaconat ebenfalls das Auftreten einer schwachen kohlenstoff-basierten organischen Radikalspezies beobachtet, nachdem die Beiträge des Glycylradikalsignals einer Kontrollprobe subtrahiert wurden. Mit Itaconat bekommt man also offenbar eine Minimalstruktur eines enzymgebundenen organischen Radikalintermediats, das mit hoher Wahrscheinlichkeit die vorhergesagten oder bereits identifizierten Produkte aller Fumarat-addierenden Enzyme imitiert. Basierend auf diesen Ergebnissen kann Itaconat eventuell als universelles Werkzeug verwendet werden, welches die Identifizierung anaerober kohlenwasserstoffabbauender Bakterien ermöglicht, die Fumarat-addierende Enzyme im initialen Schritt des Abbaus verwenden. Weiterhin lässt die auf diese Weise hervorgerufene Änderung des EPR-Signals eine Unterscheidung zwischen Fumarat-addierenden Enzymen und allen anderen Glycylradikalenzymen zu.
Entgegen der Vorhersage des DFT-Modells zur Bildung eines allylischen Produktradikals hatte die bereits biochemisch als Inhibitor identifizierte Mischung aus Benzylfumarat und Benzylmaleat keinen Einfluss auf das Glycylradikalspektrum aktivierter BSS. Es ist daher wahrscheinlich, dass die BSS durch die Bindung von Benzylfumarat/Benzylmaleat im aktiven Zentrum in der Glycylradikal-haltigen Form arretiert und die Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat aus sterischen Gründen inhibiert wird.

3. Das aktivierende Enzym (BssD) der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase

3.1 Sequenzmotive aktivierender Enzyme

Aktivierende Enzyme von Glycylradikalenzymen gehören zur Familie der S-Adenosylmethionin-Radikal Enzyme, welche die reduktive Spaltung von S-Adenosylmethionin (SAM) in Methionin und ein 5´-Desoxydenosyl Radikal katalysieren. SAM dient in diesem Fall nicht als Methylgruppen-Donor, sondern als Radikalgenerator mit dessen Hilfe das jeweilige Zielenzym aktiviert wird. Eine Gemeinsamkeit aller aktivierenden Enzyme ist ein ungewöhnlicher [4Fe4S]-Cluster im aktiven Zentrum, der von nur drei konservierten Cysteinresten koordiniert wird (Sofia *et al.*, 2001). Die vierte Koordinationsstelle dient zur Bindung des SAM-Kosubstrates. Im genomischen Kontext sind fast alle aktivierenden Enzyme in direkter Nachbarschaft zu den jeweiligen Glycylradikalenzymen kodiert (Selmer *et al.*, 2005).

Außer dem konservierten Eisen-Schwefel-Cluster zur Bindung von SAM (SAM-Cluster) weisen die aktivierende Enzyme von Fumarat addierender Glycylradikalenzyme und auch die aktivierenden Enzymen der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase (*Clostridium difficile*) sowie der Glycerol-

Dehydratase (*Clostridium butyricum*) zwei zusätzliche konservierte Cysteinmotive auf (Abb. 38; Yu *et al.*, 2006). Diese sind in einer Ferredoxin-ähnlichen Domäne angeordnet und zur Bindung von zwei weiteren Eisen-Schwefel-Clustern geeignet (Yu *et al.*, 2006). Das Vorhandensein zusätzlicher Eisen-Schwefel-Cluster erschwert die biochemische und spektroskopische Charakterisierung dieser aktivierenden Enzyme. Bisher wurden detaillierte Studien zum Reaktionsmechanismus ausschließlich mit den aktivierenden Enzymen der Pyruvat-Formiat Lyase (Buis und Broderick, 2005, Vey *et al.*, 2008) und der anaeroben Ribonukleotid Reduktase (Tamarit *et al.*, 2000, Padovani *et al.*, 2001) aus *Escherichia coli* durchgeführt, die beide keine Ferredoxin-ähnliche Domäne besitzen.

3.2 Spektroskopische Charakterisierung

Durch Produktion des Enzyms bei extrem niedrigen Temperaturen und zusätzlicher Koexpression kälteadaptierter Chaparone (Cpn10/Cpn60) wurde die Löslichkeit des aktivierenden Enzyms der BSS auf 20 Prozent gesteigert. Die Koexpression der Chaparone bewirkte eine Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster, so dass bereits direkt nach der Reinigung eine starke Braunfärbung des Proteins erkennbar war. Möglicherweise übernehmen die koexprimierten Chaparone eine ähnliche Funktion wie das nicht näher charakterisierte BssE-Protein, das aufgrund von Sequenzanalysen der AAA^+-Klasse chaperonähnlicher ATPasen zugeordnet werden kann (Neuwald *et al.*, 1999). Der Einbau redoxaktiver Eisen-Schwefel-Cluster wurde durch UV/Vis- und EPR-spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen. Zudem bestätigte eine Elementanalyse mittels ICP-OES das Vorkommen von vier Eisen-Atomen pro Holoenzym. Bisher wurde EPR-spektroskopisch die Anwesenheit eines Ferredoxin-ähnlichen [4Fe4S]-Clusters nachgewiesen, das entsprechend der Aminosäuresequenzanalyse zu erwarten war (Abb. 38). Nach Inkubation des gereinigten Enzyms mit SAM wurde keine signifikante Änderung des EPR-Spektrums beobachtet. Dies könnte daran liegen, dass der SAM-Cluster nicht korrekt assembliert bzw. bei der Proteinreinigung zerstört wurde, oder der starke Einfluss der Ferredoxin-ähnlichen Domäne die Resonanz des SAM-Clusters überlagert. Das aktivierende Enzym der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus *C. difficile* weist nach Inkubation mit SAM ein ähnliches Verhalten in der EPR-spektroskopischen Analyse auf wie das aktivierende Enzym der BSS. Trotz der nur geringfügigen Signaländerungen nach Inkubation mit SAM ist das aktivierende Enzym der 4-HPD dennoch in der Lage die 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase zu aktivieren (Yu *et al.*, 2006).

Das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase liegt nach Optimierung der Produktions- und Reinigungsbedingungen zum ersten Mal in größerem Maßstab in löslicher Form vor. Bisherige Präparationen wurden einerseits für die Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Cluster verwendet und andererseits in Kooperation mit Dr. Berta Martins (Humboldt Universität Berlin) in

Kristallisationsversuchen eingesetzt. Basierend auf diesen Ergebnissen können in Zukunft weitere Studien zur Aktivierbarkeit der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase durchgeführt werden.

Abb. 38: Partielles Sequenzalignment von aktivierenden Enzymen verschiedener Glycylradikalenzyme. Hervorgehoben sind konservierte Cystein-Reste, die den SAM-Cluster koordinieren (rot) und außerdem für die Bindung zwei weiterer Eisen-Schwefel-Cluster in Frage kommen (grau). Dargestellt sind die aktivierenden Enzyme folgender Glycylradikalenzyme: BSS (*T. aromatica*); Nms (N47); Mas (*Azoarcus sp.* HxN1); Gdh (*C. butyricum*); Hpd (*C. difficile*); Csd (*C. scatalogenes*); Pfl2 (*A. fulgidus*); Pfl (*E. coli*); Nrd (*E. coli*)

Literaturverzeichnis

Anders HJ, Kaetzke A, Kämpfer P, Ludwig W & Fuchs G (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. Int J Syst Bacteriol **45:** 327-333

Andrei PI, Pierik AJ, Zauner S, Andrei-Selmer LC & Selmer T (2004) Subunit composition of the glycyl radical enzyme p-hydroxyphenylacetate decarboxylase. A small subunit, HpdC, is essential for catalytic activity. Eur J Biochem **271:** 2225-2230

Arnold K, Bordoli L, Kopp J & Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics **22:** 195-201

Becker A, Fritz-Wolf K, Kabsch W, Knappe J, Schultz S & Volker Wagner AF (1999) Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. Nat Struct Biol **6:** 969-975

Beinert H (1983) Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. Anal Biochem **131:** 373-378

Beller HR & Spormann AM (1999) Substrate range of benzylsuccinate synthase from Azoarcus sp. strain T. FEMS Microbiol Lett **178:** 147-153

Beller HR, Reinhard M & Grbić-Galić D (1992) Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. Appl Environ Microbiol **58:** 3192-3195

Beller HR, Spormann AM, Sharma PK, Cole JR & Reinhard M (1996) Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. Appl Environ Microbiol **62:** 1188-1196

Biegert T, Fuchs G & Heider J (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium Thauera aromatica is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. Eur J Biochem **238:** 661-668

Blaser M (2007) Activation and Regulation of the 4-Hydroxyphenylacetate Decarboxylase System from *Clostridium difficile*. Thesis

Boll M (2005) Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. Biochim Biophys Acta **1707:** 34-50

Boll M (2005) Dearomatizing benzene ring reductases. J Mol Microbiol Biotechnol **10:** 132-142

Boll M & Fuchs G (1998) Identification and characterization of the natural electron donor ferredoxin and of FAD as a possible prosthetic group of benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. Eur J Biochem **251:** 946-954

Boll M, Albracht SS & Fuchs G (1997) Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosinetriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. Eur J Biochem **244:** 840-851

Boll M, Fuchs G & Heider J (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. Curr Opin Chem Biol **6:** 604-611

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72:** 248-254

Buis JM & Broderick JB (2005) Pyruvate formate-lyase activating enzyme: elucidation of a novel mechanism for glycyl radical formation. Arch Biochem Biophys **433:** 288-296

Camilli R, Reddy CM, Yoerger DR, *et al.* (2010) Tracking hydrocarbon plume transport and biodegradation at Deepwater Horizon. Science **330:** 201-204

Cohr KH & Stokholm J (1979) Toluene. A toxicologic review. Scand J Work Environ Health **5:** 71-90

Dagley S (1984) Micrbial degradation of aromatic compounds. Developments in Industrial Microbiology **25:** 53-65

Evans PJ, Ling W, Goldschmidt B, Ritter ER & Young LY (1992) Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. Appl Environ Microbiol **58:** 496-501

Feil C (2006) Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechels von Thauera aromatica. Thesis

Frazer AC, Coschigano PW & Young LY (1995) Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. Anaerobe **1:** 293-303

Fritz G, Roth A, Schiffer A, *et al.* (2002) Structure of adenylylsulfate reductase from the hyperthermophilic Archaeoglobus fulgidus at 1.6-A resolution. Proc Natl Acad Sci U S A **99:** 1836-1841

Gibson DT (1970) Initial stages in microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Journal of the American Oil Chemists Society **47:** A337

Gottschalk G (1998) *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag Berlin

Grundmann O, Behrends A, Rabus R, Amann J, Halder T, Heider J & Widdel F (2008) Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of n-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. Environ Microbiol **10:** 376-385

Hans M, Buckel W & Bill E (2008) Spectroscopic evidence for an all-ferrous [4Fe-4S]0 cluster in the superreduced activator of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from Acidaminococcus fermentans. J Biol Inorg Chem **13:** 563-574

Harayama S, Kok M & Neidle EL (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. Annu Rev Microbiol **46:** 565-601

Harwood CS & Parales RE (1996) The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. Annu Rev Microbiol **50:** 553-590

Heider J, Spormann AM, Beller HR & Widdel F (1998) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. Fems Microbiology Reviews **22:** 459-473

Heider J (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. Curr Opin Chem Biol **11:** 188-194

Hermuth K, Leuthner B & Heider J (2002) Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in Thauera aromatica strain K172. Arch Microbiol **177:** 132-138

Himo F (2002) Catalytic mechanism of benzylsuccinate synthase, a theoretical study. Journal of Physical Chemistry B **106:** 7688-7692

Hogg J (2008) Untersuchungen zu den an der initialen Reaktion des anaeroben Tolouolabbaus beteiligten Proteine aus Thauera aromatica und der Glycerindehydratase aus Rhodospirillum rubrum. Thesis

Knappe J, Neugebauer FA, Blaschkowski HP & Gänzler M (1984) Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. Proc Natl Acad Sci U S A **81:** 1332-1335

Kube M, Heider J, Amann J, *et al.* (2004) Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. Arch Microbiol **181:** 182-194

Leuthner B & Heider J (1998) A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in Thauera aromatica. FEMS Microbiol Lett **166:** 35-41

Leuthner B & Heider J (2000) Anaerobic toluene catabolism of Thauera aromatica: the bbs operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. J Bacteriol **182:** 272-277

Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, *et al.* (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from Thauera aromatica: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. Mol Microbiol **28:** 615-628

Leutwein C & Heider J (1999) Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying Thauera aromatica: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. Microbiology **145 (Pt 11):** 3265-3271

Leutwein C & Heider J (2001) Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. J Bacteriol **183:** 4288-4295

Leutwein C & Heider J (2002) (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of Thauera aromatica, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. Arch Microbiol **178:** 517-524

Li L, Patterson DP, Fox CC, Lin B, Coschigano PW & Marsh EN (2009) Subunit structure of benzylsuccinate synthase. Biochemistry **48:** 1284-1292

Lippert (2009) Biochemie von Enzymen des anaeroben Stoffwechsels von Toluol in *Thauera aromatica*. Thesis

Lovenberg W, Buchanan BB & Rabinowitz JC (1963) Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. J Biol Chem **238:** 3899-3913

Lovern MR, Cole CE & Schlosser PM (2001) A review of quantitative studies of benzene metabolism. Crit Rev Toxicol **31:** 285-311

Lovley DR & Lonergan DJ (1990) Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol, and p-Cresol by the Dissimilatory Iron-Reducing Organism, GS-15. Appl Environ Microbiol **56:** 1858-1864

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem **193:** 265-275

Martins BM, Blaser M, Feliks M, Ullmann GM, Buckel W & Selmer T (2011) Structural basis for a Kolbe-type decarboxylation catalyzed by a glycyl radical enzyme. J Am Chem Soc **133:** 14666-14674

Mayhew SG (1978) The redox potential of dithionite and SO-2 from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. Eur J Biochem **85:** 535-547

Musat F, Galushko A, Jacob J, *et al.* (2009) Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. Environ Microbiol **11:** 209-219

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL & Koonin EV (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. Genome Res **9:** 27-43

O'Brien JR, Raynaud C, Croux C, Girbal L, Soucaille P & Lanzilotta WN (2004) Insight into the mechanism of the B12-independent glycerol dehydratase from Clostridium butyricum: preliminary biochemical and structural characterization. Biochemistry **43:** 4635-4645

Padovani D, Thomas F, Trautwein AX, Mulliez E & Fontecave M (2001) Activation of class III ribonucleotide reductase from E. coli. The electron transfer from the iron-sulfur center to S-adenosylmethionine. Biochemistry **40:** 6713-6719

Peters F, Shinoda Y, McInerney MJ & Boll M (2007) Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-coenzyme A (CoA) hydratases of Geobacter metallireducens and Syntrophus aciditrophicus: Evidence for a

common benzoyl-CoA degradation pathway in facultative and strict anaerobes. J Bacteriol **189:** 1055-1060

Rabus R & Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. Arch Microbiol **163:** 96-103

Rabus R, Fukui M, Wilkes H & Widdle F (1996) Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole-cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. Appl Environ Microbiol **62:** 3605-3613

Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ & Widdel F (2001) Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. J Bacteriol **183:** 1707-1715

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239:** 487-491

Sawers G & Watson G (1998) A glycyl radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase. Mol Microbiol **29:** 945-954

Raynaud C, Sarçabal P, Meynial-Salles I, Croux C & Soucaille P (2003) Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of Clostridium butyricum. Proc Natl Acad Sci U S A **100:** 5010-5015

Schlegel H (1992) *Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart*

Selesi D, Jehmlich N, von Bergen M, *et al.* (2010) Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47. J Bacteriol **192:** 295-306

Selmer T & Andrei PI (2001) p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from Clostridium difficile. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. Eur J Biochem **268:** 1363-1372

Selmer T, Pierik AJ & Heider J (2005) New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. Biol Chem **386:** 981-988

Service USPH (1989) Toxicological profile for toluene. Agency for Toxic Substances and disease Registry. ed.^eds.), p.^pp. U.S. Public Health Service,

Seyfried B, Glod G, Schocher R, Tschech A & Zeyer J (1994) Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and m-xylene by denitrifying bacteria. Appl Environ Microbiol **60:** 4047-4052

Smith MR (1994) *The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF & Miller NE (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. Nucleic Acids Res **29:** 1097-1106

Tamarit J, Gerez C, Meier C, Mulliez E, Trautwein A & Fontecave M (2000) The activating component of the anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli. An iron-sulfur center with only three cysteines. J Biol Chem **275:** 15669-15675

Verfürth K, Pierik AJ, Leutwein C, Zorn S & Heider J (2004) Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and m-xylene metabolism. Arch Microbiol **181:** 155-162

Verfürth (2005) Untersuchungen zur Reaktion der Benzylsuccinat Synthase, des ersten Enzyms des anaeroben Toluol-Stoffwechsels. Thesis

Vey JL, Yang J, Li M, Broderick WE, Broderick JB & Drennan CL (2008) Structural basis for glycyl radical formation by pyruvate formate-lyase activating enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A **105:** 16137-16141

Vogel TM & Grbìc-Galìc D (1986) Incorporation of Oxygen from Water into Toluene and Benzene during Anaerobic Fermentative Transformation. Appl Environ Microbiol **52:** 200-202

Wackett LP & Bruce NC (2000) Environmental biotechnology. Towards sustainability. Curr Opin Biotechnol **11:** 229-231

Wagner AF, Frey M, Neugebauer FA, Schäfer W & Knappe J (1992) The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. Proc Natl Acad Sci U S A **89:** 996-1000

Weelink SA, van Doesburg W, Saia FT, Rijpstra WI, Röling WF, Smidt H & Stams AJ (2009) A strictly anaerobic betaproteobacterium Georgfuchsia toluolica gen. nov., sp. nov. degrades aromatic compounds with Fe(III), Mn(IV) or nitrate as an electron acceptor. FEMS Microbiol Ecol **70:** 575-585

Yu L, Blaser M, Andrei PI, Pierik AJ & Selmer T (2006) 4-Hydroxyphenylacetate decarboxylases: properties of a novel subclass of glycyl radical enzyme systems. Biochemistry **45:** 9584-9592

Zengler K, Heider J, Rossello-Mora R & Widdel F (1999) Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of blastochloris sulfoviridis. Arch Microbiol **172:** 204-212

Zeyer J, Kuhn EP & Schwarzenbach RP (1986) Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. Appl Environ Microbiol **52:** 944-947

Zylstra GJ & Gibson DT (1991) Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. Genet Eng (N Y) **13:** 183-203

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-Triphosphat
bbs	β-oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
BSS	(*R*)-Benzylsuccinat-Synthase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad-Celsius
C-Terminal	Carboxyterminal
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ε	Extinktionskoeffizient
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR-spektroskopie	“Electron Paramagnetic Resonance”-Spektroskopie
g	Gramm
HPLC	high pressure liquid chromatography
ICP-OES	induktiv gekoppelte Plasma-optische Emissionsspektrometrie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kis	Substratinhibitionskonstante
Kiu	Substratinhibitionskonstante
Km	Michaelis-Konstante
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
lac	Lactose
mV	Millivolt
MCS	multiple cloning site
N-Terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RP	reversed-phase
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAM	*S*-Adenosylmethionin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
v.a.	vor allem
UV/Vis	ultra violet/visible
Vmax	Maximalgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
[*x*]	Substratkonzentration
z.B.	zum Beispiel

Anhang

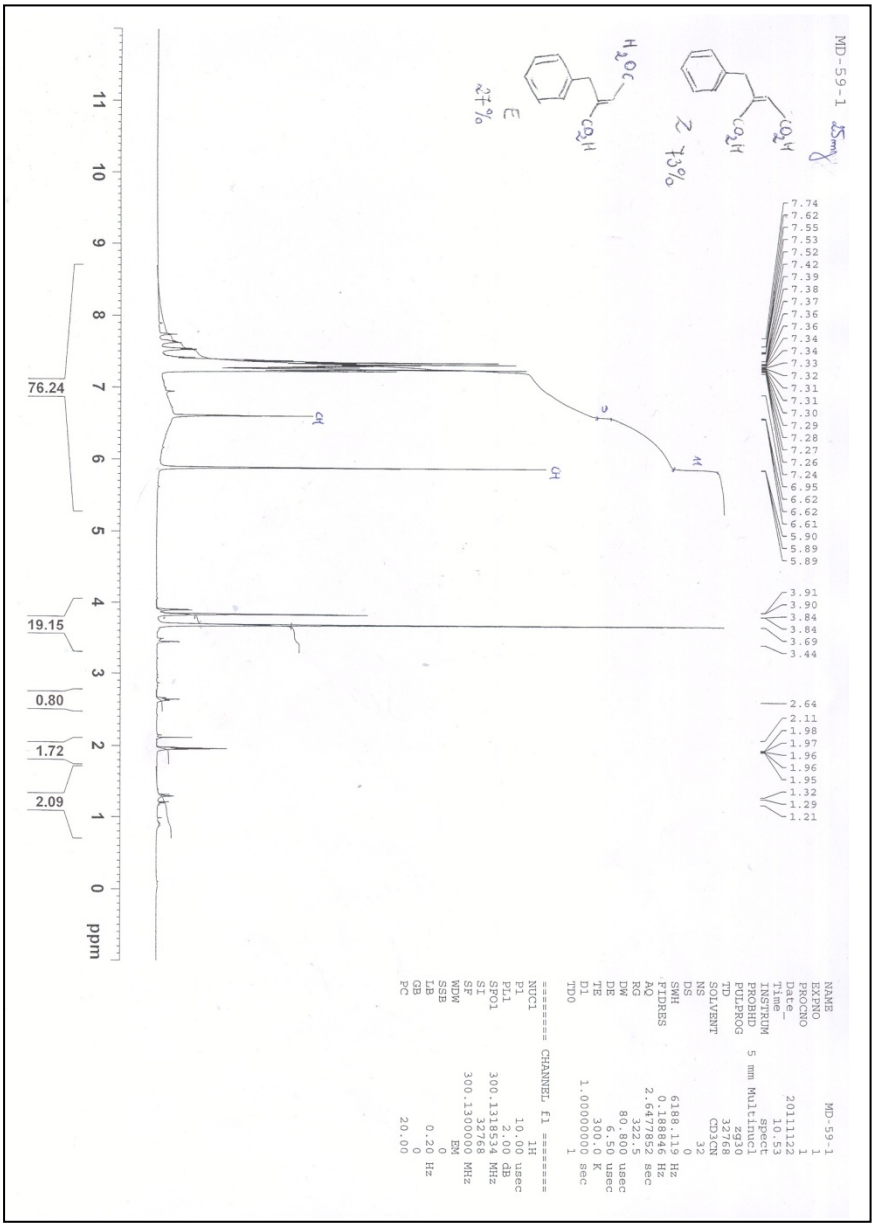


Abb. 39: NMR-spektroskopische Analyse der Mischung aus Benzylfumarat und Benzylmaleat (MD-59-1) Die NMR-Analyse zeigt, dass die synthetisierten Verbindungen in einem Verhältnis von 27 % (Benzylfumarat) zu 73 % (Benzylmaleat) vorliegen. Eine Verunreinigung durch weitere Syntheseprodukte (z.B. Phenylitaconat) kann anhand des NMR-Spektrums ausgeschlossen werden.

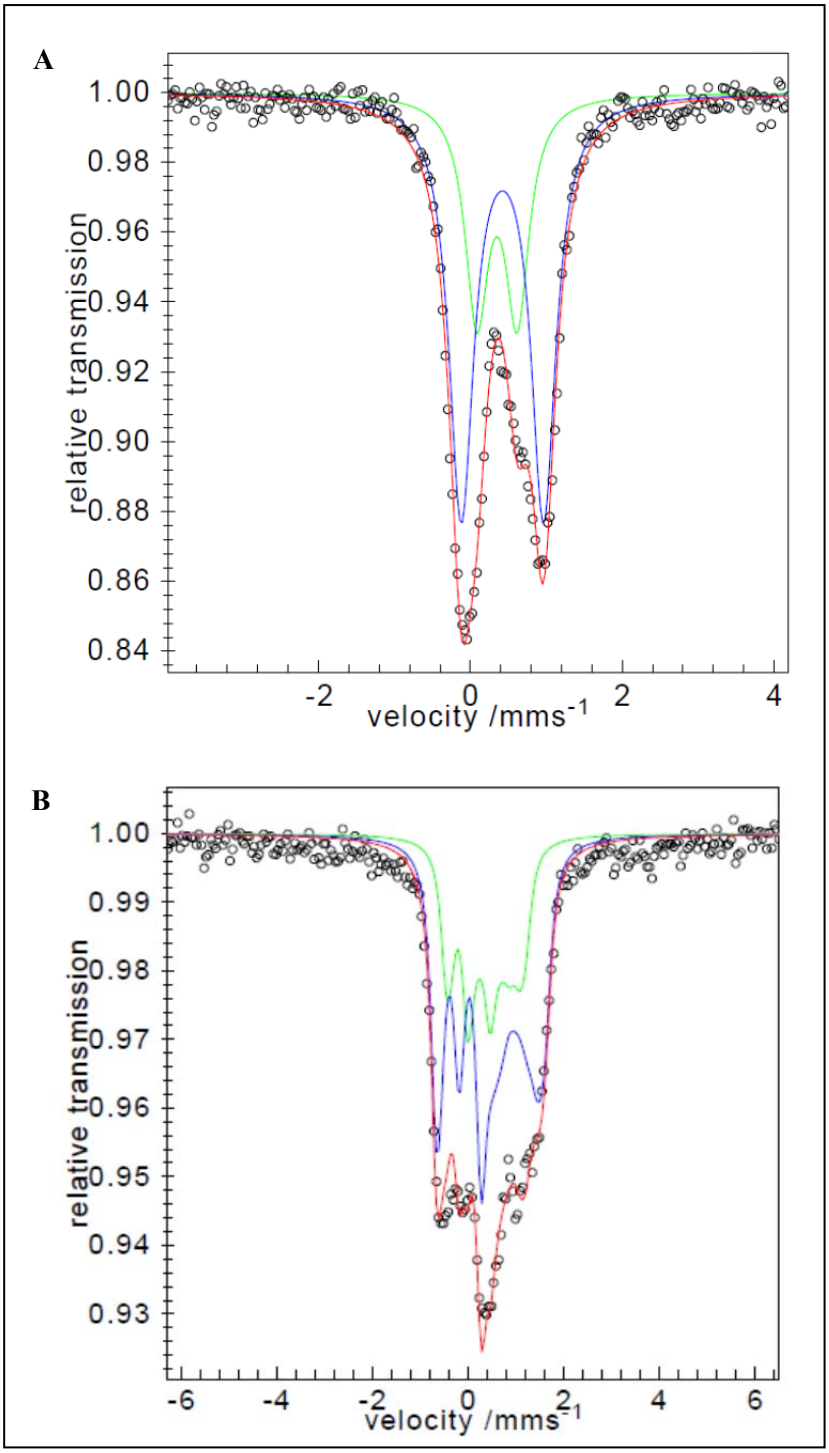


Abb. 40: Mössbauer-Spektren gereinigter BSS (in Gegenwart von 2 mM Natriumdithionit präpariert). Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 80 K in Abwesenheit (**A**) und bei 4,2 K in Gegenwart eines magnetischen Feldes von 6 T (**B**) gemessen. Die Spektren in (A) repräsentieren simulierte Lorentzische Quadrupol Dupletten mit folgenden Isomerverschiebungen (δ) und Quadrupolaufspaltungen ΔE_Q (in mm/s): 0.43, 1.09 für $[4Fe4S]^{2+}$-Cluster (67 % relative Intensität), 0.35, 0.53 und 0.42, 1.08 für den Fe(III) und Fe(II/III) Anteil reduzierter $[3Fe4S]^{0}$-Cluster (zusammen 33 % relative Intensität). Das Spektrum in (B) stellt eine Simulation bei angelegtem Magnetfeld von $[4Fe4S]^{2+}$-Cluster im S = 0 Zustand dar. Der Einflüsse von $[3Fe4S]^{0}$-Cluster und unspezifisch gebundenem Fe(II) ist zu gering um diese im Spektrum aufzulösen.

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Johann Heider. Vielen Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas, Deine Geduld und die wertvollen Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Desweiteren möchte ich Dir für die Möglichkeit danken die Ergebnisse meiner Arbeit auf verschiedenen wissenschaftlichen Tagungen zu präsentieren.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Wolfgang Buckel für die Bereitschaft zur Erstellung des zweiten Gutachtens.

Ein großer Dank geht an PD Dr. Antonio Pierik für die Durchführung der EPR-spektroskopischen Analysen und die intensive Kooperation mit vielen tiefgehenden Diskussionen und hilfreichen Ratschlägen. Ebenfalls danke ich Dr. Eckhard Bill für die Durchführung der Mössbauer-spektroskopischen Analysen.

Bei Dr. Karola Schüle möchte ich mich für die große Unterstützung im Laboralltag sowie ihren unerschütterlichen „Alles wird gut“-Optimismus während der gesamten Zeit meiner Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Freunde und Kollegen Sebastian Kölzer, Michael Schick, Daniel Knack und Marco Hornung für intensive „wissenschaftliche“ Diskussionen, die sich teilweise weit über das Themengebiet dieser Dissertation hinaus erstreckten. Ein großer Dank gilt zudem Marco Hornung für die Hilfsbereitschaft im Umgang mit dem HPLC-System.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Johann Heider und Prof. Dr. Wolfgang Buckel für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums und meiner Promotion unterstützt haben. Mein herzlichster Dank gilt meiner Freundin Maren für ihren Optimismus und die unermüdliche Unterstützung in schwierigen Phasen, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

_____ _____

(Datum) (Unterschrift)

Lebenslauf

Name:	Markus Hilberg
Geburtsdatum:	20.01.1982
Geburtsort:	Marburg/Lahn

Schulbildung

1988 – 1992	Burgwaldschule Wetter
1992 – 2001	Elisabethschule Marburg mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Ersatzdienst

2001 – 2002	Zivildienst (Studentenwerk Marburg)

Hochschulbildung

2002 – 2007	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Genetik, Zellbiologie
2007 – 2008	Diplomarbeit am Fachbereich Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. W. Buckel zum Thema: 2-Methylenglutarat-Mutase und (*R*)-3-Methylitaconat-Isomerase aus *Eubacterium barkeri*

Promotion

2008 - 2012	Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Mikrobiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. J. Heider zum Thema: Anaerober Toluol-Stoffwechsel von *Thauera aromatica*: Biochemische und Spektroskopische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat Synthase