Charakterisierung der reduktiven Aktivitäten der CO-Dehydrogenasen aus *Oligotropha carboxidovorans* und *Streptomyces thermoautotrophicus*

Vollständiger Abdruck der von Fakultät für
Bologie, Chemie und Geowissenschaften der
Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. Nat.-

Vorgelegt von

Antonius Sarjiya

aus Bogor, Indonesien

Bayreuth 2004
Deutschland

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Ortwin Meyer angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 21. April 2004
Tag des wissenschaftlichen Kolloquium: 19. Juli 2004

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Ortwin Meyer, Lehrstuhl für Mikrobiologie (1.Gutachter)
Prof. Dr. Harold Drake, Lehrstuhl für Ökologische Mikrobiologie (2.Gutachter)
Prof. Dr. Konrad Dettner, Lehrstuhl für Tierökologie II (Vorsitzender)
Prof. Dr. Gerhard Gebauer, Lehrstuhl für Pflanzenökologie
PD. Dr. Ute C. Marx, Lehrstuhl für Biopolymere

1 Einleitung 1

1.1 Mikrobielle CO-Oxidation 1
1.1.1 Die Nutzung von CO durch *Oligotropha carboxidovorans* 2
1.1.2 Die Nutzung von CO durch *Streptomyces thermoautotrophicus* 4

1.2 Die typischen Eigenschaften der CO-Dehydrogenase 4
1.2.1 Das aktive Zentrum der oxidierten CO-Dehydrogenase 6
1.2.2 Das aktive Zentrum der reduzierten CO-Dehydrogenase 8
1.2.3 Der Mechanismus der CO Oxidation 9

1.3 Die Reaktivität des [$CuSMoO_2$]-aktiven Zentrums mit Inhibitoren und Substratanalogen 11
1.3.1 Cyanid 11
1.3.2 n-Butylisocyanid 12
1.3.3 Acetylen 13

1.4 Die Nickel-haltigen CO-Dehydrogenasen 14

1.5 Molybdo-Enzyme 15

1.6 Azid als alternatives Substrat und Hemmstoff 16

1.7 Zielsetzung der Arbeit 17

2 Material und Methoden 20

2.1 Biologisches Material 20
2.2 Zellanzucht 20

2.3. Anreicherung und Isolierung von CO-Dehydrogenase 22
2.3.1 Herstellung von Zellextrakten 22
2.3.2 Anionenaustauschchromatographie 23
2.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) 23
2.3.4 Gelfiltration 24
2.3.5 Konzentrierung von Proteinlösungen 24

2.4. Proteinbestimmung 25

2.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten 25
2.5.1 Bestimmung der CO-Dehydrogenase-Aktivität 25
2.5.2 Bestimmung der Reduktion von Azid zu Ammonium 25
2.5.3 Bestimmung der Reduktion von Nitrit zu Ammonium 26
2.5.4 Bestimmung der Reduktion von Nitrat zu Nitrit 27

2.6 Bestimmung von Azid, Ammonium und Nitrit 27
2.6.1 Bestimmung von Azid 27
2.6.2 Bestimmung von Ammonium 28
2.6.3 Bestimmung von Nitrit 28

2.7 Metallanalyse 29

2.8 Bestimmung von FAD 29

2.9 Spektroskopische Methoden 30

2.9.1 UV/vis-Absorptionsspektroskopie 30
2.9.2 Elektronspinresonanz (ESR)-Spektroskopie 30

2.10 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 31

2.11 Aktivitätsfärbung 33

2.12 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase 33

2.12.1 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase durch Cyanid und Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels 33
2.12.2 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase durch n-Butylisocyanid 34
2.12.3 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase durch Cyanat 34

2.13 Messung der Gasentwicklung 34
2.13.1 Warburg-Technik 34
2.13.2 Gaschromatographische Bestimmung von Distickstoff 35

2.14 Röntgenstrukturanalyse der Azid/CO-inkativierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* 35

2.15 Chemikalien und Gase 36

3 Experimente und Ergebnisse 37

3.1 Massenproduktion der CO-autotroph wachsenden Kulturen von *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* 37

3.2 Anreicherung von CO-Dehydrogenase 39

3.3 Wirkung von N-N, N-O- und C-C Verbindungen auf die CO-Dehydrogenase 43

3.4 Azid als neues Substrat der CO-Dehydrogenase 45

3.4.1 Produkte der Azid-Reduktion 47

3.4.2 Stöchiometrie der Azid-Reduktion 49

3.4.3 Kinetik der Azid-Reduktion 51

3.4.4 H_2 als geeigneter Elektronen-Donor für die Azid-Reduktion 52

3.4.5 Bindung und Reduktion von Azid am aktiven Zentrum der CO Dehydrogenase 55

3.4.5.1 Azid-Reduktionsaktivität der Cyanid behandelten CO-Dehydrogenasen 55

3.4.5.2 Azid-Reduktionsaktivität der n-Butylisocyanid behandelten CO-Dehydrogenase 58

3.4.6 Reaktivität des aktiven Zentrums [$CuSMoO_2$] der CO-Dehydrogenase während der Inkubation mit Azid und CO 60

3.4.6.1 Kristallstruktur der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* 64

3.4.6.2 ESR-spektroskopische Eigenschaften der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase 66

3.4.6.3 CO-Oxidationsaktivität während der Inkubation von CO-Dehydrogenase mit Cyanat im oxidierten und reduzierten Zustand 71

3.4.7 Korrelation der Oxidations- und Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase mit cyanolysierbarem Schwefel und Kupfergehalt 74

3.4.8 UV/vis-spektroskopische Eigenschaften der CO-Dehydrogenase während der Azid-Reduktion 79

3.5 Nitrit als alternatives Substrat der CO-Dehydrogenase 82

3.5.1 Reduktion von Nitrit zu Ammonium 82
3.5.2 Stöchiometrie der Nitrit-Reduktion 83
3.5.3 Kinetik der Ammoniumbildung aus der Nitrit-Reduktion durch CO-Dehydrogenase 84
3.5.4 Bindung und Reduktion des Nitrits am aktiven Zentrum [$CuSMoO_2$] der CO-Dehydrogenase 84
3.5.4.1 Nitrit-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase nach Inhibition mit Cyanid 85
3.5.4.2 Nitrit-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase nach Inhibition mit n-Butylisocyanid 87
3.5.4.3 Abhängigkeit der Nitrit-Reduktion von der CO-Oxidationsaktivität 89

3.6 Nitrat als Substrat für die reduktive Aktivität der CO-Dehydrogenase 91

3.6.1 Reduktion von Nitrat durch CO-Dehydrogenase zu Nitrit 91
3.6.2 Kinetik der Nitrat-Reduktion 93
3.6.3 Nitrat-Reduktionsaktivität der inaktiven CO-Dehydrogenase 94
3.6.4 Abhängigkeit der Nitrat-Reduktionsaktivität von der CO-Oxidationsaktivität 97

4 Diskussion 99

4.1 Azid-Reduktion 99
4.1.1 Einfluss von Azid auf die CO-Dehydrogenase 99
4.1.2 Katalyse der Reduktion von Azid zu Ammonium und molekularen Distickstoff durch CO-Dehydrogenase 100
4.1.3 Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von Wasserstoff 102
4.1.4 Inaktivierung der Oxidations- und Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase in Gegenwart von Azid/CO 105
4.1.5 Azid-Reduktionsaktivität in Gegenwart von inaktiver CO-Dehydrogenase 107
4.1.6 Reoxidation der reduzierten CO-Dehydrogenase durch Azid 109

4.1.7 Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Azid-Reduktion im [$CuSMoO_2$]-Cluster der CO-Dehydrogenase 110

4.2 Reduktion von Nitrit und Nitrat zu Ammonium durch die CO-Dehydrogenase 112

4.2.1 Reduktion von Nitrit zu Ammonium durch CO-Dehydrogenase 113

4.2.2 Reduktion von Nitrat durch CO-Dehydrogenase 114

4.2.3 Nitrit-Reduktionsaktivität in Gegenwart von inaktiver CO-Dehydrogenase 115

4.2.4 Hyphothetische Interaktion der CO-Dehydrogenase mit Nitrit: „Mechanistische Überlegung" 116

4.2.5 Unabhängigkeit der Nitrat-Reduktion vom [$CuSMoO_2$]-Cluster 117

4.2.6 Hypothese der Nitrat-Reduktion durch CO-Dehydrogenase 119

4.3 Die katalytisch kompetente CO-Oxidations- und Azid-, Nitrit- und Nitrat-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* 120

5 Zusammenfassung 123

6 Summary 125

7 Literaturverzeichnis 127

Abkürzungen

A	Ampere
Å	Ångström
AAS	Atomabsorptions-Spektroskopie
Abb.	Abbildung
B_o	Magnetfeld (mT)
BSA	Rinderserumalbumin
CO, CO_2	Kohlenmonoxid, Kohlendioxid
CO-Dehydrogenase	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
Cu	Kupfer
Cyt b_{561}	Cytochrom b_{561}
d	Schichtdicke
DCPIP	2,6-Dichlor-phenolindophenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ESR	Elektronenspinresonanz
EXAFS	extended x- ray absorption fine structure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe	Eisen
FeMoco	Eisen-Molybdän-Kofaktor
[2Fe-2S]-Zentren	Eisen-Schwefel-Zentren
g, g_{av}	g-Faktor, g-Faktor$_{(Durchschitt)}$
h	Stunde
H_2	Wasserstoff
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
INT	2-(4-Iodphenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5phenyl-2H-Tetrazoliumchlorid
kDa	Kilodalton
K_m-Wert	Michaelis-Menten-Konstante
mA	Milliampere
MCD	Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid
MGD	Molybdopterin-Guanosin-Dinukleotid

Mo	Molybdän
MPD	2-Methyl-2,4-Pentanediol
MPMS	1-Methoxyphenazin-5-Methosulfat
MPT	Molybdopterin
MV_{ox}, MV_{red}	oxidiertes Methylviologen, reduziertes Methylviologen
NAD(P)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (2`-Monophosphat)
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (2`-Monophosphat), reduzierte Form
NAP	periplasmatische Nitratreduktase
n.n.	nicht nachweisbar
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
OD_{436}	Optische Dichte bei 436 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRK	Phosphoribulokinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RubisCo	Ribulosebisphosphat-Carboxylase
S	Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
UV/vis	ultaviolett/sichbares Licht
v/v	Volumen pro Volumen
V_{max}	Maximale Substratumsatzgeschwindigkeit
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

Kohlenmonoxid (CO) ist ein geruch- und farbloses, giftiges und brennbares Gas. Es entsteht hauptsächlich bei der unvollständigen Verbrennung fossiler Brennstoffe. Natürliche Quellen sind z.B. die Vegetation, Weltmeere, Vulkangase sowie Photodissoziation und elektrische Entladungen in der höheren Atmosphäre. Für warmblütige Tiere und Menschen ist CO ein Atemgift. Dabei beruht die Giftigkeit von Kohlenmonoxid auf der Reaktion mit dem Hämoglobin des Blutes und seiner höheren Affinität zu terminalen Cytochrom-Oxidasen. Unter natürlichen Bedingungen wird CO durch abiotische oder biologische Reaktionen zu CO_2 oxidiert. Zahlreiche aerobe und anaerobe Bakterien aus dem Reich der Bakterien und dem Reich der Archaea sind in der Lage, CO zu CO_2 zu oxidieren und dabei CO als Energie- und Kohlenstoff-Quelle zu verwenden (Conrad und Seiler 1980).

1.1 Mikrobielle CO-Oxidation

Der anthropogene CO-Ausstoß in Deutschland beträgt pro Jahr 4.593 kt (European Communities Report, 2001). Durch zunehmende Industrialisierung und verstärktes Verkehrsaufkommen steigt die CO-Emission kontinuierlich. Den größten Anteil an der Kohlenmonoxidemission verursacht im allgemeinen der Pkw-Verkehr, gefolgt von Haushaltsfeuerungen. In der Natur ist der Boden eine der wichtigsten CO-Senken und zahlreiche Mikroorganismen sind verantwortlich dafür, dass nur Spuren (0,06 bis 0,15 ppm) von CO in der Atmosphäre vorkommen (Mörsdorf *et al*. 1992). Alle Bakterien und Archaeen, die die Fähigkeit zur Nutzung von CO haben, gehören zu den folgenden Gruppen: carboxidotrophe, hydrogenogene, acetogene, phototrophe und sulfidogene Mikroorganismen.

Aerobe, CO-oxidierende Mikroorganismen sind ubiquitär und kommen in unterschiedlichen Ökosystemen wie z.B. in Boden und Wasser, in Kläranlagen aber auch in der Deckschicht von Kohlemeilern vor. Sie gehören zur Gruppe der aeroben, carboxidotrophen Bakterien. Es handelt sich überwiegend um Gram-negative, aber auch gram-positive Bakterien, zu denen z.B. *Streptomyces thermoautotrophicus* (Gadkari *et al*. 1990) und einige *Mycobaterium* spp. (Park *et al.* 2003) gehören.

Die typische Eigenschaft der carboxidotrophen Bakterien ist ihre Fähigkeit, CO als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle in einem chemolithoautotrophen Stoffwechsel zu verwerten. CO wird zu Kohlendioxid (CO_2) oxidiert, das weiter über den *Calvin-Benson-Bassahm* (CBB-Zyklus) assimiliert wird (Meyer und Schlegel 1983, Meyer 1989). Carboxidotrophe Bakterien betreiben einen aeroben, respiratorischen Stoffwechsel mit Sauerstoff und in einigen Fälle auch mit Nitrat oder Nitrit als Elektronenakzeptor (Mörsdorf *et al.* 1992).

Das Schlüsselenzym für die aerobe CO-Oxidation von *Oligotropha carboxidovorans*, ein Vertreter der carboxidotrophen Bakterien, ist ein metallhaltiges Enzym, das unter anderem Molybdän und Kupfer enthält (Dobbek *et al.* 2002). Die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* wurde bis auf das atomare Niveau erforscht und ihre Struktur und Funktion aufgeklärt (Meyer *et al.* 2000).

CO wird aber auch durch anaerobe Oxidationsprozesse umgewandelt, wobei verschiedene Produkte wie Methan, Essigsäure, Buttersäure, Ethanol und Butanol gebildet werden. Außerdem kann während der CO-Oxidation auch wie bei den phototrophen oder chemolithoautotrophen Mikroorganismen Wasserstoff (H_2) gebildet werden (Mörsdorf *et al.* 1992). Svetlitchnyi und Mitarbeiter (2001) schlugen unter anderem die Bezeichnung „Hydrogenogens" für die anaerobe Mikroorganismen-Gruppe vor, die während der CO-Oxidation H_2 als Endprodukt bildet. Im „commercial process" wird H_2 über die „water-gas-shift"-Reaktion gebildet und benötigt hohe Temperatur und hohen Druck. In Hinblick auf das gegenwärtige Interesse an Wasserstoff als Energiequelle kann die biologische Produktion von Wasserstoff eine sehr vielversprechende Reaktion sein (Sipma *et al*. 2003). Die Mikroorganismen, die bei 30° C und Normaldruck während der CO-Oxidation Wasserstoff bilden, stellen eine interessante biologische Alternative zur chemischen H_2-Bildung dar.

1.1.1 Die Nutzung von CO durch *Oligotropha carboxidovorans*

O. carboxidovorans OM5 (DSM 1227, früher *Pseudomonas carboxydovorans*, (Meyer *et al*. 1993a) ist in der Lage, unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen CO als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Das Schlüsselenzym für die Verwertung von CO ist die CO-Dehydrogenase (Meyer 1982). *O. carboxidovorans* besitzt eine verzweigte

Atmungskette, die sowohl einen CO-insensitiven als auch einen CO-sensitiven Zweig besitzt (Meyer *et al*. 1986).

CO-Dehydrogenase ist während des Wachstums zu etwa 87% in der Cytoplasmamembran assoziiert und beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase partiell zu etwa 50% von der Membran dissoziiert (Meyer und Rohde 1984, Rohde *et al.* 1985). Der verbleibende Anteil der CO-Dehydrogenase in der Cytoplasmamembran dient der Gewinnung von Energie. Die gebildeten Elektronen aus der CO-Oxidation werden über den membrangebundenen physiologischen Elektronenakzeptor Cytochrom b_{561} in die CO-insensitive Atmungskette eingeschleust (Jacobitz und Meyer 1989, Meyer *et al.* 1990, Meyer *et al*. 1993c).

$$CO + H_2O + 2\ \text{Cyt}\ b_{561}\ (ox) \longrightarrow CO_2 + 2\ H^+ + 2\ \text{Cyt}\ b_{561}\ (red)$$

Die Elektronen werden durch die terminale Cytochrom-Oxidase b_{561} auf Sauerstoff übertragen und befähigen damit *O. carboxidovorans* zu einem respiratorischen Stoffwechsel mit CO (Cypionka und Meyer 1983, Meyer *et al*. 1990, Meyer *et al*. 1993c). 16% des gebildeten CO_2 aus der CO-Oxidation werden über den reduktiven Pentosephosphatcyclus (Calvin-Cyclus) in Biomasse umgewandelt. Ribulosebisphosphat-Carboxylase (RubisCo) und Phospho-ribulokinase (PRK) sind die weiteren Schlüsselenzyme des carboxidotrophen Stoffwechsels. Für die CO_2-Fixierung ist die Bereitstellung der Reduktionsäquvalente in Form von NAD(P)H/H^+ erforderlich. Diese werden bei autotrophem Wachstum mit CO über einen rückläufigen, vom Membranpotential abhängigen Elektronentransport bereitgestellt (Meyer *et al*. 1986, Jacobitz und Meyer 1986). Wächst *O. carboxidovorans* mit organischen Substraten, fließen die Elektronen über den Ast der CO-sensitiven Atmungskette, über Cytochrom b_{558} und Cytochrom *c* auf die terminale Oxidase Cytochrom a_1 (Cypionka und Meyer 1983). Wie die anderen carboxidotrophen Bakterien ist *O. carboxidovorans* in der Lage, mit H_2 als Energiequelle und CO_2 als C-Quelle zu wachsen. Eine membrangebundene Hydrogenase, die zu den Klasse-I-Hydrogenasen gehört, katalysiert dabei die Oxidation von H_2 (Santiago und Meyer 1997). Die entstehenden Elektronen aus der H_2-Oxidation werden auf einen noch nicht

identifizierten primären Elektronenakzeptor übertragen und von diesem in die Atmungskette eingeschleust (Santiago 1994).

1.1.2 Die Nutzung von CO durch *Streptomyces thermoautotrophicus*

S. thermoautotrophicus ist ein thermophiles, CO- und H_2-oxidierendes, obligat chemolithoautothrophes Bakterium, das aus der Deckschicht eines Kohlemeilers isoliert wurde (Gadkari *et al.* 1990). Durch die CO-Dehydrogenase kann dieser Organismus unter aeroben Bedingungen CO als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. *S. thermoautotrophicus* besitzt eine ähnliche, verzweigte Atmungskette wie *O. carboxidovorans*. Allerdings enthält *S. thermoautotrophicus* neben den Cytochromen Typ b, c und a zusätzlich ein Cytochrom des Typs d, das Cyanid insensitiv ist (Fuchs 1992).

Unter CO- oder H_2-autotrophen Bedingungen ist *S. thermoautotrophicus* in der Lage, sich in N-freiem Medium zu vermehren. Deshalb stellt *S. thermoautotrophicus* den ersten bekannten Organismus dar, der während des Wachstums mit CO oder H_2 auch Stickstoff fixieren kann (Gadkari *et al.* 1992). CO-Dehydrogenase (St3-Protein) produziert im Zuge der CO-Oxidation Superoxidradikale durch einen Elektronentransfer auf Sauerstoff. Dieses Radikal wird anschließend durch eine Mangan-haltige Superoxid-Oxidoreduktase (St2-Protein) reoxidiert. Der Vorgang der Elektronenübertragung vom St3-zum St2-Protein durch $O_2^{\cdot -}$ stellt eine molekulare Kopplung dar. Am Ende der Reaktionssequenz reduziert das St2-Protein das St1-Protein. Das reduzierte St1-Protein katalysiert die Reduktion von N_2 und H_2 (Ribbe *et al*. 1997).

1.2 Die typischen Eigenschaften der CO-Dehydrogenase

Die Kristallstrukturen (Abb. 1-1) der CO-Dehydrogenase aus dem aeroben, carboxidotrophen Bakterium *O. carboxidovorans* zeigen ein aus zwei Heterotrimeren aufgebautes Dimer mit zwei elektronisch unabhängigen katalytischen Einheiten (Dobbek *et al*. 1999, Dobbek *et al*. 2002). Ein Heterotrimer besteht aus: 1) Molybdoprotein (L-Untereinheit), in dem sich das katalytische Zentrum befindet, 2) Flavoprotein (M-Untereinheit), das das FAD enthält und 3) Eisenschwefelprotein (S-Unterheit), mit den zwei FeS-Zentren (Dobbek *et al*. 1999, Gremer *et al*. 2000).

Die L-Untereinheit (CoxL) wird als Molybdo-Cupro-Protein bezeichnet. Ihre molekulare Masse liegt bei 88,7 kDa. Neben dem Cu enthält sie auch Mo und den molybdänbindenden Kofaktor Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid (MCD). Das MCD ist ein tricyclisches Pyranopterin-Derivat, das aus einem bicyclischen Pterin und einem daran kondensierten Pyranring besteht (Meyer *et al*. 1993b). Das Mo wird vom Endithiolat des MCD koordiniert.

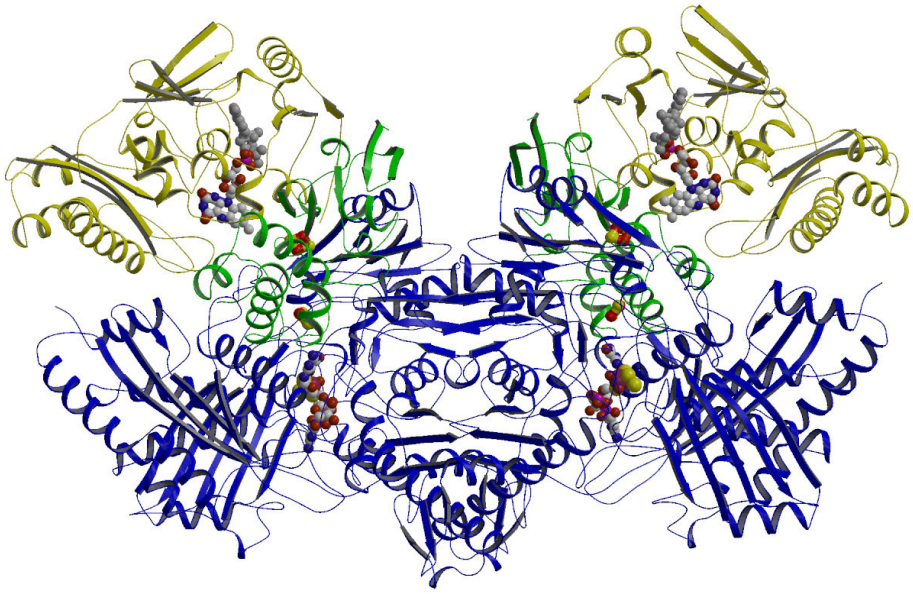


Abb. 1-1 Kristallstruktur der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Die Sekundärstrukturelemente des Dimers der CO-Dehydrogenase. Die mittlere Untereinheit, das Flavoprotein (CoxM), ist in gelb, die kleine Untereinheit, das Eisen-Schwefel-Protein (CoxS), in grün und die große Untereinheit, das Molybdoprotein (CoxL), in blau dargestellt.

Die M-Untereinheit (CoxM), die als Flavoprotein bezeichnet wird, hat ein Molekulargewicht von 30.2 kDa. Sie enthält den nicht-kovalent gebundenen Kofaktor FAD. Rekombinantes CoxM, das heterolog in *E. coli* synthetisiert wird, zeigt keine Affinität zu FAD (Gremer *et al.* 2000). Durch die Interaktion des FAD-freien rekombinaten CoxM mit CoxL und CoxS werden in CoxM Konformationsänderungen induziert, womit eine FAD-Bindung ermöglicht wird (Gremer *et al.* 1999, 2000). Die S-Untereinheit (CoxS) hat eine molekulare Masse von 17,8 kDa und enthält zwei [2Fe-2S]-Gruppen, die im ESR-Spektrum Unterschiede aufweisen und mit Typ I und Typ II bezeichnet werden (Meyer *et*

al. 1993c, Gremer *et al.* 2000). Das Fe-S-Zentrum vom Typ I liegt an der Kontaktfläche zwischen der L- und der S-Untereinheit, das Fe-S-Zentrum vom Typ II liegt an der Kontaktfläche der S- und der M-Untereinheit.

Die katalytischen Einheiten der beiden Heterotrimere der CO-Dehydrogenase sind unabhängig voneinander. Die Elektronen fließen aus der CO-Oxidation vom [$CuSMoO_2$]-Cluster über den Mo-Kofaktor und den [2Fe-2S]-Zentren Typ I und Typ II weiter auf FAD und werden von dort auf den physiologischen Akzeptor übertragen (Dobbek *et al.* 1999, Meyer *et al*. 2000). Die Elektronen können auch an nicht-physiologische Elektronenakzeptoren wie oxidiertes Methylenblau, Thionin, Toluylenblau, Dichlorphenol-indophenol (DCPIP), Pyocyanin, sowie 2-(4-Iodphenyl)-3(4-nitrophenyl)5-phenyl-2H-Tetrazolium-chlorid (INT)/1-Methoxy-phenazin-5-Methosulfat (MPMS) abgegeben werden (Meyer 1982, Kraut *et al*. 1989, Meyer *et al.* 1993c). In Gegenwart von molekularem Sauerstoff (O_2) werden die Elektronen auf O_2 übertragen; dabei werden Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid gebildet, die zur Inaktivierung des Enzyms führen (Oberfrank 1997).

Inkubiert man in Anwesenheit von Reduktionsmitteln unter anoxischen Bedingungen gereinigte CO-Dehydrogenase mit Nitrat, wird dieses zu Nitrit reduziert. Dithionit-reduziertes Methyl- oder Benzylviologen sind die geeigneten Elektronen-Donoren für die Nitrat-Reduktion (Meyer *et al*. 1993c). Im Gegensatz zur normalen Nitratreduktase konnten $NAD(P)+H^+$ oder $FADH_2$ nicht als Elektronen-Donor für die CO-Dehydrogenase dienen. Das Mo-Zentrum der CO-Dehydrogenase ist funktional an der Nitrat-Reduktion beteiligt. CO kann als Elektronen-Donor während der Nitrat-Reduktion fungieren (Meyer *et al.* 1993c). Xanthin, Hypoxanthin, Purin, Adenin, Allupurinol, Formaldehyd und Salicylaldehyd werden von CO-Dehydrogenase nicht umgesetzt (Meyer *et al*. 1993c).

1.2.1 Das aktive Zentrum der oxidierten CO-Dehydrogenase

Das aktive Zentrum, die Stelle, an der die CO-Oxidation stattfindet, ist in der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* im Molybdoprotein (CoxL) lokalisiert. Im Gegensatz zu den bereits strukturell charakterisierten Vertretern der Familie der einkernigen Molybdän-Hydroxylasen enthält das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase die Metalle Mo und Cu. Die Abstände der Atome wurden sowohl

durch Röntgenabsorptions-Feinstruktur-Spektroskopie (EXAFS) (Gnida *et al.* 2003), als auch durch Röntgenkristallographie (Dobbek *et al.* 2002) bestimmt. Das Molybdän, im Oxidationszustand +VI, wird durch die beiden Dithiolen-Schwefel vom MCD koordiniert und trägt in der apikalen Position eine Oxo-Gruppe. Als weitere, äquatoriale Liganden sind eine Hydroxo-Gruppe (Kristallstruktur) bzw. eine Oxo-Gruppe (Röntgenabsorption) sowie ein Schwefelatom vorhanden. Diese Unsicherheit bezüglich der Mo-O-Liganden beruht auf unterschiedlichen Abstandsinformationen, die mit den beiden verwendeten Methoden gewonnen wurden.

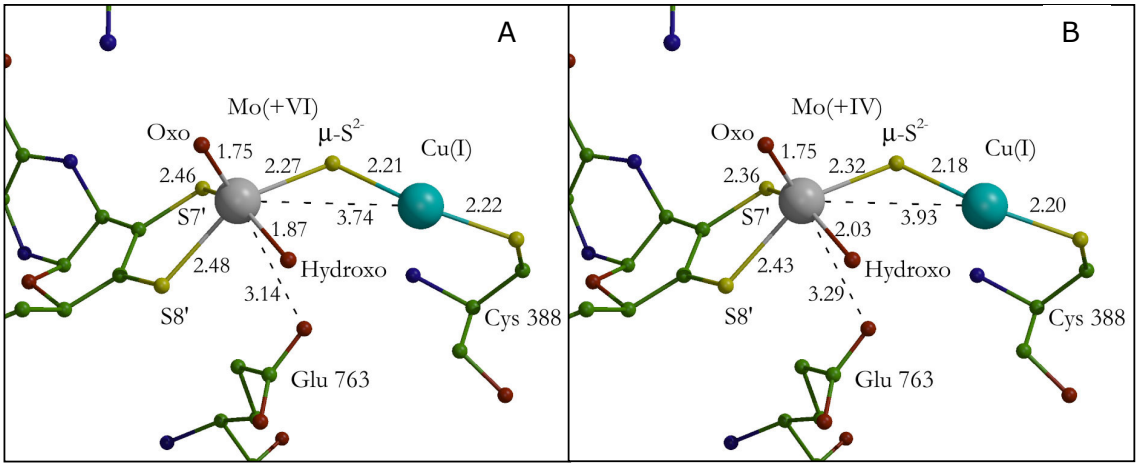


Abb. 1-2 Das oxidierte (A) und reduzierte (B) aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (aus Dobbek *et al*. 2002)

Die Strukturen der oxidierten (A) und der reduzierten CO-Dehydrogenase (B) sind kaum zu unterscheiden und zeigen die gleiche aktive Zentrumsgeometrie. Die Abstände der Atome hingegen unterscheiden sich. Das aktive Zentrum besteht aus einem bimetallischen [$CuSMoO_2$]-Cluster, in dem die beiden Metalle über einen μ-sulfido Liganden verbrückt sind. Am Mo (+VI) (oxidierter Zustand) oder Mo (+IV) (reduzierter Zustand) ist die Gruppe über die Endithiolatgruppe des MCD-Cofaktors koordiniert. Am Cu (I) (immer gleich, liegt entweder im oxidierten oder reduzierten Zustand vor) wird die Gruppe vom γS des Cystein 388 gehalten. Das Mo trägt auch eine apikale Oxogruppe und ein äquatoriales O-Atom, das als Hydroxygruppe modelliert wurde. Glutamat 763 interagiert mit seinem Carboxylatom (Oε2) mit dem Mo-Ion in trans-Position zur Oxogruppe und bildet Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren des „active site loop" (aus Dobbek *et al.* 2002). Die Zahlen repräsentieren die Abstände zwischen den Atomen in Å.

Im oxidierten Zustand liegt das Cu-Atom in der Oxidationsstufe +I vor und ist an den Schwefel des Cysteinrestes 388 der L-Untereinheit kovalent gebunden. Mo und Cu sind über ein anorganisches S-Atom verbrückt, das als *μ*S bezeichnet wird (Abb. 1-2A). Aus den Positionsinformationen für Mo, *μ*S und Cu ergibt sich ein Bindungswinkel Mo-*μ*S-Cu von 113° und der *μ*S-Cu-S-Bindungswinkel liegt bei 156° (Dobbek *et al*. 2002).

Die Aminosäuresequenz im Bereich des aktiven Zentrums ist spezifisch (VAYRC^{388}SFR) für die CO-Dehydrogenase. Das Cystein 388 koordiniert mit seinem Sγ das Cu-Atom des aktiven Zentrums. Zudem liegen die Aminosäuren Glutamin 240 und Glutamat 763 in Wasserstoffbrückendistanz zu den O-Liganden des Mo. Oε2 des Glutamats 763 besitzt eine negative Ladung, die die positive Ladung des Mo kompensieren könnte. Glutamat 763 bindet über Wasserstoffbrücken zu Serin 389 an der „active site loop" (Dobbek *et al*. 2002).

1.2.2 Das aktive Zentrum der reduzierten CO-Dehydrogenase

Die Reduktion der CO-Dehydrogenase durch CO, H_2 oder Dithionit unter anoxischen Bedingungen wird von einer Farbänderung von dunklem Braun zu hellem Grün-Braun begleitet. Bei der Reduktion der CO-Dehydrogenase liegt das Molybdän in einer reduzierten Form (Mo(IV)) vor. Das Cu bleibt aber in seinem Oxidationszustand +I (Gnida *et al.* 2003). Unabhängig von der Art des Reduktionsmittels (CO, H_2 oder Dithionit) sind die Strukturen der oxidierten und reduzierten CO-Dehydrogenase kaum zu unterscheiden und zeigten die gleiche aktive Zentrumsgeometrie (Dobbek *et al*. 2002). Unter reduziertem Zustand finden deutliche Distanzänderungen statt zwischen den beiden Metallatomen Mo und Cu von 3,70 Å auf 4,23 Å (Röntgenabsorption) (Gnida *et al*. 2003) bzw. von 3,74 Å auf 3,93 Å (Kristallstruktur) (Abb. 1-2B) (Dobbek *et al*. 2002). Die Abstände der O-Liganden des Mo betragen nach Reduktion apikal 1,70 Å und äquatorial 2,16 Å. In der Kristallstruktur bleibt der Abstand der apikalen Oxogruppe zum Mo bei 1,75 Å. Der Abstand der Hydroxygruppe zum Mo steigt auf 2,03 Å. In der Röntgenabsorption des reduzierten aktiven Zentrums wird die äquatoriale Oxogruppe zur Hydroxygruppe (Gnida *et al*. 2003). Der *μ*S vergrößert seinen Abstand zum Mo ebenfalls von 2,27 Å auf 2,32 Å (Kristallstruktur) bzw. von 2,29 Å auf 2,35 Å (Röntgenabsorption). Die Abstände des Cu zum *μ*S und zum S_λ ändern sich kaum. Das Carbonyl-O des Glutamats

763 entfernt sich vom Mo von 3,14 Å auf 3,29 Å. Der Mo-μS-Cu-Winkel steigt von 112° auf 122°, der S-Cu-S-Winkel von 156° auf 160° (Dobbek *et al*. 2002). Sowohl die Röntgenabsorption als auch die Kristallstruktur zeigen, dass sich im reduzierten aktiven Zentrum weder Substrat (CO, H_2) noch Reduktionsmittel befindet (Dobbek *et al*. 2002, Gnida *et al*. 2003).

Während CO und H_2 nur das redoxaktive katalytische Zentrum der CO-Dehydrogenase reduzieren, werden durch Dithionit alle redoxaktiven Gruppen und Kofaktoren (Mo, FeS I, FeS II, FAD), reduziert was nicht unbedingt mit der katalytischen Aktivität der CO-Dehydrogenase übereinstimmt. Die inaktive rekombinante CO-Dehydrogenase OM-12/pJRDMSL, die ein defektes katalytisches Zentrum besitzt, kann durch Dithionit reduziert werden. Die dabei im UV/vis-Absorptionsspektrum beobachtete Bleichung wurde als Funktionalität der [2Fe2S]-Zentren und des FAD interpretiert (Ferner 2001). In Anwesenheit von CO oder H_2 wird dieses defekte Zentrum nicht reduziert. Im rekombinanten Enzym können somit keine während der CO-Oxidation entstandenen Elektronen auf die redoxaktiven Kofaktoren übertragen und diese reduziert werden. Aus den röntgenabsorptionsspektroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass das aktive Zentrum der rekombinanten CO-Dehydrogenase weder cyanolysierbaren Schwefel noch Kupfer enthält. Das aktive Zentrum rekombinanter CO-Dehydrogenase kann somit als L_2MoO_3-Struktur beschrieben werden, die aus Dithiolen-Schwefeln (L_2) des Molybdänkofaktors sowie drei Oxo-Gruppen besteht (Ferner 2001).

1.2.3 Der Mechanismus der CO Oxidation

CO-Dehydrogenase katalysiert die CO-Oxidation zu CO_2, zwei Protonen und zwei Elektronen (Kap. 1.2.1). Durch freigesetzte Elektronen aus der CO-Oxidation wird das Molybdän reduziert. Ein intakter [$CuSMoO_2$]-Cluster wird zur Durchführung der CO-Oxidation benötigt (Kap. 1.2.2). Es gibt noch keine Aussagen über die Art der Substratbindung an das aktive Zentrum, weil weder durch die Röntgenabsorption noch durch die Kristallstruktur ein CO-Molekül am aktiven Zentrum erkennbar ist. Jedoch kann man an Hand der Daten aus der Struktur des aktiven Zentrums mit dem irreversibel gebundenen Inhibitor n-Butylisocyanid ein Modell für den Reaktionmechanismus der CO-Oxidaton aufstellen (Abb. 1-3)(Dobbek *et al.* 2002). In der Reaktion von n-Butylisocyanid

mit dem bimetallischen Cluster der CO-Dehydrogenase wird ein Thiocarbonat-Übergangszustand gebildet. Entsprechend dem Modell wird CO zwischen dem Cu, dem µ-Sulfido-Liganden und der äquatorialen Hydroxogruppe des bimetallischen Clusters koordiniert. Das O-Atom vom CO bindet an das Cu-Atom und das C-Atom koordiniert den *µ*S und den äquatorialen O-Liganden des Mo. Durch die Entspannung des aktiven Zentrums bei der Abstandszunahme zwischen Cu und Mo wird wahrscheinlich der Austausch des Cu-Liganden erleichtert.

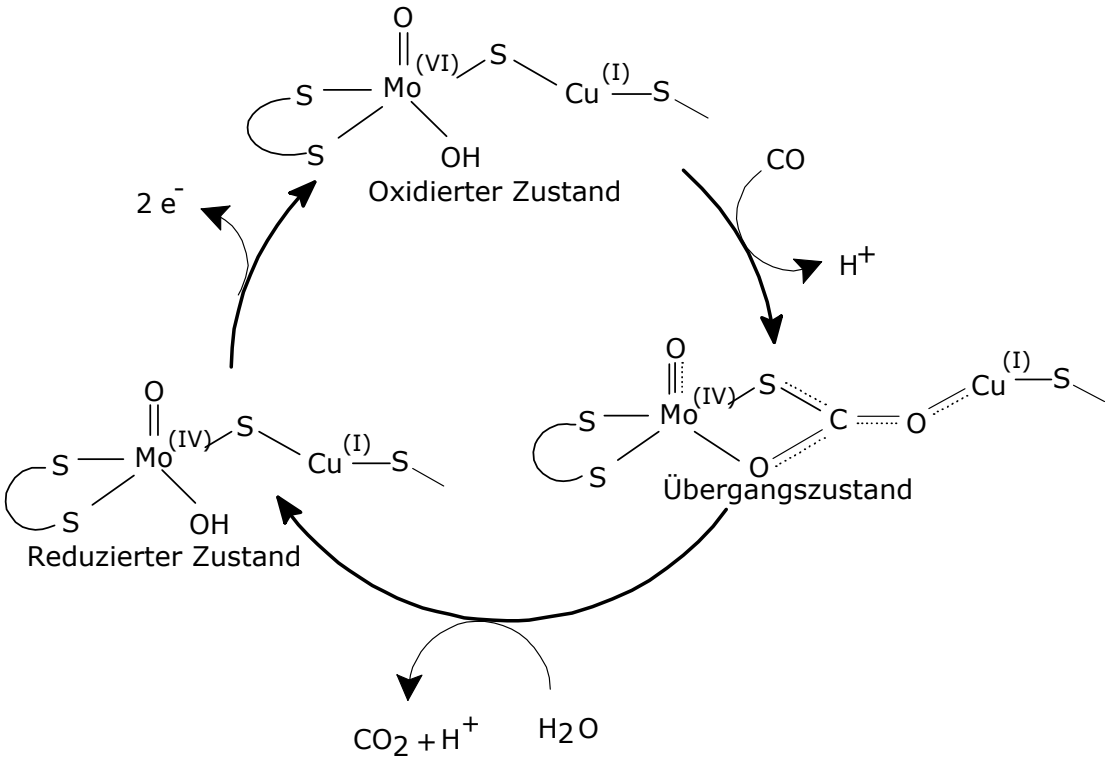


Abb. 1-3 Hypothetischer Reaktionsmechanismus der CO-Oxidation durch CO-Dehydrogenase

Der Reaktionszyklus beginnt mit der Integration des CO in das oxidierte [CuSMo(=O)OH]-Zentrum zwischen dem Cu, dem S- und dem äquatorialen O-Liganden des Mo. Im Übergangszustand erfolgt ein nukleophiler Angriff des äquatorialen O-Atoms am CO. Dadurch entsteht ein Thiocarbonat-Zustand und Mo(VI) wird zu Mo(IV) reduziert. Das Thiocarbonat löst sich durch Abgabe von CO_2 auf. Der äquatoriale O-Ligand wird durch H_2O ersetzt. Mo wird durch Abgabe von Elektronen an die intramolekulare Elektronentransportkette wieder zum Ausgangszustand oxidiert (Dobbek *et al*. 2002).

Im Thiocarbonat-Übergangszustand bewegt sich das Cu weg vom Mo, dadurch verursacht es den "geöffneten Zustand" des Clusters. Eine Funktion des Oε2 von Glu-763 ist wahrscheinlich die Stabilisierung des Mo(+VI) Zustandes. Folglich könnte die Zunahme des Mo····Oε2-Abstandes, sowie der Zustand des gebundenen n-Butylisocyanids, für die Stabilisierung des Mo(+VI) ausschlaggebend sein und seine Reduktion einleiten. Vermutlich ist der *μ*S, der mit dem C-Atom vom CO koordiniert, an der Elektronenübertragung zum Mo beteiligt. Außerdem erhöht die Bindung des S an das C-Atom vom CO dessen Elektrophilie und ermöglicht den Angriff der äquatorialen Hydroxy- bzw. Oxogruppe und damit die Bildung des CO_2. In diesem Übergangszustand, in dem das C-Atom des CO sowohl mit dem O-Atom als auch mit dem *μ*S koordiniert ist, liegt das C-Atom bereits auf Oxidationsstufe (IV) vor. Entlassen wird das gebildete CO_2 durch ein konzertiertes Schließen der Struktur des aktiven Zentrums und gleichzeitiges Ersetzen der Hydroxy- bzw. Oxogruppe am Mo aus dem H_2O der Umgebung. Das Mo(IV) wird dann durch die Abgabe der Elektronen an die Fe-S-Zentren der S-Untereinheit wieder zum Ausgangszustand Mo(VI) oxidiert. Der Weg der Elektronen verläuft weiter auf das FAD der M-Untereinheit und von dort auf einen externen Elektronenakzeptor (Dobbek *et al*. 2002).

1.3 Die Reaktivität des [$CuSMoO_2$]-aktiven Zentrums mit Inhibitoren und Substratanalogen

1.3.1 Cyanid

Die CO-Dehydrogenase wird durch Cyanid inaktiviert (Meyer und Schlegel 1983). Inkubation mit 5 mM Cyanid führte zur Hemmung der CO-Dehydrogenase-Aktivität und im Zeitraum von 10 h wurde 1,91 mol Rhodanid (SCN^-) pro mol Enzym gebildet (Gremer 2000). Im Vergleich zu nativer CO-Dehydrogenase zeigte Cyanid-inaktivierte CO-Dehydrogenase unterschiedliche ESR- und UV/vis-Spektren. Im ESR-Spektrum der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase bei 16 K war das Desulfo-Mo(+V)-Signal sehr schwach erkennbar, das rhombische Signal des Typ-I-[2Fe-2S]-Zentrums sowie die Charakteristika des Typ-II-[2Fe-2S]-Zentrums blieben wie in der nativen CO-Dehydrogenase (Gremer, 2000). Das UV/vis-Spektrum der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase zeigte eine zunehmende Bleichung des Enzyms im visuellen Bereich von ca. 300 bis 600 nm.

Kristallographische Untersuchungen zeigten, dass die Cu-Ionen und der *μ*-Sulfido-Ligand vom aktiven zweikernigen Zentrum der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase entfernt wurden und nur das monokernige Zentrum mit drei O-Liganden übrig blieb (Abb. 1-4A)(Dobbek *et al*. 2002). Die Cu-Ionen wurden durch Cyanid-Behandlung auch entfernt und konnten als Cu(+II) oxidiert werden. Das Mo(VI) im aktiven Zentrum wird von drei Oxogruppe koordiniert (plus 2 Dithiolatgruppen des MCD) (Dobbek *et al.* 2002). Die Reaktivierung der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase ist allerdings nicht so leicht wie die der Xanthin-Dehydrogenase, weil hier nicht nur die Sulfido-Liganden sondern auch das Cu-Ion fehlen.

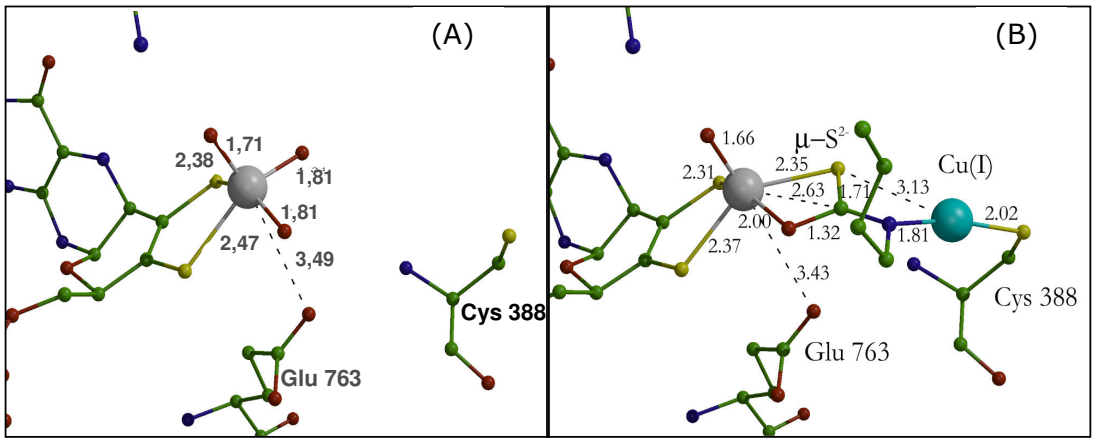


Abb. 1-4 Das aktive Zentrum der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase (A) und die Bindung des n-Butylisocyanids im [CuSMoO$_2$]-Cluster (B) (aus Dobbek *et al.* 2002)

(A) Das Mo-Zentrum des Cyanid-inaktivierten Enzyms wird vom Endithiolat des MCDs und drei Oxo-Gruppen koordiniert (Dobbek *et al.* 2002). (B) Das N-Atom bindet am Cu und das C-Atom des n-Butylisocyanids bindet am *μ*S und an der Hydroxygruppe des Mo (Dobbek *et al*. 2002). Die Zahlen repräsentieren die Abstände zwischen den Atomen in Å**.**

1.3.2 n-Butylisocyanid

Inkubiert man oxidierte CO-Dehydrogenase mit n-Butylisocyanid, so wird das Enzym inaktiviert. Isocyanid und CO haben ähnliche chemische Strukturen, da beide ein terminales, sp-hybridisiertes C-Atom mit freiem Elektronenpaar besitzen. Deshalb ist n-Butylisocyanid ein sehr effektiver substratanaloger

Inhibitor der CO-Oxidation (Dobbek *et al*. 2002). Im Gegensatz zu der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase ist das zweikernige Zentrum der n-Butylisocyanid-intaktivierten CO-Dehydrogenase intakt geblieben. Die Metalle Cu und Mo der n-Butylisocyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase liegen im Oxidationszustand +I und +IV vor. Die Kristallstruktur der n-Butylisocyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase zeigt die Bindung der Isocyanid-Gruppe am [$CuSMoO_2$)-Cluster (Abb. 1-4B). Während das C-Atom des n-Butylisocyanids am μS und an der Hydroxygruppe des Mo gebunden wird, bindet das N-Atom des n-Butylisocyanids am Cu. Die organische n-Butyl-Gruppe ist im Substratkanal positioniert (Dobbek *et al*. 2002).

1.3.3 Acetylen

Die Luft-oxidierte CO-Dehydrogenase wurde durch Acetylen innerhalb kurzer Zeit vollständig irreversibel gehemmt. Ein komplexes ESR-Signal wurde vom Acetylen-inaktivierten Enzym identifiziert, das mit Dithionit reduziert wurde. Es zeigt aber keine Ähnlichkeit mit dem Signal vom nativen Enzym (Egerer 2003).

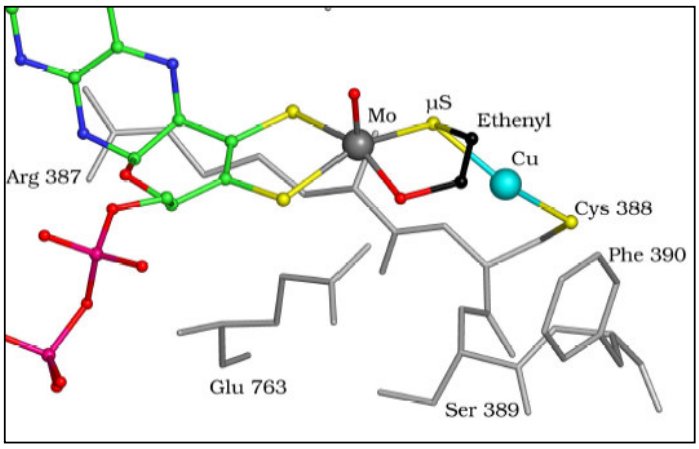


Abb. 1-5 Röntgenkristallstruktur der Bindung von Acetylen an das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase (aus Egerer 2003)

Acetylen bindet mit seinem C2-Atom an den μS des aktiven Zentrums, mit dem C1-Atom an die äquatoriale Hydroxygruppe des Mo. Es entsteht ein Fünfring aus den beiden C-Atomen des Acetylens, dem äquatorialen Hydroxy-O, dem Mo und dem anorganischen μS. Die Dreifachbindung des Acetylens wird zur Doppelbindung (Ethenylgruppe) (Egerer 2003).

Daraufhin wurden die Kristalle der CO-Dehydrogenase mit Acetylen inaktiviert und analysiert. Die Struktur des Acetylen-inaktivierten Enzyms (Abb 1-5) bei 1,3 Å zeigt, dass das Acetylen am aktiven Zentrum gebunden wurde. Acetylen bildet zusammen mit dem Mo, dem *μ*S und dem Hydroxy-O einen Fünfring aus. Das C1-Atom des Acetylens bindet an dem anorganischen *μ*S und das C2-Atom geht eine Bindung mit der äquatorialen Hydroxygruppe des Mo ein (Egerer 2003).

1.4 Die Nickel-haltigen CO-Dehydrogenasen

Im Gegensatz zu den aeroben Bakterien ist das Schlüsselenzym der anaeroben CO-Oxidationen die Nickel- und Eisen-haltige CO-Dehydrogenase. Nickelhaltige CO-Dehydrogenasen (Ni-CO-Dehydrogenasen) verschiedener Herkunft sind phylogenetisch verwandt, aber ihre metabolische Funktion, Untereinheiten-zusammensetzung und katalytische Aktivitäten sind unterschiedlich (Lindhal 2002).

Die monofunktionale Ni-CO-Dehydrogenase katalysiert eine Reaktion, die mit CO und Wasser CO_2, zwei Elektronen und zwei Protonen bildet. In acetogenen, methanogenen und sulfidogenen Bakterien bilden Ni-haltige CO-Dehydrogenasen bifunktionelle Komplexe mit einem weiteren Ni-haltigen Enzym, der Acetyl-CoA-Synthase (Ragsdale und Kumar 1996, Ragsdale 2000).

Carboxydothermus hydrogenoformans, ein strikt anaerobes Bakterium, das zur physiologischen Gruppe der „Hydrogenogens" gehört, synthetisiert zwei unterschiedliche membranassoziierte NiFe-CO-Dehydrogenasen, die zwei verschiedene Funktionen haben. CO-Dehydrogenase I hat eine katabolische Funktion und überträgt die aus der CO-Oxidation stammenden Elektronen über Protein B auf eine protonentranslozierende Hydrogenase (Svetlitchnyi *et al*. 2001). Die CO-Dehydrogenase II hat eine anabolische Funktion. Die Oxidation von CO wird an die $NADP^+$-Reduktion zu NADPH + H^+ gekoppelt und ein Teil des CO_2 für die Kohlenstoffassimilation bereitgestellt. Die Kristallstruktur der CO-Dehydrogenase II aus *C. hydrogenoformans* wurde mit einer Auflösung von 1.6 Å aufgeklärt (Dobbek *et al*. 2001). Dieses Enzym besteht aus einem Homodimer, das zwei miteinander kommunizierende Untereinheiten enthält, die über ein gemeinsames [4Fe-4S]-Zentrum (Cluster D) miteinander kovalent verknüpft sind. Darüberhinaus enthält das Dimer zwei weitere [4Fe-4S]-Zentren [Cluster B und B`] sowie zwei neuartige [Ni-4Fe-5S]-Zentren [Cluster C und C`]. Die

Metalle in Cluster C und C` werden über Cysteinreste und einen Histidinrest mit dem Protein verknüpft. Das Nickel wird von drei Schwefel-Atomen und durch einem Cystein-Schwefel als weitere Liganden koordiniert (Dobbek *et al*. 2001). Vermutlich findet die CO-Oxidation am [Ni-4Fe-5S]-Zentrum statt.

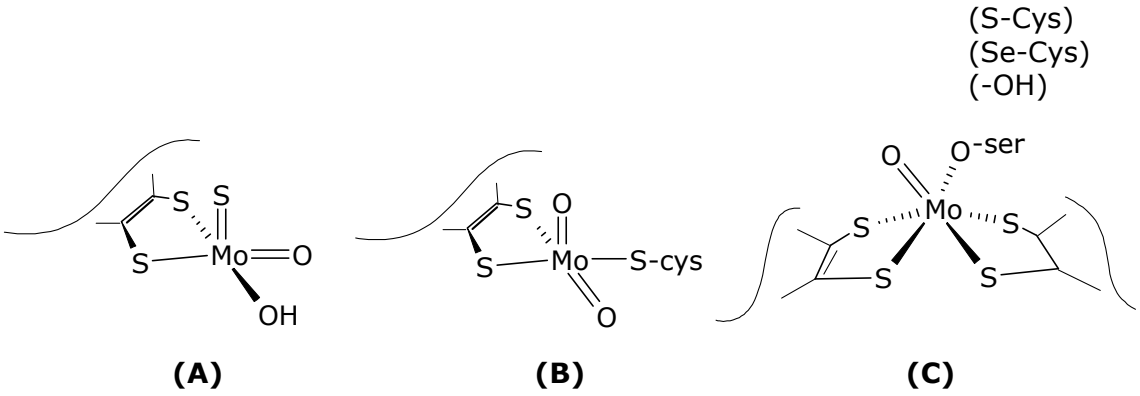
1.5 Molybdo-Enzyme

Molybdän (Mo) wurde 1930 zum erstenmal als Spurenelement identifiziert, das eine wichtige Rolle in der Stickstofffixierung spielt (Bortels 1930). Zahlreiche Enzyme (etwa 30) enthalten Molybdän. In manchen Molydoenzymen kann Mo durch W (Wolfram) ersetzt sein. Dies ist besonders bei (hyper) thermophilen anaeroben Bakterien (Hille 2002) der Fall, da eine W-Schwefel-Verbindung stabiler ist als eine Mo-Schwefel-Verbindung (Johson *et al*. 1996). Mo und W gehören im Periodensystem der Elemente zu den Übergangsmetallen.

Molybdo-Enzyme katalysieren zahlreiche, essentielle Reaktionen im Stickstoff-, Schwefel- und Kohlenstoff-Kreislauf (Hille 1996). Man kann die Molybdoenzyme unter zwei Grundformen einordnen: 1) Einkernige Molybdän-haltige Enzyme, 2) Mehrkernigen Eisen- und Molybdän-haltige Enzyme. Das Molybdän in den Nitrogenasen ist Bestandteil eines mehrkernigen Komplexes aus Molybdän, Eisen und Schwefel und wird als Eisen-Molybdän-Kofaktor (FeMoco) bezeichnet, (Howard und Rees 1996).

Auf Grund der Struktur ihres aktiven Zentrums und ihrer katalytischen Funktion wurden die einkernigen Molybdän-haltigen Enzyme in drei Familien gruppiert (Abb. 1-6) (Hille 2002): 1) Xanthin-Oxidase: diese enthält ein $Lmo^{VI}OS(OH)$-aktives Zentrum. L wurde als Pterin-Kofaktor beschrieben. Es handelt sich dabei um typische Enzyme, die die Hydroxylierung katalysieren. 2) Oxotransferasen: Sulfit-Oxidase-Familie, die ein $LMO^{VI}O_2$(S-Cys)-aktives Zentrum enthält. Eukaryotische Sulfit-Oxidase und assimilatorische Nitrat-Reduktase gehören zu dieser Gruppe. Sie katalysieren den Transfer eines Sauerstoffatoms, bzw. eines verfügbaren Elektronenpaars des Substrats. 3) Oxotransferase: Dimethyl-Sulfoxid-Reduktase (DMSO) Familie, die ein $L_2Mo^{VI}O(X)$-aktives Zentrum enthält. Molydän-Zentren dieser Gruppe werden mit zwei Pterin-Kofaktoren koordiniert. Die als (X) bezeichneten Liganden könnten ein Serin (in DMSO-Reduktase), ein Cystein (in Nitrat-Reduktase), ein Selenocystein (in Formiat-Dehydrogenase) oder ein Hydroxid/Wasser-Molekül (in Arsenit-Oxidase) sein. Mitglieder dieser

Gruppen katalysieren sowohl den Transfer von Sauerstoffatomen als auch die Hydroxylierung.



(A) **(B)** **(C)**

Abb. 1-6 Das aktive Zentrum der Xanthin-Oxidase (A), der Sulfit-Oxidase (B) und der Dimethyl-Sulfoxid-Reduktase (DMSO) (C) Familien (Hille 2002)

1.6 Azid als alternatives Substrat und Hemmstoff

Azid im anionischen Zustand weist die gleiche Ladung wie die betreffenden Elementanionen auf, wobei die Ladung weitgehend symmetrisch verteilt sein muss (kleine Dipolmomente der Atomgruppen, z.B null im Falle von N_3^-) (Wilberg 1995). Das Azidion ist linear und symmetrisch gebaut und es ist isoelektronisch mit CO_2.

Das Azidion ist ein „versatiler" (vielseitiger) Ligand, der mit den Übergangsmetallatomen in verschiedenen Koordinationen binden kann. Das Ergebnis davon sind ein-, zwei- oder mehrkernige Azidoligand-Komplexe. In Bezug auf Metallkomplexe gibt es mehrere Ligandenbindungen des Azidoliganden, z.B. „einzähnige" Monodentate-Typen oder von Ende zu Ende verbrückte (Busetto und Palazzi 1975).

Beck und Mitarbeiter (1969) berichteten, dass ein Azido-Metallkomplex durch CO zu Isocyanat umgesetzt wurde. Die Umwandlung von organischem Azid in Isocyanat ist jedoch nur bei höheren Temperaturen und hohem CO-Druck (250-300 Atmosphären) möglich (Bennet und Hardy 1968).

Nitrogenase ist bislang das einzige bekannte Enzym, das Azid reduzieren kann. Azid ist neben Distickstoff (N_2) ein alternatives Substrat für die Nitrogenase. Das Azid wird in folgenden Reaktionen reduziert (Dilworth und Thorneley 1981):

$$N_3^- + 2\,e^- + 3\,H^+ \longrightarrow NH_3 + N_2$$
$$N_3^- + 8\,e^- + 9\,H^+ \longrightarrow 3\,NH_3$$
$$N_3^- + 6\,e^- + 7\,H^+ \longrightarrow N_2H_4 + NH_3$$

Im Gegensatz dazu werden zahlreiche Metall-enthaltende Proteine durch Azid gehemmt. Die Azid-Toxizität für Metalloproteine beruht meist auf der stärkeren Koordinationsfähigkeit des Azids mit Metallzentren des aktiven Zentrums des Enzyms (Shi e*t al.* 2002).

In der Literatur ist Azid schon lange bekannt als Inhibitor des letzten Schrittes der Elektronentransportkette bei der oxidativen Phosphorylierung (Keilin und Hartree 1939). Azid wird am Eisen (Fe_{a3}) der Cytochrom-*c*-Oxidase fest gebunden und blockiert die Elektronen, die aus dem reduzierten Cytochrom-*c* (Komplex-IV) stammen um Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren.

Bezüglich der Funktion der Kupferproteine ist Azid ebenfalls als starker Inhibitor bekannt. Azid bildet Komplexe mit den vielfältigen Kupferproteinen und hemmt ihre Aktivität (Palmieri *et al.* 1997).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die oxidativen Eigenschaften der CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* sind bislang ausführlich untersucht worden, aber es gibt kaum Informationen darüber, ob dieses Enzym auch Reduktionsfähigkeiten besitzt. In dieser Arbeit ist es daher für mich von Interesse zu klären, ob die CO-Dehydrogenase in der Lage ist, Substrate zu reduzieren. Ein vorrangiges Ziel meiner Arbeit bestand darin, die Reaktivität der reduzierten CO-Dehydrogenase, bzw. die Reduktionsaktivität des [$CuSMoO_2$]-Zentrums zu untersuchen.

Für die Untersuchung sollten zuerst Substrate ausgewählt werden, die die Aktivität der CO-Dehydrogenase nicht beeinträchtigen. Eine umgekehrte Reaktion, d.h die Reduktion von CO_2 zu CO durch CO-Dehydrogenase ist bislang

nicht gelungen. Daher Azid das isoelektronisch zu CO_2 ist ausgewählt. Das Nitrit-Molekül hat wiederum ungefähr die gleiche Größe wie Azid, zeigt sehr gute Affinität zu Kupfer und kommt in Cu-haltiger Nitrit-Reduktase vor (Hulse *et al*. 1989). Nitrit hat vermutlich keine Hemmwirkung auf Cu-haltige Enzyme. Meyer und Frunzke (1990) haben berichtet, dass unter denitrifizierenden Bedingungen CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* in der Lage ist, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Daher ist anzunehmen, dass Nitrat keine Hemmwirkung auf die CO-Dehydrogenase ausübt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Substrate Azid, Nitrit und Nitrat für die Untersuchung der Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase ausgewählt.

Ziel dieser Arbeit ist, falls eines oder mehrere der ausgewählten Substrate durch CO-Dehydrogenase reduziert wird/werden zu klären, wie die Wirkungs- und Funktionsweise des Enzyms ist. Daraus ergibt die Frage, wie und wo die Substrate am Enzym gebunden und ob der aktive [$CuSMoO_2$]-Cluster, der für die CO-Oxidations-Aktivität entscheidend ist, auch für die Reduktionsaktivität eine wichtige Rolle spielt. Eine weitere Fragestellung ist, ob das Metall Kupfer (Cu) ebenso wie für die Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase auch für die Reduktionsaktivität notwendig ist oder ob hier das Metall Mo eine wichtige Rolle spielt. Ist nur eine Bindungsstelle für alle Substraten vorhanden oder gibt es unterschiedliche Bindungsstellen wie sie bei dem Enzym Nitrogenase (Shen *et al*. 1997) schon bekannt sind? Ferner muss untersucht werden, welche sowohl physiologische Elektronen-Donoren als auch nicht-physiologische Elektronen-Donoren für die Reduktionsaktivität notwendig und am besten geeignet sind. Zuletzt soll mit einem ausgewählten Substrat versucht werden, im der Kristallstruktur die genau Bindungstelle und auch die durch die Reduktionsreaktion verursachte Konformationsänderungen zu erkennen.

Ich bin auch sehr daran interessiert zu klären, ob die Oxidations- und die Reduktionsaktivität gleichzeitig stattfinden und ob die bei der Oxidationsreaktion freigewordenen Elektronen für die Reduktion verwendet werden können. Die geeigneten Elektronen-Donoren wären CO oder H_2. Die bereits bekannten Methoden zur Charakterisierung der Oxidationsaktivität, u.a. Cyanid- und n-Butylisocyanid-Inaktivierung, eignen sich ebenfalls gut, um Bindungs- und Reduktionsaktivität zu studieren. Diese Hemmstoffe werden sicherlich hilfreich

sein, einen Einblick in den Reaktionsmechanismus der Reduktion zu geben und eventuell auch die Binde- und Reduktionsstelle erkennen zu können.

Die Untersuchungen sollten überwiegend mit der CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*, einen Gram-negativen, mesophilen Bakterium durchgeführt werden. Jedoch wäre es auch sehr interessant zu wissen ob die CO-Dehydrogenase aus *Streptomyces thermoautotrophicus*, das zu den thermophilen Bakterien gehört und Gram-positive Eigenschaft besitzt, ähnliche Aktivitäten zeigt oder ob diese Bakterien aus unterschiedlichen Habitaten hinsichtlich der CO-Dehydrogenase-Aktivitäten völlig anders reagieren.

Mit der Klärung dieser Fragestellungen hoffe ich, einen Beitrag bezüglich der Funktions- und Wirkungsweise der CO-Dehydrogenase auf molekularer Ebene zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit *Oligotropha carboxidovorans* OM5 (Meyer und Schlegel 1978) und *Streptomyces thermoautotrophicus* (Gadkari *et al*. 1990) durchgeführt. Die beiden Bakterienstämme wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls entnommen. Gereinigte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5-12/pJRDMSL, die Ferner (2001) isolierte, wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendet. Diese CO-Dehydrogenase ist nicht in der Lage, CO zu oxidieren. *O. carboxidovorans* OM5-12/pJRDMSL enthält das rekombinante Plasmid pJRDMSL, das durch Klonierung der CO-Dehydrogenase-Strukturgene *coxMSL* im Vektor pJRD215 entstand.

2.2 Zellanzucht

Die Zellanzucht von *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* erfolgte in modifiziertem Mineralmedium. In dem von Meyer und Schlegel (1983) beschriebenen Mineralmedium wurden die Konzentrationen der Spurenelemente Fe(III)NH_4-Citrat und $CaCl_2$ erhöht und die von Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 reduziert. Zur Herstellung fester Nährböden wurde 1,5% Agar-Agar dem Mineralmedium zugegeben.

Mineralmedium

Elemente	*O. carboxidovorans*	*S. thermoautotrophicus*
Na_2HPO_4 x $2H_2O$	1,80 g	0,90 g
KH_2PO_4	0,75 g	1,50 g
NH_4Cl	1,50 g	1,50 g
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0,40 g	0,20 g
$CaCl_2$ x $2H_2O$	0,04 g	0,02 g
Fe(III)NH_4-Citrat	0,03 g	0,024 9
Spurenelementlösung TS2 (10x)	1,25 ml	1,00 ml
Aqua dest.	ad 1000,00 ml	ad 1000,00 ml
pH-Wert	7,00	7,00

Spurenelementlösung (10-fach Konz)

Elemente	Menge (g)
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0,10
$MnCl_2 \times 4H_2O$	0,06
H_3BO_3	0,60
$CoCl_2$	0,40
$CuCl_2 \times 2H_2O$	0,02
$NiCl_2 \times 6H_2O$	0,04
Na_2SeO_3	0,02
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	1,80
Aqua dest. (ml)	ad 1000,00
pH-Wert	7,00

Für das CO-autotrophe Wachstum von *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* wurden folgende Gasatmosphären verwendet:

	O. carboxidovorans	*S. thermoautotrophicus*
CO % (v/v)	50	53
CO_2 % (v/v)	5	10
Luft % (v/v)	45	37

Die Kulturen von 100 - 400 ml wurden in Erlenmeyer-Kolben (250 – 1000 ml) in einem Witt´schen Topf unter magnetischer Rührung bebrütet (Gasatmosphäre, siehe oben). Die Inkubation erfolgt für *O. carboxidovorans* bei 30° C und für *S. thermoautotrophicus* bei 65° C.

Die Gewinnung größerer Zellmassen erfolgte in Fermentern mit 30 oder 50 l Arbeitsvolumen (Biostat U, Braun, Melsungen), die mit 200-300 ml Vorkultur

angeimpft wurden. Die Fermentation erfolgte bei 65° C (*S. thermoautotrophicus*) und bei 30° C (*O. carboxidovorans*), wobei die Kulturen anfangs mit einem Gasgemisch aus 85% (v/v) Luft, 10% (v/v) CO und 5% CO_2 bei einer Flussrate von 2 l min^{-1} begast wurden. Nach der Anlaufphase mit der OD_{436} 0,2 – 0,3 wurde die CO_2-Begasung abgestellt. Die Kulturen wurden ständig gerührt und die Rührung schrittweise dem Zellwachstum folgend von 150 U bis 450 U min^{-1} erhöht. Während der Fermentation wurde der pH-Wert durch automatische Zugabe von 5 N NaOH bzw. 20% (v/v) H_3PO_4 (Lösungen in Wasser) konstant auf 7,0 gehalten.

Das Wachstum von *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* wurde durch Messen der optischen Dichte der Bakteriensuspension bei 436 nm in einem Spektralphotometer (Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verfolgt. Die Vorkulturen und die Fermentationskulturen wurden regelmäßig mikroskopisch auf ihre Reinheit kontrolliert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von ca. 0,9 (*S. thermoautotrophicus*) bzw. 4,0 (*O. carboxidovorans*) wurden die Kulturen mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (Zylinderinhalt 2 l, Cepa Z41 Carl Padberg GmbH, Lahr) bei 16.950 g geerntet. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff (-192° C) eingefroren und weiter bis zur Verwendung bei – 80° C aufbewahrt.

2.3. Anreicherung und Isolierung von CO-Dehydrogenase

2.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Gefrorene Zellen (Kap. 2.2) wurden mit 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 gemischt (2 ml Puffer g^{-1} Zellmasse) und mit Hilfe eines Handhomogenisators homogenisiert. Dieser Suspension wurden einige Kristalle DNase I sowie in Ethanol gelöstes Phenylmethylfonylfluorid (PMSF) (Endkonzentration 0,5 mM) zugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine 6 bis 7 mal wiederholte Passage durch eine French Press-Zelle (40 ml Volumen. Amico, Silver Springs, Maryland, USA). Zur Entfernung ganzer Zellen und Zellwandreste wurde der so erhaltene Rohextrakt 30 min lang niedertourig zentrifugiert (8.000 g, 4° C, Centricon T-124, Kontron, Eching). Der Überstand enthielt den zellfreien Rohextrakt. Dieser wurde durch eine 2-stündige Ultrazentrifugation (38.000 g, 4° C, TFT 45.95, Centricon T-1065, Kontron, Eching) von den restlichen Zelltrümmern und

Zellmembranen befreit. Bei dem klaren braunen Überstand handelt es sich um die cytoplasmatische Fraktion.

2.3.2 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte mit Hilfe einer XK 50-Säule mit SOURCE 30Q (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) als Trennmaterial und einem Bettvolumen von 100 ml. Die Auftrennung der unterschiedlichen Proteinfraktionen wurde über eine ÄKTA™ Purifier 100-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gesteuert. Mit einer Flussrate von 5 ml min^{-1} wurde die cytoplasmatische Fraktion auf die mit 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 zur Elution nichtbindender Proteine gespült. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 bis 1 M NaCl in 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2). Bei einer Flussrate von 10 ml min^{-1} wurden jeweils 10 ml Fraktionen gesammelt. Während der Auftrennung wurde der relative Proteingehalt durch Messung der Absorption bei 280 nm automatisch bestimmt. Genauso wurden der relative Flavin- und Fe-S- Gehalt über die Absorption bei 450 nm und 550 nm aufgezeichnet. Die CO-Dehydrogenase-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde wie in Kap. 2.5.1 beschrieben bestimmt.

2.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Das Trennprinzip der hydrophoben Interaktionschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Affinität von Proteinen zu hydrophoben Matrices. Dabei wird die Affinität eines Proteins zur Matrix von seiner Oberflächenbeschaffenheit und von der mobilen Phase bestimmt. Durch Salze mit starkem Aussalzeffekt, wie z.B. Ammoniumsulfat, können die hydrophoben Wechselwirkungen verstärkt werden. So kann unter Verwendung geeigneter Salzgradienten ein Trenneffekt erzielt werden.

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) wurde über eine XK 50-Säule, die mit SOURCE 15ISO (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gefüllt (Bettvolumen 100 ml) war, durchgeführt. Die Auftrennung der unterschiedlichen Proteinfraktionen wurde über eine ÄKTA™ *Purifier* 100-Anlage gesteuert.

Die geeignete Proteinprobe wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit 1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ (in Pulverform) versetzt. Nach der Abtrennung präzipitierter Proteine durch Zentrifugation (8.000 g, 4° C, Centricon T-124, Kontron, Eching) erfolgte der Probenauftrag mit einer Schlauchpumpe auf eine mit 0,85 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM KH_2PO_4/NaOH, pH 7,2 äquilibrierten Säule. Nichtbindende Proteine wurden mit 120 ml 0,85 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM KH_2PO_4/NaOH, pH 7,2 eluiert. Gebundene Proteine wurden durch einen linearen Gradienten von 0,85 M bis 0 M $(NH_4)_2SO_4$ eluiert. Bei einer Flußrate von 10 ml min^{-1} wurden Fraktionen von 10 ml gesammelt. Während der Auftrennung der unterschiedlichen Proteine wurde der relative Proteingehalt durch automatische Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Genauso wurde der relative Flavin- und FeS-Gehalt über die Absorption bei 450 nm und 550 nm aufgezeichnet. CO-Dehydrogenase-Aktivität wurde wie in Kap. 2.5.1 beschrieben bestimmt.

2.3.4 Gelfiltration

Um die gepoolten CO-Dehydrogenase-Fraktionen vom Salz zu befreien, wurden sie zuerst durch Ultrafiltration (Kap. 2.3.5) konzentriert und dann durch Gelfiltration an Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 filtriert. Das gereinigte Enzym wurde aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde das gefrorene Enzym bei –80° C aufbewahrt.

Das Entsalzen von Proteinlösungen mit kleinen Volumina (bis 2,5 ml) erfolgte durch PD10-Säulen (Sephadex G-25, Fertigesäulen, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Auf die mit dem entsprechenden Puffer äquilibrierte Säule wurde 2,5 ml Proteinlösung aufgetragen und dann mit 3,5 ml geeignetem Puffer eluiert.

2.3.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden mittels Ultrafiltration (Ultrafiltrationskammer (50 ml vol) Modell 8050, Amicon, Witten) bei einem angelegten Luftdruck von 1,5 bar unter Rührung und auf Eis aufkonzentriert. Die verwendete Membran hatte eine Ausschlussgrenze von 30 kDa (Diaflo PM 30, Amicon, Witten).

Zur Konzentrierung kleiner Volumina (bis 3,5 ml) wurden Zentrifugal-Konzentratoren (Microsep Mikrokonzentrator, 30 kDa Ausschlussgrenze, Pall Science, Rossdorf) eingesetzt.

2.4. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung zellfreier Extrakte und gereinigter Proteine erfolgte mit einem Mikroansatz der Biuret-Methode nach Beisenherz *et al.* (1953).

Zur Bestimmung des Proteingehalts von verdünnten Proteinlösungen wie sie z. B. nach der Eluierung von Chromatographiesäulen anfallen, wurde die von Bradford (1976) beschriebene Methode angewendet.

2.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.5.1 Bestimmung der CO-Dehydrogenase-Aktivität

Die CO-Dehydrogenase-Aktivität wurde photometrisch über die Reduktion von 2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid (INT) zu 1-(4-Iodphenyl)-3-phenyl-5-(4-nitrophenyl)-formazan (Formazan) bestimmt (Kraut *et al*. 1989).

2.5.2 Bestimmung der Reduktion von Azid zu Ammonium

Reaktionsansatz:

NaN_3	10 mM
Natriumdithionit	5 mM
CO-Dehydrogenase	0,5-2 mg
50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 6,5	ad 0,75 ml

Die CO-Dehydrogenase und der Puffer wurden in Wheatonflaschen (8 ml Volumen) pipettiert. Anschließend wurden die Wheatonflaschen mit Serumstopfen und Metallverschlüssen gasdicht verschlossen, mehrmals evakuiert und mit He begast. Die NaN_3-Lösung und die Dithionitlösung wurden unter anaeroben Bedingungen hergestellt und nach der Begasung in die Wheatonflaschen mit dem Reaktionsansatz mit Hilfe einer Hamilton-Spritze gegeben. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 60° C wurde mit Hilfe einer

Hamilton-Spritze eine 0,2 ml Probe entnommen und diese in einem Doppelansatz auf ihren Ammoniumgehalt bzw. Azidgehalt analysiert. Ammonium wurde nach der von Gadkari (1984) modifizierten Methode von Fawcett und Scott (1960)(Kap. 2.6.2) und Azid nach Dilworth und Thorneley (1981) (Kap. 2.6.1) gemessen.

Anschließend wurden die Reaktionsansätze 30 min lang bei 60° C inkubiert und erneut auf ihren Ammoniumgehalt hin untersucht. Aus der Differenz zwischen End- (t_1) und Anfangsgehalt (t_0) des Ammoniums ergab sich die Menge an gebildetem Ammonium als Folge der Azid-Reduktion. Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Protein oder ohne Azid.

2.5.3 Bestimmung der Reduktion von Nitrit zu Ammonium

Reaktionsansatz:

KNO_2	10 mM
Natriumdithionit	10 mM
CO-Dehydrogenase	0,5-2 mg
50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2	ad 0,75 ml

CO-Dehydrogenase und Puffer wurden in Wheatonflaschen (8 ml Volumen) pipettiert, anschließend wurden diese Flaschen gasdicht verschlossen, mehrmals evakuiert und mit He begast. Die unter anaeroben Bedingungen hergestellten Natriumdithionit- und KNO_2-Lösungen wurden nach der Begasung nacheinander mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Wheatonflaschen gegeben. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 60° C wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze eine 0,2 ml Probe entnommen und diese in Doppelansätzen auf ihren Ammoniumgehalt bzw. Azidgehalt analysiert. Ammonium wurde nach der von Gadkari (1984) modifizierten Methode von Fawcett und Scott (1960)(Kap. 2.6.2) und Nitrit nach Harrigan und McCance (1966) (Kap. 2.6.3) gemessen.

Anschließend wurden die Reaktionsansätze 60 min lang bei 60° C inkubiert und erneut auf ihren Ammoniumgehalt untersucht. Aus der Differenz zwischen End- (t_1) und Anfangsgehalt (t_0) an Ammonium ergab sich die Menge an gebildetem Ammonium als Folge der Nitrit-Reduktion. Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Protein oder ohne Nitrit.

2.5.4 Bestimmung der Reduktion von Nitrat zu Nitrit

Reaktionsansatz:

KNO_3	80 mM
Natriumdithionit	1,5 mM
Methylviologen	0,9 mM
CO-Dehydrogenase	0,5-2 mg
50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2	ad 0,75 ml

Die CO-Dehydrogenase und der Puffer wurden in Wheatonflaschen (8 ml Volumen) pipettiert. Die Wheatonflaschen wurden gasdicht verschlossen, mehrmals evakuiert und mit He begast. KNO_3-Lösung, Methylviologen und Natrium-Dithionitlösung wurden unter anaeroben Bedingungen hergestellt und nach der Begasung in die Wheatonflaschen mit Reaktionsansatz mit Hilfe einer Hamilton-Spritze gegeben. Nach einer Vorinkubationszeit von 5 min bei 60° C wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze eine 0,2 ml Probe entnommen und diese in Doppelansätzen auf ihren Nitrit- bzw. Nitratgehalt analysiert. Nitrit wurde nach Harrigan und McCance (1966) (Kap. 2.6.3) gemessen und Nitrat nach Cataldo *et al.* (1975) analysiert; beide Methoden wurden von Gadkari (1984) modifiziert.

Anschließend wurden die Reaktionansätze 60 min lang bei 60° C inkubiert und erneut auf ihren Nitritgehalt untersucht. Aus der Differenz zwischen End (t_1)- und Anfangsgehalt (t_0) an Nitrit ergab sich die Menge an gebildetem Nitrit als Folge der Nitrat-Reduktion. Als Referenz diente ein identisch behandelter Ansatz ohne Protein oder ohne Nitrat.

2.6 Bestimmung von Azid, Ammonium und Nitrit

2.6.1 Bestimmung von Azid

Zur Bestimmung der Azid-Konzentration wurde die von Dilworth und Thorneley (1981) beschriebene Methode angewendet. Zur Trennung des Azids vom Protein wurden Zentrifugal-Proteinkonzentratoren (Microsep Mikrokonzentrator, 30 kDa Ausschlussgrenze, Pall Science, Rossdorf) eingesetzt. Das Eluat wurde für die Azidanalyse verwendet. Das Azid wurde spektralphotometrisch als Eisenazid (Fe^{+3}-Azid) in saurer Lösung gemessen. Ein Probevolumen von 0,5 ml wurde jeweils mit 1 ml Glycin-Puffer/HCl (0,1 M Glycin/HCl, pH 2,0) und 0,5 ml $FeCl_3$

(0,2 M $FeCl_3$ in 0,01 M HCl, dieses Reagens erfordert Filtration) versetzt. Anschließend wurde die Extinktion der gelb-rötlichen Lösung nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur in Küvetten der Schichtdicke d = 1 cm im Photometer bei 458 nm (Novaspec II, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemessen. Zur Ermittlung des Azidsgehalts aus der Extinktion wurde eine Eichgerade mit NaN_3 als Standard (0 – 100 µg Ansatz^{-1}) erstellt. Geradengleichung:

$A_{458} = 2{,}72^{-4}$.Konzentration an Azid (µg.500 µl^{-1}) + $4{,}44^{-3}$

2.6.2 Bestimmung von Ammonium

Die Konzentration des Ammoniums wurde nach der von Gadkari (1984) modifizierten Methode von Fawcett und Scott (1960) bestimmt. Ein Probevolumen von 0,1 ml wurde jeweils mit 1,9 ml Aqua dest., 1 ml Na-Phenolat (2%) w/v), 0,5 ml Na-Nitroprussid (0,005% w/v), und 0,5 ml Na-Hypochlorit (0,2 M Na-Hypochlorit, 0,125 N NaOH) versetzt. Die Ansätze wurden 60 min lang bei 30° C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der blaugefärbten Lösung in Küvetten der Schichtdicke d = 1 cm im Photometer bei 630 nm gemessen. Zur Ermittlung des Ammoniumgehalts aus der Extinktion wurde eine Eichgerade mit NH_4Cl als Standard (0 – 10 µg Ansatz^{-1}) erstellt. Geradengleichung:

$A_{630} = -0{,}00204$.Konzentration an Ammonium-N (µg.100 µl^{-1}) + 0,18796

2.6.3 Bestimmung von Nitrit

Die Nitritbestimmung wurde nach Harrigan und McCance (1966) durchgeführt. Ein Probevolumen von 1 ml wurde mit 1 ml frisch hergestellter Reagenzlösung, die aus gleichen Teilen 0,8%iger Sulfanilsäure (w/v) in 5 N Essigsäure und 5%igem α-Napthylamin (w/v) in 5 N Essigsäure besteht, versetzt. Anschließend wurde die Extinktion der rotgefärbten Lösung nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur in Küvetten der Schichtdicke d = 1 cm im Photometer bei 550 nm bestimmt. Zur Ermittlung des Nitritgehalts aus der Extinktion wurde eine Eichgerade mit KNO_2 als Standard (0 – 4 µg Ansatz^{-1}) erstellt. Geradengleichung:

$A_{550} = 0{,}01664$.Konzentration an Nitrit (µg.100 µl^{-1}) + 0,32636

2.7 Metallanalyse

Die Bestimmung von Eisen, Molybdän, Kupfer, Mangan, Zink, Selen, Magnesium und Vanadium wurde am Bayreuther Institut für Terrestrische Ökosystemforschung (BITÖK) mittels Induced-Couple-Plasma-Massenspektrometrie (VG Plasmaquad PQ2 Turbo Plus, Fisons Instrument/VG Elemental, Wiesbaden) durchgeführt.

Der Kupfergehalt von behandelter CO-Dehydrogenase wurde sowohl mit dem gewonnen Ultrafiltrat als auch mit den entnommenen Aliquots der Enzymlösung durchgeführt. Die Messung erfolgte an einem Atomic Absorption Spectrophotometer 1100B (Perkin Elmer, Überlingen, 10 mA Lampenstrom mit Kupferdetektionslampe bei 234 nm), Gasgemisch: ca. 4 bar Pressluft, 1,3 bar Acetylen. Als Eichgerade wurde eine 0 bis 16 µM Kupfersulfatlösung verwendet. Die gemessenen Proben wurden so verdünnt, dass die Kupferkonzentration im Bereich der Eichgerade lag (< 8 µM CO-Dehydrogenase). Der Kupfergehalt wurde aus drei Parallelmessungen ermittelt.

2.8 Bestimmung von FAD

Das Flavin der CO-Dehydrogenase wurde mit Trichloressigsäure extrahiert und durch Messung der Absorptionsdifferenz zwischen oxidierter und reduzierter Form bei 450 nm bestimmt (Meyer 1982). In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 600 µl CO-Dehydrogenase (0,5 bis 1,5 mg ml^{-1} in KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2) mit 60 µl 50% (w/v) Trichloressigsäure vermischt und 20 min bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 340 µl 2,4 M K_2HPO_4 neutralisiert und das Präzipitat 5 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Vom klaren Überstand wurde vor und nach Zugabe einiger Kristalle Dithionit die Absorption bei 450 nm bestimmt. Die Konzentration an Flavin wurde mit Hilfe des millimolaren Redox-Differenz-Extinktionskoeffizienten ε_{450} = 10,5 mM^{-1} cm^{-1} bestimmt (Waud *et al.* 1975).

2.9 Spektroskopische Methoden

2.9.1 UV/vis-Absorptionsspektroskopie

UV/vis-Absorptionsspektren von Proteinlösungen wurden an einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvicon 941, Kontron, Eching) gegen die Basislinie des entsprechenden Puffers als Referenz mit einer Bandbreite von 2 nm und einer Geschwindigkeit von 200 nm min^{-1} von 230 bis 850 nm aufgezeichnet.

Die Aufnahme der Spektren von CO-Dehydrogenase nach Dithionit-, H_2- bzw. CO-Reduktion und während der Azid-Reduktion erfolgte in Quarzküvetten mit Septum und Schraubdeckel.

2.9.2 Elektronspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

Die Elektronspinresonanz-Spektren (ESR-Spektren) wurden an einem Bruker EMX-ESR-Spektrometer (Karlsruhe) aufgenommen. Das Spektrometer war mit einem Helium-Kryostaten (ESR 900 Cryostat, Oxford Instruments, England), sowie einer Temperatur-Kontrolleinheit (ITC503, Oxford Instruments, England), die Temperaturen von 6 K bis 120 K ermöglichte, ausgestattet. Die Spektren wurden mit einer Mikrowellenleistung von 10 bzw. 200 mW aufgezeichnet. Die ESR-Spektren wurden jeweils zehnmal gemessen und gemittelt. Die Daten wurden mit Software WIN-EPR (Bruker) aufgezeichnet und ausgewertet. Die Bestimmung der Mikrowellenfrequenz erfolgte mit einem Mikrowellenzähler, die Kalibrierung des Magnetfeldes mit einer Diphenylpicrylhydrazin-Referenzprobe.

Die g-Faktoren wurden mittels folgender Gleichung berechnet:

$$g = \frac{71{,}4484 \cdot \nu}{(B_o + 0{,}267)}$$

ν: Mikrowellenfrequenz in GHz

B_o: Magnetfeld in mT

CO-Dehydrogenase (10 bis 12 mg ml^{-1}) in 50 mM HEPES/NaOH-Puffer, pH 7,2 wurde unter anoxischen Bedingungen (5-maliges Evakuieren und Begasen mit 100% Argon oder Helium) mit 4 mM Dithionit versetzt. Oxidierte und reduzierte Proben wurden unter der jeweiligen Gasatmosphäre mit einer gasdichten

Hamilton-Spritze in ESR-Röhrchen überführt und anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren.

2.10 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde als vertikale Plattenelektrophorese im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei betrug die Dimension des Trenngels 120 mm H x 125 mm B x 1,5 mm T. Ein 20 mm hohes Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Ausbildung von 10 Probentaschen (225 µl Volumen) eingesetzt.

Herstellung der Gele:

Lösungen:

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung:	Acrylamid, 30% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,8% (w/v)
Trenngelpuffer:	0,980 M Tris/HCl (pH 8,8)
Sammelgelpuffer :	0,325 M Tris/HCl (pH 6,8)
Laufpuffer:	0,050 M Tris, 0,384 M Glycin (pH 8,5) 0,1% (w/v) SDS (nur bei denaturierenden Gelen)

Das Gel wurde zur Durchführung der Elektrophorese in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gesetzt.

Tabelle 2-1 Pipettierschema für Polyacrylamidgele

	Trenngel		Sammelgel	
	7,5%	13%	5%	7,5%
Acrylamid/Bisacrylamid (ml)	9,00	16,40	1,67	2,50
Trenngelpuffer (ml)	18,00	18,00	-	-
Sammelgelpuffer (ml)	-	-	5,00	5,00
Aqua bidest (ml)	9,00	3,60	2,45	2,45
Na_2SO_3 (mg)	50,00	50,00	-	-
SDS (10% w/v)*) (ml)	-	0,36	-	0,10
TEMED (µl)	9,00	9,00	5,00	5,00
Ammoniumperoxodisulfat (10% w/v) (µl)	90,00	90,00	50,00	50,00

*) nur bei denaturierenden Gelen

Die Proben mit einem Proteingehalt bis zu 100 µg in einem Volumen von maximal 100 µl wurden vor ihrer Applikation auf das Gel mit 1/10 Volumen 0,25% (v/v) Bromphenolblau und 1/10 Volumen 40% (w/v) Saccharose versetzt und mittels einer Hamilton-Spritze in die einzelnen Taschen gegeben.

Bei der Auftrennung von Proteinen in denaturierenden Gelen wurden die Proben (50 bis 100 µg) vor Zugabe von Bromphenolblau und Saccharose (10 bis 15 µl) mit 2% (w/v) SDS versetzt und 5 min lang im Wasserbad gekocht.

Die Elektrophoresen erfolgten bei einer Stromstärke von 15 mA im Sammelgel und 45 mA im Trenngel (Netzgerät: Desatronic 1000/200, Desaga Heidelberg). Sie wurden beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreichte.

Zur Bestimmung der molekularen Massen von Proteinen in denaturierenden Gelen wurde ein Standard im Bereich 14 bis 94 kDa (Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die Molekulargewichtsbestimmung in nicht-denaturierenden Gelen erfolgte mit „High Molecular Weight Calibration Kit for Gel Electrophoresis".

Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden der analytischen Polyacrylamidgele mit Coomassieblau R-250 für 60 min auf einem Horizontalschüttler (50 rpm, Braun Melsungen) gefärbt und fixiert. Anschließend wurden die Gele zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes in Entfärberlösung geschwenkt.

Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blue R-250	500 mg
Tech. Ethanol	454 ml
Essigsäure	92 ml
H_2O	454 ml

Entfärberlösung:

H_2O	400 ml
Methanol	500 ml
Essigsäure	100 ml

Die Dokumentation der Polyacrylamidgele erfolgte mit Docu Gel IV (MWG-Biotech, Ebersberg). Die Integration der Peakflächen einzelner Banden und die

Molekulargewichtsbestimmung wurde mit Hilfe der Software RFLPscan und OneDscan der Firma Scananlytics (Billerica, Massachusetts, USA) durchgeführt.

2.11 Aktivitätsfärbung

Die CO-Dehydrogenase-Aktivität wurde in den analytischen, nativen Polyacrylamidgelen (Kap. 2.10) mit 2-(4-Indophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-2H-Tetrazoliumchlorid (INT) und 1-Methoxyphenazin-Methosulfat (MPMS) nachgewiesen.

Der Testansatz wurde 30 min lang in einer Schott-Flasche mit Hilfe einer Kanüle mit CO begast und anschließend in einer kleinen Schale über das Gel gegossen. In der Regel wurde bei positiver Reaktion bereits nach 1 min eine deutliche rote Bande, die auf Grund der Reduktion von INT entstand, sichtbar.

2.12 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase

2.12.1 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase durch Cyanid und Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels

Die CO-Dehydrogenase wurde mit Cyanid inaktiviert (Meyer und Schlegel 1983, Gremer 2000) und der herausgelöste cyanolysierbare Schwefel analysiert. 0,4 ml einer frisch angesetzten anoxischen 250 mM K-Cyanid-Lösung (in KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2) wurde zu 9,6 ml anoxischer CO-Dehydrogenase (3 mg ml^{-1} in KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2) gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Von 0,7 ml Aliquots des Reaktionsansatzes wurden proteinfreie Eluate mittels Zentrifugalfiltration (30 min, 5500 g) an einer Membran mit 30 kDa Ausschlussgrenze (Zentrifugal-Konzentrator Mikrosep, Pall Sciences, Rossdorf) gewonnen. Enthaltenes Rhodanid (SCN^-) wurde mit SÖRBOS Reagenz zu rotbraunem Eisen-Rhodanid (FeSCN) umgesetzt (Westley 1981). Das Eluat (0,5 ml) wurde in einer Küvette mit SÖRBOS Reagenz (0,5 ml) gemischt und 10 min inkubiert. Das gebildete FeSCN wurde photometrisch bei 460 nm gemessen. Als Referenz diente ein identischer Ansatz, der anstelle des Eluates 0,5 ml 10 mM KCN in 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 enthielt. Die Quantifizierung der Absorption bei 460 nm erfolgte über eine Eichgerade, die mit KSCN (0-20 µM in KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2) aufgenommen wurde. Die abgetrennte CO-Dehydrogenase, die sich an der Membran sammelte, wurde zurückgewonnen und

über Gelfiltration an Sephadex G-25 (PD-10, Amersham Pharmacia, Freiburg) entsalzt. Sie wurde anschließend für Bestimmungen wie CO-Oxidation (Kap. 2.5.1) und Azid- (Kap. 2.5.2), Nitrit- (Kap. 2.5.3) und Nitrat-Reduktion (Kap. 2.5.4) verwendet.

SÖRBOS Reagenz nach Westley (1981)**:**

$Fe(NO_3)_3 \times 9H_2O$	10 g
65% HNO_3	20 ml
Aqua dest.	ad 150 ml

2.12.2 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase durch n-Butylisocyanid

Die oxidierte CO-Dehydrogenase wurde durch n-Butylisocyanid inhibiert (Dobbek *et al.* 2002). Die anoxischen Testansätze, die 1 mg Protein in KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 enthielten, wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 bis 1,2 mM) von n-Butylisocyanid versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsansätze für die verschiedenen Tests wie CO-Oxidation (Kap. 2.5.1) und Azid- (Kap. 2.5.2), Nitrit- (Kap. 2.5.3) und Nitrat-Reduktion (Kap. 2.5.4) verwendet.

2.12.3 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase durch Cyanat

Die anoxischen Testansätze enthielten 1 mg CO-Dehydrogenase und 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2). Diese Testansätze wurden mit Na-Dithionit, H_2 oder CO reduziert. Anoxische K-Cyanat-Lösung (10 bis 30 mM) wurde zu den Testansätze gegeben und diese bei 50° C inkubiert. Der zeitliche Verlauf der spezifischen Aktivität wurde in Aliquots im CO $\rightarrow$ INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1).

2.13 Messung der Gasentwicklung

2.13.1 Warburg-Technik

Für die Messung der Gasbildung mittels Warburg-Technik wurde ein Rund-Warburg-Gerät (Braun Melsungen) mit geschlossenen Differentialmanometern

und Brodischer Lösung als Sperrflüssigkeit benutzt. Das Wasserbad hatte eine Temperatur von 40° C.

Reaktionsansatz:

Hauptraum: 2 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2), 2 mg CO-Dehydrogenase, 5 mM oder 15 mM Azid.

Zentralzylinder: 0,2 ml KOH (20%)

Die Gefäße wurden 10 min lang mit He durchgespült. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Dithionit gestartet.

2.13.2 Gaschromatographische Bestimmung von Distickstoff

Die Konzentration von molekularem Distickstoff während der Azid-Reduktionsuntersuchungen wurde gaschromatographisch ermittelt. Die Proben wurden in einen Gaschromatographen (Modell CP 9000; Chrompack, Middelburg, Niederlande) mit „Wärmeleitfähigkeits-Detektor" (Modell 903 A) eingespritzt. Als Säulenmaterial dienten Hayeser Q (2,5 m) und Molekularsieb 13 X (1,8 m). Die Temperatur des Ofens betrug 40° C, die des Injektors und des Detektors 80° C und 200° C. Als Trägergas wurde He mit einer Durchflussrate von 30 ml min^{-1} benutzt. Das Chromatogramm wurde mittels eines Schreibers (LINSEIS-L6512) aufgezeichnet. Zur Ermittlung der Stickstoffkonzentration wurde eine Eichgerade mit reinem Stickstoff als Standard (0 – 200 nmol) erstellt.

Korrelationsgerade:

Peak (cm) = 0,10835.Konzentration an Stickstoff (nmol.50 μl^{-1}) + 0,03428

2.14 Röntgenstrukturanalyse der Azid/CO-inkativierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Die Kristallisation von Azid/CO-inaktivierter CO-Dehydrogenase erfolgte nach dem Dampfdiffusionsverfahren im „hängenden Tropfen". Für die Kristallisation wurden 6 µl Enzym (24 mg ml^{-1} in 50 mM HEPES/NaOH-Puffer, pH 7,2) auf silanisierte Deckgläser (18 mm Durchmesser, Damm, Frankfurt) aufgetragen und mit 2 bis 6 µl Kristallpuffer gemischt (Dobbek *et al.* 1999).

Die Silanisierung der Deckgläser erfolgte durch eine 20 bis 30-min Behandlung mit Dichlordimethylsilan-Lösung (1% (v/v) in Toluol) bei 60° C. Anschließend wurden die Deckgläser mit Wasser abgespült, 5 bis 10 min mit 96% (v/v) Ethanol behandelt, erneut mit Wasser abgespült, mit Druckluft getrocknet und über Nacht bei 130° C trockener Hitze sterilisiert.

Kristallisationspuffer:

0,82 M	KH_2PO_4/KOH
0,82 M	NaH_2PO_4/NaOH
82,00 mM	HEPES/NaOH pH 7,2
3% (v/v)	2-Methyl-2,4-Pentanediol (MPD)
	in Aqua bidest.

Die Vertiefungen einer Gewebe-Kulturschale (IWAKI microplate, Dunn Labortechnik, Asbach) wurden mit 700 µl Kristallisationspuffer befüllt und der obere Rand mit viskosem Silikonöl (Mischung aus Rotisilon A und Rotisilon B, Roth, Karlsruhe) eingefettet. Die Deckgläser mit einem Tropfen einer Mischung aus 6 µl Azid plus CO-inaktivierter CO-Dehydrogenase und 3 µl Kristallisationspuffer wurden umgedreht und auf die Vertiefungen der Gewebe-Kulturschale aufgelegt. Die Kristallisation fand bei 4° C statt.

2.15 Chemikalien und Gase

Die verwendeten Chemikalien wurden in der Regel von den Firmen Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisendorf), Boehringer (Mannheim), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Serva (Heidelberg) mit einem Reinheitsgrad besser als 97% bezogen. Die verschiedenen Gase wurden von den Firmen Linde (Höllriegelskreuth) und Riessner (Michelau/Lichtenfels) bezogen. Ihre Reinheitsgrade betrugen: CO 99,3%, CO_2 99,99%, Acetylen 99,5%, Argon 99,90%, He 99,5% und Stickstoff 99,90%.

3 Experimente und Ergebnisse

3.1 Massenproduktion der CO-autotroph wachsenden Kulturen von *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*

Die Kultur von *Streptomyces thermoautotrophicus* zeigte unter CO-autotrophen Bedingungen eine kürzere Lag-Phase und das maximale Wachstum erfolgte bei einer OD_{436} von 1,5 bis 2. Die genaue Ursache für dieses Verhalten ist bislang nicht aufgeklärt. Es wird vermutet, dass während des Wachstums ein oder mehrere sekundärer/sekundäre Metaboliten ausgeschieden wird/werden, die die CO-Dehydrogenase oder ein anderes wichtiges Enzym oder eine Funktion hemmen. Eine Beobachtung während der Wachstumsphase ergab, dass der CO-Dehydrogenasegehalt in der stationären Phase deutlich abnimmt und die Aktivität deutet darauf hin, dass, im Vergleich zu der Aktivität der exponentiellen Phase, die Aktivität in der stationären Phase geringer wird (Abb. 3-1A). Beim Wachstum von *Oligotropha carboxidovorans* kommt eine sehr lange Lag-Phase (ca. 48 h) vor.

Unter den gleichen Wachstumsbedingungen wie bei *S. thermoautotrophicus*, abgesehen vom Temperaturunterschied (30° C), wuchs die Kultur jedoch bis zu einer OD_{436} von 10 bis 13 (Abb. 3-1). Die höchste CO-Oxidationsaktivität tritt allerdings in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase auf (Schübel 1996). Die maximalen Verdopplungszeiten und die Generationszeiten in der exponentiellen Phase sind von beiden Organismen vergleichbar. Aus einem noch nicht geklärten Grund besitzen *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* CO-Dehydrogenase-Spezies, die sehr unterschiedliche spezifische Aktivitäten aufweisen.

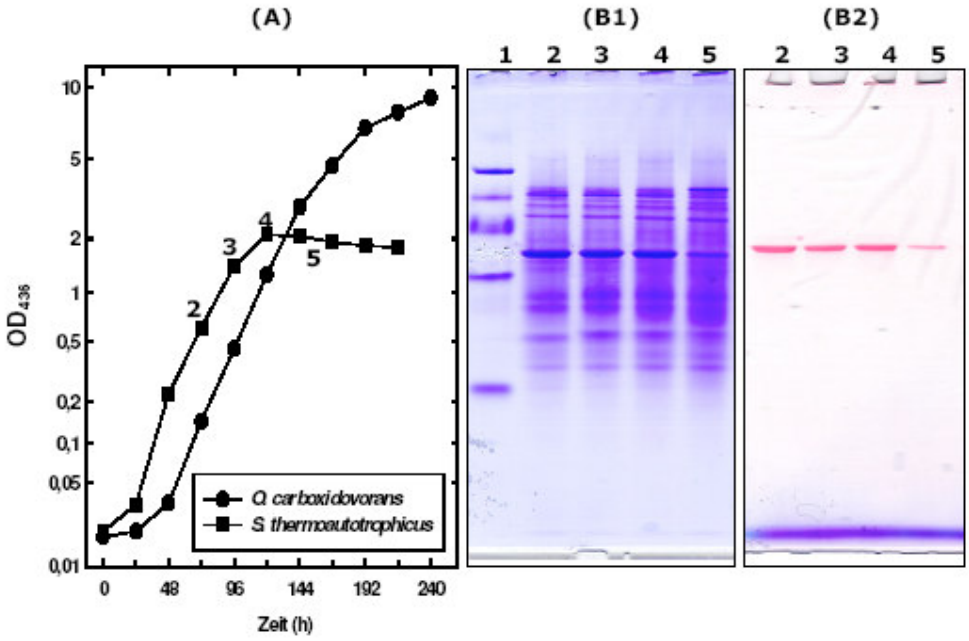


Abb. 3-1 CO-autotrophes Wachstum von *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* im 50 l-Fermenter (A). Coomasieblau- Färbung (B1) und Aktivitätsfärbung (B2) der cytoplasmatischen Fraktionen von *S. thermoautotrophicus* aus unterschiedlichen Zeiten der Wachstumsphase

O. carboxidovorans und *S. thermoautotrophicus* wurden in Mineralmedium unter Begasung mit 2 l min^{-1} mit einem Gasgemisch bestehend aus 10% (v/v) CO, 5% (v/v) CO_2 und 85% (v/v) Luft CO-autotroph angezogen (Kap. 2.2). (A): Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 436 nm verfolgt. (B): Die cytoplasmatischen Fraktionen für die Aktivitätsbestimmung wurden während unterschiedlicher Wachstumsphasen aus *S. thermoautotrophicus* vorbereitet (Kap. 2.3.1). Die cytoplasmatischen Fraktionen wurden auf einer nativen PAGE analysiert (Kap. 2.10). Bahn 1: 20 µg Standard (High Molecular Weight, Pharmacia Freiburg) mit folgenden Markerproteinen: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Lactat-Dehydrogenase (140 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Bahn 2 bis 5: 50 µg Cytoplasma aus den Zellen, die 72, 96, 120 und 146 Stunden nach dem Animpfen gewonnen wurden. (B1): Die Proteinbanden wurden mit Coomasieblau angefärbt (Kap. 2.10) und (B2): Die Proteinbanden wurden durch Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht (Kap. 2.11).

3.2 Anreicherung von CO-Dehydrogenase

CO-Dehydrogenase wurde aus den Zellen mehrerer Fermentationen durch ein Aufreinigungsverfahren, bestehend aus Ultrazentrifugation, Anionenaustausch-Chromatographie und hydrophober Interaktionschromatographie (HIC), isoliert. Die Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung homogener CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* wurden mehrfach durchgeführt und führten jeweils zu ähnlichen Ergebnissen. Die Chromatographieprofile der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* waren vergleichbar. Es wird deshalb exemplarisch eine Aufreinigung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* dargestellt.

Für die Aufreinigung von CO-Dehydrogenase wurden 40 g (Feuchtgewicht) CO-autotroph gewachsene Zellen eingesetzt. Nach Zellaufschluss und niedertouriger Zentrifugation wurde der zellfreie Rohextrakt durch Ultrazentrifugation in Cytoplasma- und Membranfraktionen getrennt (Kap. 2.3.1). Die CO-Dehydrogenase ist ein starkes Anion (pI: 4,7) (Meyer 1989), deshalb wäre für ihre Aufreinigung eine Anionenaustausch-Chromatographie geeignet. Die gewonnene Cytoplasmafraktion wurde daher einer Chromatographie an Source 30Q unterzogen (Abb. 3-2, Kap. 2.3.2). Nichtgebundene Proteine wurden während des Probenauftrags und des sich anschließenden Waschvorgangs der Säule mit Äquilibrierungspuffer (50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2) abgetrennt. Gebundene Proteine wurden mittels eines linearen NaCl-Gradienten (0 bis 1 M) eluiert. Die Elution der CO-Dehydrogenase erfolgte bei ca. 0,4 M NaCl. Die Fraktionen, die die CO-Dehydrogenase enthielten, wurden gepoolt.

Zur weiteren Anreicherung wurden die CO-Dehydrogenase-Fraktionen vereint und über eine Source 15ISO (HIC) Säule weiter gereinigt (Abb. 3-3, Kap. 2.3.3). Nichtgebundene Proteine wurden während des Probenauftrags und des anschließenden Waschvorgangs der Säule abgetrennt. Gebundene Proteine wurden mit Hilfe eines linearen, fallenden Ammoniumsulfat-Gradienten von der Säule eluiert. Die Elution der CO-Dehydrogenase erfolgte bei ca. 0,45 M $(NH_4)_2SO_4$ (Abb. 3-3). Fraktionen, die eine Absorption bei 450 nm (Maß für den relativen Flavingehalt) und 550 nm (Maß für den relativen FeS-Gehalt) aufwiesen, sowie CO-Oxidationsaktivität zeigten, wurden gepoolt und durch

Ultrafiltration (Kap. 2.3.5) aufkonzentriert. Zur Entfernung von Ammoniumsulfat wurde das gereinigte Enzym mittels Sephadex G-25 filtriert (Kap. 2.3.4).

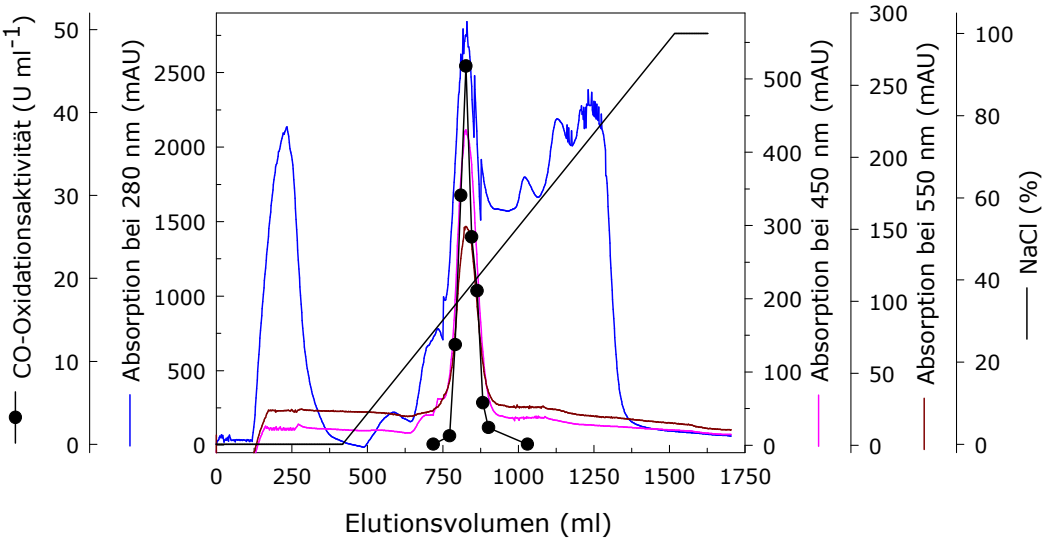


Abb. 3-2 Anionenaustausch-Chromatographie der cytoplasmatischen Fraktion von *O. carboxidovorans* an Source 30Q

Die cytoplasmatische Fraktion wurde auf eine mit 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 äquilibrierte Source 30Q-Säule (100 ml Bettvolumen) aufgetragen. Die Elution nichtbindender Proteine erfolgt durch Spülen mit 200 ml 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2. Die gebundenen Proteine wurden durch einen linearen NaCl-Gradienten (1,5 l) von 0 bis 1 M NaCl in 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 eluiert. Die Flussrate während der Probenübertragung betrug 10 ml min^{-1} und die der Spülung und des Gradienten 20 ml min^{-1}. Das Volumen der Fraktionen betrug 20 ml. Der Proteingehalt wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Messung des relativen Flavin- und FeS-Gehalts erfolgte über die Absorption bei 450 nm bzw. 550 nm. Die CO-Dehydrogenase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurde photometrisch wie in Kap. 2.5.1 beschrieben bestimmt.

In dieser Arbeit wurden CO-Dehydrogenasen mit unterschiedlichen CO-oxidierenden Aktivitäten gewonnen. Die CO-Dehydrogenasen mit unterschiedlichen oxidierenden Aktivitäten sind ebenfalls sehr gut geeignet zur Klärung der Frage, ob das aktive Zentrum auch für die reduzierende Aktivität eine Rolle spielt. Damit konnte man die katalytisch kompetente CO-Dehydrogenase, die für die oxidierende Aktivität verantwortlich ist, genau mit der reduzierenden Aktivität untersuchen und vergleichen.

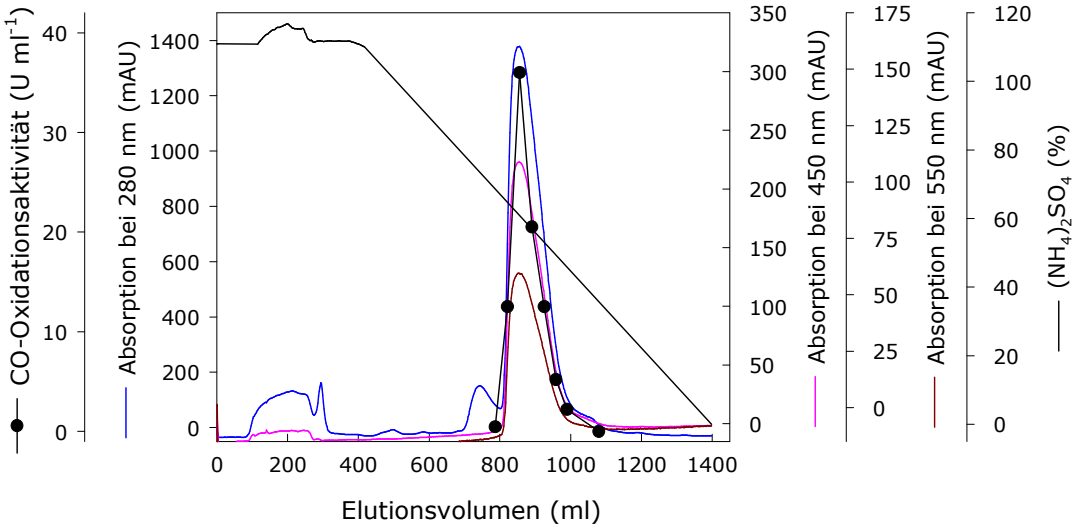


Abb. 3-3 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Source 15ISO

Der Proteinpool aus der Anionenaustausch-Chromatographie, der CO-Dehydrogenase–Aktivität enthält, wurde mit $(NH_4)_2SO_4$ Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1,2 M versetzt. Nach Abzentrifugation wurde der Überstand auf eine mit 0,85 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM KH_2PO_4/NaOH, pH 7,2 äquilibrierte Säule (100 ml Bettvolumen) aufgetragen. Die Elution nichtbindender Proteine erfolgte mit 200 ml 0,85 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM KH_2PO_4/NaOH, pH 7,2. Gebundene Proteine wurden durch einen linearen Gradienten (1 l) von 0,85 M bis 0 M $(NH_4)_2SO_4$ eluiert. Die Flussrate für die Probenübertragung betrug 5 ml m^{-1} und für den Gradienten 10 ml^{-1}. Das Fraktionsvolumen lag bei 10 ml. Die Bestimmung des relativen Flavin- und FeS-Gehalts erfolgte über die Messung der Absorption bei 450 nm bzw. 550 nm. Die CO-Dehydrogenase-Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurde photometrisch, wie in Kap. 2.5.1 beschrieben, bestimmt.

CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* wurde mit einer Ausbeute von ca. 56% 6fach und einer spezifischen Aktivität von 14,8 U mg^{-1} (bei 30° C, mit INT/MPMS als Elektronenakzeptoren) angereichert (Tabelle 3-1). Die Analyse der nativen PAGE zeigte, dass die gereinigten CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* in Form von elektrophoretisch homogenen Proteinbanden vorlagen. Die qualitative CO-Oxidationsaktivität der beiden CO-Dehydrogenasen wurde durch Aktivitätsfärbung nachgewiesen (Abb. 3-4A, Kap. 2.11). Durch SDS-PAGE wurden die Untereinheiten der gereinigten CO-Dehydrogenasen bestimmt (Abb. 3-4B, Kap. 2.10).

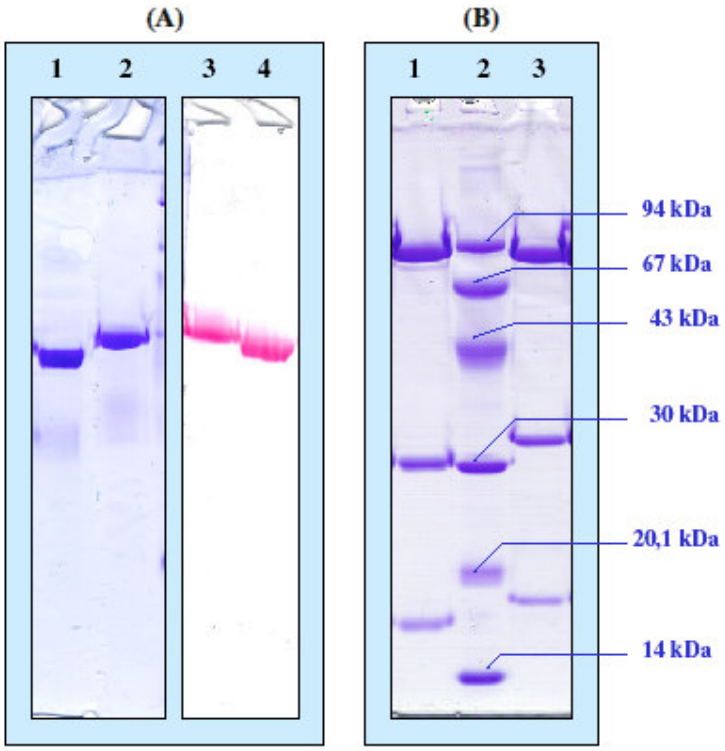


Abb. 3-4 Native PAGE der gereinigten CO-Dehydrogenasen Aktivitätsfärbung (A) und denaturierende PAGE homogener CO-Dehydrogenasen (B) aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*

Proben (je 50 µg pro Bahn) der gereinigten CO-Dehydrogenasen mit der spezifischen Aktivität von 14,8 U mg^{-1} für *O. carboxidovorans* und 11,5 U mg^{-1} für *S. thermoautotrophicus* wurden auf einer nativen PAGE (A) in einem 7,5%-igen Trenngel aufgetragen und auf einer denaturierenden PAGE (B) mit 7,5%-igem Sammelgel und 12%-igem Trenngel analysiert. Die Proteinbanden Bahn 1 und 2 (A) und Bahn 1 bis 3 (B) wurden mit Coomasieblau gefärbt (Kap. 2.10). Die Proteinbanden Bahn 3 und 4 (A) wurden durch Aktivitätsfärbung sichtbar gemacht (Kap. 2.11).
A: Bahn 1 und 4, gereinigte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*; Bahn 2 und 3, gereinigte CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*.
B: Bahn 1, gereinigte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*; Bahn 2, Standardproteine von 14 bis 94 kDa (Pharmacia Biotec Freiburg); Bahn 3, gereinigte CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*.

CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* zeigte drei Untereinheiten, eine große Untereinheit (Cox L) mit 90 kDa, eine mittlere Untereinheit (Cox M) mit 30 kDa und eine kleine Untereinheit (Cox S) mit 17 kDa. Bei der CO-Dehydrogenase

aus *S. thermoautotrophicus* konnte eine ähnliche Untereinheitenstruktur mit der Molekularmasse von 88 kDa für Cox L, 32 kDa für Cox M und 18 kDa für Cox S bestimmt werden.

Tabelle 3-1 Anreicherung von CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Anreicherungs-schritt	Volumen (ml)	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität* (U)	Spezifische Aktivität (U mg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherungs-faktor
Zellfreier Rohextrakt	**110**	**2816**	**7040**	**2,50**	**100**	**1,0**
Cytoplasmatische Fraktion	**140**	**1400**	**5656**	**4,04**	**80,3**	**1,6**
Anionenaustausch-Chromatographie	**120**	**540**	**4374**	**8,10**	**62,1**	**3,2**
Hydrophobe Interak-tionschromatographie	**130**	**299**	**4156**	**13,90**	**59,0**	**5,6**
Umpufferung und Aufkonzentrieren	**16,6**	**268**	**3962**	**14,80**	**56,3**	**5,9**

*** 1 U = 1 µmol CO oxidiert min^{-1} bei 30° C**

3.3 Wirkung von N-N, N-O- und C-C Verbindungen auf die CO-Dehydrogenase

In der Molybdoenzym-Gruppe wurde CO-Dehydrogenase kürzlich als eine neue Familie der zweikernigen Molybdoenzyme (L´CuSMoOL`) vorgeschlagen (Gnida *et al*. 2003). In der Literatur ist bekannt, dass Molybdoenzyme N-N-, N-O- und C-C-Verbindung reduzieren können. Zur Charakterisierung der reduktiven Aktivität der CO-Dehydrogenase sollte deshalb zuerst der Einfluss ausgewählter Substrate wie N_3^-, C_2H_2, NO_2^-, NO_3^- und He (als Kontrolle) auf die CO-Oxidationsaktivität überprüft werden (Abb. 3-5). Von diesen ausgewählten Substraten zeigte nur C_2H_2 eine Hemmwirkung auf die CO-Oxidationsaktivität. Es wurde kürzlich bewiesen, dass C_2H_2 im aktiven Zentrum bindet (Kap. 1.3.3) (Egerer 2003). Deshalb wurde C_2H_2 als mögliches Substrat für die Reduktion durch CO-Dehydrogenase ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu zeigten Substrate wie Azid, NO_2^- und NO_3^- keine Hemmwirkung auf die CO-Dehydrogenase (Abb. 3-5). Das Ergebnis, das Azid keine Hemmwirkung auf CO-Dehydrogenase hat, ist

sehr interessant, da Azid eigentlich ein bekannter Inhibitor zahlreicher metallhaltiger Enzyme ist (Kap. 1.6). Bei den Untersuchungen über die Hemmwirkung von Azid auf Cu-haltige Enzyme, wie z.B. Nitritreduktase oder CuZn-Superoxid- Dismutase (CuZn-SOD) wurde nachgewiesen, dass Azid nicht die reduzierten Enzyme, in denen die Cu-I Form vorliegt, hemmt (Leone *et al*. 1998, Strange *et al.* 1999). Bei der CO-Dehydrogenase kommt unabhängig vom Redoxzustand immer Cu (I) im aktiven Zentrum vor (Dobbek *et al*. 2002). Aus diesem Grund ist es einleuchtend, dass Azid keine Wirkung auf die CO-Dehydrogenase ausübt. NO_2^- und NO_3^- zeigten ebenfalls keine Wirkung auf die CO-Dehydrogenase (Abb. 3-5).

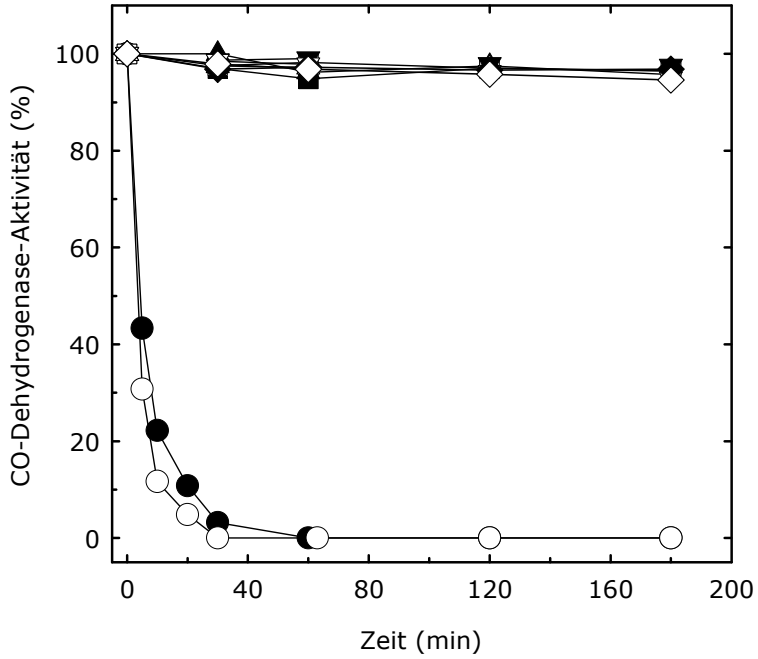


Abb. 3-5 Wirkung unterschiedlicher Substrate auf die Aktivität der CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*

Die oxidierten CO-Dehydrogenasen (1mg ml^{-1} in 5 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer, 50 mM, pH 7,2) aus *O. carboxidovorans* (◇, ○, □, △, ▽) und *S. thermoautotrophicus* (◆, ●, ■, ▲, ▼) wurden in geschlossenen Wheatonflaschen unter anoxischer Bedingung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flaschen enthielten: He-Atmosphäre (◆, ◇); C_2H_2-Atmosphäre (●, ○); 10 mM N_3^- (■, □); 10 mM NO_2^-(▲, △); 10 mM NO_3^- (▼, ▽). In regelmäßigen Abständen wurden mit Hilfe einer Hamilton-Spritze Proben aus den Flaschen entnommen und auf CO-Dehydrogenase-Aktivität geprüft. Der zeitliche Verlauf der spezifischen CO-Dehydrogenase-Aktivität (100% Aktivität = 14,8 U mg^{-1} (*O. carboxidovorans*) und 11,2 U mg^{-1} (*S. thermoautotrophicus*) wurde im INT-Test (Kap. 2.5.1) bestimmt.

In dieser Arbeit wurden diese drei Substrate, die keine Hemmung der CO-Dehydrogenase-Aktivität verursachten, für weitere Untersuchungen verwendet.

3.4 Azid als neues Substrat der CO-Dehydrogenase

In Anwesenheit eines Reduktionsmittels, z.B. Dithionit, sind die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* in der Lage, Azid zu Ammonium und N_2 zu reduzieren. Die Voraussetzungen für die Azid-Reduktion sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2 Einfluss einzelner Komponenten auf die Ammoniumbildung aus Azid

Komponenten im Ansatz			Aktivität
CO-Dehydrogenase	Dithionit	NaN_3	N_3^--Reduktion[a)]
+[b)]	+	+	35,23
+[c)]	+	+	37,65
+	+	-	n.n.
+	-	+	n.n.
-	+	+	n.n.
-	-	+	n.n.

In den Ansätzen, die jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2), 1 mg CO-Dehydrogenase, 10 mM NaN_3, 5 mM Dithionit als Elektronen-Donor enthielten, wurde die Azid-Reduktionsaktivität gemessen (Kap. 2.5.2). Die Ammoniumbildung des Azid-Reduktionsprodukts wurde wie in Kap. 2.6.2 beschrieben ermittelt.

[a)] nmol NH_4^+ mg^{-1} min^{-1} bei 60° C

[b)] CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

[c)] CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*

+ anwesend

- abwesend

n.n.: nicht nachweisbar

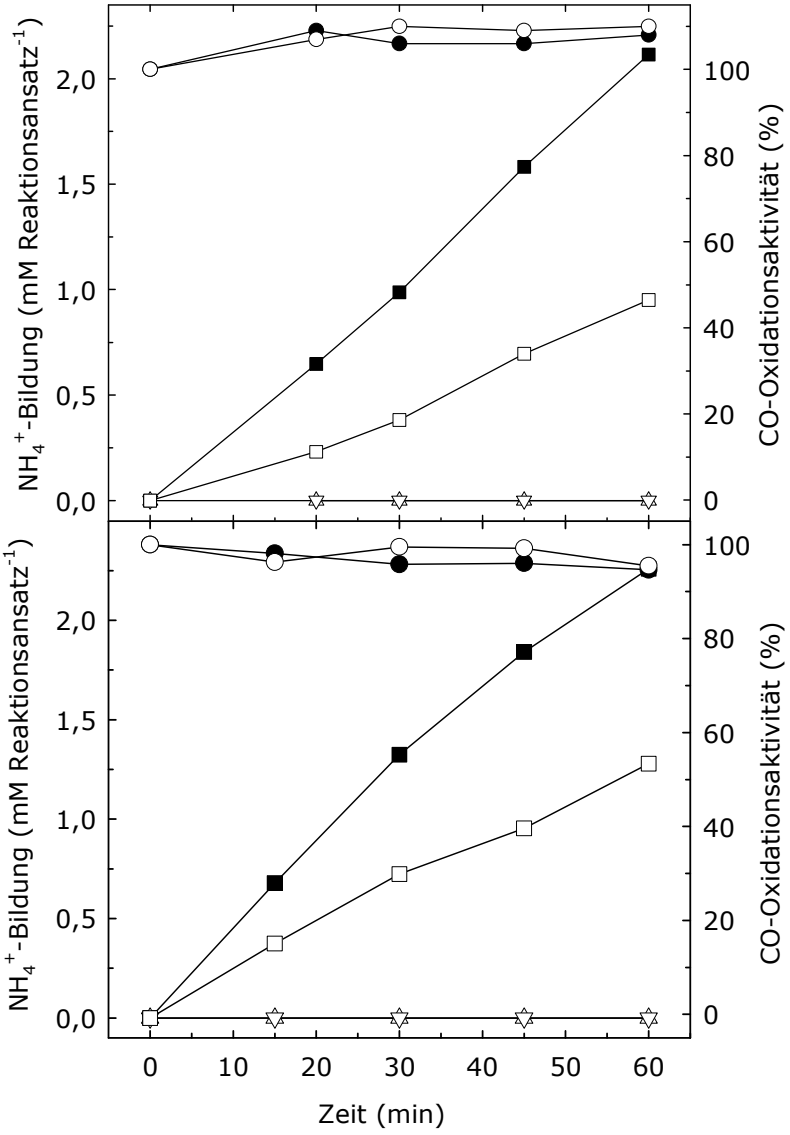


Abb. 3-6 Die CO-oxidierende Aktivität der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B) während der Azid-Reduktion

Die Ansätze enthielten jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5 und 7,2), 1 mg Protein, 10 mM N_3^- und 5 mM Dithionit (Kap. 2.5.2). Der zeitliche Verlauf der CO-Dehydrogenase-Aktivität [100% Aktivität = 14,8 U mg^{-1} (*O. carboxidovorans*) und 11,5 U mg^{-1} (*S. thermoautotrophicus*)] während der Azid-Reduktion wurde im CO → INT/PMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1) und die Ammoniumbildung gemessen (Kap. 2.6.2).
Symbole: (□) NH_4^+-Bildung bei pH 7,2; (■) NH_4^+-Bildung bei pH 6,5; (○) CO-Oxidationsaktivität bei pH 7,2; (●) CO-Oxidationsaktivität bei pH 6,5; (△) NH_4^+-Bildung ohne N_3^- (Kontrolle), (▽) NH_4^+-Bildung ohne Enzym (Kontrolle).

Während der Azid-Reduktion bleibt die Oxidationseigenschaft der CO-Dehydrogenase unverändert.

In Anwesenheit von Azid wurde die Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase nicht gehemmt. Bei direkter Zugabe von Azid während des INT-Tests (für die Messung der CO-Dehydrogenase-Aktivität) wurde die CO-Oxidationsaktivität ebenfalls nicht gehemmt. Als weitere Frage stellte sich, ob im reduzierten Zustand während der Azid-Reduktion bzw. in Anwesenheit von Azid, die CO-Oxidationsfähigkeit inaktiviert wird. Abb. 3-6 zeigt die CO-Oxidationsaktivität während der Azid-Reduktion. Die Dithionit-reduzierten CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* wurden in Anwesenheit von Azid nicht gehemmt und behielten vollständig ihre CO-Oxidationsaktivität. Vermutlich haben Azid bzw. Übergangsprodukte, die während der Azid-Reduktion entstehen, keine Hemmwirkung auf die CO-Oxidation haben. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die Elektronen, die während der CO-Oxidation gebildet werden, für die Reduktion des Azids zur Verfügung stehen. Voraussetzung dafür ist, dass Azid oder die Übergangsprodukte mit CO nicht reagieren oder toxische Verbindungen bilden, die die CO-Dehydrogenase negativ beeinflussen.

3.4.1 Produkte der Azid-Reduktion

Die molare Stöchiometrie des reduzierten Azids (als Substrat) zum gebildeten Ammonium (als Produkt) war 2:1 woraus sich die Frage ergibt, was mit der anderen Hälfte des Azids geworden ist. Das andere mögliche Produkt könnte Distickstoff sein. Zur Überprüfung wurde die Warburg-Manometrie eingesetzt (Kap. 2.13.1), in der sich sowohl Gasverbrauch als auch Gasbildung nachweisen lässt (Abb. 3-7). Die Gasbildung war nur in den Ansätzen deutlich sichtbar, die alle Komponenten, also CO-Dehydrogenase, Dithionit und Azid, enthielten.

Damit man die Proportion der Ammonium- und Gasbildung in den beiden Ansätze miteinander vergleichen kann wurden zwei unterschiedliche Ansätze vorbereitet. Ein Ansatz enthielt 15 mM Azid, der andere 5 mM Azid. In beiden Ansätzen wurden CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* und Dithionit zugegeben.

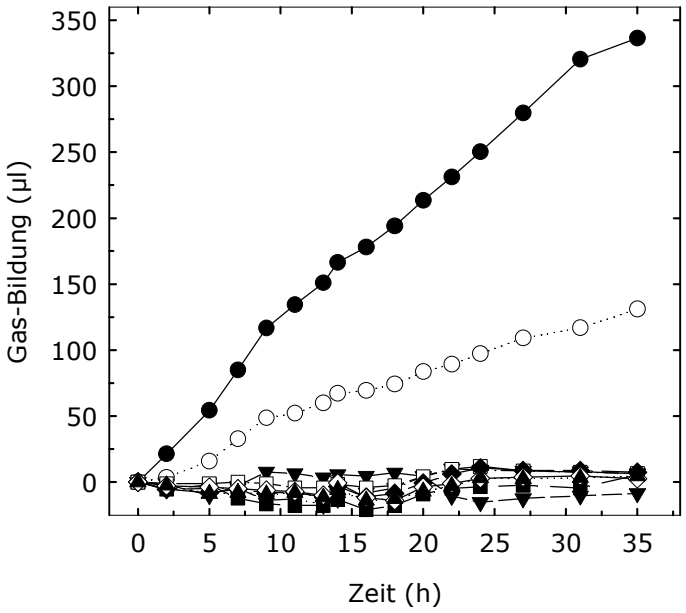


Abb. 3-7 Gasbildung während der Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase

Während der Azid-Reduktion wurde die Gasbildung anhand der Gaszunahme in den Warburg-Gefäßen bestimmt (40° C) (Kap. 2.13.1). Die kompletten Reaktionsansätze enthielten 2 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2), 2 mg CO-Dehydrogenase, 10 mM Dithionit und 5 mM (○) oder 15 mM Azid (●). Kontrolle: ohne Enzym (▼), ohne Azid (▽), ohne Dithionit (■) ohne Azid und Dithionit (□), ohne Enzym und Dithionit (◆), ohne Enzym und Azid (◇), nur Puffer (▲).

Nach 35 h Inkubationszeit wurde das Experiment beendet. Die Ansätze, die 15 mM Azid enthielten, bildeten 337,95 ± 2,63 µl (359,58 und 336,32 µl) Gas, das entspricht 13,24 ± 0,55 µl (14,09 und 13,18 µmol) Gas bzw. 15,16 ± 0,1 µmol (15,06 und 15,28) NH_4^+. Die Ansätze, die 5 mM Azid enthielten, bildeten 136,85 ± 5,17 µl (131,68 und 142,02 µl) Gas; das entspricht 5,36 (± 0,20) µmol Gas, bzw. 5,36 ± 0,2 µmol (5,16 und 5,56) NH_4^+. Es wurde deutlich, dass während der Azid-Reduktion außer Ammonium auch Gas gebildet wird. In den Ansätzen, in denen CO-Dehydrogenase, Azid oder Dithionit fehlten, konnte weder Ammonium- noch Gasbildung beobachtet werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die NH_4^+- und Gasbildung nur aus Azid durch enzymatische Reaktion in Anwesenheit von Reduktionsmittel stattfindet. Das gebildete Gas wurde gaschromatographisch analysiert und eindeutig als Distickstoff bestimmt. Die Stöchiometrie des verbrauchten Substrats und der gebildeten Produkte wurde genauer untersucht.

3.4.2 Stöchiometrie der Azid-Reduktion

Um die genaue Stöchiometrie der Reduktion von Azid und der dabei gebildeten Produkte zu erhalten, wurden Versuche in kleinen Wheatonflaschen (8 ml) durchgeführt. Diese enthielten 4 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5), 1 mg CO-Dehydrogenase ml^{-1}, 5 mM Dithionit und 4 oder 7,5 µmol Azid. Alle Ansätze wurden mit mehrmaliger Evakuierung und Begasung mit He unter anoxischen Bedingungen vorbereitet. Die Wheatonflaschen wurden bei 50° C (*O. carboxidovorans*), bzw. 60° C (*S. thermoautotrophicus*) inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden einzelne Wheatonflaschen für die Analyse entnommen. Mit Hilfe einer Hamilton-Spritze wurden 50 µl Gas aus dem *Headspace* entnommen und für die Gasanalyse verwendet. Die Azid- und Ammonium-Analyse (Kap. 2.6.1 und Kap. 2.6.2) durchgeführt. Für die Gasanalyse wurde ein Gaschromatograph verwendet (Kap.2.13.2).

In Abb. 3-8 ist dargestellt, dass die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* 7,5 µmol Azid zu 7,66 (± 0,03) µmol NH_4^+ und 7,79 (± 0,13) µmol N_2 reduziert (Tabelle 3-3). Die CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* katalysierte die Reduktion von 4 µmol Azid zu 3,80 (± 0,07) µmol NH_4^+ und 3,88 (± 0,10) µmol N_2 (Tabelle 3-3). Die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* verhalten sich bei der Azid-Reduktion ähnlich (Abb. 3-8). Es ist deutlich geworden, dass die Azid-Reduktion und die gebildeten Produkte NH_4^+ und N_2 im Verhältnis 1:1 stehen.

$$1\ N_3^- + 4\ H^+ + 2\ e^- \longrightarrow 0{,}99\ NH_4^+ + 1{,}01\ N_2$$

Tabelle 3-3 Stöchiometrie der Azid-Reduktion

CO-Dehydrogenase	Azid (µmol)	Ammonium (µmol)		Stickstoff (µmol)	
		I	II	I	II
O. carboxidovorans	7,5	7,63	7,68	7,66	7,91
S. thermoautotrophicus	4,0	3,87	3,73	3,98	3,79

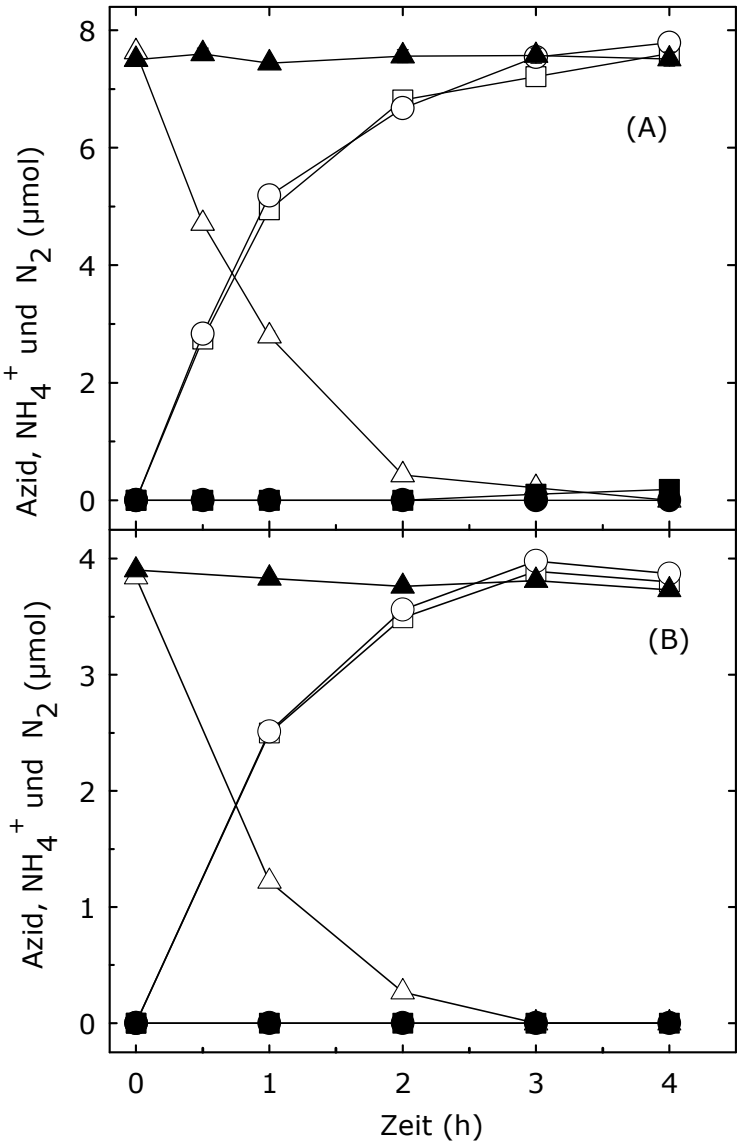


Abb. 3-8 Die stöchiometrische Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B)

Die Ansätze enthielten jeweils 4 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5), 1 mg Enzym ml^{-1}, 5 mM Dithionit, 7,5 µmol Azid (A) oder 4 µmol Azid (B). Alle Ansätze wurden unter anoxischen Bedingungen vorbereitet (Kap. 2.5.2). Die Proben wurden im Wasserbad bei 50° C (*O. carboxidovorans*) bzw. 60° C (*S. thermoautotrophicus*) inkubiert. Das gebildete N_2 wurde in einem Gaschromatographen, der mit einem „Thermal Conductive Detektor" ausgestattet war, analysiert und quantifiziert (Kap. 2.13.2). Die Ammoniumbildung und die Azid-Konzentration wurden, wie in Kap. 2.6.1 und Kap. 2.6.2 beschrieben, gemessen.

Symbole: (△) Azid-Reduktion, (□) NH_4^+-Bildung; Kontrolle: (▲) Azid-Reduktion ohne Enzym, (■) NH_4^+-Bildung ohne Enzym (●) N_2-Bildung ohne Enzym.

3.4.3 Kinetik der Azid-Reduktion

Die optimale Azid-Reduktion findet bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von 60° C statt. Meyer und Schlegel (1980) berichteten, dass das Temperaturoptimum der CO-Dehydrogenase-Aktivität bei 63° C lag.

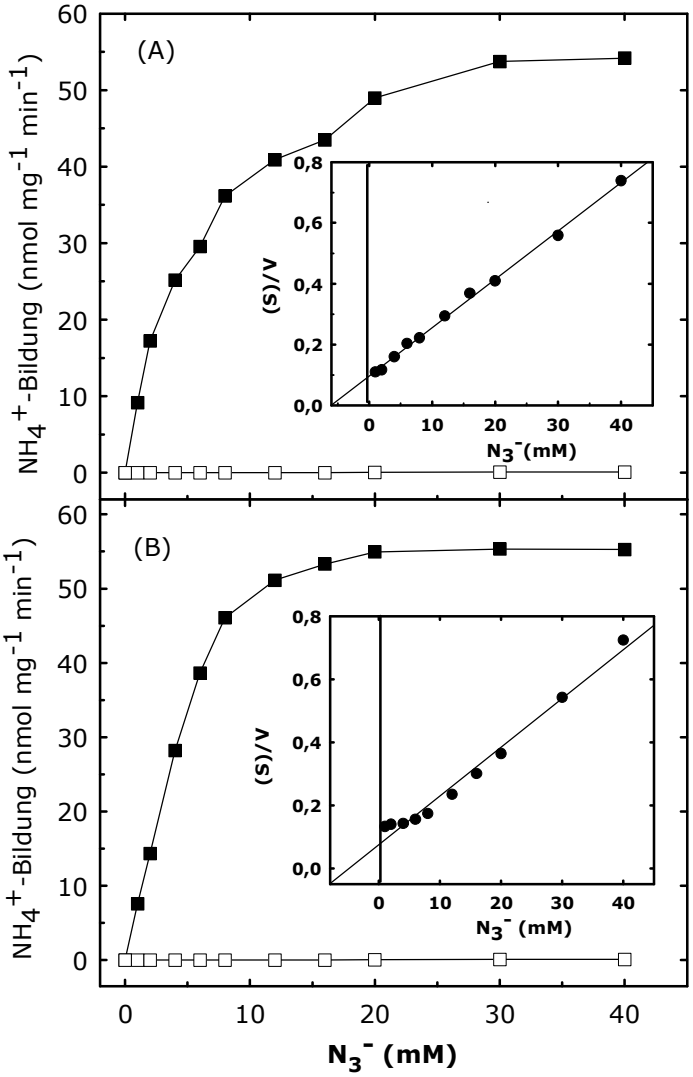


Abb. 3-9 Abhängigkeit der Ammoniumbildung durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B) von der Azidkonzentration

Die Ansätze enthielten jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6.5), 5 mM Dithionit, 1 mg CO-Dehydrogenase und 2 bis 40 mM Azid (■), Kontrolle (ohne Enzym) (□) (Kap. 2.5.2). Die Proben wurden bei 60° C inkubiert. Die Ammoniumbildung aus Azid wurde gemessen (Kap. 2.6.2). Der Inset zeigt den Hanes-Plot. Die aufgetragenen Daten waren die Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Die K_m-Werte der Azid-Reduktion wurden durch graphische Auftragung nach Hanes (1932) bestimmt. Ein K_m-Wert von 6,06 mM (Abb. 3-9) für *O. carboxidovorans* und 4,93 mM für *S. thermoautotrophicus* wurde ermittelt. Der gemessene K_m-Wert zeigt, dass die CO-Dehydrogenasen aus dem mesophilen Bakterium *O. carboxidovorans* und dem thermophilen Bakterium *S. thermoautotrophicus* ungefähr die gleiche Affinität zu Azid haben. Die V_{max} der Azid-Reduktion beider Enzyme sind auch in etwa identisch und liegen bei 54 nmol NH_4^+ mg^{-1} min^{-1}. Verglichen mit der CO-Oxidationsaktivität (12 bis 23 µmol mg^{-1} min^{-1}) ist die Azid-Reduktionsaktivität etwa um den Faktor 300 geringer.

3.4.4 H_2 als geeigneter Elektronen-Donor für die Azid-Reduktion

CO-Dehydrogenase wurde durch CO, H_2 oder einen künstlichen Elektronen-Donor wie Dithionit reduziert. Wie bereits erwähnt, dient Dithionit auch als Elektronen-Donor für die Azid-Reduktion. Aus diesem Grund wurde die Frage gestellt, ob andere Elektronen-Donoren wie CO, H_2 und Ti(III)-Citrat für die Azid-Reduktion geeignet sind.

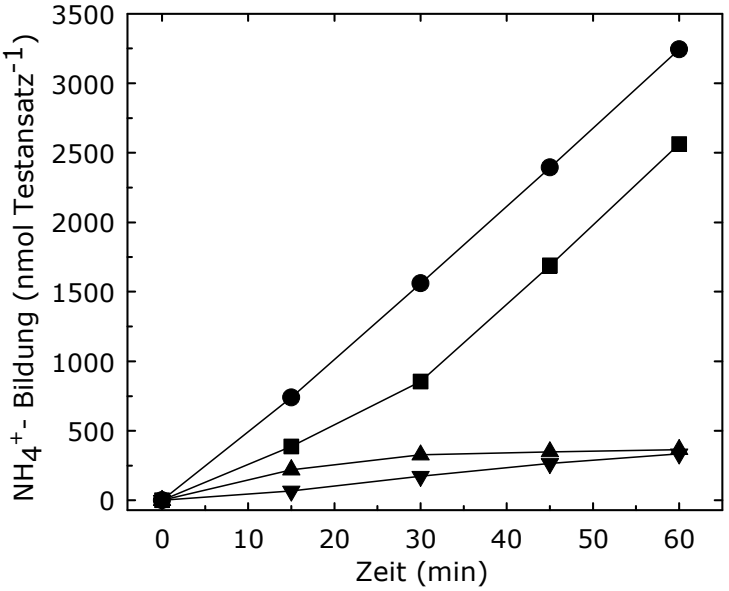


Abb. 3-10 Azid-Reduktion mit unterschiedlichen Elektronen-Donoren durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Die Ansätze enthielten jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5), 1,4 mg Enzym ml^{-1}, 10 mM Azid und unterschiedliche Elektronen-Donoren: 5 mM Dithionit (●); H_2 (■); CO (▲) oder 1 mM Ti(III)-Citrat (▼). Alle Ansätze wurden unter anoxischen Bedingungen vorbereitet (Kap. 2.5.2), bzw. unter CO-Atmosphäre mit CO als Elektronen-Donor oder H_2-Atmosphäre mit H_2 als Elektronen-Donor. Die Proben wurden bei 60° C inkubiert. Die Ammoniumbildung wurde, wie in Kap. 2.6.2 beschrieben gemessen.

Abb. 3-10 zeigt den Vergleich der verschiedenen Elektronen-Donoren in Bezug auf die Azid-Reduktion. H_2 erwies sich ebenfalls als ein geeigneter Elektronen-Donor für die Azid-Reduktion. Die Aktivität der Azid-Reduktion, wobei das H_2 als Elektronen-Donor verwendet wird, war ca. 80% weniger als mit Dithionit.

Die CO-Dehydrogenase konnte kaum Ti(III)-Citrat als Elektronen-Donor für die Azid-Reduktion verwenden. Erstaunlicherweise konnte CO nur während des Reaktionsbeginns (für ca. 15 min) als Elektronen-Donor dienen (Abb. 3-10). Um dieses Phänomen auf den Grund zu gehen, wurde die CO-Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase während der Inkubation mit Azid und CO gemessen.

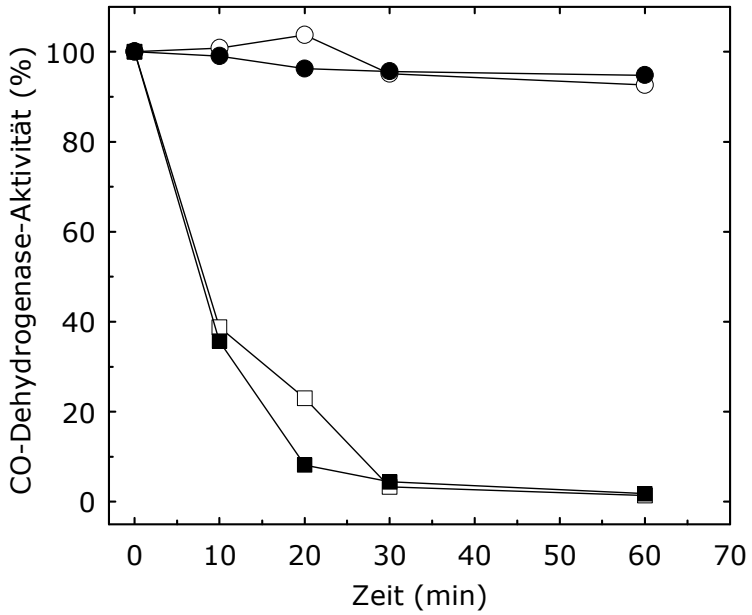


Abb. 3-11 CO-oxidierende Aktivität während der Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* in Anwesenheit von CO oder H_2

Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5) und 1 mg Enzym und wurden unter anoxischen Bedingungen vorbereitet. Die Proben wurden entweder mit H_2 oder mit CO begast (2 min lang). Dann wurde das anoxische Azid (Endkonzentration 10 mM) mit Hilfe einer Hamilton-Spritze dazugegeben. Die Proben wurden im Wasserbad (50° C) inkubiert. Der zeitliche Verlauf der spezifischen Aktivität wurde in Aliquots im CO → INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1). [100% Aktivität = 21,5 U mg^{-1} (*O. carboxidovorans*) und 12,5 U mg^{-1} (*S. thermoautotrophicus*)].
O. carboxidovorans: (●) H_2-Atmosphäre, (■) CO-Atmosphäre; *S. thermoautotrophicus*: (○) H_2-Atmosphäre, (□) CO-Atmosphäre.

Im Gegensatz zu Azid und H_2-Atmosphäre wurde in Anwesenheit von Azid und CO-Atmosphäre die CO-Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase vollständig inaktiviert. Gleichzeitig wurde mit der Oxidationsaktivität (Abb. 3-11) auch die Reduktionsaktivität beeinträchtigt. Das war ein erster Hinweis darauf, dass zwischen CO-Oxidation und Azid-Reduktion ein Zusammenhang besteht.

Es ist bekannt, dass die CO-Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase durch CO plus O_2 oder H_2 plus O_2 inaktiviert wird (Gremer 2000, Lengel 2002). Falls die hier beobachtete Inaktivierung der CO-Dehydrogenase mit Azid/CO nichts zu tun haben sollte, müsste es eine andere Erklärung geben. Es könnten möglicherweise während der Assay-Vorbereitung in die Gefäße Spuren von O_2 eintreten, die zusammen mit CO eine Inaktivierung herbeiführen. Allerdings müsste zwangsläufig in den Ansätzen mit H_2-Atmosphäre, auch eine Hemmung eintreten, da O_2 und H_2 zusammen ebenfalls die CO-Dehydrogenase hemmen (Lengel 2002). Dies ist nicht der Fall, was bedeutet, dass tatsächlich auch in Anwesenheit von Azid und CO die CO-Dehydrogenase inaktiviert wird.

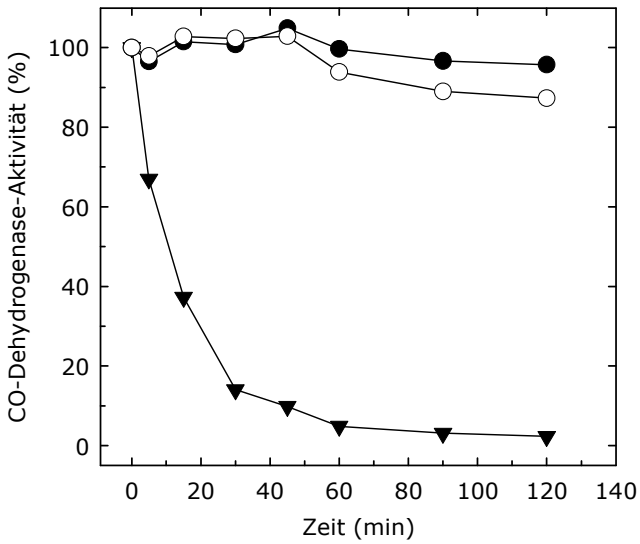


Abb. 3-12 Inaktivierung der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* durch CO plus Azid in Anwesenheit von Dithionit

Die Reaktionsansätze enthielten 1 mg Enzym, 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5), 5 mM Dithionit und 10 mM Azid. Die Proben wurden unter anoxischen Bedingungen vorbereitet und mit CO begast. Vor Messung der CO-Oxidationsaktivität wurde die Reaktion durch Entfernen von CO aus den Flaschen gestoppt. Der zeitliche Verlauf der spezifischen Aktivität (100% Aktivität = 14,5 U mg^{-1}) wurde in Aliquots im CO → INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1). Symbole: (▼) Ansatz mit CO und Azid; (●) Ansatz ohne Azid; (○) Ansatz ohne Azid und Dithionit.

Ein weiterer Beweis dafür ist, dass die Inaktivierung durch Zugabe von Dithionit nicht verhindert werden kann (Abb. 3-12). Vermutlich reagieren Azid und CO oder die Übergangsprodukte, die während der Azid-Reduktion entstehen, miteinander und verursachen die Hemmung. Im Folgenden wurde daher eine ausführliche Untersuchung dieses Phänomens durchgeführt (Kap. 3.4.6).

3.4.5 Bindung und Reduktion von Azid am aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase

Die CO-Oxidationsaktivität wird durch n-Butylisocyanid, Cyanid und Acetylen inhibiert (Gremer 2000, Dobbek *et al.* 2002, Egerer 2003). Diese Inhibitoren binden entweder am aktiven Zentrum oder entfernen einen Teil der Komponenten vom aktiven Metallzentrum (Kap. 1.3, Dobbek *et al.* 2002). Dieser Befund hat dazu beigetragen, dass das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase charakterisiert werden konnte (Dobbek *et al.* 2002). In dieser Arbeit weisen die vorherigen Versuche darauf hin, dass wahrscheinlich die Bindungsstelle für die CO-Oxidation und Azid-Reduktion gleich ist und dass eine große Korrelation zwischen CO-Oxidation und Azid-Reduktion besteht.

Es sollte daher genau untersucht werden, ob die beobachtete Korrelation zwischen Oxidations- und Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase tatsächlich besteht und die Ergebnisse zur Strukturaufklärung beitragen könnten.

3.4.5.1 Azid-Reduktionsaktivität der Cyanid behandelten CO-Dehydrogenasen

Das zweikernige Molybdoenzym CO-Dehydrogenase reagiert nach Cyanid-Behandlung ähnlich wie einkernige Molybdoenzyme, z.B. Xanthin-Oxidase oder Xanthin-Dehydrogenase (Gremer 2000, Meyer und Schlegel 1983). Damit ist erwiesen, dass CO-Dehydrogenase cyanolysierbaren Schwefel besitzen muss. Jedoch wurden durch die Cyanidbehandlung nicht nur der Sulfido-Ligand als Rhodanid (SCN^-), sondern auch das Cu-Atome, wahrscheinlich als CuCN, vom aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase entfernt (Dobbek *et al*. 2002). Das Enzym verliert die CO-Oxidationsfähigkeit. Es wurde in dieser Arbeit bereits beobachtet, dass es zwischen der Azid-Reduktionsaktivität und der CO-Oxidationsaktivität einen Zusammenhang gibt (Kap. 3.4.4). Ob die Azid-Reduktionsaktivität in Abhängigkeit vom aktiven Zentrum steht, an dem die

CO-Oxidationsfähigkeit postuliert wird (Dobbek *et al*. 2002), muss durch Entfernung des Sulfido-Liganden und des Cu-Atoms vom aktiven Zentrum nun bei der Cyanidbehandlung untersucht werden.

Die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* wurden in Gegenwart von 10 mM Kaliumcyanid (KCN) inkubiert. Während des Zeitverlaufs wurden Proben zur Messung der CO-Oxidations- und der Azid-Reduktionsaktivität und der Freisetzung von Schwefel (Kap. 2.12.1) entnommen. Die Inkubation von aktiver CO-Dehydrogenase mit KCN unter anoxischen Bedingungen führte zu einer Inaktivierung.

Die Halbwertzeit sowohl für die CO-Oxidationsaktivität als auch für die Azid-Reduktionsaktivität beträgt ca. 30 min (Abb. 3-13). Die Messungen der CO-Oxidations- und der Azid-Reduktionsaktivität erfolgten nach der Entfernung des KCN über Gelfiltration an Sephadex G-25 (PD-10).

Die Abnahme der CO-Oxidationsaktivität korrespondierte mit der Abnahme der Azid-Reduktionsaktivität. Die Freisetzung von Rhodanid (SCN^-) war umgekehrt proportional zu den beiden Aktivitäten (Abb. 3-13). Das farblose Rhodanid wurde durch Zentrifugalfiltration der Cyanid-inhibierten Enzyme über eine Membran mit 30 kDa Ausschlussgrenze gewonnen. Nach Reaktion mit $Fe(NO)_3$ bildete Rhodanid eine rotbraune Farbe $Fe(SCN)_2$, die ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 460 nm zeigte. Eine typische Bleichung des UV/vis-Spektrums im Bereich von 300 nm bis 600 nm wurde von der Cyanid-inhibierten CO-Dehydrogenase festgestellt.

Nach der Inkubation der CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* (Ausgangsaktivität: 14,8 U mg^{-1}) mit KCN im Zeitraum von 19 bis 24 h wurde der cyanolisierbare Schwefel (1,78 mol mol^{-1} Enzym) vollständig aus dem Enzym entfernt (Abb. 3-13A). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Cu-Atome (1,54 mol mol^{-1} Enzym) auch aus dieser Probe entfernt wurden. Dies führte zu einer kompletten Hemmung der CO-Oxidations- und der Azid-Reduktionsaktivität. CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus,* die mit Cyanid behandelt war, zeigte ähnliche Resultate (Abb. 3-13B). Es ist deshalb anzunehmen, dass das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase sowohl für die CO-Oxidation als auch für die Azid-Reduktion verantwortlich ist.

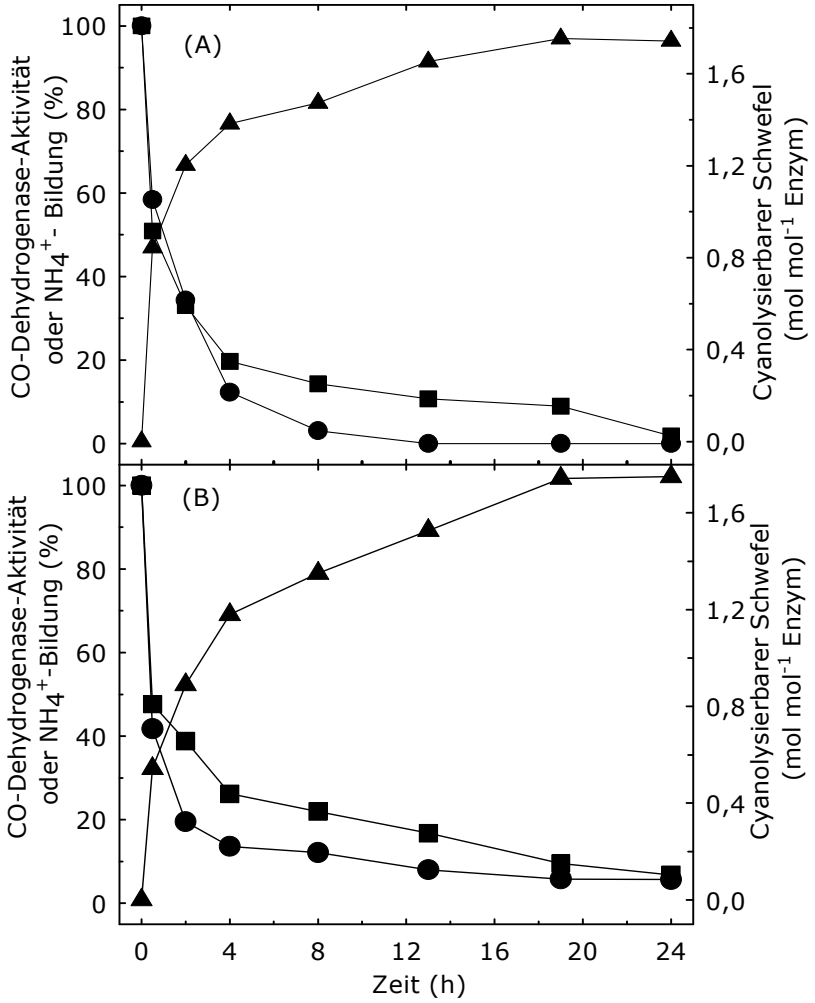


Abb. 3-13 Zeitlicher Verlauf der Cyanid-Inaktivierung der CO-Oxidation und Azid-Reduktion der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B) und Freisetzung des cyanolysierbaren Schwefels

CO-Dehydrogenase (2,2 mg ml^{-1}) wurde unter anoxischen Bedingungen mit 10 mM Cyanid versetzt (Kap. 2.12.1). Der zeitliche Verlauf der spezifischen CO-Dehydrogenase-Aktivität (Kap. 2.5.1) und die Azid-Reduktion wurde in Aliquots nach Abtrennung von Cyanid und der Reaktanten durch Gelfiltration bestimmt. Die Ansätze der Azid-Reduktion enthielten jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5), 1.0 mg Enzym, 10 mM N_3^- und 5 mM Dithionit (Kap. 2.5.2). Die Ammoniumbildung als Folge der Azid-Reduktion wurde, wie in Kap 2.6.2 beschrieben, gemessen. Parallel dazu wurden in den Ultrafiltraten der Reaktionsansätze (Ausschlussgrenze 30 kDa) gebildetes Rhodanid nachgewiesen und quantifiziert (Kap. 2.12.1). [100% Aktivitäten, CODH bzw. NH_4^+-Bildung = 14,8 U mg^{-1}, 28,2 nmol mg^{-1} min^{-1} (*O. carboxidovorans*) und 11,5 U mg^{-1}, 35,8 nmol mg^{-1} min^{-1} (*S. thermoautotrophicus*)].
Symbole: (●) CO-Dehydrogenase-Aktivität; (■) Ammoniumbildung;
(▲) cyanolysierbarer Schwefel.

3.4.5.2 Azid-Reduktionsaktivität der n-Butylisocyanid behandelten CO-Dehydrogenase

Cyanid-inhibierte CO-Dehydrogenasen zeigten weder CO-Oxidations- noch Azid-Reduktionsaktivität. Also ist die Anwesenheit des Cu-Atoms und des Sulfido-Liganden im aktiven Zentrum eine Voraussetzung sowohl für die Azid-Reduktion als auch für die CO-Oxidationsaktivität. Zur Klärung der Funktion des aktiven Zentrums wird daher eine inaktive CO-Dehydrogenase, die immer noch den [$CuSMoO_2$]-Cluster enthält, eine große Hilfe sein. In Gegenwart von 1 mM n-Butylisocyanid verliert innerhalb sehr kurzer Zeit die oxidierte CO-Dehydrogenase ihre CO-Oxidationsaktivität (Dobbek *et al.* 2002). Der Hemmeffekt ist nicht reversibel, da das n-Butylisocyanid im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase kovalent gebunden wird (Kap. 1.3.2). Das zweikernige Zentrum des Enzyms, das durch n-Butylisocyanid behandelt wurde, blieb intakt (Dobbek *et al*. 2002). Abb. 3-14 zeigt die Azid-Reduktionsaktivitäten der mit n-Butylisocyanid behandelten CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*.

Vor Versuchsbeginn wurde die oxidierte CO-Dehydrogenase 15 min lang bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Konzentrationen an n-Butylisocyanid (0 bis 1,2 mM) inkubiert. Es wurde festgestellt, dass die CO-Oxidationsaktivität mit zunehmender Konzentration an n-Butylisocyanid stark gehemmt wurde (Abb. 3-14). CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans,* die mit 0,05 mM n-Butylisocyanid behandelt wurde, zeigte nur ca. 50% CO-Oxidationsaktivität und 45% Azid-Reduktionsaktivität (Abb. 3-14A). Mit steigender n-Butylisocyanid-Konzentration (0,6 mM) wurden die Aktivitäten bis auf eine Restaktivität von 1,8% bzw. 4,2% stark verringert. Unter noch höheren Konzentrationen von n-Butylisocyanid wurden die Aktivitäten vollständig gehemmt. CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus,* die mit n-Butylisocyanid behandelt war, zeigte ähnliche Resultate (Abb. 3-14B).

Es ist eindeutig, dass durch n-Butylisocyanid inaktivierte CO-Dehydrogenase, in der das aktive Zentrum nicht entfernt war, sowohl die Oxidations- als auch die Reduktionsfähigkeit verlor. Da das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase sowohl für die CO-Oxidation als auch für die Azid-Reduktion vollständig verantwortlich ist, ist es gut vorstellbar, dass im zweikernigen Zentrum die

Bindungs- und Reduktionsstelle für Azid an der gleichen Stelle liegen, an der auch CO bindet und oxidiert wird.

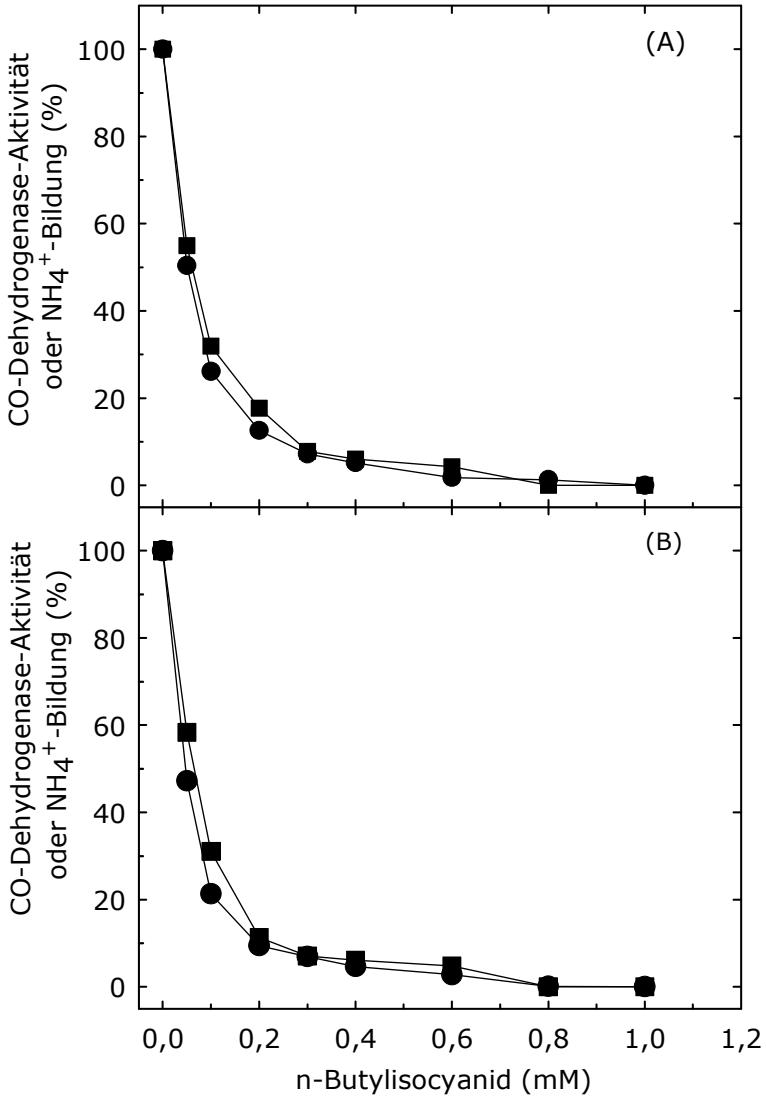


Abb. 3-14 Die Azid-Reduktion der n-Butylisocyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B)

Reaktionsansätze, die 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2) und 1 mg Enzym enthielten, wurden unter anoxischen Bedingungen mit 0 mM bis 1,0 mM n-Butylisocyanid versetzt. Nach der Inkubation (15 min) bei Raumtemperatur wurde ohne Abtrennung von n-Butylisocyanid die CO-Oxidationsaktivität im CO → INT/PMS-Test (Kap. 2.5.1) und die Azid-Reduktionsaktivität bestimmt (Kap. 2.5.2).). [100% Aktivitäten, CODH bzw. NH_4^+-Bildung = 14,8 U mg^{-1}, 28,2 nmol mg^{-1} min^{-1} (*O. carboxidovorans*) und 11,5 U mg^{-1}, 35,8 nmol mg^{-1} min^{-1} (*S. thermoautotrophicus*)].
Symbole: (●) CO-Oxidation; (■) Ammoniumbildung.

3.4.6 Reaktivität des aktiven Zentrums [$CuSMoO_2$] der CO-Dehydrogenase während der Inkubation mit Azid und CO

Der übliche Elektronen-Donor für die Azid-Reduktion ist Dithionit. H_2, das eigentlich ein Substrat für die CO-Dehydrogenase ist, fungiert auch als alternativer Elektronen-Donor in der Azid-Reduktionsreaktion. Allerdings konnte CO, das auch ein Substrat für die CO-Dehydrogenase ist, nur sehr begrenzt als Elektronen-Donor dienen (Kap. 3.4.4). In Gegenwart von CO und Azid wird die Oxidationsfähigkeit der CO-Dehydrogenase innerhalb von 15 min inaktiviert und führt gleichzeitig zur Inaktivierung der Azid-Reduktionsaktivität.

Um dieses Phänomen zu klären, wurde die Reaktivität der CO-reduzierten CO-Dehydrogenase in An- oder Abwesenheit von CO untersucht. In Anwesenheit von Azid bleibt die CO-Oxidationsaktivität intakt, vorausgesetzt, dass vor der Azidzugabe das CO, das den reduzierten Zustand der CO-Dehydrogenase erzeugt, evakuiert und durch He-Atmosphäre ersetzt wird (Abb. 3-15). Die Inaktivierung der CO-Oxidation und Azid-Reduktion findet nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von CO und Azid statt.

Die Inaktivierung der CO-Dehydrogenase in Gegenwart von Azid und CO ist irreversibel.

Es wurde beobachtet (siehe oben), dass in Gegenwart von Azid/CO die Oxidations- und Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase innerhalb sehr kurzer Zeit gehemmt wird. Während der ersten 30 min bildet CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von Azid/CO 0,242 mM NH_4^+. Während der weiteren Inkubation findet jedoch keine neue NH_4^+-Bildung statt. Von der CO-Oxidationsaktivität war nach 30 min Inkubation nur noch 3% übrig. Es ist durchaus möglich, dass Azid mit CO einen Komplex bildet und dieser die CO-Dehydrogenase hemmt. Um zu klären, ob die Inaktivierung reversibel ist oder nicht, wurde die Assay-Lösung über eine Sephadex G-25 (PD 10) Säule filtriert, damit Azid und die eventuell vorhandenen Produkte entfernt werden. Das so gewonnene reine Enzym wurde erneut auf die Oxidations- und Reduktionsaktivität überprüft. Es wurde festgestellt, dass trotz der Entfernung des Azids und der möglichen Reaktanten die CO-Oxidations- und Azid-Reduktionsaktivität nicht wieder hergestellt war und somit die Inaktivierung nicht reversibel ist.

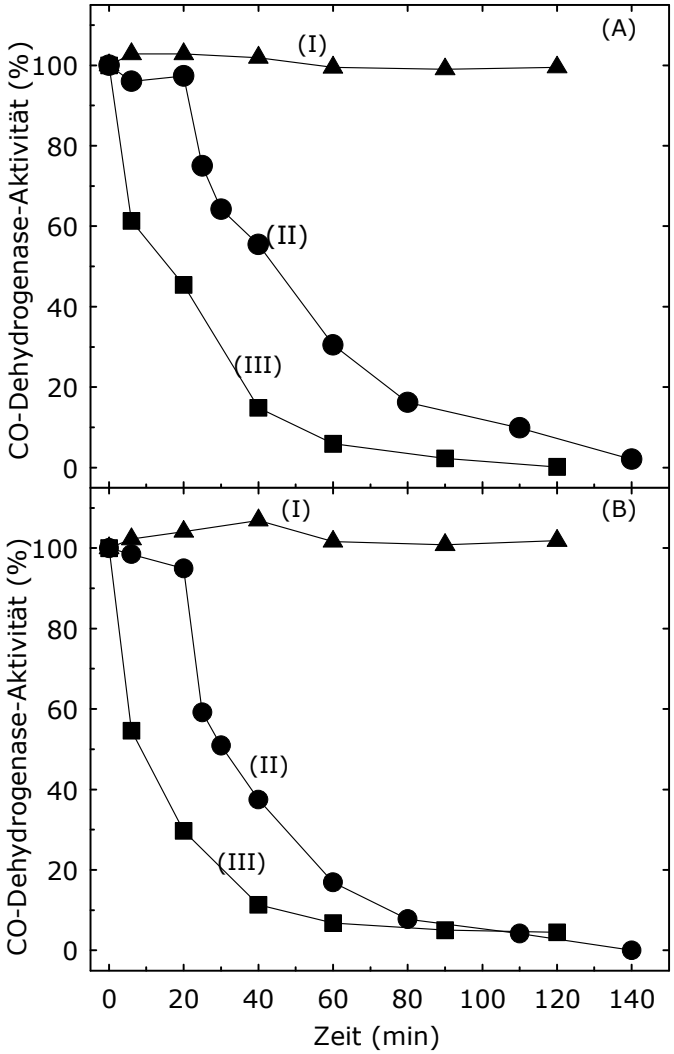


Abb. 3-15 Der Effekt von CO-Atmosphäre auf die CO-oxidierende Aktivität der reduzierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B) in Anwesenheit von Azid

Die Reaktionsansätze, die jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5) und 1 mg Enzym enthielten, wurden unter anoxischen Bedingungen vorbereitet. Probe (I): nach der Begasung mit CO (2 min) wurde das CO entfernt und durch He ersetzt (▲); Probe (II): wurde wie Probe (I) behandelt. Nach 20 min Inkubation wurde sie aber nochmal mit CO für 30 sec begast (●). Probe (III): sie wurde ohne Entfernung von CO inkubiert (■). Das anoxische Azid (10 mM Endkonzentration) wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze zugegeben. Die Proben wurden im Wasserbad (50° C) inkubiert. Der zeitliche Verlauf der spezifischen Aktivität [100% Akttivität = 14,8 U mg^{-1} (*O. carboxidovorans*) und 11,5 U mg^{-1} (*S. thermoautotrophicus*)] wurde in Aliquots im CO → INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1).

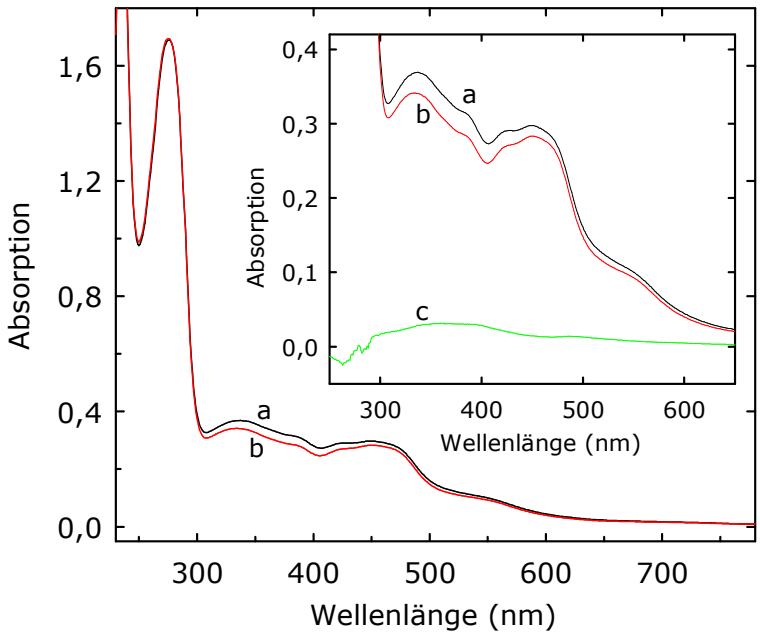


Abb. 3-16 UV/vis Absorptionsspektren luftoxidierter, aktiver und Azid/CO-inaktivierter CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

UV/vis-Absorptionsspektren von 21,5U-CO-Dehydrogenase (jeweils 1,2 mg ml^{-1} in KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2). Spektrum a: luftoxidierter Zustand der aktiven CO-Dehydrogenase; Spektrum b: luftoxidierte, Azid/CO-inaktivierte CO-Dehydrogenase nach Gelfiltration an Sephadex G-25 (PD10); Spektrum c: Differenzspektrum aus aktivem (Spektrum a) und Azid/CO inaktiviertem Enzym (Spektrum b).

Die UV/vis-Spektren der CO-Dehydrogenasen, die mit Azid und CO inkubiert wurden, zeigten eine spezifische Bleichung im vis-Bereich von ca. 300 bis 600 nm (Abb. 3-16). Diese Eigenschaft ist ähnlich den UV/vis-Spektren der inaktivierten CO-Dehydrogenase, die mit Cyanid, n-Butylisocyanid oder Acetylen behandelt war. Man konnte daher nicht erkennen, was mit den aktiven Zentren genau passiert war. Die Spektren zeigten, dass das Flavin (im Bereich 450 nm) und die Eisen-Zentren (im Bereich 550 nm) intakt geblieben waren. Es war daher notwendig zu wissen, ob der Kupfergehalt im aktiven Zentrum des inaktivierten Enzyms noch vollständig ist oder nicht.

Die Eluate von Azid/CO-inaktiviertem Enzym, die durch Zentrifugalfiltration über eine Membran mit 30 kDa Ausschlussgrenze gewonnen wurden, enthielten kein Kupfer (Tabelle 3-4). Das Kupfer war also noch im Enzym. Nach der Abtrennung des im Reaktionsansatz enthaltenen Azids und möglicher Reaktanten mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 konnte ca. 75% (1,5 mol mol^{-1} Enzym) Kupfer

aus diesem Enzym nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind nicht mit dem Cyanid-inhibiertem Enzym vergleichbar, da die gesamte Cu-Menge bereits in den Eluaten nachgewiesen wurde (Tab. 3-4). Daher stellte sich eine weitere Frage: Sind das verbliebende Kupfer und möglicherweise der Sulfido-Ligand vom [$CuSMoO_2$]-Cluster durch Cyanid abspaltbar? Das Azid/CO-inaktivierte Enzym wurde 24 h mit Cyanid behandelt und anschließend cyanolysierbareres Kupfer und cyanolisierbarer Schwefel bestimmt.

Tabelle 3-4 zeigt, dass das Azid/CO-inaktivierte Enzym aus *O. carboxidovorans* 1,53 (± 0,05) mol Cu-Atome mol^{-1} Enzym enthält. Jedoch konnten nach der Cyanid-Behandlung am inaktivierten Enzym nur noch ca. 25% des cyanolisierbaren Schwefels und Kupfers nachgewiesen werden (Tabelle 3-5). Die genaue Begründung für dieses Verhalten ist noch unbekannt; entweder enthielt das aktive Zentrum des Azid/CO-inaktivierten Enzyms keinen cyanolysierbaren Schwefel und kein Kupfer mehr oder es hat sich eine ungewöhnlich stabile Verbindung im aktiven Zentrum gebildet. Daher waren das Cu-Atom und der µ-Sulfido-Ligand nicht mehr cyanolysierbar.

Um die genaue Ursache der Azid/CO-Inaktivierung der CO-Dehydrogenase zu untersuchen, wurde das inaktivierte Enzym kristallisiert und ihre ESR-Spektralen-Eigenschaften untersucht.

Tabelle 3-4 Der Effekt der Azid/CO- und Cyanid-Inaktivierung auf den Kupfergehalt der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Inaktivierung	Kupfergehalt (mol mol^{-1} Enzym)			
	Eluate nach Zentrifugalfiltration		Enzym nach Gelfiltration an G-25	
	I	II	I	II
Azid/CO	n.n.	n.n.	1,48	1,58
Cyanid	1,88	2,24	n.n.	n.n.

n.n.= nicht nachweisbar

Tabelle 3-5 Cyanolisierbarer Schwefel und cyanolysierbares Kupfer der Azid/CO- inaktivierten CO-Dehydrogenase

CO-Dehydrogenase	Cyanolysierbarer Schwefel (mol mol^{-1} Enzym)		Cyanolysierbares Kupfer (mol mol^{-1} Enzym)	
	I	II	I	II
O. carboxidovorans	0,46	0,52	0,46	0,51
S. thermoautotrophicus	0,49	0,44	0,44	0,47

3.4.6.1 Kristallstruktur der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität des [$CuSMoO_2$]-Clusters mit Inhibitoren, wie z.B. Cyanid, n-Butylisocyanid und Acetylen, stellt sich nun die Frage, was mit der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase passiert ist. Die vorhergehenden Experimente zeigten allerdings, dass Azid/CO wahrscheinlich einen anderen Inaktivierungsmechanismus aufweist. Die Röntgenstruktur sollte aufklären, nach welchem Mechanismus Azid/CO die CO-Dehydrogenase inaktiviert.

Kristalle der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase wurden mittels Dampfdiffusionsverfahren im „hängenden Tropfen" gewonnen. Kristalle bildeten sich innerhalb von ca. 10 Tagen. Nach Transformation wurden die Kristalle in flüssigem N_2 eingefroren und mittels Synchrotronstrahlung vermessen.

Die gewonnenen Datensätze ermöglichten die Berechnung einer Struktur mit einer Auflösung von 2,2 Å. Die Bindungslängen und Bindungswinkel wurden mit dem Programm XFit vermessen.

Das aktive Zentrum der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase entspricht der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase.

Die Struktur mit einer Auflösung von 2,2 Å zeigt, dass das aktive Zentrum nur eine ganz schwache Elektronendichte im Bereich des verbrückenden Sulfido-Liganden und des Cu aufweist (Abb. 3-17). Die negative Differenz im Bereich des Kupfers und der verbrückenden Sulfido-Liganden am Mo-Zentrum weist auf ein Fehlen im Vergleich zur nativen Struktur hin.

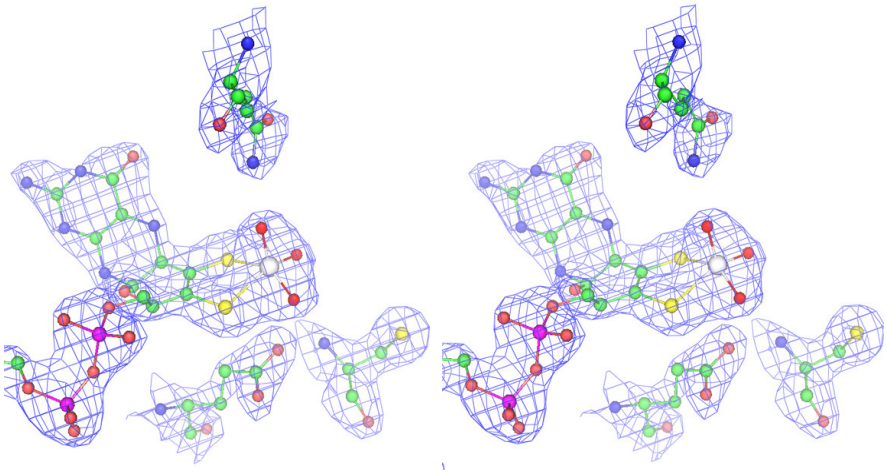


Abb. 3-17 Stereodarstellung des aktiven Zentrums der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Das aktive Zentrum der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase enthält kein Cu an der Position, an der im aktiven Enzym Cu als essentieller Teil des aktiven Zentrums erkannt wurde. $2F_{obs}$-F_{calc}- Fouriersynthese konturiert bei 1.0σ.

Die Mo-Sγ (Cys 388) Distanz von 6,5 Å liegt deutlich näher an der gemessenen Distanz in der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase (6,6 Å), als an der oxidierten aktiven Form (5,9 Å). Ebenso ist die Mo-O-(äquatorial) und Mo-O-(frühere Position des μ-Sulfido-Liganden) Distanz (1,8 Å) ähnlich wie bei der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase (Dobbek *et al*. 2002) (Abb. 3-18). Deshalb entspricht der Aufbau des aktiven Zentrums der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase dem der Cyanid-inaktivierten Form.

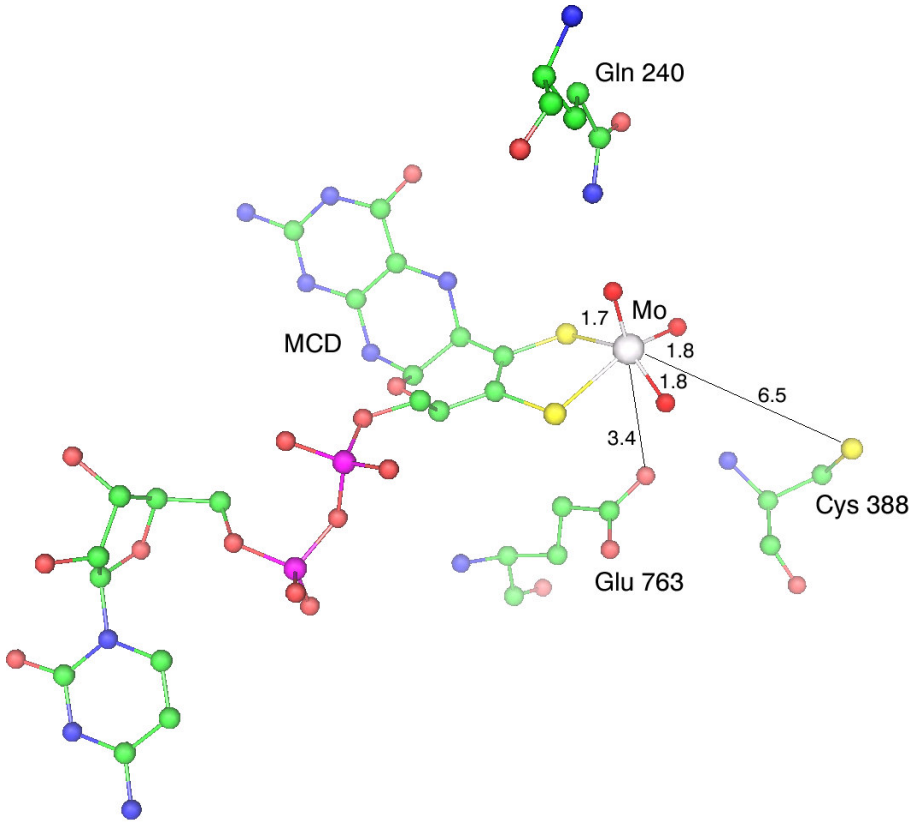


Abb. 3-18 Struktur des aktiven Zentrums der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Das Molybdän-Zentrum der Azid/CO-inaktivierter CO-Dehydrogenase ist durch die beiden Dithiolatschwefel des MCDs sowie durch drei Sauerstoff-Liganden (Trioxomolybdän) koordiniert. Die Zahlen repräsentieren die Abstände zwischen den Atomen (Å).

3.4.6.2 ESR-spektroskopische Eigenschaften der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase

Anhand der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass Azid/CO-inaktivierte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* in Bezug auf Kofaktoren (Mo-MCD, [2Fe-2S]-Zentren und FAD) nicht von der nativen CO-Dehydrogenase zu unterscheiden ist. Obwohl die Daten der Azid/CO- und der Cyanid-inaktivierten

CO-Dehydrogenase, die durch biochemische Untersuchungen gewonnen wurden, nicht genau gleich waren (Tabelle 3-5), zeigen die Kristallstrukturen beider Enzyme jedoch ein ähnliches aktives Zentrum, in dem es keinen Cu- und µ-Sulfido-Liganden mehr gibt (Kap. 3.4.6.1).

Um weitere Informationen über die Funktionalität der Kofaktoren in der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase zu erhalten, wurde das Enzym ESR-spektroskopisch analysiert und mit der bekannten Cyanid-inhibierten CO-Dehydrogenase verglichen.

Im luftoxidierten Zustand befinden sich das Mo-Zentrum und die [2Fe-2S]-Zentren der aktiven CO-Dehydrogenase in der diamagnetischen und somit ESR-inaktiven Form (zeigt kein Signal im ESR-Spektrum). Durch Reduktion mit Dithionit wird Mo(+VI) über die Oxidationsstufe Mo(+V) zu Mo(+IV) reduziert. Durch Titration mit Dithionit lässt sich der paramagnetische Oxidationszustand des Mo(+V) erreichen (Gremer *et al*. 2000).

Inaktivierung der CO-Dehydrogenase durch Cyanid entfernt den anorganischen *µ*S als SCN^- aus dem aktiven Zentrum. In dieser Desulfo-Form ändert sich durch Dithionit-Reduktion das Signal des Mo bei 120 K von komplex zu rhombisch (Dobbek *et al*. 2002).

Sollten die Sulfido-Liganden, bzw. Kupfer-Atome aus dem aktiven Zentrum der Azid/CO- inaktivierten CO-Dehydrogenase entfernt worden sein, so müsste sich das mit Dithionit-regenerierbare Mo (+V)-Signal der aktiven CO-Dehydrogenase zu einem Desulfo-Mo(+V)-Signal verändern.

CO-Dehydrogenase wurde unter anoxische Bedingungen mit CO reduziert; dazu wurden anoxisch 10 mM Azid-Lösung mg^{-1} Enzym gegeben und der Ansatz für 2 h bei 50^o C inkubiert. Nach Evakuierung des CO wurde das überschüssige Azid und Reaktanten mittels Gelfiltration an Sephadex G-25 abgetrennt, die Proteinfraktion aufkonzentriert und unter anoxischen Bedingungen mit Na-Dithionit titriert. Das ESR-Spektrum bei 120 K dieser Probe war durch ein dominierendes, rhombisches Signal mit *g*-Werten von g_1= 1,979, g_2= 1,968, g_3= 1,955, g_{av} = 1,967 charakterisiert (Abb. 3-19, Spektrum b). Im Gegensatz dazu zeigte native CO-Dehydrogenase bei 120 K ein komplexes ESR-Spektrum (Abb. 3-19, Spektrum a) im Bereich von 320 bis 370 mT.

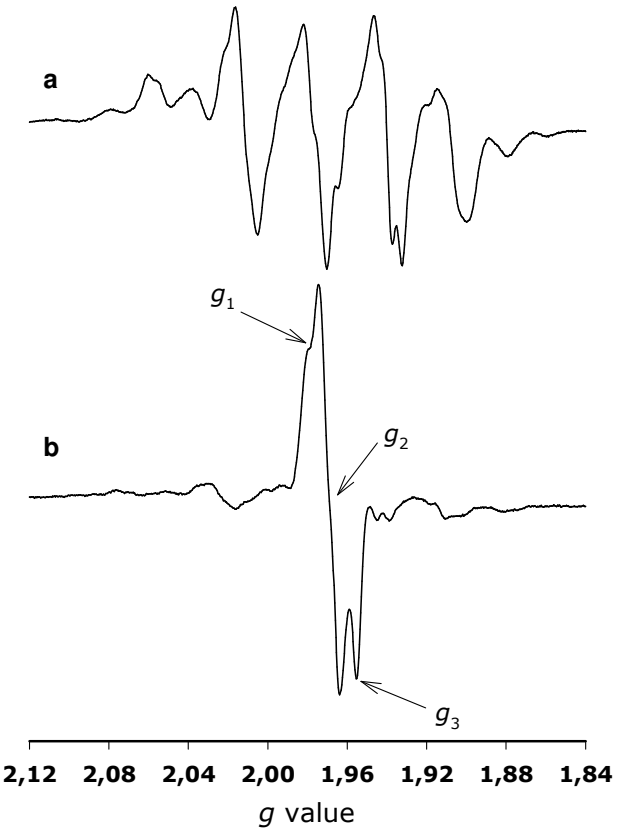


Abb. 3-19 Mo(+V)-Spektren von aktiver (a) und Azid/CO-inaktivierter CO-Dehydrogenase (b) aus *O. carboxidovorans* nach Reduktion mit Dithionit

CO-Dehydrogenase (3 mg ml^{-1} in 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2; 21,5 U) wurde unter anoxischen Bedingungen mit CO reduziert und anoxische Azid-Lösung (30 mM) dazu gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 2 h lang bei 50° C inkubiert. Zur Abtrennung von Azid und Reaktanten wurde über Sephadex G-25 gelfiltriert. Aktive und inaktivierte CO-Dehydrogenase wurden auf eine Proteinkonzentration von 12 mg ml^{-1} aufkonzentriert und in HEPES/NaOH-Puffer, pH 7,2 unter anoxischen Bedingungen (Kap. 2.9.2) 1,5 min mit 4 mM Dithionit reduziert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die ESR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 120 K mit einer Mikrowellenfrequenz von 9,47 GHz, einer Modulationsamplitude von 1 mT und einer Mikrowellenleistung von 10 mW aufgezeichnet (Kap. 2.9.2). Spektrum a: aktive CO-Dehydrogenase, Spektrum b: Azid/CO inaktivierte CO-Dehydrogenase (spez. Akt. 2,1 U mg^{-1}).

Das rhombische Spektrum der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase zeigte starke Ähnlichkeiten mit dem Mo(+V)-Signal der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase, die ein ESR-Spektrum bei 120 K mit einem dominierenden rhombischen Signal mit *g*-Werten von g_1= 1,977, g_2= 1,967, g_3= 1,953,

g_{av}= 1,966 aufwies (Gremer 2000). Es ist deshalb davon auszugehen, dass Kupfer- und µ-Sulfido-Ligand nicht mehr in der richtigen Stelle des aktiven Zentrums sind.

ESR-spektroskopische Eigenschaften der [2Fe-2S]-Zentren der Azid/CO inaktivierter CO-Dehydrogenase.

Im luftoxidierten Zustand befinden sich die [2Fe-2S]-Zentren der aktiven CO-Dehydrogenase in der diamagnetischen und somit ESR-inaktiven Form (zeigt kein Signal im ESR-Spektrum). Die Fe-S-Zentren zeigen ESR-Signale nur nach Reduktion des Enzyms. Die zwei Fe-S-Zentren sind ESR-spektroskopisch unterscheidbar und werden mit Typ I und Typ II bezeichnet. Nach Reduktion mit Dithionit bilden beide [2Fe-2S]-Zentren charakteristische ESR-Signale bei 49 K und 16 K aus (Gremer *et al.* 2000). Das Signal des Typ I-Zentrums, das bei 49 K erzeugt werden kann, wurde dabei dem proximal zum Mo-MCD-Kofaktor lokalisierten [2Fe-2S]-Zentrum zugeordnet. Das bei 16 K ausgeprägte Signal des Typ II-Zentrums wurde dabei dem distal zum Mo-MCD-Kofaktor und proximal zum FAD lokalisierten [2Fe-2S]-Zentrum zugeordnet (Gremer *et al*. 2000).

Das ESR-Signal der reduzierten CO-Dehydrogenase stellt bei 16 K ein kombiniertes Spektrum bestehend aus dem rhombischen Signal des Typ I-Zentrums und Anteilen des Typ II-Zentrums (g1 II) dar. Das rhombische ESR-Signal bei 50 K zeigte jeweils das für das [2Fe-2S]-Zentrum vom Typ I charakteristische Spektrum (Abb. 3-20).

Die ermittelten g-Werte der ESR-Signale von Azid/CO-inaktivierter CO-Dehydrogenase entsprechen den Werten der Cyanid-inaktivierten und denen der aktiven CO-Dehydrogenase. Die [2Fe-2S]-Zentren vom Typ I und Typ II in der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase sind strukturell intakt und redoxaktiv. Dies war einen eindeutige Hinweis, dass die inaktive CO-oxidierende Aktivität nicht durch strukturell und/oder funktionell defekte [2Fe-2S]-Zentren vom Typ I und Typ II bedingt wird. Die entsprechenden g-Werte wurden in Tabelle 3-6 zusammengefasst und die Zuordnung ist in Abb. 3-20 exemplarisch für native CO-Dehydrogenase gezeigt.

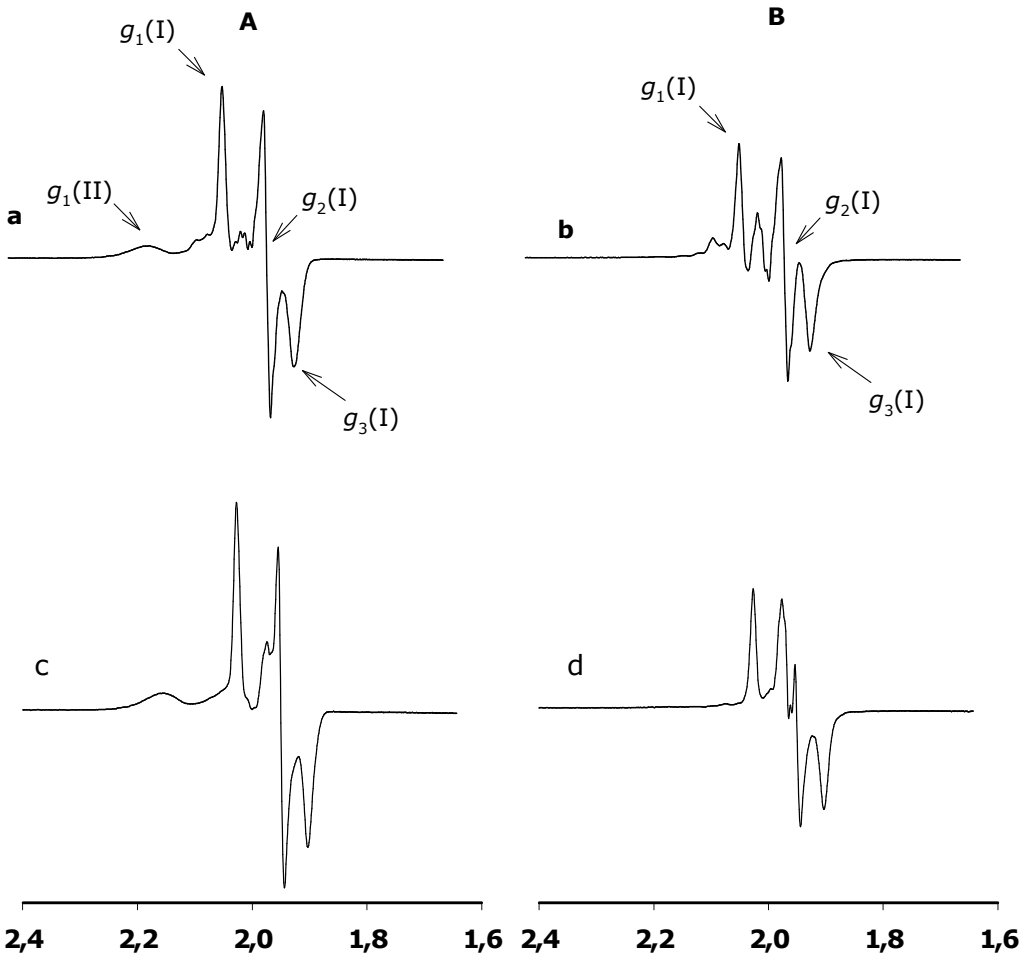


Abb. 3-20 ESR-Spektren der [2Fe-2S]-Zentren vom Typ I und Typ II von nativer (a, b) und Azid/CO inaktivierter (c, d) CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* bei 16 K (a, c) und 50 K (b, d)

Native und inaktivierte CO-Dehydrogenase (12 mg ml^{-1} in HEPES/NaOH-Puffer, pH 7,2) wurden unter anoxischen Bedingungen (Kap. 2.9.2) 1,5 min mit 4 mM Dithionit reduziert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die ESR-Spektren wurden bei einer Temperaur von 16 K (A) bzw. 50 K (B) mit einer Mikrowellenleistung von 200 mW (16 K) bzw. 10 mW (50 K) aufgezeichnet. Spektren a und b: aktive CO-Dehydrogenase, Spektren c und d: Azid/CO-inaktivierte CO-Dehydrogenase.

Tabelle 3-6 ESR-Parameter der [2Fe-2S]-Zentren vom Typ I und Typ II von Azid/CO-inaktivierter und nativer CO-Dehydrogenase

Probe	Fe-S Typ	g_1	g_2	g_3	g_{av}
CO/Azid inaktivierte CO-Dehydrogenase	$[2Fe\text{-}2S]_I$ $[2Fe\text{-}2S]_{II}$	2,027 2,155	1,951	1,903	1,960
Cyanid inaktivierte CO-Dehydrogenase[-1)]	$[2Fe\text{-}2S]_I$ $[2Fe\text{-}2S]_{II}$	2,026 2,169	1,949	1,901	1,960
Native CO-Dehydrogenase	$[2Fe\text{-}2S]_I$ $[2Fe\text{-}2S]_{II}$	2,028 2,155	1,949	1,904	1,960

[-1)] (aus Gremer 2000)

3.4.6.3 CO-Oxidationsaktivität während der Inkubation von CO-Dehydrogenase mit Cyanat im oxidierten und reduzierten Zustand

Inkubiert man reduzierte CO-Dehydrogenase mit Azid/CO, wird ihre CO-Oxidations- und Azid-Reduktionsaktivität inaktiviert. Die Kristallographie-Untersuchungen zeigten, dass das aktive Zentrum der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase kein Cu und keinen μ-Sufido-Liganden mehr enthielt. Nach Reduktion mit Dithionit zeigten ebenfalls die ESR-Spektren der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase bei 120 K ein typisches, einfaches, rhombisches Molybdän(+V)-Slow-Signal, ähnlich dem des Cyanid-inaktivierten Enzyms.

Eine direkte Unwandlung von CO und Azid zu Cyanid ist jedoch unwahrscheinlich. Der reduzierte $[CuSMoO_2]$-Cluster müsste eigentlich zuerst mit Azid Ammonium und Distickstoff bilden. In Anwesenheit von CO könnte Cyanat entstehen, das dann weiter zu Cyanid reduziert würde, wenn ein Elektronen-Donor vorhanden ist. Es wurde deshalb geprüft, wie die Wirkung des Cyanats auf die CO-Oxidationsaktivität ist. CO-Dehydrogenase wurde mit unterschiedlichen Cyanatkonzentration unter H_2-Atmosphäre inkubiert.

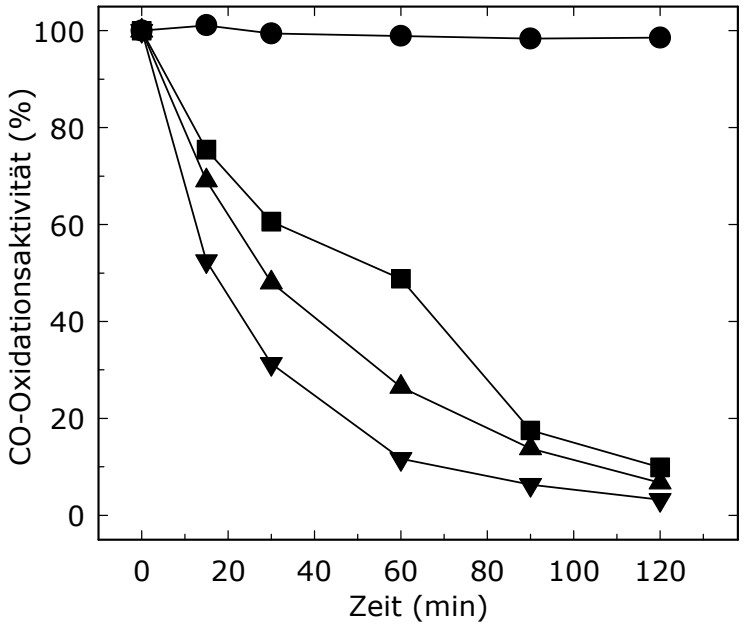


Abb. 3-21 CO-Oxidationsaktivität während der Inkubation der reduzierten CO-Dehydrogenase mit Cyanat

Die anoxischen Reaktionsansätze enthielten jeweils 1 mg CO-Dehydrogenase und 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2). Sie wurden 2 min lang mit H_2 begast. Die anoxische Cyanat-Lösung wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze dazu gegeben (Endkonzentration 10 mM, 20 mM und 30 mM). Die Proben wurden im Wasserbad (50° C) inkubiert (Kap. 2.12.3). Der zeitliche Verlauf der spezifischen CO-Dehydrogenase-Aktivität [100% Aktivität = 14,8 U mg^{-1} (*O. carboxidovorans*] wurde in Aliquots im CO $\rightarrow$ INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1). Symbole : (●) 0 mM KOCN; (■) 10 mM KOCN; (▲) 20 mM KOCN; (▼) 30 mM KOCN.

Abb. 3-21 zeigt eine deutliche Inaktivierung der CO-Oxidationsaktivität, die abhängig von der Cyanatkonzentration ist. Die Halbwertzeit für die CO-Oxidationsaktivität beträgt ca. 30 min, wenn das Enzym mit 20 mM bis 30 mM Cyanat inkubiert wurde. Weiterhin wurde die CO-Dehydrogenase mit 20 mM Cyanat in Gegenwart unterschiedlicher Elektronen-Donoren sowie unter gleichen Bedingungen aber ohne Elektronen-Donor inkubiert. Die Inkubation von CO-Dehydrogenase mit Cyanat unter He-Atmosphäre in Abwesenheit von Elektronen-Donoren zeigt, dass ihre CO-Oxidationsaktivität intakt geblieben ist.

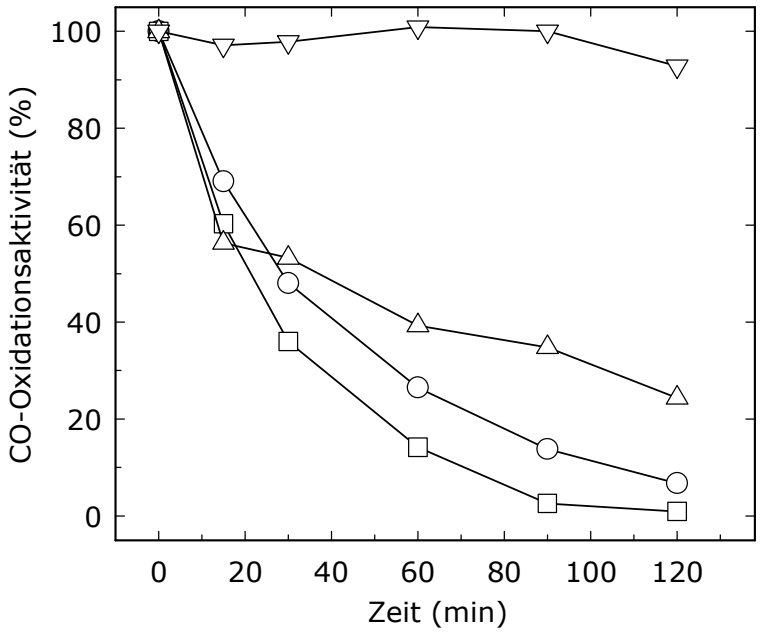


Abb. 3-22 CO-Oxidationsaktivität während der Inkubation der CO-Dehydrogenase mit Cyanat und unterschiedlichen Elektronen-Donoren

Die anoxischen Reaktionsansätze enthielten jeweils 1 mg CO-Dehydrogenase und 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2). Sie wurden mit 5 mM Dithionit reduziert oder 2 min lang entweder mit H_2 oder CO begast. Die anoxische Cyanat-Lösung wurde mit Hilfe einer Hamilton-Spritze dazu gegeben (Endkonzentration 20 mM). Die Proben wurden im Wasserbad (50° C) inkubiert (Kap. 2.12.3). Der zeitliche Verlauf der CO-Dehydrogenase-Aktivität [100% Aktivität = 14,8 U mg^{-1} (*O. carboxidovorans*)] wurde in Aliquots im CO → INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1). Symbole: (□) CO; (○) H_2; (△) Dithionit ; (▽) He (Kontrolle).

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Inaktivierung des Enzyms durch Cyanat nur in Anwesenheit von Elektronen-Donoren erfolgte (Abb. 3-22). In Anwesenheit von natürlichen Substraten, wie CO oder H_2, konnte eine stark inhibierende Wirkung des Cyanats nachgewiesen werde. Vermutlich werden die gebildeten Elektronen aus der CO- oder H_2-Oxidation direkt für die Reduktion von Cyanat zu Cyanid verwendet. Solche Reaktionen sind zu beobachten, wenn Substrat-Oxidation und Cyanat-Reduktion am selben Ort oder nahe beieinander stattfinden.

3.4.7 Korrelation der Oxidations- und Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase mit cyanolysierbarem Schwefel und Kupfergehalt

Die gereinigten CO-Dehydrogenasen, die aus CO-autotroph gewachsenen Kulturen von *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* isoliert wurden, zeigen von einer Präparation zur anderen unterschiedliche spezifische CO-oxidierende Aktivitäten.

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass die Oxidations- und Reduktionsaktivitäten der CO-Dehydrogenase miteinander korrelieren. In den folgenden Experimenten wurden die CO-Dehydrogenasen, die mit identischen Aufreinigungsverfahren gewonnen wurden aber unterschiedliche Aktivitäten aufwiesen, miteinander in Bezug auf ihre Oxidations- und Reduktionsfähigkeit untersucht. Das Ziel dieser Experimente ist zu verstehen, ob die beiden Aktivitäten immer miteinander korrelieren und ob ein Zusammenhang zwischen den Aktivitäten und dem cyanolisierbaren Schwefel und dem Cu-Gehalt besteht. CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*, die unterschiedliche CO-Oxidationsaktivität hatten, wurden für die Untersuchung verwendet. Diese Enzyme enthalten unterschiedliche cyanolysierbare Schwefel- und Cu-Atome. Es soll in diesem Versuch auch geklärt werden, warum die CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*, die nur 11,5 U CO-Oxidationsaktivität besitzt, eine vergleichbare Azid-Reduktionsaktivität aufweist wie die hoch aktive CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (spez. Akt. 21,5 U).

Bei der Reduktion der CO-Dehydrogenase mittels CO nahm die Absorption im Bereich zwischen 320 nm und 650 nm ab. Je höher die CO-Oxidationsaktivität des Enzyms ist, desto größer ist die Absorptionsabnahme. Das Ausmaß der Bleichung ist bei der Inkubation von CO-Dehydrogenase mit CO abhängig von der spezifischen Aktivität der entsprechenden Enzymspezies (Gremer 2000, Ferner 2001). Die Enzympräparation aus *O. carboxidovorans*, die eine hohe spezifische CO-Oxidationsaktivität (21,5 U) aufwies, zeigte eine maximale Bleichung (Absorptionsabnahme) (Abb. 3-23A). Obwohl die CO-Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* nur 11,5 U aufwies (Abb. 3-23B), war sie in Gegenwart von CO vollständig reduziert

und es zeigte sich ein ähnliches Spektrum wie bei der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans,* die 21,5 U spezifische Aktivität besaß. Offensichtlich beträgt die maximale spezifische Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* etwa 11,5 U.

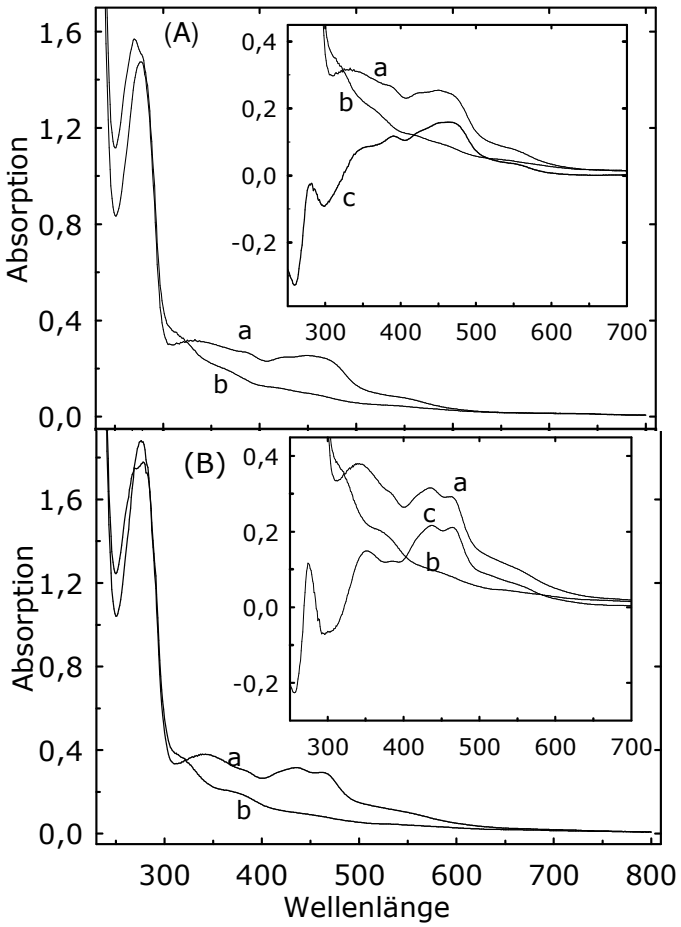


Abb. 3-23 UV/vis Absorptionsspektren luftoxidierter und CO-reduzierter 21,5U-CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und 11,5 U-CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* (B)

UV/vis-Absorptionsspektren der CO-Dehydrogenase mit 21,5 U mg^{-1} (A) und mit 11,5 U mg^{-1} (B). Spektren a: luftoxidierter Zustand, Spektren b: 30 min nach Inkubation mit CO unter anoxischen Bedingungen, Spektren c: Differenzspektren des luftoxidierten minus CO-reduzierten Enzyms.

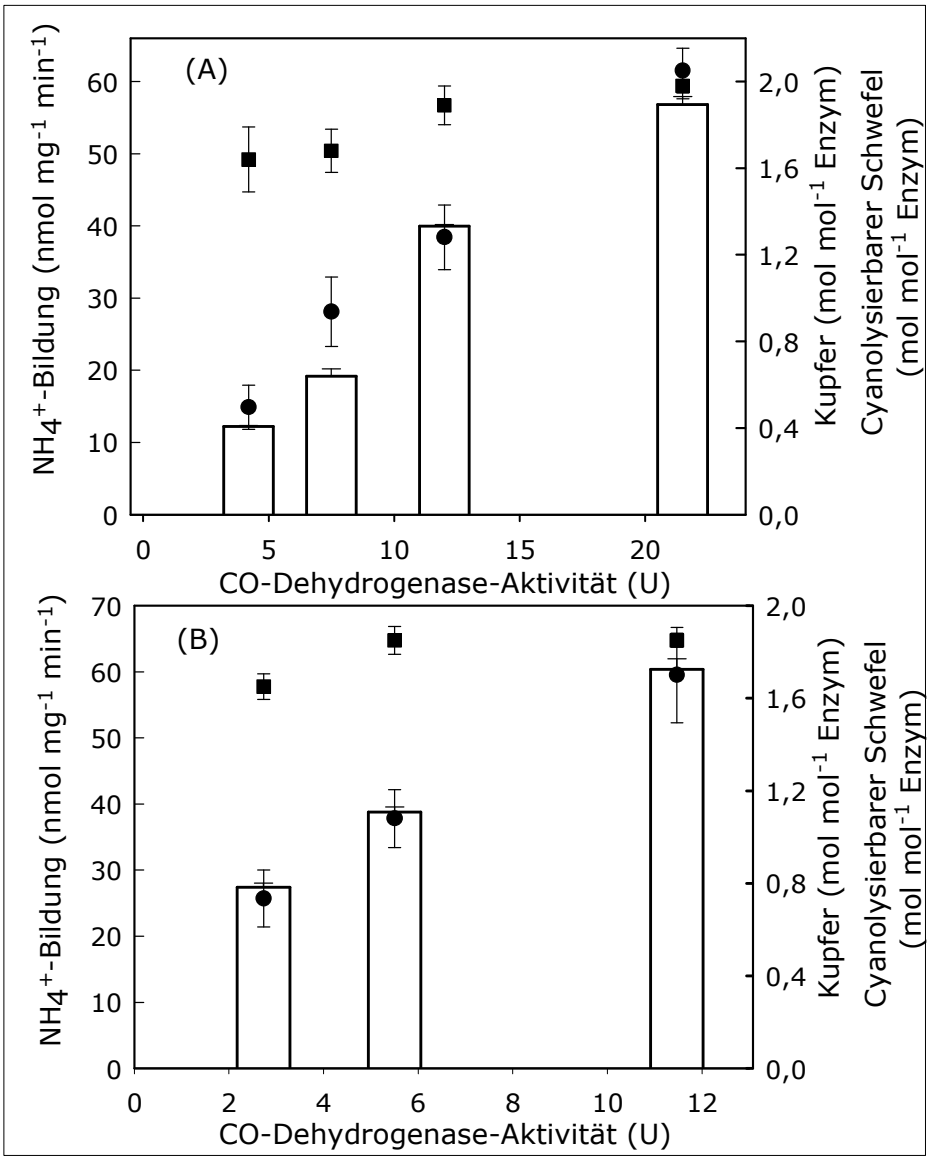


Abb. 3-24 Korrelation der CO-Oxidations- und Azid-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B)

Die CO-Dehydrogenasen wurden aus den CO-gewachsenen Bakterien verschiedener Fermentationen aufgereinigt. Das Kupfer wurde durch Induced-Couple-Plasma-Massenspektrometrie gemessen. Der cyanolysierbare Schwefel wurde als Thiocyanat wie in Kap. 1.12.1 beschrieben gemessen. Die CO-Oxidationsaktivität wurde im CO → INT/MPMS-Test (Kap. 2.5.1), die Azid-Reduktionsaktivität durch Messung der Ammoniumbildungsaktivität ermittelt (Kap. 2.5.2 und Kap. 2.6.2).
Symbole: (□) Azid-Reduktionsaktivität; (■) cyanolysierbarer Schwefel; (●) Kupfergehalt.

Wie vorherige Ergebnisse zeigen (Kap. 3.4.4, Kap. 3.4.5.1 und Kap. 3.4.5.2), ist auch hier die Azid-Reduktionsaktivtiät proportional zur Oxidationsaktivität. Die CO-Dehydrogenase mit 21,5 U Aktivität aus *O. carboxidovorans* und die CO-Dehydrogenase mit 11,5 U Aktivität aus *S. thermoautotrophicus* bilden 56,80 NH_4^+ nmol bzw. 60,36 NH_4^+ nmol m^{-1} mg^{-1}. Beide CO-Dehydrogenasen weisen nahezu einen vollständigen stöchiometrischen Metallgehalt auf. Allerdings sind die Oxidations- und Reduktionsaktivitäten nicht proportional zum cyanolisierbaren Schwefel, sondern proportional zum Cu-Gehalt des Enzyms. Dies deutet auf eine Cu-Abhängigkeit der CO-Oxidations- und Azid-Reduktionsaktivitäten hin (Abb. 3-24). Dieser Befund wurde auch durch homologe rekombinante CO-Dehydrogenase mit einem defekten aktiven Zentrum unterstützt. Da das aktive Zentrum rekombinanter CO-Dehydrogenase keinen cyanolysierbaren Schwefel und substöchiometrische Mengen an Kupfer (Ferner 2001) enthält, kann es keine Azid-Reduktionsaktivität zeigen (nicht dargestellt).

Tabelle 3-7 Der Metallgehalt der gereinigten CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*

Metall[1)]	mol mol^{-1} Enzym
Mo	1,939
Fe	7,967
Cu	1,750
Mg	2,312
Zn	0,194
Se	0,053
Mn	n.n.
V	n.n.

[1)] Die Metallanalyse wurde mittels ICP-MS und ICP-OES wie in Kap. 2.7 geschrieben durchgeführt.
n.n nicht nachweisbar

Obwohl die Struktur der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* noch nicht aufgeklärt ist, zeigen die Ergebnisse, dass die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* sehr ähnliche chemische Reaktionen durchführen (Abb. 3-24B). Es wird deshalb angenommen, dass das aktive Metallzentrum der CO-Dehydrogenase des Gram-positiven, thermophilen

Bakteriums, *S. thermoautotrophicus* ähnlich dem der CO-Dehydrogenase aus dem Gram-negativen, mesophilen Bakterium *O. carboxidovorans* ist. Die Tabelle 3-7 zeigt den Metallgehalt der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*.

Dithionit-reduzierte CO-Dehydrogenase aus S. thermoautotrophicus mit 11,5 U mg^{-1} zeigt ähnliche Mo(+V) ESR-Signale wie CO-Dehydrogenase aus O. carboxidovorans mit 21,5 U CO-Oxidationsaktivität.

CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*, die 11,5 U CO-Oxidationsaktivität besitzt, zeigte eine volle Reduktion nach Zugabe von CO. Die UV/vis-Spektren dieser Enzympräparation sind vergleichbar mit der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*, die 21,5 U CO-Oxidationsaktivität besitzt. Durch UV/vis-Spektren kann man jedoch nicht die Redoxverhältnisse am Molybdän-Zentrum beweisen. Nach Reduktion mit Dithionit zeigte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* mit einer spezifischen CO-Oxidationsaktivität von 21,5 U mg^{-1} bei 120 K ein komplexes ESR-Spektrum (Abb. 3-19a). Deshalb ist es notwendig zu prüfen, wie das Mo(+V) ESR-Signale der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* nach der Reduktion mit Dithionit regeneriert wird.

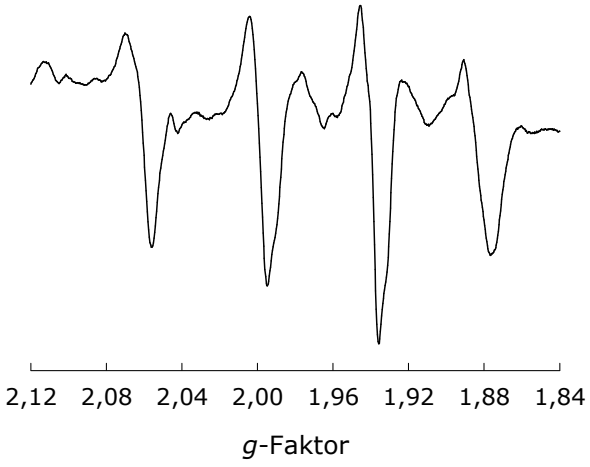


Abb. 3-25 ESR-Spektrum des Mo-Zentrums der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* mit 11,5 U mg^{-1} CO-Oxidationsaktivität

CO-Dehydrogenase (12 mg ml^{-1} in KH_2PO_4/NaOH, pH 7,2) wurde unter anoxischen Bedingungen mit 4 mM Dithionit reduziert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das ESR-Spektrum wurden bei 120 K, einer Mikrowellenfrequenz von 9,7 GHz, einer Modulationsamplitude von 1 mT und einer Mikrowellenleistung von 10 mW aufgezeichnet (Kap. 2.9.2).

Im luftoxidierten Zustand zeigte die CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* kein ESR-Signal (nicht dargestellt). Dies steht im Einklang mit einem Mo(VI), das diamagnetisch ist. Nach Zugabe von Dithionit konnte ein komplexes Mo(+V) ESR-Signal erzeugt werden (Abb. 3-25). Das Signal weist Ähnlichkeiten zu dem Mo(+V) Signal der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* auf (Abb. 3-19a, Kap. 3.4.6.2). Das ESR-Spektrum wies Maxima bei *g*-Faktoren von 2,114, 2,101, 2,069, 2,004, 1,977, 1,946, 1,924, 1,891, 1,860 und Minima mit g-Faktoren von 2,106, 2,091, 2,056, 1,995, 1,936, 1,909, 1,878, 1,855 auf.

CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* enthält ebenfalls [2Fe-2S]-Zentren vom Typ I und II (ohne Abbildung), die ein ähnliches Redoxverhalten mit Dithionit wie die FeS-Zentren von CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* zeigen.

3.4.8 UV/vis-spektroskopische Eigenschaften der CO-Dehydrogenase während der Azid-Reduktion

Die oxidierte CO-Dehydrogenase zeigte ein für Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavo-Proteine charaktrisches UV/vis-Absorption-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 276, 339, 384, 426, 450 und 550 nm sowie mit Absorptionsminima bei 308 und 407 nm (Abb. 3-26A und Abb. 3-26B) (Gremer 2000). CO-Dehydrogenase kann in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors durch Dithionit, CO oder H_2 reduziert werden. Zugabe von Dithionit oder die Inkubation unter CO- oder H_2-Atmosphäre führen zu einer Abnahme der Absorption im Bereich von 370 bis 650 nm, welche durch die Reduktion der in der CO-Dehydrogenase enthaltenen chromophoren und redoxaktiven Gruppen, insbesondere der [2Fe-2S]-Zentren vom Typ-I und Typ-II, so wie FAD und möglicherweise auch des MCD-Mo-Kofaktors, verursacht wird (Gremer 2000).

Auf Grund der Stöchiometrie der Azid-Reduktion werden theoretisch zwei Elektronen für ein mol Azid verbraucht. Deshalb kann man erwarten, dass die reduzierte CO-Dehydrogenase unter limitierenden Elektronen-Donor-Bedingungen während der Azid-Reduktion reoxidiert wird. Um die mögliche Reoxidation der CO-Dehydrogenase beobachten zu können, war es notwendig, in Abwesenheit von Elektronen-Donoren ein reduziertes Enzym zu erhalten. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass unter anoxischen Bedingungen mit CO

reduzierte CO-Dehydrogenase nach Entfernung von CO im reduzierten Zustand blieb (Abb. 3-26B).

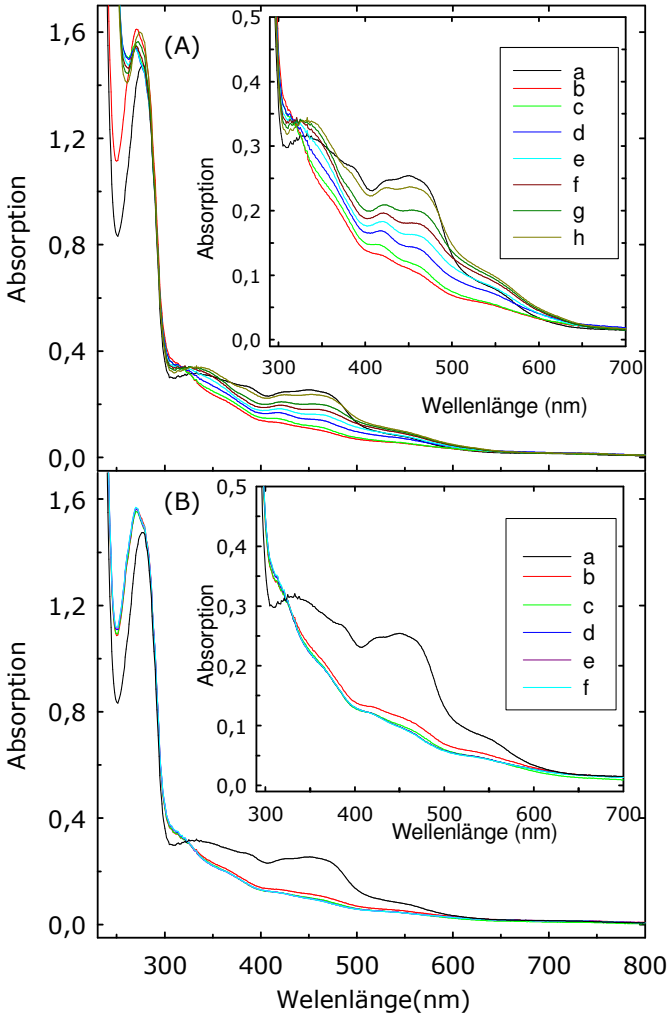


Abb. 3-26 UV/vis Absorptionsspektren luftoxidierter und CO-reduzierter CO-Dehydrogenase (frei von CO) aus *O. carboxidovorans* in Anwesenheit (A) und in Abwesenheit von Azid (B)

A: Spektrum a, luftoxidierte CO-Dehydrogenase; Spektrum b, CO-reduzierte CO-Dehydrogenase (frei von CO); Spektrum c, d, e, f, g, und h, CO-reduzierte CO-Dehydrogenase (frei von CO) in Anwesenheit von 10 mM Azid nach Inkubation für 5, 10, 15, 30, 45, 60 min. B: Spektrum a, luftoxidierte CO-Dehydrogenase; Spektrenschar (b bis f), CO-reduzierte CO-Dehydrogenase (frei von CO) ohne Zugabe von Azid nach Inkubation für 5, 15, 30, 45, 60 min. Der Proteingehalt der Probe betrug 1 bis 1,1 mg ml^{-1}. Die anoxische Probe (1,2 ml) in einer Wheaton-Flasche (8 ml Vol) wurde mit CO für 2 min begast und 5 min im Wasserbad (50° C) inkubiert. Das CO wurde evakuiert, die Probe mit He begast und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze zur anoxischen Quartz-Küvette transferiert. Die Spektren wurden wie in Kap. 2.9.2 beschrieben aufgenommen.

Das CO-reduzierte Enzym, das frei von CO war, blieb sehr stabil. Mit dieser Enzympräparation konnte in Gegenwart von Azid die Reoxidation von CO-Dehydrogenase beobachtet werden. Abb. 3-26A zeigte eine fast vollständige Reoxidation der reduzierten CO-Dehydrogenase nach Zugabe von Azid. Die Inkubation von reduzierter CO-Dehydrogenase mit Azid, die frei von einem Elektronen-Donor (CO) war, zeigte eine Absorptionszunahme im Bereich von 320 bis 650 nm. Im Zeitraum von 1 h wurde die maximale Absorptionszunahme erreicht, d.h. die [2Fe-2S]-Zentren vom Typ-I und Typ-II, sowie das FAD und möglicherweise auch der MCD-Mo-Kofaktor befanden sich wieder im oxidierten Zustand (Abb. 3-26A).

Es kann angenommen werden, dass die Elektronen vom Metallzentrum (Mo^{IV}), bzw. FAD und den [2Fe-2S]-Zentren zum Azid übertragen wurden und dass sie dabei das Enzym reoxidierten. Während dieser Reaktion wird Azid zur NH_4^+ reduziert. Das gebildete NH_4^+ (3,25 ±0,15 µmol) lag nahe zu der Enzymsmenge (3,6 µmol); dadurch wurde, wie oben erwähnt, bewiesen, dass für die Azid-Reduktion zwei Elektronen per mol Azid benötigt werden. In Kontrollansätzen, in denen Azid nicht zugegeben war, konnte keine Reoxidation der CO-Dehydrogenase beobachtet werden.

3.5 Nitrit als alternatives Substrat der CO-Dehydrogenase

Die Wirkung des Nitrits und Azids in der oxidierten CO-Dehydrogenase sind gleich. Beide Substanzen verursachen keine Hemmung der CO-Oxidation. Es konnte nachgewiesen werden, dass Azid durch CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von Dithionit oder H_2 reduziert wird. Das Azidanion hat die gleiche Größe wie Nitrit und ist ein wirksamer Hemmstoff für Cu-Nitritreduktase. Wie Azid ist Nitrit auch ein alternatives Substrat für das mehrkernige Molybdo-Enzym Nitrogenase. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob tatsächlich die CO-Dehydrogenase auch in der Lage ist, Nitrit zu reduzieren.

3.5.1 Reduktion von Nitrit zu Ammonium

Es ist bekannt, dass Nitrit durch die klassische Nitritreduktase entweder zu NO oder NH_4^+ reduziert wird. Daher wäre es sehr interessant zu wissen, welche Produkte während der Nitrit-Reduktion durch CO-Dehydrogenase gebildet werden. Unter anoxischen Bedingungen und in Anwesenheit von Dithionit als Elektronen-Donor sind die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* in der Lage, Nitrit zu Ammonium zu reduzieren. Das Enzym allein, wenn es ohne Elektronen-Donor vorliegt, kann Nitrit nicht reduzieren. Die Voraussetzung für die Nitrit-Reduktion durch CO-Dehydrogenase ist in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Tabelle 3-8 Die Voraussetzung für die Reduktion von Nitrit zu Ammonium durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*

Komponenten im Ansatz			Aktivität NO_2^--Reduktion[a]
CO-Dehydrogenase	Na-Dithionit	NO_2^-	
+[b]	+	+	13,50
+[c]	+	+	12,49
+	+	-	n.n.
+	-	+	n.n.
-	+	+	n.n.

In den Ansätzen, die jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 6,5), 1 mg CO-Dehydrogenase, 10 mM KNO_2 und 10 mM Dithionit als Elektronen-Donor enthielten, wurde die Nitrit-Reduktionsaktivität gemessen (Kap. 2.5.3). Die Proben wurden bei 60°C inkubiert. Die Ammoniumbildung des Nitrit-Reduktionsprodukts wurde wie im Kap. 2.6.2 beschrieben ermittelt.

[a] nmol NH_4^+ mg^{-1} min^{-1} (bei 60° C)

[b] CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

[c] CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*

+anwesend

-abwesend

n.n.: nicht nachweisbar

3.5.2 Stöchiometrie der Nitrit-Reduktion

Um die Stöchiometrie der Reaktion beschreiben zu können, es ist wichtig zu überzuprüfen, ob der Nitritverbrauch dem gebildeten Ammonium entspricht oder andere Produkte gebildet wurden. Unter geringer Konzentration von Nitrit wurde die Stöchiometrie der Nitrit-Reduktion untersucht. Die klassischen Nitritreduktasen, die Cytochrom *c* Nitritreduktasen, katalysieren die Umwandlung von Nitrit zu Ammonium. Dabei werden sechs Elektronen benötigt (Einsle *et al*. 2002).

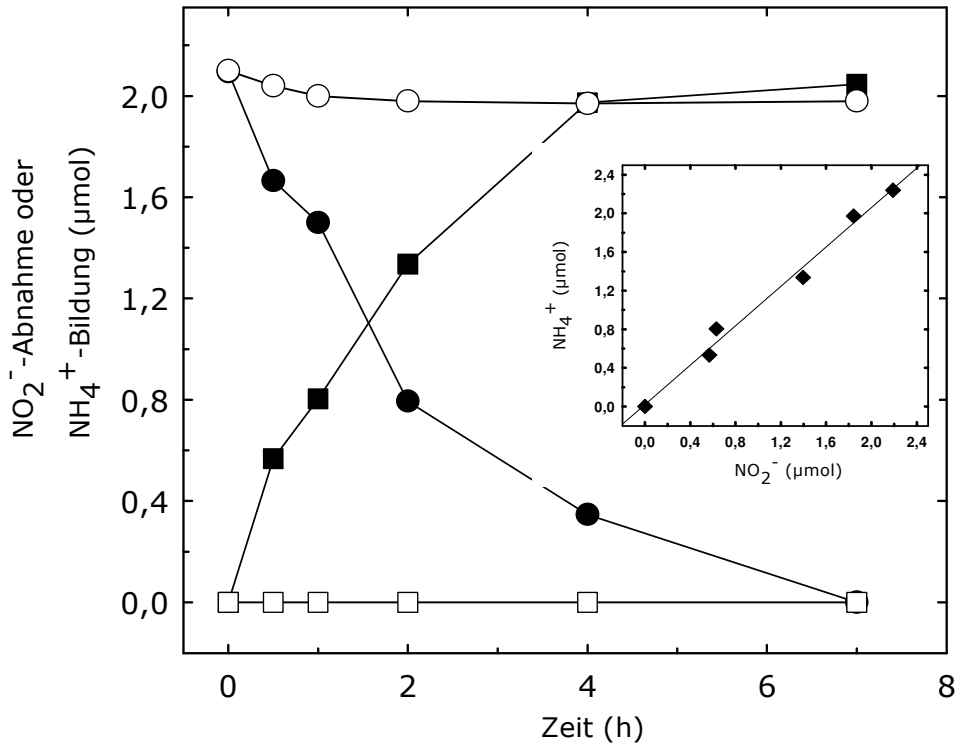


Abb. 3-27 Die stöchiometrische Nitrit-Reduktion zu Ammonium durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 4 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2), 2 mg Protein, 2 µmol NO_2^- und 15 mM Dithionit (Kap. 2.5.3). Alle Ansätze wurden unter anoxischer Bedingung vorbereitet. Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 60° C inkubiert. Der Nitritverbrauch und das gebildete Ammonium wurden verfolgt. Für die Nitrit- und Ammoniumbestimmung wurden Aliquots mit Hilfe einer Hamilton-Spritze entnommen und wie in Kap. 2.6.3 und Kap. 2.6.2 beschrieben, gemessen.
Symbole: (■) NH_4^+ Bildung, (●) Nitrit-Verbrauch, (○) Nitrit-Verbrauch ohne Enzym, (□) NH_4^+ Bildung ohne Enzym. Inset: Die Proportion von Nitritverbrauch und Ammoniumbildung.

In Abb. 3-27 wird gezeigt, dass 2,00 µmol NO_2^- zu 2,19 (± 0,18) µmol NH_4^+ reduziert werden. Das Verhältnis zwischen verbrauchtem Nitrit (Substrat) und gebildetem Ammonium (Produkt) ist 1:1 (Abb. 3-27). Es kann angenommen werden, dass Nitrit nur zu Ammonium reduziert wird. Wenn Übergangsprodukte wie NO oder Hydroxylamin gebildet würden, müsste während des zeitlichen Verlaufs die Proportion des Substratsverbrauchs nicht 1:1 stehen. Eine ähnliche Reaktion wurde auch von dem mehrkernigen Molybdoenzym Nitrogenase berichtet. Nitrogenase katalysiert die Reaktion von NO_2^- in Anwesenheit von ATP und Dithionit zu NH_4^+ (Vaughn und Burgess 1989). Allerdings reduziert das einkernige Molybdoenzym Xanthin-Oxidoreduktase, das zur gleichen Familie wie die CO-Dehydrogenase gehört, NO_2^- zu NO (Millar *et al.* 1998, Godber *et al.* 2000).

3.5.3 Kinetik der Ammoniumbildung aus der Nitrit-Reduktion durch CO-Dehydrogenase

Durch die Bestimmung der K_m- und V_{max}-Werte identifiziert man die Affinität und Geschwindigkeit des Substratumsatzes. Je niedriger die K_m-Werte sind, umso höher ist die Affinität des Enzyms zum Substrat. Die Bestimmung der K_m- und V_{max}-Werte des Enzyms für die Nitrit-Reduktion wurde an gereinigter CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* durchgeführt. Die Auftragung der Meßergebnisse erfolgte nach Hanes (Abb. 3-28 (Inset)). Die Darstellung in Abb. 3-28) zeigt, dass die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratskonzentration einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Demzufolge war die Auftragung von (S)/V gegen S linear. Aus dieser Abbildung konnte ein K_m-Wert von 6,62 mM Nitrit bestimmt werden. Der V_{max}-Wert betrug 12,3 nmol NH_4^+ mg^{-1} min^{-1}. Die kinetischen Untersuchungen der Nitrit-Reduktion, die durch nichtklassische Nitritreduktase entstehen, zeigten wie bei der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* K_m Werte, die ziemlich hoch sind (Vaughn and Burgess 1989).

3.5.4 Bindung und Reduktion des Nitrits am aktiven Zentrum [$CuSMoO_2$] der CO-Dehydrogenase

Wie bereits für die Azid-Reduktion beschrieben, wurden die Untersuchungen der Bindung und Reduktion des Nitrits durch Inaktivierung der CO-Dehydrogenase

durchgeführt. Das Enzym wurde durch Cyanid oder n-Butylisocyanid inaktiviert und hinsichtlich der Nitrit-Reduktionsaktivität untersucht.

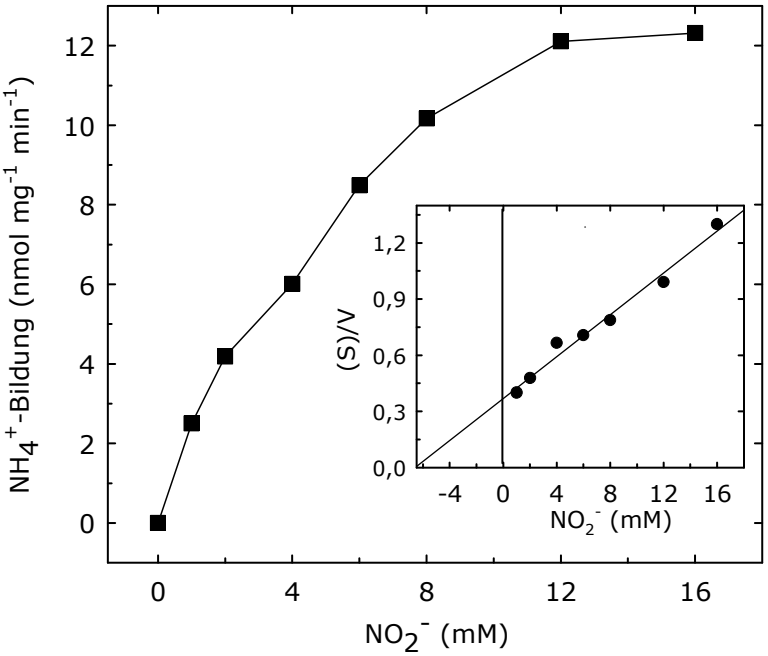


Abb. 3-28 Die Abhängigkeit der Nitrit-Reduktionsaktivität von der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* von Nitrit-Konzentration.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Ammoniumbildung aus der Nitrit-Reduktion wurden bei verschiedenen Nitrit-Konzentrationen ermittelt (Kap. 2.5.3 und Kap. 2.6.2). Der Hanes-Plot wurde durch eine Auftragung des Quotienten aus der Substratskonzentration (mM) und der Reaktionsgeschwindigkeit (nmol min^{-1} mg^{-1}) gegen Substratskonzentration erstellt. Inset: K_m-Wert-Bestimmung der Ammoniumbildung aus der Nitrit-Reduktion durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*. Inset: Hanes-Plot zur Bestimmung des K_m-Werts.

3.5.4.1 Nitrit-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase nach Inhibition mit Cyanid

Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase, [$CuSMoO_2$], an dem die CO-Oxidation stattfindet (Dobbek *et al*. 2002), ist auch essentiell für die Azid-Reduktion. Dieses Phänomen wurde durch Cyanid-Inaktivierung untersucht. Da die Cyanid-inaktivierte CO-Dehydrogenase den Cu- und den µ-Sulfido-Liganden

aus ihrem aktivem Zentrum verloren hat, zeigte das Enzym keine Azid-Reduktionsaktivität mehr (Kap. 3.4.5.1).

Mit der gleichen Prinzip wurde die Reaktion des [$CuSMoO_2$]-aktiven Zentrums mit Nitrit untersucht (Kap. 2.12.1). Die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* wurde mit Cyanid unter anoxischen Bedingung inkubiert. Während des Versuchs wurden Proben für die Bestimmung der CO-Oxidations- und der Nitrit-Reduktionsaktivität entnommen. Aus den gleichen Proben wurde der Gehalt an cyanolysierbarem Schwefels analysiert. Die Bestimmung des cyanolysierbaren Schwefels in Form von Rhodanid (SCN^-) erfolgte nach der Zentrifugalfiltration der Inaktivierungsansätze über eine Membran mit 30 kDa Ausschlussgrenze und als rot-braunes $Fe(SCN)_2$ nach Reaktion mit $Fe(NO)_3$. Die CO-Oxidations- (Kap. 2.5.1) und Nitrit-Reduktionsaktivität (Kap. 2.5.3) wurde nach der Gelfiltration an G-25 (PD10) bestimmt.

Nach Cyanid-Behandlung wurden die CO-Oxidationsaktivität und ebenso die Nitrit-Reduktionsaktivität gehemmt (Abb. 3-29). Die Halbwertszeiten der Inaktivierung der CO-Oxidationsaktivität und der Nitrit-Reduktionsaktivität sind vergleichbar (30 min). Die Abnahme der CO-Oxidationsaktivität und die Nitrit-Reduktionsaktivität verlaufen parallel zueinander. Die Zunahme des Rhodanids (SCN^-) in den gleichen Proben wurde nachgewiesen (Abb. 3-29).

Nach Inkubation der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* mit Cyanid im Zeitraum von 24 h war sowohl die CO-Oxidations- als auch die Nitrit-Reduktionsaktivität komplett gehemmt. Am Ende des Versuchs wurden im Assaymedium 1,89 ($\pm$ 0,15) mol mol^{-1} Enzym cyanolysierbarer Schwefel und 1,5 ($\pm$ 0,15) mol mol^{-1} Enzym Kupfer nachgewiesen. Es ist ersichtlich, dass die Cu-Atome und die Sulfido-Liganden aus dem aktiven Zentrum vollständig entfernt wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Anwesenheit des intakten aktiven Zentrums [$CuSMoO_2$] nicht nur für CO-Oxidations-, sondern auch für die Nitrit-Reduktionsaktivität essentiell ist.

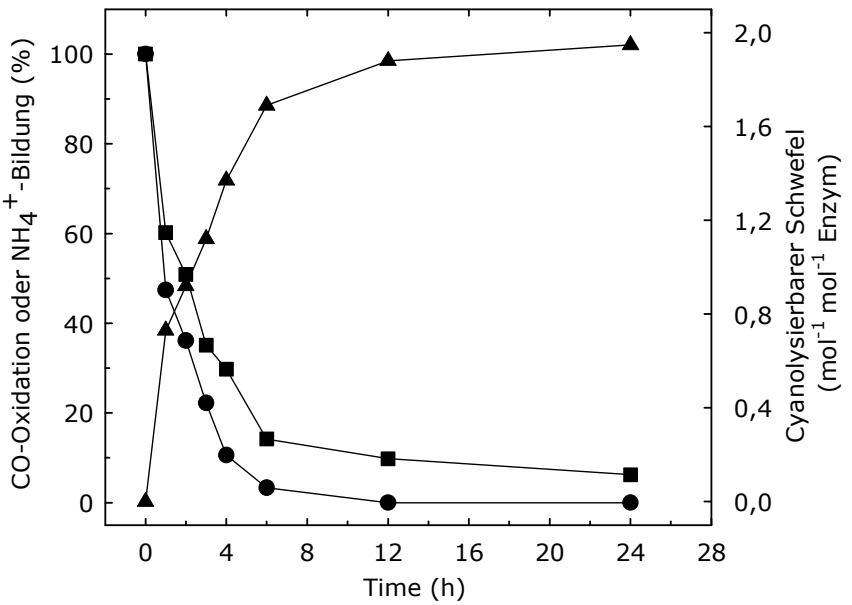


Abb. 3-29 Zeitlicher Verlauf der Cyanid-Inaktivierung der CO-Oxidation und Nitrit-Reduktion der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und Freisetzung des cyanolysierbaren Schwefels

CO-Dehydrogenase (2,2 mg ml^{-1}) wurde unter anoxischen Bedingungen mit 10 mM Cyanid versetzt. Der zeitliche Verlauf der spezifischen CO-Dehydrogenase-Aktivität (Kap. 2.5.1) und die Ammoniumbestimmung (Nitrit-Reduktionsprodukt) (Kap. 2.6.2) in Aliquots nach Abtrennung von Cyanid und der Reaktanten durch Gelfiltration bestimmt. Die Ansätze der Nitrit-Reduktion enthielten jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2), 1.0 mg Enzym, 10 mM NO_2^- und 10 mM Dithionit (Kap. 2.5.3). Parallel dazu wurden in den Ultrafiltraten der Reaktionsansätze (Ausschlussgrenze 30 kDa) gebildetes Rhodanid nachgewiesen und quantifiziert (Kap. 2.12.1). [100% Aktivitäten, CODH bzw. NH_4^+-Bildung = 14,8 U mg^{-1}, 12,2 nmol mg^{-1} min^{-1}].
Symbole: (●) CO-Dehydrogenase-Aktivität; (■) Nitrit-Reduktionsaktivität;
(▲) cyanolisierbarer Schwefel.

3.5.4.2 Nitrit-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase nach Inhibition mit n-Butylisocyanid

Um zu untersuchen, ob die inaktive CO-Dehydrogenase, in der das $[CuSMoO_2]$-Zentrum vorhanden ist, Nitrit-Reduktionsaktivität zeigt, wurde das Enzym mit n-Butylisocyanid behandelt. Im Gegensatz zur Cyanid-Behandlung verliert die mit n-Butylisocyanid behandelte CO-Dehydrogenase ihre CO-Oxidationsaktivität, jedoch wird das katalytische Zentrum nicht vom Enzym entfernt (Dobbek *et al*.

2002). In diesem Zustand kann das Enzym weder CO-Oxidation noch Azid-Reduktion durchführen (Kap. 3.5.4.2).

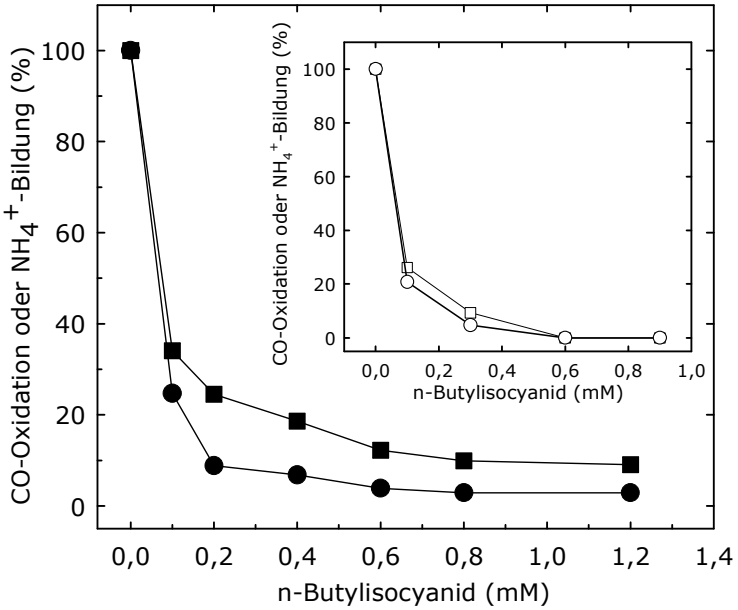


Abb. 3-30 Die Nitrit-Reduktion durch die n-Butylisocyanid-inaktivierte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und Inset: *S. thermoautotrophicus*

Reaktionsansätze, die 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2) und 1 mg Enzym enthielten, wurden unter anoxischen Bedingungen mit 0 mM bis 1,0 mM n-Butylisocyanid versetzt. Nach 15 min Inkubation wurden ohne Trennung von n-Butylisocyanid die CO-Oxidationsaktivität im CO → INT/MPMS-Test (Kap. 2.5.1) und die Nitrit-Reduktionsaktivität bestimmt (Kap. 2.5.3). [100% Aktivitäten, CODH bzw. NH_4^+-Bildung = 14,8 U mg^{-1}, 12,0 nmol mg^{-1} min^{-1} (*O. carboxidovorans*) und 11,5 U mg^{-1}, 11,9 nmol mg^{-1} min^{-1} (*S. thermoautotrophicus*)].
Symbole: (●, ○) CO-Dehydrogenase-Aktivität; (■, □) Nitrit-Reduktionsaktivität.

Die oxidierte CO-Dehydrogenase wurde bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Konzentrationen an n-Butylisocyanid (0 bis 1,2 mM) 15 min lang inkubiert. Anschließend wurden die CO-Oxidations- und die Nitrit-Reduktionsaktivitäten gemessen. In Abb. 3-30 wird gezeigt, dass die CO-Oxidations- und die Nitrit-Reduktionsaktivitäten miteinander weitgehend korrelieren. Mit 0,8 mM n-Butylisocyanid behandelte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* besitzt noch 2,9% CO-Oxidationsaktivität während die Nitrit-

Reduktionsaktivität 10% war. CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* zeigt ein ähnliches Aktivitätsmuster (Abb. 3-30 (Inset)). Durch die Bindung von n-Butylisocyanid im aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase verliert das Enzym sowohl die CO-Oxidations- (Dobbek *et al.* 2002) als auch die Nitrit-Reduktionsaktivität.

3.5.4.3 Abhängigkeit der Nitrit-Reduktion von der CO-Oxidations-aktivität

Bei der Cyanid- und n-Butylisocyanid inhibierten CO-Dehydrogenase konnte keine Nitrit-Reduktionsaktivität nachgewiesen werden. Es kann deshalb angenommen werden, dass die strukturelle Änderung des aktiven Zentrums die Inaktivierung der Nitrit-Reduktionsaktivität verursachte. Die strukturelle Änderung wird durch chemische Agenzien wie z.B. Cyanid oder n-Butylisocyanid hervorgerufen. Es stellt sich die Frage, ob die nativen CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*, die ohne chemische Behandlung unterschiedliche CO-Oxidationsaktivitäten aufweisen, auch die Nitrit-Reduktionsaktivitäten wiederspiegeln.

Die Charakterisierung der CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* durch z.B. UV/vis-Spektraleigenschaften, Kupfergehalt und cyanolysierbarem Schwefel wurde bereits im Kap. 3.4.7, Abb. 3-23A und Abb. 3-23B ausführlich besprochen. Die Azid-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase ist abhängig von der CO-Oxidationsaktivität (Kap. 3.26). Hier konnte gezeigt werden, dass die Enzyme, die die höchste CO-Oxidationsaktivität aufwiesen, auch die höchste Nitrit-Reduktionsaktivität (Abb. 3-31) zeigten. Das bedeutet, dass die Nitrit-Reduktionsaktivität abhängig vom Metallgehalt des [$CuSMoO_2$]-Zentrums ist. Es ist durchaus möglich, dass CO-Oxidation, Azid-Reduktion und Nitrit-Reduktion an der gleichen Stelle der CO-Dehydrogenase stattfinden.

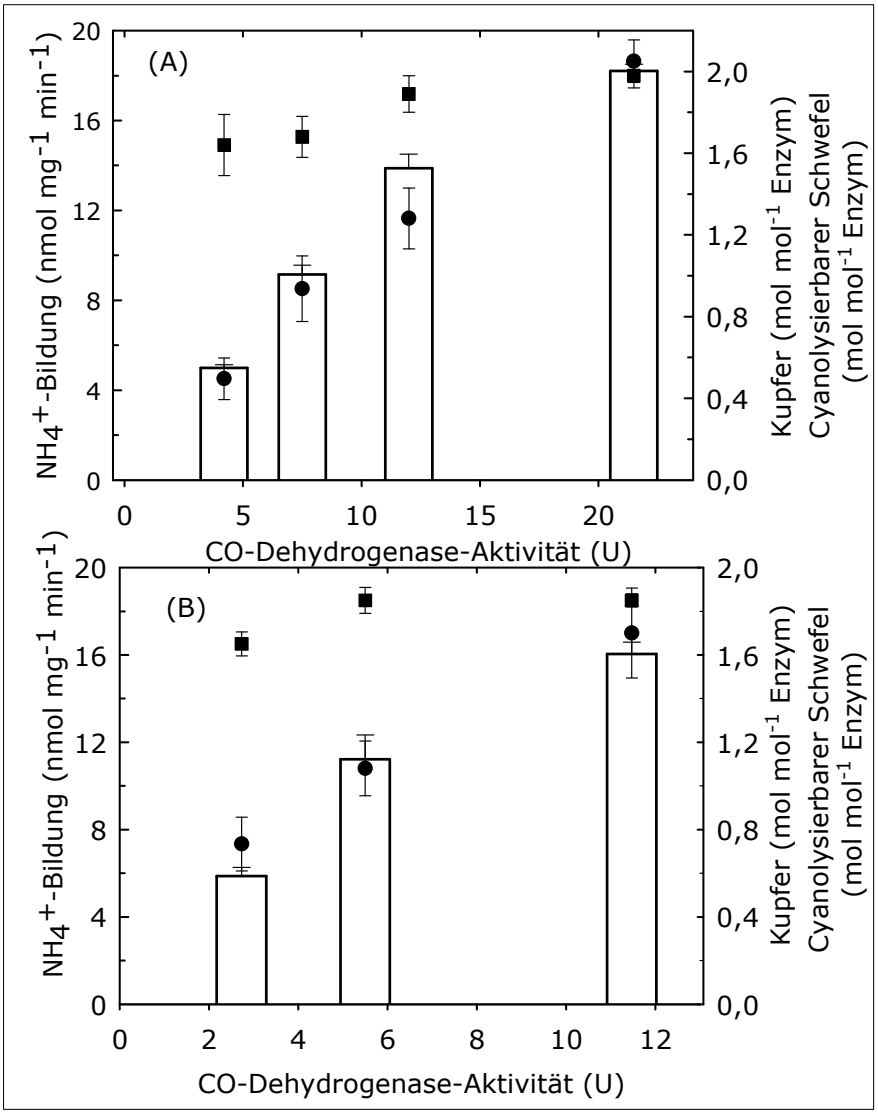


Abb. 3-31 Korrelation der CO-Oxidations- und der Nitrit-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (A) und *S. thermoautotrophicus* (B)

Die CO-Dehydrogenasen wurden aus CO-gewachsenen Bakterien aus verschiedenen Fermentationen aufgereinigt. Das Kupfer wurde durch Induced-Couple-Plasma-Massenspektrometrie gemessen. Der cyanolysierbare Schwefel wurde als Thiocyanat wie in Kap. 2.12.1 beschrieben, gemessen. Die CO-Oxidationsaktivität wurde im CO → INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1) und die Nitrit-Reduktionsaktivität wurde durch die Messung der Ammoniumbildung ermittelt (Kap. 2.5.3 und Kap. 2.6.2).
Symbole: (□) Nitrit-Reduktionsaktivität; (■) cyanolysierbarer Schwefel;
(●) Kupfergehalt.
Die Werte sind die Mittel aus 2 parallelen Messungen mit ihren Standardabweichungen.

3.6 Nitrat als Substrat für die reduktive Aktivität der CO-Dehydrogenase

In der Natur wird Nitrat durch Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Es gibt drei Nitratreduktasen, die als NAS (eine lösliche, cytoplasmatische Nitratreduktase), NAP (eine membrangebundene Nitratreduktase) und NAR (eine periplasmatische Nitratreduktase) bezeichnet werden (Kap. 1.5.3). Diese bakteriellen Nitratreduktasen besitzen Molybdopterin-Guanin-Dinucleotid (MGD) als Kofaktor (Zumft 1997).

Es wurde bereits berichtet, dass die CO-Dehydrogenase in der Lage ist, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren (Fuchs 1992, Meyer *et al*. 1993c). Die Nitratreduktase-Aktvität der gereinigten CO-Dehydrogenase aus CO-autotroph gewachsener *O. carboxidovorans*-Kultur war ca. 11 nmole min^{-1} mg^{-1}. Die CO-Dehydrogenase konnte auch CO als Elektronen-Donor für die Nitrat-Reduktion dienen. Es wurde beschrieben, dass die Nitrat-Reduktion in Gegenwart von Cyanid und Methanol gehemmt wurde (Meyer *et al.* 1993c, Fuchs 1992). Es gibt aber noch keine weiteren Informationen über die Zusammenhänge zwischen CO-Oxidations- und Nitrat-Reduktionsaktivität, ebenso über die Kinetik dieser Aktivität. In dieser Arbeit wurde anhand der neusten Erkenntnisse über Struktur und Funktion der CO-Dehydrogenase (Dobbek *et al.* 2002, Gnida *et al.* 2003) die Nitrat-Reduktionsaktivität untersucht. Es wird versucht, einen Zusammenhang zwischen CO-Oxidation- und Nitrat-Reduktion im $[CuSMoO_2]$-Cluster zu klären.

3.6.1 Reduktion von Nitrat durch CO-Dehydrogenase zu Nitrit

Die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* katalysieren die Reduktion von Nitrat zu Nitrit (Tabelle 3-9). Wie bei vorherigen Untersuchungen (Meyer *et al*. 1993c) festgestellt, zeigte die gereinigte CO-Dehydrogenase eine geringe Nitrat-Reduktionsaktivität (8,02 nmol Nitrit min^{-1} mg^{-1} für *O. carboxidovorans* und 5,5 nmol Nitrit min^{-1} mg^{-1} für *S. thermoautotrophicus*). Der geeignete Elektronen-Donor für die Nitrat-Reduktion durch CO-Dehydrogenase war ähnlich wie bei der klassischen Nitratreduktase reduziertes Methylviologen.

Tabelle 3-9 Voraussetzungen für die Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus*

Komponenten im Ansatz			Aktivität
CO-Dehydrogenase	Methylviologen[a)]	NO_3^-	NO_2^--Reduktion[b)]
+[c)]	+	+	8,02
+[d)]	+	+	5,50
+	+	-	n.n.
+	-	+	n.n.
-	+	+	n.n.

Die Ansätze, die jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 7,2), 1 mg CO-Dehydrogenase, 80 mM KNO_2, 1,5 mM Dithionit und 0,9 Methylviologen enthielten, wurden im Wasserbad bei 60° C inkubiert. Es wurde die Nitrit-Bildung gemessen (Kap. 2.6.3).

[a)] 0,9 mM Methylviologen plus 1,5 mM Dithionit

[b)] NO_2^- nmol mg^{-1} min^{-1}

[c)] CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

[d)] CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*

+ anwesend

- abwesend

n.n.: nicht nachweisbar

Es wurde festgestellt, dass andere Elektronen-Donoren wie CO, H_2 oder Dithionit für die Aktivitätsmessung nicht gut geeignet waren; in Gegenwart dieser Elektronen-Donoren war die Aktivität gering (Abb. 3-32). (spesizifische Aktivität: 14,8 U)

Im Vergleich zur Nitrat-Reduktionsaktivität (100%), die mit reduziertem Methylviologen als Elektronen-Donor eingesetzt wurde, betrugt die Nitrat-Reduktionsaktivität mit CO als Elektronen-Donor 70%, mit H_2 als Elektronen-Donor 30%, und mit Dithionit als Elektronen-Donor 19% (Abb. 3-32).

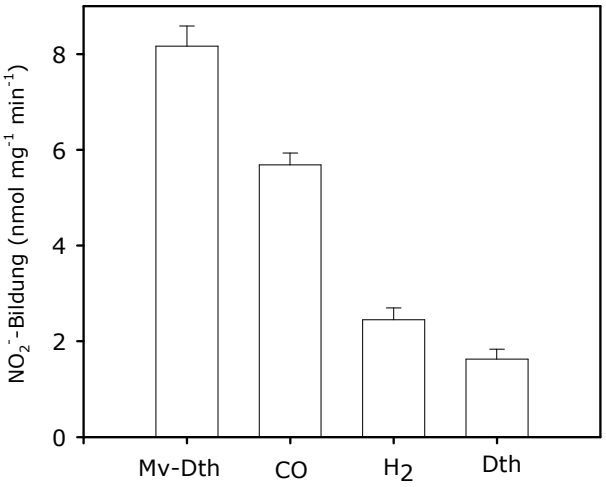


Abb. 3-32 Die Abhängigkeit der Nitrat-Reduktion von Elektronen-Donoren durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*

Die Reaktionsansätze enthielten jeweils 1 mg Enzym, 80 mM NO_3^-, 1 ml 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2 und folgende Elektronen-Donor: Mv-Dth: 0,9 mM Methylviologen plus 1,5 mM Dithionit; CO: CO-Atmosphäre; H_2: H_2-Atmosphäre und Dth: 10 mM Dithionit. Die Proben wurden im Wasserbad bei 60° C inkubiert. Das gebildete Nitrit wurde wie in Kap. 2.6.3 beschrieben gemessen. Die Werte sind die Mittel aus 2 parallelen Messungen mit ihren Standardabweichungen.

Genau wie bei den klassischen Nitratreduktasen ist die Nitrat- Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase pH abhängig, ihr pH-Optima liegt bei pH 8,0. Das pH-Optimum für die periplasmatische Nitratreduktase von *Desulfovibrio desulfuricans* liegt im Bereich 8,0 bis 9,5 (Romão *et al*. 2001).

3.6.2 Kinetik der Nitrat-Reduktion

Im folgenden Versuch wurden der K_m- und V_{max}-Wert bestimmt. Die Abb. 3-33 zeigt eine typische Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratskonzentration. Die Auftragung der Messergebnisse erfolgte nach Hanes (Abb. 3-33 (Inset)).

Aus diesen kinetischen Untersuchungen konnte ein K_m-Wert von 264,89 mM Nitrat und ein V_{max}-Wert von 24,7 nmol Nitrit mg^{-1} min^{-1} bestimmt werden. Die Affinität des Enzyms zu Nitrat war sehr gering. Ein anderes Molybdän-haltiges Enzym, Xanthin-Oxidase-Reduktase, besitzt auch Nitrat-Reduktionsaktivität. Die Xanthin-Oxidoreduktase hat einen K_m-Wert von 32 mM Nitrat und einen V_{max}-Wert von 391 nmol Nitrit min^{-1} mg^{-1} (Doel *et al*. 2001). Verglichen mit der

klassische Nitratreduktase (V_{max}:18 µmol min^{-1} mg^{-1} und K_m: 20 µM) (Romão *et al*. 2001), waren die Affinitäten und Aktivitäten der CO-Dehydrogenase sehr gering.

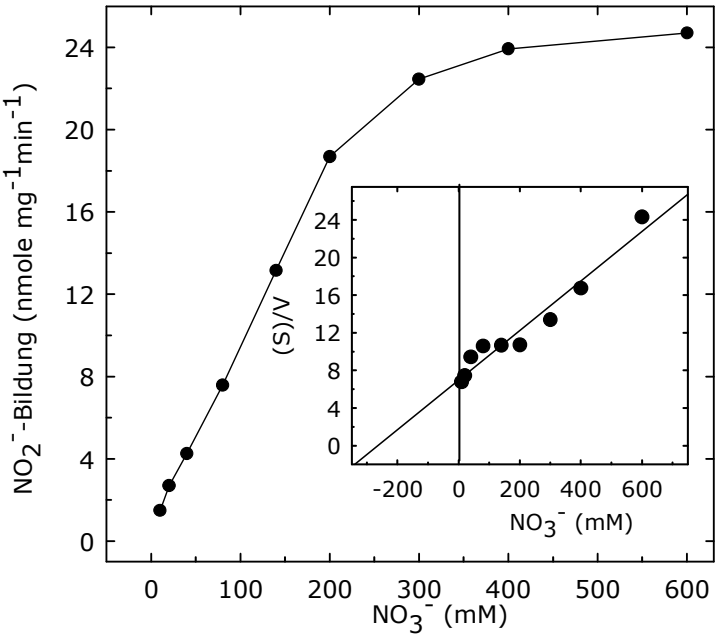


Abb. 3-33 Die Abhängigkeit der Nitrat-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* von der Nitrat-Konzentration

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Nitrat-Reduktion wurde bei verschiedenen Nitrat-Konzentrationen bestimmt (Kap. 2.5.4 und Kap. 2.6.3). Der Hanes-Plot wurde durch eine Auftragung des Quotienten aus der Substratskonzentration (mM) und der Reaktionsgeschwindigkeit (nmol min^{-1} mg^{-1}) gegen die Substratskonzentration erstellt. Inset: Hanes-Plot für die K_m-Wert-Bestimmung der NO_2^--Bildung aus der Nitrat-Reduktion durch CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*.

3.6.3 Nitrat-Reduktionsaktivität der inaktiven CO-Dehydrogenase

Es sollte geprüft werden, ob die inaktive CO-Dehydrogenase, die noch Mo im aktiven Zentrum enthält, Nitrat reduzieren kann. In dieser Arbeit wurde die durch Cyanid-inaktivierte CO-Dehydrogenase verwendet. Das aktive Zentrum der Cyanid-behandelten CO-Dehydrogenase besitzt nur noch das Molybdän, das durch zwei Dithiolat-Schwefel und drei Oxo-Grupen koordiniert wird (Dobbek *et al*. 2002).

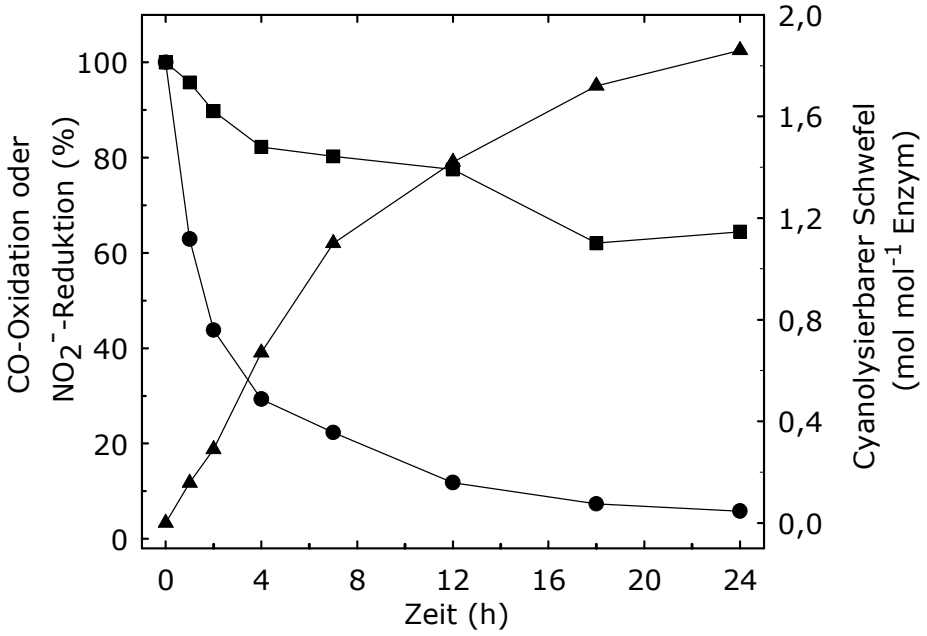


Abb. 3-34 Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der CO-Oxidations- und der Nitrat-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und Freisetzung des cyanolysierbaren Schwefels

CO-Dehydrogenase (2,2 mg ml^{-1}) wurde unter anoxischen Bedingungen mit 10 mM Cyanid versetzt. Der zeitliche Verlauf der spezifischen CO-Dehydrogenase-Aktivität (Kap. 2.5.1) und die Nitrat-Reduktion (Kap. 2.5.4) wurden in Aliquots nach Abtrennung von Cyanid und der Reaktanten durch Gelfiltration bestimmt. Die Ansätze der Nitrat-Reduktion enthielten jeweils 1 ml KH_2PO_4/NaOH-Puffer (50 mM, pH 8), 1.0 mg Enzym, 80 mM NO_3^- und Dithionit-reduziertes Methylviologen (Kap. 2.5.4). Parallel dazu wurden in den Ultrafiltraten der Reaktionsansätze (Ausschlussgrenze 30 kDa) gebildetes Rhodanid nachgewiesen und quantifiziert (Kap. 2.5.1). [100% Aktivitäten, CODH bzw. NO_2^--Bildung = 14,8 U mg^{-1}, 6,9 nmol mg^{-1} min^{-1}].
Symbole: (■) Nitrat-Reduktion; (●) CO-Dehydrogenase-Aktivität; (▲) cyanolisierbarer Schwefel

Die Inkubation von CO-Dehydrogenase mit 10 mM K-Cyanid führte zur Inaktivierung der CO-Oxidationsaktivität aber die Nitrat-Reduktionsaktivität war nur partiell beeinträchtigt (Abb. 3-34). Die Messungen der CO-Oxidations- und der Nitrat-Reduktionsaktivität wurden nach der Abtrennung des Cyanids aus der Präparation durch Gelfiltration auf G-25 (PD10) durchgeführt (Kap. 2.12.1). Nach 2 h Inkubationszeit konnten verglichen mit dem Kontrollansatz nur noch 43.4% CO-Oxidationsaktivität aber immer noch 90% Nitrat-Reduktionsaktivität

nachgewiesen werden. Während der weiteren Inkubationszeit, in der der cyanolysierbare Schwefel vollständig vom aktiven Zentrum entfernt (1,98 mol mol^{-1} Enzym) wurde, zeigte das Enzym fast keine CO-Oxidationsaktivität mehr. Es war jedoch noch 60% der Nitrat-Reduktionsaktivität vorhanden.

Die UV/vis-Spektren der Dithionit-reduzierten und damit für die CO-Oxidation inaktivierten CO-Dehydrogenase unterschieden sich nicht vom normalen Spektrum der aktiven CO-Dehydrogenase (Abb. 3-35). Diese Ergebnisse sind nicht überraschend, weil die CO-Dehydrogenase, die für die CO-Oxidation inaktiviert wurde, noch durch Dithionit reduziert werden konnte.

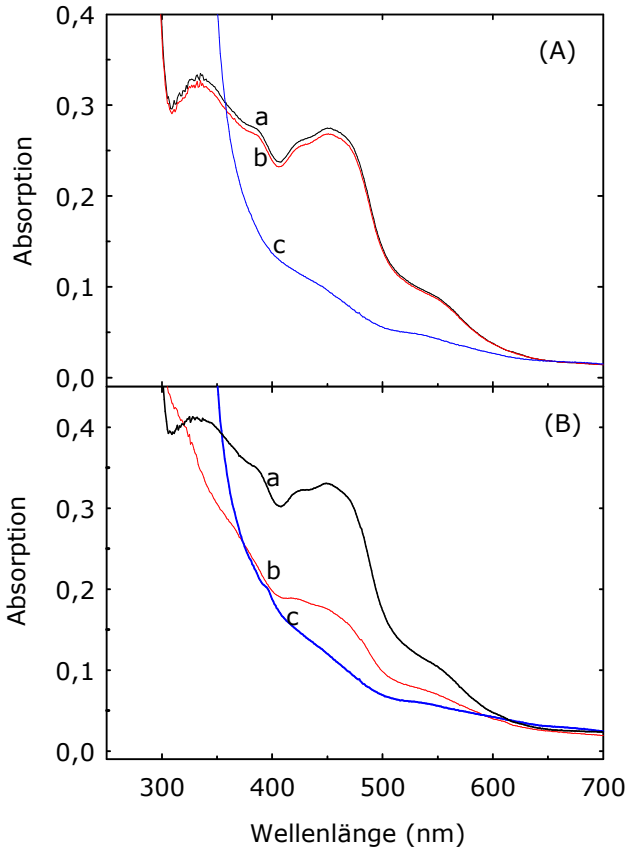


Abb. 3-35 UV/vis-Absorptionsspektren luftoxidierter, CO-inkubierter und Dithionit-reduzierter Cyanid-inaktivierter (A) und 13U-CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (B)

UV/vis-Absorptionsspektren von Cyanid-inaktivierter (A) und 13U-CO-Dehydrogenase (B) (Probe A: 1,1 mg ml^{-1} und Probe B: 1,2 mg ml^{-1} in 50 mM KH_2PO_4/NaOH-Puffer, pH 7,2). Spektren a: luftoxidierter Zustand, Spektren b: 30 min nach Inkubation mit CO unter anoxischen Bedingung, Spektren c: 5 Minuten nach Reduktion mit Dithionit unter anoxischen Bedingungen.

Die Nitrat-Reduktion ist vom intakten [$CuSMoO_2$]-Cluster unabhängig. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Bindung und die Reduktion von Nitrat und die Oxidation von CO nicht an der gleichen Stelle stattfinden. Es könnte sein, dass Nitrat direkt am Mo-Zentrum bindet und reduziert wird.

Die rekombinante inaktive CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5-12/pJRDMSL enthält ein defektes aktives Zentrum, in dem kein cyanolysierbarer Schwefel und nur in substöchiometrischen Mengen Cu vorhanden sind (Ferner 2001). Ihr aktives Zentrum ist deshalb mit der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase vergleichbar (Ferner 2001). Die inaktive rekombinante CO-Dehydrogenase besitzt ebenfalls Nitrat-Reduktionsaktivität. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen, die mit Cyanid-inaktivierter CO-Dehydroegnase erzielt wurden. Es ist ersichtlich, dass eine Korrelation zwischen der Nitrat-Reduktionsaktivität und der CO-Oxidationsaktivität nicht gegeben ist und für die Nitratreduktion kein intaktes katalytisches Zentrum notwendig ist.

3.6.4 Abhängigkeit der Nitrat-Reduktionsaktivität von der CO-Oxidationsaktivität

Um die Abhängigkeit der Nitrat-Reduktion von der CO-Oxidationsaktivität genau zu untersuchen, wurden CO-Dehydrogenase-Präparationen aus *O. carboxidovorans*, die unterschiedliche CO-Oxidationsaktivitäten aufwiesen, verwendet. Abb. 3-36 zeigt das Verhältnis zwischen Nitrat-Reduktion und CO-Oxidationsaktivität. Die Nitrat-Reduktion ist unabhängig von der CO-Oxidationsaktivität.

Im Gegenwart von Methylviologen zeigten unterschiedliche CO-Dehydrogenasen, z.B. die mit 6 oder 13 U Oxidationsaktivität, eine fast gleiche Nitratreduktion. Ebenso wies vollständig inaktive rekombinante CO-Dehydrogenase deutliche Nitrat-Reduktionsaktivität auf (Abb. 3-36A). Die Nitrat-Reduktion ist eine Enzymreaktion, da in den Reaktionsansätzen, in denen kein Elektronen-Donor/Enzym vorkamen oder die erhitzes Enzym enthielten, Nitritbildung nicht nachgewiesen wurde (nicht dargestellt).

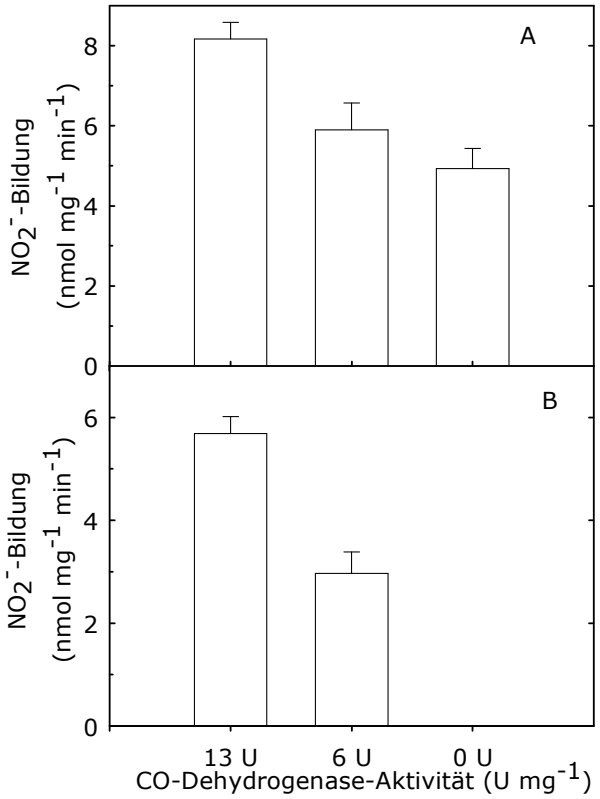


Abb. 3-36 Korrelation der Aktivität der CO-Oxidation und der Nitrat-Reduktion der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* in Anwesenheit von Dithionit-reduziertem Methylviologen (A) oder CO (B) als Elektronen-Donor

Die CO-Dehydrogenase wurde aus CO-gewachsenen Kulturen der verschiedenen Fermentationen aufgereinigt. Das inaktive Enzym (0 U) mit defektem aktivem Zentrum ist die rekombinante CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5-12/pJRDML. Die CO-Oxidationsaktivität wurde im CO → INT/MPMS-Test bestimmt (Kap. 2.5.1) und die Nitrat-Reduktionsaktivität in Anwesenheit von Dithionit-reduziertem Methylviologen (A) oder CO (B) als Elektronen-Donor wurde durch die Messung der Nitrit-Bildung ermittelt (Kap. 2.6.3). Die Werte sind die Mittel aus 2 parallelen Messungen mit ihren Standardabweichungen.

Wenn Nitrat-Reduktion unter CO-Atmosphäre stattfindet, dann können die Elektronen aus der CO-Oxidation für diese Nitrat-Reduktion nur über das intakte katalytisch aktive Zentrum fließen. Unter dieser Bedingung zeigte deshalb die inaktive rekombinante CO-Dehydrogenase, die ein defektes aktives Zentrum enthält, keine Nitratreduktion. Die CO-Dehydrogenasen, die 6 und 13U CO-Oxidationsaktivität aufwiesen, zeigten Nitratreduktion, die mit der CO-Oxidationsaktivität korrelierte (Abb. 3-36B).

4. Diskussion

Wie in dieser Arbeit gezeigt, beschränkt sich die Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase nicht nur auf Nitrat, sondern sie ist auch in der Lage, Azid und Nitrit zu reduzieren. Diese Fähigkeit besitzt nicht nur die CO-Dehydrogenase des mesophilen Bakteriums *O. carboxidovorans,* sondern auch die des thermophilen Bakteriums *S. thermoautotrophicus*. Die CO-Dehydrogenasen aus beiden Bakterien synthetisieren aus Azid und Nitrit Ammonium und aus Nitrat Nitrit. Die Reduktionseigenschaften der CO-Dehydrogenasen aus beiden Organismen wurden näher charakterisiert und besonders der Einfluß von CO-Strukturanalogen auf Reduktionsaktivitäten untersucht. Da sowohl die Kristallstrukturen der aktiven als auch der gehemmten CO-Dehydrogenasen, wie z.B. n-Butylisocyanid- und Cyanid-inhibierte Formen, vorliegen, sollte in dieser Arbeit versucht werden, die Bindungs- und die Reduktionsstelle der drei neuen Substrate am aktiven [$CuSMoO_2$]-Cluster aufzuklären. Es wurde beobachtet, dass die CO-Oxidationsaktivität mit den Reduktionsaktivitäten von Azid (N_3^-) und Nitrit (NO_2^-) korreliert, allerdings zeigte die Nitrat (NO_3^-)-Reduktionsaktivität keine Korrelation mit der CO-Oxidationsaktivität.

4.1 Azid-Reduktion

4.1.1 Einfluss von Azid auf die CO-Dehydrogenase

Azid ist neben Cyanid, Isocyanid und Acetylen ein alternatives Substrat der mehrkernigen Nitrogenase, die Distickstoff zu Ammonium reduziert (Dilworth 1966, Rubinson *et al*. 1985, Li *et al*. 1982).

CO-Dehydrogenase, ein zweikerniges Molybdoenzym, wird jedoch durch Moleküle mit Dreifachbindung, wie z.B. n-Butylisocyanid, Cyanid und Acetylen inaktiviert. Im oxidierten Zustand wird n-Butylisocyanid am [$CuSMoO_2$]-Cluster gebunden, wobei das N-Atom des n-Butylisocyanids am Cu und das C-Atom am μS und an der Hydroxygruppe des Mo koordiniert wird (Dobbek *et al.* 2002). In Gegenwart von Cyanid werden der Sulfido-Ligand und das Kupferatom aus dem [$CuSMoO_2$]-Cluster entfernt (Dobbek *et al.* 2002). Ein anderes Molekül, Acetylen, bildet zusammen mit dem Mo, dem μS und dem Hydroxy-O einen Fünfring (Egerer 2003).

Obwohl Azid strukturell auch als Dreifachbindung bezeichnet werden kann, werden die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* durch Azid nicht gehemmt (Kap. 3.3, Abb. 3-5 und Abb. 3-6). Eigentlich ist Azid bekannt als starker Inhibitor für zahlreiche Kupfer-Proteine und auch für einkernige Molybdoenzyme. Während der zyklischen Oxidation-Reduktion der Kupfer-Proteine wird in Anwesenheit von Azid ein Azid-Cu(+II)-Komplex gebildet. Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase besteht aus dem [$CuSMoO_2$]-Cluster. Im oxidierten Zustand der CO-Dehydrogenase liegt Molybdän als Mo(+VI) vor und es kann zu Mo(+IV) reduziert werden. In der CO-Dehydrogenase kommt das Kupfer unabhängig vom Redoxzustand des Enzyms immer im reduzierten Zustand (Cu(+I)) vor (Dobbek *et al.* 2002). Das Kupfer-Atom im [$CuSMoO_2$]-Cluster unterscheidet sich in dieser Hinsicht vom Kupfer-Atom der klassischen Kupfer-Proteine. Dies könnte einer der Gründe dafür sein, dass in Gegenwart von Azid die CO-Dehydrogenase nicht gehemmt wird. Allerdings ist das Azidion linear und symmetrisch gebaut und es ist isoelektronisch mit CO_2, das die Folge der CO-Oxidation ist. Statt eines Inhibitors wirkt Azid als alternatives Substrat für die Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase.

4.1.2 Katalyse der Reduktion von Azid zu Ammonium und molekularen Distickstoff durch CO-Dehydrogenase

Azid hat keine Hemmwirkung auf die CO-Dehydrogenase, sondern fungiert ganz im Gegenteil als Substrat, das zu Ammonium (NH_4^+) und Distickstoff (N_2) reduziert wird. Die Stöchiometrie der NH_4^+- und N_2-Bildung wurde anhand von limitierenden Azidkonzentrationen untersucht (Kap. 3.4.2, Tab. 3-3, Abb. 3-8). Ein mol Azid bildet 0,99 ($\pm$ 0,04) mol NH_4^+ und 1,01 ($\pm$ 0,04) mol N_2. Daraus folgt:

$$N_3^- \longrightarrow NH_3 + N_2$$

Bedingung für die Ammonium- und Stickstoffbildung ist aktive CO-Dehydrogenase. In Abwesenheit einer der notwendigen Reaktionskomponenten wurde weder die Bildung von Ammonium noch die Bildung von Stickstoff beobachtet (Kap. 3.4.2 Abb. 3-8). Ein Enzym, das Azid reduzieren kann, ist die Mo-haltige Nitrogenase.

Diese katalysiert die Reduktion von N_3^- nach folgenden Gleichungen:

$$N_3^- + 2\,e^- + 3\,H^+ \longrightarrow NH_3 + N_2 \qquad (1)$$

$$N_3^- + 6\,e^- + 7\,H^+ \longrightarrow N_2H_4 + NH_3 \qquad (2)$$

$$N_3^- + 8\,e^- + 9\,H^+ \longrightarrow NH_3 \qquad (3)$$

(Dilworth und Thorneley 1981)

Die Azid-Reduktion mit CO-Dehydrogenase stimmt mit Gleichung Nr.1 überein, was die Folgerung erlaubt, dass zwei Elektronen für die Reduktion von einem mol Azid benötigt werden. Der wesentliche Unterschied zwischen der Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase und der durch Nitrogenase ist, dass bei der Nitrogenase Energie in Form von MgATP notwendig ist. Die CO-Dehydrogenase führt die Azid-Reduktion ohne MgATP durch und benötigt keine Energie. Bei niedrigerem pH-Wert (ca. 6,5) reduziert Nitrogenase das Azid zu Hydrazin und Ammonium (Dilworth und Thornley 1981). Weiter entsteht während der Azid-Reduktion (Reaktion 3) als Zwischenprodukt Stickstoff, das wiederum sofort zu Ammonium reduziert wird. Im Vergleich dazu reduziert CO-Dehydrogenase Azid unabhängig vom pH-Wert immer zu Ammonium und molekularen Stickstoff. Der K_m- und der V_{max}-Wert der Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase ist mit dem K_m- und dem V_{max}-Werte der Nitrogenase vergleichbar (Kap. 3.4.3, Abb. 3-9). Außer Nitrogenase ist CO-Dehydrogenase bislang das einzige Enzym, dass die Fähigkeit besitzt, das in der Regel sehr toxisch auf andere Enzyme wirkende Azid zum nichttoxischen NH_4^+ zu reduzieren. Die zweikernige CO-Dehydrogenase, die den [$CuSMoO_2$]-Cluster im aktiven Zentrum enthält, reduziert Azid wie die Nitrogenase. Das aktive Zentrum der Nitrogenase besteht aus einem MoFe7S9-Clusterkern und Homocitrat, welches als zweizähniger Ligand an das Mo-Zentrum koordiniert ist. Der Kofaktor besteht aus einem Fe4S3- und einem MoFe3S3-Clusterfragment, welche über drei Sulfid-Liganden miteinander verknüpft sind (Abb. 4-2) (Howard und Rees 1996).

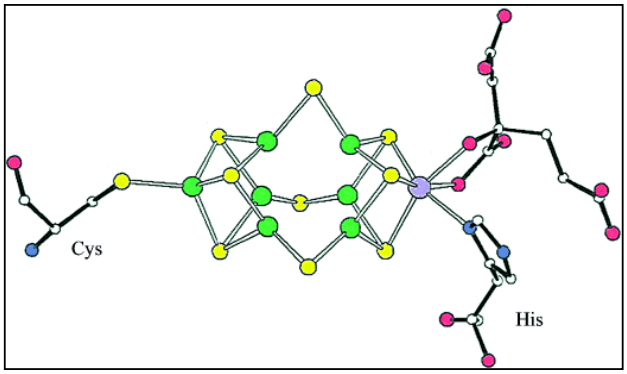


Abb. 4-1 Struktur des FeMo-Kofaktors (M-Cluster) der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii*

Das Molybdän wird in magenta, Stickstoff in blau, Schwefel in grün, Eisen in gelb, und Sauerstoff in rot markiert (aus Pickett *et al*. 2003).

CO-Dehydrogenase und Nitrogenase haben eine Gemeinsamkeit des aktiven Zentrums, in dem die Verbindung Metall-Sufidoligand-Metall (CO-Dehydrogenase: Cu-S-Mo; Nitrogenase: Fe-S-Mo oder Fe-S-Fe) vorkommt. Dies könnte einer der Gründe dafür sein, dass die beiden Enzyme Azid reduzieren können.

4.1.3 Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von Wasserstoff

Während der Azid-Reduktion, in der Dithionit als Elektronen-Donor verwendet wird, bleibt die CO-Oxidationsaktivität vollständig erhalten (Kap. 3.4.1; Abb. 3-6). Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die Oxidations- und Reduktions-aktivitäten simultan stattfinden, d.h. während der Substrat-(CO oder H_2)-Oxidation gebildete Elektronen werden für die Reduktion von Azid verwendet. Dies kann geschehen:

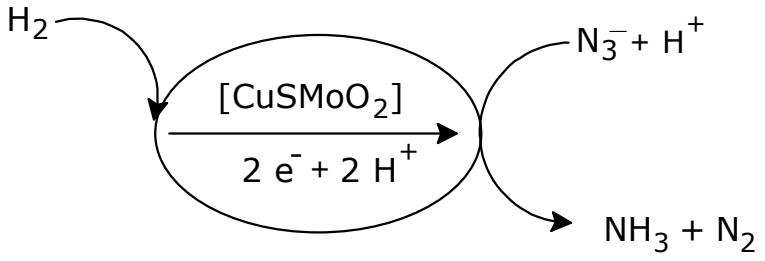
Wenn (1) die CO-Dehydrogenase die Oxidation des Substrates und die Reduktion des Azids in einem aktiven Zentrum gleichzeitig katalysieren kann und (2) dabei keine Produkte gebildet werden, die die Aktivitäten beeinträchtigen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Oxidation und Reduktion an unterschiedlichen Stellen stattfindet.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die CO-Dehydrogenase die Fähigkeit besitzt, unter H_2-Atmosphäre Azid zu reduzieren (Kap. 3.4.4 Abb. 3-10). Die

gereinigte CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* ist *in vitro* in der Lage, während der H_2-Oxidation Elektronen zu bilden (Santiago 1990). Diese Elektronen werden sehr wahrscheinlich weiter für die Azid-Reduktion verwendet.

Die Oxidation von H_2 ist abhängig von den Komponenten im aktiven Zentrum, die auch zur CO-Oxidation notwendig sind. Es ist bekannt, dass Cyanid-behandelte CO-Dehydrogenase sowohl die CO-Oxidation als auch die H_2-Oxidationsaktivität verliert (Ferner 2001). Obwohl die Kristallstruktur nur indirekte Hinweise zur H_2-Bindung (Dobbek 2000) liefert, nimmt der Autor an, dass die CO und H_2-Oxidation am [$CuSMoO_2$]-Cluster stattfindet (Schema. 4-2).

Während der Azid-Reduktion in Anwesenheit von H_2 war die CO-Oxidationsaktivität nicht beeinträchtigt (Kap. 3.4.4). Dies beweist, dass der [$CuSMoO_2$]-Cluster intakt blieb und dort keine eventuell gebildeten Hemmstoffe gebunden wurden. Es kann angenommen werden, dass die CO-Dehydrogenase simultan die Oxidation von H_2 und die Reduktion von Azid katalysieren kann (Schema 4-1).



Schema 4-1 Hypothetischer Mechanismus der Reduktion von Azid in Gegenwart von H_2

CO-Dehydrogenase oxidiert zunächst H_2 unter Bildung von Elektronen und Protonen. Die gebildeten Elektronen reduzieren dann das Azid zu Ammonium und Stickstoff. In diesem katalytischen Mechanismus finden möglicherweise die Oxidation von H_2 und die Reduktion von Azid nacheinander statt.

Es ist erstmals gezeigt worden, dass die CO-Dehydrogenase in einem Reaktionschritt mit zwei unterschiedlichen Substraten reagiert wobei ein Substrat oxidiert (H_2) und das andere (Azid) reduziert wird. Sehr wahrscheinlich findet hier eine elektronische Koppelung zwischen zwei Substraten statt. Die

Voraussetzung dafür ist eine aktive CO-Dehydrogenase, die durch H_2 reduziert werden kann.

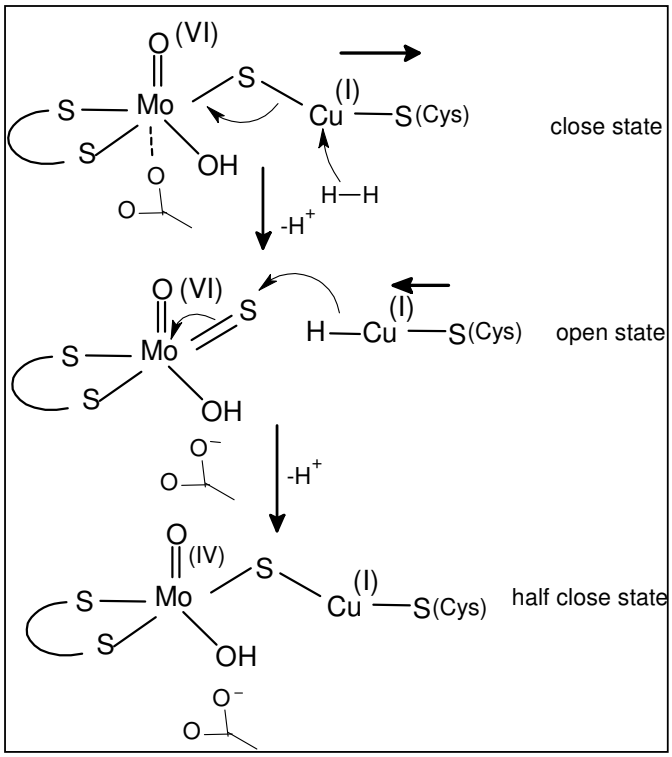


Abb. 4-2 Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die heterolytische H-Spaltung und –Oxidation (aus Dobbek 2000).

Wenn das Hydrid-Ion den µ-Sulfido-Liganden am Cu(I) substituiert und damit den *open state* des Clusters erzeugt, findet durch die Destabilisierung die Reduktion des Mo statt und das erste Proton wird abgespalten. Das zweite Proton wird freigesetzt, wenn die Bindung zwischen Cu und Sulfido-Ligand sich wieder bildet und dadurch das H_2-reduzierte aktive Zemtrum liefert (Dobbek 2000).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die CO-Dehydrogenase tatsächlich gleichzeitig H_2 als oxidationsfähiges Substrat oxidiert und die dabei gewonnen Elektronen für die Reduktion anderer Substrat wie Azid nutzen kann. Dieser Befund hat eine große Bedeutung, da CO als Hauptsubstrat der CO-Dehydrogenase nicht als Elektronen-Donor für die Azid-Reduktion fungieren kann.

Die Azid-Reduktion und die H_2- bzw. CO-Oxidation können an der gleichen oder an unterschiedlichen Bindungsstelle(n) stattfinden. Darüber wird im weiteren Kapitel diskutiert.

4.1.4 Inaktivierung der Oxidations- und Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase in Gegenwart von Azid/CO

In Anwesenheit von CO konnte die CO-Dehydrogenase nur für sehr kurze Zeit Azid reduzieren (Kap. 3.4.4, Abb. 3-10). Es konnte nachgewiesen werden, dass die CO-Dehydrogenase durch Inkubation mit Azid und CO im Zeitraum von ca. 30 min vollständig inaktiviert wurde (Kap. 3.4.4, Abb. 3-11). Die genaue Ursache für die Inaktivierung der Azid-Reduktionsaktivität und der CO-Oxidationsaktivität wurde geklärt (Kap. 3.4.6, Abb. 3-15). Allerdings musste das CO vor der Azidzugabe entfernt werden, damit die CO-Dehydrogenase nicht gleichzeitig mit Azid und CO reagieren konnte. Erneute CO-Zugabe in den Reaktionsgefäßen verursachte eine Inaktivierung (Kap. 3.4.6; Abb. 3-15). In der Kristallstruktur der CO-reduzierten CO-Dehydrogenase konnte kein gebundenes CO im aktiven Zentrum nachgewiesen werden (Dobbek *et al.* 2002). Es ist deshalb wahrscheinlich möglich, das CO-reduzierte Enzym von CO zu befreien. Das Enzym blieb im reduzierten Zustand, da es frei vom Elektronenakzeptor war.

Die Inaktivierung des Enzyms findet auch statt, wenn für die Azid-Reduktion Dithionit als Elektronen-Donor dient aber trotzdem CO in der Umgebung anwesend ist. Es ist bereits bekannt, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von CO und Sauerstoff die CO-Dehydrogenase sehr rasch ihre Aktivität verliert (Oberfrank 1997, Gremer 2000). In Versuchen mit Azid bestand die Möglichkeit, dass sich in den Reaktionsansätzen Spuren von Sauerstoff befanden, die die CO-Dehydrogenase zusammen mit CO inaktivierten. Kontrollansätze, in denen Dithionit als Elektronen-Donor verwendet wurde oder in denen nur CO allein zugegeben war, zeigten deutlich, dass die Ursache für die Hemmung darauf beruhte, dass Azid und CO gleichzeitig in der Umgebung von CO-Dehydrogenase anwesend waren (Kap. 3.4.4; Abb. 3-12).

Offensichtlich reagiert das Azid zusammen mit CO im aktiven Zentrum des Enzyms und bildet einen Komplex oder ein Produkt, welche die CO-

Dehydrogenase-Aktivität hemmen. Isocyanato-Komplexe entstehen durch Umsetzung von komplexen Metallaziden mit CO (Beck 1990, Kim *et al*. 2000).

Wird die oxidierte CO-Dehydrogenase durch Dithionit oder CO reduziert, können die entstehenden Elektronen für die Azid-Reduktion verwendet werden. Bevor die Azid-Reduktion stattfindet, muss das Azid im aktiven Zentrum gebunden werden, wahrscheinlich am [$CuSMoO_2$]-Cluster. Es besteht die Möglichkeit, dass während der Bindung des Azids das elektrophile C-Atom des CO angreift und zur Bildung des Cyanat-Ions (NCO^-) führt. Die verhältnismäßig schwache N–N-Bindung der „Azid *moiety*" (die Verbindung zwischen dem N-Atom in der Mitte und dem N-Atom, das zum Metallatom koordiniert ist) verursacht die Umwandlung des N_3^- mit CO zum NCO^- (Ziolo *et al.* 1972). Tatsächlich wurde die CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von Cyanat und Elektronen-Donoren wie z.B. H_2, CO oder Dithionit inaktiviert. Cyanat hat in Abwesenheit von Elektronen-Donoren keine Wirkung auf die CO-Dehydrogenase (Kap. 3.4.6.3, Abb. 3-22).

Die Kristallstruktur der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase zeigt, dass der µ-Sulfido-Ligand und das Kupferatom im aktiven Zentrum fehlen (Kap. 3.4.6.1, Abb. 3-17 und 3-18). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem der Cyanid-behandelten CO-Dehydrogenase. Das Mo-(+V)-slow-ESR-Signal der Azid/CO-inaktivierten CO-Dehydrogenase entsprach ebenfalls der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase (Kap. 3.4.6.2, Abb. 3-19). Angenommen, dass wie oben erklärt, NCO^- gebildet wird, musse es weiter zu Cyanid reduziert werden. Das so gebildete Cyanid kann sehr leicht sowohl die µ-Sulfido-Liganden als auch die Cu-Atome aus dem aktiven Zentrum der CO-Dehydrogenase entfernen. Dieser Reaktionen lassen sich wie folgt darstellen:

$$N_3^- + CO \longrightarrow NCO^- + N_2$$

$$NCO^- + 2\,e^- + 2\,H^+ \longrightarrow CN^- + H_2O$$

$$Mo{=}S + CN^- + H_2O \longrightarrow Mo{=}O + SCN^- + 2\,e^- + 2\,H^+$$

Die biochemischen Untersuchungen zeigten, dass sich ca. 75% der Kupferatome noch im Enzym befinden mussten (Kap. 3.4.6, Tabelle 3-4). Die Kristallstruktur- und ESR-Untersuchungen zeigen jedoch eindeutig, dass im aktiven Zentrum der Sulfido-Ligand und das Kupferatom fehlen. Die Frage, wo das Kupferatom geblieben ist, kann zur Zeit noch nicht klar beantwortet werden.

4.1.5 Azid-Reduktionsaktivität in Gegenwart von inaktiver CO-Dehydrogenase

Es konnte gezeigt werden, dass für die Azid-Reduktion eine CO-Dehydrogenase mit intaktem [$CuSMoO_2$]-Cluster unbedingt notwendig ist. Durch Cyanid-Behandlung wurden cyanolysierbarer Schwefel und cyanolysierbares Kupfer aus dem Enzym entfernt (Kap. 3.4.5.1; Abb. 3-13). Kristallographische Untersuchungen zeigen, dass nach Entfernung der Cu-Atome und der µ-Sulfido-Liganden vom zweikernigen aktiven Zentrum der Cyanid-behandelten CO-Dehydrogenase nur das monokernige Zentrum mit drei O-Liganden übrig blieb (Einleitung, Abb. 1-4A) (Dobbek *et al*. 2002). Die inaktive CO-Dehydrogenase, die aus rekombinantem *O. carboxidovorans* OM5-12/pJRDMSL isoliert wurde, zeigte ebenfalls keine Azid-Reduktionsaktivität. Dieses Enzym enthält das gleiche aktive Zentrum wie die Cyanid-gehemmte CO-Dehydrogenase und wurde als L_2MoO_3 bezeichnet (Ferner 2001). Die CO-Dehydrogenase mit defektem katalytischen Zentrum kann noch durch Dithionit reduziert werden. Die Zugabe von Dithionit zu inaktiver rekombinanter CO-Dehydrogenase führte genauso wie beim aktiven Enzym zu einer Absorptionsabnahme im Bereich von 370 bis 650 nm (Ferner 2001). Theoreisch könnte dieses Enzym eigentlich Azid reduzieren, weil andere Kofaktoren (FAD, 2Fe-2S I, 2Fe-2S II) funktionsfähig geblieben waren und die Elektronen weiter auf Azid übertragen werden konnten. Die Vorausgesetzung dafür ist, dass für die Azid-Reduktion kein intaktes [$CuSMoO_2$]-Cluster erforderlich ist. Der experimentelle Befund zeigte, dass die CO-Dehydrogenase mit defektem [$CuSMoO_2$]-Cluster nicht in der Lage ist, Azid zu reduzieren. Dieses Ergebnis ist ein eindeutiger Hinweis, dass für die Azid-Reduktion die CO-Dehydrogenase mit einem intakten [$CuSMoO_2$]-Cluster ausgestattet sein muss. Es lässt den Schluss zu, dass Azid am [$CuSMoO_2$]-Cluster bindet und dort reduziert wird.

Der genaue Ort der Azid-Reduktion im [$CuSMoO_2$]-Cluster wurde weiter durch n-Butylisocyanid-Inaktivierung geklärt. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die CO-Dehydrogenase, die mit n-Butylisocyanid gehemmt war, keine Azid-Reduktionsaktivität zeigte (Kap. 3.4.5.2, Abb. 3-14). Im Gegensatz zu der Cyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase blieb bei der n-Butylisocyanid-inaktivierten CO-Dehydrogenase die Struktur des zweikernigen Zentrums, des [$CuSMoO_2$]-Clusters intakt. Während das C-Atom des n-Butylisocyanids am µ-Sulfido-Ligand und an der Hydroxygruppe des Mo gebunden wurde, band das N-Atom des n-Butylisocyanids am Cu (Einleitung, Abb. 1-4B) (Dobbek *et al.* 2002).

Obwohl das Enzym einen vollständigen [$CuSMoO_2$]-Cluster enthält, ist es trotzdem nicht in der Lage, Azid zu reduzieren. Durch die Bindung des n-Butylisocyanids ändert sich die Struktur des [$CuSMoO_2$]-aktiven Zentrums, z.B. vergrößert sich der Abstand zwischen Mo und Cu von 3,74 Å auf 5,07 Å (Dobbek *et al*. 2002). Die Inaktivierung ist irreversibel. Das Enzym zeigt keine Affinität mehr zu CO oder Azid. Es ist auffallend, dass unabhängig davon, ob der [$CuSMoO_2$]-Cluster aus dem Enzym entfernt oder inaktiviert wurde, die CO-Oxidations- und Azid-Reduktiosaktivitäten fehlten. Daher ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass die beiden Aktivitäten am [$CuSMoO_2$]-Cluster an der gleichen Stelle stattfinden. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die CO-Dehydrogenase, die durch gleichzeitige Anwesenheit von Azid und CO inaktiviert wurde, auch die oben genannten beiden Aktivitäten verlor (Kap. 3.4.6). Es ist deshalb davon auszugehen, dass sowohl für die Azid-Reduktion als auch für die CO-Oxidation eine CO-Dehydrogenase mit funktionsfähigem [$CuSMoO_2$]-Cluster unbedingt nötig ist.

Enzympräparationen, die unterschiedliche CO-Oxidationsaktivität besitzen, zeigen immer eine Korrelation zwischen den CO-Oxidations- und den Azid-Reduktionsaktivitäten.

Die Ursache für die unterschiedlichen CO-Oxidationsaktivitäten liegt daran, dass die Enzympräparationen eine Mischung aus unterschiedlichen CO-Dehydrogenase-Spezies enthalten, deren Bandbreite von voll funktionsfähig bis hin zu komplett funktionsuntüchtig mit defektem [$CuSMoO_2$]-Cluster reicht (Ferner 2001, Gnida *et al.* 2003). Das voll aktive Enzym muss zwei mol Kupfer,

zwei mol Schwefel und zwei mol Molybdän pro mol Enzym enthalten. In der Regel enthält das funktionsuntüchtige native Enzym den vollen Gehalt an Molybdän und Schwefel, jedoch schwankt je nach Aktivitätsgrad der Cu-Anteil stark. CO-Dehydrogenase, die kein Cu im aktiven Zentrum besitzt, kann weder die CO-Oxidation noch die Azid-Reduktion durchführen (Kap. 3.4.5.1; Abb. 3-13). Für beide Aktivitäten ist der Cu-Gehalt im [$CuSMoO_2$]-Cluster entscheidend. Die beiden Aktivitäten erreichen ihr Maximum, wenn 2 mol Cu pro mol Enzym vorhanden sind (Kap. 3.4.7, Abb. 3-24). CO-Dehydrogenase, die den vollen stöchiometrischen Gehalt an [$CuSMoO_2$]-Cluster aufweist, zeigt für die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* 21.5 µmol min^{-1} mg^{-1} Oxidations- und 54 nmol min^{-1} mg^{-1} Azid-Reduktionsaktivitäten. Der Vergleich beider Aktivitäten zeigt deutlich, dass die bevorzugte Aktivität der CO-Dehydrogenase die Oxidation des Substrats (CO) und nicht die Reduktion des Substrats (N_3^-) ist. Setzt man die Oxidationsaktivität auf 100%, dann beträgt die Reduktionsaktivität etwa 0,26%. Die CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* verhält sich ähnlich, die Reduktionsaktivität ist etwa 0,41% der Oxidationsaktivität.

Santiago und Meyer (1991) berichteten, dass die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* in der Lage ist, H_2 zu bilden und die Wasserstoff-bildungsaktivität 0,4% der Oxidationsaktivität betrug. Wasserstoffbildungs- und in dieser Arbeit nachgewiesene Azid-Reduktionsaktivität sind vergleichbar.

4.1.6 Reoxidation der reduzierten CO-Dehydrogenase durch Azid

Während der Oxidation von CO wird das Enzym selbst durch CO reduziert; dabei werden CO_2, zwei Protonen und zwei Elektronen gebildet. Die Elektronen fließen über Fe-S-Zentren weiter zum FAD und anschließend gelangen sie an Elektronenakzeptoren (Dobbek *et al*. 1999, Gremer 2000). *In vivo* werden die gebildeten Elektronen über den membrangebundenen physiologischen Elektronenakzeptor Cytochrom b_{561} in die CO-insensitive Atmungskette eingeschleust (Jacobitz und Meyer 1989, Meyer *et al.* 1990, Meyer *et al*. 1993c).

Durch CO reduzierte CO-Dehydrogenase bleibt nach Entfernung von CO in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors im reduzierten Zustand. In dieser Arbeit (Kap.3.4.8) gelang es zu zeigen, dass unter Heliumatmosphäre die durch CO reduzierte CO-Dehydrogenase in Gegenwart von Azid in der Lage war, wieder zu oxidieren und die Elektronen auf Azid zu übertragen. Das Enzym war innerhalb

von 1 h wieder fast vollständig oxidiert (Kap. 3.4.8, Abb. 3-26A), während das Azid zu Ammonium reduziert wurde. Die Absorptionszunahme bei 450 nm zeigte deutlich, dass FAD die Elektronen weiter auf Azid übertragen und sich somit reoxidiert hat. Ohne Azid als Elektronenakzeptor (Kontrollansatz) blieb das Enzym im reduzierten Zustand (Abb. 3-26B).

4.1.7 Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Azid-Reduktion im [CuSMoO$_2$]-Cluster der CO-Dehydrogenase

Die CO-Dehydrogenase, das Schlüsselenzym für die Umwandlung von CO zu CO_2 ist auch in der Lage, sowohl die H_2-Oxidation als auch die Bildung von H_2 zu katalysieren. Interessanterweise wurde die Oxidation von CO und H_2 an der gleichen Stelle, dem [CuSMoO$_2$]-Cluster katalysiert, der als aktives Zentrum der CO-Dehydrogenase identifiziert wurde.

Die gesamten biochemischen Untersuchungen der Azid-Reduktion durch CO-Dehydrogenase zeigten ebenfalls, dass die Azid-Reduktion am [CuSMoO$_2$]-Cluster stattfindet. Die CO-Dehydrogenase mit defektem aktiven Zentrum, in dem Sulfido-Ligand und Kupferatom durch Cyanidbehandlung entfernt wurden, ist nicht in der Lage, Azid zu reduzieren. Ebenso konnte die n-Butylisocyanid-gehemmte CO-Dehydrogenase, die einen intakten [CuSMoO$_2$]-Cluster mit gebundenem n-Butyisocyanid enthält, Azid nicht reduzieren. Für die Azid-Reduktionsaktivität ist eine aktive CO-Dehydrogenase mit intaktem [CuSMoO$_2$]-Cluster absolut notwendig. Dies spiegelt die Tatsache wieder, dass nur die CO-Dehydrogenase, die CO-Oxidationsaktivität besitzt, in der Lage ist, Azid zu reduzieren. Diese Daten wurden durch Untersuchungen, die mit Enzympräparationen unterschiedlicher CO-Dehydrogenase-Aktivität durchgeführt wurden, gestütz. Die beiden Aktivitäten sind abhängig vom Cu-Gehalt des aktiven Zentrums (Kap. 3.4.7, Abb. 3-24).

Die CO-Dehydrogenase ist in der Lage, in Anwesenheit von H_2 Azid zu reduzieren während die CO-Oxidationsaktivität intakt bleibt. Die H_2-Oxidationsstelle wurde bereits im [CuSMoO$_2$]-Cluster modelliert (Dobbek 2000). Dagegen hat das Enzym in Anwesenheit von CO und Azid die Oxidations- und Reduktionsaktivitäten verloren. Vermutlich wurde hier Cyanat gebildet, das am [CuSMoO$_2$]-Cluster bindet und wieder zu Cyanid reduziert wird. Die Folge war, dass das Enzym inaktiviert wurde. Die Kristallstruktur der Azid/CO-inaktivierten

CO-Dehydrogenase zeigt, dass die µ-Sulfido-Liganden und Cu-Atome aus dem aktiven Zentrum fehlten (Kap. 3.4.6, Abb. 3-17, Abb. 3-18). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die Azid-Reduktion am [$CuSMoO_2$]-aktiven Zentrum stattfinden muss (Abb. 4-3).

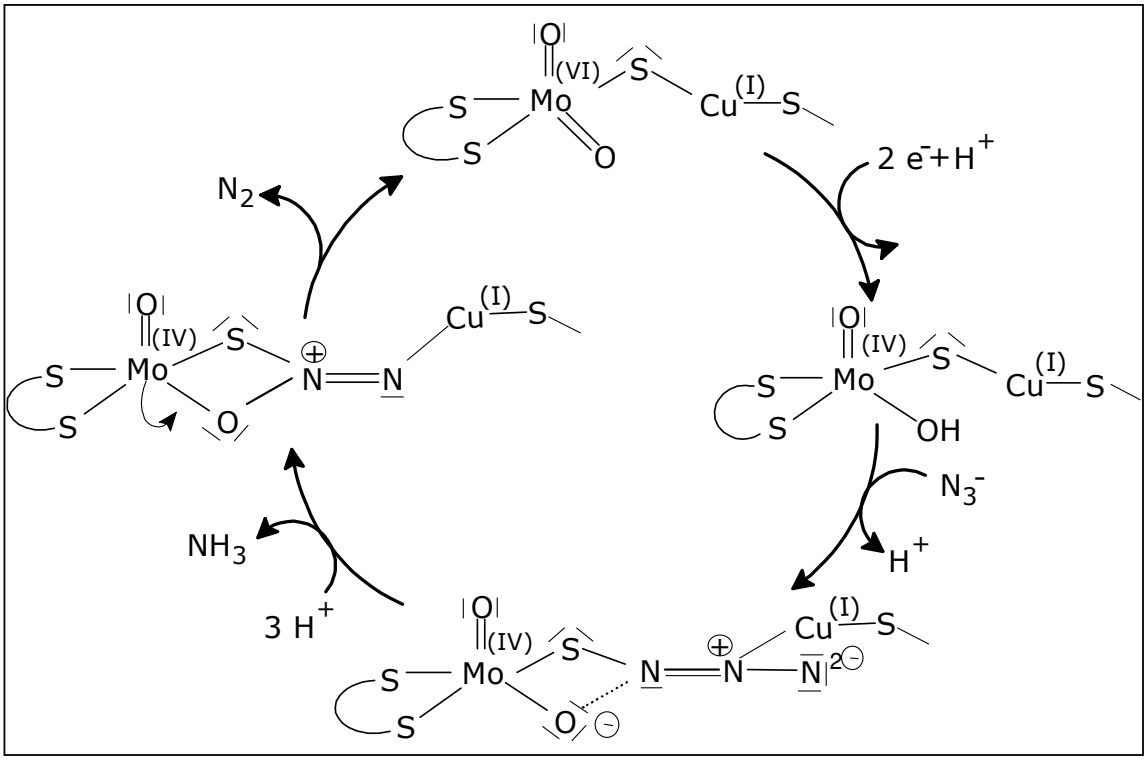


Abb. 4-3 Der hypothetische Reaktionsmechanismus für die Azid-Reduktion am [$CuSMoO_2$]-Cluster der CO-Dehydrogenase

Das Molybdän des [$CuSMoO_2$]-Clusters werden zunächst durch Dithionit oder H_2 reduziert (Mo(+VI) → Mo(IV)). Azid wird sehr wahrscheinlich am reduzierten [$CuSMoO_2$] gebunden. Während der Einführung von drei Protonen wird dieser Azidkomplex instabil und Ammonium und Distickstoff werden freigesetzt. Die Freisetzung von der Produkten reoxidiert den [$CuSMoO_2$]-Cluster (Mo(+IV) →Mo(VI)) (siehe Text).

Zunächst müsste die Interaktion zwischen Metall-Kation (reduzierter Zustand der CO-Dehydrogenase) und Azidanion erfolgen. Im reduzierten Zustand wird laut Röntgenabsorptionsspektroskopie die Distanz zwischen den beiden Metallatomen Mo(+IV) und Cu(I) von 3,70 Å auf 4,23 Å vergrößert (Gnida *et al*. 2003), bzw. laut Kristallstruktur von 3,74 Å auf 3,93 Å (Dobbek *et al*. 2002). Unter diesem

veränderten großen Abstand könnte es möglich sein, dass das Azidmolekül am [$CuSMoO_2$]-Cluster andockt. Hier wird wahrscheinlich zuerst ein Übergangskomplex zwischen Cu(I) und Mo(+IV) durch Sulfido-Ligand und Mo-Oxo-Gruppe gebildet. Azid ist ein vielseitiger Ligand (versatiler Ligand), der mit den Übergangsmetallatomen in unterschiedlichen Koordinationstypen gebunden werden kann (Ruiz *et al*. 1998). Während der Einführung von drei Protonen wird dieser Azidkomplex instabil und die Produkte Ammonium und Distickstoff werden freigesetzt (Schöllhorn und Burris 1967). Bei dieser Reaktion wird die reduzierte CO-Dehydrogenase wieder reoxidiert ((Mo(+IV) $\rightarrow$ Mo(+VI)).

4.2 Reduktion von Nitrit und Nitrat zu Ammonium durch die CO-Dehydrogenase

Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase, als [$CuSMoO_2$] bezeichnet, stellt sich als eine neue Familie der Molybdoenzyme vor (Gnida *et al*. 2003). Es ist bewiesen, dass die CO-Dehydrogenase außer der Azid-Reduktion weitere reduktive Aktivitäten besitzt. So wurde Nitrit durch CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von Dithionit als Elektronen-Donor zu Ammonium reduziert. Frühere Experimente hatten gezeigt, dass unter denitrifizierenden Bedingungen die CO-Dehydrogenase Nitrat zu Nitrit reduzieren konnte (Frunzke and Meyer 1990). Der Mechanismus der Nitrit- und Nitrat-Reduktion am [$CuSMoO_2$]-Cluster konnte wie bei der Azid-Reduktion durch Inaktivierung der CO-Dehydrogenase geklärt werden. Cyanid-behandeltes Enzym, das den μ-Sulfido-Ligand und das Kupferatom aus dem [$CuSMoO_2$]-Cluster verloren hatte, war nicht in der Lage, Nitrit zu Ammonium zu reduzieren. Überraschenderweise konnte dieses Enzym aber mit defektem [$CuSMoO_2$]-Cluster Nitrat zu Nitrit reduzieren. Die unterschiedlichen Bindungs- und Reduktionsstellen zwischen Nitrit und Nitrat konnten in dieser Arbeit durch biochemische Untersuchungen geklärt werden. Die Nitrit-Reduktion zeigte eine eindeutige Abhängigkeit vom [$CuSMoO_2$]-Cluster. Im Gegensatz dazu benötigt die Nitrat-Reduktion kein intaktes [$CuSMoO_2$]-Cluster. Die CO-Oxidationsaktivität der CO-Dehydrogenase war durch Nitrit und Nitrat nicht gehemmt (Kap. 3.3, Abb. 3-5).

4.2.1 Reduktion von Nitrit zu Ammonium durch CO-Dehydrogenase

Das aktive Zentrum der CO-Dehydrogenase besteht aus einem bimetallischen [$CuSMoO_2$]-Cluster, das ein erstes Beispiel für die Kombination aus zwei Metallen in einer katalytischen Einheit ist (Gnida *et al*. 2003). Die Fähigkeit dieses Enzyms Azid zu reduzieren, das eigentlich ein Inhibitor vieler Kupferenzymaktivitäten ist, ist ein Beweis dafür, dass die Eigenschaften des [$CuSMoO_2$]-Clusters der CO-Dehydrogenase mit denen der Kupferproteine nicht übereinstimmt. In dieser Arbeit konnte erstmal gezeigt werden, dass die CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* Nitrit zu Ammonium mit der Stöchiometrie 1:1 reduzieren (Kap. 3.5.2, Abb. 3-27). Die Ammoniumbildung konnte nur in Gegenwart von Enzym, Dithionit und Nitrit stattfinden.

Die Nitrogenase, die als mehrkerniges Molybdoenzym bezeichnet wird, kann auch Nitrit zu Ammonium katalysieren (Vaughn und Burgess 1989). Das Produkt der Nitrit-Reduktion durch CO-Dehydrogenase (zweikerniges Molybdoenzym) und durch Nitrogenase (mehrkerniges Molybdoenzym) ist allerdings unterschiedlich zu dem der Xanthin-Oxidoreduktase, die zu den einkernigen Molybdoenzymen gehört. Es gibt zahlreiche Untersuchungen über die Nitrit-Reduktionsaktivität der Xanthin-Oxidoreduktase (Harrison 2002). Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Nitrit zu NO. Interessanterweise wurde das Enzym durch NO inaktiviert, was deshalb als Selbstmord-Inaktivierung bezeichnet wurde (Godber *et al*. 2001). Der Sulfido-Ligand, der zum Mo koordiniert, wurde durch NO entfernt, wodurch die Xanthin-Oxidoreduktase sowohl ihre Nitrit-Reduktions- als auch Xanthin-Oxidations-Aktivitäten verlor (Ichimori *et al.* 1999, Godber *et al*. 2001).

In klassischen Systemen wird Nitrit durch unterschiedliche Nitritreduktasen entweder zu NO oder Ammonium reduziert. Die monomeren Multihämenzyme Cytochrom *c* Nitritreduktasen aus *Sulfurospirillum deleyianum* katalysieren die Reduktion von Nitrit zu Ammonium. Dabei werden sechs Elektronen gebraucht (Schumacher *et al.* 1991).

$$NO_2^- + 6\ e^- + 8\ H^+ \longrightarrow NH_4^+ + 2\ H_2O$$

Die homodimeren *cd*1-Nitritreduktasen, die je Untereinheit Häm *c*- und Häm *d*1-Kofaktor tragen, katalysieren die Einelektronen-Reduktion von Nitrit zu

Stickstoffmonoxid (Moir *et al*. 1993). Die gleiche Reaktion wird auch durch kupferabhängige Enzyme katalysiert, die aus Homotrimeren aufgebaut sind und je Untereinheit ein Typ I- und ein Typ II-Kupfer enthalten (Godden *et al.* 1991).

Obwohl weder die CO-Dehydrogenase noch die Nitrogenase zu den Hämenzymen gehören, sind beide Enzyme in der Lage, die Reduktion von Nitrit zu Ammonium zu katalysieren. Genauso reduziert auch Xanthin-Oxidoreduktase, die entweder Kupfer oder Häm enthält, Nitrit zu NO. Eigentlich sollte das Produkt der von der CO-Dehydrogenase katalysierten Nitrit-Reduktion NO sein, wenn die CO-Dehydrogenase in ihren Eigenschaften mit dem Kupferprotein oder der Xanthin-Oxidase-Familie übereinstimmt.

Die durch CO-Dehydrogenase katalysierte ungewöhnliche Nitrit-Reduktion könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Funktionsweisse des [$CuSMoO_2$]-Clusters nahe zum mehrkernigen FeMoco-Nitrogenase liegt und nicht zu der Kupferzentrum- oder einkernigen Xanthin-Oxidoreduktase gehört. Allerdings ist das Nitogenase-System komplexer, da es aus einem Fe-Protein (Dinitrogenase-Reduktase) und einem MoFe-Protein (Dinitrogenase) besteht. Im MoFe-Protein kommen ein P-Cluster und der FeMoco vor. Am MoFe-Protein findet die Substratreduktion statt. Im Gegenzatz dazu ist in der CO-Dehydrogenase nur ein katalytisch aktives Zentrum „[$CuSMoO_2$]-Cluster" vorhanden. Die CO-Dehydrogenase und die Nitrogenase haben noch eine gemeinsame Eigenschaft; beide Enzyme katalysieren die Reduktion von Azid.

4.2.2 Reduktion von Nitrat durch CO-Dehydrogenase

Nitrat wurde durch CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von reduziertem Methylviologen als Elektronen-Donor zu Nitrit reduziert. Die allgemeinen Reaktionsbedingungen für die Nitrat-Reduktion, wie z.B. die pH-Abhängigkeit und geeignete Elektronen-Donoren außer NADH, sind vergleichbar mit der klassischen Nitratreduktase. Die CO-Dehydrogenase ist nicht in der Lage, NADH als Elektronen-Donor für die Nitrat-Reduktion zu nutzen. Es wurde auch nachgewiesen, dass die aktive CO-Dehydrogenase in Anwesenheit von H_2 oder CO, die als Elektronen-Donor fungieren, Nitrat zu Nitrit reduziert (Kap. 3.6.1, Abb.3-32).

Die möglichen Reaktionen sind wie in der folgenden Gleichung beschrieben:

$$NO_3^- + CO \longrightarrow CO_2 + NO_2^-$$

$$NO_3^- + H_2 \longrightarrow NO_2^- + H_2O$$

$$NO_3^- + 2\ e^- + 2\ H^+ \longrightarrow NO_2^- + H_2O$$

Die CO-Dehydrogenase zeigte allerdings eine sehr geringe Affinität zu Nitrat; der K_m-Wert mit 365 mM war sehr hoch (Kap. 3.6.2, Abb. 3-33). Eine ähnliche Situation wurde bei der Xanthin-Oxidoreduktase beschrieben. Die einkernige Xanthin-Oxidoreduktase ist auch in der Lage, in Anwesenheit von Xanthin oder NADH Nitrat in Nitrit umzuwandeln (Doel *et al*. 2001, Godber *et al.* 2001, Li *et al.* 2003). Der hohe K_m-Wert dieser nicht klassischen Nitratreduktase zeigte, dass diese Reaktion keinerlei physiologische Bedeutung hat. Die Gemeinsamkeit des Nitrat-Reduktionsverhaltens zwischen CO-Dehydrogenase und Xanthin-Oxidoreduktase beruht sehr wahrscheinlich nur auf dem Molybdänzentrum. Die Koordination des Molybdänzentrums der CO-Dehydrogenase und der Xanthin-Oxidoreduktase unterscheiden sich in die Position der Oxo-Gruppe und des cyanolisierbaren Schwefels. Der weitere entscheidende Unterschied ist, dass der cyanolysierbare Schwefel der CO-Dehydrogenase neben der Bindung zum Molybdän eine weitere kovalente Bindung mit dem Kupferatom ausbildet. Anzunehmen ist, dass die Nitrat-Reduktionsaktivität nur ein Molybdänzentrum benötigt. Die beiden Enzyme enthalten MCD als Kofaktor anstatt MGD wie bei den klassischen Nitratreduktasen. Dies könnte einer der Gründe dafür sein, dass die Affinität und die Nitrat-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase und Xanthin-Oxidoreduktase sehr gering sind. Die Grundstruktur des Kofaktors der Nitratreduktase ist in Eukaryoten Molybdopterin-Monononukleotid (MPT) und in Prokaryoten Molybdopterin-Guanosin-Dinukleotid (MGD)(Romão *et al.* 2001).

4.2.3 Nitrit-Reduktionsaktivität in Gegenwart von inaktiver CO-Dehydrogenase

Durch Anwendung von Inhibitoren wie Cyanid ist es gelungen, die genaue Reduktionsstelle der Nitrit-Reduktion zu lokalisieren. Nach der Cyanid-Behandlung sind aus dem [$CuSMoO_2$]-Cluster der Sulfido-Ligand und das Kupferatom entfernt. Da die CO-Dehydrogenase nicht mehr in der Lage ist, Nitrit

zu Ammonium zu reduzieren (Kap. 3.5.4.1), ist es anzunehmen, dass für die Nitrit-Reduktion ein intaktes [$CuSMoO_2$]-Cluster essentiell ist und hier auch die Nitrit-Reduktion stattfindet. Es konnte auch gezeigt werden, dass das Enzym ebenfalls die Nitrit-Reduktionsaktivität verliert (Kap. 3.5.4.2), wenn der [$CuSMoO_2$]-Cluster durch die Anwendung von n-Butylisocyanid inaktiviert wird. Das n-Butylisocyanid bindet kovalent am [$CuSMoO_2$]-Cluster (Dobbek *et al*. 2002) und deshalb war höchstwahrscheinlich nicht nur die Bindungsstelle für das Substrat Nitrit sondern auch die Bindungsstelle für das Substrat CO nicht mehr zugänglich. Einen weiteren Beweis liefern unterschiedliche CO-Dehydrogenase-Präparationen, die verschiedene Aktivitäten aufwiesen. Wie bereits erwähnt (Kap. 3.5.4.3), beruht die Ursache für die Schwankungen der Enzymaktivität auf die Cu-Konzentration im Enzym. Die CO-Oxidationsaktivität ist proportional zur Cu-Konzentration. Das gleiche gilt auch für die Nitrit-Reduktionsaktivität. Ein [$CuSMoO_2$]-Cluster, das keinen stöchiometrischen Cu-Gehalt (2 mol Cu pro mol Enzym) besitzt, zeigt immer einen Aktivitätsverlust.

4.2.4 Hyphothetische Interaktion der CO-Dehydrogenase mit Nitrit: „Mechanistische Überlegung"

Der Verlust der CO-Oxidationsaktivität durch die Entfernung eines Teils des [$CuSMoO_2$]-Clusters oder durch die Bindung der Substratanalogen zu CO im [$CuSMoO_2$]-Cluster resultiert ebenfalls im Verlust der Nitrit-Reduktionsaktivität. Die Reduktion von Nitrit zu Ammonium beansprucht offensichtlich die gleiche Zusammensetzung des aktiven Zentrums, die auch zur CO-Oxidation benötigt wird. Vermutlich ist die Oxidationsstelle für CO und die Reduktionsstelle für Nitrit und Azid gleich oder sehr nahe beieinander. Der Unterschied zwischen Nitrit- und Azid-Reduktion liegt nur am Elektronenbedarf. Für die Nitrit-Reduktion werden sechs und für die Azid-Reduktion nur zwei Elektronen benötigt.

Enzyme wie die assimilatorische Nitritreduktase, die Sirohäm enthält oder wie die dissimilatorische Multihäm-Cytochrom-*c*-Nitritreduktase, benötigen auch für die Reduktion des Nitrits zu Ammonium 6 Elektronen. Während dieses Prozesses entstehen keine Übergangsprodukte wie NO oder Hydroxylamin (Einsle *et al*. 2002).

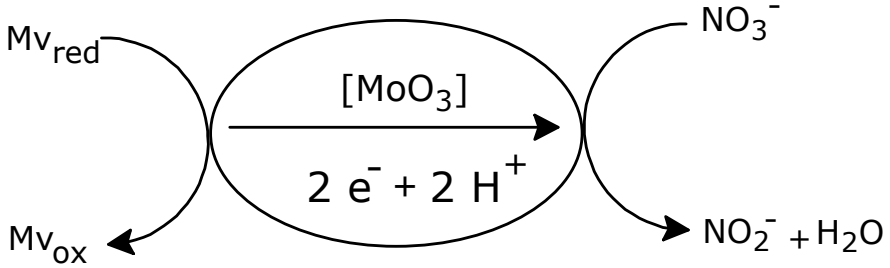
Das NO_2^- kann an Metall auf zwei verschiedene Arten binden: N-gebundene Nitro-Form and O-gebundene Nitrito-Form (Burmeister 1968). Bei der

dissimilatorischen Multihäm-Cytochrom-*c*-Nitritreduktase wurde modelliert, dass Nitrit im FeII als N-gebundene Nitro-Form vorkommt (Einsle *et al*. 2002). Eine Serie von Reduktionen und Protonationen muss passieren. Bei der Nitrit-Reduktion durch CO-Dehydrogenase ist es vorstellbar, dass an das Kupfer-Atom das NO_2^- bindet, da in der CO-Dehydrogenase ohne Cu keine Nitrit-Reduktion stattfindet. Vermutlich bindet NO_2^- in Nitro-Form an das Kupfer-Atom und wird dabei eines der O-Atom zum Sulfido-Liganden und zur äquatorialen Oxo-Gruppe des Molybdän-Zentrums koordinieren. Da in einem Redox-Zyklus vom [$CuSMoO_2$]-Cluster nur zwei Elektronen produziert werden können, sind mindestens drei Zyklen nötigt. Um ein solches Phänomen zu erklären, müssten kristallographische Untersuchungen während „des turnovers" der Nitrit-Reduktion aufgestellt werden.

4.2.5 Unabhängigkeit der Nitrat-Reduktion vom [$CuSMoO_2$]-Cluster

Für die CO-Dehydrogenase ist für die Oxidation von CO sowie für die Reduktion von Azid und Nitrit eine intaktes [$CuSMoO_2$]-Cluster essentiell. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Nitrat-Reduktion das intakte [$CuSMoO_2$]-Cluster nur eine geringe Rolle spielt.

Durch die Inaktivierung der CO-Dehydrogenase mit Cyanid kann man Sulfido-Ligand und Cu-Atom aus dem [$CuSMoO_2$]-Cluster entfernen (Dobbek *et al.* 2002). Dies führt zum Verlust der CO-Oxidationsaktivität und ist sowohl begleitet vom Verlust der Azid-Reduktion (Kap. 3.4.5.1) als auch der Nitrit-Reduktion (Kap. 3.5.4.1). Allerdings war durch die Entfernung von Sulfido-Ligand und Cu-Atom die Nitrat-Reduktionsaktivität lediglich um etw 40% vermindert.



Schema 4-2 **Hypothetischer Mechanismus der Reduktion von Nitrat durch CO-Dehydrogenase mit defektem aktivem Zentrum in Anwesenheit von Dithionit-reduziertem Methylviologen als Elektronen-Donor**

Unabhängig davon, ob das Enzym ein funktionsuntüchtiges [$CuSMoO_2$]-Cluster enthält oder ob der µ-Sulfido-Ligand und das Kupferatom durch Cyanid-Behandlung entfernt sind, ist die Nitrat-Reduktionsaktivität stets vorhanden (Schema 4-2). Anscheinend ist Cu für die Nitrat-Reduktion nicht notwendig. Diese Annahme wurde durch Experimente mit unterschiedlichen CO-Dehydrogenasen, z.B. aus *O. carboxidovorans* OM5-12/pJRDMSL bestätigt. Dieses Enzym enthält das aktive Zentrum mit drei Oxo-Liganden am Molybdän und einer fehlenden Kupfer-Modifikation am Cystein[388] (Ferner 2001). Deshalb ist diese Struktur vergleichbar mit der Struktur des aktiven Zentrums einer *in vitro* durch Cyanid inaktivierten CO-Dehydrogenase. Im rekombinanten Enzym können somit keine Elektronen aus der CO-Oxidation auf die Kofaktoren übertragen und diese reduziert werden (Ferner 2001). Diese Enzympräparationen zeigten auch Nitrat-Reduktionsaktivitäten. Dies ist ein eindeutiger Beweis, dass der intakte [$CuSMoO_2$]-Cluster für diese Aktivität keine wichtige Rolle spielt.

Die inaktive CO-Dehydrogenase konnte weder mit CO noch mit H_2 reduziert werden (Kap. 3.6.4, Abb. 3-35A). Deshalb konnte das inaktive Enzym in Anwesenheit von entweder CO oder H_2 die Nitrat-Reduktion nicht katalysieren. Die Nitrat-Reduktion durch inaktive CO-Dehydrogenase erfolgte nur mit dem durch Dithionit reduzierten Methylviologen als Elektronen-Donor. Die inaktive CO-Dehydrogenase, die FAD und [2Fe2S]- und das Molybdän-Zentrum enthält, kann noch durch Dithionit voll reduziert werden (Kap. 3.6.4, Abb. 3-35B). Daher korreliert die Nitrat-Reduktionsaktivität nicht mit der CO-Dehydrogenase-Aktivität (Kap. 3.6.4, Abb. 3-36A).

Auf Grund der Fähigkeit intaktes FAD, [2Fe2S] I und II und das Molybdänzentrum durch Dithionit reduzieren zu können, ist es möglich, dass die einkernige, inaktive CO-Dehydrogenase die Nitrat-Reduktion katalysieren kann. Die ca. 40% geringere Aktivität beruht sehr wahrscheinlich auf dem Elektronenfluss. Es ist deshalb angenommen worden, dass die Bindung und die Reduktion von Nitrat nicht am Cu-Atom stattfinden.

In intakter CO-Dehydrogenase ist die Nitrat-Reduktionsaktivität mit CO-Oxidationsaktivität nur unter den Bedingungen korreliert, wenn die Reaktion in Anwesenheit von CO (Kap. 3.6.4, Abb. 3-36B) und/oder auch in Anwesenheit von H_2 stattfindet. Dies ist erklärbar, weil unter diesen Bedingungen die Elektronen

für die Nitrat-Reduktion nur während der CO-oder H_2-Oxidation entstehen. Deshalb kann nur eine aktive CO-Dehydrogenase unter diesen Bedingungen die Nitrat-Reduktion mit CO und H_2 als Elektronen-Donoren katalysieren.

4.2.6 Hypothese der Nitrat-Reduktion durch CO-Dehydrogenase

Die CO-Dehydrogenase katalysiert in Anwesenheit von reduziertem Methylviologen die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Ein intakter zweikerniger [$CuSMoO_2$]-Cluster der CO-Dehydrogenase ist für die Nitrat-Reduktionsaktivität nicht notwendig, weil die inaktive, einkernige CO-Dehydrogenase Nitrat zu Nitrit katalysieren kann.

Durch die Reduktion der aktiven CO-Dehydrogenase mit Dithionit, CO oder H_2 ändern sich die Abstände der Atome im aktiven Zentrum. Eine weitere Änderung ist die äquatoriale Oxogruppe des Molybdäns zur Hydroxygruppe (Gnida *et al.* 2003). Bei der Reduktion von Nitrat zu Nitrit kann man erwarten, dass diese durch die nukleophilische Ersetzung der OH-Gruppe eingeleitet werden könnte. Durch die Bindung des Nitrats am reduzierten Mo entsteht eine schwache N–O Bindung, wodurch die Freisetzung vom Nitrit (als Produkt) erleichtert wird.

Es gibt noch keine Daten darüber, ob in der inaktiven CO-Dehydrogenase die äquatoriale Oxo-Gruppe des Molybdäns durch Reduktion mit Dithionit zu Hydroxygruppe verändert ist. In diesem Fall könnte die inaktive, einkernige CO-Dehydrogenase die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysieren. Wahrscheinlich ist der Nitrat-Reduktionsmechanismus ähnlich wie bei dem einkernigen Molybdoenzym Xanthin-Oxidoreduktase. Es ist nachgewisen, dass die Xanthin-Oxidationsaktivität während der Nitrat-Reduktion vollständig erhalten bleibt.

Wenn die Nitrat-Reduktion durch nukleophile Ersetzung der SH-Gruppe vom reduzierten Molybdän-Zentrum katalysiert würde, hätte dies eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge (Godber *et al*. 2001). Die Fähigkeit des fehlenden Sulfido-Liganden am katalytischen Zentrum der inaktiven CO-Dehydrogenase Nitrat zu reduzieren zeigt, dass die nukleophile Ersetzung des Sulfido-Liganden ausgeschlossen ist. Abb. 4-4 zeigt die mögliche Nitrat-Reduktion durch CO-Dehydrogenase.

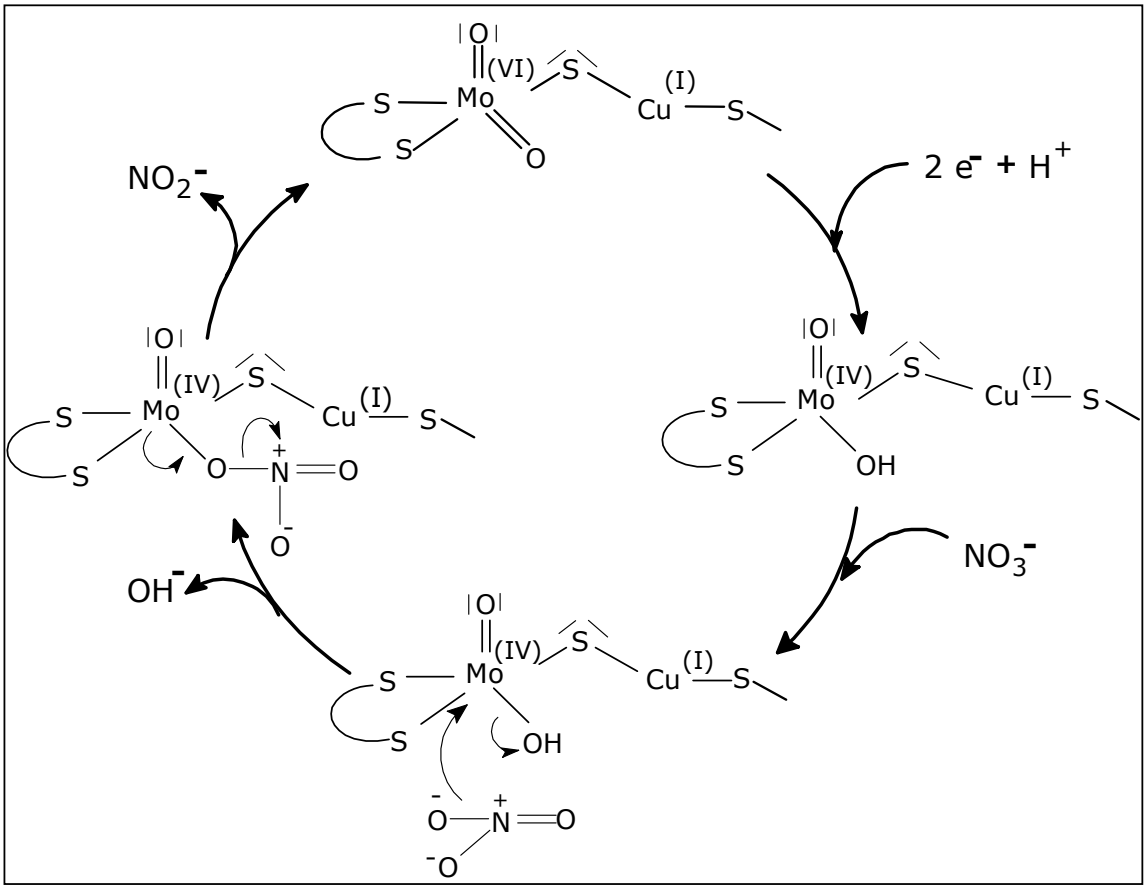


Abb. 4-4 Hypothetischer Mechanismus der Interaktion von Nitrat am Molybdänatom der CO-Dehydrogenase

Die CO-Dehydrogenase wird durch Dithionit plus Methylviologen reduziert (Mo(+VI) →Mo(IV)). Nitrat wird möglicherweise direkt an das reduzierte Molybdän-Zentrum koordiniert. Dies könnte durch die nukleophilische Ersetzung der OH-Gruppe eingeleitet werden. Dadurch entsteht eine schwache N–O Bindung und die Freisetzung von Nitrit (als Produkt) wird erleichtert. Die Freisetzung von Nitrit reoxidiert das Molybdänzentrum (Mo(+IV) →Mo(VI)).

4.3 Die katalytisch kompetente CO-Oxidations- und Azid-, Nitrit- und Nitrat-Reduktionsaktivität der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus*

Bislang ist die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* die am besten charakterisierte und untersuchte der carboxidotrophen Bakterien. Die Daten der biochemischen Untersuchungen der CO-Dehydrogenase aus

S. thermoautotrophicus wurden deshalb mit der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* verglichen.

Die CO-Dehydrogenase aus dem Gram-positiven, thermophilen, CO-autotrophen Bakterium *S. thermoautotrophicus* ist ein Dimer-Heterotrimer $(LMS)_2$, das etwa 280 kDa Molekularmasse hat. Die N-Termini der M- und S-Untereinheit zeigen Homologien zu anderen CO-Dehydrogenasen carboxidotropher Bakterien, sowie zu weiteren Proteinen der Molybdän-Hydroxylase-Familie (Heck, 2000). Es wurde nachgewiesen, dass die katalytischen Eigenschaften der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* keine großen Unterschiede zur CO-Dehydrogenase aus den Gram-negativen, mesophilen und heterotropen Bakterium *O. carboxidovorans* aufweisen. Außer bei Selen ist der Metallgehalt des Enzyms aus *S. thermoautotrophicus* (Tab. 3-7) ähnlich dem bei *O. carboxidovorans*. Die Verhältnisse FAD : Fe : Mo : Cu lagen nahezu bei 2 : 8 : 2 : 2 mol per mol Enzym. Es ist deshalb vorstellbar, dass CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* ähnliche katalytische Eigenschaften der Azid-, Nitrit- und Nitrat-Reduktion zeigt, wie die CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans*.

Im Vergleich zu der maximalen spezifischen Aktivität der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* ist die maximale spezifische Aktivität der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* etwas geringer. Eine Enzympräparation mit ca. 11,5 U spezifischer Aktivität konnte aber durch CO vollständig reduziert werden. Die UV/vis- und ESR-Spektren ähneln den Spektren der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans,* die eine spezifische Aktivität von 21,5 U aufwies (Kap. 3.4.7, Abb. 3-23B, Abb. 3-25). Die CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* enthält trotz etwas geringerer spezifischer Aktivität die vollständige Kupfer- und Molybdänkonzentration.

Durch Cyanid-Behandlung wurde das Enzym aus *S. thermoautotrophicus* inaktiviert; dabei konnte cyanolisierbarer Schwefel und cyanolisierbares Kupfer nachgewiesen werden (Kap. 3.4.5.1). Eine weitere Ähnlichkeit ist die Inaktivierung des Enzyms durch n-Butylisocyanid. Die CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* wurde auch durch geringe Konzentrationen von n-Butylisocyanid gehemmt (Kap. 3.4.5.2). Das gehemmte Enzym zeigte keine Azid-Reduktionsaktivität. Es wurde deshalb angenommen, dass die katalytische Kompetenz der CO-Oxidation auch wichtig für die Azid-Reduktion ist.

Enzympräparationen der CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* stellten ebenso wie bei *O. carboxidovorans* eine Mischung aus unterschiedlichen Spezies dar. Solches Verhalten wird häufig auch in anderen einkernige Molybdo-Enzymen wie z.B. Xanthin-Oxidoreduktase, beschrieben (Bray 1975). Jedoch ist die Ursache dafür unterschiedlich. Bei der Xanthin-Oxidoreduktase ist die Anwesenheit des Sulfido-Liganden der entscheidende Faktor. Für CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* ist das Cu-Atom ausschlaggebend. In der Enzymspräparation mit geringeren CO-Dehydrogenase-Aktiviäten (2 U) kamen oft der cyanolysierbare Schwefel (1,7 mol per mol Enzym), bzw. die Sulfido-Liganden in höheren Konzentrationen vor. Sie waren mit denen des voll aktiven Enzyms vergleichbar. Jedoch fiel der Kupfergehalt geringer aus (0,8 mol per mol Enzym) als im aktiven Enzym (Kap. 3.4.7). Der Kupfergehalt des Enzyms steht in Korrelation mit der CO-Oxidation und der Azid- und Nitrit-Reduktion. Diese Eigenschaft ist vergleichbar mit der der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* (Kap. 3.4.7 und 3.5.4.3).

Aus den physiologischen und biochemischen Untersuchungen u.a. der Struktur der Untereinheiten, des Metallgehalts, des cyanolysierbaren Schwefels, der Reaktionen mit n-Butylisocyanid und Cyanid, der CO-Oxidation und der Azid-, Nitrit- und Nitrat-Reduktion, ist deutlich geworden, dass die beiden CO-Dehydrogenasen aus *O. carboxidovorans* und *S. thermoautotrophicus* sehr ähnlich und vergleichbar sind. Aus diesem Grund ist es berechtigt zu sagen, dass höchst wahrscheinlich das katalytische Zentrum der beiden CO-Dehydrogenasen identisch ist.

5 Zusammenfassung

❖ Es wurde in dieser Arbeit entdeckt, dass die aerobe CO-Dehydrogenase in der Lage ist, alternative Substrate wie Azid, Nitrit und Nitrat zu reduzieren. CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans* und *Streptomyces thermoautotrophicus* führen die Reduktionsreaktion wie folgt durch:

➲ Azid wird zu Ammonium und molekularem Distickstoff reduziert.

$N_3^- + 2\ e^- + 3\ H^+ \rightarrow NH_3 + N_2$

➲ Nitrit wird zu Ammonium reduziert.

$NO_2^- + 6\ e^- + 7\ H^+ \rightarrow NH_3 + 2H_2O$

➲ Nitrat wird zu Nitrit reduziert.

$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$

❖ Das katalytische $[CuSMoO_2]$-Zentrum der CO-Dehydrogenase ist verantwortlich für die Reduktion von Azid und Nitrit. Ohne einem aktiven katalytischen-Zentrum findet die Reduktion von Azid und Nitrit nicht statt.

❖ Die CO-Dehydrogenase katalysiert gleichzeitig die H_2-Oxidation und die Azid-Reduktion. Die während der H_2-Oxidation entstehenden Elektronen werden für die Azid-Reduktion verwendet.

➲ $H_2 + N_3^- + H^+ \rightarrow NH_3 + N_2$

Oxidation und Reduktion finden mit größter Wahrscheinlichkeit am katalytisch aktiven $[CuSMoO_2]$-Cluster der CO-Dehydrogenase statt.

❖ Die gleichzeitige Anwesenheit von CO und Azid hemmt die CO-Oxidations- und Azid-Reduktionsaktivität.

❖ Die Kristallstruktur zeigt, dass in Gegenwart von CO und Azid aus dem [CuSMoO2]-Cluster das Cu-Atom und der Sulfidoligand entfernt sind.

❖ Die Nitrat-Reduktion der CO-Dehydrogenase ist unabhängig vom katalytisch aktiven $[CuSMoO_2]$-Cluster.

- Die CO-Dehydrogenase aus *S. thermoautotrophicus* zeigt ähnliche Oxidations- und Reduktionsaktivitäten.

- Die CO-Dehydrogenase aus dem thermophilen, Gram-positiven Bakterium *S. thermoautotrophicus* reagiert sehr ähnlich wie die CO-Dehydrogenase aus dem mesophilen, Gram-neagtiven Bakterium *O. carboxidovorans.*

6 Summary

- In this work it has been discovered that the aerobic CO dehydrogenase is able to reduce alternative substrates such as azide, nitrite and nitrate. CO dehydrogenases from *Oligotropha carboxidovorans* and *Streptomyces thermoautotrophicus* reduce the above mentioned substrates according to following equations:

  - Azide was reduced to ammonium and molecular dinitrogen (N_2):

    $N_3^- + 2\ e^- + 3\ H^+ \rightarrow NH_3 + N_2$

  - Nitrite was reduced to ammonium

    $NO_2^- + 6\ e^- + 7\ H^+ \rightarrow NH_3 + 2H_2O$

  - Nitrate was reduced to nitrite:

    $NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$

- The catalytic active site [$CuSMoO_2$]-cluster present in CO dehydrogenase is responsible for the reduction of azide and nitrite. Azide and nitrite reduction did not take place without an active catalytic cluster. The reduction of azide and nitrite are closely correlated to the oxidation of CO.

- CO dehydrogenase catalyses simultaneously the oxidation of H_2 and the reduction of azide. The electrons liberated during H_2 oxidation were used to reduce azide.

  - $H_2 + N_3^- + H^+ \rightarrow NH_3 + N_2$

- Oxidation and reduction activities most probably take place at the active site of the [$CuSMoO_2$]-cluster of CO dehydrogenase.

- The presence of CO and azide together causes inhibition of the CO oxidation and azide reduction completely.

- The crystal structure reveals that in the presence of CO and azide the Cu-atom and sulfido ligand are removed from the [$CuSMoO_2$]-cluster.

- Nitrate reduction is not dependent on the [$CuSMoO_2$]-cluster. In the absence of [$CuSMoO_2$]-cluster or in the case of damaged [$CuSMoO_2$]-cluster nitrate was reduced to ammonium.

- Die CO dehydrogenase from *S. thermoautotrophicus* shows similar oxidation and reduction activities.

- CO dehydrogenase from the thermophilic, gram positive bacterium *S. thermoautotrophicus* is very similar to CO dehydrogenase from the mesohilic gram negative bacterium *O. carboxidovorans*.

7 Literaturverzeichnis

Beck, W. (1990) Pseudohalogeno-Metallverbindungen LXXII. Addition des Azidions und anderer *N*-Nucleophile an koordinierte Kohlenmonoxid- und CO-ähnliche Liganden und verwandte Reaktionen. Azido- und Isocyanato-Carbonyl-Metallkomplexe. *J. Organomet. Chem*. **383**, 143-160.

Beck, W., Fehlhammer, W.P., Pöllmann, P. und Schächl, H. (1969) Bildung von Isocyanato-Komplexen aus komplexen Metallaziden und Kohlenmonoxid. *Chem. Ber*. **102**, 1976-1987.

Beisenherz, G., Bolze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G. (1953) Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* **8b**, 555-577.

Bennett, R.P. and Hardy, W.B. (1968) The reaction of organic azides with carbon monoxide, a new route to isocyanates. *J. Amer. Chem. Soc*. **90**, 3295-3296.

Bortels, H. (1930) Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffsbindung. *Arch. Mikrobiol*. **1**, 333-342.

Bradford, M.M. (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.

Bray, R.C. (1975) Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In: *The enzymes* (Boyer, E.D., Ed.) Academic Press, New York, 300-419.

Burgess, B.K. and Lowe, D.J. (1996) Mechanism of Molydenum Nitrogenase. *Chem. Rev*. **96**, 2983-3011.

Burmeister, J.L. (1968) Linkage isomerism in metal complexes. *Coord. Chem. Rev.* **3**, 225-245.

Burn, R.C. and Bulen, W.A. (1965) ATP-dependent hydrogen evolution by cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta*. **105**, 437-445.

Busetto, K. and Palazzi, A. (1975) Preparation of reactivity of some new azido-bridged complexes of Pd(II) and Pt(II). *Inorg. Chim. Acta*. **13**, 233-238.

Butler, C.S., Charnock, J.M., Bennett, B., Sears, H.J., Reilly, A.J., Ferguson, S.J, Garner, C.D., Lowe, D.J., Thomson, A.J., Berks, B.C. and Richardson, D.J. (1999) Models for molybdenum coordination during the catalytic cycle of periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans* derived from EPR and EXAFS spectroscopy. *Biochemistry* **38***,* 9000-9012.

Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E. and Young, V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by titration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal*. **6**, 81-90.

Conrad, R. and Seiler, W. (1980) Role of microorganisms in the consumption and production of atmospheric carbon monoxide by soil. *Appl. Environ. Microbiol*. **40**, 437-445.

Craske, A.L. and Ferguson, S.J. (1986) The respiratory nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans*. Molecular characterisation and kinetic properties. *Eur. J. Biochem*. **158**, 429-436.

Cypionka, H. and Meyer, O. (1983) Carbon monoxide-insensitive respiratory chain of *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Bacteriol*. **156**, 1178-1187.

Dias, J.M., Than, M.E., Humm, A., Huber, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Bursakov, S., Calvete, J., Caldeira, J., Carneiro, C., Moura, J.J.G., Moura, I. and Romão, M.J. (1999) Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure.* **7**, 65-79.

Dilworth, M.J. (1966) Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 285-294.

Dilworth, M.J. and Thorneley, R.N. (1981) Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Hydrazine is a product of azide reduction. *Biochem. J.* **193**, 971-983.

Dilworth, M.J., Fisher, K., Kim, C.H. and Newton, W.E. (1998) Effects on substrate reduction of substitution of histidine-195 by glutamine in the alpha-subunit of the MoFe protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Biochemistry*. **37**, 17495-17505.

Dobbek, H. (2000) Röntgenstrukturanalyse von Molybdän-haltigen Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen. Doktorarbeit, Technische Universität München.

Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O. and Huber, R. (1999) Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanyl-cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8884-8889.

Dobbek, H., Gremer, L., Kiefersauer, R., Huber, R. and Meyer, O. (2002) Catalysis at a [CuSMo(=O)OH] cluster in CO dehydrogenase resolved at 1.1 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15971-15976.

Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R. and Meyer, O. (2001) Crystal structur of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* **293**, 1281-1285.

Doel, J.J., Godber, B.L.J., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2001) Reduction of organic nitrates catalysed by xanthine oxidoreductase under anaerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1527**, 81–87.

European Communities (2001) Air pollution and climate change. In Environmental Statistics, 2nd Edition. Office for Official Publication of the European Communities, Luxembourg.

Egerer, J. (2003) Substratanaloge Inhibitoren der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase von *Oligotropha carboxidovorans*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

Einsle, O., Messerschmidt, A., Huber, R., Kroneck, P.M.H and Neese, F. (2002) Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c Nitrite Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**,11737-11745.

Fawcett, J.K. and Scott, J.E. (1960) A rapid precise method for determination of urea. *J. Clin. Pathol.* **13**, 156-159.

Ferner, R. (2001) Struktur und Funktion des [Cu-S-Mo]-Zentrums in CO-Dehydrogenase. Dissertation, Universität Bayreuth.

Fisher, K., Dilworth, M.J. and Newton, W.E. (2000) Differential Effects on N_2 Binding and Reduction, HD Formation, and Azide Reduction with α-195^{His}- and α-191^{Gln}-Substituted MoFe Proteins of *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase. *Biochemistry* **39**, 15570 –15577.

Frunzke, K. and Meyer, O. (1990) Nitrate respiration, denitrification, and utilization of nitrogen sources by aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol*. **154**, 168-174.

Fuchs, K.P. (1992) Biochemische Charakterisierung der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus *Streptomyces thermoautotrophicus* und Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen der drei Untereinheiten. Diplomarbeit, Universität Bayeuth.

Gadkari, D. (1984) Influence of herbicide Goltix and Sencor on nitrification. *Zentralbl. Mikrobiol*. **139**, 623-631.

Gadkari, D., Mörsdorfs, G. and Meyer, O. (1992) Chemolithoautotrophic Assimilation of Dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT: Identification of unsual N_2-fixing system. *J. Bacteriol*. **174**, 6840-6843.

Gadkari, D., Schricker, K., Acker, G., Kroppenstedt, R.M. and Meyer, O. (1990) *Streptomyces thermoautotrophicus* sp. nov., a thermophilic CO- and H_2-oxidizing obligate chemolithoautotroph. *Appl. Environ. Microbiol*. **56**, 3727-3734

Gnida, M., Ferner, R., Gremer, L., Meyer, O. and Meyer-Klaucke, W. (2003) A novel binuclear [CuSMo] cluster at the active site of carbon monoxide dehydrogenase: characterization by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* **42**, 222-230.

Godber, B.L.J., Doel, J.J., Goult, T.A., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2001) Suicide inactivation of xanthine oxidoreductase during reduction of inorganic nitrite to nitric oxide. *Biochem. J.* **358**, 325–333.

Godber, B.L.J., Doel, J.J., Sapkota, G.P., Blake, D.R., Stevens, C.R., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2000) Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **275**, 7757–7763.

Godden, J.W., Turley, S., Teller, D.C, Adman, E.T., Liu, M.Y, Payne, W.J. and LeGall, J (1991) The 2.3 Å X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes. Science* **253**, 438-442.

Gremer, L. (2000) Kristallstruktur und Funktion von Kohlenmonoxid-Dehydrogenase ein Seleno-Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoprotein. Dissertation, Universität Bayreuth.

Gremer, L., Kellner, S. and Meyer, O. (1999) New type of flavin adenine dinucleotide-binding resolved in the molybdo iron-sulfur-flavoprotein carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans.* In: *Flavins and Flavoproteins* (Ghisela, S., Kroneck, P., Macheroux, P. and Sund, H., Eds.), Agency for scientific Publications, Berlin, 759-766.

Gremer, L., Kellner, S., Dobbek, H., Huber, R. and Meyer. O. (2000) Binding of flavin adenine dinucleotide to molybdenum-containing carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. *J. Biol. Chem*. **275**, 1864-1872.

Hanes, C.S. (1932) Studies of plant amylases. The effect of starch concentration upon velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J*. **26**, 1406-1421.

Harrigan, W.F. and McCance, M.E. (1966) Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London, New York.

Harrison, R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now ? *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 774-797.

Heck, E. (2000) Struktur und Funktion der heterotrimeren Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus *Streptomyces thermoautotrophicus.* Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

Hille, R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev*. **96**, 2757-2816.

Hille, R. (2002) Molybdenum and tungsten in biology. *TRENDS Biochem. Sci*. **27**, 360-367.

Howard, J.B. and Rees, D.C. (1996) Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem. Rev*. **96**, 2965-2982.

Hulse, C.L., Averill, B.A. and Tiedje, J.M. (1989) Evidence for copper-nitrosyl intermediate in denitrification by the copper-containing Nitrite Reductase of *Achromobacter cycloclastes*. J. *Am. Chem. Soc*. **111**, 2322-2323.

Ichimori, K., Fukahori, M., Nakazawa, H., Okamoto, K. and Nishino, T. (1999) Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. *J. Biol. Chem*. **274**, 7763–7768.

Jacobitz, S. and Meyer, O. (1986) Reduced pyridine nucleotides in *Pseudomonas carboxydovorans* are formed by reverse electron transfer linked to proton motive force. *Arch. Microbiol*. **145**, 372-377.

Jacobitz, S. and Meyer, O. (1989) Removal of CO dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydovorans* cytoplasmic membranes, rebinding of CO dehydrogenase to depleted membranes, and restoration of respiratory activities. *J. Bacteriol*. **171**, 6294-6299.

Johnson, M.K, Rees, D.C. and Adams, M.W.W. (1996) Tungstoenzymes. *Chem. Rev*. **7**, 2817-1840.

Keilin, D. and Hartree, E.F. (1939) Cytochrome and cytochrome oxidase. *Proc. R. Soc.* **B 127,** 167-191.

Kim, Y.J., Kwak, Y.S. and Lee, S.W. (2000) Synthesis and properties of arylpalladium(II) azido complexes $PdAr(N_3)(PR_3)_2$. Nucleophilic reaction of the azido ligand with CO and with isocyanides to afford Pd(II) isocynate, C-tetrazolate and carbodiimide complexes. *J. Organomet. Chem*. **603**, 52-160.

Kraut, M., Hugendieck, I., Herwig, S. and Meyer, O. (1989) Homology and distribution of CO dehydrogenase structural genes in carboxydotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **149**, 540-546.

Kumar, M., Lu, W.P., Smith, A., Ragsdale, A.W. and McCracken, J. (1995) Azide binding to carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Am. Chem. Soc*. **17**, 2939-2940.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lengel, T. (2002) Struktur und Funktion des neuartigen [CuSMo]-Zentrums bakterieller Kohenmonoxid-Deydrogenase. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

Leone, M., Cupane, A., Militello, V., Stroppolo, M.E. and Desideri, A. (1998) Fourier transform infrared analysis of the interaction of azide with the active site of oxidized and reduced bovine Cu, Zn superoxide dismutase. *Biochemistry* **37**, 4459-4464.

Li, H., Samouilov, A., Liu, X. And Weier, J.L. (2003) Characterization of magnitude kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrat reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxid generation in anoxic tissues. *Biochemistry* **42**, 1150-1159.

Li, J., Burgess, B.K. and Corbin, J.L. (1982) Nitrogenase reactivity: cyanide as substrate and inhibitor. *Biochemistry* **18**, 4393-402.

Lindahl, P.A. (2002) The Ni-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase Family: Light at the End of the Tunnel? *Biochemistry* **41**, 2097-2105.

Meyer, O. (1982) Chemical and spectral properties of carbon monoxide:methylene blue oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **257**, 1333-1341.

Meyer, O. (1986) Biologie und Biotechnologie aerob Kohlenmonoxid-oxidierender Bakterien. In: *Jahrbuch Biotechnologie* (Creuger, W., Esser, K., Präve, P., Schlingmann, M., Thauer, R. und Wagner, F., Eds.), Hanser, München, 3-31.

Meyer, O. (1989) Aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. In: *Autotrophic bacteria* (Schlegel, H.G. and Bowien, B., Eds.),. Springer Verlag, Berlin, 331-350.

Meyer, O. and Rohde, M. (1984) Enzymology and bioenergetics of carbon monoxide-oxidizing bacteria. In: *Microbial growth on C1 compounds* (Crawford, R. L. and Hansen, R. S., Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., 26-33.

Meyer, O. and Schlegel, H.G. (1978) Reisolation of the carbon monoxide oxidase from *Pseudomonas carboxydovorans* (Kistner) comb. Nov*. Arch. Microbiol*. **118**, 35-43.

Meyer, O. and Schlegel, H.G. (1980) Carbon monoxide: methylene blue oxidoreductase from *Pseudomonas carboxydovorans*. *J. Bacteriol*. **141**, 74-80.

Meyer, O. and Schlegel, H. G. (1983). Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol*. **37**, 277-310.

Meyer, O., Frunzke, K., Gadkari, D., Jacobitz, S. Hugendieck, I. and Kraut, M. (1990) Utilization of carbon monoxide by aerobes: recent advances. *FEMS Microbiol. Rev*. **87**, 253-260.

Meyer, O., Frunzke, K., Tachil, J. and Volk, M. (1993b) The bacterial molybdenum cofactor. In: *Molybdenum enzymes, cofactors and model systems* (Stiefel, E.I., Coucouvanis, D. and Newton, W.E., Eds.), ACS symposium series 535, American Chemical Society, Washington DC, USA, 50-68.

Meyer, O., Frunzke, K. and Mörsdorf, G. (1993c) Biochemistry of the aerobic utilization of carbon monoxide. In: *Microbial growth on C1 compounds* (Murrell, J.C. and Kelly, D.P. Eds.) Intercept Ltd., Andover, 433-459.

Meyer, O., Gremer, L., Ferner, R., Ferner, M., Dobbek, H., Gnida, M., Meyer-Klaucke, W. and Huber, R. (2000) The role of Se, Mo, and Fe in the structure and function of carbon monoxide dehydrogenase. *Biol. Chem*. **381**, 865-876.

Meyer, O., Jacobitz, S. und Krüger, B. (1986) Biochemistry and physiology of aerobic carbon monoxide-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. **39**, 161-179.

Meyer, O., Stackebrandt, E. and Auling, G. (1993a) Reclassification of ubiquinone Q-10 containing carboxidotrophic bacteria: Transfer of *„[Pseudomonas] caroxydovorans*" OM5^T to *Oligotropha*, gen. nov., as *Oligotropha carboxidovorans*, comb. nov., transfer of *„[Alcaligenes] carboxydus*" DSM1086^T to *Carbophilus*, gen. nov., as *Carbophilus caboxidus*, comb. nov., transfer of *„[Pseudomonas] compransoris*" DSM 1231^T to *Zavarzinia,* gen. nov., as *Zavarzinia compransoris*, comb. nov., and amended descriptions of the new genera. *System. Appl. Microbiol.* **16**, 390-395.

Millar, T.M., Stevens, C.R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R. and Blake, D.R. (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* **427**, 225–228.

Moir, J.W., Baratta, D., Richardson, D.J. and Ferguson, S.J. (1993) The purification of a *cd*1-type nitrite reductase from, and the absence of a copper-type nitrite reductase from, the aerobic denitrifier *Thiosphaera pantotropha*, the role of pseudoazurin as an electron donor. *Eur. J. Biochem.* **212**, 377-385.

Mörsdorf, G., Frunzke, K., Gadkari, D. and Meyer, O. (1992) Microbial growth on carbon monoxide. *Biodegredation.* **3**, 61-82.

Oberfrank, A. (1997) Die Oxidase-Funktion der Kohlenmonoxide-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*, Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A. and Sannita, G. (1997) A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem*. **272**, 31301-31307.

Park, S.W., Hwang, E.H., Park, H., Kim, J.A., Heo, J. , Lee, K.H., Song, T., Kim, E., Ro, Y.T., Kim, S.W. and Kim, Y.M. (2003) Growth of Mycobacteria on carbon monoxide and methanol. *J. Bacteriol.* **185**, 142-147.

Parsonage, D. and Ferguson, S.J. (1983) Reassessment of pathways of electron flow to nitrate reducatse that are couple to energy conservation in *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett*. **153**, 108-112.

Pate, J.E., Ross, P.K., Thaman, T.J., Reed, C.A., Karlin, K.D., Sorrell, T.N. and Salomon, E.I. (1989) Spectroscopic studies of the charge transfer and vibrational features of binuclear copper(II) azide complexes: comparison to the couple binuclear copper active site in Met azide hemocyanin and tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc*. **111**, 5198-5209.

Pickett, C.J., Vincent, K.A., Ibrahim, S.K., Gormal, C.A., Smith, B. E. and Best, S.P. (2003) Electron-Transfer Chemistry of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase: Delocalized and Localized Reduced States of FeMoco which Allow Binding of Carbon Monoxide to Iron and Molybdenum. *Chem. Eur. J*. **9**, 76-87.

Ragsdale, S.W. (2000) Nickel containing CO dehydrogenase and hydrogenase. In: Enzyme-catalyzed electron and radical transfer (Holzenburg, A., Scrutton, N.S., eds), *Subcell. Biochem*. **35,** 487-518.

Ragsdale, S.W. and Kumar, M. (1996) Nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Chem. Rev*. **96**, 2515-2539.

Ribbe, M. (1998) Die aerobe Stickstoffixierung von *Streptomyces thermoautotrophicus*: Identifikation der daran beteiligten Komponenten sowie Isolierung und biochemische Charakterisierung der Nitrogenaseproteine. Dissertation, Universität Bayreuth.

Ribbe, M., Gadkari, D. and Meyer, O. (1997) N_2 Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N_2 reduction to the oxidation of superoxide produced from O_2 by molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem*. **272**, 26627-26633.

Rohde, M., Mayer, F., Jacobitz, S. and Meyer, O. (1985) Attachment of CO dehydogenase to the cytoplasmic membrane is limiting the respiratory rate of *Pseudomonas carboxydovorans*. *FEMS Microbiol. Lett*. **28**, 141-144.

Romão, M.J., Dias, J.M. and Moura, I. (2001) Dissimilatory nitrate reductase. In: *Handbook of metalloproteins* (Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T. and Wieghardt, K. Eds). John Wiley & Sons, 1075-1085.

Rubinson, J.F., Burgess, B.K.. Corbin, J.L and Dilworth, M.J. (1985) Nitrogenase reactivity: azide reduction. *Biochemistry* **24**, 273-283.

Ruiz, E., Cano, J., Alvarez, S. and Alemany, P. (1998) Magnetic coupling in end-on azido-bridged transition metal complex: a density functional study. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11122-11129.

Santiago, B. (1990) Charakterisierung der Hydrogenase-Aktivität der CO-Dehydrogenase aus *Pseudomonas carboxydovorans*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

Santiago, B. (1994) Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Aufnahme-Hydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans.* Dissertation, Universität Bayreuth.

Santiago, B. and Meyer, O. (1991) CO Dehydrogenase from *Pseudomonas carboxydovorans* carries the activity of a H_2-evolving hydrogenase. *Bioforum* **14**, 68.

Santiago, B. and Meyer, O. (1997) Purification and molecular characterization of H_2 uptake membrane-bound NiFe-hydrogenase from the carboxidotrophic bacterium *Oligotropha carboxidovorans. J. Bacteriol*. **179**, 6053-6060.

Schöllhorn, R. and Burris, R.H. (1967) Reduction of azide by the N_2-fixing enzyme system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1317-1323.

Schübel, U. (1996) CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha carboxidovorans*: Molekularbiologische Analyse des CO-Stimulons und Charakterisierung von rekombinantem CoxS. Dissertation, Universität Bayreuth.

Schumacher, W., Kroneck, P.M.H. (1991) Dissimilatory hexaheme *c* nitrite reductase of *"Spirillum"* strain 5175: purification and properties. *Arch. Microbiol.* **156**, 70-74.

Shi, C., Dai, Y., Xu, X., Xie, Y. and Liu, Q. (2002) The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Exp. Purif*. **24**, 51-55.

Shen, J., Dean, D.R. and Newton, W.E. (1997) Evidence for multiple substrate-reduction site and distinct inhibitor-binding sites from an altered *Azotobacter vinelandii* nitrogenase MoFe protein. *Biochem*. **36**, 4884-4894.

Sipma, J., Lens, P.N.L., Stams, J.M. and Lettinga, G. (2003) Carbon monoxide conversion by anaerobic bioreactor sludges. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 271-277.

Strange, R.W., Murphy, L.M., Dodd, F.E., Abraham, Z.H., Eady, R.R., Smith, B.E. and Hasnain, S.S. (1999) Structural and kinetic evidence for an ordered mechanism of copper nitrite reductase. *J. Mol. Biol*. **287**, 1001-1009.

Svetlitchnyi, V., Peschel, C., Acker, G. and Meyer, O. (2001). Two membrane-associated NiFeS-carbon monoxide dehydrogenases from anerobic carbon monoxide utilizing eubacterium *Carboxidothermus hydrogenoformans*. *J. Bacteriol.* **183**, 5134-5144.

Vaughn, S.A. and Burgess, B.K. (1989) Nitrite, a new substrate for nitrogenase. *Biochemistry* **28**, 419-424.

Waud, W.R., Brady, F.O., Wiley, R.D. and Rajagopalan, K.V. (1975) A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: effect of proteolysis on the subunit structure. *Arch. Biochem. Biophys*. **169**, 695-701.

Westley, J. (1981) Thiosulfate: cyanide sulfurtransferase (rhodanese). *Meth. Enzymol.* **77**, 285-291.

Wilberg, N. (1995) Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 101. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

Willbold, D. (1991) Isolierung und Charakterisierung von Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus dem thermophilen obligat chemolithoautotrophen Bakterium Streptomyces thermoautotrophicus. Diplomarbeit. Universität Bayreuth.

Ziolo, R.F., Thich, J.A. and Dori, Z. (1972) Some chemistry of azido complexes of group Ib metals. *Inorg. Chem*. **11**, 626-631.

Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol*. *Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ortwin Meyer für die Überlassung des interessanten Themas, sein reges Intresse am Fortgang dieser Arbeit, seine wissenschaftlichen Anregungen und ständige Bereitschaft zu konstruktiver Diskussion, sowie die mir stets gewährte Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Dilip Gadkari herzlich danken für seine hervorragende Betreuung und seine tatkräftige und praktische Unterstützung nicht nur während der Laboruntersuchungen, sondern auch während des Zusammenschreibens dieser Arbeit. Er war mir auch ein guter Ratgeber in persönlichen Fragen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen eines DAAD-Stipendiums.

Für die hochaktive Enzym-Präparation, Kristallisation und ESR-Untersuchungen war der Beitrag von Herrn Dr. Lothar Gremer sehr wertvoll. Ich möchte mich für die Zusammenarbeit herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Holger Dobbek, Junior Professur, LS. Biochemie, Universität Bayreuth für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Lösung der Kristallstruktur des Azid/CO-inaktivierten Enzyms.

Bei Dr. Reinhold Ferner möchte ich mich bedanken für die Überlassung der gereinigten CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* OM5-12/pJRDMSL.

Für ihre moralische Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft bei allen technischen Problemen möchte ich mich bei Frau Ulrike Deiß herzlich bedanken.

Danken möchte ich Frau Dr. Carla Hofmann-Findeklee und Herrn Dr. Ingo Schmidt für ihr/sein Interesse und ihre/seine stete Diskussionsbereitschaft während des Zusammenschreibens.

Danken möchte ich Herrn Prof. Diethelm Kleiner für die Unterstützung meines Stipendienantrags.

Dr. Vitaly Svetlitchnyi danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Frau Lydia Stauber möchte ich mich für die stete Bereitschaft bei allen Verwaltungsproblemen bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Lehrstuhl für Mikrobiologie für das nette Arbeitsklima, insbesondere den Kolleginnen Frau Elisabeth Keese, Helga Castorph und Christel Hofmann.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Frau Joeni S.R., die gerade ihre Dissertationen an der „Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University-Japan" angefertigt hat, ohne deren Unterstützung und Verständnis meine Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

16/4/1965	geboren in Kulon-Progo, Jogyakarta, Indonesien
1/1972 – 12/1977	Besuch der sechsjährigen Grundschule in Kulon-Progo
1/1978 – 6/1981	Besuch der dreijährigen Mittelschule in Kulon-Progo
8/1981 – 6/1984	Besuch der dreijährigen Oberschule in Cilacap
8/1984 – 6/1988	Immatrikulation für das Fach Biologie an der „Jenderal Soedirman, National University", Purwokerto.
7/1988 – 7/1989	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie unter der Leitung von Herrn Prof. Rubijanto Misman; Thema der Arbeit: „Characterization of Corn Major Diseases and the Effect of Fungicide Delsene MX-200 on their Infection Rate"
4/1990 – heute	Wissenschaftlich tätig am „Research and Development Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences", in Bogor Indonesien
7/1994 – 7/1995	Einjähriges Forschungsstipendium am Lehrstuhl „Synthetic Chemistry and Biological Chemistry" unter der Leitung von Herrn Prof. Atsou Tanaka an der Universität Kyoto, Japan
9/1998 – 8/2000	Einjähriges DAAD-Forschungsstipendium am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth
9/2000 – 3/2004	DAAD-Promotionsstipendium, bzw. Doktorarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie an der Universität Bayreuth unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. O. Meyer

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 21. April 2004

(Antonius Sarjiya)