
Abstract

The O₂-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* (*ReMBH*) is a highly efficient biocatalyst converting reversibly H₂ into 2e⁻ and 2H⁺ in the presence of O₂. This O₂-tolerance is a niche property in hydrogenases and a basic requirement for a potential industrial application. In this thesis, all metal co-factors of *ReMBH* were analysed by X-ray crystallography with regards to the mode of action and O₂-tolerance. Additionally, time-resolved structural analysis was performed at a free-electron laser to determine the sequence of events of the O₂-triggered inactivation process, showing the active site being fast blocked by a reversible OH⁻ ligand. Subsequently, the proximal [4Fe3S] cluster performs a redox-dependent structural rearrangement that alters due to ligand exchange the properties of the cluster. This is enabled by two additional cysteine ligands realizing structural flexibility and enhanced electron transfer capability. The medial [3Fe4S] cluster by its high potential defines the characteristics of the whole electron relay and reveals strong interdependency between the FeS clusters. The features of the distal [4Fe4S] are determined by e.g., the hydrogen bond network of its histidine ligand. Equalizing all FeS clusters to Cys₄-[4Fe4S] clusters resulted in an irreversibly inhibited active site characterized by the occurrence of a sulfinic acid. Finally, the catalytic bias of *ReMBH* is amongst others determined by electrostatics which are modulated by e.g., an amino acid of the 2nd coordination sphere of the active site. Altogether, a fine-tuned interplay of the co-factors embedded to an optimized protein scaffold was disclosed on a structural level.

Kurzbeschreibung

Die O₂-tolerante membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* (*ReMBH*) ist ein hocheffizienter Biokatalysator, der in Gegenwart von O₂ reversibel H₂ in 2e⁻ und 2H⁺ umwandelt. Die O₂-Toleranz ist eine Nischeneigenschaft bei Hydrogenasen und essenziell für eine mögliche industrielle Anwendung. In dieser Arbeit wurden alle Metall-Cofaktoren der *ReMBH* röntgenkristallographisch auf ihre Wirkungsweise und O₂-Toleranz hin untersucht. Zusätzlich wurde eine zeitaufgelöste Strukturanalyse durchgeführt, um den Ablauf des O₂-getriggerten Inaktivierungsprozess zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass das aktive Zentrum schnell durch einen reversiblen OH⁻ Liganden blockiert wird. Danach führt der proximale [4Fe3S] Cluster eine redox-abhängige Strukturumlagerung durch, die durch Ligandenaustausch die Klustereigenschaften verändert. Dies wird durch zusätzliche Cysteinliganden ermöglicht, die strukturelle Flexibilität und einen erweiterten Elektronentransfer realisieren. Der mediale [3Fe4S] Cluster definiert durch sein hohes Potential die Eigenschaften des gesamten Elektronenrelais und zeigt eine starke Interdependenz zwischen den FeS Clustern. Die Eigenschaften des distalen [4Fe4S] werden z.B. durch das Wasserstoffbrückennetzwerk seines Histidin-Liganden bestimmt. Die Gleichschaltung aller FeS-Cluster zu Cys₄-[4Fe4S] Clustern führte zu einem irreversibel inhibierten aktiven Zentrum, das durch das Auftreten einer Sulfinsäure charakterisiert ist. Schließlich wird die katalytische Ausrichtung der *ReMBH* u.a. durch Elektrostatik bestimmt, die z.B. durch eine Aminosäure der 2. Koordinationssphäre des aktiven Zentrums moduliert wird. Insgesamt wurde ein fein abgestimmtes Zusammenspiel der Co-Faktoren, eingebettet in ein optimiertes Proteingerüst, auf struktureller Ebene aufgedeckt.