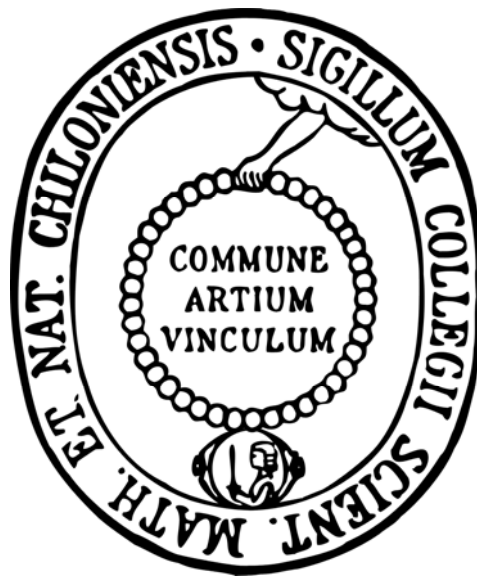


**Molekulare Untersuchung
zur marinen und limnischen Verbreitung
und zur biotechnologischen
Anwendung von Hydrogenasen**



**Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von

Martin Barz

Kiel, im Oktober 2009

Referent/in.....

Korreferent/in.....

Tag der mündlichen Prüfung.....

Zum Druck genehmigt, Kiel.....

.....Der Dekan

I. Abkürzungsverzeichnis

bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
e ⁻	Elektron
E	Einstein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
F	Farad
g	Gramm oder relative Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ ase	Hydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hox	Hydrogenase Oxidation
Hup	Hydrogenase Uptake
Hyp	Hydrogenase pleiotropisch
k	Kilo
l	Liter
LAHG	Light-activated heterotrophic growth
LB	(Nährmedium nach) Luria Bertani
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Na ₂ EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure

NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
<i>Nif</i>	nitrogen fixation (Stickstofffixierung)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	potentia Hydrogenii
Psa	Photosystem I
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SAM	S-adenosylmethionin
SAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
sp.	species
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
ThiH	Thiamin Biosynthese Protein
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Ω	Ohm
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung	1
1.1 Cyanobakterien.....	1
1.2 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	2
1.3 Aufbau des Photosystems I der Cyanobakterien.....	2
1.4 <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	4
1.5 Heterocysten.....	5
1.6 Enzyme des Wasserstoffmetabolismus	5
1.6.1 Nitrogenase.....	6
1.6.2 Hydrogenasen.....	7
1.6.3 [NiFe]-Hydrogenase.....	8
1.6.4 Klassifizierung	9
1.6.5 Gruppe I: Membrangebundene aufnehmende [NiFe]-Hydrogenasen.....	10
1.6.6 Gruppe II: Cyanobakterielle aufnehmende und Sensor-[NiFe]-Hydrogenasen.....	10
1.6.7 Gruppe III: Bidirektionale, heteromultimere, cytoplasmatische [NiFe]-Hydrogenasen.....	11
1.6.8 Gruppe IV: Wasserstofferzeugende, energierhaltende, membranassoziierte [NiFe]-Hydrogenasen.....	13
1.6.9 Die Biosynthese der [NiFe]-Hydrogenase	13
1.6.10 [FeFe]-Hydrogenasen.....	15
1.6.11 Die Biosynthese von [FeFe]-Hydrogenasen	16
1.7 Der Wasserstoffhaushalt von marinen und limnischen Gewässern	17
2. Fragestellung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Plasmide und Bakterien.....	19
3.3 Oligonukleotide.....	20
3.4 Anzuchtbedingungen der Organismen	20
3.4.1 Kultivierung von <i>Nostoc spec.</i> und <i>Synechocystis spec.</i>	20
3.4.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	22
3.5 Entnahme der Umweltproben aus marinen und limnischen Gewässern	23
3.6 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien.....	23
3.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
3.8 DNA-Isolatierung von Filtern aus Umweltproben.....	25
3.9 Restriktionsverdau.....	25
3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.11 Fusions-PCR.....	27
3.12 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	28
3.13 Dephosphorylierung mit der Shrimp Alkalinen Phosphatase (SAP).....	29
3.14 Adenylierung von PCR-Produkten.....	29
3.15 Ligation	29

3.16 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl ₂ -Methode	30
3.17 Transformation in <i>E.coli</i>	31
3.18 Transformation in <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	31
3.19 Präparation von Plasmid-DNA.....	32
3.20 Sequenzierung	32
3.21 Transformation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	32
3.22 Southern Blot.....	33
3.23 Physiologische Methoden	35
3.23.1 Bestimmung der optischen Dichte	35
3.23.2 Chlorophyllbestimmung.....	36
3.23.3 Aktivitätsmessung der Hydrogenasen.....	36
3.24 Mikroskopie	37
3.25 Datenbanken und Bioinformatikprogramme.....	37
4. Ergebnisse	39
4.1 Verteilung von Hydrogenasen in cyanobakteriellen Genomen.....	39
4.1.1 Die Verteilung der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase	42
4.1.2 Die Verteilung der aufnehmenden Hydrogenase und der Nitrogenase.....	42
4.1.2 Die Verteilung der aufnehmenden Hydrogenase und der Nitrogenase.....	43
4.2 Verteilung von Hydrogenasen in den Genomen von heterotrophen Bakterien isoliert aus marinem Oberflächenwasser.....	44
4.2.1 Die Gruppe der Rhodobacteraceae und <i>Neptunibacter caesariensis</i>	47
4.2.2 Die Gruppe der Vibrionaceae	48
4.3 Verteilung der Hydrogenasen in metagenomischen Datenbanken	51
4.3.1 Verteilung der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase	56
4.3.2 Verteilung der membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenase.....	58
4.3.3 Verteilung der [FeFe]-Hydrogenase.....	60
4.4 Verteilung von Sequenzen der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten [NiFe]- Hydrogenase in der Nord- und Ostsee, im Nordatlantik, im Mittelmeer, sowie in zwei Süßwasserseen.....	60
4.5 <i>Nostoc</i> -Projekt: Ermittlung der Wasserstoffproduktion der Nitro-genase und heterologe Überexpression von [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	63
4.5.1 Messungen der Aktivität der Nitrogenase der Mutante AMC 414 von <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	63
4.5.2 Promotorstudie des <i>nifH</i> -Promotors mittels eines GFP-Konstrukts	64
4.5.3 Heterologe Expression zweier verschiedener Eisenhydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	67
4.6 Fusion der Untereinheiten der Hydrogenase an das Photosystem I.....	70
5. Diskussion	73
5.1 Verteilung von Hydrogenasen in cyanobakteriellen Genomen.....	73

5.1.1 Die Verteilung der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase	73
5.1.2 Die Verteilung der aufnehmenden Hydrogenase und der Nitrogenase.....	75
5.2 Verteilung von Hydrogenasen in den Genomen von heterotrophen Bakterien isoliert aus marinem Oberflächenwasser.....	77
5.2.1 Die Gruppe der Rhodobacteraceae und <i>Neptunibacter caesariensis</i>	78
5.2.2 Die Gruppe der Vibrionaceae.....	78
5.3 Verteilung der Hydrogenasen in metagenomischen Datenbanken	79
5.3.1 Verteilung der cyanobakteriellen bidirektionalen Hydrogenase.....	79
5.3.2 Verteilung der membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenase.....	80
5.3.3 Verteilung der [FeFe]-Hydrogenase.....	80
5.4 Verteilung von Sequenzen der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten [NiFe]- Hydrogenase in der Nord- und Ostsee, im Nordatlantik, im Mittelmeer, sowie in zwei Süßwasserseen.....	81
5.5 <i>Nostoc</i> -Projekt: Ermittlung der Wasserstoffproduktion der Nitro-genase und heterologe Überexpression von [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	82
5.5.1 Messungen der Aktivität der Nitrogenase der Mutante AMC 414 von <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	82
5.5.2 Promotorstudie des <i>nifH</i> -Promotors mittels eines GFP-Konstrukts	83
5.5.3 Heterologe Expression zweier verschiedener Eisenhydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	83
5.6 Fusion der Untereinheiten der Hydrogenase an das Photosystem I.....	84
6. Ausblick	85
7. Zusammenfassung.....	86
8. Summary	87
9 Literaturverzeichnis.....	89
Anhang	108
Erklärung.....	109
Danksagung.....	110
Lebenslauf.....	111

1. Einleitung

1.1 Cyanobakterien

Die gramnegativen Cyanobakterien bilden ein Reich in der Domäne der Bacteria und umfassen eine große Gruppe photoautotropher, wasserspaltender Bakterien mit mehr als 150 Gattungen, die etwa 2000 Arten enthalten (Schopf 2000). Sie kommen in den unterschiedlichsten Habitaten wie in Süß- und Salzwasser, Salzseen, Wüsten und heißen Quellen vor, aber auch in Symbiose mit Pflanzen, Pilzen, Protisten und Tieren (Adams 2000). Die Vielzahl an Arten lässt sich in fünf morphologische Gruppen unterteilen (Rippka et al. 1979):

1. *Chroococcales*: einzellige Cyanobakterien, die sich durch binäre Teilung vermehren
2. *Pleurocapsales*: einzellige Cyanobakterien, die sich durch multiple Teilung vermehren
3. *Oscillatoriales*: filamentöse Zellen, die sich durch binäre Spaltung in einer Ebene teilen und keine Heterocysten bilden
4. *Nostocales*: filamentöse Zellen, die Heterocysten produzieren
5. *Stigonematales*: sich verzweigende filamentöse Formen

Cyanobakterien entstanden vor ungefähr 3,5 Mrd. Jahren. Sie besitzen Chlorophyll a, können oxygene Photosynthese betreiben und sind verantwortlich für die Entstehung des Sauerstoffs in der Atmosphäre (Schopf 2000). Weiterhin sind sie die Vorläufer der Chloroplasten, deren Entstehung durch Endosymbiose zustande kam (Douglas 1994).

Charakteristische Bestandteile des Photosyntheseapparates sind die Phycobilisomen, die als Teil der Lichtsammelkomplexe mit der Thylakoidmembran assoziiert sind. Die Phycobilisomen setzen sich aus Proteinen mit den daran gebundenen Pigmenten Phycocyanin, Allophycocyanin und Phycoerythrin zusammen (Glacer 1988).

Eine Besonderheit besteht in dem Reservespeicherstoff Cyanophycin, der zur Speicherung von Stickstoff und Energie dient. Das Cyanophycin ist aus den Aminosäuren Asparaginsäure und Arginin aufgebaut, die ein Polymer bilden.

1.2 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Das einzellige Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gehört zur morphologischen Gruppe der Chroococcales und kommt im Süßwasser vor. Es besitzt die Photosysteme I und II, kann aber auch mit Glukose unter LAHG (Light activated heterotrophic growth) - Bedingungen wachsen (Anderson und McIntosh 1991). Das gesamte Genom besitzt eine Grösse von 3.573.470 bp mit 3168 Leseramen (Kaneko et al 1996).

Ein weiteres Merkmal ist die natürliche Transformierbarkeit sowie das homologe Rekombinationsvermögen (Grigorieva und Shestakov 1982).

1.3 Aufbau des Photosystems I der Cyanobakterien

Während der Photosynthese von Pflanzen und Cyanobakterien wird die Aufgabe der

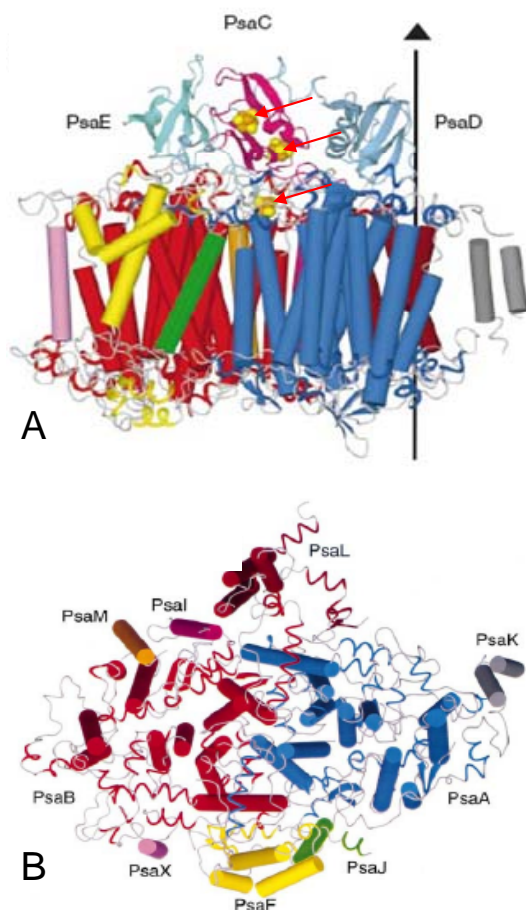


Abbildung 1: A: PS I-Monomer: gezeigt sind die Positionen der stromalen peripheren Proteine PsaC, D und E aufsitzend auf den restlichen Transmembranproteinen (Jordan et al. 2001). B: Aufsicht von der stromalen Seite auf ein PS I-Monomer: gezeigt sind die Positionen der Transmembranproteine ohne die peripheren Proteine. (Fromme et al. 2001).

Ladungstrennung von den zwei Photosystemen I und II wahrgenommen. Die Benennung der einzelnen Systeme ist dabei historisch bedingt und entspricht nicht der funktionellen Reihenfolge. Das Photosystem I, auf das im Weiteren eingegangen werden soll, transportiert die Elektronen vom Plastocyanin auf der Lumenseite zum Ferredoxin auf der Stromaseite der Thylakoide. Das cyanobakterielle PS I liegt als Trimer vor, von denen jedes Monomer aus mindestens 11 Proteinuntereinheiten besteht, die 127 Cofaktoren koordinieren (Boekema et al. 1997). Im Falle von *Synechococcus elongatus* konnte eine 12. Proteinuntereinheit identifiziert werden, die als PsaX bezeichnet wird. Neun Untereinheiten sind Transmembranproteine: PsaA, PsaB, PsaF, PsaL, PsaK, PsaJ, PsaX, PsaM und PsaI. PsaD, PsaE und PsaC sind periphere Proteine, die an den Thylakoiden auf der Stromaseite liegen (Abbildung 1). Im Falle von *Synechococcus elongatus* setzt sich die

Menge der Cofaktoren des PS I aus 96 Chlorophyll a, 22 Carotinoiden, 3 [4Fe4S]-Cluster (F_A , F_B , und F_X), 4 Lipiden, 2 Phyllochinonen und einem Ca^{2+} zusammen (Jordan et al. 2001). Im Zentrum eines Monomers sitzen die Untereinheiten PsaA (83 kDa) und PsaB (82,4 kDa), die beide elf Transmembranhelices besitzen. Von diesen Untereinheiten werden die meisten der Cofaktoren gebunden, darunter auch die für den Elektronentransfer zuständigen Chlorophylle. Die restlichen Proteinuntereinheiten sind am zentralen PsaA/B-Komplex peripher angeordnet und helfen bei der Koordination der restlichen Cofaktoren. Auf der Stromaseite bilden die Untereinheiten PsaC (9,3 kDa), D (15,6 kDa) und E (8,0 kDa) wahrscheinlich eine Tasche zur Aufnahme des Ferredoxins (Abbildung 2) (Jordan et al 2001, Xu et al. 2001). PsaC enthält die

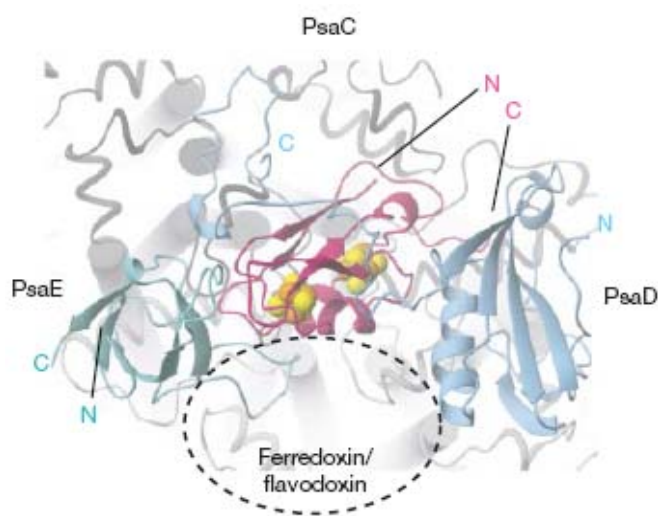


Abbildung 2: PsaC,D und E bilden eine Tasche für Ferredoxin oder Flavodoxin. Gezeigt sind außerdem F_A und F_B . N= N-terminales Ende, C= C-terminales Ende (Jordan et al. 2001)

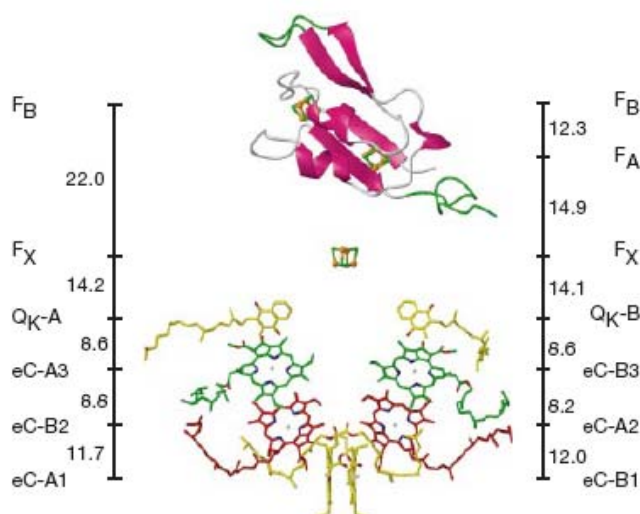


Abbildung 3: Cofaktoren des Elektronentransportes in Photosystem I: Rechts bzw. links zu sehen sind die Namen und die Abstände in Angström. Die Cluster F_A und F_B sind zusammen mit PsaC abgebildet. (Jordan et al. 2001)

[4Fe4S]-Cluster F_A und F_B . PsaE interagiert wahrscheinlich mit PsaC. PsaD hält die zwei Untereinheiten PsaC und E in Position und ist somit auch für den Elektronentransport von F_X zu $F_{A/B}$ zuständig. Auf der Lumenseite wiederum ist eine Aushöhlung zu erkennen, die wahrscheinlich zum Binden eines Cytochrom c_6 oder Plastocyanin dient (Fromme et al. 1994).

Der Elektronentransfers im PS I wird durch sechs Chlorophylle, zwei Phyllochinone und drei [4Fe4S]-Cluster bewerkstelligt.

Die Chlorophylle und Chinone sind dabei in zwei Ästen A und B angeordnet (Abbildung 3).

Der Elektronentransfer wird vom Donator, dem P700 initiiert, welches aus den Chlorophyllen eC-A1/eC-B1 besteht, über die Chlorophyll a-Moleküle eC-A2/eC-B2 auf den Elektronenakzeptor A_0 übertragen, welcher sich aus den Chlorophyllen

eC-A3/eC-B3 zusammensetzt. Von dort aus gehen die Elektronen auf den Akzeptor A_1 über, der aus den Chinonen QK-A und QK-B besteht, und werden darauf der Reihe nach auf die drei [4Fe4S]-Cluster F_X , F_A und F_B übertragen. Von dort aus werden sie auf der Stromaseite der Thylakoide über Ferredoxin zur $NADP^+$ -Reduktase transferiert (Brettel 1997, Jordan et al. 2001). Nicht vollständig geklärt ist bei diesem Mechanismus der Übertragung der Elektronen, ob beide Arme gleich aktiv sind. Spektroskopische Messungen deuten jedoch an, dass wahrscheinlich der Arm A der langsamere sein könnte, bzw. dass sich die Aktivität der Arme zwischen verschiedenen Organismen unterscheidet (Guergova-Kuras et al. 2001, Giera et al. 2009).

1.4 *Nostoc* sp. PCC 7120

Das gramnegative fädige Cyanobakterium *Nostoc* PCC 7120 gehört taxonomisch in die

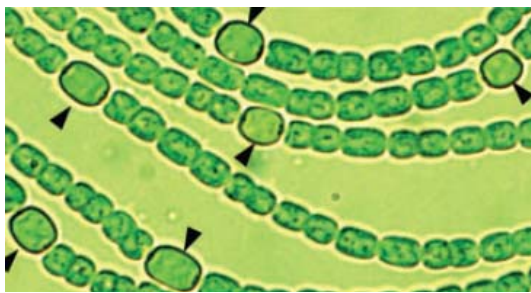


Abbildung 4: Filamente von *Nostoc* sp. PCC 7120. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Heterocysten (Zhang et al. 2006)

Ordnung der Nostocales. *Nostoc* PCC 7120 ist ein filamentöses Cyanobakterium, dessen Wachstum nur durch binäre Zellteilung in planarer Ebene stattfindet. Die Teilungsrate bleibt im gesamten Trichom gleich (Castenholz 1989, Komarek and Anagnostidis 1989, Whitton, 1989). In der Abwesenheit von fixiertem Stickstoff differenzieren sich 5 - 10 % aller vegetativen Zellen zu Heterocysten aus, welche

rundlicher und größer sind als die 3 - 3,5 μm großen vegetativen Zellen (Abbildung 4).

Aufgrund der heterocystentragenden Trichome wurde *Nostoc* sp. PCC 7120 anhand des morphologischen Erscheinungsbildes zuerst in die Gattung *Anabaena* eingeordnet. Durch molekularbiologische Untersuchungen wurde festgestellt, dass die strukturell sehr ähnlichen Mitglieder der Gattungen *Nostoc* und *Anabaena* sich in verschiedene Verwandtschaftsgruppen aufteilen lassen, wobei *Nostoc* sp. PCC 7120 innerhalb der Gruppe der Nostocales heute zu den Nostocaceae gerechnet wird (Rippka und Herdman 1992). Begründet ist diese Umgruppierung durch DNA-DNA-Hybridisierungsdaten, welche für *Nostoc* sp. PCC 7120 eine mehr als 70%ige relative Bindungsrate zu *Nostoc*-Vertretern ergaben (Lachance 1981).

Als Ausbreitungseinheit dienen dem Organismus heterocystenlose Hormogonien, die, abweichend von den anderen Stämmen, keine Gasvesikel bilden. Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich spontane Mutation, die eine Gasvesikelbildung verhindert, denn die für die

Strukturproteine der Gasvesikel codierenden Gene *gvpA* und *gvpC* sind im gesamten Gencluster vorhanden.

1.5 Heterocysten

Zusätzlich zu der normalen gramnegativen Zellwand sind den Heterocysten zwei zusätzliche Schichten aufgelagert. Die erste folgt auf die Außenmembran und besteht aus den zwei Glykolipiden 1-(O- α -D-glucopyranosyl)-3-keto-25-hexacosanediol und 1-(O- α -D-glucopyranosyl)-3-keto-25-hexacosanol (Gambacorta et al. 1996). Sie dient dem Ausschluss des extrazellulären Sauerstoffs. Die darauffolgende Schicht setzt sich aus Polysacchariden zusammen und dient dem Schutz der empfindlichen Lipidschicht. In *Anabaena cylindrica* setzt sie sich aus einem repetitiven Element zusammen, das aus einem Mannosyl- und vier Glykosylresten besteht. Zusätzlich besitzt es Seitenketten aus Glukose, Xylose, Galaktose oder Mannose, die $\beta(1-4)$ glykosidisch verbunden sind (Cardemil und Wolk 1996). Durch kleine Kanäle in der Heterocystenzellwand erfolgt ein Stoffaustausch zwischen den vegetativen Zellen und den Heterocysten (Meeks und Elhai 2002, Mullineaux et al. 2008).

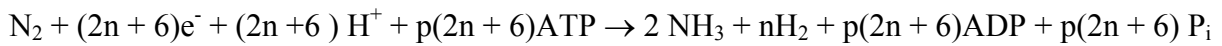
Neben diesen morphologischen Besonderheiten unterscheiden sich Heterocysten von vegetativen Zellen durch einen generell niedrigeren Gehalt an Phycobilisomen und dem Verlust sowohl an Komponenten des Photosystems II als auch der Enzyme des reduktiven Pentosephosphatzyklus (Haselkorn 1978, Adams und Carr 1981, Wolk et al. 1994). Durch den Wegfall eines aktiven Photosystems II findet keine photolytische Spaltung des Wassers statt, also auch keine Sauerstoffentwicklung, die zur Inaktivierung der Nitrogenase führen könnte.

1.6 Enzyme des Wasserstoffmetabolismus

Im Folgenden sollen mehrere Enzyme beschrieben werden, die Wasserstoff entweder produzieren oder aufnehmen können. Als erstes ist die Nitrogenase zu nennen, die Wasserstoff während der Fixierung von Luftstickstoff produziert. Die zweite Gruppe der Enzyme sind die Hydrogenasen, welche nach dem Metall in ihrem aktiven Zentrum eingeteilt werden können (Volbeda et al. 1995, Peters et al. 1998). Somit ergeben sich drei Klassen, die der [NiFe]-, der [FeFe]- und die der [Fe]-Hydrogenasen.

1.6.1 Nitrogenase

Bei der Fixierung von molekularem Stickstoff zu Ammonium wird unter ATP-Verbrauch auch Wasserstoff produziert, welcher von einer aufnehmenden Hydrogenase wieder in den Stoffwechsel der Photosynthese eingeschleust wird. Die stöchiometrische Gleichung sieht dabei folgendermaßen aus (Rees et al. 2005):



Die Werte für n sind dabei je nach Art des aktiven Zentrums unterschiedlich. Für molybdänhaltige Nitrogenasen nimmt n dabei den Wert 1 an, während er für vanadiumhaltige 3 und für „Nur Eisen“-Nitrogenasen 7,5 beträgt, während „p“ unter experimentellen Bedingungen einen Wert >2 annimmt, obwohl er rechnerisch bei =2 liegen sollte. Die Wechselzahl des Enzyms ist dabei sehr gering. Sie beträgt weniger als 10 Umsätze pro Sekunde (Tamagnini et al. 2007). Cyanobakterielle Nitrogenasen besitzen wie erwähnt verschiedene Metalle in ihren Reaktionszentren. So kann das aktive Zentrum entweder

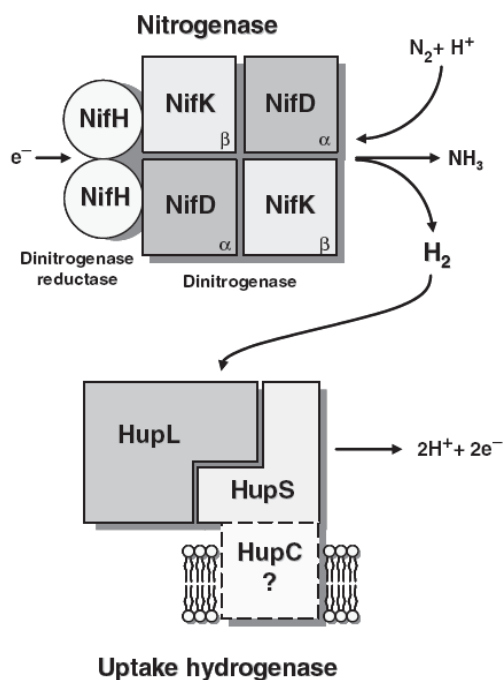


Abbildung 5: Aufbau der Nitrogenase. Der gebildete Wasserstoff wird von der aufnehmenden Hydrogenase verwendet (Tamagnini et al. 2007)

Molybdän, Vanadium oder Eisen enthalten (Eady, 1996, Zhao et al. 2006). Die verschiedenen Varianten entstammen dabei unterschiedlichen Genprodukten. Ist genügend Molybdän vorhanden, wird eine molybdänhaltige Nitrogenase synthetisiert. Besteht Mangel an diesem Element, wird ein Enzym mit Vanadium produziert. Eine Verknappung von Vanadium führt schließlich zu einer Expression der „Nur Eisen“-Nitrogenase. Allerdings kommt es bei Cyanobakterien nicht zu einer Expression des Enzyms mit ausschließlich Eisen im aktiven Zentrum.

Die Nitrogenase setzt sich aus der Dinitrogenase und der Dinitrogenase-Reduktase zusammen. Die Dinitrogenase besteht aus einem α₂β₂-Tetramer, welches ca. 220 - 240 kDa schwer ist

(Abbildung 5). Sie katalysiert die Reaktion von molekularem Stickstoff zu Ammonium. Die Dinitrogenase dagegen ist ein Homodimer von 60 - 70 kDa, das den Elektronentransfer von einem Ferredoxin bzw. Flavodoxin auf die Dinitrogenase bewerkstelligt (Orme-Johnson 1992). Der während der Reaktion entstandene Wasserstoff wird von der aufnehmenden

Hydrogenase wieder in den Elektronentransfer-Kreislauf eingespeist. Da die Nitrogenase extrem sauerstoffempfindlich ist, wurden im Verlauf der Evolution verschiedene Ansätze entwickelt, um die Stickstofffixierung von der oxygenen Photosynthese zu trennen und so der Inaktivierung durch Sauerstoff zu entgehen. Es existieren eine zeitliche oder eine räumliche Trennung. Die erste ist bei unizellulären autotrophen Organismen verwirklicht, die einem Tag-Nacht-Rhythmus unterliegen. Bei der räumlichen Trennung lassen sich wiederum drei Varianten unterscheiden. Die erste Möglichkeit der räumlichen Trennung besteht in der Ausbildung von bakteriellen Matten, in denen anoxische Verhältnisse entstehen, wie z. B. bei *Microcoleus chthonoplastes* oder *Lyngbya aestuarii* (van Hoek 1993). In der zweiten Variante differenzieren sich Zellen zeitlich zu Stickstofffixierenden Einheiten, um zu einem späteren Zeitpunkt wieder zu einer photosynthetisch aktiven Zellen zu werden, wie es z. B. bei *Trichodesmium erythraeum* der Fall ist (Berman-Frank et al. 2001). Die dritte Möglichkeit der räumlichen Trennung besteht darin, dass sich Zellen von photosynthetisch aktiven vegetativen Zellen zu stickstofffixierenden Zellen, den Heterocysten differenzieren (Stewart, 1983). Diese Differenzierung ist unumkehrbar und kommt so z.B. bei *Nostoc* sp. PCC 7120 vor. Während die vegetativen Zellen photosynthetisch hergestellte Kohlenstoffverbindungen an die Heterocysten liefern, erhalten sie im Gegenzug von diesen Glutamin als Stickstoffverbindung (Meeks et al. 1978).

1.6.2 Hydrogenasen

Grundsätzlich katalysieren Hydrogenasen folgende Reaktion: $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \Leftrightarrow \text{H}_2$.

Die Reaktion ist dabei reversibel und die Richtung hängt von den Redoxpotentialen der Reaktionspartner ab. Bei Anwesenheit eines Partners mit niedrigem Potential läuft die Reaktion in Richtung Wasserstoffproduktion ab (Vignais und Billoud 2007). Insgesamt können drei Klassen von Hydrogenasen unterschieden werden (s.o.).

Die [Fe]-Hydrogenasen wurden bisher nur bei methanogenen Archaea gefunden. Sie sind in diesen Organismen in die CO_2 -Reduktion involviert, indem sie in einem Zwischenschritt die Reduktion von Methenyltetrahydromethanopterin mit H_2 zu Methylentetrahydromethanopterin und H^+ katalysieren (Zirngibl et al. 1990).

[NiFe]-Hydrogenasen kommen sowohl bei Archea, als auch bei gramnegativen Bakterien vor. Ihre Hauptaufgabe besteht vornehmlich in der Spaltung bzw. Aufnahme von H_2 . Eine genauere Beschreibung soll im Weiteren folgen.

Den dritten Typus bilden die [FeFe]-Hydrogenasen, welche in anaeroben Prokaryoten, als auch exklusiv in niederen Eukaryoten vorkommen (Adams 1990, Akhmanova et al. 1998). In Eukaryoten sind sie entweder in Chloroplasten oder in Hydrogenosomen lokalisiert. Auch diese Hydrogenasen sollen im Verlauf noch genauer beschrieben werden.

Alle drei Typen von Hydrogenasen besitzen untereinander keine Homologien auf Sequenzebene (Vignais and Colbeau 2004). Trotzdem benutzen sie alle Eisen-Carbonyle in ihren aktiven Zentren. Weiterhin auffällig sind CN-Verbindungen in den aktiven Zentren der [NiFe]- [FeFe]- und [Fe]-Hydrogenasen, die diese koordinieren und in der Natur äußerst selten zu finden sind.

1.6.3 [NiFe]-Hydrogenase

Die bakterielle [NiFe]-Hydrogenase besteht aus einem $\alpha\beta$ -Heterodimer, dessen große α -Untereinheit das aktive Zentrum enthält und ein Gewicht von ca. 60 kDa besitzt, während die kleinere β -Untereinheit ca. 28 kDa schwer ist und die Eisen-Schwefel-Cluster zur

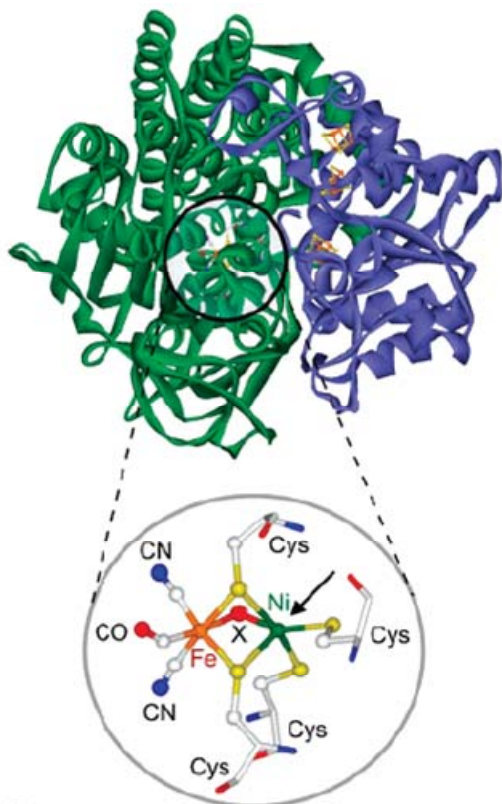


Abbildung 6: [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas*. Grün ist die große Untereinheit gekennzeichnet, blau die kleine. Das aktive Zentrum ist vergrößert dargestellt. Der Pfeil markiert die Koordinierungsstelle für die Protonen. (Lubitz et al. 2007)

Übertragung der Elektronen enthält. Die Größe der beiden Untereinheiten ist bei multimeren Hydrogenasen etwas geringer (Vignais und Billoud 2007). Anhand der Kristallstruktur verschiedener Vertreter der Gruppe *Desulfovibrio* konnte der Aufbau des aktiven Zentrums ermittelt werden (Abbildung 6) (Volbeda et al. 1995, Higuchi et al. 1997, Matais et al. 2001). Das aktive Zentrum liegt tief in der großen Untereinheit verborgen. Das Nickel- und das Eisenion sind dabei über die Schwefelatome zweier Cysteine miteinander verbunden. Zusätzlich wird das Nickel-Ion durch zwei weitere Cysteine koordiniert. In der Untergruppe der [NiFeSe]-Hydrogenasen ist eines der vier Cysteine durch Selenocystein ersetzt (Garcin et al. 1999). An das Eisenion sind dagegen zwei Cyanide und ein CO gebunden (Happe

et al. 1997, Volbeda et al. 1996). Die Zuleitung des Wasserstoffs an das aktive Zentrum geschieht wahrscheinlich über hydrophobe Kanäle, die eine Verbindung mit der Oberfläche des Proteins gewährleisten (Montet et al. 1997, Fontecilla-Camps et al. 2007). Als an der Weiterleitung von Protonen beteiligt, werden sowohl konservierte Histidin- und Glutamatreste als auch internes H₂O diskutiert (Volbeda 1995). Im Fall von *Desulfovibrio gigas* scheinen dafür zwei konservierte Glutamatreste (Glu18 und 46) in der großen Untereinheit, sowie freies Wasser zwischen dem [NiFe]-Komplex und der Bindestelle des Magnesiums zuständig zu sein (Fontecilla-Camps et al. 2001).

1.6.4 Klassifizierung

Grundsätzlich teilen sich die [NiFe]-Hydrogenasen in vier Gruppen ein, welche sich in verschiedene Untergruppen aufteilen können (Abbildung 7) (Vignais et al. 2001).

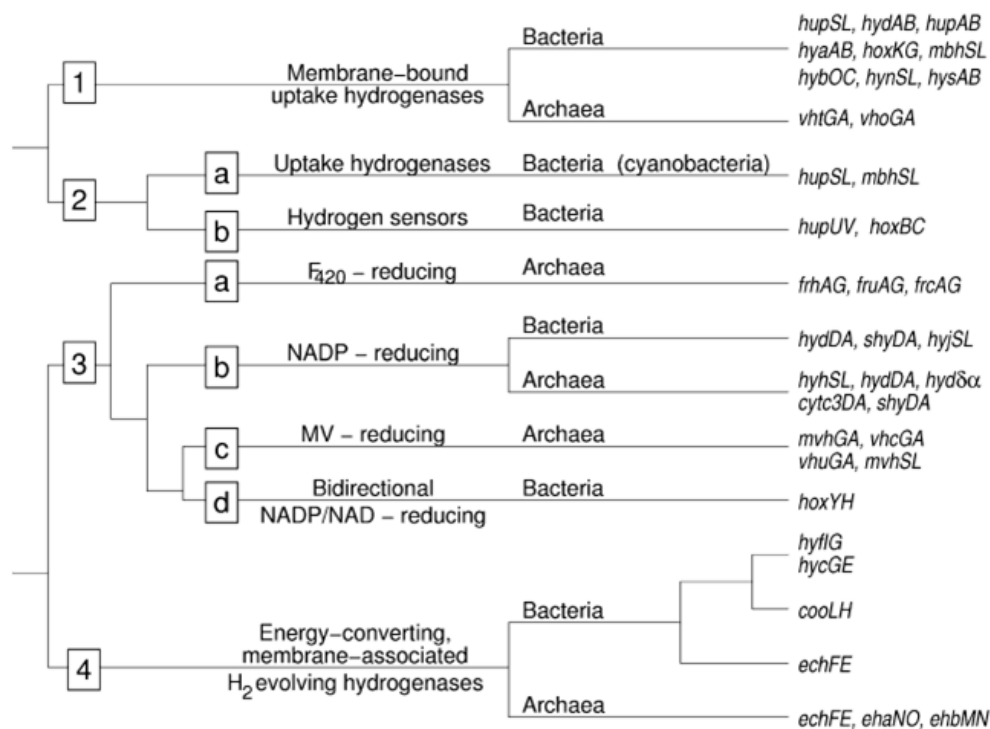


Abbildung 7: Gruppen der [NiFe]-Hydrogenasen mit Untergruppen, Funktionsbeschreibung, Vorkommen und gebräuchliche Gennamen. (Vignais et al. 2001)

Gruppe I besteht aus den membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenasen. Die Gruppe II spaltet sich in die aufnehmenden cyanobakteriellen und in die Sensor-Hydrogenasen auf. In der dritten Gruppe können Flavodoxin-, NADP-, Methylviologen- und bidirektional NADP-reduzierende Hydrogenasen gefunden werden. Die Gruppe IV bilden schließlich die membranassoziierten wasserstoffproduzierenden Hydrogenasen.

Im Folgenden sollen die einzelnen Gruppen vorgestellt und beschrieben werden.

1.6.5 Gruppe I: Membrangebundene aufnehmende [NiFe]-Hydrogenasen

Die Hydrogenasen der Gruppe I verbinden die Oxidation von H_2 mit der Reduktion von Succinat, CO_2 oder NO_3^- . Somit dienen sie der Gewinnung von Energie, indem sie am Aufbau eines Protonengradienten beteiligt sind. Diese Reaktionen werden über die Reduktion von Chinonen in der Atmungskette verknüpft. Die Hydrogenase besteht aus einer großen und

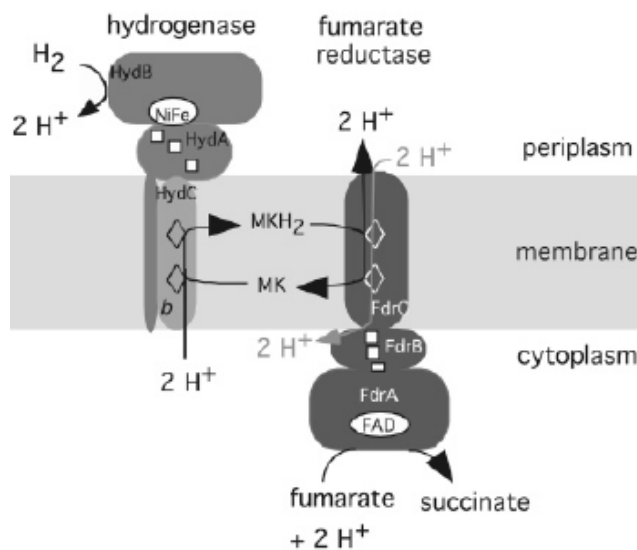


Abbildung 8: Aufnehmende Hydrogenase und Fumarat Reduktase von *Wolinella succinogenes*. HydB: große Untereinheit, HydA: kleine Untereinheit, HydC: Cytochrom b, weiße Quadrate: FeS-Cluster, Rauten: Häm-Gruppen, MK: Menachinon (Vignais und Billoud 2007)

einer kleinen Untereinheit (oft als HupL und HupS bezeichnet) und ist sowohl mit dem C-Terminus der kleinen Untereinheit, als auch mit einem Cytochrom b in der Membran verankert (Vignais und Coulbeau 2004, Vignais et al. 2004) (Abbildung 8).

Die membran-gebundenen aufnehmenden Hydrogenasen in der Gruppe I zeichnen sich durch die Anwesenheit einer Signalpeptidsequenz von 35 - 50 Aminosäuren am N-terminalen Ende der kleinen Untereinheit aus. Der konservierte Bereich sieht dabei so aus: [DENST]RRxFxK. Er dient als Signal für den Tat-Weg (twin arginine translocation)

(Weiner et al. 1998, Sargent et al. 1998). Dieser Transportweg sorgt für die Translokation des fertig gefalteten Proteins.

1.6.6 Gruppe II: Cyanobakterielle aufnehmende und Sensor-[NiFe]-Hydrogenasen

Die Hydrogenasen der Gruppe II sind denen der ersten Gruppe ähnlich. Allerdings besitzen sie keine N-terminale Signalsequenz und sind somit cytosolisch lokalisiert. Zudem weisen die kleinen Untereinheiten der Untergruppen IIa und IIb, verglichen mit denen der Gruppe I, identische Deletionen in der Aminosäuresequenz auf (Vignais and Billoud 2007). In der Gruppe IIa finden sich dabei die cyanobakteriellen aufnehmenden Hydrogenasen, welche mit

der Stickstofffixierung verbunden sind und gemeinsam mit der Nitrogenase auftreten (Ludwig et al. 2006, Appel und Schulz 1998). Auch hier werden die große und die kleine Untereinheit oft als HupS bzw. HupL bezeichnet.

Die Hydrogenasen der Gruppe IIb sind Sensor-Hydrogenasen, dh. sie registrieren die Anwesenheit von Wasserstoff und steuern die Expression von proteobakteriellen aufnehmenden Hydrogenasen (Kleihues et al. 2000). Eine weitere Besonderheit besteht darin, dass sie tolerant gegen Sauerstoff sind. Untersuchungen legen nahe, dass dies darauf zurückzuführen ist, dass der Kanal im Inneren der Hydrogenase zu schmal für die Diffusion von Sauerstoff an das aktive Zentrum der Hydrogenase (Dusche et al. 2005).

1.6.7 Gruppe III: Bidirektionale, heteromultimere, cytoplasmatische [NiFe]-Hydrogenasen

Die Hydrogenasen der dritten Gruppe kommen sowohl in Bakterien als auch in Archaea vor. Sie sind mit anderen Untereinheiten verbunden, die wiederum an Cofaktoren wie z.B. F_{420} , NAD oder NADP binden. Weiterhin sind diese Enzyme bidirektional, was bedeutet, dass sie die Cofaktoren je nach Reaktionsbedingungen sowohl oxidieren, als auch reduzieren können, sowie, dass die Reaktion $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$ der Hydrogenaseneinheit reversibel ist.

Im Weiteren sollen speziell die cyanobakteriellen Hydrogenasen der Gruppe III d beschrieben werden.

Die cyanobakterielle bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase ist ein Heteropentamer. Sie besteht aus einer Diaphoraseeinheit, welche die Oxidation von NADH bzw. NADPH katalysiert und

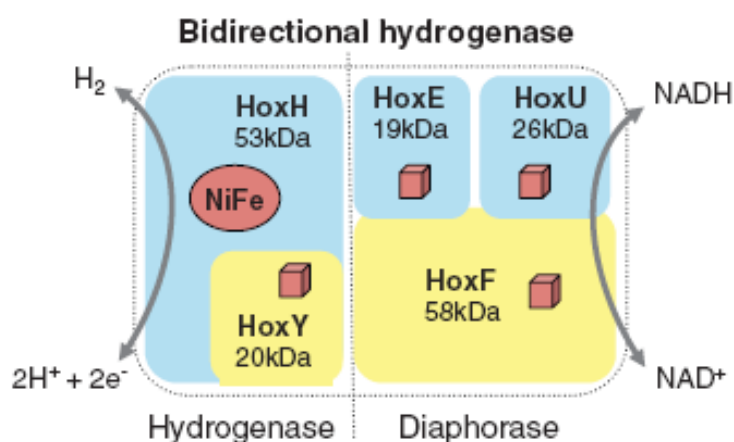


Abbildung 9: Bidirektionale Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. (Ghirardi et al. 2007)

einem Hydrogenaseteil, der für die Umsetzung des Wasserstoffs zuständig ist (Abbildung 9).

Die Diaphoraseeinheit, bestehend aus den Proteinen HoxE, F und U, ist dabei homolog zu Bestandteilen des Komplex I in der Atmungskette von Mitochondrien und Bakterien.

Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die Hydrogenase Teil von Komplex I sein

könnte (Appel und Schulz 1996, 1998, Schmitz und Bothe 1996). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass sie als Ventil für den Elektronentransport dient, wenn die Organismen nach anaerober Dunkelinkubation wieder belichtet werden (Appel et al. 2000). Im Gegensatz zu den cyanobakteriellen Hydrogenasen der Gruppe II sind diejenigen der Gruppe III d unabhängig von der Stickstofffixierung aktiv. Lokalisiert sind sie entweder löslich im Cytosol, oder leicht an der Membran gebunden (Serebriakova et al. 1994). Obwohl das Enzym grundsätzlich bidirektional ist, liegt die Reaktionsrichtung normalerweise in Richtung der Wasserstoffaufnahme, da der K_m -Wert von 2,3 μM relativ niedrig ist (Houchins und Burris 1981, Schmitz et al. 1995).

Die für die Hydrogenase codierenden *hox*-Gene befinden sich in einem Operon, vor welchem ein LexA-regulierter Promotor liegt (Abbildung 10) (Gutekunst et al. 2005, Oliveira and Lindblad 2005).



Abbildung 10: Operon der Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Ghirardi et al. 2007)

Die Hydrogenase wird von *hoxH* und *hoxY* codiert, von denen die katalytische große Untereinheit, die von *hoxH* codiert wird, sechs konservierte Cysteinreste besitzt, von denen vier an der Bindung des Nickels im aktiven Zentrum beteiligt sind (Volbeda et al. 1995, Tamagnini et al. 2002). In der kleinen Untereinheit *HoxY* befinden sich ebenfalls konservierte Cysteinreste, die wahrscheinlich für die Koordinierung eines [4Fe-4S]-Clusters zuständig sind. Die Diaphoraseeinheit enthält ein Flavin und wird durch *hoxEFU* codiert, von denen *HoxF* und *HoxU* Bindemotive für [2Fe-2S] bzw. [4Fe-4S]-Cluster besitzen und zudem für die Bindung von NAD^+/NADH zuständig sind. *HoxE* besitzt ebenfalls eine Bindestelle für einen [2Fe-2S]-Cluster und ist wahrscheinlich am Elektronentransport beteiligt. (Appel and Schulz 1996, Friedrich et al. 1995, Schmitz et al. 2002). Die offenen Leserahmen (Abbildung 10, ORF 3, 6 und 7) des Operons der Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodieren für unbekannte Genprodukte.

1.6.8 Gruppe IV: Wasserstofferzeugende, energierhaltende, membranassoziierte [NiFe]-Hydrogenasen

Die Hydrogenasen dieser Gruppe sind multimere Enzyme und besitzen mindestens sechs

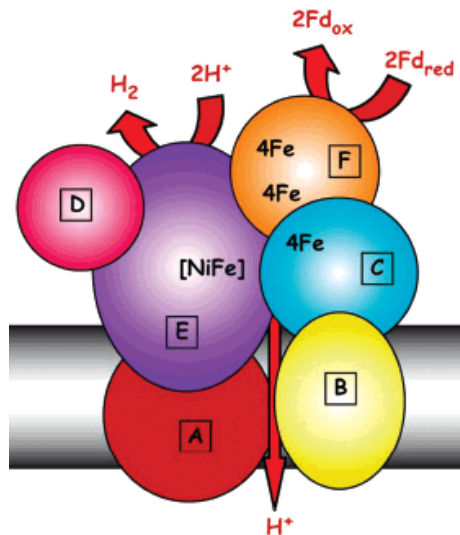


Abbildung 11: Multimere Hydrogenase von *Methanosarcina bakeri* (Fontecilla-Camps et al. 2007)

Untereinheiten (Abbildung 11). Obwohl sie in Bakterien und Archaea vorkommen, wurden die meisten bisher im letzteren Reich gefunden. Ihre Aufgabe besteht in der Reduzierung von Protonen, um den Überschuss an erzeugten Reduktionsäquivalenten abzubauen, die bei der Fermentation oder der Oxidation von H_2 und der Reduktion von e^- -Akzeptoren mit sehr niedrigem Redoxpotential entstehen.

Bei *M. bakeri* wird die Hydrogenase im Operon *echABCDE* codiert. Sie ist essentiell für die Reaktion von CO_2 zu Formylmethanofuran mittels H_2 .

Weiterhin sind zwei Untereinheiten dieser Hydrogenase homolog zu hydrophoben, membrangebundenen Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette. Gemeinsam sind sie den K^+ bzw. Na^+/H^+ -Antiportern homolog und besitzen wahrscheinlich die Funktion einer Protonenpumpe (Hedderich 2004, Fontecilla-Camps et al. 2007).

1.6.9 Die Biosynthese der [NiFe]-Hydrogenase

Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenase geschieht durch akzessorische Proteine, welche durch die Gene *hypABCDE* (*hyp* = Hydrogenase pleiotrophisch) codiert werden (Lutz et al. 1991). Die Synthese der Hydrogenasen vollzieht sich in mehreren Schritten, von denen im ersten das Fe-Ion einen Komplex mit HypC und HypD bildet (Abbildung 12). Gleichzeitig werden durch einen Komplex aus HypE und HypF Liganden gebildet und anschließend an den Eisenkomplex angelagert. Hierzu wird aus Carbamoylphosphat, welches von HypF unter Verbrauch von ATP an das terminale Ende von HypE transferiert wird, ein Thiocyanat gebildet. Dies geschieht wieder durch den Verbrauch von ATP durch Dehydrierung unter Beteiligung von HypE (Paschos et al. 2001, Reissmann et al. 2003). Die Entstehung und Anlagerung des Kohlenstoffmonoxids an den Eisenkomplex ist dagegen noch nicht verstanden.

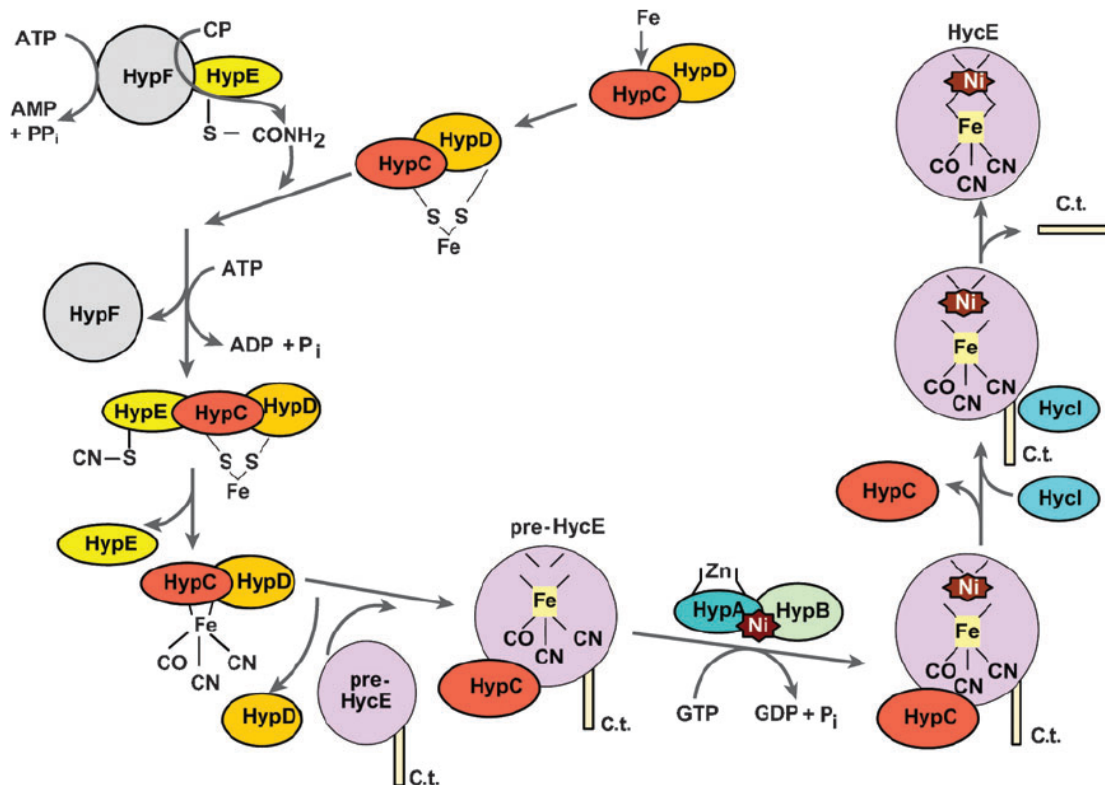


Abb. 12: Schema des Weges der Biosynthese der [NiFe]-Hydrogenase in *E. coli*. CP: Carbamoylphosphat, C.t.: C-Terminus (Ghirardi et al. 2007)

Der zum Teil assemblierte Metallkomplex wird nun von HypC auf den Vorläufer der großen Untereinheit der Hydrogenase Prä-HycE (dieser Proteinname gilt nur für *E. coli*) übertragen, welcher in einer offenen Konfiguration vorliegt und so die Metallaufnahme zulässt (Magalon und Böck 2000, Blokesch und Böck 2002). Anschließend wird das Nickelion mithilfe des Komplexes HypA/HypB eingefügt. Dabei dient das HypA wahrscheinlich zur Nickelbindung, während HypB als GTPase fungiert und als Nickelspeicher dienen kann (Maier et al. 1993 und 1995, Leach et al. 2005, Mehta et al. 2003). Nach der Nickelinsertion wird in einem letzten Schritt von HycI (der Proteinname gilt nur für *E. coli*, im Falle von *Synechocystis* sp. PCC 6803 heißt das Protein HoxW) der C-Terminus entfernt. Zusätzlich existiert in *Cupriavidus necator* ein weiteres Gen, das für HypX kodiert. Dieses Protein wird für die Sauerstofftoleranz der löslichen Hydrogenase verantwortlich gemacht, indem es eventuell weitere Koordinierungsstellen am aktiven Zentrum durch CN besetzt und so die Oxidation durch Sauerstoff verhindert (Bleijlevens et al. 2004, van der Linden et al. 2004).

1.6.10 [FeFe]-Hydrogenasen

Die [FeFe]-Hydrogenase besitzt als aktives Zentrum den sogenannten H-Cluster, welcher aus einem [4Fe4S]-Cluster besteht, der über ein Cysteinylthiolat mit einem Dieisenkomplex verbunden ist. Die zwei Eisenionen sind durch eine Dithiolatbrücke miteinander verbunden und durch CO- und CN-Gruppen koordiniert (Peters 1999) (Abbildung 13). Die Größe der katalytischen Untereinheit kann sich dabei zwischen den Organismengruppen unterscheiden. So variiert die Anzahl von zusätzlichen [FeS]-Clustern, die für die Weiterleitung der Elektronen und als Andockstelle der Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren dienen (Peters et al. 1998, 1999).

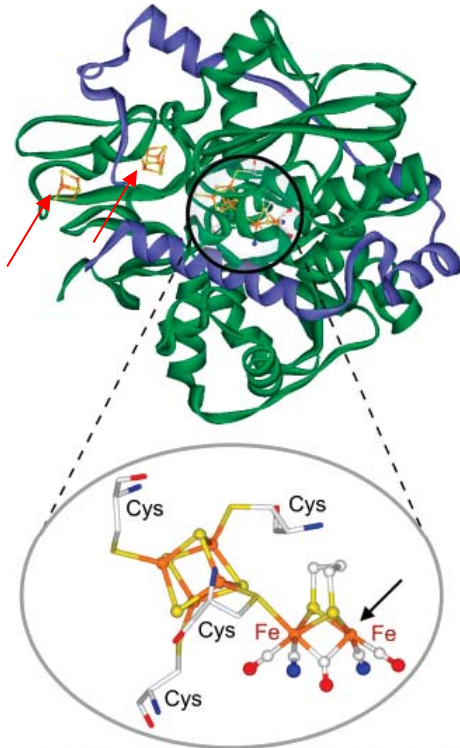


Abbildung 13: [FeFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio desulfuricans*. Der H-Cluster ist herausvergrößert. Die roten Pfeile bezeichnen zusätzliche [4Fe4S]-Cluster der katalytischen Untereinheit. (Lubitz et al. 2007)

Lokalisiert sind die Eisenhydrogenasen entweder cytosolisch, in Hydrogenosomen, in Plastiden oder periplasmatisch. In letzterem Fall besitzt die Hydrogenase ein TAT-Signal zum Transport ins Periplasma und dient der H₂-Aufnahme. Ihre Funktion ist nicht ganz klar, aber ihre Expression wird bei oxidativen Stress gesteigert (Fournier et al.

2004). Bei cytosolischer Lokalisierung sind die Hydrogenasen eher an der H₂-Produktion beteiligt und sind z.B. mit Dehydrogenasen gekoppelt oder als Elektronenventil in der Photosynthese involviert (Florin et al. 2001, Graentzdoerffer et al. 2003).

In niederen und höheren Eukaryoten kommen zusätzlich mit Eisenhydrogenasen verwandte Proteine vor. Diese werden Narf (nuclear prelamin A recognition factor) genannt. Über ihre Funktion besteht noch keine Klarheit, aber es wurde nachgewiesen, dass sie keine Hydrogenaseaktivität besitzen und zumindest in Hefe an der Synthese von Eisen-Schwefel-Proteinen beteiligt sind (Balk et al. 2004).

1.6.11 Die Biosynthese von [FeFe]-Hydrogenasen

Die Proteine für die Reifung der [FeFe]-Hydrogenasen werden von den drei Genen *hydE*, *F* und *G* codiert. Die ersten beiden Gene liegen hintereinander in einem Operon, wogegen *hydG* meist alleine vorkommt. In einzelnen Fällen liegen alle drei Gene mit zusätzlichen offenen Leserahmen in einem Operon (Posewitz et al. 2004). Durch Genvergleiche wurde ermittelt, dass *hydE* und *hydG* wahrscheinlich für Proteine kodieren, die in die Gruppe der S-Adenosylmethionin-Transferasen (SAM) gehören. Sie besitzen das typische C_{x3}-C_{x2}C-Motiv und ebenso C-terminal eine Bindestelle für Eisen-Schwefel-Cluster (Frey und Magnusson 2003). *HydF* dagegen codiert für ein Protein, dass in die Gruppe der GTPasen gehört (King et al. 2006).

Für die Biosynthese der [FeFe]-Hydrogenasen wurde kürzlich ein Mechanismus postuliert, der im Folgenden kurz erläutert werden soll (Pilet et al. 2009). In einem Hauptschritt könnte HydG Tyrosin in p-Cresol und Dehydroglycin spalten. Anlass zu dieser Hypothese gibt, dass ThiH, zu dem es eine große Ähnlichkeit besitzt, diese Reaktion während der Thiazolbiosynthese ausführt. Für diese Reaktion müsste in einem vorausgehenden Schritt von

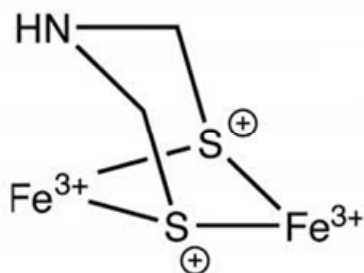


Abbildung 14: Dithiomethylamin (Pilet et al. 2009)

einem [4Fe4S]-Cluster ein Elektron auf das Adenosylmethionin übertragen werden. Aus dieser Übertragung entstehen Methionin und ein reaktives 5'-Desoxyadenosyl-Radikal (Ado°). Dieses Ado° könnte dann durch das Entfernen von einem Proton die Aufspaltung des Tyrosin bewirken, aus dem dann über Umlagerungen, sowie Decarboxylierung und Desaminierung zusammen mit einem [2Fe2S]-Cluster sowie

einem weiteren Tyrosinrest letztlich Dithiomethylamin (DTMA) entsteht (Abbildung 14). Nach der Reaktion könnte das DTMA an HydF übertragen werden, das den fertigen H-Cluster in das Apo-Hydrogenaseenzym einbaut, nachdem die CN- und CO-Substituenten durch HydE angefügt worden sind.

1.7 Der Wasserstoffhaushalt von marinen und limnischen Gewässern

Die Zusammensetzung der Erdatmosphäre ist das Ergebnis des Zusammenwirkens einer Anzahl von Prozessen. Nach Methan ist Wasserstoff mit 0,5 - 0,6 ppm das zweithäufigste Spurengas in der Atmosphäre (Novelli et al. 1999). Ungefähr 90 % des Wasserstoffs entsteht durch die photochemische Oxidation von Hydrocarbonaten wie Methan in der Atmosphäre, durch den Verbrauch fossiler Brennstoffe oder durch das Verbrennen organischer Biomasse. Auch tragen vulkanische Aktivität, Stickstofffixierung in Leguminosen und uncharakterisierte Quellen in den Ozeanen zur Entstehung von Wasserstoff bei. Der letztgenannte Punkt macht dabei ca. 6 % bzw. 6 Millionen Tonnen pro Jahr aus (Price et al. 2007). Das Entfernen des H_2 geht über die Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen in der Atmosphäre oder über Hydrogenasen im Boden vonstatten. Dabei macht die Wasserstoff-Aufnahme im Boden mit geschätzten 75 - 77 % den größten Anteil aus (Rhan et al. 2003, Price et al. 2007). Aus diesem Grund ist die H_2 -Konzentration auf der Nordhalbkugel geringer, da sich hier die größeren Landmassen befinden (Novelli et al. 1999). Im Gegensatz zum Erdreich werden in aquatischen Umgebungen übersättigte Konzentrationen von Wasserstoff an der Oberfläche gemessen. Diese Konzentrationen nehmen zur Thermokline (Temperatursprungschicht) immer weiter ab, wogegen die Tiefsee schließlich untersättigt ist. Dabei scheinen die Oberflächenwasser subtropischer und tropischer Ozeane eher eine Quelle von Wasserstoff zu sein (Scranton et al. 1982, Herr et al. 1984, Conrad und Seiler 1988). Die Konzentrationen an H_2 in der Atmosphäre der höheren Breitengrade befinden sich wiederum unter der im Gleichgewicht mit der Atmosphäre. Zugleich schwanken die Konzentrationen auch jahreszeitlich (Herr et al. 1981, Punshon et al. 2007). Auch wurden in Süßwasserseen Übersättigungen an Wasserstoff nachgewiesen, deren höchste Konzentration morgens auftritt, was mit dem Maximum der Primärproduktion korreliert (Conrad et al. 1983, Schütz et al. 1988, Schmidt und Conrad 1993). Die marine Wasserstoffaufnahme konnte isolierten Partikeln der Größe von 0,2 - 5 μm zugeordnet werden und korreliert wie in Süßwasserseen mit Wasserstoff-oxidierenden, aeroben Bakterien (Conrad et al. 1983, Punshon et al. 2007). Die Produktion von H_2 in marinen Gewässern hängt von der Sonneneinstrahlung ab und weist eine tägliche Verteilung mit einem Maximum gegen Mittag auf (Herr et al. 1981, Conrad und Seiler 1988). Da die Nitrogenase ein Molekül H_2 pro zu Ammonium reduziertem Molekül N_2 produziert, könnte die cyanobakterielle N_2 -Fixierung eine der Hauptquellen der H_2 -Produktion darstellen. Für filamentöse Cyanobakterien wurde nachgewiesen, dass ca. $0,1 \text{ nmol } H_2 \text{ h}^{-1} (\text{mg Chlorophyll})^{-1}$ in die Umgebung entweichen können (Lindberg et al. 2004). Zusätzlich kann Wasserstoff aus

dem Abbau chromogener gelöster organischer Substanz entstehen. Diese Abbauprozesse sind in limnischen, wie auch in marinen Gewässern präsent (Punshon und Moore, 2008).

2. Fragestellung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Verteilung von Hydrogenasen in limnischen und marinen Gewässern zu untersuchen. Dazu sollen sowohl die Genome cyanobakterieller Organismen, als auch die Genome aquatischer Bakterien betrachtet werden. Außer Datenbanken mit Gesamtgenomen sollen auch die metagenomischen Daten der Global-Ocean-Sampling-Datenbank in die Betrachtung miteinbezogen werden und Stammbäume für die Ermittlung der Verwandtschaftsverhältnisse erstellt werden. Insbesondere soll auch ein Augenmerk auf Hydrogenasen liegen, die entweder unbekannt und/oder zur biotechnologischen Verwendung geeignet sind.

In einem Projekt des Innofonds Schleswig-Holstein wurde mittels abgeleiteter, degenerierter Primer nach Hydrogenasen in Nord- und Ostsee, im Selenter See, im Westensee, sowie zur Kontrolle im Mittelmeer und im Nordatlantik gesucht, um auf diese Weise die Typen der Hydrogenasen, sowie die Familien der Hydrogenase besitzenden Bakterien zu ermitteln. Diese Daten sollen ausgewertet werden und zur Unterstützung der Datenbankanalysen herangezogen werden.

Die aus den ersten Teilen gewonnen Daten sollen in die Auswahl von Hydrogenasen miteinfließen, die für einen biotechnologischen Ansatz ausgewählt werden. Dafür sollen diese Hydrogenasen heterolog in den Heterocysten von *Nostoc* sp. PCC 7120 exprimiert werden, um die Möglichkeit dieses Ansatzes zu prüfen und gegebenenfalls im dortigen Mikrooxyklime Wasserstoff zu produzieren.

Weiterhin soll zur biotechnologischen Verwendung die Möglichkeit der Fusion der bidirektionalen Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 an das Photosystem I desselben Organismus untersucht werden. Hierzu sollen Fusionskonstrukte via PCR erstellt werden und anschließend per Transformation in das Genom des Cyanobakteriums integriert werden. Durch diese Fusion können die Elektronen aus der Photosynthesekette direkt auf die Hydrogenase geleitet werden und auf diese Weise Wasserstoff erzeugen. Durch die direkte Kopplung der Hydrogenase mit der Photosynthesekette könnte so eine lichtabhängige, kontinuierliche Produktion an H₂ erzeugt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Die für diese Experimente verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Amersham Biosciences (Braunschweig), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), BioRad (München), Serva (Heidelberg), Fluka (Buchs, Schweiz), Biomol (Hamburg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Riedel-de-Haën (Seelze), Roche (Mannheim) und Difco (Detroit, USA). Das deionisierte Wasser zum Herstellen der Lösungen stammte aus einer Seradest Anlage SD 2000 (USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach).

3.2 Plasmide und Bakterien

Tabelle 1: Verwendete Plasmide und Stämme von *E. coli*

Plasmid/ <i>E.coli</i>	Beschreibung	Referenz
pAM1956	Shuttlevektor: <i>Escherichia coli</i> und <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Derivat des pDU-1 Vektor Wolk et al., 1984
pAM1956nif	Expressionsvektor für die Heterocysten von <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 mit <i>nifH</i> -Promotor. Promotorfragment wurde Sall und SacI in den pAM1956 kloniert	Diese Arbeit
pAM1956nifBT	Zusätzlich wurde hinter den <i>nifH</i> -Promotor die [FeFe]-Hydrogenase von <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482 kloniert	Diese Arbeit
pAM1956nifSO	Zusätzlich wurde hinter den <i>nifH</i> -Promotor die [FeFe]-Hydrogenase von <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 kloniert	Diese Arbeit
pCRII-TOPO	<i>lacZ</i> -Gen; Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
pCRII-TOPO XL	<i>ccdb</i> -Kassette; Kanamycin-Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO- <i>psaD</i> - <i>hoxU</i>	Vektor mit Hydrogenaseoperon ab <i>hoxU</i> und <i>psaD</i> -Flanken zur Transformation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Diese Arbeit
TOPO- <i>psaD</i> - <i>hoxY</i>	Vektor mit Hydrogenaseoperon ab <i>hoxY</i> und <i>psaD</i> -Flanken zur Transformation in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Diese Arbeit
DH5 α (<i>E.coli</i>)	F ⁻ Φ 80 dLacZM15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Top10 (<i>E.coli</i>)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen, Karlsruhe
DH5 α (<i>E. coli</i>) + Plasmid pRL623	F ⁻ Φ 80 dLacZM15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44- thi-1 gyrA96 relA1</i> ; + rekombiniertes, methylierendes Plasmid pRL623	Diese Arbeit

3.3 Oligonukleotide

Die für die Polymerase-Ketten-Reaktion verwendeten Oligonukleotide stammten von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim). Aufgelistet sind nachstehend deren Namen und Sequenzen.

Name	Sequenz 5' → 3'
1 Bact. Sac-up	gagctcaatgattgtccggcataaatt
2 Bact. Sma-down	cccgggtataaatggcgttccgg
3 So Sma-up	cccgggatgacaacgacaacttatcaaccag
4 So Sma-down	cccgggctgcagctattgctgaggattgcggttaaaa
5 nifh up Sal	gtcgaccaactgctctgttatggggca
6 Nifh do sac	gagctcttttctgcaattggttg
7 PsaD-HoxU	gtaacaacagattcagggaaaacgccatcggc
8 PsaD- HoxY	cgaattttagcttcagggaaaacgccatcggc
9 HoxY-PsaD	gtttccctgaagctaaaattcgttttctaccgt
10 HoxU-PsaD	gtttccctgaatctgttgttactttaaccattga
11 HoxY-Sal	agagccaggaagtcgacggactgaaaaccacatcaact
12 PsaD-HoxY-Sal	ttttcagtcctgacttctggctctacttgettgcg
13 HoxH-Sal	agagccaggaagtcgactgtttaatcccgtggatgga
14 PsaD-HoxH-Sal	ggattaaacagtcgacttctggctctacttgettgcg
15 PsaDout1	cgtaaaagcgactggaaaacc
16 PsaDout2	cataaccccaaaccccaaca
17 HoxH-f	gtatytgyggyatttgcctgt
18 HoxH-r	ggcatttgcctrcctgyatgtgt

3.4 Anzuchtbedingungen der Organismen

3.4.1 Kultivierung von *Nostoc spec.* und *Synechocystis spec.*

Für die Kultivierung von *Nostoc*- und *Synechocystis*-Arten wurden sowohl Agarplatten mit BG-11-Medium + 15 g/l Bacto-Agar, als auch Flüssigkulturen mit BG-11-Medium (Rippka et al. 1979) verwendet. Die Organismen wurden in einer Klimakammer bei 28 °C und 5-

50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ Lichtintensität angezogen. Für Flüssigkulturen wurden 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml BG-11-Medium auf einem Schüttler (GFL Shaker 3020) bei 100 rpm angezogen. Für physiologische Experimente wurden von dieser Vorkultur Kulturröhren mit 250 ml Medium mit kontinuierlicher Luftbegasung in einer Kniese-Anlage (Kniese, Marburg) angeimpft. Das BG-11-Medium setzte sich wie folgt zusammen:

100 x BG-11:

1,76 M	NaNO_3
30,4 mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
24,5 mM	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3,12 mM	Zitronensäure
279 μM	Na_2EDTA
10 % (v/v)	1000x Spurenelementmix

1000 x Spurenelementmix:

46,3 mM	H_3BO_3
4,15 mM	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
1,61 mM	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,77 mM	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,32 mM	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0,17 mM	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1000 x Na_2CO_3 :

188,7 mM	Na_2CO_3
----------	--------------------------

1000 x K_2HPO_4 :

175,11 mM	K_2HPO_4
-----------	--------------------------

200 x TES:

2 M	TES, pH 8
-----	-----------

1000 x FeNH_4 -Citrat :

22,8 mM	FeNH_4 -Citrat
---------	-------------------------

1 Liter BG-11-Medium:

10 ml	100 x BG-11
5 ml	200 x TES
1 ml	1000 x Na_2CO_3
1 ml	1000 x K_2HPO_4
1 ml	1000 x FeNH_4 -Citrat

auf 1 Liter H_2O bidest.

BG-11-Agarplatten:

BG-11-Medium mit
15 g/l Bacto-Agar

Bei Bedarf wurde dem BG-11-Medium noch NH_4Cl bzw. Arginin zugesetzt, welches einer 1 bis 3 molaren Stammlösung entstammte. Diese wurde vorher durch einen Sterilfilter filtriert, dessen Porengröße 0,20 μm betrug. Die Endkonzentration des NH_4Cl in der Lösung betrug 5 mM, die des Arginin 10 mM. Des Weiteren wurde, wenn benötigt, zusätzlich Glukose aus einer 2 molaren Stammlösung eingesetzt. Die Endkonzentration betrug 5 mM.

Alternativ wurden die Kulturen auch in BG-11₀-Medium angezogen, welches die gleiche Zusammensetzung wie BG11-Medium besitzt, mit dem Unterschied, dass kein NaNO₃ in dem Medium vorhanden ist.

Zur Anzucht der Mutanten wurde dem Medium für die Flüssigkulturen und der Agarplatten das notwendige Antibiotikum in den folgenden Konzentrationen zugegeben:

Neomycin	40 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Spectinomycin	2 µg/ml
Streptomycin	2 µg/ml
Gentamycin	5 µg/ml
Erytromycin	25 µg/ml

Für die längerfristige Lagerung der Organismen wurden Gefrierkulturen angelegt. Dafür wurden 500 µl Kultur mit 250 µl 80 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde in Übernachtröhrchen mit 3 ml LB-Medium bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Nürtingen) bei 180 rpm über Nacht angezogen. Das LB-Medium wurde nach folgendem Protokoll gesetzt:

LB-Nährmedium:

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

auf 1 Liter H₂O bidest.

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden zusätzlich 15 g/l Bacto-Agar zum Medium gegeben. Folgende Antibiotika wurden dem Medium auf Bedarf hinzugefügt.

Kanamycin	50 µg/ml
Gentamycin	5 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml

Zur längerfristigen Lagerung wurden Gefrierkulturen hergestellt, indem 500 µl der Kultur mit 250 µl 80 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren wurden. Angeimpft wurden die Kulturen entweder mit einer Gefrierkultur oder mit Einzelkolonien von Transformanten auf einer Agarplatte.

3.5 Entnahme der Umweltproben aus marinen und limnischen Gewässern

Die Proben wurden sowohl in der Nord- und Ostsee, als auch im Westen- und Selenter See entnommen. In der Nordsee geschah dies in der Norderpiep (54°09'N / 8°31'E) und in der Ostsee in der Stollergrundrinne (54°29'N / 10°13'E). Die Proben wurden in einer Tiefe zwischen der Oberfläche und fünf Metern genommen. In den beiden Seen wurden die Proben direkt von der Oberfläche entnommen. Die Koordinaten der Probeentnahmestelle des Selenter Sees ist (54°18'25N / 10°28'53E), die des Westensees (54°17'53N / 9°57'09E). Die Proben wurden nach der Entnahme sofort gefiltert. Hierbei wurde eine Peristaltikpumpe 620S (Watson-Marlow Bredel, Rommerskirchen) verwendet. Als Filter kamen die Größen 10 µm und 0,2 µm zum Einsatz (IsoporeTM und MFTM Membrane Filters, Millipore, Schwalbach). Die Filter wurden anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

3.6 Isolierung genomischer DNA aus Bakterien

Zur Isolierung genomischer DNA wurden mit einer Impföse Zellen von einer Agarplatte in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Diese Zellen wurden in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und Glasperlen (0,25 - 0,5 mm Durchmesser) in einem Volumen von 100 µl hinzugegeben. Zusätzlich wurden 2 µl einer 10%igen SDS-Lösung (w/v) und 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol dazugegeben. Nach 3 x 10 sec Vortexen wurde der Zellaufbruch 10 min mit 10.620 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und noch einmal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Es wurde jeweils 2 min mit 10.620 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 x dem Volumen von 100 %igem Ethanol für 2 h bei -20 °C bzw. 15 min bei -80 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 17.950 g und -9 °C in der Kühlzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804R; Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation von 5 min mit 15.700 g bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415D;

Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Kreutz, Reiskirchen) getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl TE-Puffer über Nacht bei 4 °C gelöst. Die anschließende Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese.

1 x TE-Puffer:

Tris	10 mM
Na ₂ -EDTA	1 mM
auf pH 8,0 eingestellt	

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol:

Phenol-Lösung	25 Teile
Chloroform	24 Teile
Isoamylalkohol	1 Teil

Chloroform-Isoamylalkohol:

Chloroform	24 Teile
Isoamylalkohol	1 Teil

3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Verwendet wurden 0,8%ige (w/v) Gele. Dafür wurden 1,2 g Agarose (Seakem LE Agarose; BIO-Whittaker Molecular Applications, USA) in 150 ml 1 x TBE-Puffer für 6 Minuten bei 530 Watt der Mikrowelle erhitzt bzw. gekocht. Nachdem die Lösung wieder auf ca. 60 °C heruntergekühlt war, wurden 0,000075% (w/v) Ethidiumbromid dazugegeben und der Ansatz zum Auspolymerisieren in eine Apparatur (Biozym, Hess. Oldendorf) mit 12 bzw. 20 zahnigen Kämmen gegeben. Zum Auftragen der Proben wurden diese mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und in die entstandenen Geltaschen pipetiert. Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung wurde der Lambda DNA/HindIII Marker 2 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) als Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Berechnung der Konzentration der DNA geschah nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Länge der Bande x in kb}}{\text{Länge des } \lambda\text{-Genoms (48,5 kb)} * \text{Menge der aufgetragenen DNA in } \mu\text{g}} = \text{Menge der Bande x in } \mu\text{g}$$

wobei die Banden des Markers folgende Größen und Mengen an DNA bei Auftrag von insgesamt 1 µg betragen:

Bande (bp)	Menge (µg)
23.130	0,477
9416	0,194
6577	0,135
4361	0,090
2322	0,048
564	0,012
125	0,002

Zur genaueren Bestimmung der Fragmentgrößen wurde gegebenenfalls zusätzlich der Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mitaufgetragen.

Für die Gelelektrophorese wurde 1 x TBE als Puffer verwendet. Die Gelkammer (Biozym, Hess. Oldendorf) wurde mit ca. 0,75 Liter Puffer befüllt und mit der Spannungsquelle (Biometra, Göttingen) wurden 16 V/cm angelegt. Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele mit einem UV-Transilluminator (TF 20 M Vilber Lourmat; Torcy, Frankreich) bestrahlt und Photos mit einer Videodokumentationsanlage (Alpha Imager 2200; Biozym, Hess. Oldendorf) angefertigt.

10 x TBE-Puffer:

Tris	890 mM
H ₃ BO ₃	890 mM
Na ₂ -EDTA*2H ₂ O	25 mM

auf 1 Liter mit H₂O bidest. auffüllen

5 x Probenpuffer:

Glycerin	50% (v/v)
10 x TBE-Puffer	50% (v/v)
Bromphenolblau	0,2 mg/ml

3.8 DNA-Isolierung von Filtern aus Umweltproben

Zur Isolierung von DNA aus Umweltproben wurde das WaterMaster™ DNA Purification Kit von EPICENTRE® Biotechnologies bzw. das UltraClean™ Soil DNA Kit (Mo Bio, Carlsbad CA, USA) verwendet. Die Aufreinigung wurde gemäß der Anleitung der Kits durchgeführt.

3.9 Restriktionsverdau

Für den Verdau von Plasmiden wurden 2 µl einer Plasmidpräparation mit 0,1 µl (1 U) der jeweiligen Restriktionsendonuclease (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Es wurde meist

ein Gesamtvolumen von 20 μl gewählt und Puffer nach Angaben des Herstellers eingesetzt (1 μl 10 x Puffer auf 10 μl Gesamtvolumen, das restliche Volumen wurde mit H_2O bidest. aufgefüllt). Die Ansätze wurden bei 37 °C für mindestens 1 Stunde in einem Wärmeschrank (Haraeus, Hanau) inkubiert. Wenn von dem Hersteller andere Temperaturoptima für die Restriktionsenzyme angegeben waren, wurden diese verwendet.

3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) können DNA-Moleküle *in vitro* vervielfältigt werden. Die PCR wurde verändert nach Saiki et al. (1985, 1988) durchgeführt. Während der PCR wird die Menge an DNA-Molekülen durch die Wiederholung von drei Grundschritten potenziert, da mit jeder Wiederholung des Gesamtzyklus die Anzahl der DNA-Fragmente verdoppelt wird. Die grundlegenden Schritte der PCR-Reaktion bestehen aus Folgenden:

Denaturierung: Trennung der DNA-Stränge

Annelierung: Anlagerung der Oligonuklotide an die DNA

Elongation: Neusynthese der komplementären Stränge mit Hilfe der DNA-Polymerase

Es wurde folgender Standard-Ansatz verwendet:

24,5-24,75 μl H_2O bidest.

5 μl DNA (10 ng genomische DNA)

5 μl 10 x PCR-Puffer

1 μl MgSO_4 (25 mM)

4 μl dNTPs (2,5 mM)

5 μl Primer 1 (5 pmol/ μl)

5 μl Primer 2 (5 pmol/ μl)

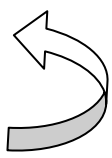
0,25-0,5 μl Pfu-Polymerase (5 U/ μl)

$\Sigma = 50 \mu\text{l}$

Zusätzlich wurde für lange Fragmente eine Variante dieses Ansatzes gewählt, bei dem ein Mix aus Taq- und Pfu-Polymerase eingesetzt wurden. Es wurden 3 U der Taq- und 0,003 U der Pfu-Polymerase eingesetzt.

Die verwendeten Puffer, das $MgSO_4$ und die Polymerasen stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), die dNTPs von Boehringer Mannheim (Mannheim). Für die PCR-Reaktionen wurden 200 μ l-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) in einem MJ Research PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research; Watertown, USA) verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach dem folgenden Programm durchgeführt:

1. Denaturierung	95 °C	1 min		40 Zyklen
2. Denaturierung	95 °C	30 sec		
3. Annealing	X °C	1 min		
4. Elongation	72 °C	Y min		
5. Elongation	72 °C	10 min		
6. Aufbewahrung	20 °C	∞ min		

Die Annealing-Temperatur wurde entweder nach der folgenden Formel berechnet:

$T_m = 69,3 + (0,41 * GC\text{-Gehalt in } \%) - (650 / \text{Länge der Oligonukleotide})$, oder es wurde die vom Hersteller (Sigma-Aldrich, Steinheim) angegebene Temperatur verwendet.

Die Elongationszeit ergab sich aus der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Je nach dessen Länge wurden 1-2 min für 1000 bp verwendet.

3.11 Fusions-PCR

Die Fusions-PCR diente zur Fusion von Fragmenten der bidirektionalen Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 an das PsaD des Photosystem I im gleichen Organismus. Die Fusion erfolgte nach Chenchik et al. (1996). Im ersten Schritt wurden über eine Standard-PCR zunächst zwei PCR-Produkte hergestellt, die ca. 350-700 bp homolog zu Bereichen stromab- bzw. stromaufwärts der Stelle im Genom sind, an der die spätere Rekombination stattfinden soll. Durch die Primer wurden an die Enden der PCR-Produkte 20 bp angefügt, die mit der 5'- bzw. 3'-Sequenz des zu fusionierenden Zwischenstückes übereinstimmten, so dass das fertige Fusionskonstrukt aus drei einzelnen Teilen erzeugt wurde. Das Zwischenfragment wurde auch mittels PCR erzeugt.

Für die eigentliche Fusion wurden dann insgesamt 100 ng DNA der drei zu fusionierenden Fragmente eingesetzt. Es wurde die gleiche Anzahl an DNA-Molekülen im Verhältnis 1:1:1

eingesetzt. Dafür wurden auch die unterschiedlichen Größen der einzelnen DNA-Fragmente in ihr Verhältnis gesetzt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

PCR-Produkt 1	}	100 ng, DNA-Gehalt
PCR-Produkt 2		
PCR-Produkt 3		
dNTPs (2,5 mM)		4 µl
Puffer		5 µl
Pfu-DNA-Polymerase		0,4 µl (2 U/µl)
H ₂ O		x µl
Σ=		50 µl

Als Fusions-PCR-Programm wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

1. 95 °C	1 min	} 30 Zyklen
2. 95 °C	30 sec	
3. 60 °C	5 min	
4. 68 °C	25 min	
5. 20 °C	∞	

Im Anschluß an die Fusion wurden die dort erzeugten Produkte durch eine PCR reamplifiziert. Dafür wurden von den Fusions-Produkten verschiedene Verdünnungen hergestellt: 1:10, 1:100 und 1:1000. Jeweils 5 µl wurden in die PCR eingesetzt. Zur Reamplifikation wurden die äußeren Primer der in die Fusion eingesetzten PCR-Produkte verwendet.

3.12 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die zu isolierenden Fragmente der DNA wurden nach dem Auftrennen in einem 0,8%igen Agarosegel mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und durch die Verwendung des High Pure PCR Product Purification Kits der Firma Roche (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Für lange PCR-Fragmente wurde das TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Es wurde sich nach den Angaben des Herstellers gerichtet.

3.13 Dephosphorylierung mit der Shrimp Alkalinen Phosphatase (SAP)

Um eine Selbstligation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung des Vektors mit der Shrimp Alkalinen Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Durch das Entfernen der 5'-Phosphatreste können später während der Ligation nur DNA-Fragmente mit intakten Phosphatresten eingebaut werden. Für die Dephosphorylierung wurden zu einem inaktivierten Restriktionsverdau 0,1 U SAP pro picomol an DNA-Enden zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 65 °C für 20 min.

3.14 Adenylierung von PCR-Produkten

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden vor der Ligation in den TOPO-Vektor adenyliert, also Adenosin-Überhänge an das 3'-Ende angefügt. Dafür wurde folgender Ansatz gemacht:

40 µl PCR-Produkt

5 µl 10 x PCR-Puffer

2 µl MgCl₂ (25 mM)

3 µl dNTPs (2,5 mM)

0,25 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)


Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 72 °C in einem MJ Research PTC-200 Gradienten Cycler (MJ Research, Watertown, USA).

3.15 Ligation

Die Ligationen von PCR-Produkten in den TOPO- bzw. TOPO XL-Vektor erfolgten unter der Verwendung des TOPO TA bzw. XL Cloning Kits der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

Für die Ligationen in andere Vektoren wurden 50-200 ng Vektor-DNA mit dem Insert im molaren Verhältnis 1:1 oder 1:3 eingesetzt. Es wurde 10x Ligations-Puffer (MBI Fermentas, St. Leon Rot) und 2 µl T4-Ligase (5 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt.

Für die Ligationsansätze wurden 0,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet und in einem Thermocycler (MJ Research PTC-150 Mini Cycler, Watertown, USA) folgendes Programm benutzt:

- | | | | |
|-------------------------------------|-------------------|---|------------|
| 1. 10 °C | 30 sec |  | 160 Zyklen |
| 2. auf +20 °C mit +0,4 °C pro 3 sec | | | |
| 3. 30 °C | 30 sec | | |
| 4. -20 °C | -0,4 °C pro 3 sec | | |

Die DNA-Konzentrationen des Vektors und des DNA-Inserts wurde mithilfe eines Agarosegels bestimmt. Dabei wurde die Mengen an einzusetzender DNA mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} * x \text{ kb Größe des Inserts}}{y \text{ kb Größe des Vektors}} * \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor (molares Verhältnis)}} = z \text{ ng Insert}$$

Die Inaktivierung der Ligase erfolgte für 20 min bei 65 °C. Der inaktivierte Ansatz wurde anschließend in *E. coli* transformiert.

3.16 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode

Es wurde eine 3 ml-Übernachtskultur mit 20 µl *E.coli*-Zellen (DH5α oder FTD164) aus einer Gefrierkultur angeimpft. Tags darauf wurde aus dieser Vorkultur 100 ml LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 170 rpm in einem Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen) auf eine optische Dichte von 0,6 bei 450 nm angezogen. Die OD wurde mit einem Photometer (UV-2501 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) bestimmt. Anschließend wurde die Kultur für 45 min auf Eis langsam geschüttelt, um das Wachstum zu stoppen. Im nächsten Schritt wurde die *E.coli*-Kultur in zwei 50 ml-Gefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) für 10 min bei 4 °C und 3210 g mit Hilfe einer Kühlzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) sedimentiert. Nachdem die Pellets in 20 ml kalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert worden waren, wurden sie für 30 min auf einem Schüttler auf Eis inkubiert. Hierauf wurden die Kulturen bei 3210 g für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in einem Gemisch aus 8,66 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung und 1,44 ml 100%igem Glycerin gelöst. Die entstandene Lösung wurde dann zu jeweils 100 ml in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

3.17 Transformation in *E.coli*

Nach der TOPO-Ligation erfolgte eine Transformation nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen (Karlsruhe) in TOP 10-Zellen.

Alle anderen Vektoren wurden in kompetente *E.coli*-Zellen (DH5 α oder FTD164) transformiert, indem diese aufgetaut wurden und der inaktivierte Ligationsansatz hineinpipettiert wurde. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis und anschließend für 90 s bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut 3 min auf Eis inkubiert und danach 900 μ l LB-Medium dazugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 180 rpm auf einem Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Nürtingen) inkubiert. Im Anschluss wurden 330 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert.

Am folgenden Tag wurden dann Kolonien als Übernachtskulturen angeimpft. Die bewachsenen LB-Platten wurden mit Parafilm (Nescofilm; Bando Chemical, Kobe, Japan) verschlossen und bei 4 °C gelagert.

3.18 Transformation in *Nostoc* sp. PCC 7120

Zur Transformation in *Nostoc* sp. PCC 7120 wurden die Plasmide in einem ersten Schritt in DH5 α -Zellen von *E. coli* transformiert, die zusätzlich das Plasmid pRL623 besaßen, dessen Gene für Methylasen kodieren, die zur Methylierung von AvaI- und AvaII-Schnittstellen dienen. Nach einer Plasmidpräparation wurden die Vektoren mit sterilem H₂O bidest. eluiert.

Es wurden 50 ml der zu transformierenden *Nostoc*-Kultur auf einem Schüttler bei 100 rpm/min und 50 μ E/m²/s für 5-8 Tage angezogen. Die Kulturen wurden bei 12000 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 20 ml 1 mM (pH 7,4) HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) aufgenommen. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (s.o.) mit anschließendem Waschen in HEPES-Puffer. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde das Pellet in 1500 μ l HEPES resuspendiert. Es erfolgte eine Chlorophyllbestimmung und die Chlorophyllkonzentration wurde auf ca. 50 μ g/ml Chlorophyll mit HEPES-Puffer eingestellt.

Die eigentliche Transformation geschah mittels Elektroporation. Hierzu wurden Küvetten mit einer Spaltbreite von 2 mm verwendet, die auf Eis gekühlt wurden. Direkt vor der Elektroporation wurden 40 μ l der Zellsuspension und 200 ng an Plasmid-DNA in die Küvette

gegeben. Es wurde ein Gene Pulser II (Biorad, München) mit folgenden Einstellungen verwendet: 2 kV, 25 μF , 100 Ω . Nach der Elektroporation wurden sofort 2 ml BG-11 zugegeben und der Ansatz 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in einen Erlenmeyerkolben mit 10 ml BG-11 gegeben und über Nacht auf einem Schüttler bei 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ und 100 U/min inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde der Transformationsansatz in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4500 g für 35 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml BG-11 gelöst und zwischen 100-200 μl auf BG11-Platten mit dem passenden Antibiotikum ausgebracht. Nach 10-14 Tagen wurden die entstandenen Kolonien gepickt und auf neue BG-11-Platten ausgestrichen.

3.19 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmide wurden aus 2 ml der *E.coli*-Übernachtskulturen mit dem NucleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey und Nagel (Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Bei einer größeren Anzahl an Proben wurde die Isolierung an einem MagAttractTM 96 Miniprep von der Firma Qiagen durchgeführt.

3.20 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels des Big Dye Kits an einem 96-Kappilar-Sequenzierer (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) nichtradioaktiv nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977).

3.21 Transformation in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Im ersten Schritt wurde mithilfe einer 50 ml-*Synechocystis*-Vorkultur eine Kulturröhre mit 250 ml Gesamtvolumen auf eine optische Dichte von 0,15 bei 750 nm angeimpft. Die optische Dichte wurde dabei mittels eines Photometers (UV-2501 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) bestimmt. Die Kulturröhre wurde bis zum nächsten Tag unter Luftbegasung auf eine OD_{750} von 0,3 angezogen. Die Kultur wurde mikroskopisch untersucht, um sicherzugehen, dass sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und somit viele Zellen in der Teilungsphase sind. Die Konzentration der Einzelzellen sollte 10 % möglichst nicht überschreiten, um eine hohe Transformationsrate zu erhalten.

Der Inhalt der Kulturröhre wurde für 10 min bei 3200 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrikon T-124, Kontron Instruments, Watford, UK). Das Pellet wurde in 1 ml BG-11-Medium resuspendiert. Von der entstandenen Suspension wurden 300 µl mit 10 bis 18 µg Plasmid-DNA versetzt und der Ansatz für 3 bis 4 h in einem Wasserbad bei 30 °C in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) inkubiert. Etwa alle 30 min erfolgte die Invertierung der Gefäße, um eine Durchmischung herbeizuführen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 100 µl des Transformationsansatzes auf Nitrocellulosefiltern ausgestrichen, die auf BG-11-Agarplatten auflagen, die zusätzlich 5 mM Glukose enthielten. Es folgte eine Inkubationszeit von zwei Tagen in einer Klimakammer bei 28 °C und 5 µE/m²/sec. Anschließend wurden die Nitrocellulosefilter auf BG11-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum und 5 mM Glukose (bei Bedarf) überführt. Nach zwei Wochen konnten Einzelkolonien auf Platten ausgestrichen werden. Neu entstandene Kolonien wurden wiederum auf neue Platten überführt. Nach 6-8maligem Überimpfen wurde DNA der Mutanten isoliert und auf erfolgreiche Segregation überprüft, was bedeutet, dass dann die Konstrukte in allen Kopien des Genoms vorhanden sind.

3.22 Southern Blot

Die genomische DNA der *Synechocystis*-Mutanten wurde isoliert (siehe 3.6) und ca. 200 ng dieser DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut (siehe 3.9). Zur Kontrolle wurde DNA des untransformierten Stammes verwendet. Die Proben wurden auf ein 0,8%iges Agarose-Gel aufgetragen und eine Spannung von 16 V/cm angelegt. Zur Größenbestimmung wurde ein mit Digoxigenin (DIG) markierter λ-DNA/HindIII-Marker (DNA-Molecular-Weight MarkerII; Boehringer Mannheim, Mannheim) verwendet (siehe 3.7).

Die Herstellung der Sonde für die DNA-DNA-Hybridisierung erfolgte mittels einer PCR mit Hilfe des PCR DIG-Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim), durch welches die Sonde DIG-markiert wurde.

Auf die Gelelektrophorese folgte eine Inkubation des Gels auf einem Schüttler von zweimal 20 min in Denaturierungspuffer und anschließend zweimal 15 min in Neutralisierungspuffer. Für den sich anschließenden Kapillarblot wurde eine Nylonmembran (Porablot NY amp; Macherey und Nagel, Düren), sowie 20x SSC-Puffer und Filterpapierstreifen (GB002 Gel-Blotting Paper; Schleicher und Schuell, Dassel) verwendet. Letztere waren zuvor in 2x SSC getränkt worden. Die DNA wurde nach einer Blotzeit von ca. 16 h mit dem UV-Crosslinker (UV Stratalinker 1800; Stratagene, Heidelberg) auf der Membran fixiert.

Auf die Fixierung der Membran folgte die Inkubation mit 30 ml Vorhybridisierungspuffer in einer Hybridisierungsröhre für 1 h bei 68 °C in Röhren im Hybridisierungssofen (OV2 von Biometra, Göttingen). Anschließend wurde dem Vorhybridisierungspuffer die Sonde zugesetzt. Die Konzentration hierbei betrug 20 ng DNA/ml Puffer. Vor der Zugabe war die Sonde 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert worden. Die Hybridisierung der DNA erfolgte anschließend über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungssofen. Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal bei Raumtemperatur 5 min in 2x SSC-Lösung mit 0,1% (w/v) SDS geschwenkt und dann zweimal 15 min in 0,5x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS bei 68°C im Hybridisierungssofen gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran zunächst für 1 min bei Raumtemperatur in Puffer 1 auf dem Schüttler und danach in Puffer 2 ohne Antikörper 1 h bei Raumtemperatur ebenfalls auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde dieser gegen Puffer 2, der 1: 10.000 mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments; Boehringer Mannheim, Mannheim) versetzt worden war, ausgetauscht. Die Aktivität des Antikörpers betrug 75 mU/ml. Als Inkubationsdauer wurden 30 min gewählt. Es folgten zwei Waschschrte auf dem Schüttler von jeweils 15 min bei Raumtemperatur in Puffer 1 mit 0,3 % (v/v) Tween. Nach einer kurzen Inkubation von 1 min in Puffer 3 wurde die Membran auf einen aufgeschnittenen Gefrierbeutel gelegt und eine Mischung aus 3 ml Puffer 3 und 30 µl CDP-Star (Boehringer Mannheim, Mannheim) daraufgegeben. Nach einer Dunkelinkubation von 6 min wurde die Membran in einen neuen Gefrierbeutel überführt, eingeschweißt und in eine Expositionskassette geklebt. Es wurde ein Röntgenfilm (X-OMAT AR-Film XAR-5, Kodak, Stuttgart) für 20 sec bis 1 h aufgelegt. Anschließend wurde der Film für 5 min in einer Entwicklerlösung (D-76; Kodak, Stuttgart) geschwenkt, kurz in Wasser gewaschen und für ca. 10 min in Fixierlösung (1:7-Verdünnung; Superfix Plus, Tetenal, Norderstedt) inkubiert. Daraufhin wurde der Film ca. 30 min in Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt.

Denaturierungspuffer:

NaOH 20 g (0,5 M)

NaCl 88 g (1,5 M)

auf 1 Liter H₂O bidest.**Neutralisierungspuffer:**

Tris 60,6 g (0,5 M)

NaCl 176 g (3,0 M)

auf 1 Liter H₂O bidest.

und mit HCl pH 7,5 eingestellt

20 x SSC:

Na₂-Citrat*2H₂O 88,2 g (3 M)
 NaCl 176 g (0,3 M)

auf 1 Liter H₂O bidest.

und mit HCl pH 7,0 eingestellt

Blocking-Reagenz (10 % w/v):

Blocking-Reagenz 10 g

(Boehringer Mannheim, Mannheim)

auf 100 ml Puffer 1

Puffer 1:

Maleinsäure 11,6 g
 NaCl 8,8 g
 NaOH 8,0 g

auf 1 Liter H₂O bidest.

und mit NaOH pH 7,5 eingestellt

Puffer 2:

Blocking-Reagenz 10 ml

Puffer 1 90 ml

Puffer 3:

Tris 12,1 g

NaCl 5,8 g

auf 1 Liter H₂O bidest.

Puffer 1 mit Tween:

Puffer 1 + 0,3 % (w/v) Tween 20 (Serva, Heidelberg)

(Vor-)Hybridisierungspuffer:

20 x SSC 25 ml
 N-Lauroylsarcosin-Lösung
 (Natriumsalz) (10 % w/v) 1 ml
 SDS-Lösung (10 % w/v) 0,2 ml
 Blocking-Reagenz (10 % w/v) 10 ml

auf 100 ml H₂O bidest.

3.23 Physiologische Methoden

3.23.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte einer Kultur wurde photometrisch (UV-2501 PC; Shimadzu, Kyoto, Japan) gemessen. Bei Cyanobakterien wurde eine Wellenlänge von 750 nm gewählt. Als Referenz wurde das entsprechende Medium genommen.

3.23.2 Chlorophyllbestimmung

Für die Chlorophyllbestimmung einer Kultur wurde dieser dreimal 1 ml entnommen. Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert und 10 min bei 15.700 g in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nach der Zugabe von 1 ml Methanol wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 10 min bei 17.950 g in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804R; Eppendorf, Hamburg) bei 20 °C zentrifugiert und dann mit dem Überstand am Photometer (UV-2501 PC; Shimadzu, Kyoto, Japan) bei folgenden Wellenlängen die Extinktion gemessen: 665; 665,5; 666; 666,5 und 750 nm. Vom höchsten Wert wurde der bei 750 nm (als Streuungskorrektur) abgezogen. Das Ergebnis ergibt x. Die Konzentration an Chlorophyll a kann nun nach folgender Formel bestimmt werden (Lichtenthaler 1987): $[\text{Chl a}] = x/0,0809 \mu\text{g/ml}$.

3.23.3 Aktivitätsmessung der Hydrogenasen

Die Aktivitätsmessung der bidirektionalen Hydrogenase erfolgte mithilfe einer Silber-Platin-Elektrode (DW 1 Liquid Clark Electrode; Hansatech Inst., Norfolk, UK) verändert nach Wang et al. (1971 und 1980). Es wurde eine Polarisationsspannung von -600 mV angelegt.

Die Elektrode wurde zwischen der Ag/AgCl-Kathode und der Pt-Anode mit einer gesättigten Kaliumchloridlösung befüllt und stand mit Hilfe einer Teflonmembran (YSI Membrane Kit Standard, Yellow Springs, Ohio, USA) mit der Reaktionskammer in Verbindung.

Die Reaktionskammer wurde über einen Wassermantel, der mit einem Wasserbad über eine Pumpe verbunden war, auf konstant 30 °C temperiert. Mit der Elektrode wurde eine Verstärkerbox (gebaut durch die Werkstatt des Fachbereich Biologie der Philips-Universität Marburg) verbunden und an diese ein Schreiber (SE-120; ABB Goerz, ABB Metrawatt, Nürnberg) angeschlossen.

Zur Kalibrierung der Elektrode wurden 100 µl wasserstoffgesättigtes Wasser und 900 µl Wasser in die Reaktionskammer gegeben. Somit wurde eine Wasserstoffkonzentration von 77,4 nmol/ml eingestellt. Insgesamt wurde vor jeder Meßreihe dreimal kalibriert.

Für die Aktivitätsmessung der Gesamthydrogenase wurden 20 µg Chlorophyll eingesetzt und mit dem jeweiligen Medium auf 850 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 50 µl Methylviologen (100 mM), das in reduzierter Form als künstlicher Elektronendonator dient,

und 100 µl Natrium-Dithionit (100 mM), welches das Methylviologen reduziert und den Sauerstoff aus der Kultur entfernt, hinzugefügt. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt. Für die Messung der Photowasserstoffproduktion wurde ebenfalls die Menge von 20 µg Chlorophyll eingesetzt. Dann wurde mit dem jeweiligen Medium auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl aufgefüllt. Nach einer Dunkelinkubationsphase von 3-5 min folgte eine Belichtung der Probe mit 140 µE/m²/s. Während dieser Zeit wurde die Wasserstoffproduktionsrate mit Hilfe des Schreibers protokolliert.

Im Falle beider Messmethoden wurde die Aktivität der Hydrogenase auf die Chlorophyllmenge bezogen und mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Steigung} * \text{Schreibergeschwindigkeit (cm/min)} * 77,4 \text{ nmol H}_2 * \text{Verdünnung}}{\text{Kalibrierung (cm)} * \text{Verstärkung des Schreibers} * \mu\text{g Chl}} = \text{Aktivität in nmol H}_2/\text{min}/\mu\text{g Chl}$$

3.24 Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Leica TCS SP 1 (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) gemacht. Als Anregungsenergie für das GFP und das Chlorophyll wurde eine Wellenlänge von 475 nm gewählt. Zur Detektion kam die Bandbreite der Wellenlängen zwischen 505-515 nm zum Einsatz. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde zwischen 640 und 670 nm gemessen.

3.25 Datenbanken und Bioinformatikprogramme

Folgende Datenbanken und Programme wurden zur Erstellung dieser Arbeit verwendet:

Datenbanken:

GOS: <http://camera.calit2.net/>

Cyanobase: <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Programme:

Blast (Altschul et al. 1997): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ClustalW (Thompson et al. 1994): <http://align.genome.jp/>

Bioedit 7.0.9 (Hall 1999): <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Boxshade 3.21: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

A Tree Viewer 1.92.1: (Zmasek und Eddy 2001):

<http://www.softpedia.com/developer/Washington-University-School-of-Medicine-25191.html>

Treeview 1.6.6: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

TreeviewX 0.5.0: <http://linnaeus.zoology.gla.ac.uk/~rpage/treeviewx/download.html>

PHYLIP 3.63 (Felsenstein 2005): <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>

Zur Berechnung der Stammbäume wurden nach der manuellen Optimierung der Alignments und dem Entfernen der Lücken die Programme Maximum Parsimony und Maximum Likelihood aus der Sammlung der Phylip-Programme verwendet. Zusätzlich wurden die Distanzen der Sequenzen mittels einer Jones-Taylor-Thornton-Matrix und dem Fitch und Margoliash-Algorithmus bestimmt (1967). Mithilfe des Parsimony- und des Fitch-Margoliash Algorithmus wurden jeweils 1000 Bootstraps berechnet, mit Maximum Likelihood jeweils 100.

4. Ergebnisse

4.1 Verteilung von Hydrogenasen in cyanobakteriellen Genomen

Die Cyanobakterien sind eine der größten prokaryotischen Gruppen, die in marinem und limnischem Oberflächenwasser vorkommen. Sie können zwei verschiedene Arten von [NiFe]-Hydrogenasen besitzen. Die erste wird bidirektionale Hydrogenase genannt, da sie in beide Richtungen arbeiten kann, während die zweite eine aufnehmende Hydrogenase ist, welche mit der Stickstofffixierung gekoppelt ist und wahrscheinlich den diazotrophen Stämmen vorbehalten ist (Appel and Schulz 1998, Tamagnini et al. 2007). Eine phylogenetische Analyse zeigte eine nahe Verwandtschaft beider Hydrogenasen zu denen der filamentösen, anoxygenen, photosynthetischen Bakterien, welche früher auch grüne nicht-Schwefel Bakterien genannt wurden (Ludwig et al. 2006).

Für die Untersuchung über die Verteilung der Hydrogenasen in der Gruppe der Cyanobakterien wurden sowohl die Datenbank des National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) als auch die Genbank „Cyanobase“ (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>) verwendet. Per BLAST-Analyse (Altschul et al. 1997) wurde sowohl nach der großen Untereinheit der Hydrogenase HoxH (Hox = hydrogen oxidation), als auch nach NifJ, HupL und NifD (Nif = nitrogen fixation, Hup = hydrogen uptake) gesucht (Tabelle 2, Organismen sind nach Habitat sortiert). Die Untersuchungen aller verfügbaren cyanobakteriellen Sequenzen zeigte die Anwesenheit der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase in allen Stämmen, die entweder aus Süßwasser, aus der Gezeitenzone, aus mikrobiologischen Matten, aus Reisfeldern oder aus Salzwiesen isoliert worden waren (Tabelle 2). Im Falle der isolierten Organismen aus der Küstenzone besaßen nur vier von sieben Stämmen, nämlich *Cyanothece* sp. CCY 0110, *Nodularia spumigena* CCY 9414, *Spirulina subsalsa* FACHB351 und *Synechococcus* sp. WH 5701 dieses Enzym, wogegen es bei isolierten Cyanobakterien aus dem offenen Ozean nicht gefunden werden konnte (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vorkommen der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase (HoxH) und der membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenase (HupL) in Cyanobakterien. Die 69 Stämme wurden nach dem Habitat, aus welchem sie isoliert wurden, aufgeteilt. *Leptolyngbya valderiana* BDU 20041 wurde bei der Analyse ausgelassen, obwohl es in der Datenbank vorhanden ist (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi), da nur etwa 89 kbp des Genoms sequenziert wurden. Die Anwesenheit von NifD ist ein Marker für die Nitrogenase. Komplette sequenzierte Stämme sind fett gedruckt. Die Einheit der Genomgröße sind Megabasen. Die Genome wurden durchsucht, indem die jeweils zugehörige Proteinsequenz zur BLAST-Analyse verwendet wurde. Die Organismen wurden nach ihrem Habitat geordnet. Datenbank: C= Cyanobase, N= NCBI

Organismus	Habitat/ Datenb.	Größe	HoxH	NifJ	HupL	NifD
Anabaena variabilis ATCC 29413	Süßwasser/ C	6.36	YP_325153	YP_323551 YP_321599	YP_325087	YP_324742
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	Süßwasser/ N	6.0	ZP_03273562	ZP_03273569		
<i>Gloeocapsa alpicola</i> str. CALU 743	Süßwasser/ N		AAO85440			
Microcystis aeruginosa NIES-843	Süßwasser/ C	5.84	YP_001656435	YP_001658828		
Microcystis aeruginosa PCC 7806	Süßwasser/ N	5.17	CAO89286	CAO88863		
Nostoc sp. PCC 7120	Süßwasser/ N	6.41	NP_484809	NP_485951 NP_486843	NP_484720	NP_485484
<i>Prochlorothrix hollandica</i>	Süßwasser/ N		U88400			
Synechococcus elongatus PCC 6301	Süßwasser/ C	2.69	YP_172265	YP_172431		
Synechococcus elongatus PCC 7942	Süßwasser/ C	2.69	YP_401572	YP_401401		
Synechocystis sp. PCC 6803	Süßwasser/ C	3.57	NP_441411	NP_442703		
<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012	Reisfeld/ N		AAN65267		AAN65266	ABA02237
Cyanothece sp. PCC 7424	Reisfeld/ N	5.94	ZP_02972728	YP_002376576	ZP_02973433	YP_00237741
Cyanothece sp. PCC 7425	Reisfeld/ N	5.37	YP_002484718	YP_002485040		ZP_03139427
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	Reisfeld/ N	5.7	ZP_03154336	ZP_03157112	ZP_03153783	ZP_03154128
Cyanothece sp. PCC 8801	Reisfeld/ N	4.68	ZP_02942892	YP_002374020	ZP_02941033	ZP_02943179
Cyanothece sp. PCC 8802	Reisfeld/ N	4.8	ZP_03143669	ZP_03141892	ZP_03142797	ZP_03144923
<i>Arthrospira maxima</i> FACHBSM	Salzwiese/ N		AAQ63961			
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB341	Salzwiese/ N		AAQ63964			
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB439	Salzwiese/ N		AAQ63960			
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB440	Salzwiese/ N		AAQ63963			
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB791	Salzwiese/ N		AAQ91344			
<i>Arthrospira platensis</i> FACHBOUQDS6	Salzwiese/ N		AAQ63959			
Microcoleus chthonoplastes PCC 7420	Salzwiese/ N	8.67	YP_002619903	YP_002620835		
<i>Lyngbya aestuarii</i> CCY 9616	Marine mikrobielle Matte/ N	7.0	ABD34839		ABD34838	ABD34836
<i>Lyngbya majuscula</i> CCAP 1446/4	Marine mikrobielle Matte/ N		AY536043		AAO66476	AAAY78884
<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	Marine mikrobielle Matte/ N	7.0	ZP_01622077	ZP_01622083	ZP_01619041	ZP_01620767
<i>Cyanobium</i> sp. PCC 7001	Gezeitenzone/ N	2.8	YP_002597857	YP_002597848		
Cyanothece sp. ATCC 51142	Gezeitenzone/ C	4.93	YP_001803731	YP_001802370	YP_001802481	YP_00180197
Synechococcus sp. PCC 7002	Gezeitenzone/ C	3.00	YP_001733469	YP_001734690		
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	Gezeitenzone/ N	6.0	YP_002710310	YP_002711016 YP_002710302		YP_00271105

<i>Cyanothece</i> sp. CCY 0110	Küste/ N	5.9	ZP_01727423	ZP_01730229	ZP_01728928	ZP_01727766
<i>Nodularia spumigena</i> CCY 9414	Küste/ N	5.3	ZP_01629499	ZP_01630855	ZP_01628406	ZP_01628430
<i>Spirulina subsalsa</i> FACHB351	Küste/ N		AY345592			
<i>Synechococcus</i> sp. CC9605	Küste/ C	2.51				
<i>Synechococcus</i> sp. CC9902	Küste/ C	2.23				
<i>Synechococcus</i> sp. BL107	Küste/ N	2.3				
<i>Synechococcus</i> sp. WH 5701	Küste/ N	3.0	ZP_01085930	ZP_01085923		
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	Offener Ozean/ N	6.24		ZP_00518015	ZP_00519188	ZP_00516387
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. AS9601	Offener Ozean/ C	1.67				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9211	Offener Ozean/ C	1.69				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9215	Offener Ozean/ C	1.74				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9301	Offener Ozean/ C	1.64				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9303	Offener Ozean/ C	2.68				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9312	Offener Ozean/ C	1.70				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9313	Offener Ozean/ C	2.41				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9515	Offener Ozean/ C	1.70				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. NATL1A	Offener Ozean/ C	1.86				
<i>Prochlorococcus marinus</i> str. NATL2A	Offener Ozean/ C	1.84				
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i> str. CCMP1375	Offener Ozean/ N	1.75				
<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> str. CCMP1986	Offener Ozean/ N	1.75				
<i>Synechococcus</i> sp. CC9311	Offener Ozean/ C	2.61				
<i>Synechococcus</i> sp. WH 7803	Offener Ozean/ C	2.37				
<i>Synechococcus</i> sp. WH 7805	Offener Ozean/ N	2.6				
<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102	Offener Ozean/ C	2.43				
<i>Trichodesmium erythraeum</i> MS101	Offener Ozean/ N	7.75			YP_722943	YP_723618
<i>Synechococcus</i> sp. RCC307	Mittelmeer/ C	2.22				
<i>Synechococcus</i> sp. RS9916	Rotes Meer / N	2.7				
<i>Synechococcus</i> sp. RS9917	Rotes Meer/ N	2.6				
<i>Synechococcus</i> sp. JA-2-3B'a(2-13)	Heiße Quelle/ C	3.04				YP_476681
<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	Heiße Quelle/ C	2.93				YP_475237
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	Heiße Quelle/ C	2.59				
<i>Acaryochloris marina</i>	Ascidie/ C	6.50	YP_001521996	YP_001522063		
<i>Gloeobacter violaceus</i> sp. PCC 7421	Stein/ C	4.66				
<i>Nostoc azollae</i>	Symbiont mit Wasserfarn/ N		ZP_03765204		ZP_03768004	ZP_03768758
<i>Nostoc punctiforme</i> sp. PCC 73102	Symbiont mit Palmfarn/ N	8.23		YP_001867453	ZP_00112356	ZP_00112319
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7422	Symbiont mit Palmfarn/ N	-10	BAE46796		BAE46791	

4.1.1 Die Verteilung der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase

„Genomstreamlining“ beschreibt den Wegfall überflüssiger Gene des Organismus für das jeweilige Habitat während der Evolution. Dieser Umstand und der Mangel an Eisen, welches für die Aktivität der Hydrogenase essentiell ist, könnte im offenen Ozean die Abwesenheit von Genen der bidirektionalen Hydrogenase in den picoplanktonischen Stämmen *Prochlorococcus* and *Synechococcus* erklären (Gutekunst et al. 2005). Trotzdem besitzen nicht einmal die im offenen Ozean vorkommenden Stämme *Crocospaera watsonii* and *Trichodesmium erythraeum* mit einer Genomgröße von über 6 Mbp diese Hydrogenase (Tabelle 2)(Abbildung 15). Wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist, besitzen Organismen mit bidirektionalen Hydrogenasen im Durchschnitt größere Genome mit einer größeren Anzahl an offenen Leserahmen, wogegen die zwei bereits erwähnten Cyanobakterien hier die Ausnahmen bilden. Trotzdem besitzen beide eine aufnehmende Hydrogenase, welche einen ähnlichen Bedarf an Eisenionen besitzt wie das bidirektionale Enzym (Tabelle 2).

Alle cyanobakteriellen Stämme, von denen eine komplette Sequenz verfügbar ist und die eine bidirektionale Hydrogenase besitzen, beherbergen zusätzlich das Gen einer Pyruvat:Flavodoxin/Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR), *nifJ*. Dieses Gen ist in den zwei Genomen von *Synechococcus* WH 5701 und *Arthrospira maxima* entweder Bestandteil des *hyp*-Gen-Clusters, oder steht in enger Verbindung zu den *hox*-Genen. Dieser Umstand weist darauf hin, dass während der Fermentation über ein PFOR ähnliches Enzym, welches die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ katalysiert, die bidirektionale Hydrogenase dazu benutzt werden könnte, Elektronen abzuführen (Tabelle 2).

4.1.2 Die Verteilung der aufnehmenden Hydrogenase und der Nitrogenase

Das Vorkommen der aufnehmenden Hydrogenase (HupL, Gruppe 2a) in Cyanobakterien korreliert nicht mit einem bestimmten Habitat, sondern mit der Diazotrophie der jeweiligen Stämme. Diese wird durch die Anwesenheit der für die Nitrogenase kodierenden Gene (z.B. *nifD*) angezeigt (Tabelle 2). Hier gibt es nur vier Ausnahmen, welche zwar die Nitrogenase besitzen, denen aber die aufnehmende Hydrogenase fehlt. Hierbei handelt es sich um drei Stämme von *Synechococcus*, welche aus einer heißen Quelle isoliert wurden, sowie *Cyanothece* sp. PCC 7425. *Cyanothece* sp. PCC 7425 ist dabei der einzige Stamm, der zusätzlich Gene einer bifunktionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase (Gruppe 3b, [YP_002483374](#)) besitzt (Tabelle 2), wobei unklar bleibt, ob diese aktiv exprimiert wird und

welche Funktion sie im Metabolismus einnehmen könnte. Weiterhin bestätigt dieses Ergebnis das frühere Auffinden eines marinen stickstofffixierenden Stammes von *Synechococcus* ohne eine aufnehmende Hydrogenase, welcher vermutlich zu der Gruppe der *Cyanothece* gezählt werden sollte (Ludwig et al. 2006).

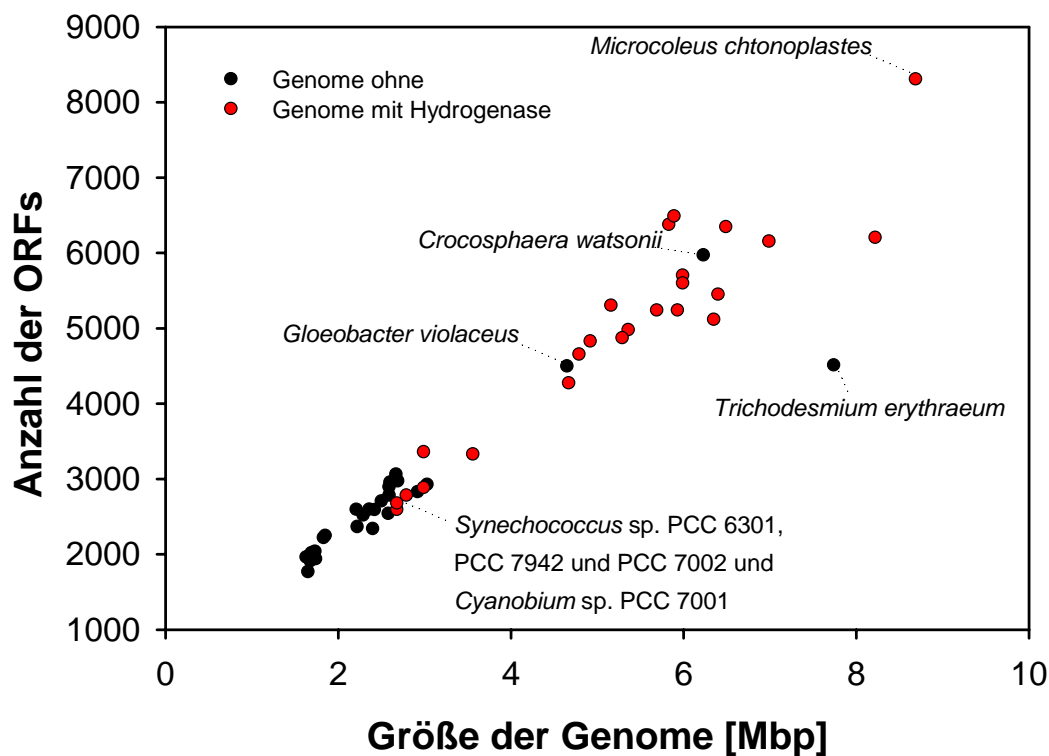


Abbildung 15: Cyanobakterielle Genome ohne (schwarz) und mit (rot) der bidirektionalen NAD(P) gekoppelten Hydrogenase. Der Cluster von schwarzen Punkten am unteren linken Ende repräsentiert die kleinen Genome von *Prochlorococcus* and *Synechococcus* Stämmen.

4.1.2 Die Verteilung der aufnehmenden Hydrogenase und der Nitrogenase

Das Vorkommen der aufnehmenden Hydrogenase (HupL, Gruppe 2a) in Cyanobakterien korreliert nicht mit einem bestimmten Habitat, sondern mit der Diazotrophie der jeweiligen Stämme. Diese wird durch die Anwesenheit der für die Nitrogenase kodierenden Gene (z.B. *nifD*) angezeigt (Tabelle 2). Hier gibt es nur vier Ausnahmen, welche zwar die Nitrogenase besitzen, denen aber die aufnehmende Hydrogenase fehlt. Hierbei handelt es sich um drei Stämme von *Synechococcus*, welche aus einer heißen Quelle isoliert wurden, sowie *Cyanothece* sp. PCC 7425. *Cyanothece* sp. PCC 7425 ist dabei der einzige Stamm, der zusätzlich Gene einer bifunktionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase (Gruppe 3b, [YP_002483374](https://doi.org/10.1101/002483374)) besitzt (Tabelle 2), wobei unklar bleibt, ob diese aktiv exprimiert wird und

welche Funktion sie im Metabolismus einnehmen könnte. Weiterhin bestätigt dieses Ergebnis das frühere Auffinden eines marinen stickstofffixierenden Stammes von *Synechococcus* ohne eine aufnehmende Hydrogenase, welcher vermutlich zu der Gruppe der *Cyanothece* gezählt werden sollte (Ludwig et al. 2006).

4.2 Verteilung von Hydrogenasen in den Genomen von heterotrophen Bakterien isoliert aus marinem Oberflächenwasser

Für die Datenbankrecherchen wurden für jede Hydrogenasenklasse ein repräsentatives Protein in die Suchmaske des BLAST-Programms eingegeben. Die jeweils verwendeten Hydrogenasen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Mit ihnen wurde jeweils für jede Klasse der Hydrogenasen alle sequenzierten prokaryotischen Genome der Genbank des National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchsucht. In dieser befanden sich zu dem Zeitpunkt 139 Bakterien, die von marinem Oberflächenwasser isoliert worden waren. In 32 von diesen Genomen wurden eine oder mehrere Hydrogenasen gefunden. Dies sind 23,02 % von 139 (Tabelle 4). Da eine Anzahl der analysierten Genome noch nicht komplett sequenziert war, repräsentiert dieser Prozentsatz die minimale Anzahl. Werden die 32 Bakteriengenome aufgeteilt, ob sie aus der kostalen Zone oder dem offenen Ozean stammen, besitzen 26 Genome aus dem Küstenbereich eine Hydrogenase und 6 Genome von denen, die aus dem offenen Ozean entstammen, was einen Vorzug für die Anwesenheit von Hydrogenasen in der kostalen Zone impliziert. In keinem der untersuchten Genome konnte dabei eine [FeFe]- oder [Fe]-Hydrogenase gefunden werden.

Gene zur Expression von [FeFe]-Hydrogenasen wurden nur in zwei *Shewanella*-Stämmen (ANA-3 und MR-4) gefunden. Dieser Typus von Hydrogenase ist extrem sensitiv gegen Sauerstoff und wird von diesem irreversibel inaktiviert (Fontecilla-Camps et al. 2007). In Hinsicht auf die Fundstellen der Organismen wird klar, dass beide von besonderen Standorten isoliert wurden. Der Stamm ANA-3 wurde an einer hölzernen Pier gefunden, wogegen MR-4 aus dem Schwarzen Meer entstammt. Der erste Fundort könnte zusätzlich von einem Biofilm bewachsen worden sein, der für die nötige Anaerobizität sorgt, wogegen das Schwarze Meer als das größte anoxische Becken der Welt gilt (Sorokin 2002). Aus diesen angeführten Gründen werden diese beiden Stämme aus den Betrachtungen ausgenommen und später nicht diskutiert.

Es wurden 24 Genome mit membrangebundenen H₂-aufnehmenden Hydrogenasen gefunden (Gruppe I), zwei Genome mit einer aufnehmenden Hydrogenase des cyanobakteriellen Typus

(Gruppe IIa, *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 und *Neptuniibacter caesariensis*), sechs Genome mit einer Sensorhydrogenase (Gruppe 2b), sieben Genome mit einer bifunktionalen Hydrogenase (Gruppe IIIb), vier Genome mit einer bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase (Gruppe IIIId) und drei Genome mit einer membrangebundenen H₂-entwickelnden Hydrogenase (Gruppe IV). Letztere Gruppe ist dabei ähnlich der Hydrogenase 3 von *E. coli*.

Tabelle 3: Hydrogenase und HypX Sequenzen, die für die Suche der komplett sequenzierten Genome und in der GOS metagenomischen Datenbank verwendet wurden. Die Hydrogenasen wurden klassifiziert gemäß Vignais et al. 2001.

Hydrogenase	Organismus	Accession number
[Fe]-Hydrogenase	<i>Methanocaldococcus jannschii</i>	Q58194
[FeFe]-Hydrogenase	<i>Clostridium pasteurianum</i>	P29166
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 1 Membrangebundene H ₂ aufnehmende Hydrogenase	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	P21852
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 2a cyanobakterielle aufnehmende Hydrogenase	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	NP_484720
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 2b H ₂ -Sensor	<i>Ralstonia eutropha</i>	NP_942663
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 3a F ₄₂₀ -reduzierend	<i>Methanocaldococcus jannschii</i>	Q60338
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 3b Bifunktional NAD(P) gekoppelt	<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	NP_662771
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 3c MV-reduzierend	<i>Methanococcus voltae</i>	ZP_02193988
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 3d Bidirektional NAD(P) gekoppelt	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	BAA18091
[NiFe]-Hydrogenase Gruppe 4 Membrangebundene H ₂ - entwickelnde	<i>Escherichia coli</i>	NP_417201
[NiFe]-Hydrogenase-reifendes Protein HypX	<i>Ralstonia eutropha</i>	NP_942660

Tabelle 4: Marine Bakterien mit [FeFe]-Hydrogenasen und [NiFe]-Hydrogenasen der verschiedenen Klassen. HypX, ein zusätzliches Protein, dessen Anwesenheit verantwortlich für die Sauerstofftoleranz der löslichen Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* ist, wurde in die Suche miteinbezogen.

Küste/ offener Ozean	Stamm	FeFe- Hydrogenase	Gruppe 1	Gruppe 2a	Gruppe 2b	Gruppe 3a	Gruppe 3b	Gruppe 3c	Gruppe 3d	Gruppe 4	HypX
	Actinobacteria										
K	<i>Mycobacterium marinum</i> M		YP_001850173				YP_001851771				
O	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4		YP_002766098				YP_002766851				
	Bacteroidetes/Chlorobi										
K	<i>Flavobacteria bacterium</i> MS024-2A		ZP_03702421								
K	<i>Prosthecochloris aestuarii</i> DSM 271		YP_002015547				YP_002016588				
O	<i>Robiginitalea biformata</i> HTCC2501		ZP_01119574								
	Mollicutes/others										
K	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i> Ellin345		YP_593314								
K	<i>Planctomyces maris</i> DSM 8797						ZP_01852867				
K	<i>Verrucomicrobiae bacterium</i> DG1235						YP_002715357				
	Proteobacteria										
K	<i>Magnetococcus sp.</i> MC-1		YP_866409		YP_866399		YP_864809				
	α-Proteobacteria										
K	<i>Labrenzia aggregata</i> IAM 12614		ZP_01550392		ZP_01550270				ZP_01545563		
K	<i>Labrenzia alexandrii</i> DFL-11								YP_002610401		
O	<i>Roseovarius sp.</i> HTCC2601		ZP_01443057		ZP_01443054						
K	<i>Roseovarius sp.</i> TM1035		ZP_01881109		ZP_01881113						
K	<i>Sagittula stellata</i> E-37		ZP_01748533		ZP_01748530						
O	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256			YP_611130							
	δ-Proteobacteria										
C	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396								YP_431451		
O	<i>Neptuniibacter caesariensis</i>		ZP_01166595	ZP_01167270	ZP_01166020		ZP_01164927				ZP_01166042
K	<i>Psychromonas ingrahamii</i> 37								YP_942646		YP_942640
K	<i>Shewanella baltica</i> OS155		YP_001050263								
K	<i>Shewanella baltica</i> OS185		YP_001366120								
K	<i>Shewanella baltica</i> OS195		YP_001554352								
K	<i>Shewanella baltica</i> OS223		YP_002358323								
K	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400		YP_750788								
K	<i>Shewanella putrefaciens</i> CN-32		YP_001183609								
K	<i>Shewanella sp.</i> ANA-3	YP_868355	YP_869516								
K	<i>Shewanella sp.</i> MR-4	YP_735375	YP_733952								
K	<i>Shewanella sp.</i> MR-7		YP_738201								
K	<i>Shewanella sp.</i> W3-18-1		YP_963312								
K	<i>gamma proteobacterium</i> NOR51-B						YP_002656756				
	Vibrionaceae										
K	<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK									ZP_01218749	
O	<i>Photobacterium sp.</i> SKA34		ZP_01160131							ZP_01161272	
K	<i>Vibrio angustum</i> S14		ZP_01234606							ZP_01234036	

4.2.1 Die Gruppe der Rhodobacteraceae und *Neptunibacter caesariensis*

Die Genome der *Roseovarius*-Gruppe besitzen große Gen-Cluster, in denen eine membrangebundene Hydrogenase in Verbindung mit einer Sensorhydrogenase und allen akzessorischen Genen vorliegen (Abbildung 16). Die Sensorhydrogenase fungiert als Rezeptor, die es der Zelle ermöglicht, die Anwesenheit von Wasserstoff in der Umgebung wahrzunehmen. Sie aktiviert die Transkription der Strukturgene der membrangebundenen Hydrogenase. (Lenz und Friedrich 1998, Elsen et al. 2003, Buhrke et al. 2004, Vignais et al. 2005). Zusätzlich befinden sich in den Genclustern eine Anzahl von zusätzlichen Genen, die für Proteine wie HupK kodieren, das notwendig für die Produktion einer sauerstofftoleranten Hydrogenase in *R. eutropha* ist (Bernhard et al. 1996, Ludwig et al. 2008).

Das Genom von *N. caesariensis* (früher *Oceanospirillum* (Arahal et al. 2007) besitzt vier Arten von [NiFe]-Hydrogenasen. Die erste ist eine membrangebundene aufnehmende der Gruppe I, wogegen die zweite eine aufnehmende des cyanobakteriellen Typus der Gruppe IIa ist. Weiterhin konnten eine Sensorhydrogenase (Gruppe IIb) und eine bifunktionale Hydrogenase (Gruppe IIIb) identifiziert werden. Durch eine phylogenetische Analyse wurde bestätigt, dass das HypX-Protein (Abbildung 16), welches im Genom kodiert ist, zu der Gruppe der Reifungsproteine für die Hydrogenase gehört (Abbildung 17, *N. caesariensis* ist rot, *R. eutropha* grün umrandet). Für HypX ist bekannt, dass es zuständig für die Insertion zusätzlicher Liganden (wahrscheinlich Cyanide) an das aktive Zentrum der löslichen Hydrogenase des Knallgasbakteriums *Ralstonia eutropha* ist. Dies macht das Enzym insensitiv gegenüber Sauerstoff (Buhrke und Friedrich 1998, Bleijlevens et al. 2004) Zur Erstellung des Phylogramms von HypX wurden Krotonasen als Outgroup verwendet. Diese Enzyme sind an der Synthese von Fettsäuren bzw. deren Abbau beteiligt, indem sie β -Hydroxyacyl-CoA reversibel zur $\Delta^{2,3}$ -Acyl-CoA-Verbindung dehydratisieren. Aufgrund einer weiteren phylogenetischen Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die membrangebundenen Hydrogenasen (HupL) von *N. caesariensis* wie auch der *Roseovarius*-Stämme nah verwandt mit der desselben Typus von *R. eutropha* (HoxG) sind, welcher sauerstofftolerant ist (Abbildung 18, Die *Roseovarius*-Stämme durch eine rote Klammer, *N. caesariensis* durch einen roten und *R. eutropha* durch einen grünen Pfeil markiert). Dieses ist ein starker Hinweis darauf, dass sowohl *N. caesariensis*, als auch die *Roseovarius*-Stämme dazu fähig sind, in mariner Umgebung während der Anwesenheit von Sauerstoff, Wasserstoff zu oxidieren. Für die Erstellung der phylogenetischen Bäume wurde als Outgroup eine

Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Kette H, 49 kDa) genommen, da diese eine nahe Verwandtschaft zu den großen Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenasen aufweist.

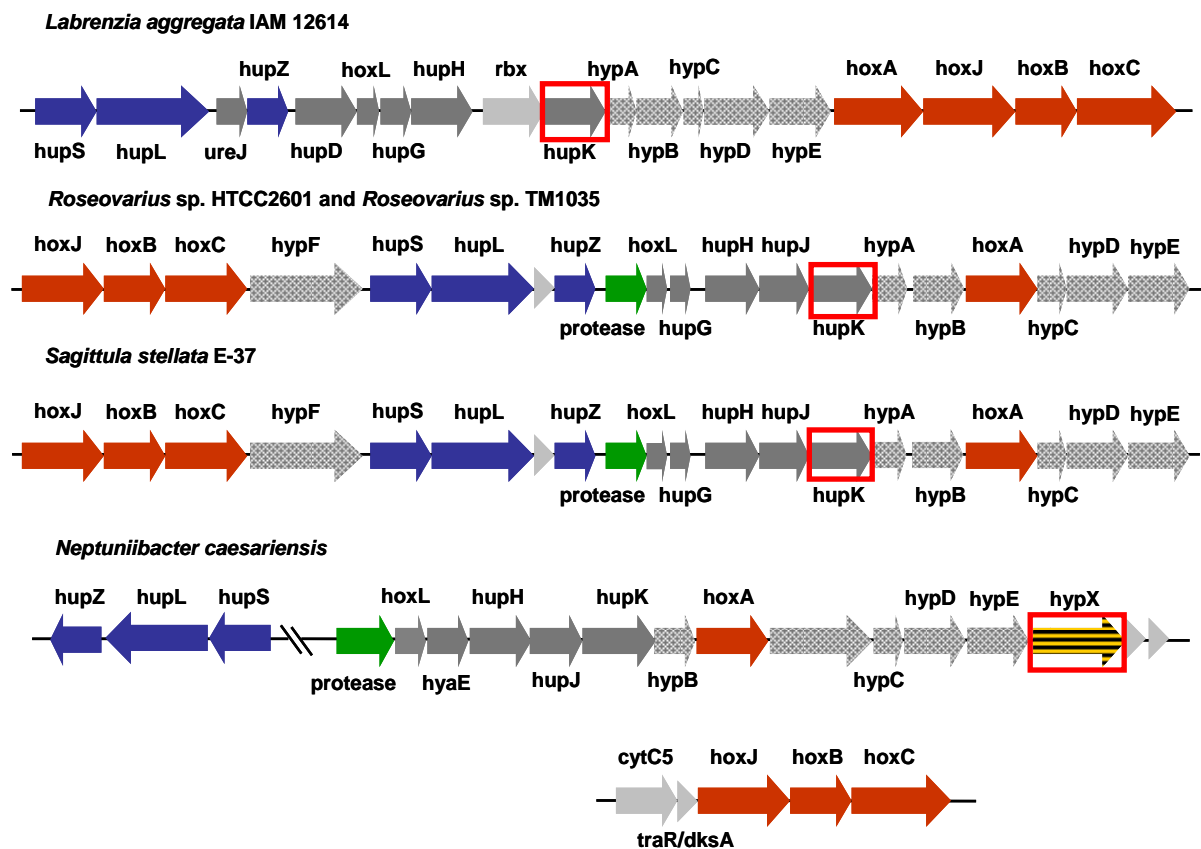


Abbildung 16: Struktur des Genclusters der membrangebundenen H₂-aufnehmenden NiFe-Hydrogenase von marinen Rhodobacteraceae und dem δ -Proteobakterium *Neptuniibacter caesariensis*. Die Strukturgene der Hydrogenase (*hupS*, *hupL* und *hupZ* das membrangebundene Cytochrom) sind in blau gehalten. Die rotgefärbten Gene (*hoxA/B/C*) sind Bestandteil des Regulationsmechanismus der Hydrogenase. *HoxJ* kodiert für eine Histidinkinase, die mit einem Wasserstoffsensoren interagiert, welcher durch *hoxB* und *hoxC* kodiert wird und die Aktivität des „response regulator“, kodiert durch *hoxA*, reguliert. *HupK* (rot umrandet) könnte für ein Protein kodieren, das für die Expression einer Sauerstoff-toleranten Hydrogenase notwendig ist. Akzessorische Gene, die für diesen Typ von Membran-Hydrogenase notwendig sind, sind grau dargestellt, wogegen graugemusterte Gene akzessorisch für alle NiFe-Hydrogenasen sind. Grünmarkierte Gene sind wahrscheinlich Proteasen, die den C-Terminus der Hydrogenase abschneiden. *HypX* von *Ralstonia eutropha* scheint die lösliche Hydrogenase sauerstofftolerant zu machen (gelbschwarz gestreift und rot umrandet). Die Sequenzen wurden aus der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen.

4.2.2 Die Gruppe der Vibrionaceae

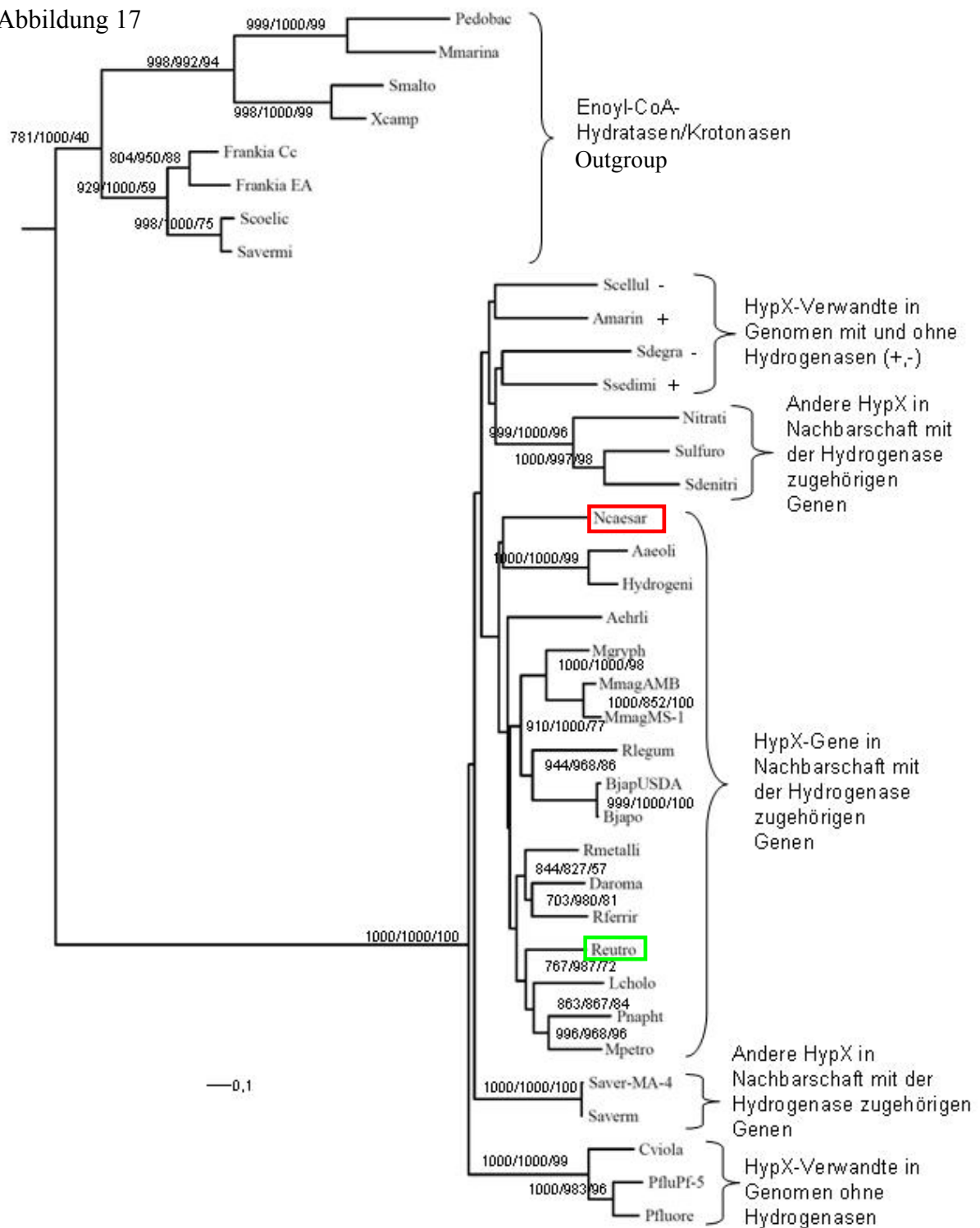
Die Genome der Vibrionaceae beherbergen sowohl eine membrangebundene H₂-entwickelnde Hydrogenase der Gruppe IV (Abbildung 19) als auch eine zweite membrangebundene Hydrogenase der Gruppe I (Abbildung 18, oranger Pfeil). Mit dieser Kombination kann unter Anaerobizität durch den Wasserstoffkreislauf ein Protonengradient in der Zelle etabliert

werden, indem der Wasserstoff, der während der Fermentation durch die Hydrogenase der Gruppe IV produziert wurde, von der periplasmatisch lokalisierten aufnehmenden Hydrogenase der Gruppe I wieder aufgenommen und in Protonen umgewandelt wird (Redwood et al. 2007). Auf diese Weise wird über der Plasmamembran ein Protonengradient aufgebaut und so Energie gespeichert. Durch eine phylogenetische Analyse konnte gezeigt werden, dass das Protein der Gruppe IV mit den Hydrogenasen 3 und 4 von *E. coli* eine nahe Verwandtschaft aufweist (Abbildung 20, die Gruppe der Vibrionaceae ist mit einer roten Klammer markiert). Für die Erstellung der phylogenetischen Bäume wurde wiederum als Outgroup die Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Kette H, 49 kDa) verwendet.

Abbildung 17: Phylogenetischer Baum von HypX. Die Zahlen an den Gabelungen geben die Bootstraps der drei verschiedenen Programme an, die zur Berechnung der Bäume benutzt wurden. Die Reihenfolge ist Maximum Parsimony/Neighbor-Joining (Fitch-Margoliash)/Maximum Likelihood. Die Abbildung ist zur besseren Ansicht dem Anhang als PDF-Dokument beigefügt. Gesondert markiert sind die HypX von *N. caesariensis* (rot) und *R. eutropha* (grün). Als Outgroup wurden Enoyl-CoA-Hydratasen verwendet.

Aeoli, *Aquifex aeolicus* VF5 NP_213788; Aehrli, *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-1 YP_742845; Amarin, *Acaryochloris marina* MBIC11017 YP_001520946; BjapUSDA, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 NP_773566; Cviola, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 NP_903812; Daroma, *Dechloromonas aromatica* RCB YP_287160; Frankia Cc *Frankia* sp. CcI3 YP_482743; Frankia EA *Frankia* sp. EAN1pec YP_001505433; MmagAMB, *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 YP_420998; MmagMS-1, *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 ZP_00055441; Mmarina *Microscilla marina* ATCC 23134 ZP_01691397; Mpetro, *Methylibium petroleiphilum* PM1 YP_001021998; Ncaesar, *Neptuniibacter caesariensis* ZP_01166042; Nitrati, *Nitratiruptor* sp. SB155-2 YP_001356445; Pedobac *Pedobacter* sp. BAL39 ZP_01883353; Pnapht, *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 YP_982187, PfluPF-5, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 YP_260772; Pfluore, *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 YP_348856; Reutro, *Ralstonia eutropha* H16 NP_942660; Rferri, *Rhodoferax ferrireducens* T118 YP_525330; Rmetalli, *Ralstonia metallidurans* CH34 YP_583693; Saverm, *Streptomyces avermitilis* MA-4680 NP_828541; Savermi *Streptomyces avermitilis* MA-4680 NP_823962; Scoelic *Streptomyces coelicolor* A3(2) NP_629596; Sdegra, *Saccharophagus degradans* 2-40 YP_526001; Smalto *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 YP_002027502; Ssedimi, *Shewanella sediminis* HAW-EB3 YP_001475080; Sulfuro, *Sulfurovum* sp. NBC37-1 YP_001358952; Xcamp *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10 YP_36301.

Abbildung 17



4.3 Verteilung der Hydrogenasen in metagenomischen Datenbanken

Durch die Betrachtung von Genomen einzelner Bakterienstämme, die in einer speziellen Umgebung vorkommen, kann eine Aussage über das Habitat, aus dem sie isoliert wurden, getroffen werden. Dabei ist aber zu beachten, dass nur ein sehr grober Einblick in die Menge der Genome der unkultivierbaren Stämme geleistet werden kann, die aber die Majorität der Organismen in dem entsprechenden Habitat bilden (Whitman et al. 1998, Giovannoni und Stingl 2005, Pedros-Alio 2006). Aus diesem Grund wurden auch metagenomische Datenbanken in die Betrachtung miteinbezogen.

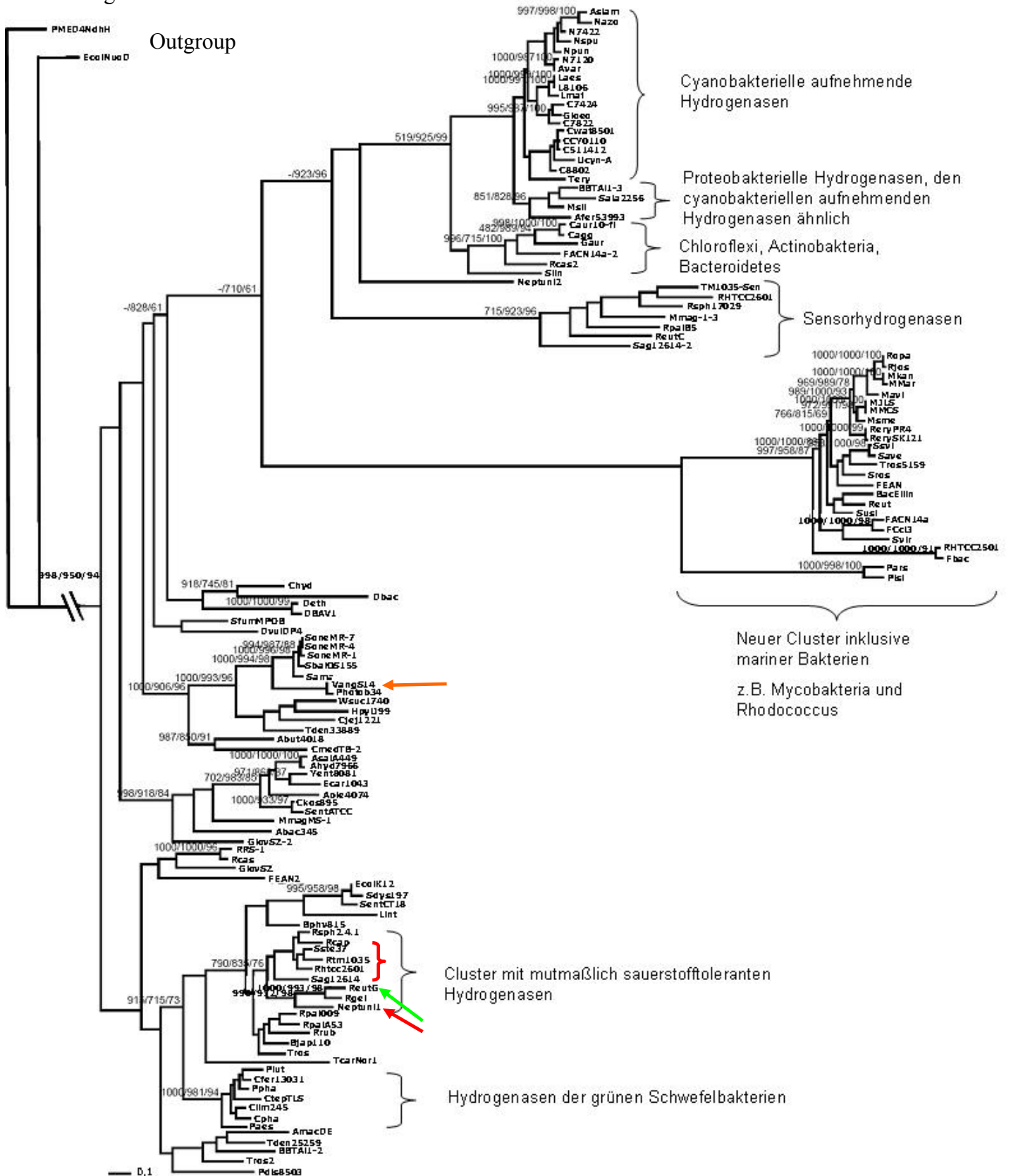
Es wurde die Global Ocean Sampling (GOS) Datenbank durchsucht (Venter et al. 2004, Rush et al. 2007, Yooseph et al. 2007). Die Datenbank enthält mehr als sieben Millionen partielle Sequenzen von Genomen, die von Partikeln mit einer Größe zwischen 0,2-0,8 µm isoliert wurden. Durch diese Fragmentierung gehört eine große Anzahl an Sequenzen zu *Pelagibacter ubique* und der Gruppe von *Prochlorococcus/Synechococcus* der Cyanobakterien (Rush et al. 2007). Für den BLAST-Suchalgorithmus wurden wieder die Hydrogenasen benutzt, welche in Tabelle 3 aufgeführt sind. Für die GOS-Datenbank wurden Proben sowohl aus den offenen Ozeanen, als auch aus den Küstenbereichen der ganzen Welt genommen. Die Sequenzen der Station 11 aus der Sargassosee wurden aus der Betrachtung herausgenommen, da hier wahrscheinlich eine Kontamination vorlag (DeLong 2005).

Abbildung 18: Phylogenetischer Baum der aufnehmenden Hydrogenase (HupL). Die Zahlen an den Gabelungen geben die Bootstraps der drei verschiedenen Programme an, die zur Berechnung der Bäume benutzt wurden. Die Reihenfolge ist Maximum Parsimony/Neighbor-Joining (Fitch-Margoliash)/Maximum Likelihood. Die Abbildung ist zur besseren Ansicht dem Anhang als PDF-Dokument beigelegt. Gesondert gekennzeichnet sind die Gruppe der *Vibrionaceae* (oranger Pfeil), die Gruppe der *Rhodobacteraceae* (rote Klammer), *N. caesariensis* (roter Pfeil) und *R. eutropha* (grüner Pfeil). Als Outgroup wurden NdhH und NuoD von *P. marinus* und *E. coli* verwendet

Abac345 *Candidatus Koribacter versatilis* Ellin345 YP_593314; Abut4018 *Arcobacter butzleri* RM4018 YP_001490358; Afer53993 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 YP_002219307; Ahyd7966 *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 YP_857036; AmacDE *Alteromonas macleodii* 'Deep ecotype' YP_002124659; Aple4074 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 str. 4074 ZP_00134404; AsalA449 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 YP_001141617; Asiam *Anabaena siamensis* TISTR 8012 AAN65266; Avar *Anabaena variabilis* ATCC 29413 YP_325087; Bac Ellin *bacterium Ellin514* ZP_03626632; BBTAi1-2 *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 YP_001220511; BBTAi1-3 *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 YP_001236652; Bjpg110 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 NP_773581; Bphy815 *Burkholderia phymatum* STM815 YP_001863308; C.fer13031 *Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031 ZP_01386726; C511412 *Cyanothece* sp. ATCC 51142 YP_001802481; C7424 *Cyanothece* sp. PCC 7424 YP_002377118; C7822 *Cyanothece* sp. PCC 7822 ZP_03153783; C8802 *Cyanothece* sp. PCC 8802 ZP_03142797; Cagg *Chloroflexus aggregans* DSM 9485 YP_002461848; Caur10-fl *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl YP_001636362; CCY0110 *Cyanothece* sp. CCY 0110 ZP_01728928; Chyd *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901 YP_360377; Cjej1221 *Campylobacter jejuni* RM1221 YP_179388; Ckos895 *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 YP_001455880; Clim245 *Chlorobium limicola* DSM 245 YP_001942914; CmedTB-2 *Caminibacter mediatlanticus* TB-2 ZP_01871651; Cpha *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266 YP_911445; CtepTLS *Chlorobium tepidum* TLS NP_661672;

Cwat8501 *Crocospaera watsonii* WH 8501 ZP_00519188; Dbac *Desulfomicrobium baculatum* ICC1_L; DBAV1 *Dehalococcoides* sp. BAV1 YP_001213724; Deth *Dehalococcoides ethenogenes* 195 YP_180861; DvulDP4 *Desulfovibrio vulgaris* DP4 YP_966691; Ecar1043 *Pectobacterium atrosepticum* SCR11043 YP_049334; EcolK12 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 NP_415492; EcolNuoD *Escherichia coli* CAA48363; FACN14a *Frankia alni* ACN14a YP_712616; FACN14a-2 *Frankia alni* ACN14a YP_712064; Fbac *Flavobacterium bacterium* MS024-2A ZP_03702421; FCci3 *Frankia* sp. Ccl3 YP_481046; FEAN *Frankia* sp. EAN1pec YP_001506830; FEAN2 *Frankia* sp. EAN1pec YP_001507712; Gaur *Gemmatimonas aurantiaca* T-27 YP_002759924; Gloeo *Gloeotheca* sp. PCC 6909 AAP04005; GlovSZ *Geobacter lovleyi* SZ YP_001952291; GlovSZ-2 *Geobacter lovleyi* SZ YP_001950403; HpylJ99 *Helicobacter pylori* J99 NP_223293; L8106 *Lyngbya* sp. PCC 8106 ZP_01619041; Laes *Lyngbya aestuarii* ABD34838; Lint *Lawsonia intracellularis* PHE/MN1-00 YP_594816; Lmaj *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 AAO66476; Mavi *Mycobacterium avium* 104 YP_881873; MJLS *Mycobacterium* sp. JLS YP_00107040; Mkan *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478 ZP_04750138; Mmag-1-3 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 YP_421305; MmagMS-1 *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 ZP_00052632; Mmar *Mycobacterium marinum* M YP_001850173; MMCS *Mycobacterium* sp. MCS YP_639307; Msil *Methylocella silvestris* BL2 YP_002364007; Msme *Mycobacterium smegmatis* str. MC2 155 YP_887053; N7120 *Nostoc* sp. PCC 7120 NP_484720; N7422 *Nostoc* sp. PCC 7422 BAE46791; Nazo '*Nostoc azollae*' 0708 ZP_03768004; Npun *Nostoc punctiforme* PCC 73102 AAC16277; Nspu *Nodularia spumigena* CCY 9414 ZP_01628406; Neptuni2 *Neptuniibacter caesariensis* ZP_01167270; Neptuni2 *Neptuniibacter caesariensis* ZP_01166595; Paes *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271 YP_002015547; Pars *Pyrobaculum arsenaticum* DSM 13514 YP_001153513; Pdis8503 *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503 YP_001303173; Photob34 *Photobacterium* sp. SKA34 ZP_01160131; Pisl *Pyrobaculum islandicum* DSM 4184 YP_929722; Plut *Pelodictyon luteolum* DSM 273 YP_375349; PMED4NdH *Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* str. CCMP1986 NP_892293; Ppha *Pelodictyon phaeoclathratiforme* BU-1 YP_002018704; Rcap *Rhodobacter capsulatus* AAA69668; Rcas2 *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 YP_001433219; Rcas *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 YP_001433862; ReryPR4 *Rhodococcus erythropolis* PR4 YP_002766098; RerySK121 *Rhodococcus erythropolis* SK121 ZP_04384689; Reut *Ralstonia eutropha* H16 NP_942704; ReutC *Ralstonia eutropha* H16 NP_942663; ReutG *Ralstonia eutropha* H16 AAA16462; Rgel *Methylibium petroleiphilum* PM1 YP_001022015; RHTCC2501 *Robiginitalea biformata* HTCC2501 ZP_01119574; Rhtcc2601 *Roseovarius* sp. HTCC2601 ZP_01443057; RHTCC2601-Sens *Roseovarius* sp. HTCC2601 ZP_01443054; Rjos *Rhodococcus jostii* RHA1 YP_704548; Ropa *Rhodococcus opacus* B4 YP_002781742; Rpal009 *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 NP_946314; RpalA53 *Rhodopseudomonas palustris* BisA53 YP_780164; RpalB5 *Rhodopseudomonas palustris* BisB5 YP_568300; RRS-1 *Roseiflexus* sp. RS-1 YP_001276649; Rrub *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 YP_426250; Rsph17029 *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029 YP_001044019; Rsph2.4.1 *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 YP_353568; Rtm1035 *Roseovarius* sp. TM1035 ZP_01881109; Sag12614 *Stappia aggregata* IAM 12614 ZP_01550392; Sag12614-2 *Stappia aggregata* IAM 12614 ZP_01550270; Sala2256 *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 YP_611130; Sama *Shewanella amazonensis* SB2B YP_927554; Save *Streptomyces avermitilis* MA-4680 NP_828543; SbalOS155 *Shewanella baltica* OS155 YP_001050263; Sdys197 *Shigella dysenteriae* Sd197 YP_402612; SentATCC *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* A str. ATCC 9150 YP_152163; SentCT18 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* str. CT18 NP_456296; SfumMPOB *Syntrophobacter fumaroxidans* MPOB YP_847061; Slin *Spirosoma linguale* DSM 74 ZP_04492490; SoneMR-1 *Shewanella oneidensis* MR-1 NP_717701; SoneMR-4 *Shewanella* sp. MR-4 YP_733952; SoneMR-7 *Shewanella* sp. MR-7 YP_738201; Sros *Streptosporangium roseum* DSM 43021 ZP_04474993; Sste37 *Sagittula stellata* E-37 ZP_01748533; Ssvi *Streptomyces sviveus* ATCC 29083 YP_002204206; Susi *Solibacter usitatus* Ellin6076 YP_827763; Svir *Saccharomonospora viridis* DSM 43017 ZP_04507584; TcarNor1 *Thermosinus carboxydivorans* Nor1 ZP_01667576; Tden25259 *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259 YP_315133; Tden33889 *Sulfurimonas denitrificans* DSM 1251 YP_393947; Tery *Trichodesmium erythraeum* IMS101 YP_722943; TM1035-Sens *Roseovarius* sp. TM1035 ZP_01881113; Tros 5159 *Thermomicrobium roseum* DSM 5159 YP_002523076; Tros2 *Thiocapsa roseopersicina* AAA27410; Tros *Thiocapsa roseopersicina* AAC38282; Ucyn-A *Cyanothece* sp. CCY 0110 ZP_01728928; VangS14 *Vibrio angustum* S14 ZP_01234606; Wsuc1740 *Wolinella succinogenes* DSM 1740 NP_907813; Yent8081 *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 YP_001007767.

Abbildung 18



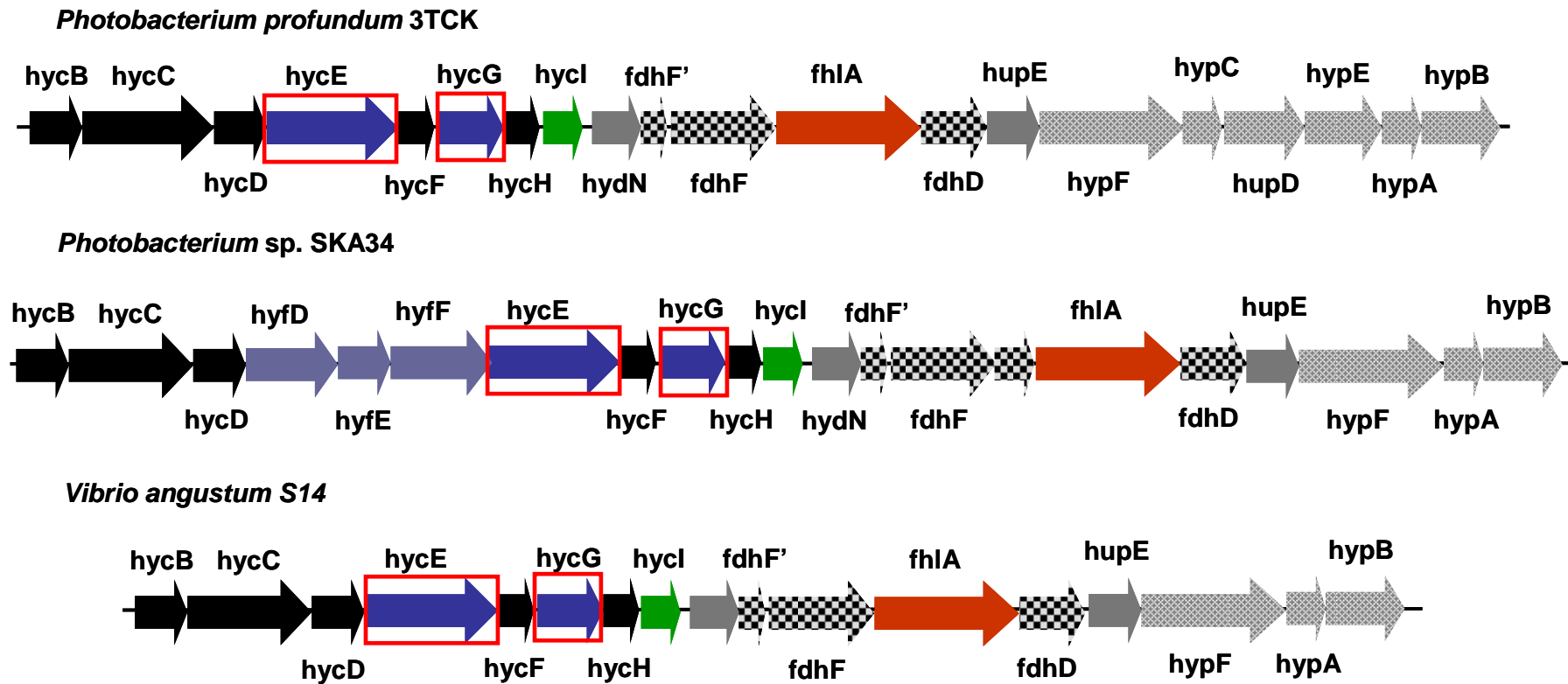


Abbildung 19: Struktur der drei Cluster der Hydrogenasegene der Vibrionaceae, die aus mariner Umgebung isoliert wurden. Es handelt sich um Energie umwandelnde, H_2 -entwickelnde [NiFe]-Hydrogenasen. Die Strukturgene der Hydrogenase sind in blau gehalten und rot umrandet. Akzessorische Gene, die für diesen Typ Hydrogenase notwendig sind, sind grau dargestellt, wogegen graugemusterte Gene akzessorisch für alle [NiFe]-Hydrogenases sind. Grünmarkierte Gene sind wahrscheinlich Proteasen, die den C-Terminus der Hydrogenase entfernen. Die karierten Gene sind Teil der Formiatdehydrogenase. FhIA ist das für den Aktivator kodierende Gen, welches für die Aktivierung der Transkription der Formathydrogenylase verantwortlich ist. Die in schwarz und in hellblau gefärbten Gene sind zusätzliche Untereinheiten des gesamten Proteinkomplexes. Die Sequenzen wurden aus der Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen.

Abbildung 20

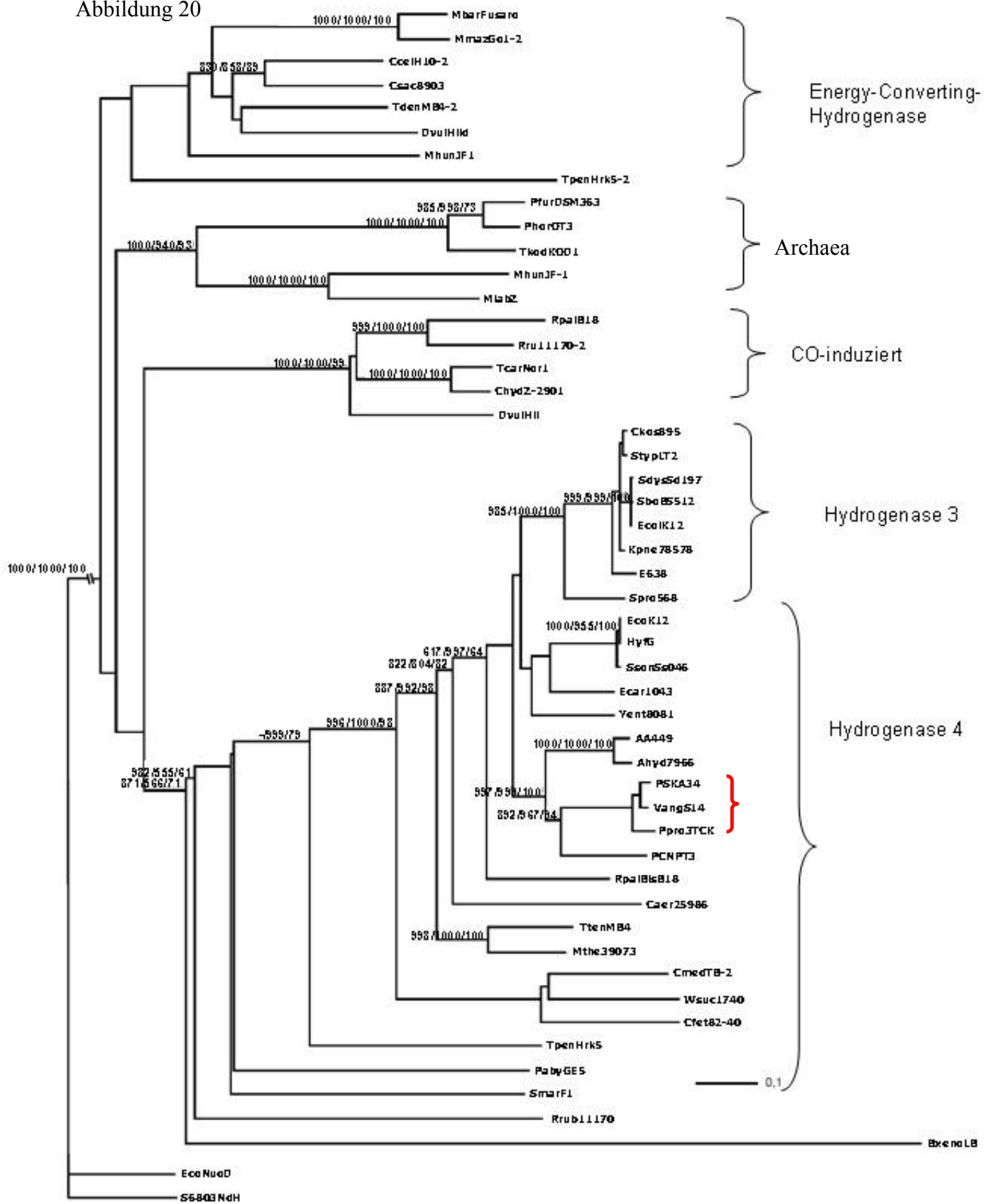


Abbildung 20: Phylogenetischer Baum von HyfG. Die Zahlen an den Gabelungen geben die Bootstraps der drei verschiedenen Programme an, die zur Berechnung der Bäume benutzt wurden. Die Reihenfolge ist Maximum Parsimony/Neighbor-Joining (Fitch-Margoliash)/Maximum Likelihood. Die Abbildung ist zur besseren Ansicht dem Anhang als PDF-Dokument beigelegt. Gesondert markiert ist die Gruppe der *Vibrionaceae* (rote Klammer). AA449 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 YP_001141637; Ahyd7966 *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 YP_857016; BxenoLB *Burkholderia xenovorans* LB400 YP_554971; Caer25986 *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 ZP_01771217; CcelH10-2 *Clostridium cellulolyticum* H10 YP_002507636; Cfet82-40 *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* 82-40 YP_891337; ChydZ-2901 *Carboxydotherrmus hydrogeniformans* Z-2901 YP_360647; Ckos895 *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 YP_001455578; CmedTB-2 *Caminibacter mediatlanticus* TB-2 ZP_01871228; Csac8903 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 YP_001180322; DvulHil *Desulfovibrio vulgaris* str. *Hildenborough* YP_011504; DvulHild *Desulfovibrio vulgaris* str. *Hildenborough* YP_009654; E638 *Enterobacter* sp. 638 YP_001177909; Ecar1043 *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 YP_049347; EcolK12 *Escherichia coli* SMS-3-5 YP_001744870; EcolNuoD *Escherichia coli* CAA48363; HyfG *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 NP_416982; Kpne78578 *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578 YP_001336689; MbarFusaro *Methanosarcina barkeri* str. *Fusaro* YP_303713; MhunJF1 *Methanospirillum hungatei* JF-1 YP_503186; MhunJF-1 *Methanospirillum hungatei* JF-1 YP_504006; MlabZ *Methanocorpusculum labreanum* Z YP_001030396; MmazGo1-2 *Methanosarcina mazei* Go1 NP_634348; Mthe39073 *Moorella thermoacetica* ATCC 39073 YP_431018; PabyGE5 *Pyrococcus abyssi* GE5 NP_127148; PCNPT3 *Psychromonas* sp. CNPT3 ZP_01215760; PfürDSM3638 *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 NP_579163; PhorOT3 *Pyrococcus horikoshii* OT3 NP_143306; Ppro3TCK *Photobacterium profundum* 3TCK ZP_01218749; PSKA34 *Photobacterium* sp. SKA34 ZP_01161272; RpalB18 *Rhodopseudomonas palustris* BisB18 YP_534343; RpalBisB18 *Rhodopseudomonas palustris* BisB18 YP_534411; Rru11170-2 *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 YP_426513; Rrub11170 *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 YP_425408; S6803NdhH *Synechocystis* sp. PCC 6803 NP_441259; SboBS512 *Shigella boydii* CDC 3083-94 YP_001881532; SdysSd197 *Shigella dysenteriae* Sd197 YP_404437; SmarF1 *Staphylothermus marinus* F1 YP_001041067; Spro568 *Serratia proteamaculans* 568 YP_001478659; SsonSs046 *Shigella sonnei* Ss046 YP_311432; StypLT2 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 NP_461770; TcarNor1 *Thermosinus carboxydvorans* Nor1 ZP_01666010; TkodKOD1 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 YP_184504; TpenHrk5 *Thermofilum pendens* Hrk 5 YP_919596; TpenHrk5-2 *Thermofilum pendens* Hrk 5 YP_920473; TtenMB4 *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 NP_623297; TtenMB4-2 *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 NP_621827; VangS14 *Vibrio angustum* S14 ZP_01234036; Wsuc1740 *Wolinella succinogenes* DSM 1740 NP_907952; Yent8081 *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 YP_001006994.

4.3.1 Verteilung der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase

Es konnten keine cyanobakteriellen bidirektionalen Hydrogenasen in den Proben gefunden werden, die dem offenen Ozean entstammten. Alle cyanobakteriellen *hoxH*-Sequenzen, die in der Datenbank gefunden werden konnten, entstammten dem Fundort Punta Comorant. Dieser Ort ist ein hypersalines Becken mit niedrigen Konzentrationen an Sauerstoff (Yutin et al. 2007) auf den Galapagos Inseln (Abbildung 21).

Abgesehen von den drei Küstenregionen (Mangrove auf Isabella Island, Cape May und Dirty Rock), mit insgesamt 9 Sequenzen, stammten alle anderen 45 Sequenzen ausschließlich von Punta Cormorant. Dies bestätigt die Anwesenheit von der Großen Untereinheit der Hydrogenase *hoxH* im flachen Küstenbereich in einer Anzahl von unterschiedlichen Gruppen von Bakterien. Obwohl die *Burkholderiaceae* eine große Gruppe in den Sequenzen der gesamten Metagenomedatenbank darstellen, sind die einzigen Vertreter mit Hydrogenase die von Punta Cormorant (Abbildung 21), wogegen in den Sequenzen aus dem offenen Ozean kein Gen gefunden werden konnte, dass für eine solche Hydrogenase kodiert.

Bidirektionale NAD(P)⁺-gekoppelte Hydrogenasen

n = 54

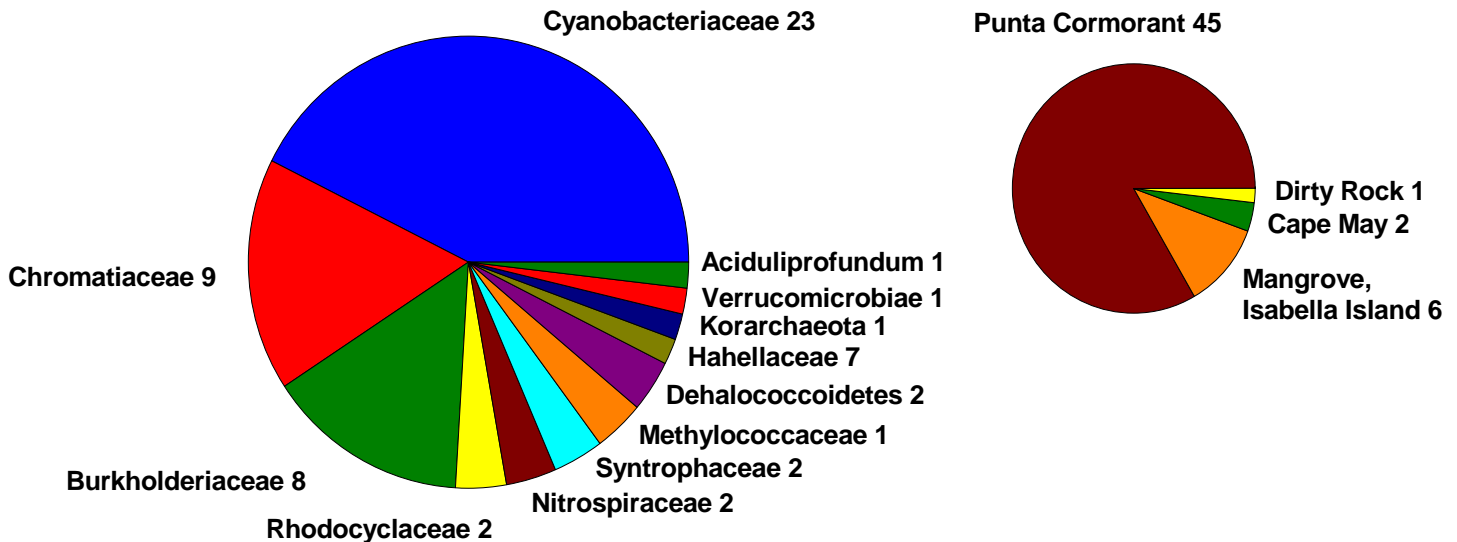


Abbildung 21: Verteilung der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenasen der verschiedenen prokaryotischen Gruppen, welche in der GOS Datenbank gefunden wurden. Die absolute Anzahl beträgt 54 Sequenzen. Rechts ist die Zahl der Sequenzen der einzelnen beprobten Stationen zu erkennen.

Die gefundenen Sequenzen der Hydrogenasen waren meist ähnlich zu denen der bekannten bidirektionalen Hydrogenasen der Stämme von *Synechococcus* (Abbildung 22, roter Pfeil). Für die Erstellung der phylogenetischen Bäume wurde als Outgroup die Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Kette H, 49 kDa) verwendet. Obwohl zumindest die HoxH-Sequenzen der Gruppe von *Prochlorococcus/Synechococcus* in der GOS-Datenbank auffindbar sein sollten (s.o.), konnte keine aus Proben im offenen Ozean gefunden werden, was zeigt, dass in diesen Stämmen keine cyanobakterielle Hydrogenase vorhanden ist, wie auch schon anhand der Analyse der Gesamtgenome gezeigt wurde (Tabelle 2).

Abbildung 22: Phylogenetischer Baum der großen Untereinheit der bidirektionalen Hydrogenase (HoxH). Die Zahlen an den Gabelungen geben die Bootstraps der drei verschiedenen Programme an, die zur Berechnung der Bäume benutzt wurden. Die Reihenfolge ist Maximum Parsimony/Neighbor-Joining (Fitch-Margoliash)/Maximum Likelihood. Die Abbildung ist zur besseren Ansicht dem Anhang als PDF-Dokument beigefügt. HoxH von *Synechococcus* sp. PCC 6301 ist durch einen roten Pfeil markiert. Als Outgroup wurden die Proteine NdhH von *S.* sp PCC 6803 und *P. marinus*, sowie NuoD von *E. coli* verwendet.

Afla *Acetomicrobium flavidum* CAA56464; Ahalo *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420 YP_002619903; Amar *Acaryochloris marina* MBIC11017 YP_001521996; Amax *Arthrospira maxima* FACHBSM AAQ63961; Apla1 *Arthrospira platensis* FACHB341 AAQ63964; Apla2 *Arthrospira platensis* FACHBOUQDS6 AAQ63959; Apla3 *Arthrospira platensis* FACHB439 AAQ63960; Apla4 *Arthrospira platensis* FACHB791 AAQ91344; Avar *Anabaena variabilis* ATCC 29413 YP_325153; Bfun *Burkholderia xenovorans* LB400

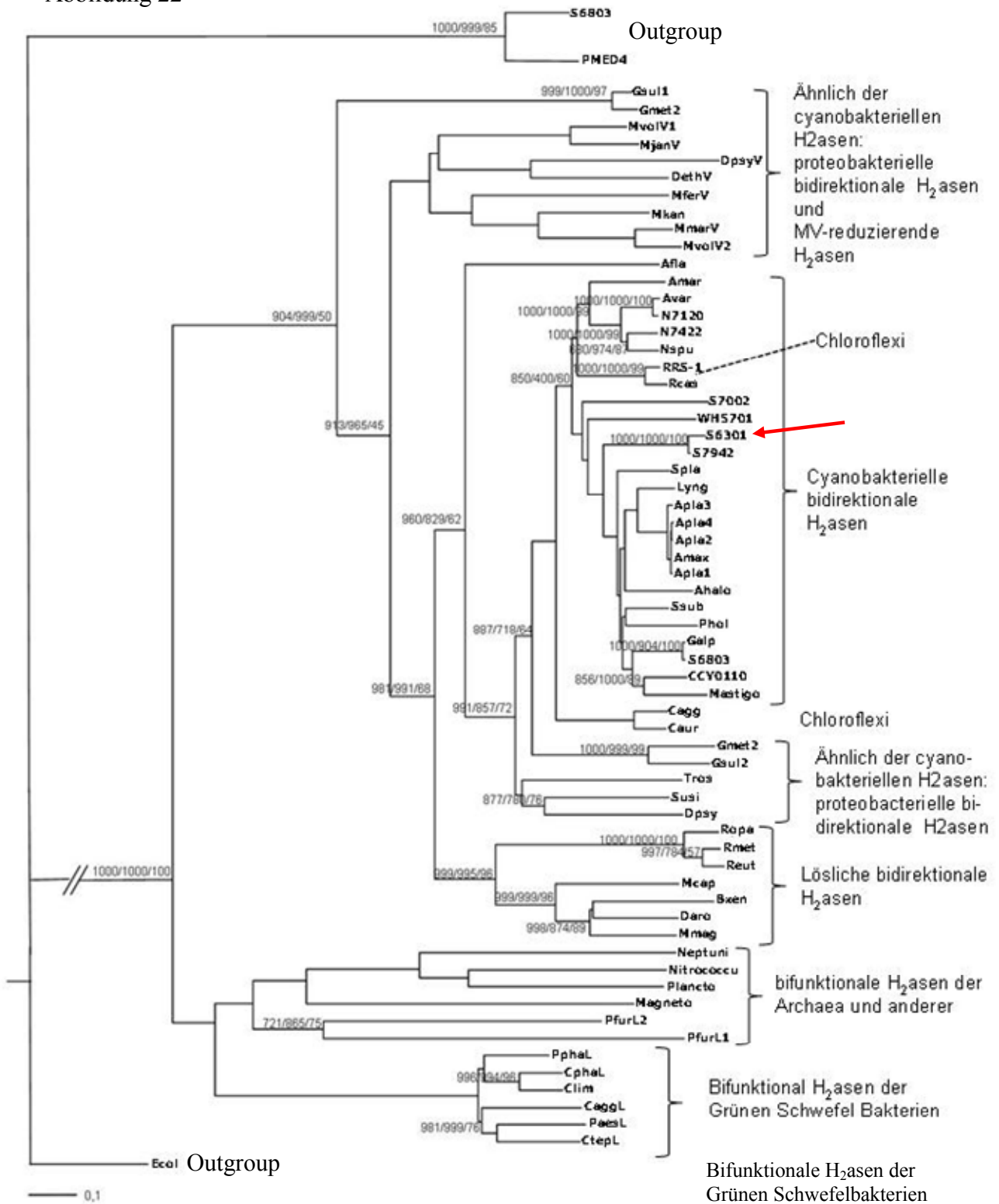
YP_555781; Cagg *Chloroflexus aggregans* DSM 9485 YP_002463784; CaggL *Chlorobium chlorochromatii* CaD3 YP_378564; CCY0110 *Cyanothece* sp. CCY 0110 ZP_01727423; CCY0110 *Cyanothece* sp. CCY 0110 ZP_01727423; Chf *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl YP_001634807; Chf *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl YP_001634807; ClimL *Chlorobium limicola* DSM 245 YP_001944104; Cnec *Ralstonia eutropha* H16 NP_942730; CphaL *Chlorobium phaeobacteroides* DSM 266 YP_912598; CtepL *Chlorobium tepidum* TLS NP_662771; Daro *Dechloromonas aromatica* RCB YP_284208; DethV *Dehalococcoides ethenogenes* 195 YP_181357; Dpsy *Desulfotalea psychrophila* LSv54 YP_065948; DpsyV *Desulfotalea psychrophila* LSv54 YP_064749; Ecol *Escherichia coli* CAA48363; Galp *Gloeocapsa alpicola* str. CALU 743 AAO85440; Gmet *Geobacter metallireducens* GS-15 YP_384078; Gmet *Geobacter metallireducens* GS-15 YP_386258; Gsul *Geobacter sulfurreducens* PCA NP_953465; Gsul *Geobacter sulfurreducens* PCA NP_953763; Lyng *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4 AAT07678; Magneto *Magnetococcus* sp. MC-1 YP_864809; Mastigo *Cyanothece* sp. PCC 7424 YP_002379398; Mcap *Methylococcus capsulatus* str. Bath YP_112653; MferV *Methanothermus fervidus* Q49179; MjanV *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 NP_248187; Mkan *Methanopyrus kandleri* AV19 NP_613553; Mmag *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 ZP_00053777; MmarV *Methanococcus maripaludis* S2 NP_987943; MvolV *Methanococcus voltae* Q00404; MvolIV *Methanococcus voltae* Q00407; N7120 *Nostoc* sp. PCC 7120 NP_484809; N7422 *Nostoc* sp. PCC 7422 BAE46796; Nitrococcus *Nitrococcus mobilis* Nb-231 ZP_01126922; Nspu *Nodularia spumigena* CCY 9414 ZP_01629499; Nspu *Nodularia spumigena* CCY 9414 ZP_01629499; Oceano *Oceanospirillum* sp. MED92 ZP_01164927; PaesL *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271 YP_002016588; PfurL1 *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 NP_578623; PfurL2 *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 NP_579061; Phol *Prochlorothrix hollandica* AAB53705; Plancto *Planctomyces maris* DSM 8797 ZP_01852867; PMED4 *Prochlorococcus marinus* subsp. *pastoris* str. CCMP1986 NP_892293; PphaL *Pelodyctyon phaeoclathratiforme* BU-1 YP_002019299; Rcas *Roseiflexus castenholzii* DSM 13941 YP_001431482; Rmet *Ralstonia metallidurans* CH34 YP_583677; Ropa *Rhodococcus opacus* AAB57892; RRS-1 *Roseiflexus* sp. RS-1 YP_001277847; S6301 *Synechococcus elongatus* PCC 6301 YP_172265; S6803 *Synechocystis* sp. PCC 6803 NP_441259; S6803 *Synechocystis* sp. PCC 6803 NP_441411; S7002 *Synechococcus* sp. PCC 7002 YP_001733469; S7942 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 YP_401572; Spla *Arthrospira platensis* FACHB440 AAQ63963; Ssub *Spirulina subsalsa* FACHB351 AAQ63962; Susi *Solibacter usitatus* Ellin6076 YP_826256; Tros *Thiocapsa roseopersicina* AAP50523; WH5701 *Synechococcus* sp. WH 5701 ZP_01085930.

4.3.2 Verteilung der membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenase

Die zweitgrößte gefundene Gruppe ist die der membrangebundenen Hydrogenasen. Die meisten der Sequenzen (35) stammen von Punta Comorant. Zusätzlich wurden auch Hydrogenasensequenzen an zwei küstennahen Probenorten gefunden. Der eine ist Dirty Rock, der andere New Harbor (Abbildung 23).

Zudem existieren erste metatranskriptomische Datensätze (Poretsky et al. 2009), deren Analyse die Anwesenheit von Transkripten der membrangebundenen H₂-aufnehmenden Hydrogenase (HupL) zeigte. Ein Transkript war dabei der cyanobakteriellen aufnehmenden Hydrogenase sehr ähnlich. Die anderen beiden ließen sich den Flavobacteriaceae und den Bradyrhizobiaceae zuordnen. In dem untersuchten Datensatz befanden sich allerdings ausschließlich Proben aus dem offenen Ozean.

Abbildung 22



Membranegebundene H₂ aufnehmende Hydrogenasen

n = 41

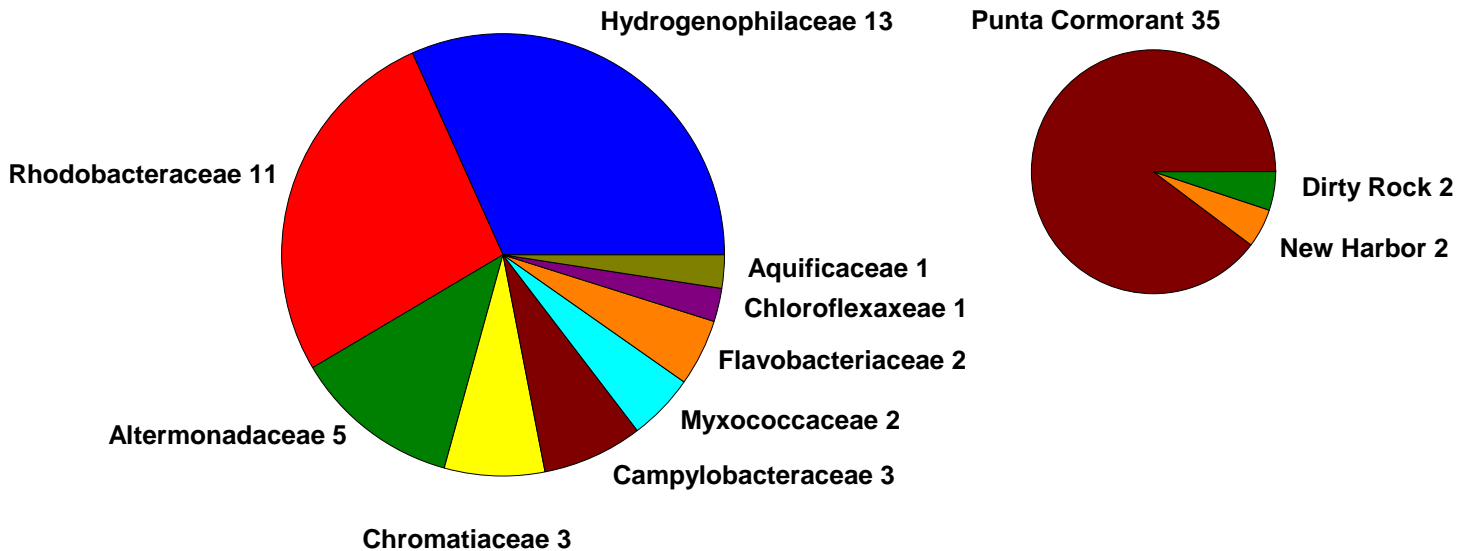


Abbildung 23: Verteilung der membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenasen der verschiedenen prokaryotischen Gruppen, welche in der GOS Datenbank gefunden wurden. Es wurden 41 Sequenzen gefunden. Rechts ist die Zahl der Sequenzen der einzelnen beprobten Stationen zu erkennen.

4.3.3 Verteilung der [FeFe]-Hydrogenase

Die Sequenzen, die für die extrem sauerstoffsensitive [FeFe]-Hydrogenase in der GOS-Datenbank gefunden wurde, stammen von einem Mangrovegebiet (Isabella Island) und einem hypersalinen Becken auf Punta Comorant. In allen anderen Proben konnte diese nicht gefunden werden (Abbildung 24).

Die Hydrogenasen der Archaea konnten in der Metagenomdatenbank nicht gefunden werden.

4.4 Verteilung von Sequenzen der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten [NiFe]-Hydrogenase in der Nord- und Ostsee, im Nordatlantik, im Mittelmeer, sowie in zwei Süßwasserseen

Obwohl alle [NiFe]-Hydrogenasen zwei charakteristische Motive für die Bindung des aktiven Zentrums teilen (insgesamt vier Cysteine am N- und C-Terminus), ist es nicht möglich Primer zu entwerfen, die spezifisch für alle Klassen der [NiFe]-Hydrogenasen sind. Deshalb wurde

das Augenmerk auf die bidirektionale NAD(P)-gekoppelte Hydrogenase der Cyanobakterien, der Chloroflexaceae und einigen Proteobakterien gelegt. In den Cyanobakterien ist dieses Enzym auch als die bidirektionale Hydrogenase bekannt. Es ist nahe verwandt mit der löslichen Hydrogenase von *R. eutropha* und dem Komplex I (Appel and Schulz 1996, Schmitz and Bothe 1996).

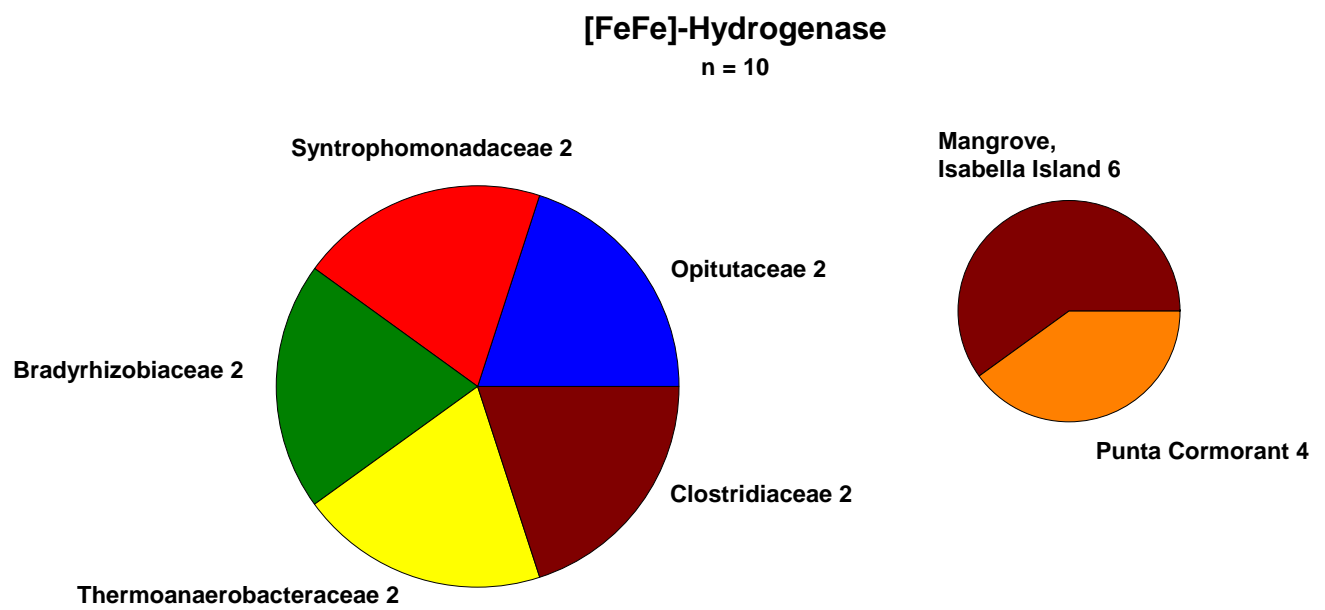


Abbildung 24: Verteilung der [FeFe]-Hydrogenasen der verschiedenen prokaryotischen Gruppen, welche in der GOS Datenbank gefunden wurden. Die absolute Anzahl der gefundenen Sequenzen beträgt 10. Rechts ist die Zahl der Sequenzen der einzelnen beprobten Stationen zu erkennen.

In einem Verbundprojekt des Innofonds Schleswig-Holstein wurde Oberflächenwasser aus der Stollergrundrinne in der Ostsee, aus der Norderpiep in der Nordsee, aus dem Atlantik, sowie dem Westensee und dem Selentersee gesammelt. Die Proben wurden mit Filtern der Größe 10 µm und 0,2 µm filtriert und die DNA isoliert.

In den Proben aller Orte (mit Ausnahme des Atlantiks) konnte das Gen für die große Untereinheit der bidirektionalen Hydrogenase (*hoxH*) nachgewiesen werden. In Abbildung 25 ist die Verteilung von *hoxH* auf die Organismengruppen und die verschiedenen Beprobungsorte gezeigt.

In der Ostsee, wie auch in den Süßwasserseen konnte eine große Anzahl an cyanobakteriellen *hoxH* detektiert werden. Die meisten davon gehören zur Gruppe der Chroococcales und sind dort am nächsten verwandt mit *Microcystis*, sowie zu der Gruppe der filamentösen, heterocystenträgenden Nostocaceae.

In der Nordsee macht die Menge der α-proteobakteriellen Gruppe der Rhodobacteraceae denselben Anteil aus, wie alle cyanobakteriellen Sequenzen zusammengenommen.

Von den Proben der mesotrophen Süßwasserseen (Westensee und Selenter See), konnten nur cyanobakterielle *hoxH* amplifiziert werden (Chlorococcales, Nostocaceae and Oscillatoriales) und einige wenige Sequenzen von methylo trophen Bakterien und Dictyoglomaceae nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnten aus Proben, die aus oligotrophen Gewässern wie dem Atlantik bei den Kapverdischen Inseln (Probe zur Verfügung gestellt von der AG Laroche) und dem Mittelmeer (Probe zur Verfügung gestellt von Thorsten Staller) entstammten, keine Sequenz der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase (*hoxH*) nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der Untersuchungen, die *in silicio* gemacht wurden, untermauert.

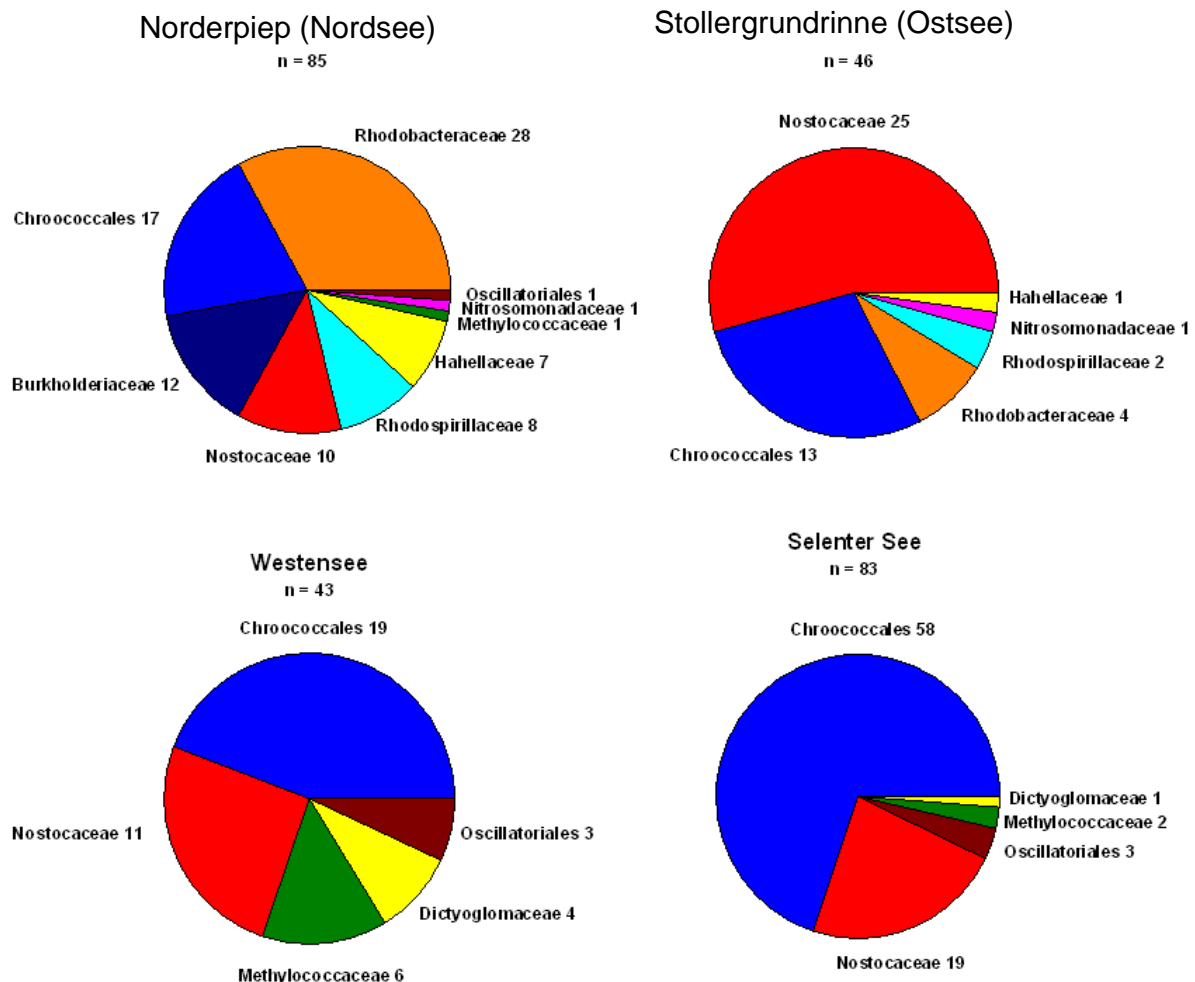


Abbildung 25: Verteilung der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenasen (HoxH) in Proben, die von der Norderpiep (Nordsee), Stollergrundrinne (Ostsee) und den Süßwasserseen Westensee and Selenter See genommen wurden.

4.5 *Nostoc*-Projekt: Ermittlung der Wasserstoffproduktion der Nitrogenase und heterologe Überexpression von [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von *Nostoc* sp. PCC 7120

Für eine spätere biotechnologische Anwendung wurde die Möglichkeit einer heterologen Überexpression von [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten von *Nostoc* AMC 414 überprüft. Da in den Heterocysten ein Mikrooxy-Klima vorliegt, könnte es sich um die ideale Umgebung handeln, diese Klasse von Hydrogenasen zu überexprimieren, da sie durch Sauerstoff irreversibel inaktiviert werden. Für die Überexpression wurde die Funktionalität des verwendeten Promotors mittels GFP und die Fähigkeit der verwendeten Mutante zur Produktion von Wasserstoff via Nitrogenase überprüft.

4.5.1 Messungen der Aktivität der Nitrogenase der Mutante AMC 414 von *Nostoc* sp. PCC 7120

Da der während der Versuche produzierte Wasserstoff nicht wieder von der aufnehmenden Hydrogenase in Protonen umgewandelt werden sollte, musste eine Mutante verwendet werden, die keine Aktivität dieser Hydrogenase mehr besitzt. Der Organismus *Nostoc* AMC 414 wurde großzügiger Weise von Jim Golden zur Verfügung gestellt und ist eine Mutante von *Nostoc* sp. PCC 7120. Im Unterschied zum Wildtyp wurde hier das *xisC* Element der aufnehmenden Hydrogenase deletiert. Aufgrund dessen kann es in den Heterocysten nicht mehr zu einem DNA-„Rearrangement“ der Gene der aufnehmenden Hydrogenase und somit zu deren Expression kommen kann (Carrasco et al 2005). Die zu messende Kultur wurde auf BG-11-Medium mit 10 mM Arginin angezogen und dann auf BG-11₀-Medium gesetzt, um die Entwicklung der Heterocysten zu induzieren. Es wurde in regelmäßigen Abständen eine Probe entnommen und die Wasserstoffproduktion mit der Clark-Elektrode gemessen (Kapitel 3.23.3). Dafür wurden 20 µg Chlorophyll und eine Lichtstärke von 140 µE/ m²/ s eingesetzt. Klar zu erkennen ist eine messbare Aktivität der Nitrogenase nach 48 Stunden, die nach weiteren 24 Stunden wieder abfällt (Abbildung 26). Aktivität der bidirektionalen Hydrogenase konnte während dieses Zeitraumes nicht ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Wasserstoffentwicklung durch die AMC414-Mutante

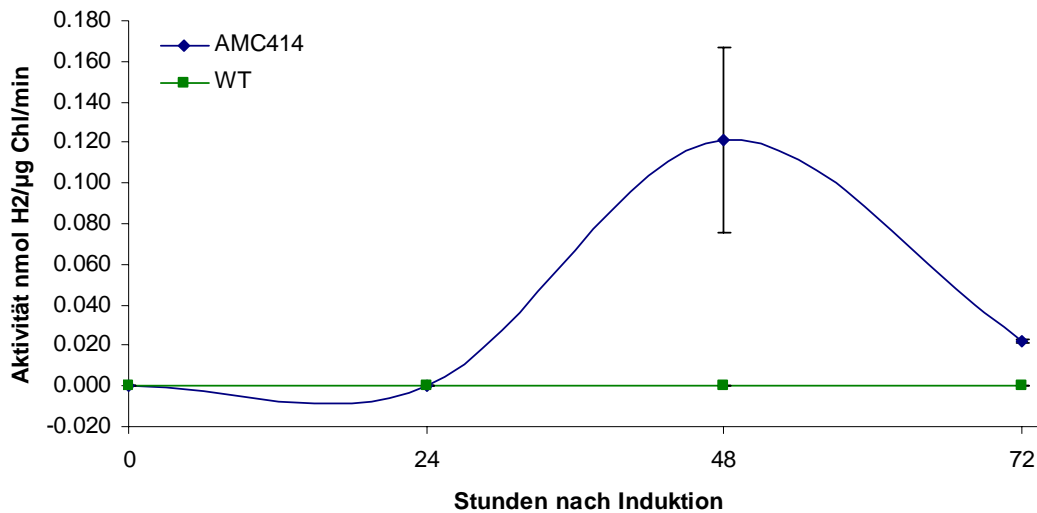


Abbildung 26: Entwicklung von Wasserstoff durch die Aktivität der Nitrogenase der Mutante AMC 414 und des Wildtyps *Nostoc* sp. PCC 7120. Aufgetragen sind die Stunden nach der Induktion der Heterocysten gegen die Aktivität.

4.5.2 Promotorstudie des *nifH*-Promotors mittels eines GFP-Konstrukts

Für den Test auf die spezifische Aktivität des Promotors in den Heterocysten wurde ein Promotor ausgewählt, der selektiv in den Heterocysten konstitutiv aktiv sein sollte. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf den Promotor des Operons *nifHDK*. Es wurden die ersten 780 Basen upstream des *nifH*-Genes aus *Nostoc* sp. PCC 7120 amplifiziert (Bauer und Haselkorn 1995)(siehe 3.3, Primer 5 und 6), in den TOPO-Vektor zwischenkloniert und schließlich mittels der Schnittstellen *Sa*I und *Sa*cI in den Vektor pAM1956 kloniert (Abbildung 27). Das fertige Konstrukt wurde schließlich in den Organismus *Nostoc* AMC414 transformiert. Dieser Vektor ist ein Derivat des Plasmids pDU-1 und wird sowohl in *Nostoc* als auch in *E. coli* repliziert. Zusätzlich ist in diesem Vektor ein grün-fluoreszierendes Protein vorhanden, mit welchem die Aktivität des Promotors mit Hilfe des Konfokalen Laser Scanning Mikroskopes überprüft wurde (Abbildung 28).

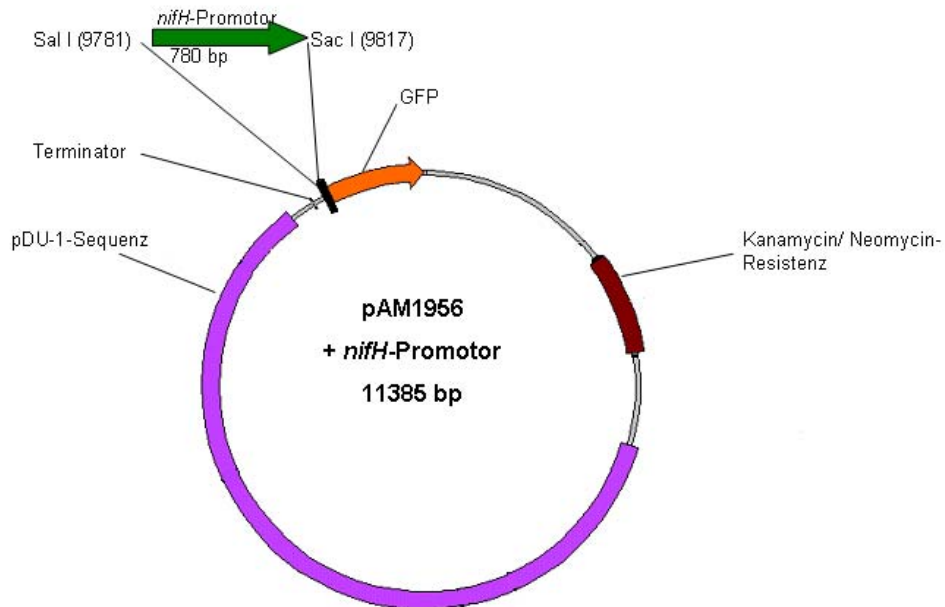


Abbildung 27: Schema des Vektors pAM1956 mit kloniertem *nifH*-Promotor

Die Probenkulturen wurden mit BG11 und 10 mM Arginin angezogen und später zur Induktion der Heterocysten auf BG11₀ ohne Stickstoff überführt. Die Photos wurden 48 h nach der Induktion aufgenommen. Zusätzlich zum GFP wurden Aufnahmen der Fluoreszenz des Chlorophylls gemacht. Klar zu erkennen ist, dass diese Chlorophyllfluoreszenz in den Heterocysten nicht immer vorhanden bzw. vermindert ist (Abbildung 28A), was an dem geringeren Anteil der Phycobilisomen liegt (Ying et al. 2002). Weiterhin zeigt die Expression des grünfluoreszierenden Proteins, dass der Promotor von *nifH* ausschließlich in den Heterocysten exprimiert wird (Abbildung 28B). Abbildung 28C zeigt die untersuchte Kultur im Hellfeld, während das vierte Bild eine Überlagerung der drei vorausgehenden Abbildungen darstellt.

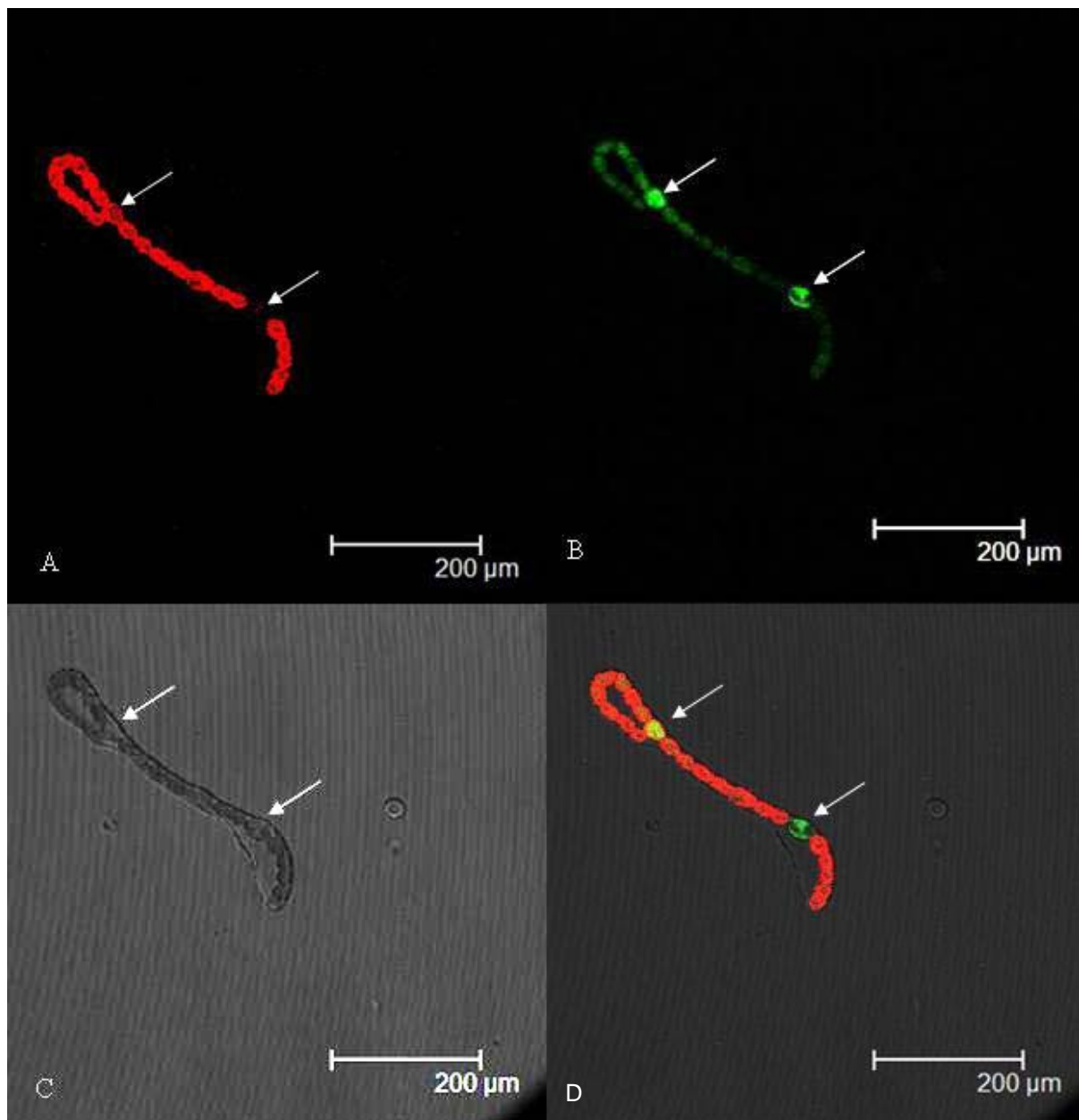


Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahmen der Mutante AMC414 von *Nostoc* sp. PCC 7120, in welche ein GFP-Konstrukt transformiert wurde. Die Photos wurden 48 h nach Induktion der Heterocysten mit einem Konfocalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Zu sehen ist unter A die Chlorophyll- und unter B die GFP-Fluoreszenz (siehe 3.24). Abbildung C zeigt das Hellfeld, während D eine Überlagerung aller vorangegangenen Abbildungen darstellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen die Heterocysten.

4.5.3 Heterologe Expression zweier verschiedener Eisenhydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von *Nostoc* sp. PCC 7120

Für die Expression der Eisenhydrogenasen wurden die [FeFe]-Hydrogenasen von *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 und *Shewanella oneidensis* MR-4 ausgesucht (Abbildung 29).

A Hydrogenase von *B. thetaiotaomicron*



B Hydrogenase von *S. oneidensis*



Abbildung 29: A: [FeFe]-Hydrogenase von *B. thetaiotaomicron*: *hydA1*: [FeFe]-Hydrogenase, *hydE*: Radical-SAM-Protein, *hydG*: Radical-SAM-Protein, *hydF*: GTPase, BT1836: Alanyl-Dipeptidyl-Peptidase. B: [FeFe]-Hydrogenase von *S. oneidensis*: *hydA1*: [FeFe]-Hydrogenase, *kIU*: Kleine Untereinheit, Twin-Arginin-Translocation-Sequenz, *FD*: Formiat-Dehydrogenase, Gamma-Untereinheit, *hydG*: Radical-SAM-Protein Put. Prot.: Putatives Protein, *hydE*: Radical-SAM-Protein, *hydF*: GTPase. (Xu et al. 2003, Heidelberg et al. 2002)

Bei den Kriterien für die Auswahl der zu exprimierenden Hydrogenasen wurde Wert darauf gelegt, dass diese Ferredoxin-abhängig sind, da diese während der Expression in den Heterocysten über das PS I und das nachgeschaltete Ferredoxin mit Elektronen versorgt werden sollten. Zudem sollten die Hydrogenasen mit ihren akzessorischen Genen in einem Operon liegen, um die Klonierungen zu erleichtern. Weiterhin konnte im Verlauf dieser Arbeit zumindest die Hydrogenase aus *Shewanella oneidensis* bereits heterolog und aktiv in *E. coli* exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Die ausgewählten Hydrogenasen wurden per PCR amplifiziert (siehe 3.3, Primer 1,2 und 3,4) und über den TOPO XL-Vektor schließlich in den pAM1956 kloniert, in welchen schon der Promotor des *nif*-Operons integriert worden war (Abbildung 30). Für die Klonierung wurden die Enzyme *Sma*I für die Hydrogenase von *Shewanella*, sowie *Ecl*136II und *Xma*I für die von *Bacteroides* benutzt. Die Hydrogenase von *S. oneidensis* wurde per Restriktionsverdau auf ihre Orientierung im Vektor überprüft. Wurden die nach der Transformation entstandenen Kolonien auf das Stickstoffmangelmedium BG-11₀ gesetzt, konnte beobachtet werden, dass die *Nostoc*-Transformanten mit der Hydrogenase des *Bacteroides*-Stammes nicht mehr fähig waren zu wachsen. Dieses Ergebnis gilt sowohl für auf Agar angezogenen Kulturen, wie auch für solche, die in Schüttelkulturen oder begast in Röhren bei jeweils 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ wachsen sollten (Abbildungen 31, 32). Dieses Ergebnis konnte inzwischen in der Arbeitsgruppe von Peter Wolk mit einer Hydrogenase aus *Clostridium* wiederholt und damit bestätigt werden (persönliche Mitteilung).

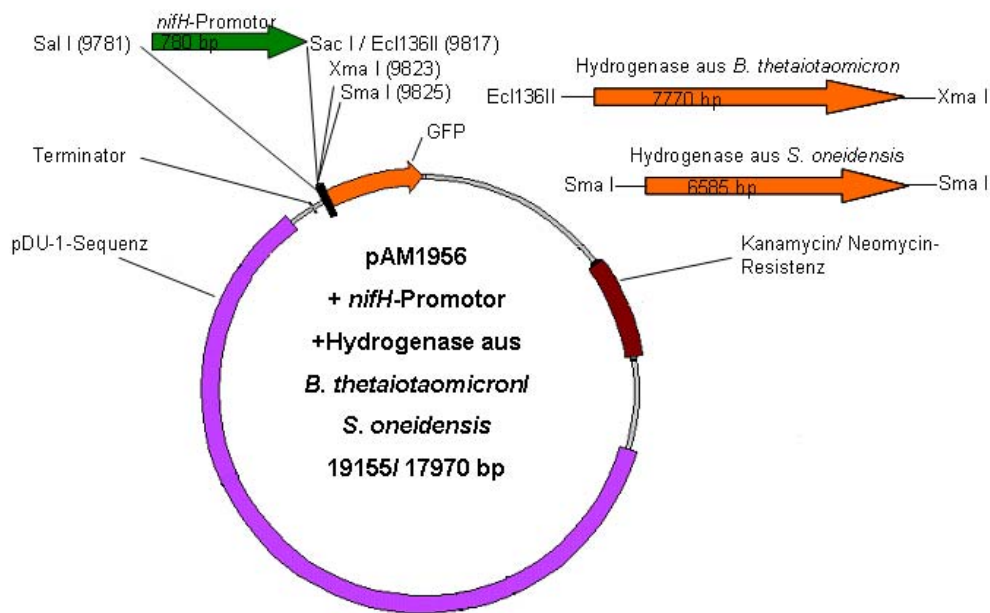


Abbildung 30: Schema des Vektors pAM1956 mit klonierten *nifH*-Promotor und [FeFe]-Hydrogenase von *B. thetaiotaomicron* bzw. *S. oneidensis*.

Wie aus der Abbildung 31 weiter hervorgeht, hat der mit der Hydrogenase von *Shewanella* transformierte Stamm keine Schwierigkeiten auf beiden Medien zu wachsen. Trotzdem konnten mit Hilfe der Clark-Elektrode keine höheren Photowasserstoffproduktionsraten als bei der untransformierten Kultur von *Nostoc* AMC414 gemessen werden. Auch die Messungen der Gesamthydrogenaseaktivitäten unterschieden sich nicht signifikant.

Für die Messung der Aktivitäten der Hydrogenasen wurden sowohl die mit der Hydrogenase von *Bacteroides* transformierten Stämme, als auch die Kontrollgruppe mit BG-11 und 10 mM Arginin in begasteten Röhren angezogen. Danach wurden beide auf BG-11₀ umgesetzt. Nach 48 Stunden ab dem Umsetzen auf das Stickstoffmangelmedium konnte das Sterben der transformierten Stämme (nur *Bacteroides*) unter dem Mikroskop beobachtet werden, nach 96 h waren die Kulturen durchsichtig, wogegen es in der untransformierten Kontrollgruppe keine nennenswerte Beeinträchtigung des Wachstums gab (Abbildung 32). Eine Steigerung der Wasserstoffproduktion und der Aktivität der Gesamthydrogenase konnte bis zum sichtbaren Absterben der Kulturen gegenüber der Kontrollgruppe nicht gemessen werden.

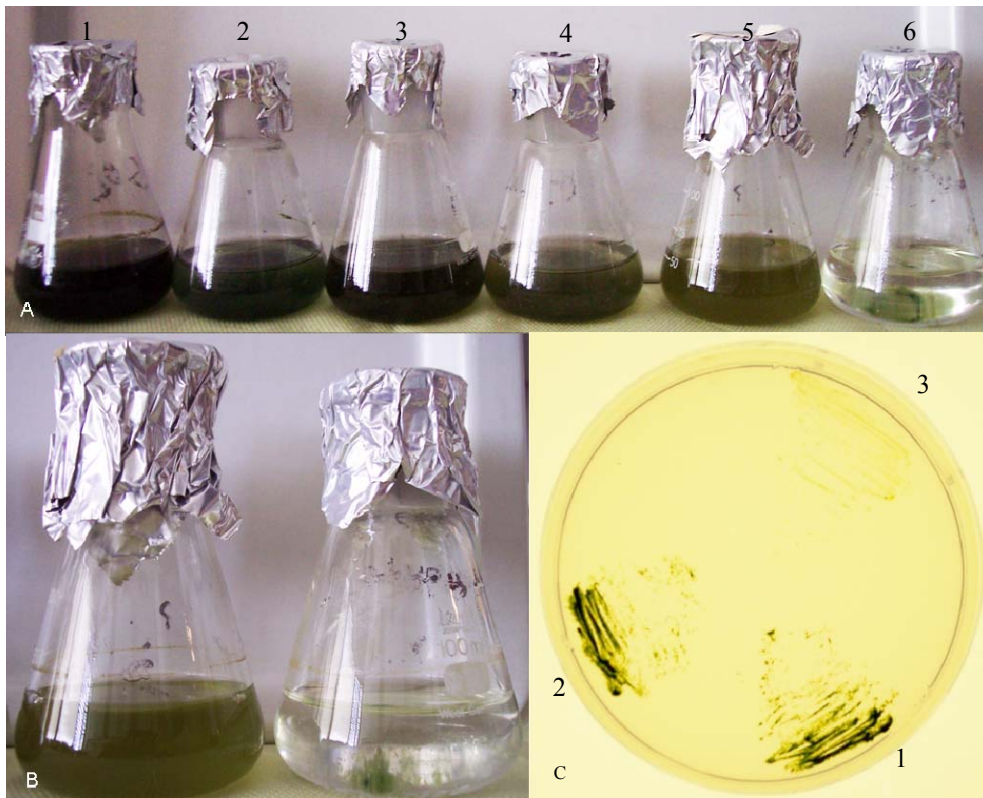


Abbildung 31: Wachstumsunterschiede der Kulturen. A: Schüttelkulturen von links nach rechts: 2× *Nostoc* AMC414 mit pAM1956 auf BG-11 und BG11₀ (1 und 2), 2× *Nostoc* AMC414 mit der Hydrogenase aus *Shewanella oneidensis* auf BG-11 und BG11₀ (3 und 4), 2× *Nostoc* AMC414 mit der Hydrogenase aus *Bacteroides thetaiotaomicron* auf BG-11 und BG-11₀ (5 und 6). B: Vergrößerung der Schüttelkulturen von *Nostoc* AMC414 mit der Hydrogenase aus *B. thetaiotaomicron* auf BG11 und BG-11₀ aus Bild A. C: Wachstum der Kulturen auf einer gedrittelten BG-11₀-Platte: 1: *Nostoc* AMC414 mit pAM1956, 2: *Nostoc* AMC414 mit pAM1956 und *nif*-Promotor, 3: *Nostoc* AMC414 mit der Hydrogenase aus *B. thetaiotaomicron*.

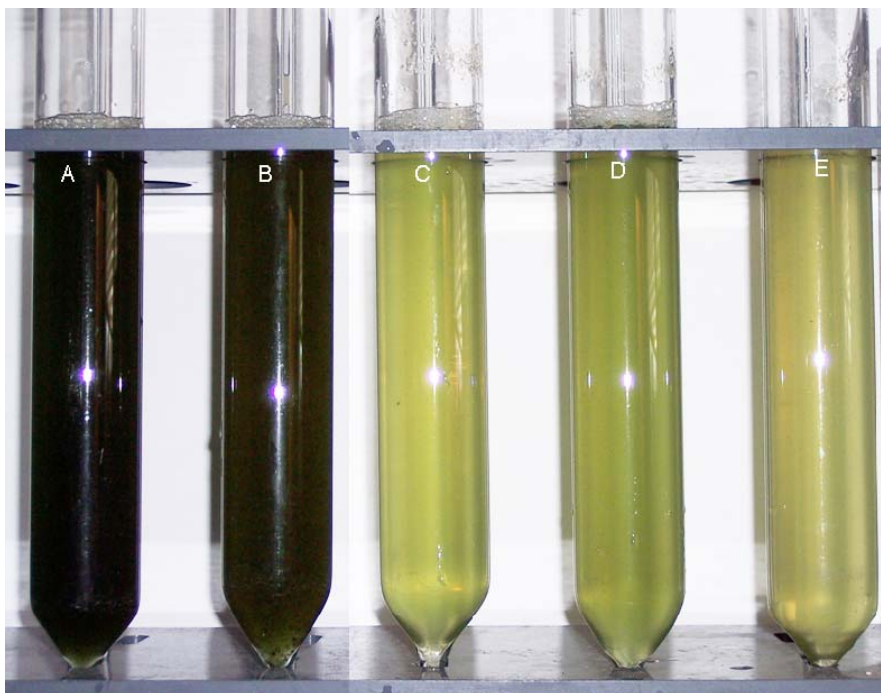


Abbildung 32: Wachstum der Kulturen in begasteten Röhren 96 h nach dem Umsetzen auf BG-11₀. A und B: Kontrollgruppe: AMC414-Mutante mit pAM1956. C-E: *Nostoc* AMC414 mit der [FeFe]-Hydrogenase aus *Bacteroides thetaiotaomicron*.

4.6 Fusion der Untereinheiten der Hydrogenase an das Photosystem I

Es wurde der Versuch unternommen, an das PsaD des Photosystems I von *Synechocystis* sp. PCC 6803 die Untereinheiten der bidirektionalen Hydrogenase zu fusionieren. Dadurch soll mit den Elektronen der Photosynthesekette Wasserstoff erzeugt werden, indem die Elektronen während der Photosynthese nicht mehr überwiegend auf das Ferredoxin geleitet werden, sondern vermehrt auf die katalytische Untereinheit der Hydrogenase. Als Wirtsorganismus wurde dafür eine Mutante von *Synechocystis* verwendet, bei der die Gene von *hoxE* bis *hoxH* der Hydrogenase also das gesamte *hox*-Operon (Abbildung 33) durch eine Kanamycinkassette ersetzt worden waren und sich so keine Aktivität der bidirektionalen Hydrogenase zeigen konnte (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jens Appel).

Die Gene des Operons der Hydrogenase kodieren für die Diaphorase, welche den NAD(P)-umsetzenden Teil des Enzyms bildet und für den eigentlichen Hydrogenaseteil, der für den Umsatz des Wasserstoffs zuständig ist (Abbildung 33). Für eine Fusion mit dem PsaD mussten daher die Gene, die für den Wasserstoff umsetzenden Teil kodieren (*hoxY*, ORF 6 und 7, *hoxH*), im Genom an das *psaD*-Gen rekombiniert werden. Dabei kodiert *hoxY* für die kleine Untereinheit der Hydrogenase und *hoxH* für die Große. ORF 6 und 7 bilden offene Leserahmen unbekannter Funktion. In einem weiteren Versuch wurde *hoxU* für die Fusion mitverwendet. Dieses Gen kodiert für ein Protein, in welchem Eisen-Schwefel-Cluster sitzen, welche in der Lage sind, Elektronen an die eigentliche Hydrogenase weiterzuleiten und in diesem Versuch die Leitung der Elektronen vom PsaD an die Hydrogenase gewährleisten sollen. Es wurden *hoxU* und ein Teil von *hoxY*, welches für die kleine Untereinheit der Hydrogenase kodiert, die weitere Eisen-Schwefel-Cluster besitzt, sowie Teile des *psaD* und des sich anschließenden offenen Leserahmens per PCR amplifiziert und fusioniert. In einer zweiten Variante wurde nur der Teil von *hoxY* vervielfältigt und mit den Teilen von *psaD* per Fusion verbunden (Abbildung 34). Auf der Ebene der Aminosäuren geht die Peptidkette nach der Aminosäure 108 (Glutamat) des PsaD in das jeweilige Hox-Protein über.

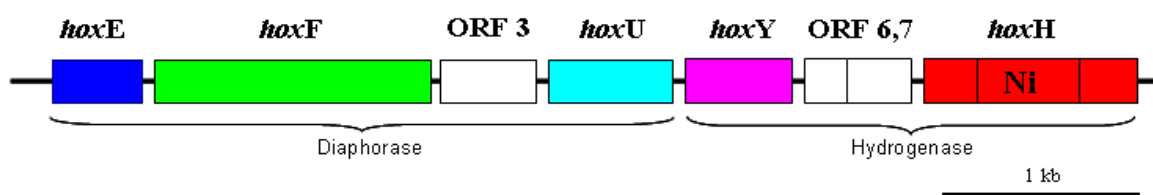


Abbildung 33: Operon der bidirektionalen Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. ORF: open reading frame/ (offener Leseramen), Ni: Nickel (Appel und Schulz 1996)

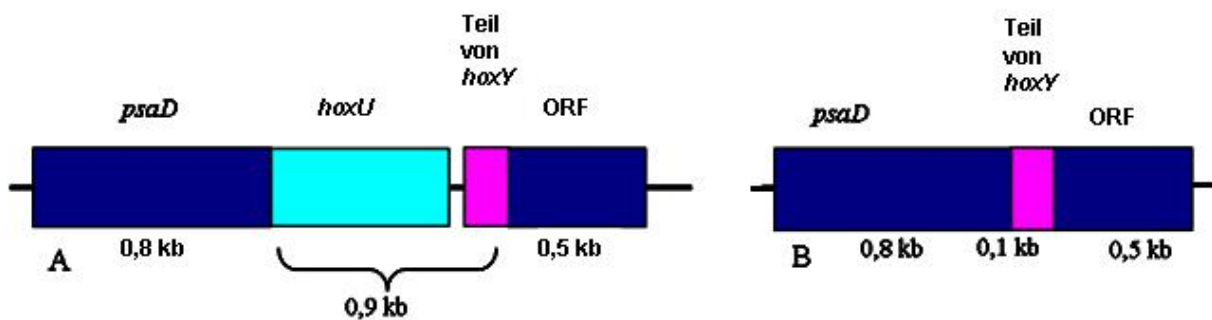


Abbildung 34: Schema des Ergebnisses der Fusions-PCR mit Teilen des *psaD*-Gens und des Hydrogenaseoperons. Abbildung A zeigt die Fusion mit *hoxU*, wogegen in Abbildung B nur ein Teil von *hoxY* in die Fusion miteinbezogen wurde.

Beide Varianten wurden in den TOPO-Vektor kloniert. In einem zweiten Schritt wurde per Sall- und NdeI-Schnittstellen aus einem bereits vorhandenen Klon (Plamid pGem mit kloniertem *hox*-Fragment, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jens Appel) der Rest von *hoxY*, die offenen Leserahmen 6 und 7, sowie *hoxH*, welches für die große Untereinheit der Hydrogenase kodiert, die das katalytische Zentrum bildet, per Sall-NdeI-Klonierung eingefügt. Im letzten Schritt wurde per Sall-Schnittstelle die Resistenzkassette gegen Erythromycin kloniert (Abbildung 35).

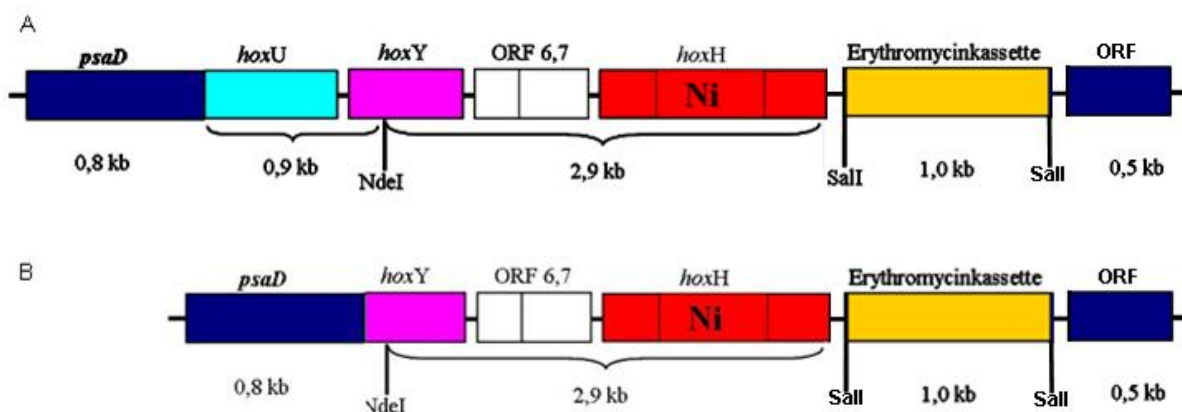


Abbildung 35: A: Das Schema zeigt das fertige Konstrukt für die Rekombination in *Synechocystis* sp. PCC 6803. B: In der zweiten konstruierten Variante fehlt das kodierende Gen für *hoxU*. In dem als *hoxH* bezeichneten Gen ist die Nickelbindestelle gekennzeichnet (Ni).

Nach der Transformation wurden die Kulturen auf BG11-Platten mit 5 mM Glukose überimpft und bei $5 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ angezogen. Später wurden die Kulturen zur Segregation alle zwei Wochen auf neue Platten übertragen. Nach drei Monaten wurde DNA isoliert und die Segregation mittels eines Southern-Blots überprüft (Abbildung 36). Für den Blot wurde die

genomische DNA mit HindIII (ein Verdau mit HindIII versprach die markantesten Banden im Southern-Blot) verdaut und zur Detektion eine Dig-markierte Sonde verwendet, die mit Primern hergestellt worden war, die am Beginn und am Ende des *psaD*-Gens ansetzen.

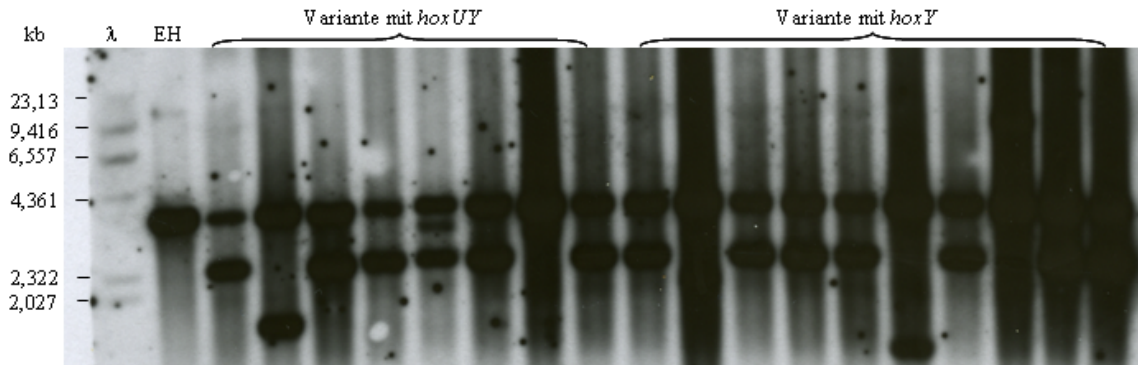


Abbildung 36: Gezeigt ist der Southern-Blot der transformierten Kulturen von *Synechocystis*. Gezeigt sind die Größen des Markers in Kilobasen (kb), die Spur des Lambda-Markers (λ), die *hoxE-H*-Mutante von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (EH), sowie verschiedene Klone der zwei unterschiedlichen Varianten der verwendeten Fusionskonstrukte.

Bei korrekter Rekombination in das *psaD* von *Synechocystis* sollten die erhaltenden Banden für die Variante *hoxUY* 5742 bp, sowie 2664 bp betragen. Die Banden der Variante *hoxY* sollten 4981 bp und 2664 bp groß sein. Die kleinere Bande konnte bei allen Proben gefunden werden, wogegen die größere stets fehlte, was auf ein Misslingen der Rekombination schließen lässt. Dies ist umso bemerkenswerter, als dass Kolonien erst nach dem dritten Versuch einer Transformation auftraten (Daten nicht gezeigt) und schließlich nur wenige Klone isoliert werden konnten, die, wie beschrieben, keine korrekte Rekombination aufwiesen, was darauf schließen lässt, dass die Fusion mit dem *psaD* des PSI physiologisch stark benachteiligt ist.

5. Diskussion

5.1 Verteilung von Hydrogenasen in cyanobakteriellen Genomen

Es wurde für die Datenbankanalyse erstens die Genbank des National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und zweitens von Cyanobase (<http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/>) untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese keinen Anspruch auf Vollständigkeit besitzen, was die Anzahl der cyanobakteriellen Genome anbelangt. Auch waren nicht alle der betrachteten Stämme zum Zeitpunkt der Untersuchung komplett sequenziert, was zu leichten Verschiebungen in den erlangten Ergebnissen führen könnte. Weiterhin wird jede Schlussfolgerung von der Verteilung eines Gens in der Umwelt auf dessen Aktivität dadurch erschwert, dass dieses von dem im jeweiligen Milieu lebenden Organismus nicht notwendigerweise exprimiert werden muss, sondern genauso ruhen und erst bei einer größeren Umweltveränderung exprimiert werden könnte. In Hinsicht auf die hier untersuchte Verteilung der verschiedenen Typen der Hydrogenasen erscheint diese Theorie aber abwegig. Vielmehr scheint biologischer Wasserstoffverbrauch bzw. dessen Produktion in einer großen Anzahl von Salz- und Süßwasserhabitaten gebräuchlich zu sein, wie im Folgenden ausführlich dargestellt werden soll (Abbildung 37).

5.1.1 Die Verteilung der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, werden bei der Verteilung der großen Untereinheit der bidirektionalen Hydrogenase HoxH der Cyanobakterien bestimmte Ökosysteme bevorzugt. Im Falle der hier betrachteten cyanobakteriellen Genome konnte kein für die große Untereinheit der bidirektionalen Hydrogenase kodierendes Gen in isolierten Proben aus dem offenen Ozean gefunden werden. Da sowohl die diazotrophen cyanobakteriellen Stämme, als auch die heterotroph lebenden Bakterien aus dem offenen Ozean aufnehmende Typen von Hydrogenasen besitzen, gibt es folglich keine Selektion gegen die Enzymklasse der Hydrogenasen an sich, wohl aber gegen die einzelnen Gruppen. Trotzdem gibt es eine klare Präferenz des Vorkommens der bidirektionalen Hydrogenase in Milieus wie das des marinen Küstenbereichs, Becken, Süßwasserseen und mikrobiellen Matten. An diesen Orten können

Cyanobakterien und heterotroph lebende Bakterien entweder ein mikrooxygeniertes Milieu oder komplett anaerobe Bedingungen vorfinden.

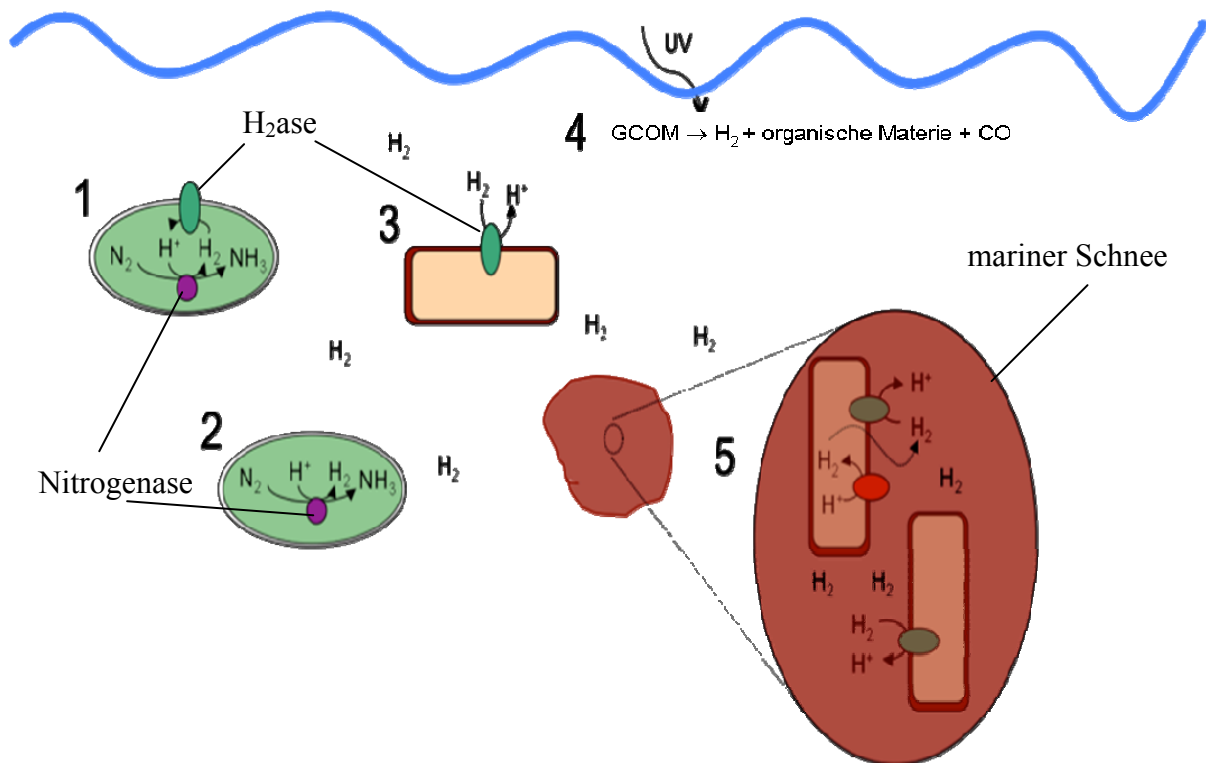


Abbildung 37: Schematisch gezeigt sind die Prozesse, die eine Rolle in der Wasserstoffproduktion bzw. dessen Verbrauch im marinen Oberflächenwasser spielen und anhand der Ergebnisse gestützt werden. 1: Einige stickstofffixierende Cyanobakterien sind bei Anwesenheit einer aufnehmenden Hydrogenase in der Lage, den von der Nitrogenase produzierten Wasserstoff wieder aufzunehmen und so wieder zu verwenden. 2: Andere, meist einzellige Organismen besitzen dagegen oft keine aufnehmende Hydrogenase und produzieren so während der Stickstofffixierung Wasserstoff. 3: Heterotroph lebende Bakterien nutzen wahrscheinlich die Übersättigung der Konzentration an H_2 in den oberen Wasserschichten mittels sauerstofftoleranten aufnehmenden Hydrogenasen. 4: Zusätzlich wird Wasserstoff auch in abiotischen Prozessen produziert, wie z.B. im Abbau von gelöster chromogener organischer Materie (GCOM) durch UV-Licht. Als Nebenprodukt entsteht hier zusätzlich Kohlenstoffmonoxid. 5: In „marinem Schnee“ erzeugen heterotroph lebende Bakterien durch den Verbrauch von Sauerstoff eine anaerobe Umgebung. In dieser könnte durch eine membrangebundene H_2 -produzierende Hydrogenase in Verbindung mit einer aufnehmenden Hydrogenase ein Protonengradient generiert werden.

Für Cyanobakterien wurde gezeigt, dass die bidirektionale Hydrogenase unter anaeroben Bedingungen aktiviert wird und für die fermentative Wasserstoffproduktion zuständig ist (Troshina et al. 2002). Dieses Ergebnis wird bekräftigt durch die Anwesenheit des Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR)-Genes *nifJ* in denselben Cyanobakterien. Während der Fermentation katalysiert die PFOR die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO_2 und versorgt die Hydrogenase mit Elektronen. Dabei entsteht auch reduziertes Ferredoxin bzw. Flavodoxin. Dieses wiederum kann von der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase zur Produktion von Wasserstoff genutzt werden (Troshina et al. 2002). Weiterhin ist bekannt, dass die bidirektionale Hydrogenase unter Anaerobizität als

Elektronenventil dient, wenn der Organismus von Fermentation zu Photosynthese wechselt (Appel et al. 2000, Cournac et al. 2002, 2004, Guthann et al. 2007). Diese Zusammenhänge könnten auch die hohe Konzentration an Wasserstoff erklären, die während den Morgenstunden in eutrophierten Seen gefunden werden können (Conrad et al. 1983). Die Konzentration des Sauerstoffs könnte hier aufgrund hoher Aktivität der Zellatmung abgesunken sein und so die Hydrogenase aktiviert werden. So kann es während der Nacht zu einer fermentativen Wasserstoffproduktion kommen, die bis zum Wiedereinsetzen der Photosynthese am nächsten Morgen anhält. Auf diese Weise entsteht ein mit Wasserstoff übersättigter See. Eine ähnliche Schwankung der Konzentration des Wasserstoffs wurde auch für cyanobakterielle Matten beschrieben (Hoehler et al. 2001). In beiden genannten Fällen wird die Produktion des Wasserstoffs nicht ausschließlich durch Cyanobakterien bewerkstelligt, sondern auch durch die Aktivität von Algen und heterotroph lebender Bakterien, die im selben Milieu siedeln.

5.1.2 Die Verteilung der aufnehmenden Hydrogenase und der Nitrogenase

Von den untersuchten 66 cyanobakteriellen Stämmen besitzen 26 *nifD*, welches für die große Untereinheit der Nitrogenase kodiert und sind deshalb als diazotroph anzusehen. Allerdings ist die Aktivität der Nitrogenase meist mit der von HupL (große Untereinheit der aufnehmenden Hydrogenase) gekoppelt, d.h. mit der Aktivität der aufnehmenden Hydrogenase, die den produzierten Wasserstoff recycelt. Nur vier Stämme (*Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus* sp. PCC 7335, *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab, *Synechococcus* sp. JA-2-3B'a(2-13)), der hier analysierten Organismen, bilden eine Ausnahme: Ihnen fehlt *hupL*. Eine Suche in der Datenbank mit den Metatranskriptomen (Poretzky et al. 2009) zeigte, dass dieser Typ der aufnehmenden Hydrogenase im offenen Ozean in Cyanobakterien exprimiert wird (Ergebnis nicht dargestellt).

Die Stickstofffixierung ist ein wesentlicher Grund für die Produktion von H₂ in terrestrischen Ökosystemen (Conrad und Seiler 1980). *In situ*-Messungen des diazotrophen Cyanobakteriums *T. thiebautii* in der Sargassosee lassen allerdings vermuten, dass dies dort eine vernachlässigbare Wasserstoffquelle darstellt (Scranton et al. 1987). Dies weist darauf hin, dass die Stickstofffixierung der filamentösen Cyanobakterien einen geringen Beitrag zu den H₂-Quellen in marinen Ökosystemen leistet, da sie meist gleichzeitig im Besitz einer aufnehmenden Hydrogenase sind. Auf der anderen Seite sind einzellige diazotrophe cyanobakterielle Stämme (z.B. einige Stämme von *Synechococcus*) frei von aufnehmenden

Hydrogenasen (Ludwig et al. 2006). Sie produzieren Wasserstoff während der Fixierung des Stickstoffs aus der Atmosphäre (Mitsui und Suda 1995). Diese einzelligen Bakterien vollziehen eine zeitliche Trennung zwischen dem sauerstoffempfindlichen Mechanismus der Stickstofffixierung, welcher in die Nacht verlagert ist und der sauerstoffgenerierenden Reaktion der oxygenen Photosynthese, die während des Tages stattfindet. Allerdings ist es einigen Stämmen auch möglich, Stickstoff während der Lichtphasen zu fixieren (Mitsui und Suda 1995, Ortegacalvo und Stal 1991). Der Mechanismus dieser Fixierung und der Schutz der Nitrogenase vor Sauerstoff verbleiben bis heute allerdings ungeklärt. Einzelne diazotrophische Stämme tragen einen ansehnlichen Teil zum fixierten Luftstickstoff in marinen Gewässern bei (Zehr et al. 2001, Montoya et al. 2004). Aus diesem Grund muss auch der Anteil an der Gesamtmenge des produzierten H_2 dementsprechend groß sein, da ihnen eine aufnehmende Hydrogenase fehlt. Eine Ausnahme bildet hier ein vor kurzem entdecktes unkultiviertes einzelliges Cyanobakterium. Diesem fehlt nicht nur das Photosystem II, sondern es beherbergt auch eine aufnehmende Hydrogenase (Zehr et al. 2008), welche nach den Ergebnissen dieser Arbeit eine nahe Verwandtschaft zu der von *Cyanothece* besitzt (4.2, 4.3 Abbildung 18). Dieser Stamm müsste in der Lage sein, den von der Nitrogenase produzierten Wasserstoff zu recyceln.

Über die Verteilung von cyanobakteriellen Stickstofffixierern im offenen Ozean, sowie ihrem saisonalen Vorkommen ist wenig bekannt. Es wurde allerdings per quantitativer PCR gezeigt, dass alle Gruppen weit verbreitet sind (Langlois et al. 2008, Fong et al. 2008). Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die Verteilung der Stickstofffixierer im Ozean unausgewogen ist und die Fixierung des N_2 somit variabel (Montoya et al. 2004), womit auch die Entwicklung von Wasserstoff von Ort zu Ort variieren kann.

Auch wenn wahrscheinlich einzellige stickstofffixierende Cyanobakterien mitverantwortlich für einen Teil der Wasserstoffproduktion sind, wird auch H_2 durch die Zersetzung von organischer Materie durch UV-Licht erzeugt (Punshon and Moore 2008). Auch koinzidiert die tägliche Schwankung der H_2 -Konzentration in marinem Oberflächenwasser mit der Sonneneinstrahlung (Herr et al. 1984, Conrad und Seiler 1988). Dieser Effekt verbleibt allerdings bis heute ungeklärt.

5.2 Verteilung von Hydrogenasen in den Genomen von heterotrophen Bakterien isoliert aus marinem Oberflächenwasser

Wie schon für die Datenbankrecherche für die Genome der Cyanobakterien so gilt auch hier, dass der benutzte Datensatz des NCBI keinen Anspruch auf Vollständigkeit hat. Auch hier waren alle Stämme, die dem offenen Ozean entstammten, frei von der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase (4.2, Tabelle 4). Allerdings besitzt eine große Anzahl an Genomen der marinen Bakterien, die aus Oberflächenwasser isoliert wurden, eine membrangebundene H₂-aufnehmende Hydrogenase (HupL). Auch hier bestätigte die Suche in der Datenbank mit Metatranskriptomen (Poretzky et al. 2009), dass dieser Typ von Hydrogenase im offenen Ozean sowohl in Cyanobakterien als auch in anderen Bakterien exprimiert wird (Ergebnisse nicht dargestellt).

Mycobakterien bevölkern aquatische Ökosysteme und sind in der Lage, Wasserstoff unter denselben aeroben Bedingungen aufzunehmen, wie es oben schon für *R. eutropha* beschrieben wurde (King et al. 2003). Dies stützt die These, dass die Aufnahme von Wasserstoff in diesem Milieu eine verbreitete Fähigkeit ist, die dabei behilflich sein könnte, in diesen Habitaten zu überleben. Ein Wachstum, das ausschließlich auf der Gewinnung von Energie durch die Verwertung von Wasserstoff beruht, ist allerdings ausgeschlossen, da hierfür dessen Konzentration selbst in übersättigtem Oberflächenwasser zu gering ist. Ein ähnlicher Vorschlag wurde im Zusammenhang mit dem längerfristigen Überleben von Bakterien und deren Fähigkeit, Wasserstoff aufzunehmen, gemacht (Morita 2000). Auch werden für die Fähigkeit von Bakterien, Kohlenstoffmonoxid in den Küstenbereichen der Ozeane zu oxidieren, ähnliche Thesen vertreten (King und Weber 2007, Moran und Miller 2007). Diese Hypothesen werden dadurch untermauert, dass die Fähigkeit zur aeroben Aufnahme von Wasserstoff schon anhand isolierter Partikel aus dem marinen Küstenbereich mit einer Größe zwischen 0,2 und 5 µm gezeigt worden ist (Punshon et al. 2007). Diese Eigenschaft ist speziell für lito- und heterotrophe Bakterien wichtig, welche möglichst viel der vorhandenen Energieressourcen verwerten müssen. Sie kann aber bei photoautotrophen Bakterien wie z. B. Cyanobakterien vernachlässigt werden.

5.2.1 Die Gruppe der Rhodobacteraceae und *Neptunibacter caesariensis*

Die Gencluster der membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenase der *Rhodobacteraceae* besitzen alle akzessorischen Gene, die auch von dem Enzym dieses Typus aus *Ralstonia eutropha* bekannt sind (4.2.1, Abbildung 16). Eine der vier Hydrogenasen von *N. caesariensis* sowie die Hydrogenasen der *Roseovarius*-Stämme sind nahe verwandt mit dieser Hydrogenase, wie durch die phylogenetische Analyse bewiesen wurde (4.2.1, Abbildung 18). Von diesem Enzym wurde gezeigt, dass es insensitiv gegenüber Sauerstoff und auch noch in einer Sauerstoffatmosphäre aktiv ist (Vincent et al. 2006, Cracknell et al. 2008). Elektrochemische Untersuchungen ergaben eine messbare Aktivität an Wasserstoffaufnahme bis zum Level von 1 bis 10 nM (Cracknell et al. 2008). Diese Konzentrationen an Wasserstoff liegen sehr gut in dem Bereich, der auch in Oberflächenwasser gefunden werden kann. Einer der isolierten Stämme (*Roseovarius* sp. HTCC 2601) stammte aus der Sargassosee, alle anderen aus Küstenzonen. In diesen machen die α -Proteobakterien mehr als 24 % des Bakteriumplanktons aus (Gonzalez et al. 1997). Aus diesem Grund müssten auch ihre Hydrogenasen in diesem Milieu verbreitet sein.

5.2.2 Die Gruppe der Vibrionaceae

Bakterielle Aktivität kann zur Anaerobizität in marinen organischen Aggregaten führen. In diesen Partikeln (z.B. mariner Schnee), die bis 1,5 mm klein sein können, wurden weder methanogene noch sulfatreduzierende Bakterien gefunden (Ploug et al 1997). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse implizieren, dass solche anaeroben Mikropartikel besonders von Bakterien der Gruppe der Vibrionaceae besetzt sein könnten, da diese sowohl eine membrangebundene aufnehmende Hydrogenase als auch eine Hydrogenase des Typs III von *E. coli* besitzen (4.2.2, Abbildung 19 und 20) und zur Fermentation bzw. für die Aktivität der Hydrogenasen anaerobe Bedingungen benötigen, die in den organischen Partikeln zu finden sind. Da deren membrangebundene H_2 -produzierende Hydrogenase in *E. coli* in Verbindung mit Untereinheiten der Formiatdehydrogenase kodiert ist (4.2.2, Abbildung 19), liegt die Vermutung nahe, dass sie für die Formiathydrogenlyase-Reaktion zuständig ist. In *E. coli* wird durch diese Entgiftungsreaktion das Formiat, welches während der Fermentation produziert wird, zu Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid umgewandelt. So könnte das Enzym in einem zusätzlich energiegenerierenden Schritt involviert sein (Sawers 2005). Die membrangebundene aufnehmende Hydrogenase, welche ebenfalls im Genom der

Vibrionaceae codiert ist, erlaubt die Wiederaufnahme des Wasserstoffs und könnte zusätzlich für den Transport von Protonen aus der Zelle zuständig sein (Redwood et al. 2008). Aufgrund dieser Arbeit mit den oben angeführten Indizien, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die membrangebundene H₂-produzierende Hydrogenase der Vibrionaceae als Indikator für Bakterien genutzt werden könnte, die das Innere organischer Partikel besiedeln.

5.3 Verteilung der Hydrogenasen in metagenomischen Datenbanken

Für die Analyse der Metagenome wurde die GOS-Datenbank untersucht. Wie aus den vorangegangenen Ergebnissen erwartet, konnte in den aus dem offenen Ozean isolierten Proben keine Hydrogenasesequenz gefunden werden (4.3). Der auffällige Mangel an Hydrogenasesequenzen aus dem Küstenbereich in dieser Datenbank erklärt sich durch die Filterprozedur. Die meisten der isolierten Partikel besaßen eine Größe zwischen 0,2 und 0,8 µm. Auf diese Weise wurden partikelassoziiert lebende Bakterien automatisch ausgesondert. Proben anderer Filtergröße wurden bis zum Zeitpunkt des Abschluss der Untersuchung noch nicht in der GOS-Datenbank veröffentlicht. Des Weiteren könnte die Zusammensetzung der Umweltproben die Art und Häufigkeit der in die Plasmide eingebauten DNA-Sequenzen beeinflussen. Daher könnte bei zahlenmäßiger Überlegenheit an Organismen ohne Hydrogenasen deren DNA-Sequenzen eher in die später zu sequenzierenden Plasmide eingebaut werden. Dies könnte so zu einer verringerten Zahl an gefundenen Sequenzen von Hydrogenasen führen. Allerdings stimmt mit den Erwartungen überein, dass alle gefundenen Sequenzen von Probenorten stammten, in den Anaerobizität vorherrscht oder zumindest potentiell vorherrschen kann (4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, Abbildungen 21, 23 und 24).

5.3.1 Verteilung der cyanobakteriellen bidirektionalen Hydrogenase

Die Gene der bidirektionalen Hydrogenase verteilen sich bei 54 Sequenzen auf zwölf gefundene Gruppen und vier Fundorte (4.3.1, Abbildung 21). Damit stellt dieser Typ von Hydrogenase den größten Anteil der in der metagenomischen Datenbank gefundenen Sequenzen. Die Fundorte sind, wie oben bereits erwähnt, in der Lage, anaerobe Bedingungen zu beherbergen und entstammen alle dem Küstenbereich, oder beherbergen ein hypersalines Becken. Die gefundenen Sequenzen waren häufig mit der Gruppe der *Synechococcus/Prochlorococcus* verwandt (4.3.1, Abbildung 22). Da sowohl *Synechococcus* als auch *Prochlorococcus* im offenen Ozean vorkommen und bei der verwendeten Filtergröße

auch deren DNA isoliert wurde, scheinen diese Organismen im Freiwasser tatsächlich keine Hydrogenase zu besitzen, was die Analyse der Gesamtgenome bestätigt. Das seltene Auffinden von Sequenzen im Küstenbereich lässt sich mit den bereits oben erwähnten Gründen erklären und liegt hier somit vielleicht an der knappen Anzahl an Organismen mit einer bidirektionalen Hydrogenase im Vergleich mit Organismen ohne dieses Enzym.

5.3.2 Verteilung der membrangebundenen aufnehmenden Hydrogenase

Die Zahl der gefundenen Sequenzen (41) verteilt sich auf neun Gruppen von Bakterien und drei Beprobungsorte (4.3.2, Abbildung 23). Es handelt sich hierbei um dieselben Fundorte wie bei den bidirektionalen Hydrogenasen. Die größte Fundstelle an Sequenzen bildet dabei das hypersaline Becken. Das Nichtauffinden dieser Hydrogenasenart im offenen Ozean ist wahrscheinlich auf die oben angeführten Gründe zurückzuführen. Die größte der gefundenen Gruppen bilden die Hydrogenophilaceae, welche von der Oxidation von Wasserstoff leben können, indem sie die Knallgasreaktion betreiben. Da hierfür die Anwesenheit von Sauerstoff zeitweise notwendig ist, sollten in dieser Gruppe Hydrogenasen zu finden sein, die insensitiv gegenüber O₂ sind.

5.3.3 Verteilung der [FeFe]-Hydrogenase

Zehn Sequenzen von [FeFe]-Hydrogenasen wurden an nur zwei Orten gefunden. Sie verteilen sich gleichmäßig auf fünf Gruppen. Alle Gruppen sind anaerob oder bevorzugen ein Mikrooxyklime. Da die [FeFe]-Hydrogenase das empfindlichste aller hier untersuchten Enzyme darstellt, indem es als einziges irreversibel von Sauerstoff inaktiviert wird, spricht alles dafür, dass in beiden Fundstellen Orte vorhanden sind, die anaerob werden können. Auffällig ist die Gruppe der Syntrophomonadaceae (4.3.3, Abbildung 24). Diese Gruppe ist dafür bekannt, mit anderen Organismen, z.B. methanogenen Bakterien, zu kooperieren, indem sie den produzierten Wasserstoff zur Verfügung stellen. Aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff ist es unwahrscheinlich, dass diese Hydrogenasen im Küstenbereich oder dem offenen Ozean gefunden werden können, da die Organismen oft strikte Anaerobier sind. Diese Hypothese wird auch von der Analyse der Gesamtgenome gestützt, in denen keine Sequenzen der [FeFe]-Hydrogenase gefunden werden konnten (4.2, Tabelle 4). Es existieren nur zwei Ausnahmen, die aber durch die anaerobe Umgebung ihres Fundortes erklärt werden können (mikrobielle Matte, Schwarzes Meer).

5.4 Verteilung von Sequenzen der bidirektionalen NAD(P)-gekoppelten [NiFe]-Hydrogenase in der Nord- und Ostsee, im Nordatlantik, im Mittelmeer, sowie in zwei Süßwasserseen

Für die Untersuchung über die Verteilung der bidirektionalen Hydrogenasen (Kapitel 4.4) in den verschiedenen Gewässern wurden degenerierte Primer benutzt, was zielgerichteter und preiswerter ist, als eine Shotgun-Klonierung mit anschließender Sequenzierung. Allerdings muss beachtet werden, dass diese Art von Primern wahrscheinlich nicht die bidirektionalen Hydrogenasen aller Organismen abdecken und zudem eine Präferenz zu einigen Sequenzen besitzen. Somit ist die quantitative Auswertung der Hydrogenasen mit Vorsicht zu betrachten, da das häufige oder seltene Auftreten von Organismen zum Teil auch der selektiven Präferenz der Primer geschuldet sein kann. Trotzdem kann angenommen werden, dass alle Familien der Bakterien, welche mit diesen Primern detektierbar sind, gefunden worden sind, da bei 85 Sequenzen maximal 9 Familien gefunden wurden (Norderpiep, Nordsee) (4.4, Abbildung 25). Die aus dem Oberflächenwasser der beiden Süßwasserseen (Westensee und Selenter See) detektierten Sequenzen der bidirektionalen Hydrogenase konnten insgesamt nur fünf Familien zugeordnet werden (4.4, Abbildung 25). Die Gruppen der Chroococcales, der Nostocaceae, der Methylococcaceae, der Dictyoglomaceae und der Oscillatoriales kommen dabei in beiden Seen vor. Auch nehmen Chroococcales und die Nostocaceae beide Male die größten Gruppen ein. Auffällig ist, dass es sich bis auf die Familie der Methylococcaceae um Cyanobakterien handelt, während die letztgenannten zu den Proteobakterien gehören.

Die aus der Ostsee isolierten Proben bestanden zu ca. 83% aus Cyanobakterien (Nostocaceae, Chroococcales), wogegen in der Nordsee die größte Gruppe von den Rhodobacteraceae gebildet wird (4.4, Abbildung 25). Die Anwesenheit der Nostocaceae als größte Gruppe in der Ostsee weist auf einen Stickstoffmangel hin, da diese Familie fähig ist, Luftstickstoff aus der Atmosphäre zu binden.

Wie in Kapitel 4.4 beschrieben, konnten keine Sequenzen aus den Proben des oligotrophen Mittelmeers und des Nordatlantiks, welcher ebenfalls nährstoffarm ist, amplifiziert werden. Dies bestätigt zusammen mit den anderen Fundorten aus Nord- und Ostsee, sowie den beiden Süßwasserseen die *in silicio* erhaltenen Ergebnisse.

5.5 *Nostoc*-Projekt: Ermittlung der Wasserstoffproduktion der Nitrogenase und heterologe Überexpression von [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von *Nostoc* sp. PCC 7120

Ziel des Versuches war die Überexpression einer aktiven [FeFe]-Hydrogenase in den Heterocysten eines fädigen Cyanobakteriums der Gruppe der Nostocaceae. Für die heterologe Expression der Eisenhydrogenasen wurde als Organismus *Nostoc* AMC 414 genommen, da diese Mutante von *Nostoc* sp. PCC 7120 das Protein XisC fehlt. Das XisC ist für das Rearrangement der DNA der aufnehmenden Hydrogenase während der Heterocystenentwicklung zuständig (Carrasco et al. 2005). Durch das Entfernen dieses Elements kann es nicht mehr zur Assemblierung einer aktiven aufnehmenden Hydrogenase kommen und so der durch die Nitrogenase bzw. heterolog exprimierte [FeFe]-Hydrogenase gebildete Wasserstoff nicht mehr aufgenommen, d.h. verbraucht werden.

5.5.1 Messungen der Aktivität der Nitrogenase der Mutante AMC 414 von *Nostoc* sp. PCC 7120

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob und in welcher Höhe die Mutante AMC414 Wasserstoff produziert, d.h. ob die aufnehmende Hydrogenase wirklich deletiert ist und ob sich der Stamm so anziehen lässt, dass keine Heterocysten entstehen und somit keine Aktivität der Nitrogenase messbar sein dürfte. Die Kulturen wurden hierzu auf BG-11-Medium mit 10 mM Arginin angezogen. Das Überangebot an Stickstoffquellen sollte die Ausbildung von Heterocysten verhindern. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert, gewaschen und in stickstofffreiem BG-11₀ wieder aufgenommen. Zu erkennen ist (4.5.1, Abbildung 26), dass eine messbare und gleichzeitig die maximale Aktivität der Nitrogenase 48 h Stunden nach der Induktion zu messen ist. Nach 72 Stunden ist die Aktivität um den Faktor 5,5 vermindert. Allerdings lässt sich nicht feststellen, ob sich der wahre Maximalwert nicht vor oder noch nach 48 Stunden befindet. Dafür hätten die Messintervalle kleiner sein müssen. Der starke Abfall der Aktivität nach 72 Stunden ist vielleicht auch dem Alter der Kultur geschuldet, die davor schon in BG-11 angezogen wurde. Die nicht messbare Aktivität zwischen der Induktion und dem Messpunkt nach 48 Stunden weist auf die Abwesenheit von Heterocysten hin, was auch durch die Lichtmikroskopie bestätigt werden konnte.

5.5.2 Promotorstudie des *nifH*-Promotors mittels eines GFP-Konstrukts

Durch das GFP-Konstrukt (4.5.2, Abbildung 27), sollte überprüft werden, ob der für die spätere heterologe Expression der Eisenhydrogenasen ausgewählte Promotor Aktivität aufweist und ob sich diese Aktivität selektiv auf die Heterocysten beschränkt. Die Sequenz für den Promotor wurde leicht verändert nach Bauer und Haselkorn 1995 ausgewählt. Für den Bereich des Promotors wurden 800 Basenpaare stromaufwärts des Gens gewählt, das für *nifH* kodiert. Die Kulturen wurden auf BG-11 mit 10 mM Arginin angezogen und später auf das Stickstoffmangelmedium BG-11₀ umgesetzt. Die Aufnahmen (4.6, Abbildung 28) der GFP-Fluoreszenz wurden 48 Stunden nach der Induktion gemacht und zeigen, dass der Promotor funktioniert und selektiv nur in den Heterocysten aktiv ist.

5.5.3 Heterologe Expression zweier verschiedener Eisenhydrogenasen in den Heterocysten der Mutante AMC 414 von *Nostoc* sp. PCC 7120

In diesem Versuchsteil sollten schließlich verschiedene [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten von *Nostoc* sp. PCC 7120 (Mutante AMC414) überexprimiert werden. Für die heterologe Expression wurden, wie in Kapitel 4.5.3 geschildert, zwei [FeFe]-Hydrogenasen ausgewählt, da dieser Hydrogenasentypus in vivo eine 100-mal größere Aktivität aufweist, als die der [NiFe]-Hydrogenasen. Zusätzlich sind die zwei ausgewählten Hydrogenasen von *B. thetaiotaomicron* und *S. oneidensis* im Gegensatz zu den [NiFe]-Varianten Ferredoxin gekoppelt (NCBI: NP_810747, KEGG: EC 1.12.7.2), was von Vorteil ist, da sie die Elektronen über das Ferredoxin der Photosynthesekette in den Heterocysten erhalten sollen. Zudem benötigen die Eisenhydrogenasen nur drei akzessorische Gene (Posewitz et al 2004), wogegen das Assemblierungssystem der [NiFe]-Enzyme mit mindestens sieben Genen weitaus komplizierter ist. Die [FeFe]-Hydrogenasen der beiden erwähnten Organismen wurden deshalb ausgewählt, da hier alle Gene in einem Operon vorliegen (4.5.3, Abbildung 29) und so per PCR leichter amplifiziert und kloniert werden konnten.

Für die Hydrogenase aus *S. oneidensis* konnte weder eine Aktivität der Hydrogenase gemessen werden, noch konnten Unterschiede im Wachstum gegenüber dem untransformierten Stamm beobachtet werden, obwohl Aktivität in *E. coli* gezeigt werden konnte.

Die mit der Hydrogenase aus *B. thetaiotaomicron* transformierten Kulturen wurden sowohl auf BG-11 mit 10 mM Arginin angezogen, abzentrifugiert, gewaschen und in BG-11₀ wieder aufgenommen, als auch von Agarplatten mit BG-11 + Arginin auf BG-11₀-Agarplatten

überimpft, oder als Schüttelkultur in Erlenmeyerkolben mit den erwähnten Medien angezogen (3.4.1). Was bei allen Varianten beobachtet werden konnte, war das Sterben der Kulturen nach Einsetzen der Heterocystenentwicklung. Dieses konnte auch nicht wieder durch die erneute Zugabe von Arginin aufgehalten oder rückgängig gemacht werden. Eine plausible Erklärung ist, dass durch die Assemblierung der Eisenhydrogenasen die vorhandenen Reservestoffe in den Heterocysten verbraucht werden. Die Spanne der H₂-Entwicklung ist dabei vielleicht so kurz, dass sie aus dem Messintervall gefallen ist. Da die Heterocysten durch die vegetativen Zellen mit Metaboliten versorgt werden, müssten diese den Heterocysten immer weitere Stoffwechselprodukte zur Verfügung stellen, die sogleich verbraucht würden, da die Expression der Hydrogenasen nicht von den Zellen reguliert, d.h. erniedrigt werden kann. Auf diese Weise verhungert der Organismus buchstäblich und die Kultur zeigt das beobachtete Absterben (4.5.3, Abbildung 31 und 32). Auch kann es durch die Aktivität der assemblierenden Gene zu einer Anhäufung von Kohlenstoffmonoxid und Cyanid (beides wird für eine aktive Hydrogenase gebraucht) in den Heterocysten kommen, was wiederum zu einem Absterben der Zellen führen würde. Zusätzlich könnte die aktive Eisenhydrogenase in Konkurrenz mit der Nitrogenase stehen und dieser die Elektronen, die über das Ferredoxin geleitet werden, wegnehmen. In dieser Situation wäre der Organismus unfähig zur Stickstofffixierung und könnte auf dem Stickstoffmangelmedium nicht mehr wachsen. In den genannten Fällen könnte die Phase der Wasserstoffproduktion nach der Aktivierung der [FeFe]-Hydrogenase bis zum Absterben der Zellen so kurz sein, dass sie von den Messintervallen nicht erfasst wurde.

5.6 Fusion der Untereinheiten der Hydrogenase an das Photosystem I

Mit der Fusion der bidirektionalen Hydrogenase an das PS I von *Synechocystis* sp. PCC 6803 sollte der Elektronentransport der Photosynthesekette mit der Produktion von Wasserstoff gekoppelt werden. Dass dies zumindest *in vitro* möglich ist, wurde bereits von Ihara et al. 2006 gezeigt. Weiterhin wurde für die löslichen NAD(P)⁺-reduzierenden Hydrogenasen von *R. eutropha* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 gezeigt, dass diese bei Anwesenheit von Sauerstoff durch die Zugabe von NADPH aktiviert werden können, indem dieses Elektronen auf die Hydrogenase transferiert (Burgdorf et al. 2005, Germer et al. 2009). Eine ähnliche Funktion könnte auch das PSI bei Inaktivierung der Hydrogenase durch den am PSII entstandenen Sauerstoff einnehmen. Für diesen Versuch wurden zwei verschiedene Fusionskonstrukte erstellt (4.6, Abbildung 34) und in eine Mutante von *Synechocystis*

transformiert, in der die bidirektionale Hydrogenase deletiert worden war. Anhand des Southern-Blots lässt sich jedoch feststellen, dass zwar ein Teil des Fusionskonstruktes in das Genom rekombiniert hat, diese Rekombination aber unvollständig ist, da von den zwei erwartenden Banden jeweils die Größere fehlte, die Kleinere aber vorhanden war. Die Art und Weise dieser Rekombination lässt sich im Nachhinein nur schlecht bestimmen, vermutet werden kann aber, dass z.B. die Kanamycinkassette des TOPO-Vektors mit der gleichen Kassette, rekombiniert hat, die für die Deletion der für die bidirektionale Hydrogenase kodierenden Gene in der Mutante von *Synechocystis* verwendet wurde. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das Fusionskonstrukt mit noch vorhandenen Resten des *hox*-Operons in der Mutante rekombiniert hat.

6. Ausblick

Sowohl die *in silicio* Analysen der Datenbanken als auch die Untersuchungen der verschiedenen Gewässer mittels degenerierter Primer eröffnen weitere interessante Aspekte und Ansatzpunkte. So wäre es von Interesse, die Analysen über die Verteilung der verschiedenen Klassen der Hydrogenasen mit vergrößerten Datensätzen in den Genbanken fortzuführen. Ein besonderes Augenmerk wäre hier auf die „Global ocean sampling metagenomic database“ zu legen. Da in dieser Metagenomdatenbank bisher meist nur die Isolate von Filtern zwischen 0,2 und 0,8 µm sequenziert und veröffentlicht wurden, würde die Analyse von den vorhandenen Filtern anderer Größe, den Zugriff auf die Genome ganz anderer Organismen ermöglichen.

Durch lateralen Gentransfer, der wahrscheinlich in der Entwicklung der Eisenhydrogenasen stattgefunden hat, war es bisher nicht möglich, einen phylogenetischen Stammbaum dieser Klasse von Hydrogenasen zu erstellen. Hier besteht eventuell die Möglichkeit die Phylogenie mit Hilfe der akzessorischen Gene zu bestimmen. Nach einer vorläufigen phylogenetischen Analyse könnte sich HydE dazu eignen. Allerdings müsste hierfür noch eine passende Outgroup ermittelt werden, da die verwendeten nicht optimal erscheinen.

Auch könnte die Suche nach Hydrogenasen mittels degenerierter Primer erweitert werden, indem erstens andere Gebiete zur Beprobung herangezogen werden und zweitens, indem degenerierte Primer für *hypD* verwendet werden, was die gesamte Bandbreite der [NiFe]-Hydrogenasen abdecken und sich nicht nur auf das bidirektionale Enzym beschränken könnte.

Für die heterologe Expression der [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten von *Nostoc* sp. PCC 7120 müsste ein regulierbarer Promotor gefunden werden, um eventuell die Aktivität dieser Hydrogenase zu vermindern. Zusätzlich müsste die Entwicklung der Heterocysten von der Abwesenheit einer Stickstoffquelle entkoppelt werden, um Konkurrenz mit der Nitrogenase zu vermeiden. In einem letzten Schritt müsste dieses Konstrukt dauerhaft stabil in das Genom integriert werden.

Für die Fusion der Untereinheiten der bidirektionalen Hydrogenase an das PSI von *Synechocystis* sp. PCC 6803 müsste zunächst wahrscheinlich eine neue Deletionsmutante der NAD(P)-gekoppelten Hydrogenase erstellt werden, die keine Reste des *hox*-Operons mehr enthält. In einem weiteren Schritt müsste das Fusionskonstrukt aus dem Vektor geschnitten, aufgereinigt und in die Transformation eingesetzt werden, um zu vermeiden, dass Teile des Vektors mit dem Genom rekombinieren.

7. Zusammenfassung

Die erstellte Arbeit zeigt einen Bezug zwischen der Verteilung von [NiFe]-Hydrogenasen und der Stufe der Trophie in marinen Gewässern auf. Die NAD(P)-gekoppelten Hydrogenasen konnten weder in Datensätzen des offenen Ozean gefunden, noch selber per PCR detektiert werden, sondern kamen in beiden Fällen nur im Küstenbereich, d.h. in einem Bereich mit terrestrischem Einfluss und somit nicht in Bereichen, die oligotroph sind, vor. Dass der Küstenbereich insgesamt reich an Sequenzen dieser Arten von Hydrogenasen ist, konnte sowohl durch die PCR, als auch durch die Untersuchung der Gesamtgenome gezeigt werden. Im Gegensatz dazu korrelierten die Fundorte der aufnehmenden Hydrogenasen nicht mit dem Grad der Trophie, sondern mit der diazotrophen Lebensweise des Organismus, was bedeutet, dass die Anwesenheit dieses Typs von Hydrogenase mit der Präsenz der Nitrogenase einhergeht, auch wenn es hier Ausnahmen bei einzelligen stickstofffixierenden Bakterien gibt. Gleichzeitig konnten in der Gruppe der Rhodobacteraceae, sowie bei *Neptunibacter caesariensis* Hinweise darauf gefunden werden, dass es sich bei den dortigen membrangebundenen Hydrogenasen um sauerstoffresistente Varianten handelt, die verwandt mit dem Enzym von *R. eutropha* sind. Zudem scheint sich die membrangebundene H₂-produzierende Hydrogenase der Vibrionaceae als Marker für das Innere organischer Partikel besiedelnder Bakterien anzubieten. Archeale Hydrogenasen konnten nicht gefunden werden, wogegen die Fundstellen von [FeFe]-Hydrogenasen sich in der metagenomischen Datenbank auf zwei potentiell anaerobe Fundorte außerhalb mariner Gewässer beschränkte.

Während der physiologischen Versuche mit dem Organismus *Nostoc* AMC 414 konnte im Gegensatz zum WT eine Wasserstoffproduktion der Nitrogenase beobachtet werden, da es in dieser Mutante von *Nostoc* sp. PCC 7120 nicht zur Assemblierung einer aktiven aufnehmenden Hydrogenase kommt. Zusätzlich wurde als Promotorstudie für eine anschließende heterologe Expression von [FeFe]-Hydrogenasen in den Heterocysten dieser Mutante von *Nostoc* ein 800 bp großes Fragment stromaufwärts des für NifH kodierenden Genes überprüft. Die heterologe Expression einer [FeFe]-Hydrogenase von *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 in den Heterocysten scheint im Prinzip zu funktionieren, allerdings führte diese Expression nach der Induktion der Heterocysten stets zum Absterben der gesamten Kultur. Gründe hierfür könnte die Akkumulation von CN und CO in den Heterocysten sein, was toxisch für die Zellen wäre. Weiterhin könnten überexprimierte Hydrogenasen mit den Nitrogenasen um den gleichen Elektronenpool konkurrieren, was dazu führen könnte, dass der Organismus nicht mehr unter Stickstoffmangel wachsen kann. Schließlich könnten die Heterocysten durch den erhöhten Verbrauch an Stoffwechselprodukten diese vermehrt aus den vegetativen Zellen abziehen und dieses zum Absterben der Kultur führen.

Die Fusion der bidirektionalen Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 an das Photosystem I des gleichen Organismus konnte während der vorliegenden Arbeit noch nicht abgeschlossen werden. Allerdings wurden aus den gewonnenen Erkenntnissen Lösungsvorschläge für eine verbesserte Versuchsdurchführung entwickelt.

8. Summary

This thesis describes a connection between the distributions of [NiFe]-hydrogenases and the trophic level of marine environments. The NAD(P)-linked hydrogenases could neither be found in the datasets of the open ocean, nor was detectable by using PCR. But with both methods it was possible to detect these sequences in organisms isolated from marine surface waters of costal regions, i.e. in a region with terrestrial influence and which therefore is not oligotrophic. The circumstance that the costal region is rich in sequences of the bidirectional hydrogenase is represented by the fact, that the coding sequences of that type of hydrogenase could be detected via PCR and analysis of the genome sequences of the various bacteria. In contrast to the results above the findings of the sequences of the uptake hydrogenase did not correlate with the trophic level, but with the ability of the organisms to live diazotrophic. So the presence of that type of hydrogenase is connected to the attendance of the nitrogenase,

even there are some exceptions for unicellular, nitrogen-fixing bacteria. Furthermore, strong indications that the group of the *Rhodobacteraceae* and *Neptunibacter caesariensis* harbour the genes coding for a membrane bound hydrogenase were found, which is insensitive to oxygen and related to the same enzyme in *R. eutropha*. In addition the membrane bound H₂-evolving hydrogenase of the *Vibrionaceae* seems to be a marker for the hydrogenases of bacteria that are living inside of organic particles. Sequences of the hydrogenases of the archaea could not be found, but the ones of the [FeFe]-type were detectable in the metagenomic database. These samples were collected at two places outside marine environments.

During the physiological tests with *Nostoc*-mutant AMC 414 evolution of hydrogen was detectable, whereas with the wildtype it was not, because the mutant of *Nostoc* sp PCC 7120 is not able to assemble an active uptake hydrogenase. Additionally, for a study of later heterologous expression in the heterocysts of that mutant of *Nostoc*, a 800 bp large DNA-fragment upstream of the gene coding for NifH was tested for promoter activity. The heterologous expression of the [FeFe]-hydrogenase of *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 in the heterocysts of *Nostoc* seems to be working, but the expression of that enzyme results in the death of the organism after the induction of the heterocysts. Reasons therefore could be the accumulation of CN and CO in the heterocysts, which would be toxic for the cells. Furthermore, the overexpressed hydrogenase could compete with the nitrogenase for the same pool of electrons, which would make it impossible for the organism to grow under nitrogen absence. Finally the death of the culture could be caused by higher requirements of metabolic intermediates by the heterocysts, which would be removed from the vegetative cells.

The fusion of the bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with the photosysteme I of the same organism was not successful during this thesis. However, possible new approaches were generated on the basis of the obtained experience.

9 Literaturverzeichnis

Adams DG (2000): Heterocyst formation in cyanobacteria. *Curr Opin Microbiol* 3: 618 – 624.

Adams DG, Carr NG (1981): The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. *Crit Rev Microbiol* 9: 45 – 100.

Adams MWW (1990): The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1020: 115 – 145.

Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, van Hoek A, Boxma B, Vogels G, Veenhuis M, Hackstein JH (1998): [A hydrogenosome with a genome](#). *Nature* 396: 527 – 528.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389 – 3402.

Anderson SL, McIntosh L (1991): Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* 173: 2761 – 2767.

Appel J, Phunpruch S, Steinmüller K, Schulz, R (2000): The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol* 173: 333 – 338.

Appel J, Schulz R (1996): Sequence analysis of an operon of NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NADP(H)-dehydrogenase (complex I). *Biochim Biophys Acta* 1298: 141 – 147.

Appel J, Schulz R (1998): Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis - hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising? *J Photochem Photobiol B: Biol* 47: 1-11.

- Arahal DR, Lekunberri I, Gonzalez JM, Pascual J, Pujalte MJ, Pedros-Alio C, Pinhassi J (2007): *Neptuniibacter caesariensis* gen nov, sp nov, a novel genome-sequenced gamma proteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1000 – 1006.
- Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Mühlenhoff U, Lill R (2004): The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *EMBO J* 23: 2105 – 2115.
- Bauer CC, Haselkorn R (1995): Vectors for determining the differential expression of genes in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* sp strain PCC 7120. *J Bacteriol* 1995 177: 3332 – 3336.
- Berman-Frank I, Lundgren P, Chen YB, Küpper H, Kolber Z, Bergman B, Falkowski P (2001): Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science*. 5546: 1534 - 15437.
- Bernhard M, Schwartz E, Rietdorf J, Friedrich B (1996): The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J Bacteriol* 178: 4522 – 4529.
- Bleijlevens B, Buhrke T, van der Linden E, Friedrich B, Albracht SP (2004): The auxiliary protein HypX provides oxygen tolerance to the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by way of a cyanide ligand to nickel. *J Biol Chem* 45:46686 - 46891 Epub 2004 Aug 31.
- Blokesch M, Böck A (2002): Maturation of the [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J Mol Biol* 324: 287 – 296.
- Boekema EJ, Dekker JP, Heel MG van, Rögner M, Saenger W, Witt I, Witt HT (1987): Evidence for a trimeric organization of the photosystem I complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus*. sp *FEBS Lett* 217: 283 – 286.
- Brettel K (1997): Electron transfer and redox-cofactors in photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1318: 322 – 373.

Buhrke T, Friedrich B (1998): *hoxX* (*hypX*) is a functional member of the *Alcaligenes eutrophus* *hyp* gene cluster. Arch Microbiol 170: 460 – 463.

Buhrke T, Lenz O, Porthun A, Friedrich B (2004): The H₂-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. Mol Microbiol 51: 1677 – 1689.

Burgdorf T, van der Linden E, Bernhard M, Yin QY, Back JW, Hartog AF, Muijsers AO, de Koster CG, Albracht SP, Friedrich B (2005): Non-standard structures of the Ni-Fe cofactor in the regulatory and the NAD-reducing hydrogenases from *Ralstonia eutropha*. J Bacteriol 187: 3122 – 3132.

Cardemil L, Wolk CP (1979): The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga structure of the basic repeating unit. J Biol Chem, 254: 736 – 741.

Carrasco CD, Holliday SD, Hansel A, Lindblad P, Golden JW (2005): Heterocyst-specific excision of the *Anabaena* sp strain PCC 7120 *hupL* element requires *xisC*. J Bacteriol 187: 6031 – 6038.

Castenholz RW (1989): General Characteristics of the Cyanobacteria. In Garrity Y, GM (Editor), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed, Vol 1, The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 474 – 487.

Chenchik A, Moqadam F, Siebert PD (1996): A new method for full-length cDNA cloning by PCR. In: A laboratory guide to RNA: isolation, analysis and synthesis (Krieg PA, Ed) 273 - 321 Wiley-Liss, New York.

Conrad R (1996): Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). Mol Microbiol Rev 60: 609-640.

Conrad R and Seiler W (1988): Methane and hydrogen in seawater (Atlantic Ocean). Deep Sea Res 35: 1903-1917.

Conrad R, Aragno M, Seiler W (1983): Production and consumption of hydrogen in a eutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* 45: 502-510.

Conrad R, Seiler W (1980): Contribution of hydrogen production by biological nitrogen fixation to the global hydrogen budget. *J. Geophys. Res.* 85: 5493-5498.

Cournac L, Guedeney G, Peltier G, Vignais, PM (2004): Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp Strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *J Bacteriol* 186: 1737 – 1746.

Cournac L, Mus F, Bernard L, Guedeney G, Vignais PM, Peltier G (2002): Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients. *Int J Hydrog Energy* 27: 1229 – 1237.

Cracknell JA, Vincent KA, Ludwig M, Lenz O, Friedrich B, Armstrong FA (2008): Enzymatic oxidation of H₂ in atmospheric O₂: the electrochemistry of energy generation from trace H₂ by aerobic microorganisms. *J Am Chem Soc* 130: 424 – 425.

DeLong EF (2005): Microbial community genomics in the ocean. *Nat Rev Microbiol* 3: 459 – 469.

Douglas SE (1994): Chloroplasts origins and evolution. In DA Bryant (ed), *The molecular biology of cyanobacteria* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 91 – 118.

Duche O, Elsen S, Cournac L, Colbeau A (2005): Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O₂ sensitive without affecting its transducing activity. *FEBS J* 272: 3899 – 3908.

Eady RR (1996) : Structure–function relationships of alternative nitrogenases. *Chem Rev* 96: 3013 – 3030.

- Elsen S, Duché O, Colbeau A (2003): Interaction between the H₂ sensor HupUV and the histidine kinase HupT controls HupSL hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 185: 7111 – 7119.
- Erickson JA, Nyborg AC, Johnson JL, Truscott SM, Gunn A, Nordmeyer FR, Watt GD (1999): Enhanced efficiency of ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis utilizing reductants that form the all-ferrous redox state of the Fe protein. *Biochemistry* 14: 279 – 285.
- Felsenstein J (2005): Using the quantitative genetic threshold model for inferences between and within species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1427 – 1434.
- Fitch WM, Margoliash E (1967): A method for estimating the number of invariant amino acid coding positions in a gene using cytochrome c as a model case. *Biochem Genet* 1: 65 – 71.
- Florin, L, Tsokoglou, A, Happe, T (2001): A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *J Biol Chem* 276: 6125 – 6132.
- Fong AA, Karl DM, Lukas R, Letelier RM, Zehr JP et al (2008): Nitrogen fixation in an anticyclonic eddy in the oligotrophic North Pacific Ocean. *ISME J* 2: 663 – 676.
- Fontecilla-Camps JC, Frey M, Garcin E, Higuchi Y, Montet Y, Nicolet Y, Volbeda A (2001): Molecular architectures. In: R Cammack, M Frey, and R Robson (Eds) *Hydrogen As a Fuel: Learning from Nature* Taylor & Francis London, UK 93 – 109.
- Fontecilla-Camps JC, Volbeda A, Cavazza C, Nicolet Y (2007): Structure/Function Relationships of [NiFe]- and [FeFe]-Hydrogenases. *Chem Rev* 107: 4273 – 4303.
- Fournier, M, Dermoun, Z, Durand, M C, Dolla, AJ (2004): A new function of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress. *Biol Chem* 279: 1787 – 1793.
- Frey PA, Magnusson OT (2003): S-Adenosylmethionine: a wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin? *Chem Rev* 103: 2129 – 2148.

Friedrich T, Steinmüller K, Weiss H (1995): The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett* 367: 107 – 111.

Fromme P, Jordan P, Krauss N (2001): Structure of photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 5-31.

Fromme P, Schubert WD, Krauss N (1994): Structure of photosystem I: Suggestions on the dockingsites for plastocyanin, ferredoxin and the coordination of P700. *Biochim Biophys Acta* 1187: 99-105.

Gambacorta A, Romano I, Trincone A, Soriente A, Giordano M, Sodano G (1996): The heterocyst glycolipids from five nitrogen-fixing cyanobacteria. *Gazz Chim Ital*, 126: 653 – 656.

Garcin E, Vernede X, Hatchikian EC, Volbeda A, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1999): The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure* 7: 557 – 566.

Germer F, Zebger I, Saggiu M, Lenzian F, Schulz R, Appel J. (2009): Overexpression, isolation and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe]-hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem*. 2009 Sep 28.

Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness PC, Dubini A, Yu J, Seibert M (2007): Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annu Rev Plant Biol* 58: 71 – 91.

Giera W, Gibasiewicz K, Ramesh VM, Lin S, Webber A (2009): Electron transfer from A to A(1) in photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii* occurs in both the A and B branch with 25-30-ps lifetime. *Phys Chem Chem Phys* 11: 5186 – 5191.

Giovannoni SJ, Stingl U (2005): Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437: 343 – 348.

Glacer AN (1988): Phycobilisomes. *Methods Enzymol* 167: 304 – 312.

Gonzalez JM, Moran MA (1997): Numerical dominance of a group of marine bacteria in the α -subclass of the class *proteobacteria* in coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* 63: 4237 – 4242.

Graentzdoerffer A, Rauh D, Pich A, Andreesen JR (2003): Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. *Arch Microbiol* 179: 116 – 130.

Grigorieva G, Shestakov S (1982): Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp 6803. *FEMS Microbiology Letters* 13: 367-370.

Guergova-Kuras M, Boudreaux B, Joliot A, Joliot P, Redding K (2001): Evidence for two active branches for electron transfer in Photosystem I. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4437 – 4442.

Gutekunst K, Hoffmann D, Lommer M, Egert M, Suzuki I, Schulz R, Appel J (2006): Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Int J Hydr Energ* 31: 1452 – 1459.

Gutekunst K, Phunpruch S, Schwarz C, Schuchardt S, Schulz-Friedrich R, Appel J (2005) LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 as a transcription activator. *Mol Microbiol* 58: 810 – 823.

Gutthann F, Egert M, Marques A, Appel J (2007): Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances hydrogen evolution in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochem Biophys Acta* 1767: 161 – 169.

Hall TA (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95 – 98.

Happe RP, Roseboom W, Pierik AJ, Albracht SPJ, Bagley KA (1997): Biological activation of hydrogen. *Nature* 385: 126.

Haselkorn R (1978): Heterocysts. *Annu Rev Plant Physiol* 29: 319-344.

Hedderich R (2004): Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I? *J Bioenerg Biomembr* 36: 65-75.

Heidelberg JF, Paulsen IT, Nelson KE, Gaidos EJ, Nelson WC, Read TD, Eisen JA, Seshadri R, Ward N, Methe B, Clayton RA, Meyer T, Tsapin A, Scott J, Beanan M, Brinkac L, Daugherty S, DeBoy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Haft DH, Kolonay JF, Madupu R, Peterson JD, Umayam LA, White O, Wolf AM, Vamathevan J, Weidman J, Impraim M, Lee K, Berry K, Lee C, Mueller J, Khouri H, Gill J, Utterback TR, McDonald LA, Feldblyum TV, Smith HO, Venter JC, Neelson KH, Fraser CM (2002): Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol.* 11: 1118 -1123.

Herr FL, Frank EC, Leone GM, Kennicutt MC (1984): Diurnal variability of dissolved molecular hydrogen in the tropical South Atlantic ocean. *Deep Sea Res* 31: 13 - 20.

Herr FL, Scranton MI, Barger WR (1981): Dissolved hydrogen in the Norwegian sea: mesoscale surface variability and deep water distribution. *Deep Sea Res* 28: 1001 - 1016.

Higuchi Y, Yagi T, Yasuoka N (1997): Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5: 1671 – 1680.

Hoehler TM, Bebout BM, DesMarais DJ (2001): The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early earth. *Nature* 412: 324 – 327.

Hoek Cvd, Jahns HM, Mann DG (1993): *Algen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Houchins JP, Burris RH (1981): Comparative characterization of two distinct hydrogenases from *Anabaena* sp strain 7120. *J Bacteriol* 146: 215 – 221.

- Ihara M, Nishihara H, Yoon KS, Lenz O, Friedrich B, Nakamoto H, Kojima K, Honma D, Kamachi T, Okura I (2006): Light-driven hydrogen production by a hybrid complex of a [NiFe]-hydrogenase and the cyanobacterial photosystem I. *Photochem Photobiol* 82: 676 – 682.
- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N (2001): Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411: 909 – 917.
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC6803 II: Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 3: 109 – 136.
- King GM (2003): Uptake of carbon monoxide and hydrogen at environmentally relevant concentrations by mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 69: 7266 – 7272.
- King GM, Weber CF (2007): Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 5: 107 – 117.
- King PW, Posewitz MC, Ghirardi ML and Seibert M (2006): Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *J Bacteriol* 188, 2163 – 2172.
- Kleihues L, Lenz O, Bernhard M, Buhrke T, Friedrich B (2000): The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J Bacteriol* 182: 2716 – 2724.
- Komarek JK, Anagnostidis K (1989): Modern approach to the classification system of the cyanophytes 4-Nostocales. *Algol Stud* 56: 247 – 345.
- Lachance MA (1981): Genetic relatedness of heterocystous cyanobacteria by DNA-DNA reassociation. *Int J Syst Bacteriol* 31: 139 – 147.

Langlois RJ, Hummer D, LaRoche J (2008): Abundances and Distributions of the Dominant *nifH* Phylotypes in the Northern Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 74: 1922 – 1931.

Leach MR, Sandal S, Sun H, Zamble DB (2005): Metal binding activity of the *Escherichia coli* hydrogenase maturation factor HypB *Biochemistry*. *Biochemistry* 44: 12229 – 12238.

Lenz O, Friedrich B (1998): A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12474 – 12479.

Lichtenthaler HK (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* 148: 538 – 548.

Lindberg P, Lindblad P, Cournac L (2004): Gas exchange in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5. *Appl Environ Microbiol* 70: 2137-2145..

Lubitz W, Reijerse E, van Gastel M (2007): [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques. *Chem Rev* 107: 4331 - 4365.

Ludwig M, Schubert T, Zebger I, Wisitruangsakul N, Saggiu M et al (2009): Concerted action of two novel auxiliary proteins in assembly of the active site in a membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *J Biol Chem* 284: 2159 – 2168.

Ludwig M, Schulz-Friedrich R, Appel J (2006): Occurrence of hydrogenases in cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria: implications for the phylogenetic origin of cyanobacterial and algal hydrogenases. *J Mol Evol* 63: 758 – 768.

Lutz S, Jacobi A, Schlenzog V, Böhm R, Sawers G, Böck A (1991): Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenases isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5: 123 – 135.

- Magalon A, Böck A (2000): Dissection of the maturation reactions of the (NiFe) hydrogenase3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. FEBS Lett 473: 254 – 258.
- Maier T, Jacobi A, Sauter M, Böck A (1993): The product of the *hypB* gene, which is required for nickel incorporation into hydrogenases, is a novel guanine nucleotide-binding protein. J Bacteriol 175: 630 – 635.
- Maier T, Lottspeich F, Böck A (1995): GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. Eur J Biochem 230: 133 – 138.
- Matias PM, Soares CM, Saraiva LM, Coelho R, Morais J, Le Gall J, Carrondo MA (2001): [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3. J Biol Inorg Chem 6: 63 – 81.
- Meeks JC, Wolk CP, Lockau W, Schilling N, Shaffer PW, Chien WS (1987): Pathways of assimilation of $[^{13}\text{N}]\text{N}_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. J Bacteriol 134: 125 – 130.
- Meeks JC, Elhai J (2002): Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66: 94 – 121.
- Mehta N, Olson JW, Maier RJ (2003): Characterization of *Helicobacter pylori* nickel metabolism accessory proteins needed for maturation of both urease and hydrogenase. J Bacteriol 185: 726 – 734.
- Mitsui A, Suda S (1995): Alternative and cyclic appearance of H_2 and O_2 photoproduction activities under nongrowing conditions in an aerobic nitrogen fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. Curr Microbiol 30: 1 – 6.

- Montet Y, Amara P, Volbeda A, Vernede X, Hatchikian EC, Field MJ, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1997): Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol* 7: 523 – 626.
- Montoya JP, Holl CM, Zehr JP, Hansen A, Villareal TA et al (2004): High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* 430: 1027 – 1031.
- Moran MA, Miller WL (2007): Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Nat Rev Microbiol* 5: 792 – 800.
- Morita RY (2000): Is H₂ the universal energy source for long-term survival? *Microb Ecol* 38: 307 – 320.
- Mullineaux CW, Mariscal V, Nenninger A, Khanum H, Herrero A, Flores E, Adams DG (2008): Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *EMBO J* 9: 1299 – 1308.
- Novelli PC, Lang PM, Masarie KA, Hurst DF, Myers R, Elkins JW (1999): Molecular hydrogen in the troposphere: global distribution and budget. *J Geophys Res* 104: 30427-30444.
- Oliveira P, Lindblad P (2005): LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* 251: 59 – 66.
- Orme-Johnson WH (1992): Nitrogenase structure: where to now. *Science* 257: 1639 – 1640
- Ortegacalvo JJ, Stal LJ (1991): Diazotrophic growth of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* sp PCC 6909 in continuous culture. *J Gen Microbiol* 137: 1789 – 1797.
- Paschos A, Glass RS, Böck A (2001): Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett* 488: 9 – 12.

- Pedros-Alio C (2006): Marine microbial diversity: can it be determined? Trends Microbiol 14: 257 – 263.
- Peters JW (1999): Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. Curr Opin Struct Biol 9: 670-676.
- Peters JW, Lanzilotta WN, Lemon BJ, Seefeldt LC (1998): X-ray Crystal Structure of the Fe-Only Hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom Resolution. Science 282: 1853 – 1858.
- Pilet E, Nicolet Y, Mathevon C, Douki T, Fontecilla-Camps JC, Fontecave M (2009): The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly. FEBS Lett 583: 506 – 511.
- Ploug H, Kuhl M, Buchholz-Cleven B, Jorgensen BB (1997): Anoxic aggregates - an ephemeral phenomenon in the pelagic environment? Aquatic Micro Ecol 13: 285 – 294.
- Poretsky RS, Hewson I, Sun S, Allen AE, Zehr JP, Moran MA (2009): Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. Environ Microbiol 11: 1358 – 1375.
- Posewitz, MC, King PW, Smolinski SL, Zhang L, Seibert M, Ghirardi ML (2004): Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. J Biol Chem 279: 25711 – 25720.
- Price H, Jaegle L, Rice A, Quay P, Novelli PC (2007): Global budget of molecular hydrogen and its deuterium content: Constraints from ground station, cruise, and aircraft observations. J Geophys Res Atmospheres 112: D22108.
- Punshon S, Moore RM (2008): Photochemical production of molecular hydrogen in lake water and coastal seawater. Mar Chem 108: 215-220.
- Punshon S, Moore RM, Xie H (2007): Net loss rates and distribution of molecular hydrogen (H₂) in mid-latitude coastal waters. Mar Chem 105: 129-139.

Redwood MD, Mikheenko IP, Sargent F, Macaskie LE (2008): Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production. FEMS Microbiol Lett 278: 48 – 55.

Rees DC, Akif Tezcan F, Haynes CA, Walton MY, Andrade S, Einsle O, Howard JB (2005): Structural basis of biological nitrogen fixation. Philos Trans A Math Phys Eng Sci 363: 971 – 984.

Reissmann S, Hochleitner E, Wang H, Paschos A, Lottspeich F, Glass RS, Böck A (2003): Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. Science 299: 1067 – 1070.

Rhan T, Eiler JM, Boering KA, Wennberg PO, McCarthy MC (2003): Extreme deuterium enrichment in the stratospheric hydrogen and the global atmospheric budget of H₂. Nature 424: 918-921.

Rippka R, Herdmann M (1992): Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria. Catalog and Taxonomic Handbook: Catalog of Strains, Institut Pasteur, Paris.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdmann M, Stanier RY (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Microbiol 111: 1 – 61.

Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S (2007): The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. PLoS Biol 5: e77 doi:101371/journalpbio0050077.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487 – 491.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350 – 1354.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463 – 5467.

Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks BC, Palmer T (1998): Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. EMBO J 17: 3640 – 3650.

Sawers RG (2005): Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. Biochem Soc Trans 33: 42 – 46.

Schmidt U, Conrad R (1993): Hydrogen, carbon monoxide, and methane dynamics in Lake Constance. Limnol Oceanogr 38: 1214-1226.

Schmitz O, Boison G, Hilscher R, Hundeshagen B, Zimmer W, Lottspeich F, Bothe H (1995): Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. Eur J Biochem 233: 266 – 276.

Schmitz O, Boison G, Salzmann H, Bothe H, Schütz K, Wang SH, Happe T (2002): HoxE: A subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. Biochim Biophys Acta 1554: 66 – 74.

Schmitz O, Bothe H (1996): The diaphorase subunit HoxU of the bidirectional hydrogenase as electron transferring protein in cyanobacterial respiration? Naturwissenschaften 83: 525 – 527.

Schopf JW (2000): The fossil record: tracing roots of the cyanobacterial lineage. In Whitton, BA and Potts M, (ed), The ecology of cyanobacteria, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 13 – 35.

Schütz H, Conrad R, Goodwin S, Seiler W (1988): Emission of hydrogen from deep and shallow freshwater environments. Biogeochem 5: 295-311.

Scranton MI, Jones MM, Herr FL (1982): Distribution and variability of dissolved hydrogen in the Mediterranean Sea. *J Mar Res* 40: 873-891.

Scranton MI, Novelli PC, Michaels A, Horrigan SG, Carpenter EJ (1987): Hydrogen production and nitrogen fixation by *Oscillatoria thiebautii* during in situ incubations. *Limnol Oceanogr* 32: 998 – 1006.

Serebriakova LT, Zorin NA, Lindblad P (1994): Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Arch Microbiol* 161: 140 – 144.

Sorokin YI (2002): *The Black Sea: Ecology and Oceanography*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

Stewart WN (1983): *Paleobotany and the evolution of plants*. Cambridge University Press, Cambridge.

Tamagnini P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt F, Wünschiers R, Lindblad P (2002): Hydrogenase and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microbiology and Molecularbiology Reviews* 66: 1 – 20.

Tamagnini P, Leitao E, Oliveira P, Ferreira D, Pinto F, Harris DJ, Heidorn TT, Lindblad P (2008): Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbial Rev* 31: 692 – 720.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673 – 4680.

Troshina O, Serebryakova L, Shermetieva M, Lindblad P (2002): Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *Int J Hydr Energ* 27: 1283 – 1289.

Van der Linden E, Burgdorf T, Bernhard M, Bleijlevens B, Friedrich B, Albracht SP (2004): The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active

site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J Biol Inorg Chem* 5: 616 - 626.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO (2004): Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66 – 74

Vignais PM, Billoud B (2007): Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chem Rev* 107: 4206 – 4272.

Vignais PM, Billoud B, Meyer J (2001): Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* 25: 455 – 501.

Vignais PM, Colbeau A (2004): Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol* 6: 159 – 188.

Vignais PM, Elsen S, Colbeau A (2005): Transcriptional regulation of the uptake [NiFe]hydrogenase genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans* 33: 28 – 32.

Vignais PM, Willison JC, Colbeau A (2004): In *Respiration in Archaea and Bacteria, Vol 2: Diversity of Prokaryotic Respiratory Systems*, Zannoni, D, Ed, Springer: Dordrecht, The Netherlands, 233 – 260.

Vincent KA, Cracknell JA, Clark JR, Ludwig M, Lenz O (2006): electricity from low-level H₂ in still air – an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase. *Chem Comm* 5033 – 5035.

Volbeda A, Charon MH, Piras C, Hatchikian EC, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1995): Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*. 373: 580 – 587.

Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Frey M (1996): Novel metal sites in protein structures. *Curr Opin Struct Biol* 6: 804 – 812.

Wang R, Healey FP, Myers J (1971): Amperometric Measurement of Hydrogen Evolution in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 48: 108 – 110.

Wang RT (1980): Amperometric hydrogen electrode. *Meth Enzymol* 69: 409 – 413.

Weiner JH, Bilous PT, Shaw GM, Lubitz SP, Frost L, Thomas GH, Cole JA, Turner RJ (1998): A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* 93: 93 – 101.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998): Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6578 – 6583.

Whitton BA (1989): Genus I *Calothrix*. Stanley, Bryant, Pfennig and Holt (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st Ed Vol 3 The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1791 – 1793.

Wolk CP, Ernst A, Elhai J (1994): Heterocyst Metabolism and Development. In DA Bryant (ed), *The molecular biology of cyanobacteria* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 769 – 823.

Wolk CP, Vonshak A, Kehoe P, Elhai J (1984): Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5: 1561 - 1565.

Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, Hooper LV, Gordon JI (2003): A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science*. 5615: 2074 - 2076

Xu W, Tang H, Wang Y, Chitnis PR (2001): Proteins of the cyanobacterial photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1507: 32 – 40.

- Ying L, Huang X, Huang B, Xie J, Zhao J, Zhao XS (2002): Fluorescence Emission and Absorption Spectra of Single *Anabaena* sp. Strain PCC7120 Cells. *Photochem Photobiol.* 3: 310-313.
- Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ (2007): The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Expanding the universe of protein families. *PLoS Biol* 5: e16 doi:101371/journalpbio0050016.
- Yutin N, Suzuki MT, Teeling H, Weber M, Venter JC, Rusch DB, Beja O (2007): Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific oceans using the global ocean sampling expedition metagenomes. *Environ Microbiol* 9: 1464 – 1475.
- Zehr JP, Bench SR, Carter BJ, Hewson I, Niazi F, Shi T, Tripp HJ, Affourtit JP (2008): Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science* 322: 1110 – 1112.
- Zehr JP, Waterbury JB, Turner PJ, Montoya JP, Omoregie E (2001): Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* 412: 635 – 638.
- Zhang CC, Laurent S, Sakr S, Peng L, Bédou S (2006): Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol Microbiol* 59: 367 – 375.
- Zhao Y, Bian S-M, Zhou H-N, Huang J-F (2006): Diversity of nitrogenase systems in diazotrophs. *J Int Plant Biol* 48: 745 – 755.
- Zirngibl C, Hedderich R, Thauer RK (1990): N₅,N₁₀-Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity. *FEBS Lett* 261: 112 – 116.
- Zmasek CM, Eddy SR (2001): ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 383 – 384.

Anhang

Der Anhang dieser Arbeit befindet sich auf der beiliegenden CD-ROM. Auf der CD sind die Sequenzen aus den DNA-Isolierungen der Umweltproben der einzelnen Standorte als auch die Ergebnisse der Blast-Analysen hinterlegt. Weiterhin befinden sich dort die elektronischen Versionen der verschiedenen Stammbaumanalysen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit, ausgenommen sei hier nur die fachliche Beratung durch meine akademische Betreuer, nach Inhalt und Form meine Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch teilweise im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Weiterhin erkläre ich, dass von mir noch keine früheren Promotionsversuche unternommen wurden.

Teile dieser Arbeit sind in folgender Veröffentlichung enthalten:

Martin Barz, Christian Beimgraben, Torsten Staller, Frauke Germer, Friederike Opitz, Claudia Marquardt, Christoph Schwarz, Klaus Vanselow, Ruth Schmitz, Julie LaRoche, Rüdiger Schulz, Jens Appel (2009): Distribution analysis of hydrogenases in surface waters of marine and freshwater environments. PLOSone submitted.

Martin Barz, Christian Beimgraben, Torsten Staller, Frauke Germer, Friederike Opitz, Claudia Marquardt, Christoph Schwarz, Klaus Vanselow, Ruth Schmitz, Julie LaRoche, Rüdiger Schulz, Jens Appel (2009): Distribution analysis of hydrogenases in surface waters of marine and freshwater environments. 13TH International Symposium On Phototrophic Prokaryotes, Montreal, August 9 - 14

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Kiel, den

(Martin Barz)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Rüdiger Schulz für die Vergabe des Themas der Dissertation, sowie die fachliche Betreuung und die Finanzierung der Arbeit ganz herzlich bedanken. Ohne ihn wäre die Teilnahme an Konferenzen wie in Breckenridge wohl kaum möglich gewesen. Zudem haben die Arbeitsgruppenausflüge, die er mit uns allen unternommen hat, stets zur guten Atmosphäre in der Gruppe beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Jens Appel bedanken, der sich immer die Zeit nahm, den Stand der Arbeiten zu diskutieren und stets Ratschläge zu erteilen wusste. Außerdem lässt sich vortrefflich mit ihm in den Rockies wandern.

Natürlich möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe für das gute Betriebsklima bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt hier Björn Forberich, der mir immer Obdach bot, wenn es abends mal wieder spät wurde.

Den Mitgliedern des Innovationsfondprojekts Schleswig-Holstein: Jens, Christian, Friederike und Claudia danke ich besonders für die verschiedenen Proben und Daten.

Jim Golden (A&M University, Texas, USA) bin ich zu Dank für das Überlassen des Vektors pAM1956 und der *Nostoc* AMC 414-Mutante verpflichtet

Meiner Frau Beatriz möchte ich für ihre Geduld und das Verständnis danken. Beides musste sie gerade in der letzten Zeit, da die Fertigstellung dieser Arbeit nahte, vermehrt aufbringen. Meiner Tochter Lorena danke ich dafür, dass sie mich ab und zu mal ausschlafen ließ.

Auch gilt mein Dank meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht und mich Zeit meines Lebens uneingeschränkt unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Geburtsdatum: 24.03.1979
Geburtsort: Bremerhaven
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Bildungsweg

- 03/2005 – 11/2009 Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Fach Zellbiologie
- Thema der Promotion: “ Molekulare Untersuchung zur marinen und limnischen Verbreitung und zur biotechnologischen Anwendung von Hydrogenasen“
- 10/1999 – 02/2005 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Biochemie, Zoologie
 - Thema der Diplomarbeit: “Präparation von Heterocysten und Charakterisierung von Promotoren im Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120“
 - Abschluss zum Diplom-Biologen
- 08/1995 – 06/1998 Schulzentrum Geschwister-Scholl Bremerhaven
- Hauptfächer: Biologie, Geschichte
 - Abschluss: Allgemeine Hochschulreife