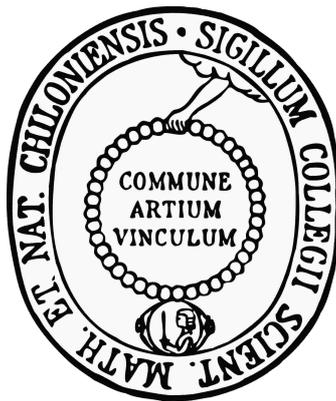


**Überexpression, Isolierung und Charakterisierung der
bidirektionalen [NiFe] Hydrogenase des
Cyanobakteriums
Synechocystis sp. PCC 6803**



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

**vorgelegt von
Frauke Germer**

Mai 2010

Referent: Prof. Dr. Rüdiger Schulz
Korreferent: Prof. Dr. Axel Scheidig
Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2010
Zum Druck genehmigt: 23.06.2010

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Summary	2
3 Einleitung	3
3.1 Wasserstoff als Energieträger.....	3
3.2 Cyanobakterien.....	4
3.3 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	4
3.4 Hydrogenasen.....	5
3.5 Cyanobakterielle [NiFe] Hydrogenasen.....	7
3.6 [NiFe] Hydrogenase von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	9
3.7 Struktureller Aufbau der Standard [NiFe] Hydrogenasen.....	12
3.8 Assemblierung der [NiFe] Hydrogenasen.....	15
3.9 Redoxzustände der Standard [NiFe] Hydrogenasen.....	16
3.10 Mechanismen der O ₂ -Toleranz von [NiFe] Hydrogenasen.....	18
3.11 Fragestellung.....	20
4 Material und Methoden	21
4.1 Chemikalien, Puffer und Nährmedien.....	21
4.2 Mikrobiologische und physiologische Methoden.....	22
4.2.1 Zellanzucht.....	22
4.2.2 Reinheitskontrolle, Bestimmung der optischen Dichte.....	22
4.2.3 Chlorophyllbestimmung.....	22
4.2.4 Stammhaltung.....	23
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	23
4.3.1 Plasmide und Stämme.....	23
4.3.2 Isolierung genomischer DNA.....	24
4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
4.3.4 Agarosegelelektrophorese.....	27
4.3.5 Geextraktion.....	28
4.3.6 Enzymatische DNA-Modifikationen.....	28
4.3.7 Ligation.....	29
4.3.8 Plasmidpräparation.....	29
4.3.9 Herstellung kompetenter Zellen.....	29
4.3.10 Transformation.....	30
4.3.11 Überexpression in <i>E. coli</i>	31
4.3.12 Sequenzierung.....	31
4.4 Biochemische Methoden.....	32
4.4.1 Zellaufbruch.....	32
4.4.2 Isolierung von Thylakoid- und Plasmamembran.....	33
4.4.3 Isolierung der Hydrogenase.....	33
4.4.4 Aktivitätsmessungen.....	34
4.4.5 Quantitative Proteinbestimmungen.....	35
4.4.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	36
4.4.7 Western Blot-Analysen.....	37
4.4.8 Proteinfärbungen mit Coomassie und Silbernitrat.....	37
4.4.9 Isoelektrische Fokussierung.....	38
4.4.10 N-terminale Sequenzierung nach Edman.....	38
4.4.11 Massenspektrometrie.....	38

4.5	Spektroskopische Methoden	39
4.5.1	UV/VIS-Spektroskopie	40
4.5.2	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie.....	40
4.5.3	Elektronen Spin Resonanz-Spektroskopie	42
4.6	Protein-Film-Elektrochemie.....	44
4.7	Kristallisierung	45
5	Ergebnisse	47
5.1	Überexpression der [NiFe] Hydrogenase.....	47
5.1.1	Überexpression des <i>hox</i> -Operons und Fusion des Strep-tag (II).....	47
5.1.2	Einfluss der [Ni]- und [Fe]-Konzentration auf die Hydrogenaseaktivität.....	51
5.1.3	Überexpression des <i>hyp</i> -Operons.....	52
5.1.4	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i>	54
5.2	Isolierung der [NiFe] Hydrogenase.....	56
5.2.1	Affinitätschromatographie: Ausbeute und Reinheit.....	56
5.2.2	Edman-Sequenzierung: Stöchiometrie der Untereinheiten	57
5.2.3	Stabilität des Hydrogenase-Komplexes: Einfluss der Pufferbedingungen	59
5.2.4	Gelfiltration	62
5.2.5	Anionen-Austausch-Chromatographie.....	65
5.3	Zelluläre Position der [NiFe] Hydrogenase	66
5.4	Kristallisierung	70
5.5	Spektroskopische Charakterisierung	72
5.5.1	UV/VIS-Spektroskopie: [FeS] Cluster.....	73
5.5.2	ESR-Spektroskopie: Oxidierter Zustand.....	74
5.5.3	ESR-Spektroskopie: Reduzierter Zustand.....	76
5.5.4	FT-IR-Spektroskopie: Ligandierung des aktiven Zentrums.....	80
5.5.5	FT-IR-Spektroskopie: Redoxzustände	80
5.6	Bestimmung des isoelektrischen Punkts	83
5.7	Charakterisierung mittels Protein-Film-Elektrochemie	85
5.7.1	Bildung des Protein-Films.....	85
5.7.2	Rotation der Elektrode - Auswirkung auf die Aktivität	87
5.7.3	pH-Abhängigkeit.....	89
5.7.4	Vergleich H ₂ -Oxidation/H ⁺ -Reduktion	92
6	Diskussion	94
6.1	Überexpression.....	94
6.2	Stabilität und Zusammensetzung des nativen Enzyms	95
6.3	Zelluläre Lokalisierung und potenzielle physiologische Funktion	98
6.4	Physiologische Direktionalität der [NiFe] Hydrogenase	100
6.5	[FeS] Cluster und FMN.....	102
6.6	Ligandierung des aktiven Zentrums.....	105
6.7	Redoxzustände	106
6.8	Sauerstoffempfindlichkeit	112
7	Ausblick	117
8	Literatur	119

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-Triphosphat
BisTris	Bis(2-Hydroxyethyl) Amino-tris(hydroxymethyl)Methan
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum Albumin)
CCS	Carbon Dioxide Capture and Storage (CO ₂ -Abscheidung und -Speicherung)
CE	Cytosolischer Extrakt
CHES	2-(Cyclohexylamino)-Ethansulfonsäure
CN ⁻ -Ligand	Cyanid-Ligand
CO-Ligand	Carbonyl-Ligand
Cys	Cystein
Cyt b ₆ /f	Cytochrom b ₆ /f Komplex
Cyt c Ox.	Cytochrom c Oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
et al.	et alii (und andere)
F ₄₂₀	N-(N-{O-[5(8-Hydroxy-2,4-dioxo-2,3,4,10-tetrahydropyrimido[4,5-b]chinolin-10-yl)-5-deoxy-L-ribityl-1-phospho]}-(S)-lactyl}-γ-L-glutamyl)-L-glutamat
Fd	Ferredoxin
FMN	Flavinmononukleotid
FNR	Ferredoxin NADP Reduktase
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot
GM	Gesamtmembran
H ₄ MP	Tetrahydromethanopterin
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
Hox	Hydrogen oxidation (H ₂ -Oxidation)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
Hup	Hydrogen uptake (H ₂ -Aufnahme)
Hyp	Hydrogenase pleiotropic
ICP-MS	Induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Zwischenstaatlicher Ausschuss für Klimaänderungen)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
K _p _i	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
LB	Luria Bertani
LC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat) (reduzierte Form)
NDH-1	NADPH-Dehydrogenase (Komplex I)
NDH-2	Typ II NADH-Dehydrogenase
NPT	Neomycin Phosphotransferase
Nuo	NADH-Ubichinon Oxidoreduktase

Abkürzungsverzeichnis

OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Plastocyanin
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGE-Elektrode	pyrolytic graphite edge electrode (Pyrolytische Graphit Kanten-Elektrode)
PM	Plasmamembran
PS I, II	Photosystem I, II
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Qox	Chinol Oxidase
RE	Referenz-Elektrode
RNA	Ribonukleinsäuren
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SHE	Standard-H ₂ -Elektrode
sp.	single species (Art)
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
TAPS	3-N-Tris(Hydroxymethyl)-Methylamino-Propansulfonsäure
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris(hydroxymethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
TM	Thylakoidmembran
Tm	Temperature of melting (Schmelztemperatur)
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat
Units	katalytische Einheit von Enzymen
V _E	elution volume (Elutionsvolumen)
V _o	void volume (Ausschlussvolumen der Säule)
V _t	total volume (totales Säulenvolumen)
WT	Wildtyp
x g	relative Erdbeschleunigung

1 Zusammenfassung

Die bidirektionale [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde mittels Affinitätschromatographie zu einer hohen Reinheit isoliert. Zu diesem Zweck diente ein an den C-Terminus der großen Diaphorase-Untereinheit (HoxF) fusionierter Strep-tag (II). Durch Insertion des *psbAII*-Promotors stromaufwärts der strukturellen Diaphorase-Hydrogenase-Gene (*hoxEFUYH*) und zusätzliche Expression der akzessorischen Gene (*hypFCDEAB*) von *Nostoc* sp. PCC 7120 unter der Kontrolle des *psbAII*-Promotors wurde die Synthese des Enzyms um ca. den Faktor 3 gesteigert und die Ausbeute der Isolierung erhöht. Damit ist das Vermögen der Überexpression des Enzyms in *Synechocystis* belegt. Im Isolat wurde eine unerwartete Stöchiometrie von HoxEFUYH im Verhältnis 0,2:2:2:1:1 detektiert. Zwei Formen des Enzym-Komplexes sind im nativen Gel sichtbar. Möglicherweise spiegelt dies den physiologischen Zustand wider oder die Isolierung führt zur Dissoziation des Komplexes. Die kleine und große Untereinheit der Hydrogenase (HoxYH) liegen in äquimolaren Mengen vor. Zum ersten Mal wurden Infrarot-spektroskopische Analysen einer [NiFe] Hydrogenase eines oxygenen phototrophen Bakteriums durchgeführt. Sie verdeutlichen, dass zwei CN⁻- und ein CO-Ligand am Eisen des aktiven Zentrums gebunden sind. Vier verschiedene Redoxzustände des aktiven Zentrums wurden während der reversiblen Aktivierung und Inaktivierung identifiziert. Obwohl die detektierten Zustände denen der Standard [NiFe] Hydrogenasen ähnlich sind, konnte ein paramagnetisches Nickel weder im vollständig oxidierten noch im Ni_a-C Zustand der Katalyse mittels ESR-Spektroskopie detektiert werden. Ein weiterer Unterschied zu den Standard Hydrogenasen ist, dass das Enzym unter oxidischen Bedingungen nur einen inaktiven Zustand aufweist. Die stark oxidierte Vorstufe, namentlich Ni_u-A, kommt in der Hydrogenase von *Synechocystis* nicht vor. Dies ist ein erster Hinweis auf die Hintergründe des schnellen Reaktivierungsvermögens der Hydrogenase von *Synechocystis*. ESR- und UV/VIS-Spektroskopie bestätigten die auf Sequenzebene vorhergesagte Präsenz von [4Fe4S], [2Fe2S], 2[4Fe4S] Clustern sowie FMN. Dagegen konnte kein [3Fe4S] Cluster, wie in Standard Hydrogenase üblich, identifiziert werden. Dies scheint, genauso wie die Abwesenheit von paramagnetischem Nickel in der ESR-Spektroskopie ein generelles Phänomen der bidirektionalen [NiFe] Hydrogenasen, die mit einer Diaphorase assoziiert sind, zu sein. Kristallisierungsversuche des Enzyms führten zu ersten interessanten Konditionen und zur Optimierung der Isolierungsstrategie. Beides bildet die Grundlage für weitere Versuche zur Gewinnung von großen Einkristallen. Bedingungen zur Bildung eines aktiven Hydrogenase-films auf einer Pyrolytischen Graphit Kanten (PGE)-Elektrode wurden etabliert, die viele Untersuchungen zur katalytischen Umsetzung des Enzyms ermöglichen. Erste elektrochemische Analysen zeigen das pH-Optimum der Katalyse und dass das Enzym von *Synechocystis* eine für die Klasse der [NiFe] Hydrogenasen außergewöhnliche Direktionalität hin zur H₂-Produktion aufweist. Diese Tatsache verdeutlicht, genauso wie die geringe O₂-Empfindlichkeit, das biotechnologische Potenzial des Enzyms.

2 Summary

The bidirectional [NiFe] hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 was isolated to high purity by a single affinity chromatography step using a *Synechocystis* mutant with a Strep-tag II fused to the C-terminus of HoxF. To increase the yield of purified enzyme the *psbAII*-promoter was inserted upstream of the structural diaphorase-hydrogenase genes (*hoxEFUYH*). In addition, the accessory genes (*hypFCDEAB*) from *Nostoc* sp. PCC 7120 were expressed under the control of the *psbAII*-promoter. In the respective strain the synthesis of active hydrogenase was about 3 fold higher compared to the wild type, proving the overexpression capacity of the hydrogenase in *Synechocystis*. The detected subunit stoichiometry of the isolated enzyme was 0,2:2:2:1:1 for HoxEFUYH. Two hydrogenase complexes occur in a native gel. Taken together, these are surprising findings that, either represent the physiological state or arise due to dissociation during the purification procedure. The small and large subunits of the hydrogenase (HoxY and HoxH) occur in equimolar amounts.

For the first time a Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic characterization of a [NiFe] hydrogenase from an oxygenic phototroph is presented, revealing that two cyanides and one carbon monoxide coordinate the iron of the active site. Four different redox states of the active site were detected during the reversible activation/inactivation. Although these states appear similar to those observed in standard [NiFe] hydrogenases, no paramagnetic nickel state could be detected in the fully oxidized form and the Ni_a-C form by means of EPR-spectroscopy. Another difference to standard hydrogenases is the fact that the enzyme from *Synechocystis* only exhibits one inactive state under oxic conditions. The most oxidized state, namely Ni_a-U, is absent, causally determining its fast reactivation capacity. Catalytic amounts of NAD(P)H are sufficient to activate the reaction of this enzyme with hydrogen. UV/VIS- and EPR-spectroscopy confirm the presence of a [4Fe4S], [2Fe2S] and 2[4Fe4S] cluster as well as a FMN. On the contrary no [3Fe4S] Cluster, as observed in standard hydrogenases, could be identified. This characteristic and the absence of any paramagnetic nickel signal in EPR-spectroscopy seem to be common features in bidirectional [NiFe] hydrogenases associated with a diaphorase.

Attempts to crystallize the enzyme have led to interesting initial conditions and to the optimization of the purification process. Both of these advances provide a basis for further assays to obtain large mono-crystals. Conditions to form an active film of hydrogenase on a pyrolytic graphite edge (PGE) electrode surface were established. This will permit investigation of the catalytic turnover of the enzyme. First electrochemical experiments determine the pH-optimum for the catalysis and show an outstanding bias towards hydrogen production for the hydrogenase from *Synechocystis* in contrast to other [NiFe] hydrogenases which prefer hydrogen consumption. This and the less oxygen sensitive character of the enzyme demonstrate its biotechnological potential.

3 Einleitung

3.1 Wasserstoff als Energieträger

In einer globalisierten Welt mit konstant steigendem Energieverbrauch sind die Probleme und Herausforderungen der langfristigen Energieversorgung ein drängendes Thema. Die Begrenztheit von fossilen Energieressourcen, die Sicherung der globalen Energieversorgung, die unstete Preisentwicklung auf den Energiemärkten mit all ihren Folgen für Wirtschaft und Verbraucher und nicht zuletzt die immer größer werdenden Befürchtungen hinsichtlich der Klimaveränderung werden diskutiert und erfordern Lösungen. Der durch Menschen verursachte Anstieg der Treibhausgas-Konzentrationen, besonders des Kohlendioxids (CO₂), in der Atmosphäre gilt als hauptverantwortlich für eine globale Erwärmung (IPCC-Klimabericht, 2007). Im Jahr 2008 betrug der Anteil an fossilen Energieträgern in Deutschland 81 % am gesamten Energieverbrauch (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, 2009). Vorgaben zur Senkung der CO₂-Emissionen müssen durch entsprechende Maßnahmen umgesetzt werden. Dazu gehört die Strategie, CO₂ abzutrennen und z. B. in geologischen Formationen zu speichern (CCS, Carbon Capture and Storage). Dies kann zwar für die Minderung der Treibhausgasemissionen sorgen, lässt allerdings die Endlichkeit der fossilen Energieträger außer Acht. Neue regenerative Energiequellen müssen erschlossen werden.

Die Sonnenenergie stellt mit einer jährlich auf die Erdoberfläche eintreffenden Energiemenge von ca. $1,1 \times 10^{18}$ kWh die größte natürliche Ressource dar. Dies entspricht etwa dem 10000-fachen des gesamten Energieverbrauchs der Menschheit. Organismen mit oxygener Photosynthese sind in der Lage, Lichtenergie in chemische Energie zu konvertieren, dabei nutzen sie Wasser und CO₂. Das organische Material, das aus der Photosynthese resultiert, wird bereits in Technologien zur Produktion von Biokraftstoffen verwendet. Einige Cyanobakterien und Grünalgen können darüber hinaus die photosynthetische Energie direkt zur Bildung von Wasserstoff (H₂) nutzen. Die Vorteile eines solchen Systems liegen auf der Hand. Wasserstoff ist ein exzellenter Energiespeicher (33,3 kWh/kg) und umweltfreundlicher Energieträger, da bei seiner Verbrennung nur Wasser entsteht. Außerdem bietet er eine breite Palette an Anwendungen, da seine Energie entweder direkt in Strom (Brennstoffzellen) oder mechanische Energie und Wärme (Verbrennungsmotoren) umgewandelt werden kann. Viele Cyanobakterien benötigen zur H₂-Produktion neben Sonnenlicht, H₂O und CO₂ nur eine geringe Menge an Nährstoffen. Sie sind einfach zu kultivieren. Das Enzym, das in Cyanobakterien die H₂-Bildung unter direkter Verwendung von Elektronen aus der Photosynthese katalysiert, ist die NAD(P) gekoppelte bidirektionale [NiFe] Hydrogenase. Informationen über das aktive Zentrum, die Sauerstoffsensitivität und die katalytische Umsetzung der Hydrogenase sind essenziell für eine spätere biotechnologische Nutzung. Es besteht daher ein großes Interesse an der genauen Charakterisierung dieses cyanobakteriellen Enzyms.

3.2 Cyanobakterien

Cyanobakterien bilden eine der größten Bakterienklassen der Erde und sind als einzige Bakterien in der Lage, oxygene Photosynthese zu betreiben. Sie kommen in fast allen ökologischen Nischen vor, vom Süßwasser über Salzwasser, in terrestrischen und in extremen Lebensräumen wie Eisseen der Antarktis oder heißen Quellen (Whitton und Potts, 2000). Fossile Spuren von Cyanobakterien in Stromatolithen reichen bis ca. 3,5 Milliarden Jahre zurück (Schopf, 1993). Diese Vorfahren der heutigen Cyanobakterien spielten eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der oxygenen Atmosphäre. Außerdem sind sie nach der Endosymbiontentheorie die Vorläufer der Chloroplasten in Algen und grünen Pflanzen (Sagan, 1967). Die Gruppe der Cyanobakterien zeigt eine große morphologische Vielfalt auf, die einzellige, filamentöse und koloniebildende Formen beinhaltet. Zahlreiche Stämme bilden differenzierte Zellen aus, z. B. auf Stickstofffixierung spezialisierte Zellen (Heterocysten) oder Dauerstadien (Akineten). Verschiedene Cyanobakterien sind auch ohne Heterocysten in der Lage, Stickstoff (N_2) zu fixieren. Die zeitliche Trennung zwischen dem sauerstoffsensitiven Prozess der N_2 -Fixierung und der oxygenen Photosynthese ist dabei eine weit verbreitete Strategie (Misra und Tuli, 2000; Berman-Frank et al., 2003). Die Tatsache, dass Cyanobakterien mit H_2O als unerschöpflichem Elektronendonator, N_2 und CO_2 unter aeroben Bedingungen reduzieren können, ist verantwortlich für den evolutionären und ökologischen Erfolg der Bakterien.

Cyanobakterien besitzen zwei Enzymarten, die direkt in den H_2 -Metabolismus involviert sind. Zum einen produzieren Nitrogenasen H_2 als Begleiterscheinung neben der Reduktion von N_2 zu NH_4^+ . Für diese Reaktion werden nicht nur Elektronen aus der Photosynthese benötigt, sondern außerdem 16 ATP. Der zusätzliche Energieverbrauch verringert den Wirkungsgrad des Prozesses stark. Demgegenüber nutzen cyanobakterielle Hydrogenasen das Potenzial der Elektronen direkt zur Bildung von H_2 , weshalb deren technologische Nutzung als energetisch effizienter eingeschätzt wird (Tamagnini et al., 2002).

3.3 *Synechocystis* sp. PCC 6803

In dieser Arbeit wurde die NAD(P) gekoppelte bidirektionale [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (im Folgenden als *Synechocystis* bezeichnet) untersucht. *Synechocystis* ist ein einzelliges nicht stickstofffixierendes Cyanobakterium der Ordnung Chroococcales (Abb. 3.1). Ursprünglich wurde der Organismus aus einem Süßwassersee in Oakland, Kalifornien isoliert und 1968 in die Pasteur Culture Collection (PCC) aufgenommen. Die Bakterien gehören zu der Gruppe der moderat halotoleranten Cyanobakterien und können sich neben Süßwasser an deutlich höhere Salzkonzentrationen mit bis zu 1,2 M NaCl adaptieren (Reed und Stewart, 1985). *Synechocystis* ist das erste Cyanobakterium, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Kaneko et al., 1996). Die Größe des zirkulären

Chromosoms beträgt 3573471 bp und es hat einen GC-Gehalt von 47,7 % (Kaneko et al., 1996). Die DNA liegt in 6 - 8 chromosomalen Kopien in der Zelle vor (Williams, 1988).

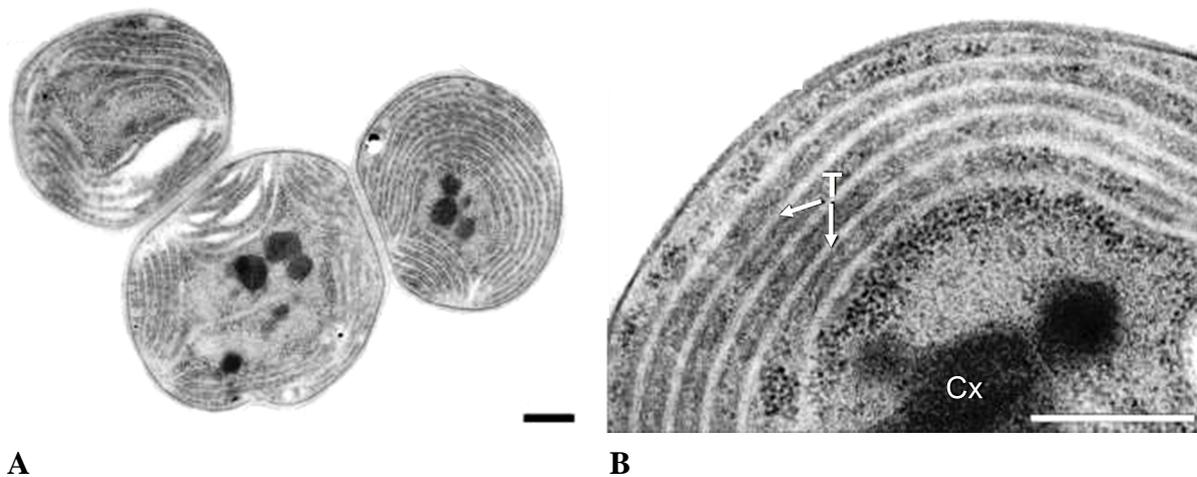
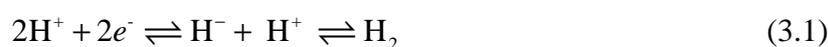


Abb. 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Synechocystis* sp. PCC 6803. (A) ganze Zellen, (B) Detailansicht eines Zellausschnitts. Cx: Carboxysomen; T: Thylakoidmembran. Maßstab = 400 nm (nach Agarwal et al., 2009)

Als Cyanobakterium betreibt *Synechocystis* oxygene Photosynthese mittels der Photosysteme I und II (PS I und PS II). Es fixiert CO₂ über den Calvin-Zyklus, ist also photoautotroph (Bryant, 1994). Der Organismus kann ebenfalls photoheterotroph wachsen, ohne ein funktionales PS II, wenn eine geeignete reduzierte Kohlenstoffquelle wie z. B. Glucose vorhanden ist (Rippka et al., 1979; Williams, 1988). Chemoheterotrophie wurde bei *Synechocystis* unter der Voraussetzung von kurzen Blaulichtimpulsen nachgewiesen (Anderson und McIntosh, 1991). Als Labororganismus eignet sich das Cyanobakterium in besonderem Maße, da es eine natürliche Kompetenz besitzt, fremde DNA in die Zelle aufzunehmen (Grigorieva und Shestakov, 1982).

3.4 Hydrogenasen

Hydrogenasen sind Metalloenzyme, die meist durch O₂ inhibiert werden. Sie katalysieren sowohl die heterolytische Spaltung von Wasserstoff als auch die Rückreaktion, also die Produktion von Wasserstoff, entsprechend der Gleichung (3.1). Die Richtung der Reaktion hängt vom Potenzial der Redoxpartner, vom pH-Wert, von der H₂-Konzentration und der Enzymstruktur ab. In Gegenwart eines Elektronendonors mit niedrigem Redoxpotenzial können Hydrogenasen H₂ produzieren.



Drei unterschiedliche Klassen von Hydrogenasen sind bekannt, zwei besitzen ein binukleares Metallzentrum ([FeFe] und [NiFe]), wohingegen die dritte Klasse ein mononukleares

[Fe] Zentrum aufweist und keine [FeS] Cluster gebunden hat (Volbeda et al., 1995; Nicolet et al., 1999; Shima et al., 2008). Obwohl die Hydrogenasen der drei Klassen sich evolutionär unabhängig voneinander entwickelt haben (Vignais et al., 2001; Vignais und Billoud, 2007), teilen sie die Gemeinsamkeit einer Fe(CO)(RS⁻)-Struktur im aktiven Zentrum (Armstrong und Fontecilla-Camps, 2008).

Hydrogenasen werden in allen drei Domänen des Lebens gefunden. Die meisten Organismen, die H₂ metabolisieren können, gehören jedoch zu den Bakterien und Archaea. [Fe] Hydrogenasen kommen nur in methanogenen Archaea, [FeFe] Hydrogenasen dagegen in Bakterien und einigen niederen Eukaryoten, wie z. B. Grünalgen vor (Vignais und Billoud, 2007). Bisher konnte keine [NiFe] Hydrogenase in Eukaryoten gefunden werden. Dagegen weisen Prokaryoten [NiFe] Hydrogenasen und [FeFe] Hydrogenasen auf.

Die [NiFe] Hydrogenasen der Bakterien sind die am häufigsten vertretenen und am besten untersuchten Hydrogenasen. Sie werden in vier Hauptgruppen mit einigen Untergruppen eingeteilt (Vignais et al., 2001; Vignais und Billoud, 2007), die in Tabelle 3.1 aufgeführt sind.

Tab. 3.1: Klassifizierung bisher bekannter [NiFe] Hydrogenasen (nach Vignais et al., 2001; Vignais und Billoud, 2007)

Gruppe	Funktion und Charakteristika	Vorkommen	Beispiel Organismus
1	Membran-assoziierte H ₂ -aufnehmende Hydrogenase	Bakterien/Archaea	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
2a	cyanobakterielle H ₂ -aufnehmende Hydrogenase	Cyanobakterien	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
2b	H ₂ -Sensor Hydrogenase	Bakterien	<i>Ralstonia eutropha</i> *
3a	F ₄₂₀ -reduzierende Hydrogenase	Archaea	<i>Methanocaldococcus jannschii</i>
3b	bifunktionale NAD(P) gekoppelte Hydrogenase	Bakterien/Archaea	<i>Chlorobium tepidum</i> TLS
3c	Methylviologen-reduzierende Hydrogenase	Archaea	<i>Methanococcus voltae</i>
3d	bidirektionale NAD(P) gekoppelte Hydrogenase	Bakterien	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
4a	Membran-assoziierte H ₂ -produzierende Hydrogenase	Bakterien/Archaea	<i>Escherichia coli</i>

*(ehemals *Alcaligenes eutrophus*, neuerdings *Cupriavidus necator*)

Die Gruppe 1 beinhaltet Membran-assoziierte, H₂-aufnehmende Hydrogenasen mit periplasmatischer Orientierung, die die H₂-Oxidation an die Elektronentransport-phosphorylierung koppeln. Diese Hydrogenasen gehören zu den sogenannten Standard Hydrogenasen. Zur Gruppe 2 gehören heterodimere Hydrogenasen, wie die cyanobakteriellen aufnehmenden Hydrogenasen und die regulatorischen H₂-Sensor Hydrogenasen, wogegen die Gruppe 3 aus multimeren Hydrogenasen besteht. Diese multimeren cytosolischen

Hydrogenasen interagieren mit verschiedenen löslichen Kofaktoren, nach denen die Untergruppierung (3a - d) erfolgt. Die Membran-assoziierten Hydrogenasen der Gruppe 4 reduzieren Protonen, um die ATP-Ausbeute der Fermentation zu steigern (Überblick der Gruppen: Schwartz und Friedrich, 2006).

Die Hydrogenasen der Grünalgen und Cyanobakterien gehören zu zwei verschiedenen Klassen. Interessanterweise besitzen die [FeFe] Hydrogenasen der Grünalgen eine deutlich höhere spezifische Aktivität (ca. 100-fach höher) als die cyanobakteriellen [NiFe] Hydrogenasen (Adams et al., 1989; Florin et al., 2001). Sie sind allerdings gleichzeitig wesentlich sauerstoffsensitiver als diese. Die H₂-Produktion findet daher nur unter strikt anaeroben Bedingungen statt. Es gibt zwei Wege der Photo-H₂-Produktion in Grünalgen (Gfeller und Gibbs, 1985; Happe und Kaminski, 2002; Mus et al., 2005; Chochois et al., 2009). Der erste Mechanismus benötigt die Aktivität der beiden Photosysteme (PS I und PS II). Die Hydrogenase übernimmt Elektronen vom reduzierten Ferredoxin. Diese H₂-Produktion ist nur andauernd, wenn die Algen unter Schwefelmangel wachsen. Die Zellen weisen dann eine geringe Photosyntheseleistung auf, die von der Atmungsrate übertroffen wird. Dadurch entsteht ein anaerobes Milieu, das eine Kontinuität der H₂-Produktion ermöglicht (Melis et al., 2000; Zhang et al., 2002; Hemschemeier, et al., 2008). Beim zweiten Mechanismus werden die aus der Oxidation von organischen Substanzen stammenden Elektronen über eine NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreduktase auf den Plastochinon-Pool übertragen. Während das PS I für die Reduktion von Ferredoxin benötigt wird, ist das PS II bei diesem Prozess der H₂-Produktion nicht beteiligt (Chochois et al., 2009; Ghirardi et al., 2009).

3.5 Cyanobakterielle [NiFe] Hydrogenasen

[NiFe] Hydrogenasen sind wesentlich toleranter gegenüber O₂ als die [FeFe] Hydrogenasen der Grünalgen. Die Enzyme können nach einer aeroben Inaktivierung unter anaeroben Bedingungen reaktiviert werden (Vincent et al., 2007), wohingegen die meisten [FeFe] Hydrogenasen irreversibel durch O₂ geschädigt werden (De Lacey et al., 2007; Baffert et al., 2008).

In Cyanobakterien sind zwei verschiedene [NiFe] Hydrogenasen vertreten: ein H₂-oxidierendes Enzym und eine bidirektionale Hydrogenase (Tamagnini et al., 2007). Die cyanobakterielle H₂-oxidierende [NiFe] Hydrogenase gehört der Gruppe 2a an (Tab. 3.1) und konnte mit Ausnahme von drei *Synechococcus* Stämmen und *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Ludwig et al., 2006) in allen bis heute untersuchten diazotrophen Cyanobakterien nachgewiesen werden (Lambert und Smith, 1981; Houchins, 1984; Appel und Schulz, 1998; Tamagnini et al., 2000). Physiologisch tritt das Enzym in Verbindung mit der Nitrogenase auf und reoxidiert den während der Stickstofffixierung als Nebenprodukt anfallenden Wasserstoff (Houchins, 1984; Schütz et al., 2004). Diese Art der Weiterverwendung des Wasserstoffs hat für die Zelle drei Vorteile. Es wird zum einen ATP durch die „Knallgas-Reaktion“ geliefert

und dadurch die Energieausbeute maximiert, zum anderen wird die Sauerstoffkonzentration in Gegenwart der sauerstoffsensitiven Nitrogenase gesenkt und letztendlich werden Reduktionsäquivalente für weitere Zellfunktionen bereitgestellt (Howarth und Codd 1985; Weisshaar und Böger, 1985; Bothe et al., 1991). Strukturell besteht die H₂-oxidierende [NiFe] Hydrogenase aus einem HupL und einem HupS Protein (hup, hydrogen uptake). Außerdem wird die Existenz eines zusätzlichen Polypeptids diskutiert, das die Hydrogenase mit der Membran verankert (Tamagnini et al., 2005; 2007). HupL ist die große Untereinheit und beinhaltet das aktive Zentrum. HupS stellt die kleine Untereinheit der Hydrogenase dar. Sie bindet mehrere [FeS] Cluster, die den Elektronentransfer zwischen dem aktiven Zentrum und dem Elektronenakzeptor vermitteln.

Die bidirektionale [NiFe] Hydrogenase katalysiert sowohl die Reduktion von Protonen zu molekularem H₂ als auch die Oxidation von H₂. Die ersten molekulargenetischen Charakterisierungen bidirektionaler [NiFe] Hydrogenasen aus *Anabaena* Stämmen und *Synechococcus* sp. PCC 7942 zeigten, dass das Enzym zur Klasse 3d der NAD(P)-reduzierenden [NiFe] Hydrogenasen gehört (Schmitz et al., 1995). Es ist ein Heteropentamer, bestehend aus einer Hydrogenase (HoxYH)- und einer Diaphorase (HoxEFU)-Einheit (Schmitz et al., 2002). Hydrogenasen, die mit einer NAD(P)H Dehydrogenase assoziiert sind, existieren in verschiedenen Bakterienstämmen und in einigen Archaea. Beispiele sind die löslichen Hydrogenasen der photosynthetischen Schwefel-Purpur-Bakterien *Thiocapsa roseopersicina* und *Allochromatium vinosum* (Rákhely et al., 2004; Long et al., 2007), des β -Proteobakteriums *Ralstonia eutropha* H16, des Aktinobakteriums *Rhodococcus opacus* 1b (ehemals *Nocardia opaca* 1b) sowie des Euryarchaeons *Pyrococcus furiosus* (Schneider et al., 1984 a, b; Burgdorf et al., 2005 b; van Haaster et al., 2008).

Die Aktivität und das Vorkommen des Enzyms in Cyanobakterien sind nicht an die N₂-Fixierung gekoppelt. Die zelluläre Lokalisierung der bidirektionalen Hydrogenase von Cyanobakterien wird kontrovers diskutiert. Das Enzym wurde sowohl in Heterocysten als auch in vegetativen Zellen gefunden (Hallenbeck und Benemann, 1978; Houchins und Burris, 1981). Lange Zeit wurde es als lösliches Enzym eingeordnet, nachdem es in aufgebrochenen *Nostoc* sp. PCC 7120 Zellen in der cytosolischen Fraktion detektiert wurde (Houchins und Burris, 1981). Mittlerweile deuten Untersuchungen anderer Organismen eher darauf hin, dass eine schwache Assoziation der bidirektionalen Hydrogenase mit Membranen besteht. In *Anabaena variabilis* und *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde eine Verbindung mit der Thylakoidmembran vorgeschlagen (Serebryakova et al., 1994; Appel et al., 2000), während in *Synechococcus* sp. PCC 6301 immunologische Daten eine Assoziation mit der Plasmamembran implizieren (Kentemich et al., 1991). Eine periplasmatische Lokalisierung der Hydrogenasen wird ausgeschlossen, da keine Transitsequenzen vorhanden sind (Appel und Schulz, 1996).

Ähnlich wie in Grünalgen gibt es mehrere Wege zur H₂-Produktion in Cyanobakterien. Der direkte Elektronendonator ist bei Cyanobakterien allerdings nicht Ferredoxin sondern

NAD(P)H. Für die H₂-Produktion kann die Aktivität der beiden Photosysteme (PS I und PS II) genutzt werden. Die Elektronen zur Reduktion von NADP⁺ kommen dabei direkt aus der Wasserspaltung. Die H₂-Produktion erfolgt nur kurzfristig in Übergangszuständen, da der photosynthetisch gebildete O₂ die Hydrogenase inhibiert. Durch Oxidation von organischen Substanzen kann der Plastochinon-Pool ebenfalls, unabhängig vom PS II, reduziert werden und anschließend über die Aktivität des PS I konstant H₂ produziert werden (Houchins et al., 1984; Cournac et al., 2004; Rupprecht et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit der H₂-Produktion in Cyanobakterien verläuft vollständig ohne die Aktivität der Photosysteme, über die Fermentation von reduzierten Kohlenhydraten im Dunkeln (Troshina et al., 2002).

3.6 [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 gehört zu den nicht stickstofffixierenden Cyanobakterien und besitzt als solches nur eine [NiFe] Hydrogenase (Appel und Schulz, 1996; 1998; Appel et al., 2000). Es handelt sich um die in dieser Arbeit untersuchte NAD(P) gekoppelte bidirektionale [NiFe] Hydrogenase der Klasse 3d (Tab. 3.1). Die Hydrogenasegene von *Synechocystis* (*hoxEFUYH*) sind, wie bei den meisten Cyanobakterien, in einem Operon angeordnet (Abb. 3.2), das drei offene Leserahmen (ORF) einschließt. Die Funktionen der ORF mit den Größen 10, 17 und 24 kDa sind bisher nicht bekannt. Zur Prozessierung der Hydrogenase in *Synechocystis* treten die akzessorischen *hyp*-Gene (*hyp* = hydrogenase pleiotropic) im Genom auf. Die *hyp*-Gene (*hypA1*, *hypB1*, *hypC*, *hypD*, *hypE*, *hypF*) sind hochgradig konserviert. Mutationen in diesen Genen setzen die Hydrogenaseaktivität stark oder vollständig herab (Hoffmann et al., 2006). Die *hyp*-Gene in *Synechocystis* sind nicht, wie in vielen anderen Organismen, in einem Operon angeordnet, sondern über das gesamte Genom verteilt. Zur Hydrogenasereifung wird außerdem eine Endopeptidase, vermutlich HoxW (Hoffmann et al., 2006) benötigt, die eine C-terminale Peptidsequenz der großen Untereinheit der Hydrogenase abspaltet. Die bisher bekannten Abläufe der Prozessierung von [NiFe] Hydrogenasen sind in Kapitel 3.8 beschrieben.

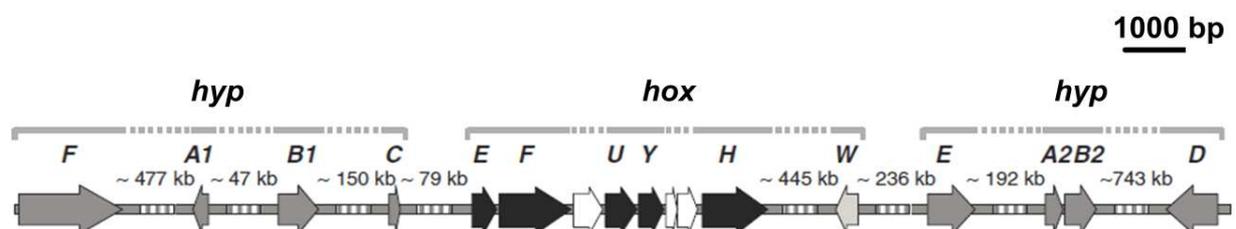


Abb. 3.2: Organisation der Gene *hoxEFUYH* (schwarz), die in *Synechocystis* sp. PCC 6803 für die bidirektionale [NiFe] Hydrogenase kodieren sowie der Gene *hypABCDEF* (dunkelgrau) und *hoxW* (hellgrau), die für Proteine der Hydrogenasereifung kodieren. In weiß sind drei offene Leserahmen des *hox*-Operons abgebildet, deren Funktion nicht bekannt ist (nach Tamagnini et al., 2007).

HoxY und *hoxH* kodieren die kleine und die große Untereinheit der Hydrogenase, *hoxF* und *hoxU* die kleine und die große Untereinheit der Diaphorase. *HoxE* kodiert für eine

Untereinheit von 19 kDa, deren Funktion noch nicht hinreichend aufgeklärt ist. Das Protein zeigt eine große Sequenzähnlichkeit zu NuoE (Nuo: NADH-Ubichinon Oxidoreduktase), dem 24 kDa Protein vom mitochondrialen Komplex I aus *Escherichia coli* (*E. coli*). Daher wird diskutiert, ob HoxE eine Rolle bei der Membranbindung spielt. Für die Hydrogenase aus *Thiocapsa roseopersicina* konnte gezeigt werden, dass HoxE Elektronen an Membrankomponenten überträgt (Rákhely et al., 2004). Neben HoxE besitzen auch HoxF und HoxU hohe Sequenzähnlichkeiten zu peripheren Teilen (NuoF und NuoG) des Komplex I in *E. coli*. Interessant ist, dass die entsprechenden drei, in anderen Prokaryoten genauso wie in *E. coli*, hoch konservierten Untereinheiten des Komplex I in Cyanobakterien fehlen. Es wird daher spekuliert, ob HoxEFU die fehlenden Untereinheiten des Komplex I ersetzen und damit die bidirektionale Hydrogenase an den Komplex I koppeln (Appel und Schulz, 1996; Schmitz und Bothe, 1996; Tamagnini et al., 2007).

HoxE besitzt das Sequenzmotiv für die Bindung eines [FeS] Clusters (Tab. 3.2). Neben HoxE weisen auch die kleine Untereinheit des Hydrogenasedimers sowie HoxU und HoxF der Diaphorase mehrere konservierte Cysteine auf, die wahrscheinlich in die Koordinierung von [FeS] Cluster involviert sind (Appel und Schulz, 1996). Zusätzlich gibt es in HoxF zwei charakteristische glycinreiche Motive: (GxGx₄Gx₁₀Gx₂G) für eine FMN- und (GxGx₂Gx₃G) für eine NAD(P)⁺-Bindung (Schmitz et al., 1995).

Tab. 3.2: Sequenzmotive in den Untereinheiten der bidirektionalen [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Schmitz et al., 1995; Appel und Schulz, 1996; Long et al., 2007)

Untereinheit	Motiv	mögliche Bindung
HoxE	Cx ₄ Cx ₂₅ Dx ₉ Cx ₃ Cx ₃ P	[2Fe2S] Cluster
HoxF	Cx ₄ Cx ₃₀ Gcx ₃ Cx ₃ P FCx ₂ ESCGKcxPCR _x GT	[2Fe2S] Cluster [4Fe4S] Cluster
HoxU	Cx ₁₀₋₁₃ CR[LV]Cx ₁₃ C ExNHxC[AS][VIS]CVx ₄ CxLQ Dx ₂ RCx ₂ CxRC[VI]R[VA]CDx ₂₆ WGx ₄ CTxCGKcx ₃ CPTG	[2Fe2S] Cluster [4Fe4S] oder [3Fe4S] Cluster 2 [4Fe4S] Cluster
HoxY	CxGCx ₅₅₋₅₇ Rx ₉ GxCx ₅₉₋₆₅ GCPP	proximales [FeS] Cluster
HoxH	RICGICx ₃ H [YF]DPCLSC[SA][TS]H	N-terminales Motiv des [NiFe] Zentrums C-terminales Motiv des [NiFe] Zentrums

Die physiologische Rolle der bidirektionalen Hydrogenase in *Synechocystis* ist noch nicht vollständig geklärt. Das Enzym nutzt NAD(P)H als Elektronendonator und NAD(P) als Elektronenakzeptor und ist daher abhängig vom Redoxstatus der Zelle. Aufgrund der Differenz im elektrochemischen Potenzial (ca. -320 mV für das NAD(P)/NAD(P)H-Paar und -420 mV für das H⁺/H₂-Paar) kann die Hydrogenase nur H₂ produzieren, wenn der NAD(P)-Pool stark reduziert vorliegt. Der Redoxstatus des Pools wird u. a. durch die Aktivität der Photosynthese und der Atmung kontrolliert. Die zwei Prozesse teilen sich in der Thylakoidmembran Komponenten des Elektronentransports (Cytochrom b₆/f Komplex,

Plastochinon-Pool). Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym als ein Ventil für überschüssige Elektronen im Elektronentransport während der Adaptation an höhere Lichtverhältnisse (dunkel nach hell) dient (Appel et al., 2000). Dem stark reduzierten NAD(P)-Pool werden durch H₂-Produktion Elektronen entzogen, wodurch der Elektronentransport aufrechterhalten und Photoinhibition vermieden wird. In solchen Übergangszuständen ist die H₂-Produktion nur kurzfristig, da der photosynthetisch gebildete O₂ die Hydrogenase inhibiert. Im Dunkeln wurden konstante, aber geringe H₂-Produktionsraten gemessen (Houchins et al., 1984; van der Oost und Cox, 1987). Diese resultieren aus der Oxidation von NAD(P)H, das durch Fermentation produziert wird. Durch H₂-Oxidation können Elektronen unter Beteiligung des Komplex I der Atmung auch aufgenommen werden (Cournac et al., 2004). Die Atmung, der zyklische Elektronentransport, der Calvin Zyklus und die Hydrogenase konkurrieren um die Elektronen des NAD(P)H. Außerdem wurde gezeigt, dass die Abwesenheit der Chinol Oxidase zu verstärkten H₂-Produktionsraten führt (Gutthann et al., 2007). Eine schematische Übersicht der physiologischen Rolle des Enzyms gibt Abb. 3.3.

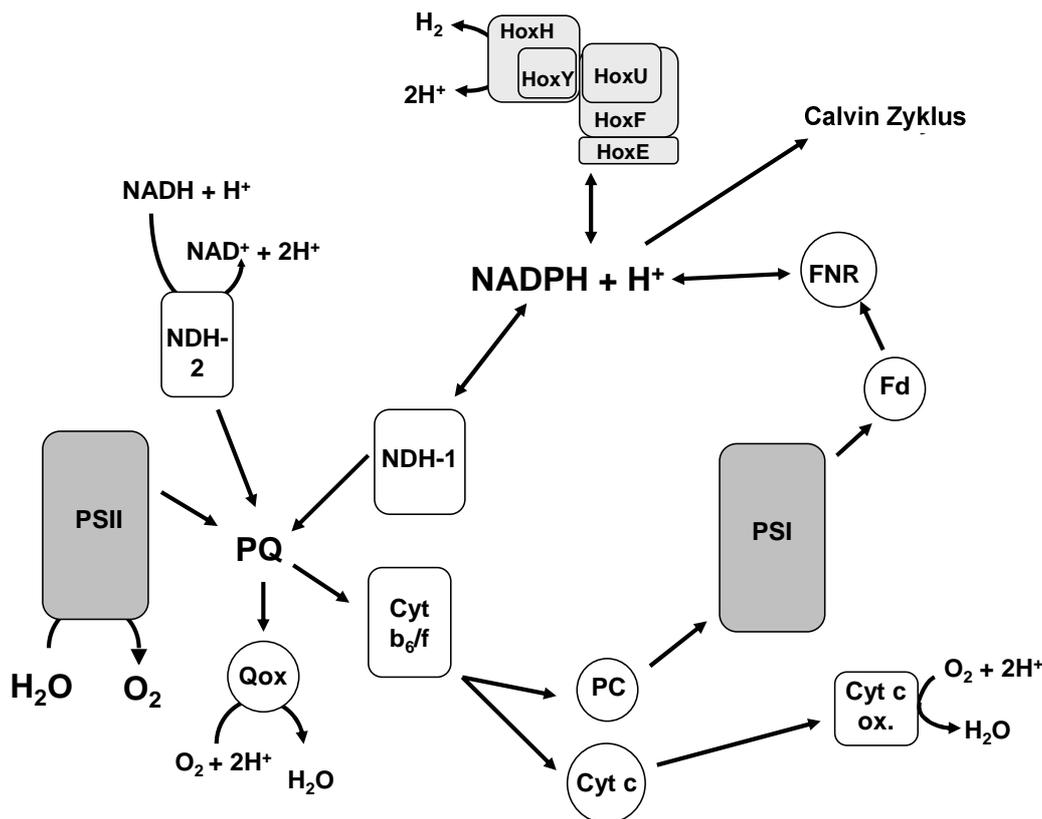


Abb. 3.3: Modell der physiologischen Rolle der [NiFe] Hydrogenase (HoxEFUYH) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (verändert nach Gutthann et al., 2007). Die Pfeile symbolisieren den Elektronentransport. NDH-1: NADPH-Dehydrogenase (Komplex I); NDH-2: Typ II NADH-Dehydrogenase; PS I: Photosystem I; PS II: Photosystem II; Cyt b₆/f: Cytochrom b₆/f Komplex; PQ: Plastochinon; Fd: Ferredoxin; FNR: Ferredoxin NADP Reduktase; PC: Plastocyanin; Cyt c ox.: Cytochrom c Oxidase; Qox: Chinol Oxidase.

Obwohl die Expression der Hydrogenase in *Synechocystis* in Abhängigkeit von Umweltbedingungen variiert, ist eine konstitutive Expression des Enzyms nachweisbar. Allerdings produziert die Hydrogenase nur in Übergangszuständen Wasserstoff (Appel et al., 2000; Cournac et al., 2004). Eine permanent aktive Hydrogenase wäre für die Zellen von Nachteil, da ein Teil der eingefangenen Lichtenergie stets in Form von H_2 an die Umgebung abgegeben würde. Die Hydrogenase wird daher auf mehreren Ebenen streng reguliert. Die erste Regulation erfolgt auf Höhe der Expression über den Transkriptionsaktivator LexA (Gutekunst et al., 2005) sowie vermutlich über die AbrB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren sll0359 und sll0822 (Ishii und Hihara, 2008; Oliveira und Lindblad, 2008). Zweitens wird das Enzym über den Mechanismus der Enzymreifung mit Hilfe der Hyp-Proteine (Hoffmann et al., 2006) und drittens über die Verfügbarkeit der Metalle, die zur Bildung einer aktiven Hydrogenase notwendig sind, reguliert (Gutekunst et al., 2006).

Die vierte Regulationsebene, die Aktivität und Empfindlichkeit des aktiven Zentrums gegenüber Sauerstoff, ist in Organismen mit oxygener Photosynthese und damit auch in *Synechocystis* nur sehr wenig untersucht. Die Hydrogenase aus *Synechocystis* wird sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimiert (Appel et al., 2000), ist aber in Gegenwart von Sauerstoff inaktiv (Cournac et al., 2002; 2004). Mit sehr wenigen Ausnahmen (Kapitel 3.10) werden alle bisher bekannten [NiFe] Hydrogenasen durch Sauerstoff inaktiviert und die Reaktivierung unter anaeroben Bedingungen dauert Stunden (Fernandez et al., 1984; Houchins, 1984; Vignais et al., 2002). Die Hydrogenase aus *Synechocystis* ist in dieser Hinsicht ein außerordentlich interessantes Enzym. Es liegt in Gegenwart von Sauerstoff inaktiv in der Zelle vor und wird unter anaeroben Bedingungen, in Gegenwart von H_2 und katalytischen Mengen von NADH oder NADPH, innerhalb weniger Minuten reaktiviert (Cournac et al., 2002; 2004; Vignais et al., 2002). Die ständige Präsenz des inaktiven Enzyms ermöglicht es den Cyanobakterien bei wechselnden Umweltbedingungen sofort H_2 zu metabolisieren. Sie deutet auf die Wichtigkeit dieses Metabolismus für die Zelle in Übergangszuständen hin. Die Ursache des außergewöhnlich raschen Reaktivierungsverhaltens bzw. dieser „geringeren“ Sauerstoffsensitivität ist bisher nicht untersucht.

3.7 Struktureller Aufbau der Standard [NiFe] Hydrogenasen

Die Katalyse der H_2 -Oxidation mittels [NiFe] Hydrogenasen beinhaltet mehrere Schritte: den Transfer von H_2 zum aktiven Zentrum, das Binden des Gases am [NiFe] Zentrum, die heterolytische Spaltung in ein Proton und ein Hydrid, die Freigabe des Protons in das Medium sowie den intra- und intermolekularen Elektronentransfer zum Redoxpartner. Zu den bisher am besten untersuchten [NiFe] Hydrogenasen, die diese Schritte vollbringen, gehören die der anaeroben, sulfatreduzierenden Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* (*D. gigas*, *D. vulgaris*) sowie die Hydrogenase des photosynthetischen Schwefel-Purpurbakteriums *Allochromatium*

vinosum. Diese als Standard [NiFe] Hydrogenasen bezeichneten Enzyme weisen deutliche Übereinstimmung auf biochemischer, spektroskopischer und struktureller Ebene auf.

Das Grundmodul einer Standard [NiFe] Hydrogenase besteht aus einer großen Untereinheit (ca. 60 kDa) mit dem aktiven Zentrum und einer kleinen Untereinheit (ca. 30 kDa), welche den Elektronentransport vermittelt. Kristallstrukturen der Hydrogenasen von *D. gigas* (Volbeda et al., 1995; 1996; 2005), *D. vulgaris* Miyazaki F (Higuchi et al., 1997; 1999; Ogata et al., 2005), *D. desulfuricans* (Matias, et al., 2001) und *D. fructosovorans* (Montet et al., 1997; Volbeda et al., 2002) haben die generelle Struktur der Proteine aufgezeigt (Abb. 3.4).

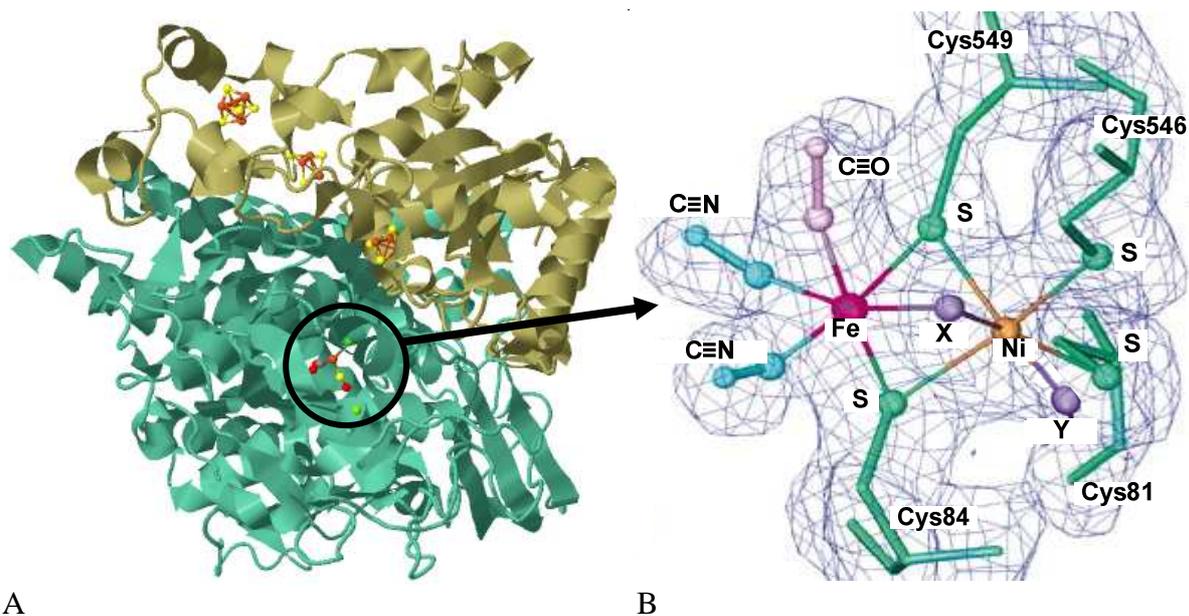


Abb. 3.4: Röntgenstruktur der [NiFe] Hydrogenase von *D. vulgaris* Miyazaki F (Higuchi et al., 1997). (A) Struktur des gesamten Proteins (aus der Proteindatenbank, PDB, 1H2R). Die kleine Untereinheit, gelb dargestellt, beinhaltet drei [FeS] Cluster. Die große Untereinheit mit dem aktiven Zentrum ist grün abgebildet. (B) Detaillierte Darstellung des aktiven Zentrums. Der Brückenligand zwischen Nickel und Eisen ist mit einem X gekennzeichnet. Die terminale Koordinationsstelle am Nickel ist mit einem Y gekennzeichnet.

Die beiden Untereinheiten interagieren über eine große Fläche miteinander und bilden ein globuläres Heterodimer. Das [NiFe] Zentrum befindet sich tief im Inneren des Proteins verborgen und ist eng mit einer fast linearen Kette von drei [FeS] Clustern in der kleinen Untereinheit gekoppelt, über die Elektronen an die Oberfläche der Hydrogenase gelangen. Ein ungefährender Abstand von 13 Å liegt zwischen den [FeS] Clustern. Das in Bezug zum aktiven Zentrum proximale [FeS] Cluster dieser Kette ist genau wie das distale vom [4Fe4S] Typ. In der Mitte befindet sich ein [3Fe4S] Cluster. Das proximale [4Fe4S] Cluster ist essenziell für die H₂-Umsetzung und kommt in allen Hydrogenasen mit einem bimetallischen aktiven Zentrum vor (Fontecilla-Camps et al., 1997). Über vier Cysteine ist das Nickelatom des bimetallischen Zentrums mit dem Enzym verbunden. Zwei davon sorgen gleichzeitig für die Verbrückung mit dem Eisenatom. Alle vier Cysteine sind streng konserviert (Volbeda et al.,

1995). Einige [NiFe] Hydrogenasen, z. B. von *Desulfomicrobium baculatum*, besitzen anstelle eines Cystein-Schwefelatoms ein Cystein-Selenatom im aktiven Zentrum (Patil, 1994). Diese Selen-Hydrogenasen haben außerdem statt des medialen [3Fe4S] Clusters ein [4Fe4S] Cluster (Garcin et al., 1999).

Am Eisen des aktiven Zentrums der Standard [NiFe] Hydrogenasen befinden sich zwei CN⁻-Liganden, die über Wasserstoffbrücken mit benachbarten Aminosäuren verbunden sind und ein CO-Ligand, der von hydrophoben Aminosäure-Resten umgeben ist. Diese NiFe(CN)₂(CO) Struktur wurde mittels Röntgenstrukturanalyse (Volbeda et al., 1995; 1996; Higuchi et al., 1997; Ogata et al., 2002) und Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie charakterisiert (Happe et al., 1997; De Lacey et al., 1997; 2002; Pierik et al., 1999; Bleijlevens et al., 2004 b; Fichtner et al., 2006).

Das katalytische Nickelatom hat zwei freie Koordinationsstellen zur Bindung von Liganden, eine gemeinsame mit dem Eisenatom, welche in Abb. 3.4 mit X gekennzeichnet ist, und eine terminale, die mit Y gekennzeichnet ist. Wenn beide besetzt sind, zeigt das Nickelatom eine oktaedrische Koordination (Fontecilla-Camps et al., 2009). Die drei Schwefelatome (Cys81, Cys84 und Cys564) sowie der Brückenligand X bilden eine quadratisch planare Liganden-Struktur um das Nickelatom, das sich im Zentrum der Grundfläche befindet. Das Schwefelatom des Cysteins Cys549 sowie der terminale Ligand Y bilden die aus der Ebene herausragenden Spitzen des Oktaeders. Die freie terminale Bindestelle vom Nickelatom wird als primäre Koordinationsstelle für H₂ gesehen, weil der kompetitive Inhibitor CO dort bindet (Ogata et al., 2002) und weil spezielle hydrophobe H₂-Kanäle dort enden. Über die hydrophoben Kanäle erfolgt der gerichtete Transfer von gasförmigem H₂ (Fontecilla-Camps et al., 1997; Volbeda et al., 2002). Experimente zur Xenon-Bindung in Kristallen von [NiFe] Hydrogenasen aus *D. fructosovorans* zeigten, dass mehrere an der Oberfläche des Enzyms beginnende hydrophobe Kanäle sich zu einem kleinen Kanal verbinden, der zum aktiven Zentrum führt. Außerdem war das Xenon-Gas in bestimmten Höhlen des Proteins höher konzentriert als in der Umgebungslösung. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Höhlen als Gasreservoir zur Substratkonzentrierung dienen (Montet et al., 1997). *D. fructosovorans* Mutanten, in denen durch Aminosäure-Austausch das postulierte Kanalende zum aktiven Zentrum hin modifiziert wurde, zeigten neben signifikant reduzierten CO- und H₂-Diffusionsraten (Leroux et al., 2008) ebenfalls eine erhöhte Sauerstofftoleranz (Dementin et al., 2009). Diese Ergebnisse implizieren, dass der H₂-Kanal ebenfalls den Zugang von CO und O₂ ermöglicht, welcher jeweils zur Inhibition der Enzyme führt.

Zwei Wege zum Transfer der bei der H₂-Oxidation freiwerdenden Protonen, vom aktiven Zentrum zur Proteinoberfläche, werden postuliert (Ogata et al., 2009). In den Standard Hydrogenasen wurde neben den Metallen im aktiven Zentrum ein Mg²⁺ (Fe²⁺ in *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin et al., 1999)) identifiziert, welches am C-terminalen Histidin der großen Untereinheit gebunden ist (Higuchi et al., 1997). Es besitzt drei Wasserliganden und befindet sich in ca. 13 Å Entfernung zum aktiven Zentrum. Neben einer

Funktion im Reifungsprozess des Enzyms (Kapitel 3.8) eignet es sich zum Transfer von Protonen (Fontecilla-Camps et al., 2007). Im Prinzip bilden protonen tragende Aminosäuregruppen der Proteinmatrix wie Aspartat, Glutamat oder Histidin zusammen mit mehreren Wassermolekülen eine Kette zum aktiven Zentrum hin und wieder zurück, die bei geeigneten pK_s -Werten Protonen aufnehmen und wieder abgeben. Studien mit der [NiFe] Hydrogenase von *D. fructosovorans* lokalisierten ein konserviertes Glutamat (Glu25) in 3 Å Entfernung zum Nickel-bindenden Cystein543 (Cys546 entsprechend in *D. vulgaris* Miyazaki F), das essenziell ist und scheinbar die Protonen direkt vom aktiven Zentrum aufnimmt (Dementin et al., 2004).

3.8 Assemblierung der [NiFe] Hydrogenasen

Die Synthese der aktiven [NiFe] Hydrogenase ist ein komplexer Prozess, der in *E. coli* neben den strukturellen Proteinen mindestens sechs Reifungsenzyme, eine spezifische Endopeptidase sowie Carbamoylphosphat, GTP und ATP erfordert (Böck et al., 2006; Forzi und Sawers, 2007; Leach und Zamble, 2007). Die Assemblierung der Hydrogenase wird durch den Einbau von Eisen in einen Komplex aus HypC und HypD initiiert (Blokesch und Böck, 2002; Böck et al., 2006). Carbamoylphosphat ist der Ausgangsstoff für die Cyanid-Gruppe. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird das C-terminale Cystein von HypE carbamoyliert (Reissmann et al., 2003). Unter Dehydratisierung und weiterem ATP-Verbrauch wird die CN-Gruppe von HypE auf den eisenhaltigen HypCD-Komplex übertragen. Der Ursprung des Carbonyls ist noch unbekannt (Roseboom et al., 2005). HypC vermittelt die Übertragung des $Fe(CN)_2CO$ -Fragments in den Vorläufer der großen Untereinheit und hält diesen als Chaperon für den Einbau von Nickel, mittels eines Komplexes aus HypA und HypB, geöffnet (Hube et al., 2002). Zur Prozessierung der Hydrogenase in *Synechocystis* sind nachweislich die *hyp*-Gene (*A1*, *B1*, *C*, *D*, *E*, *F*) erforderlich (Hoffmann et al., 2006).

Nachdem das Metallzentrum komplett eingebaut ist, wird eine C-terminale Peptidsequenz nach Histidin oder Arginin des Cx_2Cx_2H/R -Aminosäuremotivs durch eine spezifische Endopeptidase abgespalten (Theodoratou et al., 2000; 2005). Es folgt eine Konformationsänderung zum nativen Enzym. An dem Histidin oder Arginin ist ein Magnesium gebunden. Es wird diskutiert, ob dieses Metall einen stabilisierenden Einfluss auf den C-Terminus des Vorläufer-Proteins während der Assemblierung ausübt (Ogata et al., 2009). In *Ralstonia eutropha* wurde ein zusätzliches Hyp-Protein, HypX, identifiziert. Das Protein HypX hat eine N10-Formyltetrahydrofolat-Bindedomäne am N-Terminus. Daher wurde angenommen, dass es am Transfer von C1-Komponenten wie CO und CN teilnimmt (Rey et al., 1996). Schließlich wurde gezeigt, dass HypX im aktiven Zentrum zusätzliche CN^- -Liganden einführt (Bleijlevens et al., 2004 a), die die lösliche Hydrogenase resistenter gegenüber Sauerstoff machen (van der Linden et al., 2004).

3.9 Redoxzustände der Standard [NiFe] Hydrogenasen

Obwohl die Kinetik der H_2 -Reaktion sehr schnell ist, konnten einige Redoxzustände des aktiven Zentrums von [NiFe] Hydrogenasen über Redox titrationen stabilisiert und anschließend mit verschiedenen spektroskopischen Techniken analysiert werden (Fontecilla-Camps et al., 2007; Lubitz et al., 2007; Ogata et al., 2009). Einen Überblick über die wichtigsten Zustände gibt Abb. 3.5. Die Redoxpotenziale der einzelnen Zustände liegen relativ dicht beieinander, unabhängig davon, ob sie katalytisch aktiv oder inaktiv sind. Diese Tatsache resultiert vermutlich aus der Kombination der verschiedenen Liganden der Metalle. Thiole der Cysteine sind gute π -Donoren, Cyanide gute σ -Donoren sowie relativ gute π -Akzeptoren und Carbonyl ist ein sehr guter π -Akzeptor. Die spezielle Koordinierung kann dazu dienen, den Eingang und Ausgang von Elektronen im aktiven Zentrum zu erleichtern. Da die Synthese von strukturellen Analoga des aktiven Zentrums (biomimetische Komplexe) bisher zu keinen vergleichbaren katalytisch aktiven Spezies führte (Tard und Pickett, 2009), ist davon auszugehen, dass die flexible Proteinumgebung die Redoxübergänge zusätzlich stabilisiert (De Lacey et al., 2007).

In aerob isolierten Standard [NiFe] Hydrogenasen zeigten kristallographische Studien (Ogata et al., 2005; Volbeda et al., 2005), dass ein Sauerstoff-Ligand an Eisen und Nickel verbrückend gebunden ist (Koordinationsstelle in Abb. 3.4 mit X gekennzeichnet). Dabei existieren zwei verschiedene Zustände, ein „ready state“ mit einem Hydroxo-Ligand (van Gastel et al., 2005; Volbeda et al., 2005) und ein „unready state“ mit einem zweiatomigen Sauerstoff-Ligand, wahrscheinlich einem Hydroperoxid (Ogata et al., 2005; Volbeda et al., 2005). Der genaue Charakter des Liganden im „unready state“ wird kontrovers diskutiert (Lubitz et al., 2007; Ogata et al., 2009). Kristallographische Studien zum „unready state“ zeigten außerdem, dass am terminalen Cystein Cys84 eine Modifikation vorliegt, die als eine zusätzliche Sauerstoffspezies interpretiert wird (Ogata et al., 2005). In beiden oxidierten Formen ist das Enzym inaktiv, kann aber unter reduzierenden Bedingungen aktiviert werden. Dabei wird der Sauerstoff-Ligand verdrängt, der die H_2 -Bindung blockiert (Garcin et al., 1999; Higuchi et al., 1999). Die Zustände unterscheiden sich in ihrer Aktivierungskinetik. Der „ready state“, als Ni_I -B abgekürzt, wird innerhalb von Sekunden bis Minuten reaktiviert, während der „unready state“, Ni_U -A, Stunden benötigt (Fernandez et al., 1985; Kurkin et al., 2004; Fichtner et al., 2006; De Lacey et al., 2007). Die molekularen Ursachen für den Aktivierungsunterschied sind noch nicht vollständig geklärt. Angenommen wird, dass im Zusammenhang mit dem Brückenliganden eine zweiatomige Sauerstoffspezies schwerer zu entfernen ist. Durch Reduktion mit einem Elektron werden die Zustände in ihre entsprechenden reduzierten Formen, Ni_U -S und Ni_I -S umgewandelt. Ni_U -S und Ni_I -S sind ebenfalls katalytisch inaktiv und der verbrückende Sauerstoff-Ligand verbleibt wahrscheinlich im aktiven Zentrum (Bleijlevens et al., 2004 b).

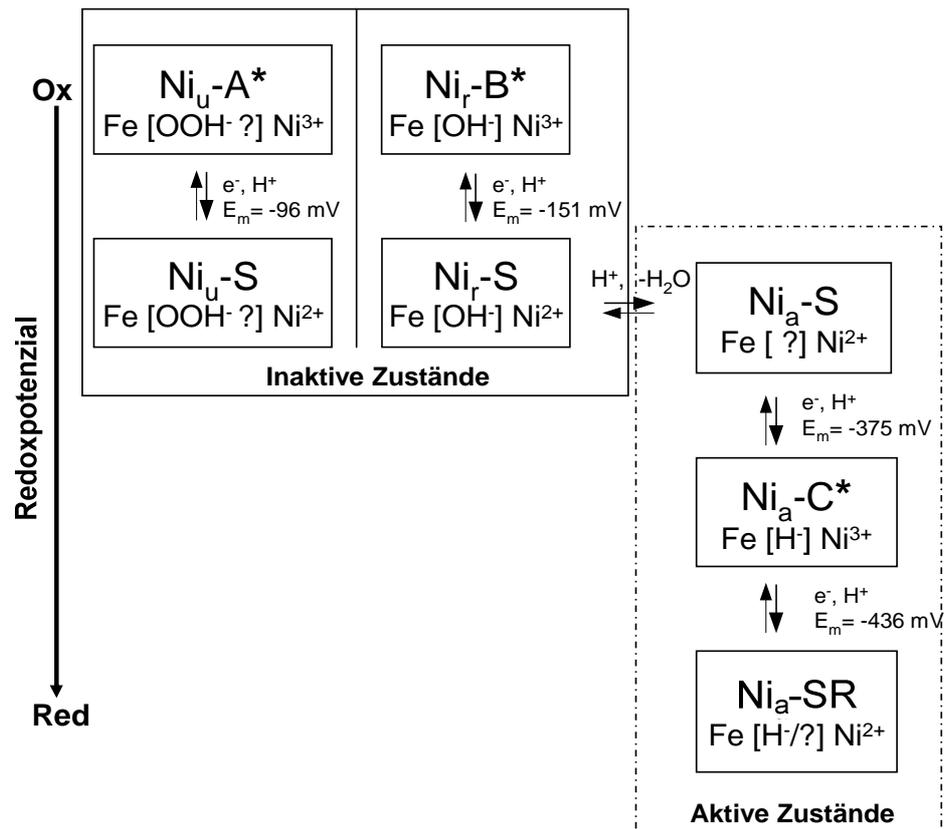


Abb. 3.5: Schema der Redoxzustände des aktiven Zentrums von Standard [NiFe] Hydrogenasen. Die Oxidationszustände von Nickel sind angegeben. Paramagnetische Zustände sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die katalytisch aktiven Zustände sind in dem gepunkteten Kasten dargestellt. Die mittleren Redoxpotenziale der Übergänge (E_m) sind für das Enzym von *D. vulgaris* Miyazaki F bei pH = 8,0 angegeben (nach Lubitz et al., 2007; Ogata et al., 2009; Fontecilla-Camps et al., 2007).

Unter reduzierenden Bedingungen entsteht dann der aktive Ni_a-S Zustand. Bei diesem Schritt wird ein terminales Cystein am Nickel protoniert (Fichtner et al., 2006). Versuche mit dem kompetitiven Inhibitor CO zeigten, dass CO nur im Ni_a-S Zustand binden kann. Da die Bindung nur möglich ist, wenn kein verbrückender elektronegativer Ligand vorhanden ist, wird Sauerstoff wahrscheinlich während dieses Redoxübergangs als Wasser entfernt (De Lacey et al., 2002; Pandelia et al., 2010). Ni_a-S wird weiter reduziert zu Ni_a-C . Im Ni_a-C Zustand ist ein verbrückendes Hydrid (H^-) zwischen Nickel und Eisen vorhanden (Brecht et al., 2003; Foerster et al., 2005). Ein letzter Ein-Elektron-Reduktionsschritt führt zum vollständig reduzierten Ni_a-SR . In Abhängigkeit vom pH-Wert existieren verschiedene Formen von Ni_a-SR . Alle Redoxgleichgewichte sind pH-abhängig, da die Ein-Elektronen-Reduktionsschritte jeweils von Protonen begleitet werden. Die Nickel-Eisen-Koordinations-Geometrie verändert sich nur gering zwischen der oxidierten inaktiven und reduzierten aktiven Form. Der Hauptunterschied liegt im Vorhandensein und im Charakter des Liganden zwischen Nickel und Eisen. Im Zuge des Aktivierungsprozesses muss die Sauerstoffspezie entfernt werden. Nach der heterolytischen Spaltung von H_2 wird das Hydrid im aktiven

Zentrum gebunden und das Proton ist wahrscheinlich an einer entlegenen Stelle angeheftet oder bereits aus dem aktiven Zentrum entfernt (Fontecilla-Camps et al., 2009).

Mittels Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) können die Zustände Ni_r-B, Ni_u-A und Ni_a-C charakterisiert werden, da diese über ein ungepaartes Elektron am Nickel verfügen. Sie zeigen typische ESR-Spektren für paramagnetisches Ni³⁺ (Roberts und Lindahl, 1994). Die g-Tensor-Werte liegen zwischen 2,33 und 2,01. Für *Allochromatium vinosum* wurden beispielsweise Ni_u-A (g = 2,32; 2,24; 2,01), Ni_r-B (g = 2,32; 2,16; 2,01) und Ni_a-C (g = 2,21; 2,15; 2,01) gemessen (De Lacey et al., 2007; Lubitz et al., 2007). Die g_x- und g_z-Komponenten von Ni_u-A und Ni_r-B sind sehr ähnlich, g_y dagegen ist signifikant unterschiedlich. Die g_y-Achse liegt in Richtung des verbrückenden Liganden (Ogata et al., 2009). Die übrigen Redoxzustände sind ESR inaktiv, da diamagnetisches Ni²⁺ vorliegt (Davidson et al., 2000).

Alle Redoxzustände können, unabhängig davon ob ein ungepaartes Elektron vorliegt, mittels Infrarotspektroskopie charakterisiert werden. Die Infrarot-Absorptionslage der CN- bzw. CO-Streckschwingungen ändert sich während der Katalyse aufgrund von Variationen der Elektronendichte des aktiven Zentrums oder dessen Umgebung (Bagley et al., 1995; De Lacey et al., 1997; 2007; Bleijlevens et al., 2004 b; Fichtner et al., 2006). Die Verlagerung der Absorptionen während der Redoxübergänge ist beachtlich kleiner als in Komplexen mit Fe²⁺/Fe³⁺-Übergängen (Lai et al., 1998). Die Bindung des Eisens im aktiven Zentrum an die typischen π-Akzeptor-Liganden CN⁻ und CO bewirkt einen „low spin“ Zustand des Metallions. Es verbleibt während der gesamten Katalyse als diamagnetisches Fe⁺². Dies wurde ebenfalls mittels ESR-Spektroskopie bestätigt (Dole et al., 1997). Es wurden noch einige andere Redoxzustände in [NiFe] Hydrogenasen detektiert, die nicht funktionsfähig sind. Es handelt sich z. B. um CO-inhibierte, lichtexponierte und temperaturgestresste Zustände (De Lacey et al., 2007), auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

3.10 Mechanismen der O₂-Toleranz von [NiFe] Hydrogenasen

Einige wenige Beispiele von relativ O₂-toleranten [NiFe] Hydrogenasen sind bekannt. Darunter fallen die periplasmatisch orientierte Membran-gebundene (Schneider und Schlegel, 1976) und die NAD⁺ reduzierende lösliche Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* H16 (Schink und Schlegel, 1979; Burgdorf et al., 2005 b), die Hydrogenasen von *Aquifex aeolicus* (Guiral et al., 2005) sowie die Hydrogenase von *Rubrivivax gelatinosus* (Maness und Weaver, 2001). Die genannten Enzyme scheinen allerdings weniger aktiv als O₂-sensitive Hydrogenasen zu sein (Fontecilla-Camps et al., 2007). Eine weitere Gruppe von Enzymen ist hochgradig O₂ resistent und gleichzeitig noch weniger aktiv. Es handelt sich hierbei um die regulatorischen H₂-Sensor [NiFe] Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* (Bernhard et al., 2001), *Rhodobacter capsulatus* (Elsen et al., 1996) und *Bradyrhizobium japonicum* (Black et al., 1994). Diese Enzyme regulieren auf Ebene der Transkription die energiegewinnenden Hydrogenasen (Kleihues et al., 2000; Friedrich et al., 2005).

Die bidirektionale, lösliche NAD^+ -reduzierende Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* gehört zur Gruppe 3d und weist eine hohe Ähnlichkeit zu der bidirektionalen [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* auf. Neben HoxFUYH besitzt das Enzym zwei HoxI Untereinheiten (Burgdorf et al., 2005 a). Spektroskopische Studien deuten darauf hin, dass das aktive Zentrum zusätzlich zu der Standard-Koordinierung (Abb. 3.4) je einen weiteren CN^- -Liganden am Nickel und am Eisen gebunden hat. Diese Ligandierung schützt das katalytische Zentrum vor der Sauerstoffbindung und damit vor der Bildung der inaktiven $\text{Ni}_u\text{-A}$ und $\text{Ni}_r\text{-B}$ Zustände (Happe et al., 2000; van der Linden et al., 2004; 2006). Die anderen zwei Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* besitzen eine Standard-Ligandierung (Pierik et al., 1998; Vincent et al., 2005). Allen drei O_2 -toleranten Hydrogenasen ist gemein, dass sie keinen inaktiven $\text{Ni}_u\text{-A}$ Zustand und im Falle der regulatorischen und der NAD^+ -reduzierenden Hydrogenase ebenfalls kein $\text{Ni}_r\text{-B}$ Zustand besitzen (Pierik et al., 1998; Happe et al., 2000). Als weiterer Mechanismus für die erhöhte Sauerstofftoleranz wurde für die regulatorische Hydrogenase gezeigt, dass engere Gaskanäle den Zugang von O_2 zum aktiven Zentrum begrenzen, während das kleinere H_2 -Molekül bedingt passieren kann (Buhrke et al., 2005 a). Diese Tatsache wurde auch für die regulatorische und O_2 -resistente Hydrogenase von *Rhodobacter capsulatus* festgestellt (Duché et al., 2005). Studien bei *Desulfovibrio fructosovorans* ergaben, dass eine räumliche Verengung des Gaskanals alleine keine Auswirkung auf die O_2 -Sensitivität hatte. Allerdings konnte durch den gezielten Einbau von zwei Methionin-Aminosäuren am Gaskanalende nahe des aktiven Zentrums eine deutlich erhöhte O_2 -Toleranz erreicht werden (Dementin et al., 2009). Methionin besitzt eine hohe Affinität zur Bindung von Sauerstoffspezies (Pal und Chakrabarti., 2001). Die Aminosäure spielt eine Rolle gegen oxidativen Stress (Stadtman, 2006). Die Membran-gebundene Hydrogenase (MBH) von *Ralstonia eutropha* weist dagegen ein einzigartiges Redoxverhalten des proximalen [FeS] Clusters auf, das die Bildung von $\text{Ni}_u\text{-A}$ verhindern soll (Saggu et al., 2009). Außerdem ist eine von den Standard Hydrogenasen abweichende Aminosäurekonstellation in der Nähe des aktiven Zentrums verantwortlich für eine hohe Affinität zu H_2 (Ludwig et al., 2009). Zusammenfassend sind bisher vier verschiedene, sich teilweise ergänzende Strategien bekannt, um einer Inaktivierung durch O_2 zu entgehen: Die Modifizierung des aktiven Zentrums durch zusätzliche CN^- -Liganden, eine Verengung des Gaskanals der zum aktiven Zentrum führt, der Einfluss des proximalen [FeS] Clusters und eine hohe Affinität zum Substrat H_2 durch spezielle Aminosäuresignaturen nahe des aktiven Zentrums.

3.11 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in das Forschungsziel ein, die Möglichkeit der Erzeugung von Wasserstoff mit Hilfe der Photosynthese von Cyanobakterien zu untersuchen. Die Effizienz der Wasserstoffproduktion von Mikroorganismen ist bisher stark durch die Tatsache beeinträchtigt, dass Hydrogenasen sensitiv gegenüber Sauerstoff sind.

Das Interesse dieser Arbeit liegt darin, die NAD(P) gekoppelte bidirektionale [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu charakterisieren. Das Enzym kann die Elektronen zur H₂-Produktion direkt aus der Photosynthese beziehen. Es ist unter aeroben Bedingungen inaktiv, wird aber in Gegenwart von Sauerstoff exprimiert und unter anaeroben Bedingungen außergewöhnlich schnell reaktiviert. Im Reaktivierungsverhalten ähnelt das Enzym von *Synechocystis* der ebenfalls sequenzähnlichen löslichen NAD⁺-reduzierenden Hydrogenase von *Ralstonia eutropha*, die O₂-tolerant ist. Es stellt sich die Frage, ob die beiden Enzyme auch im Aufbau des aktiven Zentrums vergleichbar sind. Besitzt die Hydrogenase von *Synechocystis* ebenfalls zusätzliche zweiatomige Liganden? Die bereits gut charakterisierten Standard [NiFe] Hydrogenasen lassen sich dagegen nur sehr langsam reaktivieren. Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten bestehen bezüglich des aktiven Zentrums und der Katalyse der Hydrogenase von *Synechocystis* im Vergleich zu diesen Enzymen?

Ziel der vorliegenden Arbeit ist insgesamt, erstmalig mit der Hydrogenase eines oxygenen photosynthetischen Organismus eine Verbindung zwischen dem Aufbau des aktiven Zentrums, der Sauerstoffempfindlichkeit und der katalytischen Aktivität herzustellen. Hierzu dienen folgende Ansätze:

- Auf molekulargenetischer Ebene soll zunächst ein neues Expressionssystem für die Hydrogenasegene (Struktur und Assemblierungsgene) etabliert werden, das die Effizienz der Wasserstoffproduktion in *Synechocystis* durch Überexpression des Enzyms steigert.
- Die Entwicklung einer Prozedur zur Isolierung der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* ist die Grundlage für die angestrebte Charakterisierung des Enzyms und daher der wichtigste Schritt in dieser Arbeit.
- Mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) und Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) soll dann das aktive Zentrum der Hydrogenase untersucht werden, um zum ersten Mal eine Vorstellung über die Anzahl der CO- und CN-Liganden am Eisen und über die verschiedenen Redoxzustände des aktiven Zentrums einer cyanobakteriellen Hydrogenase zu erlangen.
- Um Informationen über die Kinetik der H₂-Umsetzung zu erhalten, soll die Hydrogenase mittels Protein-Film-Elektrochemie untersucht werden. Diese Methode ermöglicht die Messung der katalytischen Aktivität von Redoxenzymen über ein breites Spektrum an elektrochemischen Potenzialen.
- Versuche zur Kristallisierung der Hydrogenase sollen dem langfristigen Ziel der Strukturaufklärung des Enzyms dienen.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Puffer und Nährmedien

Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ bzw. „reinst“, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Difco Laboratories (Detroit, USA), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Für molekularbiologische Arbeiten wurden zusätzlich Chemikalien der Firmen Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein), Eppendorf (Hamburg), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim) und Qiagen (Hilden) verwendet. Das Material für die Affinitätschromatographie wurde von der Firma IBA (Göttingen) bezogen. In dieser Arbeit verwendetes deionisiertes Wasser wurde mit einer Seradest-Anlage SD 2000 der Elga Labwater GmbH (Celle) erzeugt und im Folgenden als H₂O bezeichnet. Firmenbezeichnungen der verwendeten Geräte sind an den entsprechenden Stellen im Text benannt.

Puffer

ECL1:	2,6 µM Luminol, 400 µM p-Coumarsäure, 100 mM Tris (pH 8,5)
ECL2:	0,075 % (v/v) H ₂ O ₂ , 100 mM Tris (pH 8,5)
K _p _i -Puffer:	Gemisch aus 100 mM KH ₂ PO ₄ und 100 mM K ₂ HPO ₄ (Der pH-Wert wird durch das Mischungsverhältnis eingestellt.)
Puffer M:	15 mM NaCH ₃ COO, 15 mM MES, 15 mM HEPES, 15 mM TAPS, 15 mM CHES und 0,1 M NaCl
Nativ-Ladepuffer:	125 mM Tris (pH 8,3), 40 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
5 x Probenpuffer:	50 % (v/v) Glycerin, 50 % (v/v) 10 x Puffer TBE, 0,2 mg/ml Bromphenolblau
SDS-Ladepuffer:	10 % (w/v) SDS, 20 mM 1,4-Dithiothreitol, 20 % (w/v) Glycerin, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM Tris (pH 6,8)
Puffer E:	Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R:	Puffer W mit 1 mM 2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure (HABA)
Puffer T:	39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,0037 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Puffer TBE :	890 mM Tris (pH 8,3), 890 mM H ₃ BO ₃ , 25 mM Na ₂ EDTA
Puffer TE:	10 mM Tris, 1 mM Na ₂ EDTA (pH 8,0)
Puffer W:	100 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl
TBS:	20 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM NaCl
TTBS:	TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20

Nährmedien

LB-Medium: 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
BG-11-Medium: 17,6 mM NaNO₃, 0,304 mM MgSO₄ x 6 H₂O, 31,2 μM Zitronensäure, 2,79 μM Na₂EDTA, 46,3 μM H₃BO₃, 4,15 μM MnCl₂ x 4 H₂O, 1,61 μM NaMoO₄ x 2 H₂O, 188,7 μM NaCO₃, 175,1 μM K₂HPO₄, 0,77 μM ZnSO₄ x 7 H₂O, 10 mM TES (pH 8,0), 22,8 μM FeNH₄-Citrat, 0,32 μM CuSO₄ x 5 H₂O, 5 μM NiCl₂

Die Nährmedien wurden vor Gebrauch 20 min autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 15 g Bacto Agar/l Medium zugegeben. Nach Abkühlen auf mind. 50 °C erfolgte gegebenenfalls die Zugabe von Antibiotika.

4.2 Mikrobiologische und physiologische Methoden

4.2.1 Zellanzucht

Synechocystis sp. PCC 6803 Wildtyp wurde mit BG-11-Medium in 250 ml Röhren (Kniese-Apparatur, Marburg) oder in 10 Liter-Behältern unter kontinuierlicher Begasung mit Luft bei 50 - 150 μE m⁻² s⁻¹ und 28 °C kultiviert. Kleine Ansätze wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben bei 100 rpm (Kreisschüttler 3020, GFL-Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) mit 50 μE m⁻² s⁻¹ und bei 28 °C inkubiert. *Synechocystis* Mutanten wurden in BG-11-Medium angezogen, dem das mutantenspezifische Antibiotikum zugesetzt wurde (25 μg/ml Chloramphenicol, 5 μg/ml Gentamycin, 50 μg/ml Kanamycin). Die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) Mutanten erfolgte in LB-Medium bei 37 °C mit entsprechender Zugabe von Antibiotika (25 μg/ml Chloramphenicol, 10 μg/ml Gentamycin, 50 μg/ml Kanamycin). Flüssigkulturen wurden bei 180 rpm im Schüttelinkubator 4400 (Innova Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen) angezogen.

4.2.2 Reinheitskontrolle, Bestimmung der optischen Dichte

Die Reinheit der Bakterienkulturen wurde durch Vereinzlungen auf Agarplatten mit makroskopischer und mikroskopischer Kontrolle (Mikroskop 473011-9901, Zeiss West Germany, Oberkochen) gewährleistet. Die Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen erfolgte im UV-2501 PC Photometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) bei 600 nm (*E. coli*) bzw. 730 nm (*Synechocystis*). Als Leerwert diente das entsprechende sterile Medium. Proben, die eine größere OD als 0,3 aufwiesen, wurden zur erneuten Messung verdünnt.

4.2.3 Chlorophyllbestimmung

Für die Chlorophyllbestimmung wurde 1 ml Bakterienkultur mit einer OD₇₃₀ <0,5 bei 15700 x g für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Die Extraktion des Chlorophylls aus dem Zellpellet erfolgte durch Zugabe von 1 ml Methanol bei 4 °C über Nacht. Nach erneuter 10 min Zentrifugation bei 15700 x g wurde die Extinktion des

Überstands im Photometer UV-2501 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) bei 665, 665,5, 666, 666,5 und 750 nm gegen die Referenz Methanol gemessen. Um den Gehalt an Chlorophyll zu bestimmen, subtrahiert man den Streuungsfaktor bei 750 nm von der höchsten gemessenen Extinktion. Man erhält so die Absorption (A). Der molare Absorptionskoeffizient beträgt $\varepsilon = 0,0809$ (Lichtenthaler, 1987). Die Konzentration von Chlorophyll wird über das Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet (Kapitel 4.5.1). Der Chlorophyllgehalt diente als Bezugswert für die *in vivo* Aktivitätsbestimmung der Hydrogenase.

4.2.4 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden die *Synechocystis* Mutanten auf BG-11 Agarplatten bei 28 °C gehalten und ca. alle vier Wochen überimpft. *E. coli* Klone wurden auf LB-Agarplatten bei 4 °C gelagert und ca. alle zwei Monate überimpft. Außerdem wurden von allen wichtigen *Synechocystis* und *E. coli* Mutanten Gefrierkulturen bei -80 °C angelegt. Für diesen Zweck wurden in sterilen Reaktionsgefäßen 500 µl einer frisch gewachsenen Kultur mit 250 µl 80 % (v/v) Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Alle hitzestabilen Geräte, Materialien und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen autoklaviert (20 - 30 min bei 120 °C). Hitzelabile Lösungen wurden als Lösung sterilfiltriert (0,2 µm Filter, Sarstedt, Nümbrecht).

4.3.1 Plasmide und Stämme

Die zur Klonierung verwendeten Plasmide und *E. coli* Stämme sind in Tab. 4.1 aufgelistet.

Tab. 4.1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und *E. coli* Stämme

Plasmide/Stämme	Beschreibung	Referenz/Hersteller
pBlueGM	Quelle der Gm ^R	Wohlleben et al., 1989
pCR 2.1 TOPO	<i>lacZ</i> α pUC _{ori} Amp ^R Km ^R M13-Bindestellen, Klonier- und Sequenziervektor	Invitrogen, Karlsruhe
pCR XL TOPO	<i>P_{lac} lacZ</i> α <i>ccdB</i> pUC _{ori} Km ^R Zeo ^R M13-Bindestellen, Klonier- und Sequenziervektor	Invitrogen, Karlsruhe
pET22	Expressionsvektor <i>E. coli</i> mit <i>pelB</i> His(6)-tag <i>T7lac</i> Amp ^R	Novagen, Madison
pET26	Expressionsvektor <i>E. coli</i> mit <i>pelB</i> <i>T7lac</i> Km ^R	Novagen, Madison
pDH2	<i>Synechocystis</i> Expressionsvektor mit <i>psbAII</i> -Promotor und Cm ^R aus pKS-CAT Vektor	Hoffmann et al., 2006 Kunert et al., 2000
pHoxW	pGEM-T Vektor, der <i>hoxW</i> enthält	Hoffmann et al., 2006
DH5α (<i>E. coli</i>)	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	Invitrogen, Karlsruhe
Top10 (<i>E. coli</i>)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG λ</i> ⁻	Invitrogen, Karlsruhe
FTD164 (<i>E. coli</i>)	Hydrogenasefreier Stamm des NREL, National Renewable Energy Laboratory	NREL, Golden, USA

4.3.2 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 oder *Nostoc* sp. PCC 7120 wurden Zellen direkt von einer Agarplatte abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufbruch erfolgte in 100 µl Puffer TE mit 2 µl 10 % (w/v) SDS und 100 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) unter Verwendung von sterilen Glasperlen ($\varnothing = 0,17 - 0,18$ mm). Dabei wurde der Ansatz 3 x 10 s gemischt und anschließend bei 10620 x g zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg). Der wässrige nukleinsäurehaltige Überstand wurde abgenommen, mit dem vierfachen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und 5 min erneut bei 4 °C und 10620 x g zentrifugiert. Es bildeten sich drei Schichten. Die obere nukleinsäurehaltige Phase wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß erneut mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine weiße Interphase (denaturierte Proteine) mehr vorhanden war. Zur Fällung der DNA wurde die obere nukleinsäurehaltige Phase abgenommen und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) sowie 2,5-fachen Volumen 100%igem Ethanol (-20 °C) versetzt. Nach 2 h Inkubation bei -20 °C erfolgte eine 15 min Zentrifugation bei -9 °C und 17950 x g (Kühlzentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg). Die pelletierten Nukleinsäuren wurden zweimal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und 5 min bei 15700 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die DNA in Puffer TE über Nacht bei 4 °C gelöst.

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) dient der Amplifizierung von Nukleinsäureabschnitten. Voraussetzung für die Methode ist die Bildung kurzer doppelsträngiger DNA-Stücke mit freien 3'-OH-Enden durch die Hybridisierung (Annealing) von kurzen Oligonukleotiden (Primern) an denaturierte DNA-Stränge. Im nächsten Schritt verlängert eine Polymerase das doppelsträngige DNA-Fragment (Elongation). Nach erneuter Denaturierung können neue Primer an die einzelsträngige DNA binden und der Prozess wiederholt sich. Die PCR führt so zu einer exponentiellen Amplifizierung des DNA-Abschnitts.

Primersequenzen für PCR-Ansätze, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind in Tab. 4.2 dargestellt. Die Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt.

Tab. 4.2: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz 5' - 3'
Ana-hyp1	CATATGGCGACTGAGGAAATTTCG
Ana-hyp2	TAGCTAGTCGACGATTAAGGAAAACTGGTAC
E-in1	GGTTCGTGCCTTCATCCGTCGACTGATTGGGAGAGCCTAAACC
E-out1	TCTGAGCGATGAACTGAGAAAC
E-in2	TACCGCCACCTAACAAATTCGGTACCAGGATTTTCATATGACCGTTGCCAC
E-out2	AACTGTTACTTAACCAAGGTTG
Gm-1	GTCGACGGATGAAGGCACGAACC
Gm-2	GTCGACGAATTGTTAGGTGGCG
HoxF-in1	GAACTGCGGGTGGCTCCAGCTAGCGACTTTGAGTAATTCTTCATA
HoxF-out1	CTTTTTAGAAGGGGAAGCTA
HoxF-in2	GAGCCACCCGCAGTTCGAGAAATAGTTCGGATCCTTATCCACTCAGTTA
HoxF-out2	CAGTGGCTTGGATAAATTCT
HoxH-Sal	AGAGCCAGGAAGTCGACTGTTTAATCCCGCTGGATGGA
N-HoxE-28	TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGA
HoxH _{nested}	AAAACATAAGGCTATGGAAACCCGACAG
N-HoxE _{nested}	CTGAGCGATGAACTGAGAAACAAACGAGACA

Standard-PCR

Die Bedingungen und das Temperaturprogramm der Standard-PCR sind im Folgenden aufgeführt. Die Menge an eingesetztem Template variierte zwischen 2 ng - 100 ng DNA.

Ansätze für Standard-PCR mit *Taq*-Polymerase:

5,00 µl	10 x Puffer mit 500 mM KCl (Fermentas, St. Leon-Rot)
3,00 µl	MgCl ₂ (25 mM)
4,00 µl	dNTPs (2,5 mM)
5,00 µl	Primer forward (5 pmol/µl)
5,00 µl	Primer reverse (5 pmol/µl)
3,00 µl	DNA (x ng/µl)
0,50 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
ad 50,00 µl	H ₂ O

Da die *Taq*-Polymerase keine 3' - 5' Exonuklease Aktivität (proofreading) besitzt, aber eine hohe Prozessivität in 5' - 3' und die *Pfu*-Polymerase gegenteilige Eigenschaften aufweist, wurde für die Amplifizierung von langen DNA-Fragmenten (>3 kb) ein Gemisch aus beiden Enzymen verwendet. Zu einem Standard-PCR-Ansatz wurden 1,25 Unit *Taq*-Polymerase und 0,125 Unit *Pfu*-Polymerase gegeben. Die 50 µl PCR-Ansätze wurden in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) im Thermocycler (DNA-Engine-PTC-200, Bio-Rad, München) dem Temperatur-Programm aus Tabelle 4.3 unterzogen. Die gewählte Annealing-Temperatur richtet sich nach der Länge und Beschaffenheit der Primer. Üblicherweise wählt

man eine Temperatur, die 3 °C unter dem errechneten Schmelzpunkt der Primer liegt. Die Elongationszeit (x) hängt von der Länge des DNA-Fragments und der Prozessivität der verwendeten Polymerase ab. Um Verunreinigungen der PCR-Reaktionen durch verschleppte DNA zu vermeiden, wurden die verwendeten Reagenzien in kleinen Aliquots aufbewahrt. Außerdem wurde zur Kontrolle auf kontaminierende Lösungen ein Negativ-Ansatz ohne Template-Zugabe durchgeführt.

Tab. 4.3: Temperaturprogramm für Standard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Denaturierung	95	0,5
2. Denaturierung	95	1
3. Annealing [#]	50 - 60	1
4. Elongation	72	x
5. 30 - 40 Wiederholungen der Schritte 2 - 4		
6. abschließende Elongation	72	10

[#] Rate = 1 °C/s

Fusions-PCR

Im Zuge der Überexpression der Hydrogenase von *Synechocystis* in *E. coli* (Kapitel 4.3.11) wurde ein Konstrukt mit einem fusionierten Strep-tag (II) am C-Terminus von HoxF im *Synechocystis* *hox*-Operon erstellt. Für diesen Zweck wurde zunächst eine Fusions-PCR durchgeführt (verändert nach Shevchuk et al., 2004). Nach der Amplifizierung von zwei einzelnen PCR-Produkten (2,5 kb und 4,4 kb) mit den Primerpaaren (N-HoxE_{nested}/HoxF-in1) und (HoxF-in2 /HoxH_{nested}) erfolgte deren Fusion. Die Primer HoxF-in1 und HoxF-in2 enthalten jeweils Sequenzteile des Strep-tag (II) an ihren 5' Enden. In einem Bereich von 16 Basenpaaren überlappen sie miteinander (Abb. 4.1).

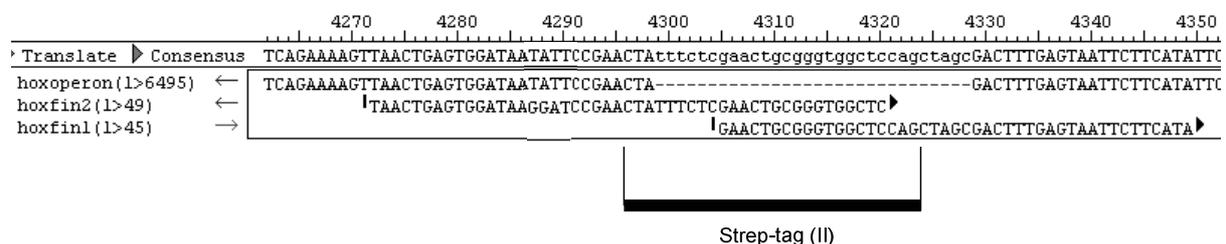


Abb. 4.1: Sequenzausschnitt der Insertion des Strep-tag (II) in das *hox*-Operon von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Darstellung der Überlappung der Primersequenzen HoxF-in1 und HoxF-in2 mit dem *hox*-Operon. Die Primer enthalten jeweils einen Teil der Strep-tag (II)-Sequenz.

Die beiden einzelnen PCR-Produkte hybridisierten an dieser komplementären Domäne während der Fusions-PCR und wurden mittels DNA-Polymerasen verlängert. Es wurde ein Gemisch aus 1,25 Unit *Taq*-Polymerase und 0,125 Unit *Pfu*-Polymerase verwendet. Die Fusions-PCR wurde mit dem in Tab. 4.4 dargestellten Temperaturprogramm durchgeführt.

Zur Fusion wurden insgesamt nicht weniger als 700 ng DNA verwendet, wobei die PCR-Produkte in äquimolaren Mengen eingesetzt wurden.

Tab. 4.4: Temperaturprogramm für Fusions-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Denaturierung	92	1
2. Denaturierung	92	0,5
3. Hybridisierung der PCR-Produkte [#]	52 - 62 (Gradient)	1
4. Elongation	68	21
5. 13 Wiederholungen der Schritte 2 - 4		
6. abschließende Elongation	68	21

[#] R = 1 °C/s

Reamplifizierung (Nested-PCR)

Das Fusionsprodukt wurde aus einem Agarosegel extrahiert (Kapitel 4.3.5) und als Template-DNA (10 ng) in einer Reamplifizierung verwendet. Für diese Reaktion wurde der Standard-PCR-Ansatz für die Amplifizierung von langen DNA-Fragmenten, unter Verwendung einer Mischung aus der *Pfu*-Polymerase und der *Taq*-Polymerase, durchgeführt. Die verwendeten Primer N-HoxE-28 und HoxH-Sal sind Nested Primer. Sie liegen ca. 100 bp innerhalb des Fusionsprodukts. Nested-Primer werden benötigt, da das 7,2 kb Amplifikat aus der Fusion unvollständig, also kürzer sein kann und damit die Originalprimer nicht zu einer erfolgreichen Reamplifizierung führen würden.

4.3.4 Agarosegelelektrophorese

In einer Agarose-Matrix bewegen sich DNA-Moleküle im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Außerdem hängt die Wanderung der DNA-Stücke von der angelegten Spannung, den Pufferbedingungen sowie der Agarosekonzentration ab. Die DNA-Konzentration und -Größe wurde visuell anhand der Intensität und Lage der Banden im Agarosegel abgeschätzt. Zur Kalibrierung der Laufstrecke und der Konzentration diente der Längenstandard, Lambda DNA/HindIII Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Agarose wurde in Abhängigkeit der zu untersuchenden Fragmentgrößen, in der Regel 0,8 % (w/v) in Puffer TBE angesetzt, welcher gleichzeitig als Elektrophoresepuffer in der Gelkammer (Biozym, Hess. Oldendorf) diente. Zu dem Puffer wurden 0,0001 % (w/v) Ethidiumbromid oder 0,0012 mg/ml Kristallviolett gegeben. DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5 x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm Laufstrecke (High Voltage Power Pack P30 Spannungsquelle, Biometra, Göttingen). Zur Detektion der DNA-Banden wurden die Gele mit einem UV-Transilluminator (TF 20 M Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich) bestrahlt und mit einer Videodokumentationsanlage (Alpha Imager 2200, Biozym, Hess. Oldendorf) ausgewertet.

4.3.5 Gelextraktion

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des High Pure PCR Product Purification Kits (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Bei Fragmenten, die eine Größe von 3 kb überschritten, wurde die DNA in der Regel mit Kristallviolett anstelle von Ethidiumbromid im Agarosegel sichtbar gemacht und anschließend entsprechend der Angaben des TOPO XL PCR Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) extrahiert. Zur Elution der DNA von den verwendeten Säulen wurde anstelle des Elutionspuffers H₂O verwendet.

4.3.6 Enzymatische DNA-Modifikationen

Restriktion von DNA

Zur sequenzspezifischen Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden verschiedene Typ II Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Eine Unit eines Restriktionsenzym wurde für die Spaltung von 1 µg DNA in mindestens 10 µl Gesamtvolumen verwendet.

Dephosphorylierung

Zur Vermeidung von Religationen geschnittener Vektoren während der Ligation mit DNA-Fragmenten wurden die 5'-Phosphat-Gruppen der DNA-Fragmente mit Hilfe der Shrimp Alkaline Phosphatase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gemäß Herstellerangaben abgespalten. Dabei wurde 0,1 Unit des Enzyms pro picomol DNA zugegeben und dieser Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch Hitze inaktiviert (15 min bei 65 °C).

Konstruktion von glatten (blunt end) DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten, die mit unterschiedlichen Endonukleasen geschnitten worden sind, wurden die überhängenden 5'-DNA-Enden mittels Klenow Fragment (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgefüllt. Bei dem Klenow Fragment handelt es sich um die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Das Enzym besitzt 5' - 3' Polymeraseaktivität und 3' - 5' Exonukleaseaktivität. Gemäß Herstellerangaben wurde 1 µg DNA mit 1 Unit Klenow-Polymerase und 0,125 mM dNTPs 10 min bei 37 °C in entsprechendem Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitze gestoppt (10 min bei 75 °C).

Adenylierung

Blunt end DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen, die mit der *Pfu*-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) synthetisiert wurden, mussten vor der Ligation mit TOPO-Vektoren polyadenyliert werden. Zu diesem Zweck wurde nach der PCR die *Pfu*-Polymerase inaktiviert, um deren 3' - 5' Exonuklease Aktivität zu zerstören. Für die Adenylierung wurde der PCR-Ansatz anschließend mit 1,25 Unit *Taq*-Polymerase, 3 µl dNTPs (2,5 mM) versetzt und 15 min bei 72 °C inkubiert.

4.3.7 Ligation

Die Ligation von PCR-Produkten mit einer Größe von bis zu 3 kb in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits entsprechend der Herstellerangaben (viertel Ansätze). Für die Klonierung von PCR-Produkten, größer als 3 kb, wurde entweder der pCR XL TOPO Vektor des TOPO XL PCR Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet oder der pCR2.1-TOPO Vektor mit abweichenden Bedingungen gewählt. Die abweichenden Bedingungen für die Klonierung großer Inserts waren wie folgt: Das molekulare Verhältnis von Insert:Vektor betrug 1:1. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von H₂O und 3,7 µl MgCl₂ auf ein Volumen von 20 µl erhöht und die Inkubationszeit wurde auf 24 h bei Raumtemperatur verlängert.

Für die Ligation von DNA in den *Synechocystis* Expressionsvektor pDH2 wurde die DNA im molekularen Verhältnis von 1:1 oder 1:3 zum Vektor [50 oder 100 ng] unter Zugabe von 0,1 Volumen 10 x Ligations-Puffer und 1 µl T4 Ligase (5 U/µl) (MBI Fermentas, St. Leon Rot) in einem Gesamtvolumen von 10 oder 20 µl gegeben. Bei der Ligation von glatten DNA-Fragmenten wurde der Reaktion 10 % (v/v) Polyethylenglycol (PEG) zugeführt. Die Ligation erfolgte im Thermocycler (MJ Research PTC-150 Mini Cycler, Watson, USA). Die Ansätze wurden zunächst 30 s bei 10 °C inkubiert. Es folgte eine Erhöhung der Temperatur von 0,13 °C/s auf 20 °C. Nach 30 s bei 30 °C wurde die Temperatur auf -20 °C gesenkt (0,13 °C/Sek). Der gesamte Zyklus wurde 160-mal durchlaufen, bevor die Ligase 20 min bei 65 °C inaktiviert wurde.

4.3.8 Plasmidpräparation

Plasmide aus *E. coli* wurden mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Zur Elution der DNA von den verwendeten Säulen wurde anstelle des Elutionspuffers H₂O verwendet.

4.3.9 Herstellung kompetenter Zellen

100 ml LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von DH5α *E. coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) oder FTD164 *E. coli* Zellen (NREL, National Renewable Energy Laboratory, Golden, USA) angeimpft und bei 37 °C, 180 rpm im Schüttelinkubator (4400 Innova Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Nürtingen) bis zu einer OD₄₅₀ von 0,6 angezogen. Um das Wachstum der Zellen zu stoppen, wurde die Kultur anschließend 45 min auf Eis geschüttelt und in zweimal 50 ml geteilt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 3210 x g. Die erhaltenen Pellets wurden durch Zugabe von 0,1 molarer MgCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend 30 min auf Eis geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation von 5 min bei 4 °C und 3210 x g wurde das Pellet in 1,44 ml 100%igem (v/v) Glycerin und 8,66 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

4.3.10 Transformation

Transformation von *E. coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte in TOP 10 Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben (halbe Ansätze) oder in kompetente DH5 α *E. coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) sowie kompetente FTD164 *E. coli* Zellen (NREL, National Renewable Energy Laboratory, Golden, USA) nach folgendem Protokoll: 2,5 - 50 ng Plasmid-DNA wurden mit 200 μ l kompetenten Zellen versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Zellen für 2 min erneut auf Eis gesetzt. Es folgte die sterile Zugabe von 900 μ l LB-Medium. Anschließend wurden die Ansätze 1 h bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator bei 180 rpm geschüttelt. Danach erfolgte das Ausplattieren von 300 μ l der Suspension auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum und eine Inkubation über Nacht im Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C.

Transformation von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis ist unter physiologischen Bedingungen spontan in der Lage, durch homologe Rekombination, fremde DNA in das eigene Genom zu integrieren (Grigorieva und Shestakow, 1982; Williams, 1988). Während der exponentiellen Wachstumsphase ist die Effizienz der Transformation etwa doppelt so hoch im Vergleich zu anderen Phasen (Zang et al., 2007). Aus diesem Grund wurden Zellen in diesem Zustand verwendet. 250 ml Kulturröhren wurden aus einer Vorkultur auf eine OD₇₃₀ von 0,03 angeimpft. Nach drei Tagen wurde diese Kultur als Inokulum für einen neuen 250 ml Ansatz mit einer OD₇₃₀ von 0,15 verwendet. Nach 24 h wurden 125 ml des Ansatzes zentrifugiert (10 min bei 3200 x g) und das Zellpellet in 300 μ l BG-11-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 6 - 18 μ g DNA erfolgte eine vierstündige Inkubation im Dunkeln bei 30 °C. Die Suspension wurde jede halbe Stunde kurz geschwenkt. 90 μ l der Probe wurden dann auf BG-11-Agarplatten mit autoklavierten Nitrocellulosefiltern ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 28 °C und 50 μ E m⁻² s⁻¹ wurden die Filter auf BG-11-Platten mit entsprechenden Antibiotika umgebettet. Es bildeten sich Einzelkolonien, die auf Platten ohne Filter übertragen wurden. *Synechocystis* besitzt ca. 12 Kopien seines Genoms in einer Zelle (Labarre et al., 1989). Zur Segregation wurden die Einzelkolonien sechs- bis achtmal neu ausplattiert und der Grad der Segregation mittels PCR überprüft.

4.3.11 Überexpression in *E. coli*

Zur Überexpression der cyanobakteriellen [NiFe] Hydrogenase in *E. coli* wurde das pET-System (Novagen, Madison, USA) verwendet. Der in diesem System verwendete starke T7-Promotor ermöglicht eine hohe Überexpression des Zielproteins mit bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge (Herstellerangabe).

Das *hyp*-Operon aus *Nostoc* sp. PCC 7120 wurde mit den Primern Ana-hyp1 und Ana-hyp2, die die Schnittstellen *NdeI* und *SalI* aufweisen, amplifiziert und in den pCR2.1 TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Das *hyp*-Fragment konnte über den Verdau mit *NdeI* und *SalI* anschließend in den Expressionsvektor pET22 (Novagen, Madison, USA) kloniert werden.

Das *hoxW*-Gen, welches vermutlich für die Hydrogenase spezifische Endopeptidase kodiert, wurde mittels *NdeI* und *BamHI* aus dem pHoxW Vektor (Hoffmann et al., 2006) geschnitten und in den pET26 Vektor (Novagen, Madison, USA) kloniert.

Die Ligation des *hox*-Operons aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit fusioniertem Strep-tag (II) (Kapitel 4.3.3) erfolgte über die Schnittstellen *XbaI* und *SalI* in den pET26 Vektor. Außerdem wurde die ursprünglich im Vektor vorhandene Kanamycin-Kassette gegen eine Gentamycin-Kassette ausgetauscht, weil der pET26 Vektor mit Kanamycin Resistenz bereits für das Überexpressionskonstrukt von *hoxW* genutzt worden war. Über einen Restriktionsverdau mit *DraIII* und *ClaI* wurde die Kanamycin-Kassette aus dem Vektor entfernt. Die Enden des geschnittenen Vektors wurden mit dem Klenow-Fragment geglättet. Anschließend erfolgte eine blunt-end-Klonierung mit einer Gentamycin-Kassette aus dem Vektor pBlueGM (Wohlleben et al., 1989). Diese war zuvor mit dem Enzym *SalI* aus dem Vektor geschnitten und mit dem Klenow-Fragment inkubiert worden.

Zur Überprüfung der Klonierung wurden alle pET-Konstrukte in DH5 α -Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert und sequenziert. Es folgte nacheinander die Transformation der pET-Konstrukte in FTD164 *E. coli* Zellen (NREL, National Renewable Energy Laboratory, Golden, USA), die zwischen den einzelnen Transformationen kompetent gemacht wurden. FTD164 Zellen sind frei von Hydrogenasen. Die Anzucht der FTD164 Mutanten erfolgte über Nacht in 3 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (37 °C, 180 rpm). Die Kulturen wurden am folgenden Tag als Inokulum für 50 ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika und 500 μ M NiCl₂) verwendet. Bei 37 °C und 180 rpm wuchsen die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Dann erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Nach 0, 1, 3 und 18 h wurden Zellproben entnommen und analysiert.

4.3.12 Sequenzierung

Zur Überprüfung aller Klonierungen in dieser Arbeit erfolgte die Plasmid-Sequenzierung an einem Plattensequenzierer mit 96 Kapillarenkopf (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems Foster City, USA) nichtradioaktiv entsprechend des Prinzips der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977) durch das Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) in Kiel.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Zellaufbruch

Glasperlen

Zur Präparation von Gesamtmembranen und cytosolischen Extrakten wurden 250 ml Kulturen von *Synechocystis* Wildtyp und Mutanten 10 min bei 20 °C und 3200 x g zentrifugiert (Centrikon T-124, Kontron Instruments, Watford, UK). Die Zellpellets wurden in 2 ml Puffer W resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (2 min bei 15700 x g, Zentrifuge 5414, Eppendorf, Hamburg). Nach Aufnahme der Pellets in 450 µl Puffer W wurden so viele Glasperlen ($\varnothing = 0,17 - 0,18$ mm) dazugegeben, bis die Zellsuspensionen noch ca. 2 mm über den Glasperlen stand. Anschließend wurde 3 x 2 min und 1 x 1 min geschüttelt. Zwischendurch wurden die Proben jeweils 1 min auf Eis gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 876 x g (Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg), um die Glasperlen zu sedimentieren. Die Überstände wurden in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 15 min bei 4 °C zentrifugiert (2000 x g). Durch diesen Schritt wurden die zellfreien cytosolischen Proteine (Überstand) von der Membranfraktion (Pellet) getrennt. Die Membranfraktion konnte in Puffer W resuspendiert werden. Sowohl die cytosolischen Proteine als auch die Membranfraktion wurden, falls erforderlich, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

French-Press

Für die Isolierung der [NiFe] Hydrogenase erfolgte die Anzucht der entsprechenden *Synechocystis* Mutante im 10 Liter-Maßstab. Zur Zellernte wurden die Kulturen in 1 Liter-Zentrifugenbehältern 20 min bei 20 °C und 5000 x g zentrifugiert (Avanti J-26 XP Zentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld). Nach Waschen und Resuspendieren der Pellets in Puffer W wurden die Zellen mittels dreimaliger Passage durch eine gekühlte French-Press Zelle (SLM-Aminco, USA) bei 20000 psi aufgebrochen. Die Überprüfung der Qualität des Zellaufbruchs erfolgte exemplarisch im Mikroskop (Mikroskop 473011-9901, Zeiss West Germany, Oberkochen). Um den zellfreien cytosolischen Extrakt zu erhalten, wurde anschließend bei 45000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert (Optima L-90K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld). Nach Aliquotieren und Einfrieren des Überstands in flüssigem Stickstoff wurde der Extrakt bei -80 °C gelagert. Das Membranpellet konnte nach Resuspendieren mit Puffer W ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert werden.

Ultraschall

E. coli Zellen aus der Überexpression (Kapitel 4.3.11) wurden in 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym, 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0) resuspendiert und 30 min auf Eis

inkubiert. Ebenfalls auf Eis erfolgte dann über eine MS 72 Mikrospritze eine Behandlung mit Ultraschall: 3 min Puls und 70 % Leistung (Sonopuls HD 2070 Ultraschall-Homogenisator, Bandelin, Berlin). Nach einer 30 min Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g (Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) befanden sich die löslichen Proteine im Überstand.

4.4.2 Isolierung von Thylakoid- und Plasmamembran

Die separate Isolierung der Thylakoid- und der Plasmamembran aus *Synechocystis* Mutanten mittels Dichtegradientenzentrifugation erfolgte ausgehend von der Gesamtmembranfraktion, die aus dem Glasperlen- bzw. French-Press-Aufbruch erhalten wurde (Kapitel 4.4.1). 7,5 ml dieser Membranfraktion wurden mit 7,5 ml 90 % (w/v) Saccharoselösung versetzt. Anschließend wurde ein Saccharosegradient präpariert (nach Murata und Omata, 1983). Dazu wurden die 15 ml Membranfraktion mit 10 ml 39 %, 3 ml 30 % und 8 ml 10 % (w/v) Saccharoselösung überschichtet. Bei 4 °C und 100000 x g erfolgte die Zentrifugation des Gradienten über Nacht (Optima L-90K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter; Rotor TFT 28.38, Kontron, München). Es bildeten sich unter anderem eine orangefarbene und eine grüne Schicht, die entsprechend aus Plasmamembranen bzw. Thylakoidmembranen bestanden. Mit einer langen Glaspipette wurde vorsichtig aus der Mitte der jeweiligen Schicht Material entnommen, getrennt mit Puffer W verdünnt und 1 h bei 120000 x g zentrifugiert (Optima L-90K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter; Rotor TFT 70.38, Kontron, München). Die pelletierten Membranen waren anschließend frei von Saccharose. Die Plasmamembran wurde in 200 µl und die Thylakoidmembran in 500 µl Puffer W resuspendiert.

4.4.3 Isolierung der Hydrogenase

Ammoniumsulfatfällung und Affinitätschromatographie

Alle Isolierungsschritte wurden bei 6 °C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Der zellfreie cytosolische Extrakt (Kapitel 4.4.1) wurde zunächst einer 20%igen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung unterzogen. Die Konzentration wurde durch langsames Zutropfen von gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung unter ständigem Rühren eingestellt. Zur vollständigen Equilibrierung folgte eine 30 min Inkubation ebenfalls unter stetigem Rühren. Anschließend wurde 30 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde auf eine 1 bzw. 5 ml Strep-Tactin Sepharose Säule (IBA, Göttingen) aufgetragen. Gemäß der Schwerkraft stellte sich eine konstante Flussrate durch die Affinitätschromatographie-Säule ein. Ungebundene Proteine wurden durch fünfmaliges Waschen mit jeweils einem Säulenvolumen des Puffer W entfernt. Die Elution der rekombinanten Hydrogenase mit dem fusionierten Strep-tag (II) erfolgte in sechs Fraktionen durch Zugabe von jeweils einem halben Säulenvolumen Puffer E. Nach vier Regenerationsläufen mit fünf Säulenvolumen Puffer R konnte die Säule erneut verwendet werden.

Für alle folgenden Analysen war es notwendig, die Konzentration der Hydrogenase zu erhöhen. Dies erfolgte durch eine Zentrifugation der entsprechenden Elutionsfraktion(en) bei $3500 \times g$ (Kühlzentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) mit 10 kDa bzw. 30 kDa Zentrifugenfiltern (Amicon Ultra 4 bzw. 0,5 Millipore, Eschborn). Im Falle der Kristallisierungsexperimente wurde mit Vivaspin 500 Zentrifugenfiltern 10 kDa (Sartorius, Göttingen) bei $3013 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert.

Gelfiltration

Für die Gelfiltration wurde eine HiLoadTM 16/60 SuperdexTM 200 prepgrade Säule (GE Healthcare, München) mit einer Höhe von 60 cm und einem Durchmesser von 1,6 cm (Säulenvolumen $V_t = 120,6 \text{ ml}$) verwendet. Superdex 200 Säulen ermöglichen eine sehr gute Auflösung von Peptiden und Proteinen mit einer Molekularmasse von 100 - 600 kDa. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Puffer W equilibriert. Nach Applikation der aus der Affinitätschromatographie isolierten Hydrogenase, mit einer Konzentration von 6,5 mg/ml, erfolgte der Säulenlauf bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Enzymaktivität und Proteingehalt untersucht.

Die Gelfiltration diente außerdem dazu, das Molekulargewicht des nativen Hydrogenase-Komplexes zu bestimmen. Für diesen Zweck wurde die Säule vor der Anwendung kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte unter denselben Bedingungen wie die Reinigungsprozedur. Verwendet wurden das High und Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare, München).

Anionen-Austausch-Chromatographie

Die Hydrogenase-haltigen Fraktionen aus der Gelfiltration wurden mit Vivaspin 500 Zentrifugenfiltern 10 kDa (Sartorius, Göttingen) bei $3013 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ so lange zentrifugiert, bis eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml erreicht war. 100 μg Protein wurde anschließend zur weiteren Reinigung der Hydrogenase auf eine MonoQ 5/50 Säule (GE Healthcare, München) mit einer Höhe von 5 cm und einem Durchmesser von 0,5 cm (Säulenvolumen $V_t = 1 \text{ ml}$) appliziert. Die Säule war zuvor mit zwei Säulenvolumen eines 20 mM MES (pH 6,5) Puffers equilibriert worden. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Eluiert wurde in einem linear ansteigenden Gradienten (0 - 1 M NaCl in 20 min) durch Zugabe von 1M NaCl, 20 mM MES (pH 6,5).

4.4.4 Aktivitätsmessungen

H₂-Produktion

Die H₂-Produktionsrate wurde nach Wang et al. (1971) in einer Clark-ähnlichen Silber-Platin-Elektrode (DW 1 Liquid Clark Electrode; Hansatech-Instruments, Norfolk, UK) bei einer Polarisationsspannung von -600 mV gemessen. Der Elektronenfluss zwischen der Pt-Anode

und der Ag/AgCl-Kathode wurde durch gesättigte KCl-Lösung gewährleistet. Der Probenraum wurde auf 30 °C temperiert und stand über einer Teflonmembran (Standard Membrane Kit, YSI, Yellow Springs Instrument, USA) mit der Elektrode in Verbindung. In Gegenwart von 5 mM Methylviologen als Elektronendonator und von 10 mM Natriumdithionit zur Anaerobisierung und Reduktion des Methylviologens erfolgte die Aktivierung der Hydrogenase.

H₂-Aufnahme

Die Hydrogenaseaktivität wurde photometrisch anhand der Reduktion von Methylviologen durch H₂ gemessen. In einer mit einem Septum verschlossenen Küvette wurden 2 mM Methylviologen in 1 ml Puffer W (zuvor im Niedrigvakuum entgast) in einer anaeroben Kammer 20 min mit H₂ begast. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe der Hydrogenase und es wurde die Änderung der Absorption bei 604 nm verfolgt.

4.4.5 Quantitative Proteinbestimmungen

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der im Folgenden dargestellten Methoden ermittelt, um vergleichende Aussagen treffen zu können.

Coomassie Blau nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde semi quantitativ mit Coomassie Blau ermittelt (nach Bradford, 1976). Verwendet wurde ein den Farbstoff enthaltendes Reagenz (Roti-Nanoquant, Carl-Roth, Karlsruhe). Durch Bindung von Coomassie Blau in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Extinktionsänderung bei 595 nm, welche photometrisch nachvollzogen wurde. Die Kalibrierung erfolgte als Doppelbestimmung. In sieben Stufen wurde eine Konzentrationsreihe von 2 - 20 µg/ml Rinderserum Albumin (Bovine Serum Albumin, BSA) erstellt und jeweils mit 200 µl des Bradford-Reagenz versetzt. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln erfolgte die Auswertung am Photometer (UV-2501 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan). Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit einer Konzentration eingesetzt, die innerhalb des Kalibrierungsbereichs lag.

Rose Bengal

Die Proteinprobe (1 - 5 µg) wurde mit 2 ml 10 mM KH₂PO₄ (pH 6,8) und mit 0,1 ml Rose Bengal Lösung (1 mg/ml) versetzt. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 0,1 ml 50 % (v/v) Eisessig. Durch die Bindung von anionischem Rose Bengal an die Proteine konnte eine Absorptionsänderung bei 560 nm gemessen werden. Die Methode ist modifiziert nach Elliott und Brewer (1978). Die Kalibrierung erfolgte als Doppelbestimmung in fünf Stufen mit einer Konzentrationsreihe von 1 - 10 µg/ml Rinderserum Albumin (Bovine Serum Albumin, BSA).

4.4.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Denaturierende Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte als diskontinuierliche Elektrophorese nach Schägger und von Jagow (1987) in einem Tricin-SDS Gel mit 0,1 % (w/v) SDS, 13,3 % H₂O und 1 M Tris (pH 8,5). Eine Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid wurde im Verhältnis 37,5:1 (Rotiphorese Gel 30, Carl-Roth, Karlsruhe) eingesetzt. Die Konzentration des Acrylamids betrug 4 % für das Tricin-Sammelgel und 10 % bzw. 16,5 % für das Tricin-Trenngel. Zum Polymerisieren wurden 0,03 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 0,03 % (v/v) Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben. In vertikalen Gelkammern (Multigel Long System bzw. Maxigel System, Biometra, Göttingen) wurden Midigele (11 cm x 12 cm x 0,1 cm) bzw. Maxigele (17 cm x 18 cm x 0,1 cm) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 7 - 30 mA (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen) in dem Kathodenpuffer (100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS) und dem Anodenpuffer (200 mM Tris (pH 8,9)).

Vor dem Beladen des Gels wurde jede Proteinprobe im Verhältnis 1:1 mit SDS-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert (TS-100 Thermo-Shaker, Peqlab, Erlangen). Die Kalibrierung der Laufstrecke erfolgte mit dem PageRuler™ Prestained Protein, 10 - 130 kDa (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Zur Visualisierung der Proteinbanden im Gel wurde die Methode der Coomassie oder Silberfärbung (Kapitel 4.4.8) angewendet.

Native Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen in Polyacrylamid unter nativen Bedingungen (ohne SDS) erfolgte in Polyacrylamid-Gradienten (5 - 12,5 %) bei 6 °C. Dabei wurde die Methode der „Clear Native“ Gele nach Wittig und Schägger (2005) verwendet.

Die Methode der „Clear Native“ Gele verwendet keine externen Ladungsträger, die sich vor der Elektrophorese an Proteine anlagern. Aus diesem Grund eignet sich die Methode nur für die Trennung von Proteinen, die einen niedrigeren isoelektrischen Punkt als der pH-Wert des Gels und des Puffers besitzen. Ein Vorteil der „Clear Native“ Gele gegenüber nativen Gelen mit externen Ladungsträgern ist, dass sie milder sind und sich sehr gut eignen, um den physiologischen Zusammenhalt von Protein-Komplexen zu bewahren (Wittig et al., 2007).

Das Sammelgel bestand aus 4 % Acrylamid. Als Trenngel wurde ein Polyacrylamid-Gradient (5 - 12,5 %) mit zusätzlichem Glycerin-Gradienten (5 - 20 % v/v) verwendet. Sowohl Sammelgel als auch Trenngel beinhalten weiterhin 50 mM BisTris (pH 7,0). Zum Polymerisieren wurden 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat und 0,2 % (v/v) TEMED verwendet. Eine Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid wurde im Verhältnis 48:1,5 eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 7 - 30 mA (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen) in dem Kathodenpuffer (7,5 mM Imidazol (pH 7,0), 50 mM Tricin) und dem

Anodenpuffer (200 mM Imidazol (pH 7,0)). Die Proteinproben wurden vor dem Gelauftrag mit 1/5 Volumen Nativ-Ladepuffer versetzt. Die Kalibrierung der Laufstrecke erfolgte mit dem HMW Native Marker Kit, 66 - 669 kDa (GE Healthcare, München). Zur Visualisierung der Proteinbanden im Gel wurde die Methode der Coomassie oder Silberfärbung (Kapitel 4.4.8) angewendet.

4.4.7 Western Blot-Analysen

Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Gel über eine Elektrophorese (Kapitel 4.4.6) getrennt, im Puffer T equilibriert und anschließend auf eine Nitrocellulose Membran (Porablot, Macherey-Nagel, Düren) in der Blot-Apparatur (Fast Blot B34, Biometra, Göttingen) bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Membran in 30 min transferiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper mit der Membran zu vermeiden, erfolgte nach kurzem Waschen in TBS eine einstündige Vorinkubation der Membran bei Raumtemperatur in TBS mit 5 % (w/v) Block-Reagenz (blotting grade blocker non-fat dry milk, Bio-Rad, München). Im Falle des Strep-tag (II) Antikörpers wurde mit 3 % (w/v) biotinfreiem Rinderserumalbumin in TBS vorinkubiert. Wiederholtes Waschen mit TTBS diente dem Entfernen überschüssigen Block-Reagenzes. Die Inkubation der Antikörper gegen HoxF (1:1000) und HoxH (1:100) (Appel et al., 2000) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie einem Antikörper gegen HypD (1:500) (Jones et al., 2004) aus *Ralstonia eutropha* erfolgte über Nacht in TTBS mit 1 % (w/v) Blockreagenz. Der Antikörper Anti-Strep-tag (II) (IBA, Göttingen) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurde 5 x 5 min mit TTBS gewaschen, bevor die Membran 2 h mit sekundärem Antikörper Anti-Kaninchen Ig-HRP, 1:10000 (GE Healthcare, München) in TTBS mit 1 % (w/v) Blockreagenz inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte nach erneuten Waschschritten mit TTBS und abschließend mit TBS über die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase). Zu diesem Zweck wurde die Membran mit den Lösungen ECL1 und ECL2 gleichzeitig für ca. 5 min bedeckt. Die Oxidation von Luminol mit Wasserstoffperoxid wird durch die Meerrettich Peroxidase katalysiert und durch p-Coumarsiure verstärkt. Bei dieser Reaktion kommt es über einen angeregten Zustand des Luminols zur verstärkten Chemilumineszenz (ECL, enhanced chemiluminescence), die auf einem Detektionsfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, München) abgelichtet wurde.

4.4.8 Proteinfärbungen mit Coomassie und Silbernitrat

Proteine wurden in Gelen entweder mittels Coomassie- oder Silberfärbungen sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze der Färbung mit Coomassie Blau liegt bei ca. 50 - 100 ng. Bei der Silberfärbung bilden Ag⁺-Ionen Komplexe mit Aspartat-, Glutamat- und Cysteinresten. Durch Reduktion entsteht elementares Silber. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 5 ng. Da die beiden Methoden Proteine in Abhängigkeit ihrer Beschaffenheit färben, eignen sie sich nicht zur Quantifizierung von Proteinen.

Coomassiefärbung

Die Proteingele wurden in einer Lösung, bestehend aus 0,8 % (w/v) Coomassie Blau G-250, 10 % (v/v) Essigsäure und 45 % (v/v) Methanol gefärbt. Bis zur Entfärbung des Hintergrunds wurden die Gele anschließend in 10 % (v/v) Essigsäure und 25 % (v/v) Methanol ohne Farbreagenz gewaschen.

Silberfärbung

Nach Blum et al. (1987) wurden die Gele 1,5 h in 30 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Eisessig fixiert. Es folgten zwei Waschstreps je 15 min in 20 % (v/v) Ethanol und in H₂O. Die Proteine im Gel wurden anschließend durch 0,02 % Na₂S₂O₃ (w/v) für 1,5 min reduziert. Vor und nach der 30 min Inkubation in 0,2 % AgNO₃ (w/v) wurde je 2 x 20 s in H₂O gewaschen. Die Entwicklung der Proteinbanden erfolgte in einer Lösung aus 3 % (w/v) Na₂CO₃, 0,07 % (v/v) CH₂O und 1 % (w/v) Na₂S₂O₃. Die Reaktion wurde durch eine 1 min Inkubation in 400 mM Tris und 25 % (v/v) Essigsäure gestoppt.

4.4.9 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde mit einem fertigen Gel (PhastGel IEF 3 - 9) in einem PhastSystemTM (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das homogene Polyacrylamid-Gel enthält 2 - 6 % Trägerampholyte (PharmalyteTM), die einen stabilen, linearen pH-Gradienten aufbauen. Die Kalibrierung erfolgte mit dem Isoelectric focusing calibration Kit (broad pI Kit, pH 3 - 10) von GE Healthcare.

4.4.10 N-terminale Sequenzierung nach Edman

Die Analyse wurde von der WITA GmbH, Berlin, durchgeführt. Die Firma verwendete 3 µl einer Proteinprobe mit einer Konzentration von 300 pmol/µl (ermittelt mit Bradford) und verdünnte diese mit 7 µl H₂O. Es folgte das Fällern der Proteine mit 100 µl Ethanol (1 h bei -80 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 µl Trifluoressigsäure aufgenommen. Anschließend erfolgte das Auftragen der Proteinprobe auf eine mit Biobrene vorbehandelte Glasfasermembran. Die Probe wurde dann im N₂-Strom getrocknet und im Procise 492 Edman Micro Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) automatisch sequenziert. Die Sequenzierung diente zur Identifizierung der Hydrogenase-Untereinheiten sowie zur Konzentrationsbestimmung.

4.4.11 Massenspektrometrie

Die Untereinheiten der isolierten Hydrogenase aus *Synechocystis* wurden in einem 10 bzw. 16,5%igen Tricin-SDS Gel (Kapitel 4.4.6) über eine Elektrophorese getrennt, Silber gefärbt (Kapitel 4.4.8), ausgeschnitten und anschließend per MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight-Mass Spectrometry) oder LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry) analysiert.

MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS-Analyse der Hydrogenase-Untereinheiten wurde von der PLANTON GmbH, Kiel, durchgeführt. Zunächst wurden die Proteinproben entfärbt, reduziert und alkyliert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Trypsin. Für die Messungen an einem Voyager-DE-STR Massenspektrometer (Applied Biosystems, Forster City, USA) wurden die Peptide in eine α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure-Matrix eingebettet. Die Trypsin-Hydrolyse wurde mit einem Kontrollprotein und einer anschließenden Messung überprüft. Es wurde mit einem externen und internen Massenstandard zwischen 1000 - 5500 Da kalibriert (Sequazyme Peptide Mass Standard kit, Applied Biosystems). Alle Qualitätskriterien waren erfüllt. Die Identifizierung der Proteine aufgrund der erhaltenen MS-Daten erfolgte über das Protein Prospectors MS-Fit Program (University of California, San Francisco, USA) und der Mascot-Such-Maschine (Version 2.0, Matrix Science Ltd.).

LC-ESI-MS/MS

Die Verbindung von Flüssigkeitschromatographie (LC, liquid chromatography) und Massenspektrometrie (MS) erweist sich als besonders geeignet zur Identifizierung von Proteinen geringer Konzentration. Nach einem proteolytischen Verdau der Proteine werden die entstandenen Peptide mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie nach ihren chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften getrennt. Die eluierenden Peptide können direkt ionisiert (ESI, Elektrospray-Ionisierung) und kontinuierlich, idealerweise immer ein Peptid nach dem anderen, an das Massenspektrometer übergeben werden.

Die Analyse wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eva-Mai Aro an der Universität Turku, Finnland, durchgeführt. Die Untereinheiten der Hydrogenase sowie koeluierende Proteine wurden mit einem nanoESI-qTOF (QSTAR Elite, Applied Biosystems, Foster City, USA), der an ein Ultimate 3000 LC System (Dionex, Sunnyvale, USA) gekoppelt war, analysiert. Die verdauten Peptide wurden in einem 20 min Gradienten von der Säule eluiert. Zur Datenbank-Recherche wurde eine hausinterne Mascot-Datenbank gegen *Synechocystis* sp. PCC 6803 verwendet, die die häufigsten Verunreinigungen beinhaltet. Die MS/MS-Methode ermöglichte alle 5 s eine Fragmentierung von zwei, quantitativ am stärksten vorkommenden, eluierenden Peptiden. Dies führte zur Bestimmung der Aminosäuresequenz der Peptide und nicht, wie bei MALDI-MS, zur Identifizierung der Masse.

4.5 Spektroskopische Methoden

Die Methoden der Spektroskopie beruhen auf der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Sie werden meist nach dem spektralen Bereich benannt (z. B. UV-, VIS- oder IR-Spektroskopie). Je nach Energie der verwendeten elektromagnetischen Strahlen werden verschiedene Effekte an den Substanzen hervorgerufen (z. B. Elektronenanregungen, Molekülschwingungen oder Molekülrotationen).

4.5.1 UV/VIS-Spektroskopie

Der sichtbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums (VIS) liegt zwischen 400 nm und 800 nm, während der ultraviolette Bereich (UV) sich von 100 - 400 nm erstreckt. Wenn elektromagnetische Strahlung dieser Bereiche auf Materie trifft, kann die Absorption der Strahlung bewirken, dass Elektronen von einem Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand übergehen. Diese Elektronen-Übergänge sind möglich, wenn die Energie der Strahlung genau der Energiedifferenz des Elektrons zwischen Grundzustand und erhöhtem Energieniveau entspricht. Die Absorption von elektromagnetischer Strahlung kann direkt zur Konzentrationsbestimmung der absorbierenden Substanz in Flüssigkeiten genutzt werden. Der Zusammenhang zwischen Absorption (A) und Konzentration (c) wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (4.1) beschrieben.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (4.1)$$

Die Intensität der elektromagnetischen Strahlung vor (I_0) und nach (I) dem Auftreffen auf eine Probe wird gemessen. Unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten der Probe (ε) [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] (auch molarer Absorptionskoeffizient genannt) und der Pfadlänge der Strahlung durch die Lösung (d) [cm] wird die Konzentration berechnet. Die Größen A , I , I_0 und ε sind wellenlängenabhängig.

Neben Absorptions-Messungen, z. B. der H_2 -Aufnahme (Kapitel 4.4.4), wurde in dieser Arbeit die spektroskopische Messung der Extinktion, z. B. von Bakteriensuspensionen (Kapitel 4.2.2) und Chlorophyllextrakten (Kapitel 4.2.3), durchgeführt. Die Extinktion umfasst die gesamte Abschwächung der elektromagnetischen Strahlung in einer Probe, zusätzlich zu der Absorption, also auch die Lichtstreuung. Bei der Chlorophyllbestimmung ist die Lichtstreuung gegenüber der Absorption gering. Bei der Zelldichtebestimmung einer Suspension verhält es sich reziprok.

4.5.2 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) ist eine Variante der IR-Spektroskopie, bei der ein ausgehender Infrarotstrahl durch Spiegel in zwei kohärente Teilstrahlen getrennt wird, die später wieder kombiniert werden. Dabei erfahren die Strahlen durch Zurücklegen unterschiedlicher Wegstrecken eine Verschiebung der Wellenlängen zueinander. Das gemessene Interferogramm stellt die absorbierte Strahlung in Abhängigkeit der Wegdifferenz der beiden Strahlen dar. Mittels der Fourier-Transformation wird das Interferogramm in ein Spektrum umgerechnet. Durch die Verwendung eines Interferometers wird das Spektrum, nicht wie bei herkömmlicher IR-Spektroskopie, kontinuierlich in Abhängigkeit von der Wellenlänge gemessen, sondern alle Wellenlängen eines definierten

Spektralbereichs gleichzeitig als Momentaufnahme. Die FT-IR-Spektroskopie ermöglicht die Aufzeichnung zahlreicher Spektren in kurzer Zeit, wodurch sich das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.

Die Analysemethode arbeitet im infraroten Spektralbereich. Der Infrarot-Bereich wird in das nahe (0,75 - 2,5 μm), mittlere (2,4 - 50 μm) und ferne Infrarot (50 - 500 μm) aufgeteilt. Die infrarote Strahlung ist damit energieärmer im Vergleich zur UV- oder VIS-Strahlung. Sie reicht nicht für die Anregung elektronischer Übergänge aus, sondern bewirkt innerhalb des elektronischen Grundzustands Schwingungen der Atombindungen. Man unterscheidet dabei zwischen Valenzschwingungen (Streckschwingung entlang der Bindungsebene) und Deformationsschwingungen (Biege-, Dreh- oder Kippschwingung aus der Bindungsebene heraus). Bei den Deformationsschwingungen werden nur die Bindungswinkel verändert, nicht die Bindungslängen. Diese Schwingungen treten bei niedrigen Frequenzen auf. Ein Molekül ist IR-aktiv, wenn es permanente oder induzierbare Dipolmomente aufweist, die durch die Schwingungen verändert werden. Je größer die Bindungsstärke zwischen zwei Atomen ist und je kleiner die beteiligten Atommassen sind, desto höher liegt die Schwingungsfrequenz. Die benötigte Energie zur Schwingungsanregung ist für bestimmte Atomgruppen spezifisch. Daher eignet sich die Methode zur Charakterisierung von funktionellen Gruppen in Molekülen. Die Schwingung des gesamten Moleküls ergibt sich aus der Überlagerung der einzelnen Atomschwingungen. Das Peptidrückgrat eines Proteins dominiert dessen Gesamtabsorptionsspektrum und erschwert Interpretationen von funktionellen Gruppen der Aminosäuren. Die Methode eignet sich dennoch sehr gut, um die zweiatomigen Eisenliganden ($\text{C}\equiv\text{N}$ und $\text{C}\equiv\text{O}$) des aktiven Zentrums von Hydrogenasen zu analysieren. Dessen IR-aktive Schwingungen liegen in einem Absorptionsbereich zwischen 1800 - 2100 cm^{-1} und werden nicht von anderen Signalen des Proteins überlagert. Die Absorption bei der IR-Spektroskopie wird als Funktion der Wellenzahl (reziproke Wellenlänge [cm^{-1}]: $1/\lambda$) angegeben. Die Wellenzahl ist der Frequenz und damit der absorbierten Energie direkt proportional.

Die Infrarot-Spektren wurden an der Technischen Universität Berlin (Institut für Chemie, Max-Volmer-Institut) in Kooperation mit Dr. Lenzian und Dr. Zebger mit einem Bruker Tensor 27 FT-IR-Spektrometer aufgenommen, welches mit einem stickstoffgekühlten MCT-Detektor (Auflösung 2 cm^{-1}) ausgestattet ist. Das Protein wurde mit einer Konzentration von 0,1 - 0,6 mM in eine gasdichte Transmissionszelle mit CaF_2 -Fenstern gegeben (Volumen: $\sim 7 \mu\text{l}$, Weglänge: 50 μm). Die Temperatur der Messzelle wurde während der Messungen kontrolliert auf 10 °C gehalten. Alle Spektren wurden einer Basislinienkorrektur (Spline funktion der OPUS 4.2 Software) unterzogen und gegen die integrierte Intensität der $\text{C}\equiv\text{O}$ -Schwingungen normalisiert.

4.5.3 Elektronen Spin Resonanz-Spektroskopie

Die Elektronen Spin Resonanz-Spektroskopie (ESR) wird zur Charakterisierung von Radikalen oder Übergangsmetallionen in Proteinen eingesetzt. Sie basiert auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch ungepaarte Elektronen, die sich in einem von außen angelegten Magnetfeld befinden. Substanzen mit mindestens einem ungepaarten Elektron bezeichnet man als paramagnetisch aufgrund des Eigendrehimpulses (Spins) des Elektrons. In einem äußeren Magnetfeld gibt es quantenmechanisch zwei Möglichkeiten der Spinorientierung. Die „parallele“ Anordnung ($m_s = +\frac{1}{2}$, Spin aufwärts \uparrow) entspricht dem energetisch günstigen Grundzustand und entsteht durch Anziehung im Magnetfeld. Der angeregte Zustand wird als „antiparallel“ bezeichnet ($m_s = -\frac{1}{2}$, Spin abwärts \downarrow) und ist durch Abstoßung im Magnetfeld begründet. Der energetische Abstand ΔE zwischen den beiden Energieniveaus ist linear von der Stärke des Magnetfeldes (B_0) abhängig (Zeeman-Effekt, Abb. 4.2).

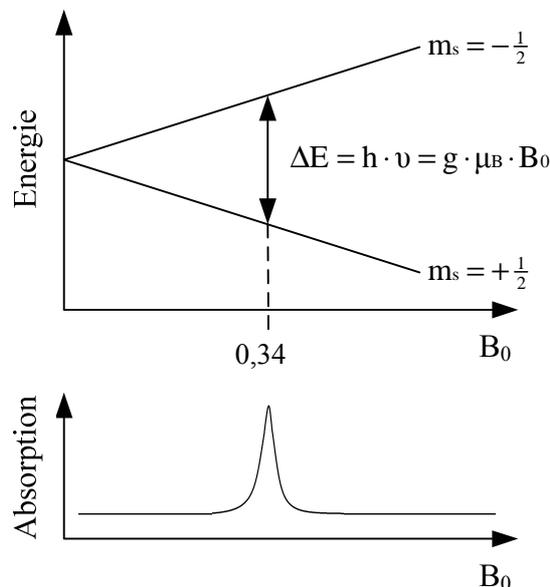


Abb. 4.2: Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus eines freien Elektrons ($m_s = -\frac{1}{2}$ und $m_s = +\frac{1}{2}$) im Magnetfeld mit zunehmender Stärke (B_0). Bei Einstrahlung von Mikrowellen mit einer konstanten Frequenz von 9,5 GHz tritt die Absorption der Strahlung bei 0,34 T ein (verändert nach Czeslik et al., 2007).

Die Probe in der ESR-Spektroskopie absorbiert Mikrowellenstrahlung, wenn bei einer bestimmten Magnetfeldstärke die konstant eingestrahlte Mikrowelle exakt ΔE zwischen angeregtem und Grundzustand entspricht (siehe 4.2).

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (4.2)$$

h = Planck'sches Wirkungsquantum = $6,6260755 \cdot 10^{-34} \cdot \text{Js}$

ν = Frequenz der Mikrowellenstrahlung = $[\text{s}^{-1}]$

g = Landé-Faktor (g-Wert)

B_0 = Feldstärke des äußeren Magnetfeldes [T]

μ_B = Bohr'sches Magneton = $0,92740154 \cdot 10^{-23} \text{JT}^{-1}$

Der Landé-Faktor für ein freies Elektron beträgt $g = 2,0023$. In einem Protein wird der g-Wert eines Übergangmetallions von der Umgebung des Elektrons bestimmt. Es ergeben sich kleinere oder größere effektive g-Werte, die von dem des freien Elektrons abweichen. In einer gefrorenen Proteinprobe liegt eine zufällig verteilte Orientierung der Molekülachsen vor. Der g-Wert wird durch drei unterschiedliche g-Tensor-Werte g_x , g_y und g_z charakterisiert. Diese Werte hängen von der Orientierung des Magnetfeldes relativ zum Achsensystem des Moleküls ab, was zu einem ESR-Spektrum mit rhombischer Symmetrie führt.

Bei einer kubischen Symmetrie liegt ein isotroper g-Faktor vor. Alle drei g-Tensor-Werte sind identisch. Ihre Lage ist demnach unabhängig von der Orientierung des paramagnetischen Zentrums zum äußeren Magnetfeld. Bei axialer Symmetrie entsprechen sich zwei g-Tensor-Werte und nur einer unterscheidet sich. Die ESR-Spektren sind charakterisiert durch die Form der Absorptionslinie, die Position des Resonanzfeldes, die Linienbreite und die Fläche unter der Absorptionslinie. Aus diesen Parametern kann der spezifische g-Wert errechnet werden.

Die ESR-Spektren wurden an der Technischen Universität Berlin (Institut für Chemie, Max-Volmer-Institut) in Kooperation mit Dr. Lenzian und Dr. Saggi mit einem Bruker ESP300E Spektrometer aufgenommen, welches im X-Frequenzband (Mikrowelle: 9,5 GHz) arbeitet. Die Frequenz der Mikrowelle wurde während der Messung konstant gehalten, während die Magnetfeldstärke variierte. In diesem Fall wird bei einem freien Elektron der Übergang zwischen den zwei Spinzuständen in einem Magnetfeld von $B_0 = 340 \text{ mT}$ erreicht (Abb. 4.2). Die Mikrowellenfrequenz wurde über einen EIP Frequenz Zähler (Microwave Inc., USA) detektiert. Um genaue g-Werte zu erhalten, wurde das magnetische Feld mit einem externen Standard (Lithium-Partikel in einer LiF-Matrix) kalibriert, deren g-Wert bei 2,002293 (Stesmans und van Gorp, 1989) liegt. Die Enzymprobe wurde im ESR-Röhrchen (Rototec Spintec 707-SQ-250) in einen Oxford ESR 900 Helium Cryostaten platziert und über einen Oxford ITC502 kontrolliert, um Messungen zwischen 280 und 4 K zu ermöglichen. Der Probenraum ist ein Hohlraum-Resonator in rechteckiger Form (TE_{102} Modus).

Die Simulation der Spektren erfolgte mit der MATLAB toolbox *EasySpin* (Stoll und Schweiger, 2006). Die Basislinienkorrektur erfolgte durch Subtraktion eines aufgenommenen Spektrums der Hydrogenase von dem Spektrum des Puffers W. Die Spektren wurden unter

und einer Platindraht Gegen-Elektrode. Das gemessene Potenzial wurde in Bezug zur Standard H₂ Elektrode (SHE) angegeben. Die Umrechnung des Potentials der Referenzelektrode erfolgte gemäß der Gleichung 4.3.

$$E_{\text{SHE}} = E_{\text{RE}} + 179 \text{ mV} \quad (4.3)$$

Die Experimente wurden über einen Autolab PGSTAT128N electrochemical analyser (ECO Chemie, Utrecht, Niederlande) mit GPES Software (ECO Chemie) kontrolliert.

Die PGE-Elektrode besteht aus pyrolytischem Graphit, dessen Basisfläche aus parallelen Graphitlagen mit einem Abstand von ca. 3,35 Å zusammengesetzt ist. Die Kanten der Graphitlagen bilden die Absorptionsoberfläche der Elektrode, da sie im Vergleich zur planaren Basisfläche deutlich schnellere Elektrodenkinetiken aufweisen (Banks und Compton, 2005). Durch Polieren mit einem angefeuchteten Wattebausch und α -Aluminiumoxid (1 μm) wurde die Kantenebene der pyrolytischen Graphit-Elektrode angeraut und oxidiert, so dass funktionelle Gruppen für nicht-kovalente Enzymbindungen entstanden. Anschließend wurde die Elektrodenoberfläche mit H₂O gespült und im Ultraschallbad gründlich gereinigt. Unter diesen Voraussetzungen konnte die isolierte Hydrogenase (0,1 μM Enzym in 1 ml Puffer M (pH 6,4)) an die PGE-Elektrode gebunden werden. Dies erfolgte bei nicht rotierender Elektrode durch zyklische Variation der Spannung (+200 mV bis -600 mV) mit 10 mV/s Scan-Raten. Die Bildung eines stabilen Proteinfilms auf der Elektrodenoberfläche wurde durch die resultierenden zyklischen Voltammogramme verfolgt. Nachdem keine Veränderung mehr im Voltammogramm ersichtlich war, wurden die Messungen in enzymfreiem Puffer durchgeführt. Der Puffer M besteht aus 15 mM NaCH₃COO, 15 mM MES, 15 mM HEPES, 15 mM TAPS, 15 mM CHES und 0,1 M NaCl. Zur Einstellung des gewünschten pH-Werts wurde der Puffer mit NaOH oder HCl titriert. Das Polieren, Spülen und Reinigen durch Ultraschall der Elektrode wurde nach jeder Messung wiederholt.

4.7 Kristallisierung

Der erste Schritt zur Strukturaufklärung eines Enzyms mit Hilfe der Röntgenkristallographie ist die Gewinnung eines adäquaten Einkristalls. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kristallisationsbedingungen, in Abhängigkeit der Enzym-, Salz- und Puffer-Konzentration, des pH-Werts, der Temperatur, von Cokristallisations-Substanzen, Fällungsmitteln (Präzipitanten) und Kofaktoren, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Juan-Carlos Fontecilla-Camps am Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble, Frankreich) ausgetestet.

Es wurde nach der Methode des „hängenden Tropfens“ sowie des „sitzenden Tropfens“ im Dampfdiffusion-System manuell oder mit Hilfe eines Robotersystems gearbeitet. Die Abb. 4.4 stellt die beiden Varianten schematisch dar.

Die Kristallisationsansätze über die Methode des „hängenden Tropfens“ erfolgten mit Hilfe eines Roboters unter Verwendung verschiedener Kristallisations Kits: PEGs Suite, JCSG+

Suite und Classic Suite (Qiagen, Hilden) sowie Crystal Screen Lite und Index (Hampton Research, CA, USA). Alle manuellen Ansätze wurden nach der Methode des „sitzenden Tropfens“ durchgeführt.

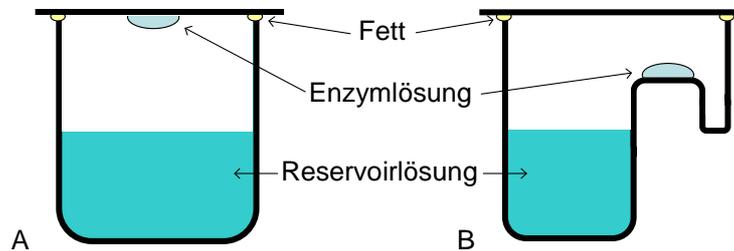


Abb. 4.4: Schematische Darstellung von Kristallisations-Methoden. (A) Methode des „hängenden Tropfens“, (B) Methode des „sitzenden Tropfens“.

Vor der Verwendung in den Kristallisationsansätzen wurde die mittels Affinitätschromatographie isolierte, bei -20 °C gelagerte Hydrogenase über eine Membran (Amicon Ultrafree-MC, $0,45\text{ }\mu\text{m}$ PVDF Membran, Millipore, Eschborn) filtriert, um evtl. gebildete Aggregate zu entfernen. Der Tropfen bestand zu gleichen Teilen aus Enzym in Puffer W und aus Reservoirlösung. Die Zusammensetzung der Reservoirlösung wurde variiert.

Notwendiger Bestandteil der Reservoirlösung ist allerdings stets ein Präzipitant, welcher die Enzyme bei einer bestimmten Konzentration aus der Lösung verdrängt. Zwischen Tropfen und Reservoirlösung herrscht ein Konzentrationsgradient vor. Wasser diffundiert bis zum Gleichgewicht aus dem Tropfen in die Gasphase. Dadurch erhöht sich langsam und kontinuierlich die Konzentration im Tropfen, bis es im Idealfall zur Kristallisierung, meist allerdings zur Präzipitation des Enzyms kommt. Als Präzipitanten wurden vor allem Salze wie Ammoniumsulfat oder organische Verbindungen wie Alkohole oder Polyethylenglykole verwendet.

Um zu testen, ob es sich bei den erhaltenen Kristallnadeln um Proteinkristalle handelt, wurden diese mit der proteinspezifischen Farbstofflösung Izit (Hampton Research, CA, USA) gefärbt. Izit ist ein kleines Molekül, das die Flüssigkeitskanäle in Proteinkristallen färbt. Der Farbstoff kann nicht in Salzkristalle eindringen, weil diese keine solchen Kanäle besitzen.

5 Ergebnisse

5.1 Überexpression der [NiFe] Hydrogenase

5.1.1 Überexpression des *hox*-Operons und Fusion des Strep-tag (II)

Die Grundlage dieser Arbeit stellt die Gewinnung großer Mengen, möglichst reiner [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 für biochemische, elektrochemische und spektroskopische Untersuchungen sowie für Kristallisationsversuche dar. Die Hydrogenase wird in der Zelle nur in geringen Mengen synthetisiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, sollte das Enzym in *Synechocystis* überexprimiert werden. Für diesen Zweck wurde der starke *psbAII*-Promotor aus *Synechocystis* verwendet (Elhai, 1993). Dieser konnte mit den Primern (E-out1/E-in1 und E-in2/E-out2) amplifiziert und über die Schnittstellen *KpnI* und *NdeI* in *Synechocystis* stromaufwärts von *hoxE* kloniert werden. Die *Synechocystis* Mutante mit stromaufwärts der *hox*-Gene liegendem *psbAII*-Promotor wurde für eine weitere Klonierung verwendet. In diesem Fall wurde an den C-Terminus von *hoxF* die Sequenz eines Strep-tag (II) mit einer zusätzlichen Alanin-Serin-Verbindung fusioniert. Unter Verwendung der Primerpaare (HoxF-out1/HoxF-in1 und HoxF-in2/HoxF-out2) entstanden zwei PCR-Produkte, die über ihre komplementäre Strep-tag (II) Sequenz miteinander hybridisiert wurden. Der Primer HoxF-in2 enthält eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BamHI*. An dieser Stelle wurde die Sequenz für eine Neomycin Phosphotransferase (NPT) aus dem Vektor pUC4K eingefügt. Die dargestellten Klonierungen wurden von Dr. Jens Appel durchgeführt. Die Neomycin Phosphotransferase inaktiviert durch Phosphorylierung eine Reihe von Aminoglycosid Antibiotika, wie z. B. Kanamycin oder Neomycin. Hiermit wird eine Resistenz erzielt, die für die Selektion positiver Klone essenziell ist. Das Klonierungsprodukt ist schematisch in Abb. 5.1 zusammengefasst.

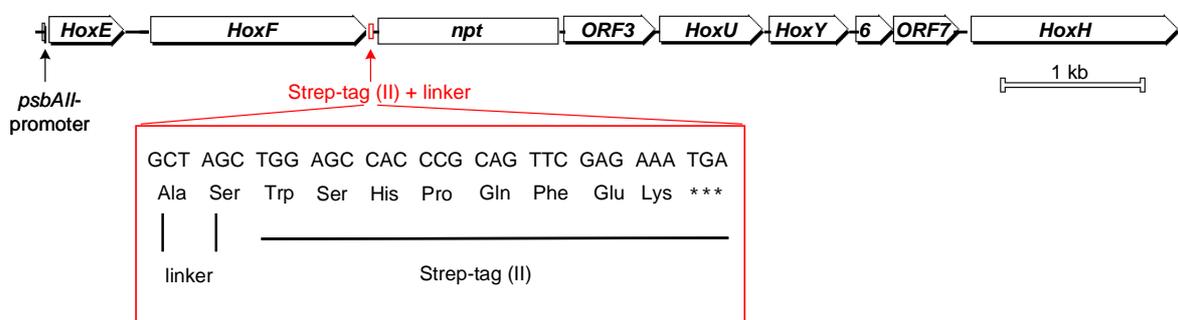


Abb. 5.1: Schema des *hox*-Operons aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit fusioniertem Strep-tag (II). Der Strep-tag (II) wurde mittels eines Alanin-Serin-Linkers an den C-Terminus von *HoxF* fusioniert. Stromaufwärts des [NiFe] Hydrogenase-Operons wurde ein *psbAII*-Promotor kloniert. Das Konstrukt beinhaltet die *npt*-Resistenz-Kassette gegen u. a. Kanamycin. *HoxE*, *F*, *U*, *Y* und *H* kodieren die Untereinheiten des Hydrogenase-Diaphorase-Komplexes. Die Funktionen der einzelnen offenen Leserahmen 3, 6 und 7 sind bisher nicht bekannt.

Alle erzeugten Mutanten wurden in dieser Arbeit gemeinsam mit dem *Synechocystis* Wildtyp (WT) auf Hydrogenaseaktivität in Gegenwart von Methylviologen und Dithionit untersucht (Abb. 5.2). Das Ergebnis zeigt, dass die Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon (WT22) sowie die Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon und Strep-tag (II) fusioniert an den C-Terminus von HoxF (E3) mehr Wasserstoff bilden als der Wildtyp. Die Zellen wurden bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (schwarze Balken) und bei $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (weiße Balken) in BG-11-Medium kultiviert. Eine höhere Hydrogenaseaktivität ist bei den Mutanten mit *psbAII*-Promotor messbar, die bei hoher Lichteinstrahlung angezogen wurden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die *psbA*-Gene das D1 Protein des Photosystems II kodieren. Das D1 Protein wird bei hohen Lichtintensitäten aufgrund von Photooxidation zerstört und muss immer wieder neu gebildet werden. Konsequenterweise wird der Promotor in Abhängigkeit von der Lichtintensität unterschiedlich reguliert. Bei höherer Lichtintensität steigt die Transkription am *psbAII*-Promotor an (Máté et al., 1998). Im Falle der *Synechocystis* Mutanten führt dies zu einer stärkeren Expression der *hox*-Gene und somit zu einer Steigerung der Hydrogenaseaktivität pro Zelle. Die Wasserstoffproduktionsraten wurden stets auf den Chlorophyllgehalt bezogen.

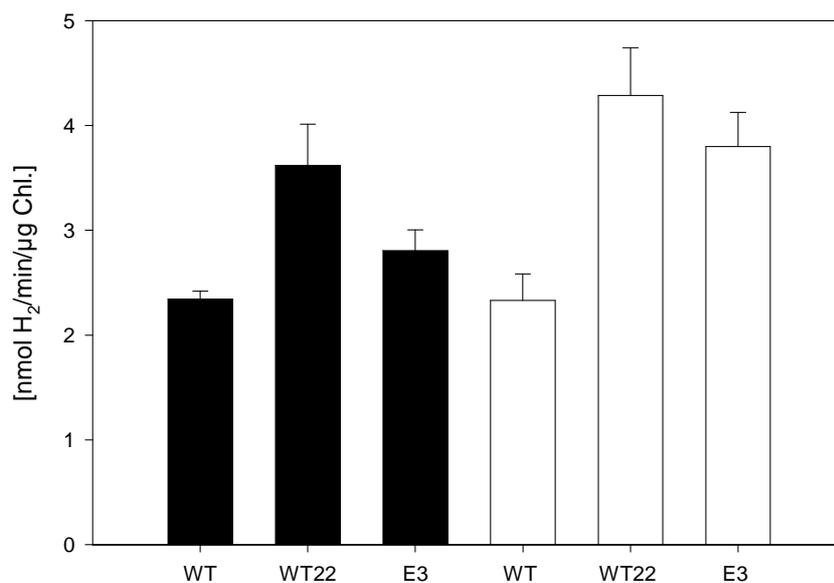
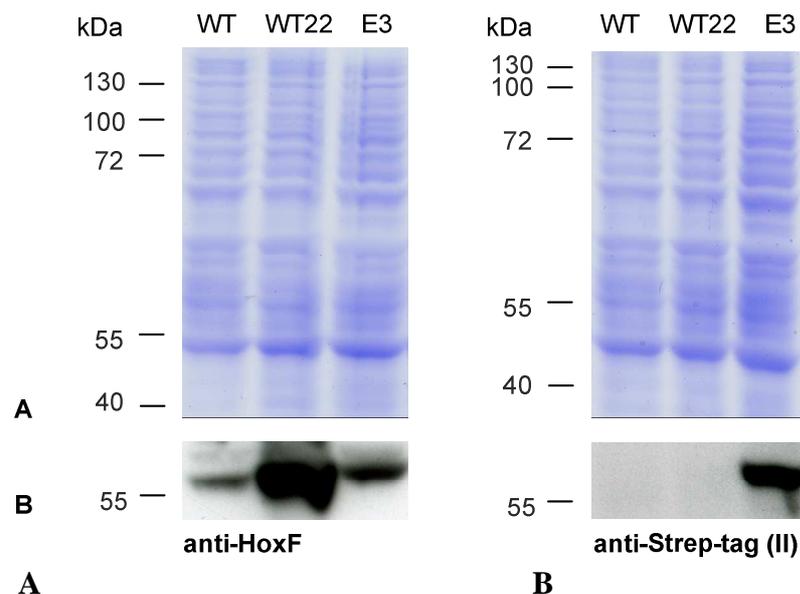


Abb. 5.2: Hydrogenaseaktivität gemessen als H₂-Produktion in Gegenwart von Methylviologen und Dithionit. WT: *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp, WT22: Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon, E3: Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon und Strep-tag (II) fusioniert an den C-Terminus von HoxF. Die Zellen wurden bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (schwarze Balken) and $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (weiße Balken) in BG-11-Medium kultiviert.

Die Hydrogenaseaktivität der *psbAII* Mutante mit Strep-tag (II) (E3) ist geringer im Vergleich zur reinen *psbAII* Mutante (WT22). Dies führt zu der Vermutung, dass entweder der fusionierte Strep-tag (II) die Enzymaktivität direkt einschränkt oder dass die Transkription

des Operons durch die Strep-tag (II) Sequenz bzw. die eingefügte Antibiotikaresistenz (Abb. 5.1) gestört wird. Als Konsequenz aus dieser Beobachtung folgte die Untersuchung des Expressionslevels der Hox-Proteine. Zu diesem Zweck wurde ein Western Blot mit dem Antikörper gegen HoxF von den zellfreien cytosolischen Extrakten der gemessenen Kulturen, die über Zellaufbruch mit Glasperlen (Kapitel 4.4.1) gewonnen wurden, angefertigt (Abb. 5.3 A). Die Expression von HoxF reflektiert die Unterschiede der gemessenen Hydrogenaseaktivitäten. Durch den *psbAII*-Promotor wird in der Mutante WT22, im Vergleich zum *Synechocystis* Wildtyp (WT), mehr HoxF produziert. Die Mutante E3 mit *psbAII*-Promotor und mit Strep-tag (II) nimmt, wie bei den Aktivitätsmessungen, eine Zwischenstellung ein. Sie weist mehr HoxF auf als der WT, aber sehr viel weniger als die WT22 Mutante. In einem Western Blot mit einem Antikörper gegen Strep-tag (II) zeigt diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp und zur Mutante WT22 ein deutliches Signal (Abb. 5.3 B). Die Fusion des Strep-tag (II) an HoxF hat demnach funktioniert, führt aber zu einer Verminderung der Expression von HoxF und damit der Hydrogenaseaktivität in der Zelle.



A **B**
Abb. 5.3: 16,5%iges Tricin-SDS Gel und Western Blot-Analysen mit (A) anti-HoxF und (B) anti-Strep-tag (II). WT: *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp, WT22: Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon, E3: Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon und Strep-tag (II) fusioniert an den C-Terminus von HoxF. Die Kultivierung erfolgte bei $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in BG-11-Medium.

Bei der Analyse des Western Blots in Abb. 5.3 A fällt auf, dass das starke Signal der WT22 Mutante nicht in Relation zu der Aktivitätsmessung der Mutante steht. Nach dem Expressionslevel von HoxF in der WT22 Mutante müsste die Hydrogenaseaktivität im Vergleich zu der E3 Mutante und zum Wildtyp deutlich höher liegen als die Messungen in

Abb. 5.2 zeigen. Dies lässt vermuten, dass die Aktivität der Hydrogenase in der WT22 Mutante neben der Anzahl der Strukturgene durch weitere Faktoren limitiert ist. Ein weiterer Western Blot mit einem Antikörper gegen die große Untereinheit der Hydrogenase (HoxH) ist in Abb. 5.4 dargestellt. Neben dem Wildtyp wurden die WT22 Mutante und die *Synechocystis* Deletionsmutante des *hox*-Operons Δ HoxEH (Phunpruch, 1999) verwendet.

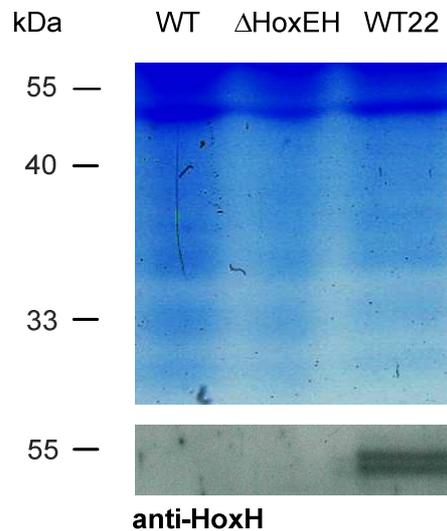


Abb. 5.4: 16,5%iges Tricin-SDS Gel und Western Blot-Analyse mit anti-HoxH. WT: *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp, WT22: Mutante mit *psbAII*-Promotor vor dem *hox*-Operon, Δ HoxEH: Deletionsmutante des *hox*-Operon. Die Kultivierung erfolgte bei $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in BG-11-Medium.

Die Deletionsmutante (Δ HoxEH) zeigt, wie erwartet, kein Signal für die große Hydrogenase-Untereinheit HoxH. Das fehlende Signal beim Wildtyp ist darauf zurückzuführen, dass die HoxH Konzentration für die Sensitivität des Antikörpers zu gering ist. Durch Überexpression der *hox*-Gene (WT22 Mutante) konnte bei gleichem Proteinauftrag eine deutliche Doppelbande detektiert werden. Appel et al. (2000) zeigten im *Synechocystis* Wildtyp bei hoher Proteinkonzentration des cytosolischen Extakts dagegen, dass das HoxH-Signal unter den gleichen Bedingungen eine Einfachbande ist. Als letzter Schritt in der Assemblierung der Hydrogenase wird eine C-terminale Peptidsequenz nach Histidin oder Arginin des C_x₂C_x₂H/R-Aminosäuremotivs in der großen Hydrogenase-Untereinheit von *E. coli* durch eine spezifische Endopeptidase abgespalten (Theodoratou et al., 2000; 2005). In HoxH von *Synechocystis* liegt das Sequenzmotiv 25 Aminosäuren vor dem C-Terminus. Das Doppelsignal zeigt, dass vermutlich eine prozessierte (ca. 50 kDa) und eine nicht prozessierte (53 kDa) Form von HoxH in der Überexpressionsmutante vorhanden sind. Demnach konnte wahrscheinlich der Assemblierungsprozess nicht komplett abgeschlossen werden.

5.1.2 Einfluss der [Ni]- und [Fe]-Konzentration auf die Hydrogenaseaktivität

Beim Assemblierungsprozess wird die spezifische Peptidase erst aktiv, wenn Nickel bereits in das katalytische Zentrum eingebunden ist, da das Element als Erkennungsmotiv dient (Rossmann et al., 1994; Theodoratou et al., 2000). Aus diesem Grund wurde die Hydrogenaseaktivität der Mutanten WT22 und E3 sowie des *Synechocystis* Wildtyps (WT) in Abhängigkeit von verschiedenen Nickelkonzentrationen getestet (Abb. 5.5 A). In dem Zusammenhang wurde außerdem überprüft, ob die Konzentration von Eisen ein limitierender Faktor für die Synthese des Enzyms darstellt (Abb. 5.5 B).

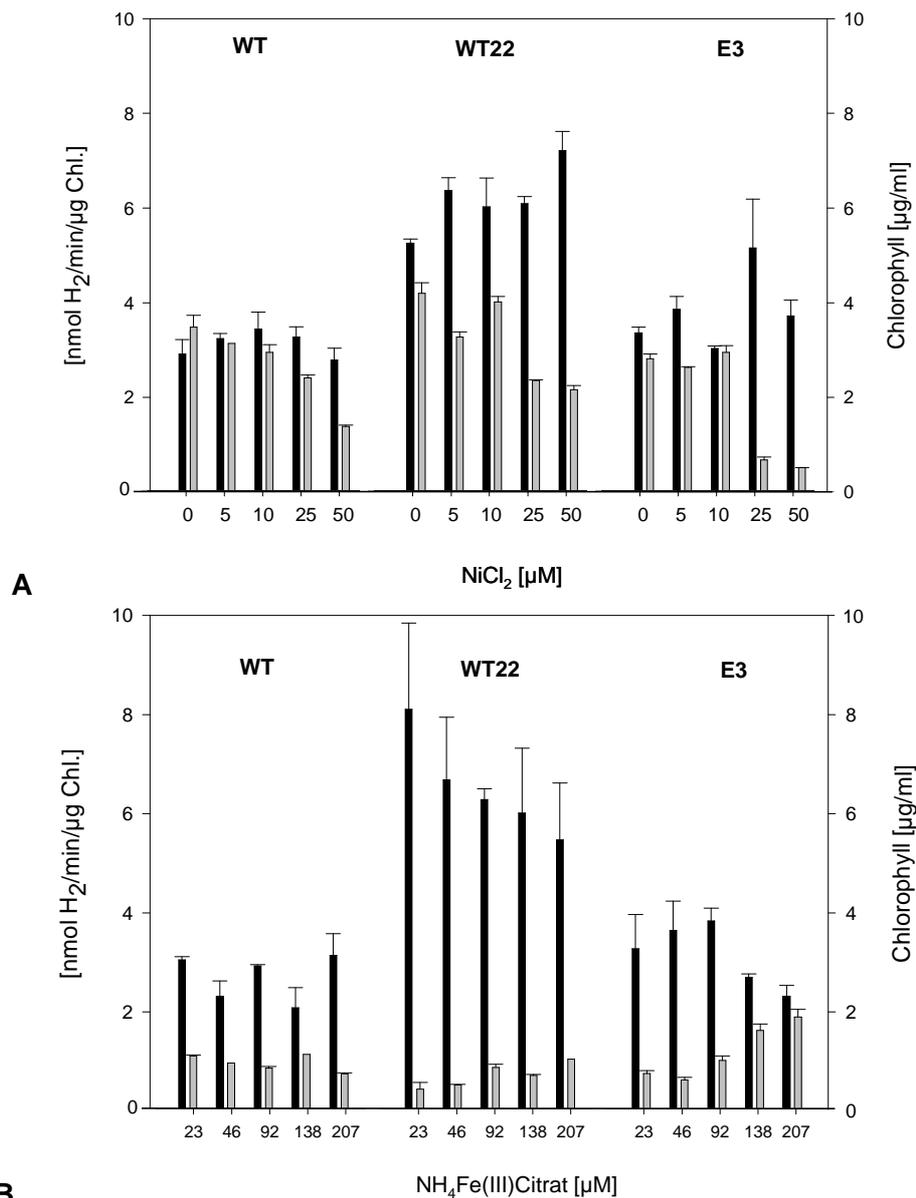


Abb. 5.5: Hydrogenaseaktivität gemessen als H₂-Produktion mit Methylviologen und Dithionit. WT: *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp, WT22: Mutante mit *psbAII*-Promotor vor dem *hox*-Operon, E3: Mutante mit *psbAII*-Promotor vor dem *hox*-Operon und Strep-tag (II) fusioniert an den C-Terminus von HoxF. Die Kultivierung erfolgte bei 200 μE m⁻² s⁻¹ in BG-11-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von (A) NiCl₂ und (B) NH₄Fe(III)Citrat. Neben der H₂-Produktionsrate (schwarze Balken) ist die Chlorophyllkonzentration (graue Balken) dargestellt.

In der Eisenversuchsreihe wurde in allen Ansätzen 5 μM Nickel und in der Nickelversuchsreihe 23 μM Eisen zugefügt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass im Wildtyp und in der Überexpressionsmutante E3 die Aktivität weder durch Zugabe von höheren Nickel- noch Eisenkonzentrationen im Medium gesteigert werden kann. Die Hydrogenaseaktivität der WT22 Mutante zeigt keine Korrelation zur Nickel- und eine negative Korrelation zur Eisenkonzentration. Mit steigender Eisenkonzentration sinkt die Hydrogenaseaktivität in der Zelle. Dieser Zusammenhang ist nicht darin begründet, dass die höheren Eisenwerte (bis zu 207 μM) toxisch für die Zellen sind, da der Chlorophyllgehalt in den Ansätzen konstant bleibt. Im Gegensatz dazu ist zu beobachten, dass ab einer Nickelkonzentration von 25 μM das Wachstum der Bakterien gestört ist. In diesen Kulturen ist der Chlorophyllgehalt signifikant geringer. In allen Vorkulturen war zum Zeitpunkt der Nickelzugabe der Chlorophyllgehalt identisch. Die bei 0 μM NiCl_2 gemessene Hydrogenaseaktivität erklärt sich durch Nickel-verunreinigte Chemikalien des BG-11-Mediums.

Die Versuche ergeben, dass die Konzentrationen von 5 μM Nickel und 23 μM Eisen des in dieser Arbeit verwendeten BG-11-Mediums keinen limitierenden Faktor für die Reifung des Enzyms in den Überexpressionsmutanten darstellen. Aus diesem Grund erfolgte die weitere Kultivierung der Mutanten in diesem Medium.

5.1.3 Überexpression des *hyp*-Operons

Die Ergebnisse der Konzentrationsreihen führten zu der Überlegung, dass durch den *psbAII*-Promotor die Expression der *hox*-Gene in einem Umfang gesteigert werden konnte, die von der natürlichen Menge an Reifungsproteinen (Hyp-Proteinen) in *Synechocystis* nicht mehr vollständig assembliert werden können. Zu diesem Zweck erfolgte die zusätzliche Überexpression der *hyp*-Gene. Die *hyp*-Gene in *Synechocystis* liegen als einzelne Gene oder in kleinen Gruppen über das gesamte Chromosom verteilt vor (Kapitel 3.6). In *Nostoc* sp. PCC 7120 sind die *hyp*-Gene (*hypF*, *C*, *D*, *E*, *A* und *B*) hingegen in einem Genkluster lokalisiert. Beide Organismen weisen bidirektionale Hydrogenasen mit hoher Sequenzähnlichkeit auf (Ludwig et al., 2006). Aus den genannten Tatsachen erschien es sinnvoll, die *hyp*-Gene aus *Nostoc* in *Synechocystis* unter der Kontrolle des *psbAII*-Promotors zu exprimieren.

Das *hyp*-Operon aus *Nostoc* sp. PCC 7120 wurde mit den Primern Ana-hyp1 und Ana-hyp2, die die Schnittstellen *NdeI* und *SalI* aufweisen, amplifiziert und in den pCR 2.1 TOPO Vektor kloniert. Das 6,7 kb Fragment konnte anschließend über den Verdau mit *NdeI* und *SalI* stromabwärts von dem *psbAII*-Promotor in den *Synechocystis* Expressionsvektor pDH2 kloniert werden. Dieses Konstrukt wurde in die WT22 Mutante transformiert. Die Hydrogenaseaktivität dieser konstruierten Mutante (21) wurde im Verhältnis zum Wildtyp (WT) sowie zur Ausgangskultur (WT22) getestet (Abb. 5.6). Sie zeigt ca. eine Verdoppelung der Wasserstoffproduktion im Vergleich zu WT22. Daraus lässt sich schließen, dass die Überexpression der Hyp-Proteine zur Steigerung der Menge an aktiver Hydrogenase in der Zelle führt.

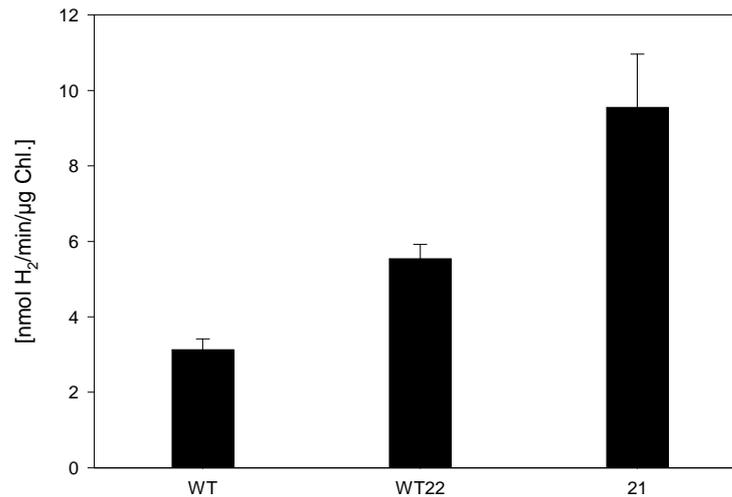


Abb. 5.6: Hydrogenaseaktivität gemessen als H₂-Produktion in Gegenwart von Methylviologen und Dithionit. WT: *Synechocystis* sp. PCC 6803, WT22: Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon, 21: WT22 Mutante mit dem *hyp*-Operon aus *Nostoc* sp. PCC 7120 unter der Kontrolle des *psbAII*-Promotors. Die Kultivierung erfolgte bei 200 µE m⁻² s⁻¹ in BG-11-Medium.

Das *hyp*-Operon aus *Nostoc* sp. PCC 7120 wurde außer in die WT22 Mutante ebenfalls in die Mutante E3 transformiert und anschließend auf Hydrogenaseaktivität getestet (Abb. 5.7 A). Zwei der erhaltenen Mutanten (B und F) zeigten eine gesteigerte Hydrogenaseaktivität verglichen mit dem *Synechocystis* Wildtyp (WT). Die Steigerung der H₂-Produktion im Vergleich zur E3 Mutante beträgt ca. den Faktor zwei. Sie liegt damit in der gleichen Größenordnung wie der Aktivitätsunterschied zwischen Mutante 21 und WT22.

Die Expression der Hyp-Proteine von *Nostoc* sp. PCC 7120 in *Synechocystis* wurde mittels eines Western Blots mit einem Antikörper gegen HypD exemplarisch überprüft (Abb. 5.7 B). Die zellfreien cytosolischen Extrakte der Mutanten B und F enthalten mehr HypD als der Wildtyp oder die E3 Mutante. Als Positivkontrolle (HypD) wurde Extrakt von *Ralstonia eutropha* HF632 verwendet, welcher die Reifungsproteine der membrangebundenen Hydrogenase beinhaltet (Lenz et al., 2005). Die Negativkontrolle (Δ Hyp) ist ebenfalls ein Extrakt von *R. eutropha* HF632 mit einer Deletion der *hyp*-Region. Beide Proben wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bärbel Friedrich, Humboldt-Universität Berlin, bereitgestellt. Das Protein mit höherem Molekulargewicht, welches in den cyanobakteriellen Stämmen (WT, E3, B und F) in dem Western Blot zusätzlich zu HypD detektiert wird, resultiert aus einer unspezifischen Reaktion des Antikörpers HypD, da diese Bande in den *R. eutropha* Stämmen nicht sichtbar ist. Die Hydrogenaseaktivität und der Expressionslevel von HypD der beiden auf gleichem Weg konstruierten Mutanten B und F sind vergleichbar.

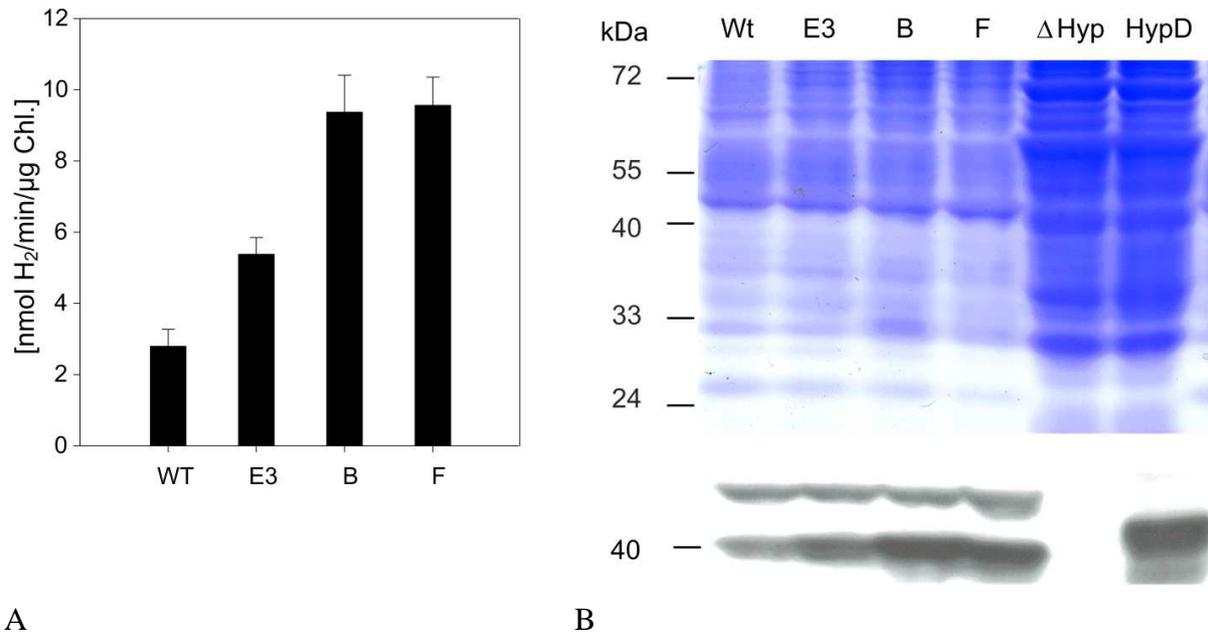


Abb. 5.7: (A) Hydrogenaseaktivität gemessen als H₂-Produktion in Gegenwart von Methylviologen und Dithionit. (B) 16,5%iges Tricin-SDS Gel und Western Blot-Analyse mit Antikörper gegen HypD. WT: *Synechocystis* sp. PCC 6803, E3: Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts vom *hox*-Operon und Strep-tag (II) fusioniert an den C-Terminus von HoxF, B und F: Zwei E3 Mutanten mit integriertem *hyp*-Operon aus *Nostoc* sp. PCC 7120 unter der Kontrolle des *psbAII*-Promotors, HypD: Positivkontrolle *Ralstonia eutropha* HF632 beinhaltet die Reifungsproteine der membrangebundenen Hydrogenase (Lenz et al., 2005). ΔHyp: Negativkontrolle *R. eutropha* HF632 ohne *hyp*-Region.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die heterologe Überexpression des *hyp*-Operons von *Nostoc* sp. PCC 7120 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 gelungen ist. Mit den Mutanten B und F wurde eine *Synechocystis* Variante geschaffen, die aufgrund des überexprimierten *hox*- und *hyp*-Operons gegenüber dem Wildtyp eine dreifach gesteigerte Hydrogenaseaktivität aufweist und zusätzlich einen fusionierten Strep-tag (II) am C-Terminus von HoxF besitzt. Die Mutante B bildet die Grundlage für die im Folgenden präsentierten Ergebnisse zur Isolierung und Charakterisierung der [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis*.

5.1.4 Heterologe Überexpression in *E. coli*

Parallel zur Expressionssteigerung der [NiFe] Hydrogenase unter der Kontrolle des *psbAII*-Promotors wurde versucht, das Enzym in *E. coli* unter der Kontrolle des T7-Promotors noch stärker zu exprimieren. Die *hyp*-Gene, die potenzielle Endopeptidase (HoxW) und das *hox*-Operon wurden in drei separaten Schritten in *E. coli* kloniert, um die Voraussetzungen für die Entstehung eines funktionellen Enzymkomplexes zu erfüllen (Kapitel 4.3.11). Das *hyp*-Operon aus *Nostoc* sp. PCC 7120 wurde in den Vektor pET22 und das *hoxW*-Gen aus *Synechocystis* in den pET26 kloniert. Die Klonierung des *hox*-Operons aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit fusioniertem Strep-tag (II) erfolgte in den pET26 Vektor, dessen Antibiotikaresistenz zuvor von Kanamycin in Gentamycin verändert worden war. Nach der einzelnen Transformation der drei Vektoren in FTD164 *E. coli* Zellen (hydrogenasefreie Mutante des

NREL, National Renewable Energy Laboratory, Golden, USA) erfolgte die Anzucht und Induktion durch Zugabe von 0,5 mM IPTG bei 37 °C. Nach 0, 1, 3 und 18 h wurden Zellproben entnommen und deren cytosolische Proteine auf einem denaturierenden Acrylamidgel analysiert (Abb. 5.8). In Zellen mit dem HoxW Überexpressionskonstrukt erkennt man nach der Induktion eine verstärkte Expression eines Proteins mit einer Größe von ca. 20 kDa. Da HoxW ein Molekulargewicht von ca. 18 kDa besitzt, ist davon auszugehen, dass die Überexpression der potenziellen Endopeptidase funktioniert hat. Bereits vor der Induktion mit IPTG ist eine leicht erhöhte HoxW Menge im Vergleich zu den *E. coli* Proben mit anderen Konstrukten zu erkennen. Auch ohne Induktion wird mit dem T7lac-Promotor eine geringe Menge an T7 RNA Polymerase gebildet. Die *E. coli* Kulturen mit dem *hox*- bzw. *hyp*-Expressionskonstrukt zeigen nach Induktion des T7-Promotors mit IPTG keine signifikante Veränderung im Proteinbild. Entweder erfolgt keine oder nur eine geringe Expression der Gene. Das Ergebnis blieb auch nach Variation der Inkubationsparameter Temperatur und IPTG-Konzentration unverändert. Außerdem war keine Aggregation von rekombinanten Proteinen in „Inclusion Bodies“ erkennbar.

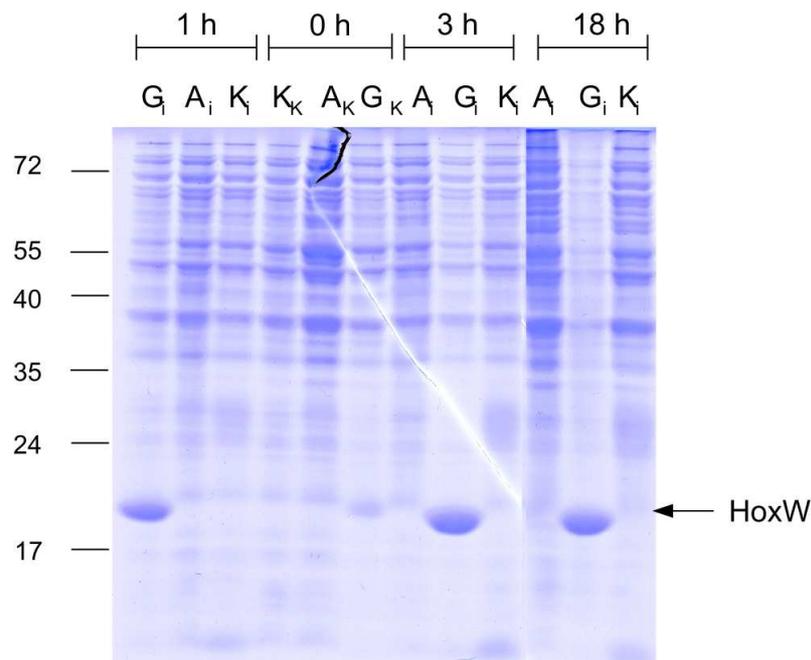


Abb. 5.8: 16,5%iges Tricin-SDS Gel, Coomassie Blau gefärbt, mit Aliquots der Überexpression von (G) HoxW und (K) HoxEFUYH aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie (A) HypABCDEF aus *Nostoc* sp. PCC 7120 in *E. coli*. Dargestellt ist die Expression vor der Induktion mit 0,5 mM IPTG als Kontrolle (_K) sowie 1 h, 3 h und 18 h nach der Induktion mit IPTG (_I).

Das *hox*-Operon- und das *hoxW*-Konstrukt wurden nacheinander in eine FTD164 *E. coli* Zelle transformiert und die Proteinexpression im Gel überprüft. Als Ergebnis zeigte sich nach Induktion mit IPTG eine ähnliche Zunahme der bereits beschriebenen Proteinbande von HoxW. Die Mutante besaß keine Hydrogenaseaktivität, auch nicht nach 30 min N₂-Begasung

der Kultur. Die Anaerobisierung diente dazu, die *E. coli* eigenen *hyp*-Gene zu aktivieren. Eine zusätzliche Transformation des *hyp*-Konstrukts in die Mutante führte ebenfalls zu keiner messbaren H₂-Produktion. Nach diesen Ergebnissen wurden die Überexpressionsversuche in *E. coli* eingestellt.

5.2 Isolierung der [NiFe] Hydrogenase

5.2.1 Affinitätschromatographie: Ausbeute und Reinheit

Für die Charakterisierung der [NiFe] Hydrogenase sollte eine schnelle, schonungsvolle und effiziente Aufreinigungsprozedur etabliert werden. Die Wahl fiel auf das Strep-tag (II)/StrepTactin-System, eine Variante der Affinitätschromatographie, die eine hohe Reinheit bei gleichzeitig guter Ausbeute und moderaten Kosten verspricht (Vergleich verschiedener Affinitäts-tags: Lichty et al., 2005). Mit Hilfe der fusionierten Strep-tag (II) Sequenz an der HoxF Untereinheit des Hydrogenase-Komplexes (Kapitel 5.1) erfolgte die gravimetrische Isolierung des Enzyms aus der Mutante B (Kapitel 5.1.3) bei 6 °C unter aeroben Bedingungen über eine StrepTactin-Sepharose-Säule (IBA, Göttingen). Daten einer Reinigungsprozedur in kleinem Maßstab sind in der Tab. 5.1 zusammengefasst. Dabei wurde als Pufferbedingung 100 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl (Puffer W) gewählt. Im Verlauf dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der Hydrogenase unter verschiedenen Pufferbedingungen, um die Stabilität des Enzym-Komplexes zu testen (Kapitel 5.2.3).

Tab. 5.1: Reinigungstabelle der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 in kleinem Maßstab (1 Unit = Produktion von 1 $\mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1}$).

	Volumen	Protein	ges. Protein	spezif. Aktivität	totale Aktivität	Reinig.-faktor ³	Aktivitäts-Ausbeute ³	Protein-Ausbeute ³
	[ml]	[mg/ml]	[mg]	[Units/mg]	[Units]	(n-fold)	[%]	[%]
Extrakt ¹	5,00	13,60	68,00	0,076	5,169	1	100	100
AC ²	0,50	0,025	0,013	87,782	1,097	1155	21,2	0,019

¹ zellfreier cytosolischer Extrakt

² AC: Eluat der StrepTactin-Affinitätschromatographie

³ Der zellfreie cytosolische Extrakt dient als Referenz.

Ausgehend von 2 g Zellmaterial (Frischgewicht) konnten 13 μg Hydrogenase isoliert werden. Die spezifische Aktivität des Eluats betrug ca. 88 Units/mg, gemessen als H₂-Produktion mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator. Die geringe Ausbeute führte dazu, dass der Maßstab der Isolierung stark vergrößert werden musste. Für die in dieser Arbeit dargestellten Analysen wurden ca. 16 mg Hydrogenase aus ca. 2,4 kg Zellmaterial aufgereinigt. Zur Kultivierung waren ca. 2000 Liter notwendig.

Die [NiFe] Hydrogenase konnte über die Affinitätschromatographie ca. 1155-fach aufgereinigt werden. Diese hohe Reinheit bestätigte sich durch die Coomassie- und Silberfärbung der Elutionsfraktion in einem denaturierenden Agarosegel (Abb. 5.9). Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde die Identität der markierten Banden im Gel als Untereinheiten (HoxEFUYH) der Hydrogenase/Diaphorase ermittelt. Weitere schwache Proteinbanden bei hoher Proteinkonzentration im Gel wurden in einer Verbindung von Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (Kapitel 5.3.2) analysiert.

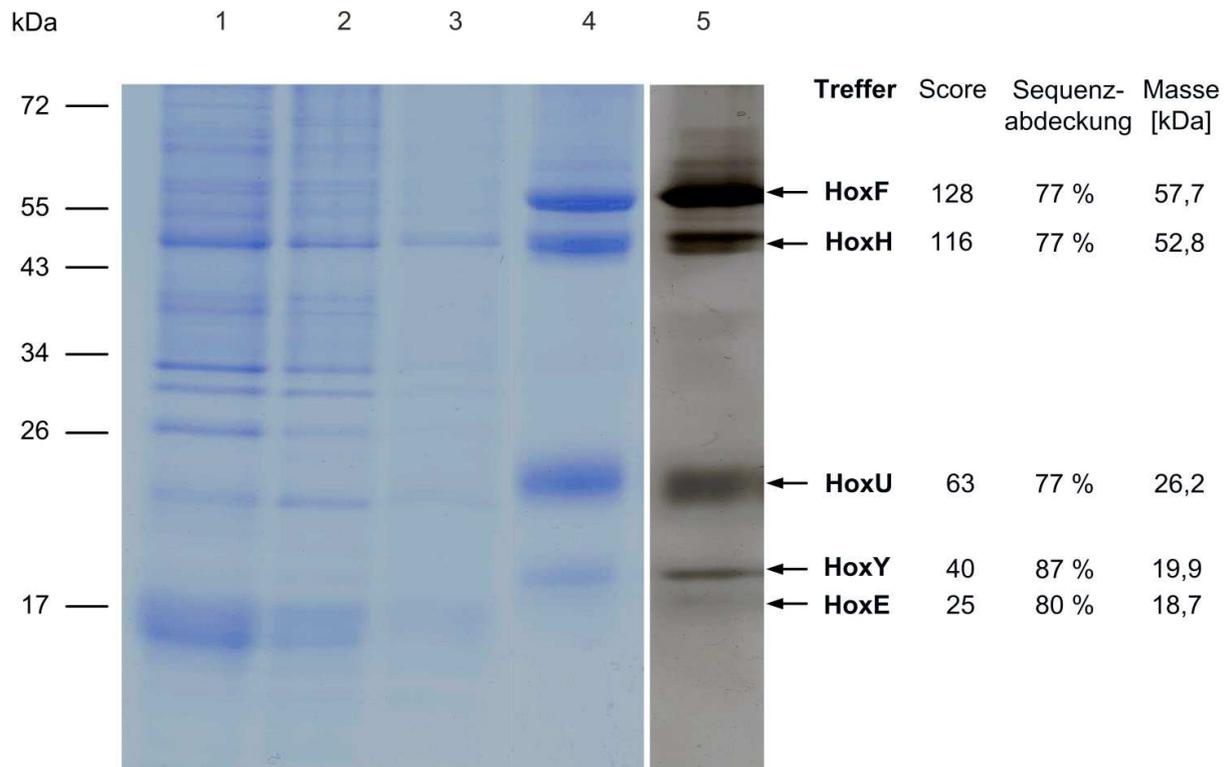


Abb. 5.9: 16,5%iges Tricin-SDS Gel mit Fraktionen aus der Reinigungsprozedur der [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Coomassie Blau Färbung des zellfreien cytosolischen Rohextrakts (1), erste Durchfluss-Fraktion (2), erste Wasch-Fraktion (3), Elutions-Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration und höchsten Hydrogenaseaktivität aus der StrepTactin-Affinitätschromatographie (4) und Silberfärbung derselben Elutions-Fraktion (5). Die Identifizierung der Proteine aufgrund der erhaltenen MALDI-Daten erfolgte über die Mascot-Such-Maschine (Version 2.0, Matrix Science Ltd.).

5.2.2 Edman-Sequenzierung: Stöchiometrie der Untereinheiten

Die Methode des Edman-Abbaus und der N-terminalen Sequenzierung sollte zum einen exakte Angaben über die Proteinkonzentration und zum anderen genauen Aufschluss über die Art und Stöchiometrie der Untereinheiten der isolierten Hydrogenase liefern.

Die in dieser Arbeit üblicherweise verwendete Methode zur Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 4.4.5) kann nur zur ungefähren Abschätzung der Proteinkonzentration dienen. Für einige Untersuchungen der Hydrogenase war es notwendig, eine möglichst exakte Angabe der Konzentration zu besitzen. Aus diesem Grund wurde von der WITA GmbH,

Berlin, eine Edman-Sequenzierung der mittels Affinitätschromatographie isolierten Hydrogenase durchgeführt. Die Firma verwendete 3 µl des gereinigten Enzyms, dessen Konzentration zuvor nach Bradford auf 300 pmol/µl bestimmt worden war. Die theoretisch eingesetzte Proteinmenge lag demnach bei 900 pmol.

Die Quantifizierung über die Edman-Sequenzierung basiert auf den integrierten Flächen der Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäurepeaks eines Zyklus in Bezug auf den PTH-Aminosäurestandard (100 pmol). Anschließend wurde aus diesen Konzentrationen mittels der Ausbeute der Standardsequenzierung (1 nmol β-Lactoglobulin) auf die tatsächlich eingesetzte Proteinmenge geschlossen. Daraus ergab sich eine errechnete Proteinmenge von 1918 pmol für die isolierte Hydrogenase. Die Bestimmung nach Bradford führt demnach bei der [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* zu einer Unterschätzung der eigentlichen Konzentration um ca. die Hälfte. Diese Unterschätzung wurde durch die Konzentrationsbestimmung mit dem Farbstoff Rose-Bengal bestätigt. Hier ergaben die Messwerte ebenfalls deutlich höhere Proteinkonzentrationen (Faktor 1,5) in Bezug zur Bradford-Quantifizierung.

Die Identifizierung der einzelnen Untereinheiten sowie die Ermittlung ihrer Stöchiometrie erfolgten ebenfalls über die Edman-Sequenzierung. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.2 dargestellt. Die Existenz der fünf erwarteten Proteinuntereinheiten HoxE, F, U, Y und H der isolierten Hydrogenase konnte mit der Methode bestätigt werden. Die nacheinander identifizierten PTH-Aminosäuren stimmen mit den aus der DNA-Sequenz bekannten Aminosäuren der Untereinheiten überein. Im 8. Zyklus wurde kein Threonin und im 12. Zyklus kein Serin detektiert. Diese Aminosäuren sind in den Zyklen aufgrund der DNA-Sequenz von HoxE zu erwarten gewesen. Da die Konzentration von HoxE im Isolat gering ist (siehe unten), wird vermutlich in diesen Zyklen die Nachweisgrenze nicht erreicht. Die Aminosäure Cystein ist ohne vorherige Alkylierung im Edman-Abbau nicht nachweisbar. Aus diesem Grund ist in Zyklus 13 kein PTH-Cystein für HoxY vorhanden. Bis auf HoxF sind alle Proteinuntereinheiten N-terminal ohne initiales Methionin detektiert worden. Neben den bestätigten Untereinheiten wurden in manchen Abbauzyklen weitere PTH-Aminosäuren ermittelt. Diese können von zusätzlichen Proteinkomponenten stammen.

Die quantitative Abschätzung der einzelnen PTA-Aminosäuren über den gesamten Abbau, besonders in Zyklen, bei denen keine Parallelitäten einzelner Aminosäuren auftraten (Zyklus 5, 6, 7, 8, 10 und 13), ergab für HoxE:F:U:Y:H ein Verhältnis von 0,2:2:2:1:1. Die eigentlichen Hydrogenaseproteine HoxY und HoxH kommen damit im gleichen Verhältnis zueinander vor, genauso wie die Diaphorase-Untereinheiten HoxU und HoxF. Im gesamten Enzym-Komplex liegt dagegen die Diaphorase gegenüber der Hydrogenase doppelt so konzentriert vor. HoxE, die kleine Untereinheit der Diaphorase, bildet eine Ausnahme. Das Protein macht nur einen Anteil von 3,2 % Prozent im isolierten Komplex aus.

Tab. 5.2: Edman-Abbau und Sequenzierung der mittels Affinitätschromatographie isolierten [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Bestimmung der Stöchiometrie der Untereinheiten von HoxEFUYH. In der Sequenz nicht detektierte Aminosäuren sind mit einem X dargestellt.

Zyklus	PTH-AS HoxU	PTH-AS HoxF	PTH-AS HoxY	PTH-AS HoxH	PTH-AS HoxE
1	S	M	A	S	T
2	V	D	K	K	V
3	V	I	I	T	A
4	T	K	R	I	T
5	L	E	F	V	D
6	T	L	A	I	R
7	I	K	T	D	Q
8	D	E	V	P	X
9	D	I	W	V	V
10	K	A	L	T	P
11	A	T	A	R	P
12	I	K	G	I	X
13	A	S	X	E	A
Verhältnis	2	2	1	1	0,2

Insgesamt wird durch die Edman-Sequenzierung deutlich, dass die fünf Untereinheiten des Hydrogenase-Komplexes aus *Synechocystis* nach der Isolierung nicht in äquimolaren Mengen vorliegen. Dies kann den physiologischen Zustand widerspiegeln, kann aber auch durch die Reinigungsprozedur bedingt sein. Möglicherweise dissoziiert der Komplex während der Isolierung auseinander. Da der Strep-tag (II) an die große Diaphorase Untereinheit HoxF fusioniert ist, können einzelne Untereinheiten und Hydrogenase Komplexe ohne HoxF verloren gehen. Aus diesem Grund wurde die Stabilität des Enzym-Komplexes bei veränderten Reinigungsbedingungen getestet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

5.2.3 Stabilität des Hydrogenase-Komplexes: Einfluss der Pufferbedingungen

In verschiedenen Experimenten wurden die Pufferbedingungen während der Affinitätschromatographie (Kapitel 5.2.1) verändert, um die Stabilität des isolierten [NiFe] Hydrogenase-Komplexes zu testen.

Untersuchungen des Einflusses von EDTA und der Salzkonzentration sind in Abb. 5.10 dargestellt. Es wurden vier verschiedene Pufferbedingungen gewählt. Abweichend von Puffer W (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl) wurde die Salzkonzentration auf 50 mM NaCl gesenkt und außerdem die Zugabe von 1 mM EDTA untersucht. Die Hydrogenaseaktivität wurde als H₂-Produktion in Gegenwart von Methylviologen und Dithionit gemessen. Dargestellt ist die Anfangsaktivität nach der Isolierung in Units/mg sowie die

prozentuale Aktivität des Enzyms nach Aufbewahrung bei 6 °C und -80 °C in Bezug zur Anfangsaktivität (100 %) der jeweiligen Isolierung.

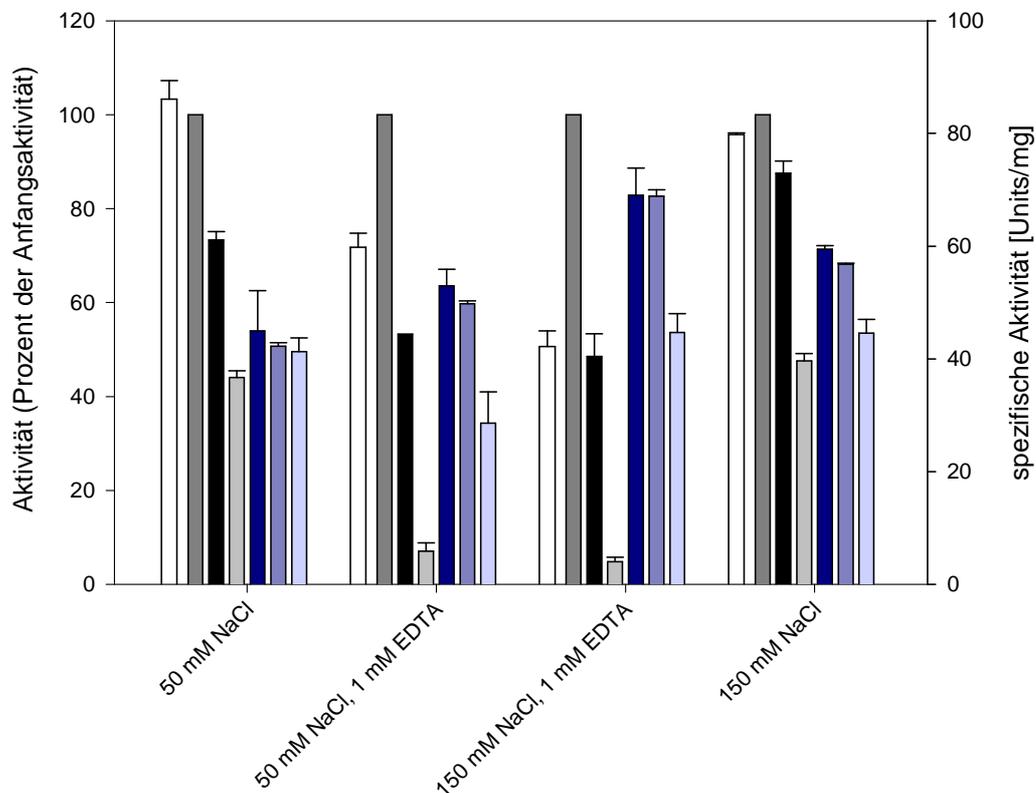


Abb. 5.10: Stabilität der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Das Enzym wurde in verschiedenen Puffern mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Alle Puffer beinhalteten 100 mM Tris (pH 8,0). Variiert wurde die Konzentration von NaCl (50 und 150 mM) sowie die Zugabe von 1 mM EDTA. Die Hydrogenaseaktivität wurde als H₂-Produktion in Gegenwart von Methylviologen und Dithionit gemessen. Dargestellt ist die Anfangsaktivität in Units/mg und die prozentuale Aktivität des Enzyms nach Aufbewahrung bei 6 °C und -80 °C in Bezug zur Anfangsaktivität der jeweiligen Isolierung. *Die Enzymprobe wurde zwei Mal in flüssigem Stickstoff eingefroren. (1 Unit = Produktion von 1 μmol H₂ min⁻¹)

Ein Vergleich der einzelnen Anfangsaktivitäten zueinander zeigt deutlich geringe Aktivitäten der mit EDTA isolierten Hydrogenasen. Außerdem lässt die Aktivität der Hydrogenase durch Zugabe von EDTA bei 6 °C schneller nach als ohne EDTA. Eine Konzentration von 150 mM NaCl ist deutlich besser als 50 mM NaCl für die Wahrung der Hydrogenaseaktivität nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und der Lagerung bei -80 °C. Das Enzym verliert durch längere Lagerung bei -80 °C (gemessen nach 42 Tagen) im Vergleich zur kurzen Lagerung (gemessen nach 4 Tagen) in allen vier untersuchten Puffern kaum zusätzlich an Aktivität. Erneutes Einfrieren und Auftauen senkt die Aktivität allerdings beträchtlich. Eine Ausnahme bildet die isolierte Hydrogenase in 50 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 8). Der Enzymkomplex ist

in allen Puffern relativ stabil während der Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, verliert allerdings durch den Prozess des Einfrierens/Auftauens deutlich an Aktivität. Insgesamt bleibt die Aktivität in Puffer W über alle Zeiträume am besten erhalten. Die unter den vier verschiedenen Bedingungen isolierten [NiFe] Hydrogenasen wurden am Tag der Isolierung zusätzlich in einer nativen Gelelektrophorese untersucht (Abb. 5.11). Alle Isolate zeigen dabei jeweils mind. zwei native Hydrogenase-Formen. Die Zugabe von EDTA während der Aufreinigung resultiert in einer weiteren Form des Hydrogenase-Komplexes. Die Auftrennung der Komplexe in der nativen Gelelektrophorese erfolgt über das Verhältnis von Ladung zu Größe, weshalb die unterschiedlichen Laufstrecken keine exakten Aussagen über die Größe und damit die Zusammensetzung zulassen.

Die zwei gewählten Salzkonzentrationen (50 mM und 150 mM NaCl) während der Affinitätschromatographie führen jeweils zu einer Doppelbande im nativen Gel. Da die Abnahme der Aktivität über die Zeit bei 150 mM NaCl deutlich geringer ausfällt als bei 50 mM NaCl, wurde mit der höheren Salzkonzentration weiter gearbeitet.

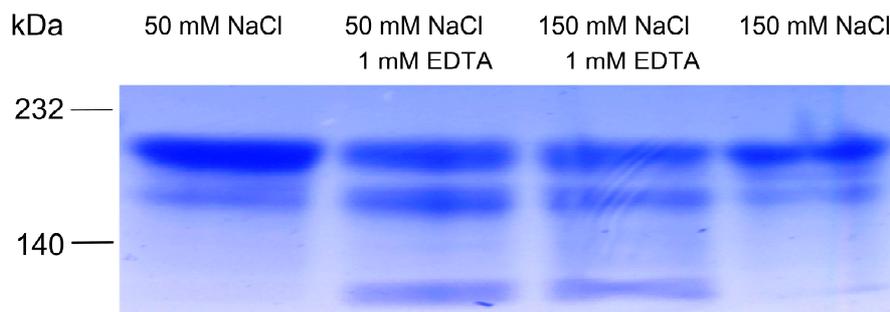


Abb. 5.11: 16,5%iges „Clear native“ Gel mit der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Das Enzym wurde in verschiedenen Puffern mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Alle Puffer beinhalteten 100 mM Tris (pH 8,0). Variiert wurde die Konzentration von NaCl (50 und 150 mM) sowie die Zugabe von 1 mM EDTA. Der Proteingehalt pro Spur betrug ca. 36 μg . Das native Gel wurde Coomassie Blau gefärbt.

Einfluss des pH-Werts

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Stabilität des Hydrogenase-Komplexes untersucht (Abb. 5.12). Das Enzym wurde in vier verschiedenen Puffern (100 mM Kp_i -Puffer (pH 6,0), 100 mM Kp_i -Puffer (pH 7,0), 100 mM Tris (pH 8,0) und 100 mM Tris (pH 9,0)) mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Alle Puffer beinhalteten zusätzlich 150 mM NaCl. Die Enzymstabilität, gemessen als prozentuale Aktivität in Bezug auf die jeweilige Anfangsaktivität (100 %), zeigt sich nach einem Tag bei $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Puffer mit pH 8,0 und 9,0 deutlich höher als im Puffer mit pH 6,0 und 7,0. Die Anfangsaktivität am Tag der Isolierung beträgt bei pH 9,0 allerdings nur ca. 1/3 der Anfangsaktivität bei pH 8,0. Vier Tage nach der Isolierung ist keine Aktivität mehr für pH 6,0 messbar. Am stabilsten zeigt sich der Hydrogenase-Komplex bei pH 8,0.

Im nativen Gel sind keine Unterschiede zwischen den bei verschiedenen pH-Werten isolierten Hydrogenasen erkennbar (Ergebnis nicht dargestellt). Eine Variation des pH-Werts führt demnach nicht zur Stabilisierung eines einzigen nativen Hydrogenase-Komplexes.

Es wurde außerdem versucht, die Enzymstabilität durch Zugabe von 10 % (w/v) PEG 6000, 10 % (v/v) Glycerin oder 25 % (v/v) Glycerin während der Aufreinigung zu erhöhen. Es war kein positiver Effekt erkennbar (Ergebnis nicht dargestellt).

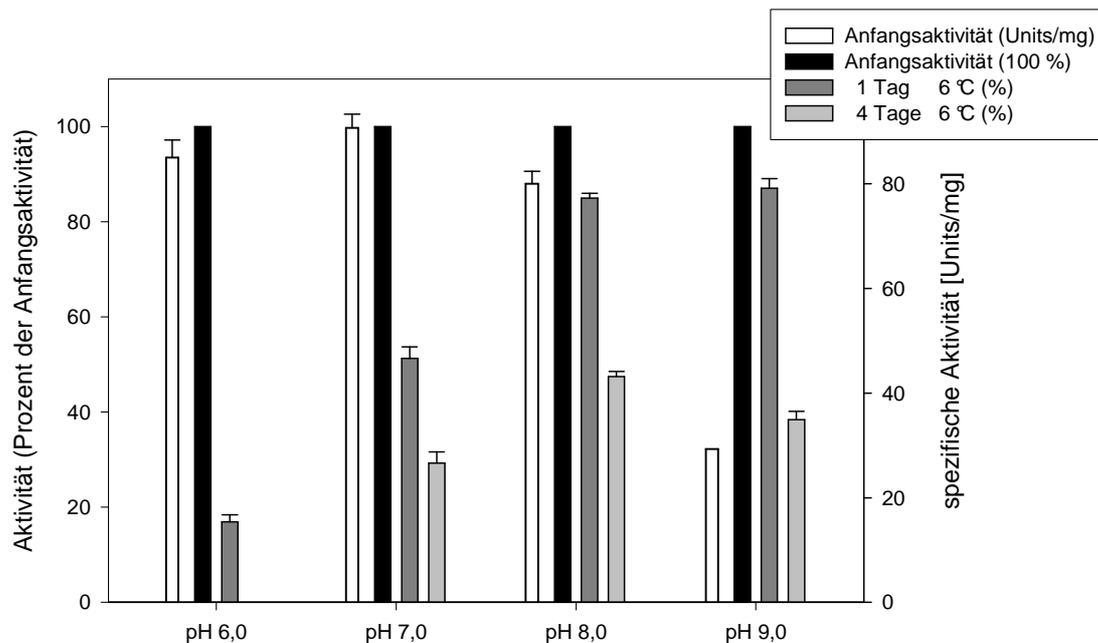


Abb. 5.12: Stabilität der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Das Enzym wurde in verschiedenen Puffern (100 mM K_p -Puffer pH 6,0 und 7,0; 100 mM Tris pH 8,0 und 9,0) mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Alle Puffer beinhalteten 150 mM NaCl. Die Hydrogenaseaktivität wurde als H_2 -Produktion in Gegenwart von Methylviologen und Dithionit gemessen. Dargestellt ist die Anfangsaktivität in Units/mg und die prozentuale Aktivität des Enzyms nach Aufbewahrung bei 6 °C in Bezug zur Anfangsaktivität der jeweiligen Isolierung. (1 Unit = Produktion von $1 \mu\text{mol } H_2 \text{ min}^{-1}$).

Abschließend ist festzustellen, dass unter den getesteten Isolierungsbedingungen die Hydrogenaseaktivität über die Zeit am besten im Puffer W (100 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl) erhalten bleibt.

5.2.4 Gelfiltration

Im Zuge der Kristallisierungsexperimente erfolgte eine Gelfiltration. 2 mg des über die StrepTactin-Säule isolierten Enzyms wurden in Puffer W mit einer Konzentration von 6,5 mg/ml auf eine Gelfiltrationssäule HiLoadTM 16/60 SuperdexTM 200 pregrade (GE Healthcare, München) aufgetragen. Die Säule hat eine Höhe von 60 cm und einen Durchmesser von 1,6 cm (Säulenvolumen $V_t = 120,6 \text{ ml}$). Das Elutionsprofil dieser Größen-

Ausschluss-Chromatographie ist in Abb. 5.13 dargestellt. Mehrere Absorptionspeaks zeigen, dass nach der Isolierung verschiedene Hydrogenase-Komplexe vorliegen.

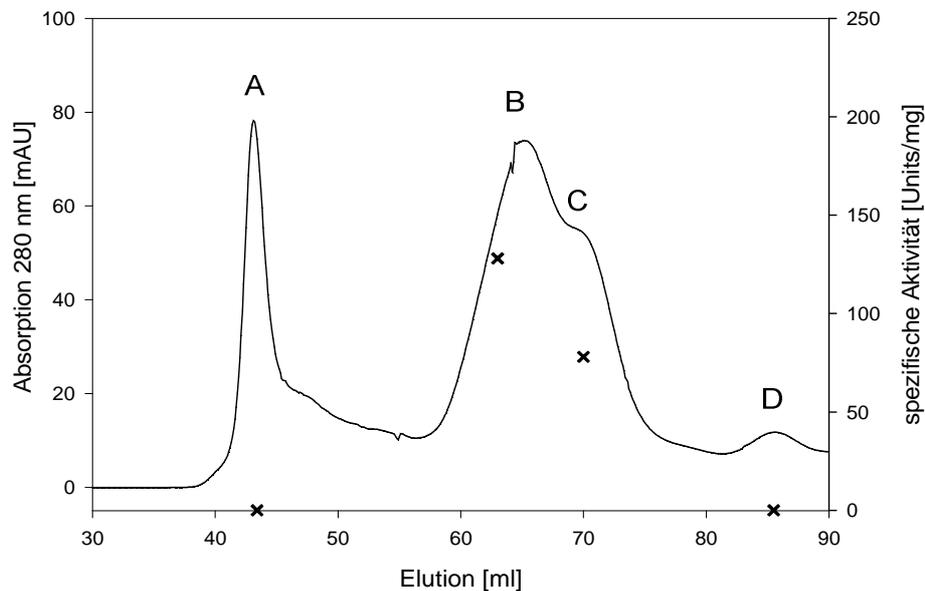


Abb. 5.13: Gelfiltrationslauf der mittels Affinitätschromatographie isolierten [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. 2 mg Protein wurden auf eine HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pregrade Säule (GE Healthcare, München) mit einer Höhe von 60 cm und einem Durchmesser von 1,6 cm appliziert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min x: Die Hydrogenaseaktivität wurde als H₂-Oxidation (Unit = Oxidation von 1 μmol H₂ min⁻¹) gemessen.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der verschiedenen Enzymformen wurde die Gelfiltrationssäule kalibriert (Abb. 5.14). Verwendet wurden Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts aus dem High und Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare, München). Über die Elutionsvolumina (V_e) der jeweiligen Standardproteine und das zuvor bestimmte Ausschlussvolumen der Säule ($V_o = 44$ ml) konnte mit Hilfe der Formel 5.1 der Verteilungskoeffizient (K_{AV} -Wert) berechnet werden.

$$K_{AV} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)} \quad (5.1)$$

Nach Erstellen einer Kalibrierungsgeraden (Abb. 5.14) mit der Gleichung ($K_{AV} = -0,1862 \cdot \ln(\text{Molekulargewicht (kDa)}) + 1,2393$) und dem Regressionskoeffizienten $R^2 = 0,983$ wurde das Molekulargewicht der einzelnen Elutionseinheiten der Hydrogenase errechnet. Die Proteine des Peak A eluieren bei 42 - 45 ml. Sie liegen im Bereich des Ausschlussvolumens und damit außerhalb der Trennfähigkeit der Säule (bis 600 kDa). Der Komplex in Peak A ist in einem erneuten Gelfiltrationslauf stabil, zeigt allerdings genauso wie die Fraktionen von Peak D (83 ml - 88 ml) keine Hydrogenaseaktivität (gemessen als H₂-Aufnahme). Das Molekulargewicht der Proteine von Peak D beträgt ca. 41 kDa. Die zwei

nativen Enzymkomplexe mit der Größe von ca. 175 kDa (Peak B) und ca. 124 kDa (Peak C) sind aktiv. Anhand der Aminosäuresequenz der Hydrogenase von *Synechocystis* lässt sich ein Molekulargewicht von ca. 176 kDa für einen Komplex, bestehend aus den Untereinheiten HoxEFUYH, errechnen. Dies entspricht der Größe des Proteins, das als Peak B eluiert.

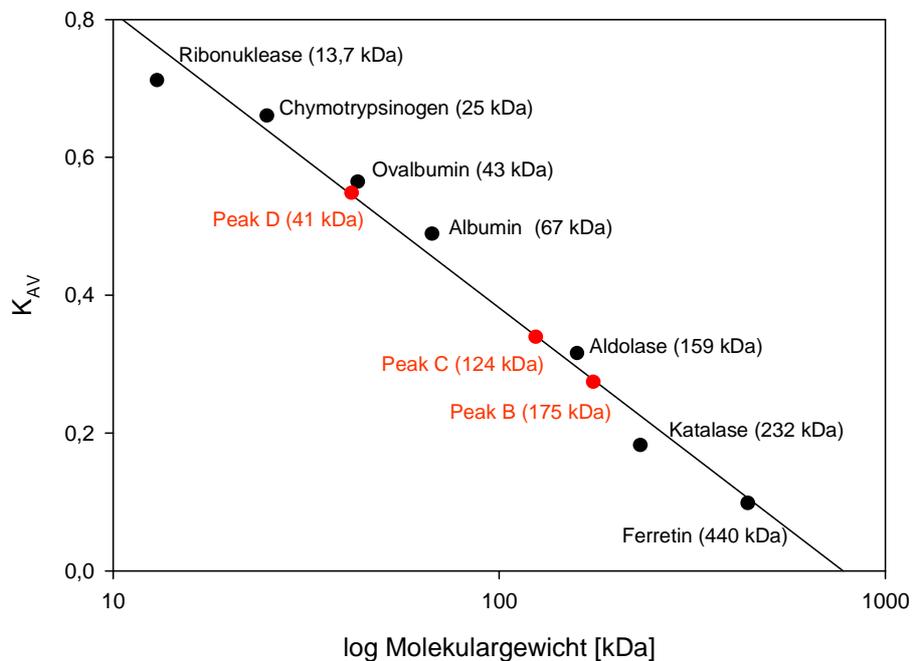


Abb. 5.14: Kalibrierung der HiLoadTM 16/60 SuperdexTM 200 pregrade Säule (GE Healthcare, München) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min (schwarz). Verwendet wurden Proteine des Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare). Der Verteilungskoeffizient (K_{AV}) wurde gegen das Molekulargewicht der Proteine aufgetragen. Darstellung der errechneten Molekulargewichte der Proteine aus Peaks B, C, D der Gelfiltration (rot).

Die native Gelelektrophorese (Abb. 5.11) zeigt im Gegensatz zu der Gelfiltration (Abb. 5.13) nur zwei Protein-Komplexe der isolierten Hydrogenase in Puffer W. Proteine des Peak D der Gelfiltration sind evtl. in der Probe zu schwach konzentriert, um im nativen Gel sichtbar zu werden. Die Agglomeration des Enzym-Komplexes zu einer Größe von >600 kDa (Peak A) resultiert vermutlich aus Effekten während des langen Laufs in der Gelfiltration oder durch Auftauen und Einfrieren. Da die Gelfiltrations-Analysen im Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble) durchgeführt wurden, war die Probe außergewöhnlich lange eingefroren und wurde mehrmals aufgetaut. Dagegen erfolgte die native Gelelektrophorese direkt nach Isolierung der Hydrogenase. Die Enzymform in Peak A stellt keinen physiologischen Zustand dar, sondern ist ein inaktives Artefakt.

Um die aktive Enzymform in Peak B, die entsprechend ihrer Größe einen Komplex aus äquimolaren Mengen HoxEFUYH darstellen könnte, von dem kleineren Komplex (Peak C) zu separieren, wurde eine Anionen-Austausch-Chromatographie als zusätzlicher Reinigungsschritt nach der Gelfiltration durchgeführt.

5.2.5 Anionen-Austausch-Chromatographie

Die Elutionsfraktionen des Peaks B (58 - 64 ml) aus der Gelfiltration (Abb. 5.13) wurden zusammengefasst und auf eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml konzentriert. Anschließend erfolgte die Applikation von 100 µg der Hydrogenase auf eine MonoQ 5/50 Säule (GE Healthcare, München) mit einer Höhe von 5 cm und einem Durchmesser von 0,5 cm (Säulenvolumen $V_t = 1$ ml). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Zunächst wurde mit verschiedenen NaCl Konzentrationen in Stufengradienten der Konzentrationsbereich für die Elution der Hydrogenase getestet. Die Reinigung erfolgte schließlich in einem linearen Gradienten. Das Elutionsprofil dieses Gradienten mit 1 M NaCl-Lösung (0 - 1 M NaCl in 20 min) ist in Abb. 5.15 dargestellt. Die aktive Hydrogenase eluiert bei 440 - 510 mM NaCl (Pfeil). Weitere kleine Absorptionspeaks verdeutlichen, dass die Hydrogenasefraktionen aus der Gelfiltration mittels Anionen-Austausch-Chromatographie weiter gereinigt werden können.

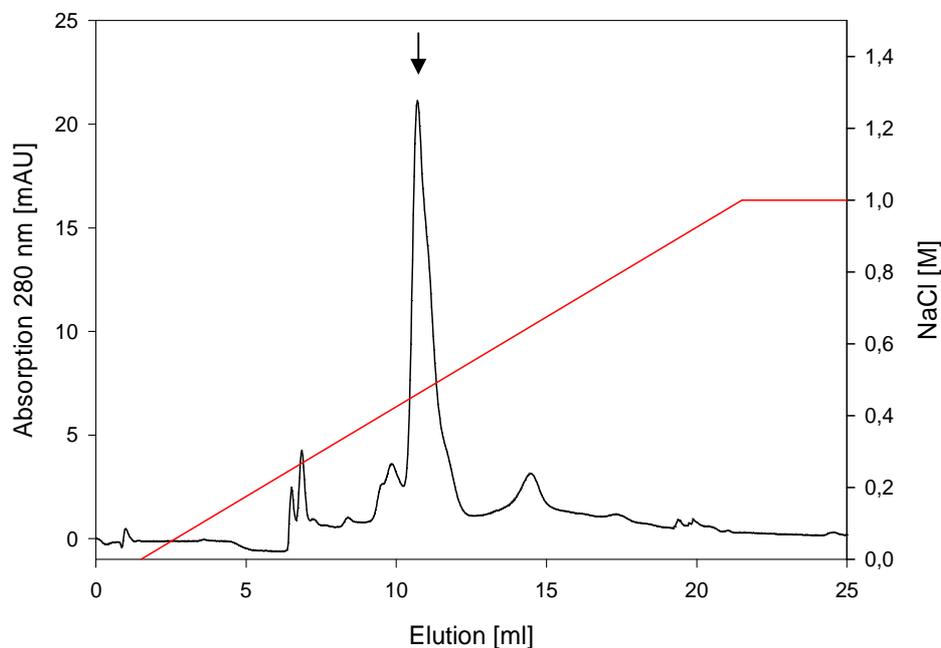


Abb. 5.15: Chromatographie der Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Verwendet wurde eine MonoQ 5/50 Anionen-Austausch-Säule (GE Healthcare, München) mit einer Höhe von 5 cm und einem Durchmesser von 0,5 cm. 100 µg Protein (Peak B aus der vorgeschalteten Gelfiltration, Abb. 5.13) wurde mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml appliziert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Eluiert wurde in einem linear steigenden Gradienten mit 1 M NaCl-Lösung (0 - 1 M NaCl in 20 min).

Der Hydrogenase-Komplex nach der Gelfiltration und anschließenden Anionen-Austausch-Chromatographie (10,5 - 12 ml Elutionsfraktionen) weist das Molekulargewicht von ca. 175 kDa auf und bleibt in einem erneuten Gelfiltrationslauf stabil und aktiv. Das Ergebnis zeigt, dass die beiden zusätzlichen Reinigungsschritte notwendig sind, um einen einzigen stabilen und aktiven Hydrogenase-Komplex zu erhalten. Ein Nachteil der Prozedur besteht darin, dass durch die Folge der Reinigungsschritte viel Enzym verloren geht.

5.3 Zelluläre Position der [NiFe] Hydrogenase

5.3.1 Physiologischer Zustand

Nach der Isolierung der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* über Affinitätschromatographie liegen mindestens zwei unterschiedlich zusammengesetzte Komplexe vor. Dies geht aus der nativen Gelelektrophorese (Kapitel 5.2.3) und der Gelfiltration (Kapitel 5.2.4) hervor. Um der Frage nachzugehen, ob diese Formen den physiologischen Zustand widerspiegeln oder durch die Reinigungsprozedur bedingt sind, wurden verschiedene Gesamtproteinextrakte über native Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 5.16).

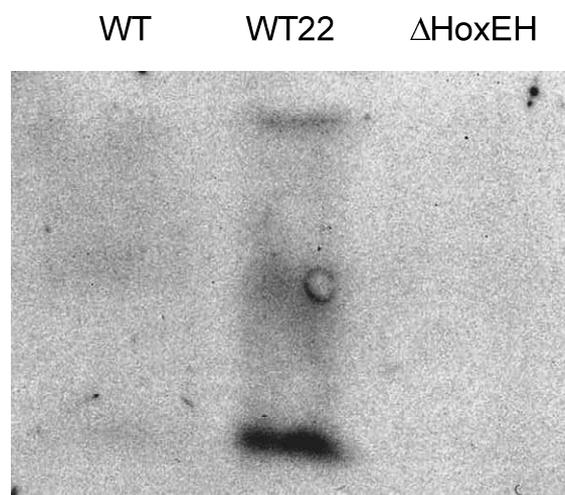


Abb. 5.16: Western Blot-Analyse mit Antikörper gegen HoxF. Gesamtproteinextrakte des *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyps (WT), der Mutante mit *psbAII*-Promotor vor dem *hox*-Operon (WT22) und der HoxEFUYH Deletionsmutante (Δ HoxEH) wurden über ein 16,5%iges „Clear native“ Gel separiert.

Verwendet wurde der Extrakt vom *Synechocystis* Wildtyp (WT) von der Mutante mit *psbAII*-Promotor stromaufwärts des *hox*-Operon (WT22) und der HoxEFUYH Deletionsmutante (Δ HoxEH). Die Detektion der Hydrogenase erfolgte über einen Western Blot mit Antikörper gegen HoxF. Bei der WT22 Mutante sind drei unterschiedliche Banden deutlich zu erkennen, die beim Wildtyp nur sehr schwach und bei der Deletionsmutante gar nicht erscheinen. Die Intensität der Banden ist in der Überexpressionsmutante, wie erwartet, ausgeprägter.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hydrogenaseformen mit unterschiedlicher Stöchiometrie der Untereinheiten in der Zelle vorliegen könnten. Es könnte auch sein, dass die Untereinheiten in äquimolaren Mengen vorliegen, die Komplexe sich aber zu Dimeren oder Multimeren zusammenlagern. Die Auftrennung der Komplexe in der nativen Gelelektrophorese erfolgt über das Verhältnis von Ladung zu Größe, weshalb die

unterschiedlichen Laufstrecken keine exakten Aussagen über die Größe zulassen. Dennoch ist auffällig, dass die Banden deutlich höher liegen als die Banden der isolierten Hydrogenase (Abb. 5.11). Daher ist es ebenfalls möglich, dass das Enzym in der Zelle an unterschiedliche Komponenten assoziiert ist.

5.3.2 Protein-Assoziation

Die Verbindung von Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) eignet sich zur Identifizierung von Proteinen mit geringer Konzentration in komplexen Proben. Die Nachweisgrenze von Proteinen liegt bei ca. 10 fmol. Die Methode erwies sich daher als besonders geeignet, um zu untersuchen, welche Proteine an der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 assoziiert sein könnten. Zu diesem Zweck wurde die isolierte Hydrogenase aus der Affinitätschromatographie (Kapitel 5.2.1) in verschiedenen Konzentrationen auf denaturierende Tricin-SDS Gele aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden 8 Proteinbanden ausgeschnitten (Abb. 5.17) und per LC-ESI-MS/MS analysiert.

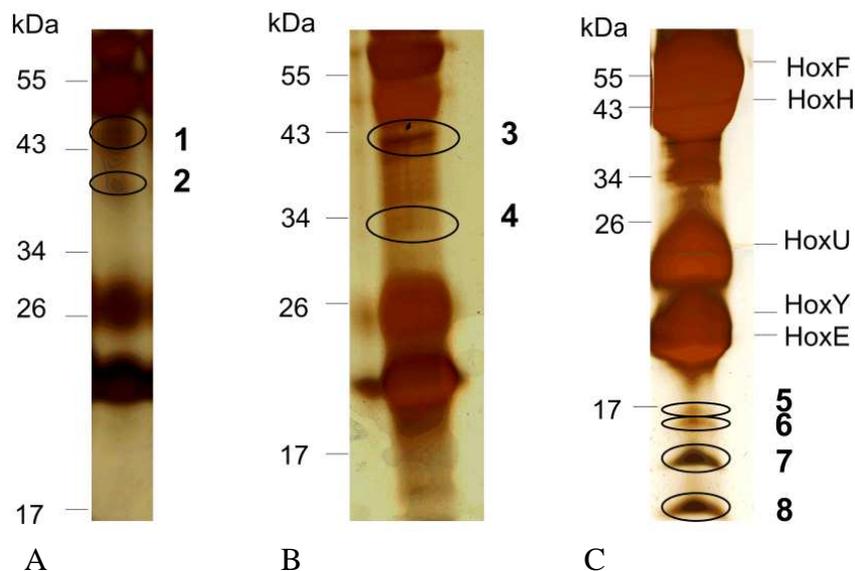


Abb. 5.17: Gelelektrophorese der isolierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 in 16,5 (A, C) bzw. 10 %igen (B) Tricin-SDS Gelen. Die 8 umkreisten Banden wurden mittels LC-ESI-MS/MS analysiert.

Eine Zusammenfassung der massenspektrometrischen Analyse liefert Tab. 5.3. Dargestellt ist eine Auswahl der identifizierten Proteine, deren Sequenz durch die Tandem-Massenspektrometrie zu mindestens 29 % abgedeckt wurde. Die Tabelle umfasst nicht die detektierten ribosomalen Proteine sowie Proteine unbekannter Funktion. Viele Proteine wurden in mehreren der ausgeschnittenen Banden detektiert. Die Identifizierung mit der höchsten Abdeckung ist fett gedruckt.

Tab. 5.3: Auswahl von Proteinen der LC-ESI-MS/MS-Analyse, die gemeinsam mit der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 in der Affinitätschromatographie eluieren. Die nicht dargestellten Proteine umfassen ribosomale Proteine und Proteine unbekannter Funktion.

Bezeichnung (Cyanobase)	Beschreibung	Ab- deckung	Masse (kDa)	Gel- Bande
slr0757	KaiB homolog	73,3	11928	8
sll0822	AbrB-ähnlicher Transkriptionsfaktor	72,1	13953	6,5,7
sll0982	Thylakoidmembran-assoziiertes Protein	68,8	14274	7
slr0012	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RuBisCO) kleine Untereinheit (rbcS)	67,3	13231	7,8
sll0359	AbrB-ähnlicher Transkriptionsfaktor	65,8	17208	6,5,7
slr1256	Urease γ Untereinheit (ureA)	65	11049	8
slr2075	10 kDa Chaperonin (groES)	61,3	11172	8
sll1721	Pyruvat Dehydrogenase, (E ₁) Pyruvat Dehydrogenase Komplex	57,7	35686	2,4
sll1638	Periphere Untereinheit des Photosystem II (psbQ)	57,7	16467	7
slr0623	Thioredoxin (trxA)	56,1	11741	7
slr1839	CcmK, CO ₂ -Konzentrierungsmechanismus	52,7	11895	8
sll0819	Photosystem I, Untereinheit III (psaF)	52,1	18237	6,5,7
ssr3383	Phycobilisom LC Bindeprotein (apcC)	49,3	7800	8
sll0617	Vipp1, Plasmamembran-assoziiert, essenziell für die Thylakoidmembran Bildung	49,1	28888	4,2,3
slr0013	Plasmamembran-assoziiertes Protein	48,6	18678	6,8
slr0879	Glycin Decarboxylase Komplex H-Potein (gcvH)	47,7	14571	8,7,6,5
slr1623	NADH Dehydrogenase I, Untereinheit M	46,3	14069	7
slr1096	Dihydrolipoamid Dehydrogenase, (E ₃) Pyruvat Dehydrogenase Komplex	45,8	51232	1
sll0679	SphX Protein Vorläufer (sphX)	44,3	36756	4,2
slr1562	Glutaredoxin (grxC)	43,1	12214	7
slr1513	sbtB, Komponente des Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Transporters	38,2	11999	7,5,8
ssl3093	Phycocyanin-assoziiertes Bindeprotein (cpcD)	36,1	9317	8
ssl2009	Thylakoid-Membranprotein	33,3	10799	8
slr1128	mögliches Membranprotein	32,7	35705	2,4
sll0891	2-Ketosäuren Dehydrogenase (Malat Dehydrogenase, Lactat Dehydrogenase) (citH)	31,5	34324	4,2
sll1841	Dihydrolipoamid Acetyltransferase, (E ₂) Pyruvat Dehydrogenase Komplex	29,6	44870	3,4,2,1

Interessanterweise wurden in allen analysierten Proteinbanden die fünf Hox-Untereinheiten der Hydrogenase mit jeweils sehr hoher Abdeckung identifiziert. Dies macht deutlich, wie stark das Enzym dominiert und dass die koeluierenden Proteine im Vergleich sehr gering konzentriert sind. Eine Überladung des Gels war notwendig, um neben den Hox-Untereinheiten weitere Banden im Gel sichtbar zu machen. Es kann sich bei allen Kandidaten auch um Proteine handeln, die mit dem StrepTactin der Säule interagieren und nicht an die Hydrogenase von *Synechocystis* assoziiert sind.

Unter den koeluierenden Proteinen befinden sich neben cytosolischen auch Thylakoid- bzw. Plasmamembran-assoziierte Proteine, die möglicherweise für die Membran-Assoziation der Hydrogenase in *Synechocystis* verantwortlich sein können. Überraschenderweise wurden

außerdem zwei AbrB-ähnliche Transkriptionsfaktoren (sll0822, sll0359) detektiert, die im Zusammenhang mit der Regulation der Hydrogenase von *Synechocystis* bekannt sind (Ishii und Hihara, 2008; Oliveira und Lindblad, 2008). Weitere Proteine sind nennenswert, die für eine physiologische Funktion der Hydrogenase interessant sein könnten, wie die drei Komponenten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (sll1721, slr1096, sll1841), die 2-Ketosäuren Dehydrogenase (sll0891), die periphere Untereinheit M der NADPH Dehydrogenase, Komplex I (slr1623) und die Untereinheit H des Glycin Decarboxylase-Komplexes.

5.3.3 Zelluläre Lokalisierung

Um der Frage nachzugehen, wo die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 zellulär lokalisiert ist, wurden die Thylakoid- (TM) und Plasmamembranen (PM) der *Synechocystis* Mutante B (Kapitel 5.1.3) mit fusioniertem Strep-tag (II) an HoxF mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt und anschließend isoliert. Zusammen mit den Gesamtmembranen (GM) und dem cytosolischen Extrakt (CE) wurde das Vorkommen der Hydrogenase in den Proben über eine Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 5.18). Dabei wurde ein Antikörper gegen den Strep-tag (II) verwendet. Die aus der Mutante isolierte [NiFe] Hydrogenase (H) diente als Positivkontrolle. In allen Proben erscheint bei ca. 58 kDa, entsprechend der Größe von HoxF, ein Signal.

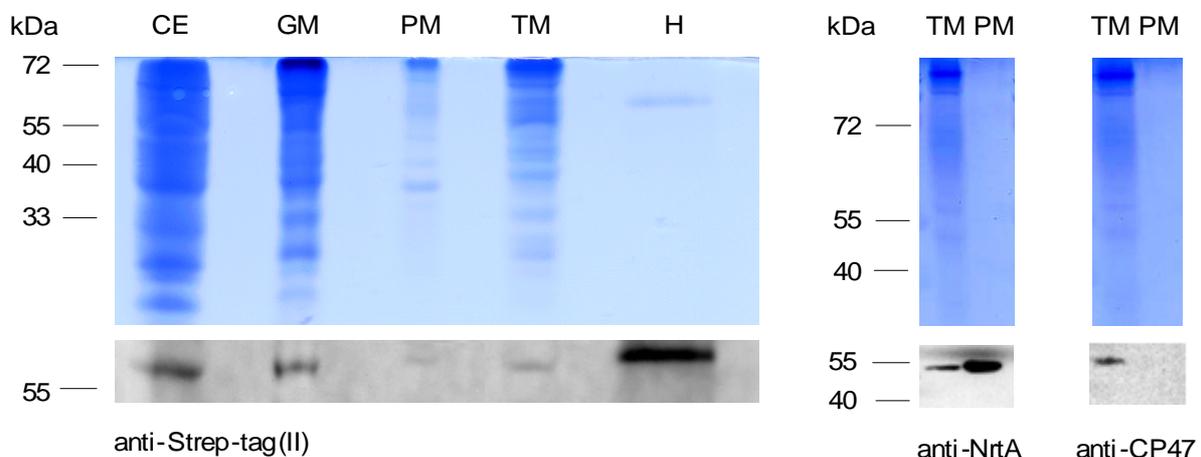


Abb. 5.18: Western Blot-Analyse mit Antikörper gegen Strep-tag (II) zur Identifizierung der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 im cytosolischen Extrakt (CE), im Gesamtmembran Extrakt (GM), in der Plasmamembran (PM) und in der Thylakoidmembran (TM). Zur Kontrolle diente die isolierte Hydrogenase aus *Synechocystis* (H). Die Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen NrtA und CP47 dienten zur Überprüfung der Reinheit der TM- und PM-Fraktion. NrtA ist als Markerprotein nur in der PM, das Chlorophyll-bindende Protein CP47 dagegen nur in der TM vorhanden. Verwendet wurden 16,5 % Tricin-Gele.

Über eine zusätzliche Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen die Proteine NrtA und CP47 wurde überprüft, wie rein die isolierten Fraktionen der Thylakoid- und Plasmamembran

sind. CP47 ist ein Chlorophyll-bindendes Protein und aus diesem Grund in den Thylakoidmembranen lokalisiert. Als Markerprotein für die Plasmamembran diente NrtA, welches eine Komponente des Nitrattransporters in dieser Membran von *Synechocystis* ist.

Das Protein CP47 konnte ausschließlich in der TM-Fraktion nachgewiesen werden. Allerdings ist der Proteinauftrag der beiden Fraktionen nicht vergleichbar, weshalb eine Verunreinigung der Plasmamembran mit Thylakoidmembran nicht ausgeschlossen werden kann. Die Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration sind für Plasma- und Thylakoidmembran Isolate von *Synechocystis* ungenau (Backasch, 2008). In den isolierten Thylakoidmembranen erscheint bei großem Proteinauftrag ein schwaches Signal für das Protein NrtA. Die Fraktion ist demnach mit Plasmamembranen verunreinigt. Vergleicht man die Signalstärken der Banden in Bezug zum Proteinauftrag, erkennt man, dass es sich nur um eine sehr schwache Verunreinigung handelt. Unter Berücksichtigung dieser sehr geringen Verunreinigung resultiert die mittels Western Blot gegen Strep-tag (II) nachgewiesene Hydrogenase in der TM-Fraktion sicherlich zum Teil daraus, dass das Enzym tatsächlich dort assoziiert ist. Die Western Blot-Analyse zeigt deutlich, dass die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sowohl gelöst im Cytosol als auch in der Fraktion der Gesamtmembran vorliegt.

Über ein quantitativ unterschiedliches Vorkommen der Hydrogenase in gelöster bzw. Membran-assoziiierter Form können keine Aussagen getroffen werden, da die aufgetragenen Proteinmengen, trotz Proteinbestimmung, stark variieren.

5.4 Kristallisierung

Die Grundvoraussetzung und gleichzeitig der schwierigste Schritt bei der Strukturaufklärung eines Proteins mittels Röntgenkristallographie ist die Erzeugung geeigneter Kristalle. Die spezifischen Kristallisationsbedingungen eines Proteins lassen sich nicht herleiten, sondern müssen durch zahlreiche Versuchsansätze herausgearbeitet werden. Ein wichtiger Faktor, der zum Gelingen der Kristallisierung beiträgt, ist eine hohe Reinheit des eingesetzten Proteins. Die Reinheit der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* nach der Affinitätschromatographie wurde mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft und als hoch eingestuft (Kapitel 5.2.1).

Aus diesem Grund wurde das aus der Affinitätschromatographie isolierte Enzym, nachdem es durch eine 0,45 µm Membran filtriert wurde, direkt verwendet. Die Kristallisationsansätze wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Juan-Carlos Fontecilla-Camps am Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Die ersten Versuchsreihen wurden bei 20 °C in Puffer W manuell nach der Methode des „sitzenden Tropfens“ mit Enzymkonzentrationen von 5 mg/ml - 10 mg/ml durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Hydrogenase bei einer Konzentration von 7 - 8,5 mg/ml (ermittelt mit Rose Bengal) am besten verhielt. Mit einer Enzymkonzentration von 8,4 mg/ml wurden mit Hilfe eines Robotersystems nach der Methode des „hängenden Tropfens“ 434 verschiedene Konditionen

getestet. Daraus resultierte ein Ansatz mit einer vielversprechenden Bildung von Spheruliten (Abb. 5.19 A), die an ihrer Oberfläche kleine Kristallnadeln aufweisen. Es gelang nicht mit einem isolierten und zerstoßenen Spherulit als Keim, Einzelkristalle zu züchten.

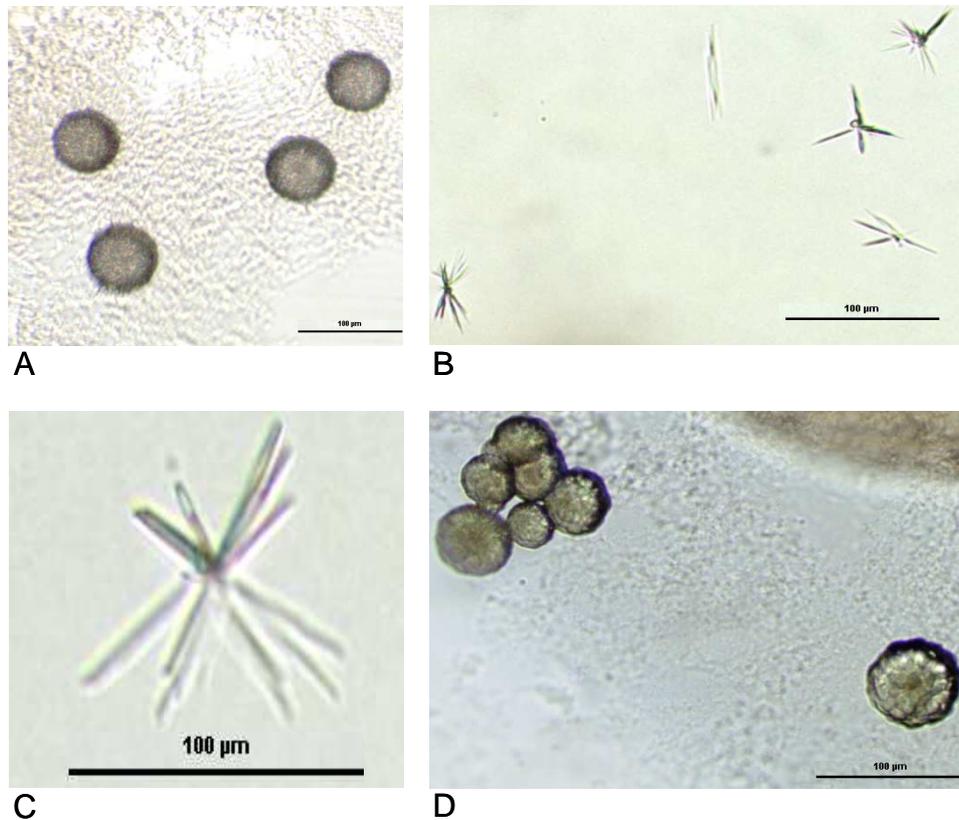


Abb. 5.19: Kristallisierung der [NiFe] Hydrogenase in Puffer W aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 nach der Methode des „hängenden Tropfens“ (A) und des „sitzenden Tropfens“ (B, C, D). (A) Spherulit, nach Zugabe von 0,2 M Zink Acetat, 0,1 M Natrium Cacodylat (pH 8,5), 10 % (v/v) Isopropanol. (B) Kristallnadeln, nach Zugabe von 18 % (w/v) PEG 6000, 25 mM N-Octyl- β -D-glucosid, 100 mM CHES pH 9,0. (C) Kristallnadel, nach Zugabe von 14 % (w/v) PEG 6000, 2 mM N, N-Dimethyldodecylamin-N-oxid, 100 mM CHES pH 10,0. (D) Spherulit, gewachsen unter den gleichen Voraussetzungen wie in (C), allerdings wurde zusätzlich 0,1 M Praseodymium (III) Chlorid Hexahydrat zugegeben. Alle Strukturen erschienen nach mehrtägiger Inkubation bei 20 °C. Die Enzymkonzentration von (A) betrug [7 mg/ml] und von (B, C und D) [8,4 mg/ml].

In vielen manuellen Ansätzen stellte sich heraus, dass hohe Konzentrationen an zugegebenen Präzipitanten wie Salzen (z. B. ab 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) oder Polyethylenglykolen sowie niedrigeren pH-Werten als 5,5 zur Bildung von sehr starken Aggregaten führten. Generell erwiesen sich höhere pH-Werte (8 - 10) als geeigneter. Die Zugabe von PEG 6000 in Konzentrationen zwischen 10 und 20 % (w/v) führte zu ersten interessanten Phasenbildungen, die sich unter Zugabe des Detergenz N-Octyl- β -D-glucosid zu kleinen Kristallnadeln formierten (Abb. 5.19 B). Weitere 21 Detergenzien (Detergent Screen1, Hampton Research, CA, USA) wurden bei unterschiedlichen alkalischen pH-Werten und unter Zugabe von

verschiedenen Konzentrationen PEG 6000 getestet. Das beste daraus resultierende Ergebnis war die Bildung größerer Nadeln unter Zugabe von 14 % (w/v) PEG 6000, 2 mM N, N-Dimethyldodecylamin-N-oxid, 100 mM CHES pH 10 (Abb. 5.19 C). Um größere und im besten Fall einzelne Kristallnadeln zu bekommen, wurden diese Bedingungen mit den Substanzen aus dem Additive Screen-HR2-428 (Hampton Research, CA, USA) kombiniert. Durch die Zugabe von 0,1 M Praseodymium (III) Chlorid Hexahydrat bildeten sich interessante Spherulite (Abb. 5.19 D). Die Größe und Form der Kristallnadeln konnte nicht verbessert werden. Dies gelang auch nicht durch weitere Keimungsversuche oder Änderung der Inkubationstemperatur von 20 °C auf 4 °C. Außerdem wurde die Zugabe von 0,28 mM FMN getestet. Diese Ansätze zeigten eine deutlich höhere Löslichkeit/Stabilität der Hydrogenase, aber keine Optimierung der Kristallnadeln. Ein Test mit dem Farbstoff IZIT (Hampton Research, CA, USA) zeigte, dass es sich bei den erhaltenen Kristallnadeln um Protein- und nicht um Salzkristalle handelt (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse insgesamt machen deutlich, dass sich die [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* generell kristallisieren lässt. Die erzeugten Kristallnadeln liegen allerdings selten einzeln vor. Meist sind mehrere Nadeln aus einem Kristallisationskeim hervorgegangen. Für eine Röntgenstruktur-Analyse werden größere und einzelne Kristallnadeln benötigt. Konstantes langsames Wachstum von Proteinkristallen erfolgt unter weniger übersättigten Bedingungen als deren Keimung. In dieser Arbeit wurden verschiedene Bedingungen gefunden, unter denen die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* Kristallkeime bildet. Durch einen Transfer dieser Keime (zerstoßende Kristalle) in neue Proteinlösungen mit einem geringen Maß an Übersättigung konnte das Wachstum nicht optimiert werden. Dies kann darin begründet sein, dass die idealen Parameter für das Kristallwachstum noch nicht gefunden worden sind oder dass die Zusammensetzung der Proteinprobe optimiert werden muss. Nach den Untersuchungen des Hydrogenaseisolats aus der Affinitätschromatographie mittels nativer Gelelektrophorese (Kapitel 5.2.3) und Gelfiltration (Kapitel 5.2.4) stellte sich heraus, dass die Hydrogenase mindestens in zwei unterschiedlich zusammengesetzten Komplexen vorliegt. Das ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass die Kristallnadeln nicht weiter wachsen. Für zukünftige weiterführende Kristallisierungsexperimente sollte daher nur der einzelne aktive Enzym-Komplex verwendet werden, der durch die zusätzlichen Reinigungsschritte der Gelfiltration und der Anionen-Austausch-Chromatographie (Kapitel 5.2.5) isoliert wurde und der aufgrund seiner ermittelten Molekülgröße von ca. 175 kDa aus äquimolaren HoxEFUYH-Untereinheiten bestehen könnte.

5.5 Spektroskopische Charakterisierung

Das folgende Kapitel stellt die in dieser Arbeit durchgeführten spektroskopischen Untersuchungen der über Affinitätschromatographie isolierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* dar. Neben der UV/VIS-Spektroskopie, die erste Hinweise über die Existenz

der [FeS] Cluster liefern sollte, wurde in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Berlin (Institut für Chemie, Max-Volmer-Institut) die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) und die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) durchgeführt. Die Sensitivität der FT-IR-Spektroskopie ermöglicht indirekt, über die Beobachtung der Schwingungsfrequenzverschiebungen der CN⁻- und CO-Liganden des Eisenatoms im katalytischen Zentrum, Rückschlüsse auf Veränderungen der Elektronendichte und damit auf katalytische Vorgänge zu ziehen. Mittels ESR-Spektroskopie können der elektronische Zustand des Nickelatoms direkt verfolgt und weitere Aussagen über die Identität der [FeS] Cluster gemacht werden. Informationen der drei Methoden ergänzen sich und führen zu Aussagen über die Zahl der CO- und CN⁻-Liganden im aktiven Zentrum sowie über die katalytischen Vorgänge der cyanobakteriellen Hydrogenase.

5.5.1 UV/VIS-Spektroskopie: [FeS] Cluster

Von dem vollständig oxidierten Zustand der isolierten [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* wurde ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen (Abb. 5.20). Es zeigt eine starke Absorption bei 280 nm, die durch aromatische Aminosäuren im Protein bedingt ist. Außerdem sind einzelne Absorptionspeaks bei 325 nm, 390 nm, 425 nm und 440 nm erkennbar, die vermutlich durch [FeS] Cluster und FMN entstehen.

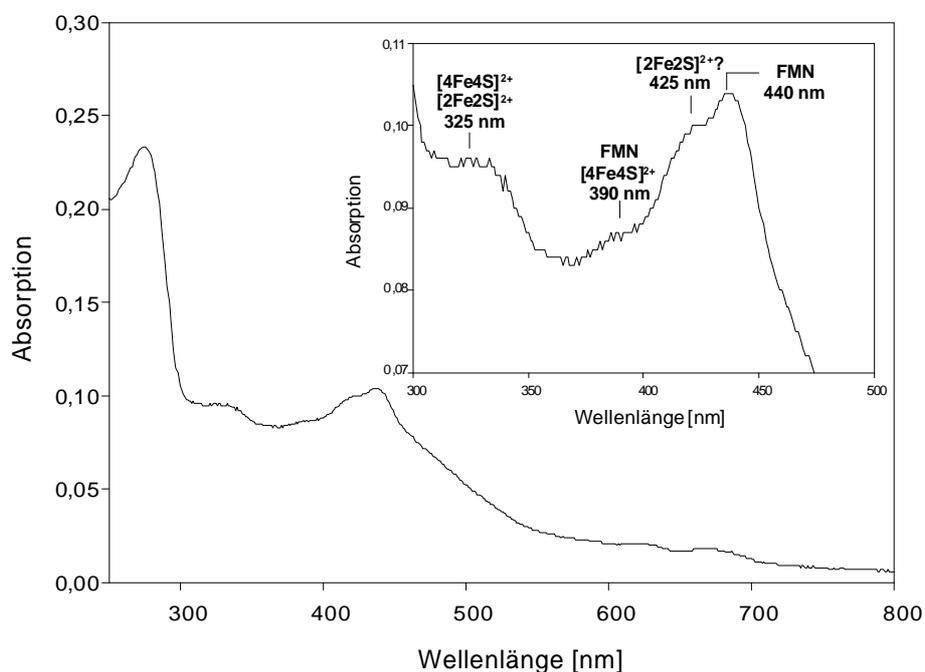


Abb. 5.20: UV/VIS-Spektrum der oxidierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Der Detailausschnitt zeigt das vergrößerte Spektrum im Bereich der absorbierenden [FeS] Cluster und FMN.

Vergleiche mit der Literatur (Tab. 5.4) ergeben, dass das Signal bei 325 nm wahrscheinlich von einem [2Fe2S]²⁺ Cluster und einem [4Fe4S]²⁺ resultiert. Dagegen absorbieren bei 390 nm

oxidierte $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}$ Cluster und FMN. Der Absorptionspeak bei 425 nm kann von oxidierten $[2\text{Fe}_2\text{S}]^{2+}$ Clustern stammen, die bei 420 nm absorbieren. Bei 440 nm liegen die Absorptionsmaxima von sowohl $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}$ Clustern als auch von FMN. In Abhängigkeit der Proteinumgebung besitzt FMN zwei Absorptionsmaxima im Bereich zwischen 360 - 390 nm und zwischen 440 - 470 nm (Chapman und Reid, 1999). Außerdem weisen $2[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster Absorptionsmaxima bei 325 und 425 nm auf (Friedrich et al., 2000; Rasmussen et al., 2001).

Tab. 5.4: Spektroskopische Charakteristika von [FeS] Clustern in Proteinen (Lippard und Berg, 1995)

[FeS] Cluster	Zustand	Ladung Eisen	g-Tensor-Werte (Temp.)	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
$[2\text{Fe}_2\text{S}]^{2+}$	oxidiert	2Fe^{3+}	kein Signal	325	19200
				420	14400
				465	14700
$[2\text{Fe}_2\text{S}]^{1+}$	reduziert	$1\text{Fe}^{3+}, 1\text{Fe}^{2+}$	1,89; 1,95; 2,05 (<100 K)	Absorption um 50 % reduziert	
$[3\text{Fe}_4\text{S}]^{1+}$	oxidiert	3Fe^{3+}	1,97; 2,00; 2,02 (<20 K)	305	23100
				415	15600
				455	13200
$[3\text{Fe}_4\text{S}]$	reduziert	$2\text{Fe}^{3+}, 1\text{Fe}^{2+}$	kein Signal	425	9600
$[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}$	oxidiert	$3\text{Fe}^{3+}, 1\text{Fe}^{2+}$	2,04; 2,04; 2,12 (<100 K)	325	24300
				390	15200
				450	13800
$[4\text{Fe}_4\text{S}]^{1+}$	reduziert	$1\text{Fe}^{3+}, 3\text{Fe}^{2+}$	1,88; 1,92; 206 (<20 K)	Absorption nimmt ab	

Da alle Absorptionsbanden sich stark überlagern, ist es nicht möglich, mittels der molaren Extinktionskoeffizienten Aussagen über die Konzentration der einzelnen [FeS] Cluster und des FMN im Protein zu treffen.

Bei der Betrachtung des Spektrums ist allerdings interessant, dass keine Absorptionspeaks bei Wellenlängen auftreten, die spezifisch für $[3\text{Fe}_4\text{S}]^{1+}$ Cluster sind. Die Signale können vollständig von anderen Absorptionssignalen überlagert sein. Es ist aber wahrscheinlicher, dass in der Hydrogenase von *Synechocystis* im Gegensatz zu Standard Hydrogenasen ein $[3\text{Fe}_4\text{S}]^{1+}$ Cluster fehlt. Dies würde den aus der Aminosäure-Sequenz der Hydrogenase von *Synechocystis* identifizierten Bindemotiven für [FeS] Cluster entsprechen (Kapitel 3.6).

5.5.2 ESR-Spektroskopie: Oxidierter Zustand

Die ESR-Messungen erfolgten bei kontinuierlichen Mikrowellen einer Frequenz von 9,5 GHz gegen ein variables Magnetfeld. Die unter aeroben Bedingungen isolierte [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* liegt im oxidierten Redoxzustand vor. Die entsprechenden ESR-Spektren weisen ein schwaches paramagnetisches Signal auf (Abb. 5.21 c, d), bei dem es sich um ein oxidiertes $[3\text{Fe}_4\text{S}]^+$ Cluster oder ein organisches Radikal handeln könnte. Da dieses Signal quantitativ in weniger als 5 % des Proteins vorkommt (0,05 Spin/Protein), ist eine Verunreinigung als Ursprung möglich. Es könnte sich um eine Chlorophyll-Verunreinigung handeln.

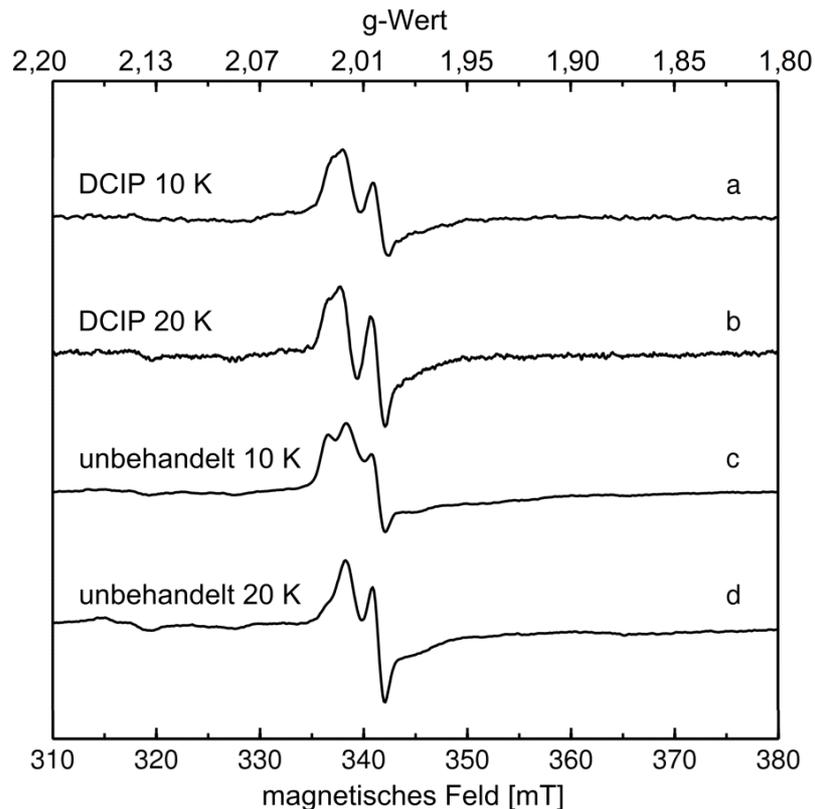


Abb. 5.21: ESR-Spektren der oxidierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803, ursprünglicher Zustand nach der aeroben Isolierung (c, d). Zugabe von DCIP im Überschuss (a, b). Experimentelle Konditionen: Mikrowellenfrequenz 9,5 GHz, Modulationsamplitude 1 mT, Modulationsfrequenz 12,5 kHz, Mikrowellenstärke 1 mW.

Wahrscheinlicher ist, dass ein kleiner Teil eines $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ Clusters während der aeroben Aufreinigung oxidativ geschädigt wurde und als $[3\text{Fe}4\text{S}]^{1+}$ Cluster erscheint. Dieses Phänomen wurde bereits für andere Hydrogenasen beschrieben (Schneider et al., 1979; Erkens et al., 1996; Serebryakova et al., 1996). Um auszuschließen, dass das Enzym und damit der Großteil eines tatsächlich vorhandenen $[3\text{Fe}4\text{S}]^{1+}$ Clusters unvollständig oxidiert vorliegen, wurde 2,6-Dichloroindophenol (DCIP) im Überschuss zugegeben. Unter diesen Bedingungen aufgenommene ESR-Spektren sind in der grundsätzlichen Gestalt und Größenordnung des Signals identisch mit denen des ursprünglich isolierten Enzyms (Abb. 5.21 a, b). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* anscheinend kein $[3\text{Fe}4\text{S}]^{1+}$ Cluster besitzt, wie in Standard [NiFe] Hydrogenasen üblich. Dies wurde bereits durch die UV/VIS-Spektroskopie (Kapitel 5.5.1) vermutet.

Des Weiteren gibt es keine Spur eines Ni-Signals (Ni_u -A oder Ni_r -B) im ESR-Spektrum des oxidierten Enzyms von *Synechocystis*. Die g-Tensor-Werte dieser Signale liegen bei Standard [NiFe] Hydrogenasen in einem Bereich zwischen 2,3 und 2,01. Zum Vergleich in *A. vinosum* weist das Ni_r -B Signal die Werte $g_x = 2,33$, $g_y = 2,16$, $g_z = 2,01$ und Ni_u -A die Werte $g_x = 2,32$, $g_y = 2,24$, $g_z = 2,01$ auf (De Lacey et al., 2007; Lubitz et al., 2007).

5.5.3 ESR-Spektroskopie: Reduzierter Zustand

Zur Reduktion der aerob isolierten Hydrogenase von *Synechocystis* wurde das Enzym unter Zugabe von katalytischen Mengen NADPH (5 Mol-%) 30 min bei Raumtemperatur mit H_2 begast. Das reduzierte Enzym zeigt im ESR-Spektrum bei 40 K ein Signal für ein reduziertes [FeS] Cluster, welches pro Proteinmolekül einmal (1 Spin/Protein) vorkommt (Abb. 5.22 a).

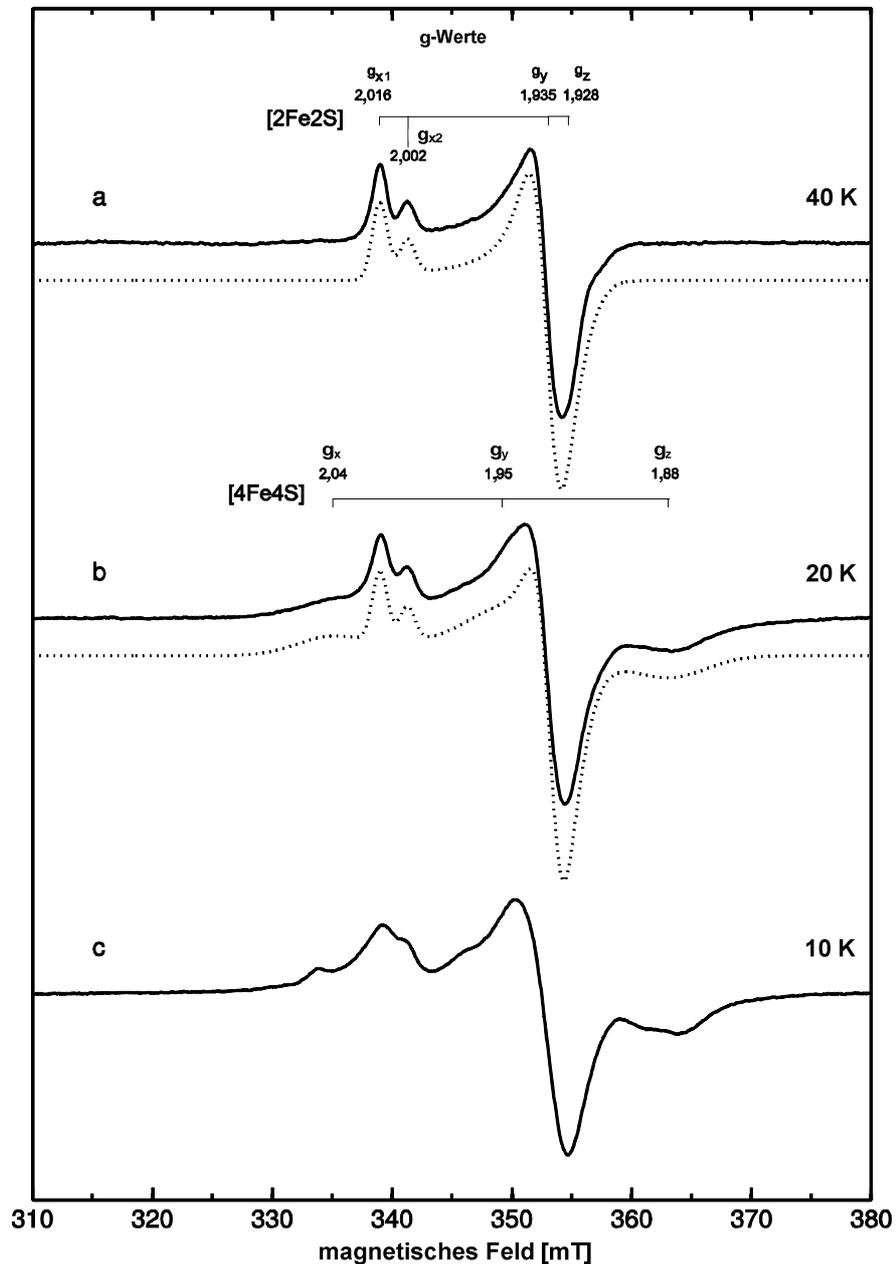


Abb. 5.22: ESR-Spektren der reduzierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ganze Linien) zusammen mit dazugehöriger Simulation (gepunktete Linien). Der Proteinlösung wurden katalytische Mengen von NADPH (5 Mol-%) zugegeben und die Probe wurde 30 min mit H_2 begast. (a) $T = 40$ K, Signal eines reduzierten $[2Fe_2S]^{1+}$ Clusters mit leicht unterschiedlichen g_x -Werten erscheint. (b) $T = 20$ K, zusätzliches $[4Fe_4S]^{1+}$ erscheint. (c) $T = 10$ K, Cluster sind magnetisch gekoppelt. Experimentelle Konditionen: Mikrowellenfrequenz 9,5 GHz, Modulationsamplitude 1 mT, Modulationsfrequenz 12,5 kHz, Mikrowellenstärke 1 mW.

Die g-Tensor-Werte dieses Clusters sind $g_x = 2,016$, $g_y = 1,935$ und $g_z = 1,928$ mit einer Linienbreite von 1,5 mT. Diese g-Tensor-Werte deuten zusammen mit deren Veränderung in Abhängigkeit der Temperatur darauf hin, dass es sich um ein $[2Fe2S]^{1+}$ Cluster und nicht um ein $[4Fe4S]^{1+}$ Cluster handelt. Die spezifischen Charakteristika der ESR-Signale von verschiedenen [FeS] Clustern wurden für den Komplex I diskutiert (Ohnishi, 1998).

In der *Synechocystis* Hydrogenase scheint es zwei Formen des $[2Fe2S]^{1+}$ Clusters mit unterschiedlichen g_x -Werten ($g_{x1} = 2,016$ und $g_{x2} = 2,002$) zu geben. Es ist möglich, dass zwei verschiedene $[2Fe2S]^{1+}$ Cluster im Enzym vorhanden sind, die per Zufall dieselben g_y und g_z -Werte aufweisen. Ebenfalls denkbar ist, dass zwei Formen eines Clusters existieren. Die verschiedenen g_x -Werte können durch leichte Veränderung einer Aminosäure in der Nähe des Clusters entstehen. Diese Veränderungen können wiederum durch die Aufreinigung, den Gefrierprozess sowie durch den Puffer bedingt sein (Mukai et al., 1973).

Bei einer Temperaturerniedrigung von 40 K auf 20 K wird das Signal eines anderen [FeS] Clusters sichtbar. Es besitzt die g-Tensor-Werte: $g_x = 2,04$, $g_y = 1,95$ und $g_z = 1,88$ (Abb. 5.22 b). Diese Werte sind gemeinsam mit der Temperaturabhängigkeit und der Linienbreite von 5 mT typisch für ein reduziertes $[4Fe4S]^{1+}$ Cluster (Guigliarelli et al., 1995; Guigliarelli und Bertrand, 1999; Schumann et al., 2008; Saggiu et al., 2009). Die Spinquantifizierung für dieses Signal liegt ebenfalls bei ca. 1 Spin/Protein. Die Signale beider [FeS] Cluster sind ähnlich intensiv und kommen beide in nahezu 100 % des Enzyms vor. Bei einer Temperatur von 10 K wird das Spektrum komplexer und die Linien breiter (Abb. 22 c). Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass die beiden Cluster magnetisch gekoppelt sind.

Die absolute Spinintensität beider Cluster zusammen beträgt nach wie vor ca. 2 Spin/Protein. Es wurde versucht, über Veränderungen der Mikrowellenstärke bei 10 K und bei 40 K die beiden Spektren voneinander zu trennen (Abb. 5.23). Dies war nicht möglich, woraus geschlossen werden kann, dass sich die beiden Cluster im Enzym in räumlicher Nähe zueinander befinden (Schneider et al., 1984 a).

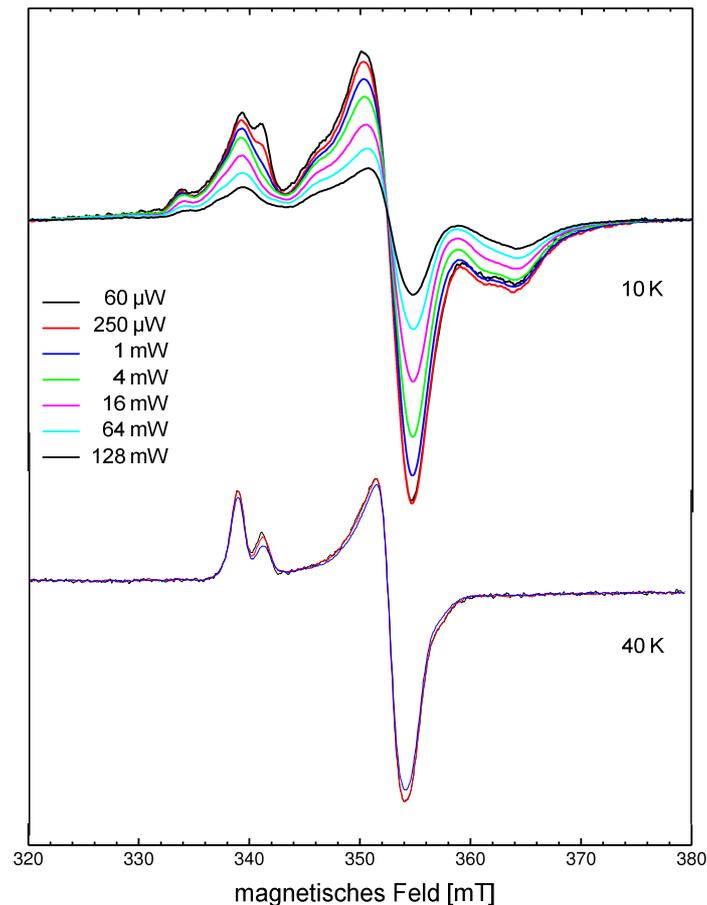


Abb. 5.23: ESR-Studien der reduzierten [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 zur Entkopplung der beiden unterschiedlichen Signale der [FeS] Cluster. Die Mikrowellen wurden zwischen 60 μ W und 128 mW bei 10 K und zwischen 250 μ W und 4 mW bei 40 K variiert. Experimentelle Konditionen: Modulationsamplitude 1 mT, Modulationsfrequenz 12,5 kHz.

In der Aminosäuresequenz der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sind acht potenzielle Bindemotive für verschiedene [FeS] Cluster erkennbar. Vor diesem Hintergrund ist interessant, dass in den ESR-Spektren lediglich entsprechende Signale mit 2 Spin/Protein detektiert wurden. Daraufhin wurden verschiedene Methoden angewendet, um das Enzym zu reduzieren. Neben der Reduktion mit katalytischen Mengen (5 Mol-%) NADPH und 30 min H₂-Begasung (Abb. 5.24 a) wurde ebenfalls mit katalytischen Mengen (5 Mol-%) von NADH und H₂ reduziert (Abb. 5.24 b). Die Spektren der beiden Bedingungen sind gleich. Eine Inkubation der Hydrogenase unter H₂-Begasung und Zugabe von NADH im 10-fachen Überschuss zeigte ebenfalls keine zusätzlichen Signale für [FeS] Cluster (Abb. 5.24 d). Unter diesen Bedingungen wurde lediglich die Menge des Flavinradikals größer (Einsatz Abb. 5.24). Der g-Tensor-Wert des Flavin-Zentrums liegt bei 2,003. Das Flavin ist bei höheren Temperaturen von 230 K sichtbar und hat eine Linienbreite von 1,9 mT. Um die Gewissheit zu haben, dass alle Kofaktoren der Probe reduziert vorliegen, wurde mit einem 20-fachen Überschuss an Natriumdithionit unter einer Argon-Atmosphäre reduziert (Abb. 5.24 c). Dies

fürte zu keiner Veränderung der Signale im ESR-Spektrum. Aus diesem Grund lässt sich schlussfolgern, dass die Hydrogenase allein durch Zugabe katalytischer Mengen NADH oder NADPH und 30 min Begasung mit H_2 vollständig reduziert und in einen katalytisch aktiven Zustand überführt wird.

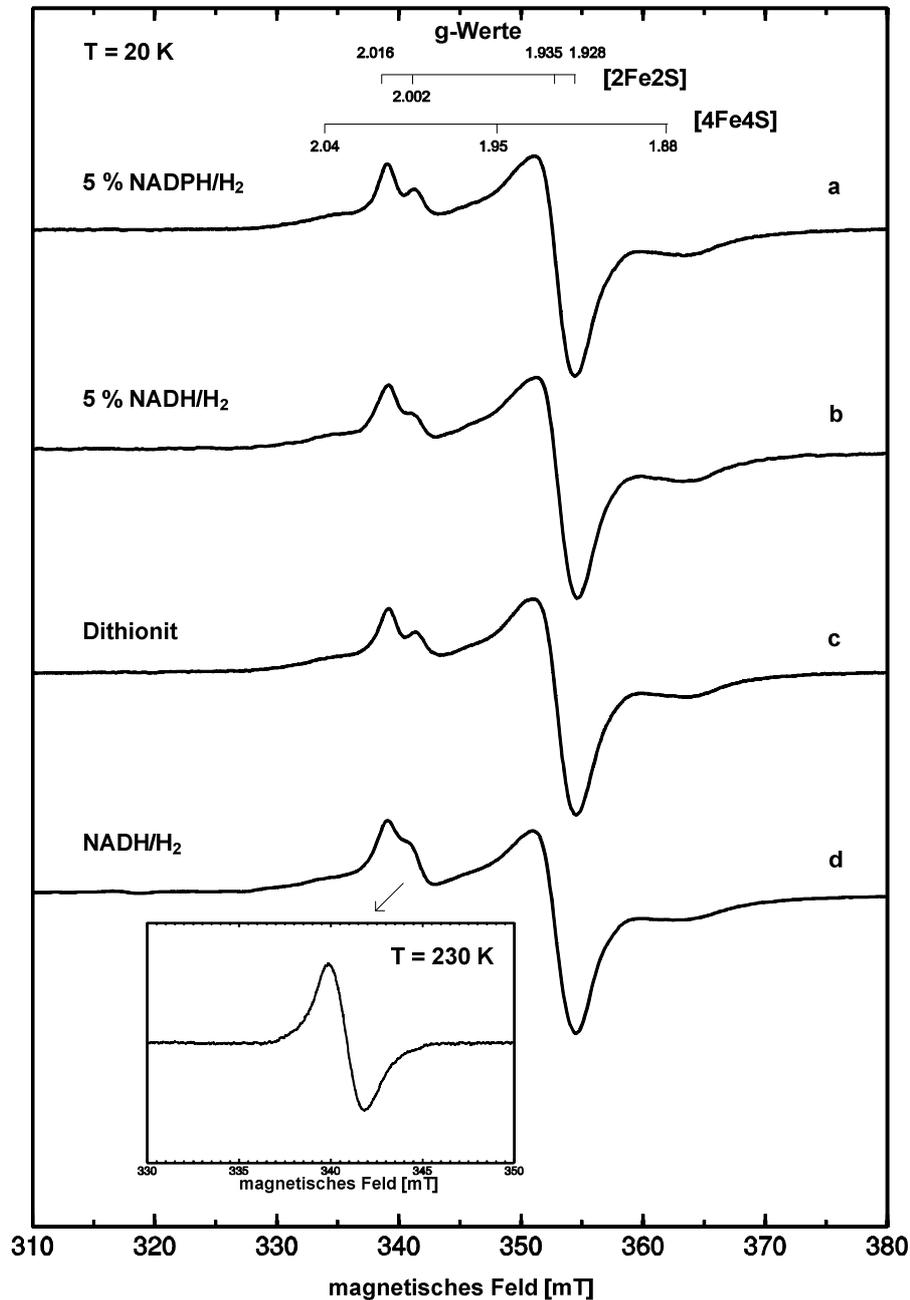


Abb. 5.24: Vergleich der reduzierten [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* bei $T = 20\text{ K}$ unter Verwendung verschiedener Reduktionsmethoden. (a) mit katalytischen Mengen NADPH (5 Mol-%) und 30 min H_2 Inkubation. (b) mit katalytischen Mengen NADH (5 Mol-%) und 30 min H_2 Inkubation. (c) mit 20-fachem Überschuss Natriumdithionit, zugegeben unter einer Argon-Atmosphäre. (d) mit 10-fachem Überschuss NADH und 30 min H_2 Inkubation. Experimentelle Konditionen: Mikrowellenfrequenz 9,5 GHz, Modulationsamplitude 1 mT, Modulationsfrequenz 12,5 kHz, Mikrowellenstärke 1 mW.

Mittels ESR-Spektroskopie konnte in der reduzierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* kein Signal gemessen werden, dass einem paramagnetischen Ni Zustand (NiIII) oder Ni(I) entspricht. Ni_a-C oder Ni_a-L Signale sind aus reduzierten Standard [NiFe] Hydrogenasen bekannt. Das Enzym aus *A. vinosum* weist z. B. Ni_a-C mit $g_x = 2,21$, $x_y = 2,15$, $g_z = 2,01$ und Ni_a-L mit $g_x = 2,26$, $x_y = 2,12$, $g_z = 2,05$ auf (Lubitz et al., 2007).

5.5.4 FT-IR-Spektroskopie: Ligandierung des aktiven Zentrums

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das aktive Zentrum einer cyanobakteriellen [NiFe] Hydrogenase mittels FT-IR-Spektroskopie charakterisiert. Abb. 5.25 zeigt das Spektrum der aerob isolierten, oxidierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis*. Es sind drei Absorptionsbanden in der Region des elektromagnetischen Spektrums sichtbar, die charakteristisch für CN⁻ (2076 cm⁻¹ und 2088 cm⁻¹) und für CO (1957 cm⁻¹) Streck-schwingungen sind. Dies lässt darauf schließen, dass zwei Cyanide und eine CO-Gruppe an das Eisen im aktiven Zentrum gebunden sind und damit eine Anordnung wie in den Standard [NiFe] Hydrogenasen vorliegt (Volbeda et al., 1995; De Lacey et al., 1997; Kurkin et al., 2004; Fichtner et al., 2006).

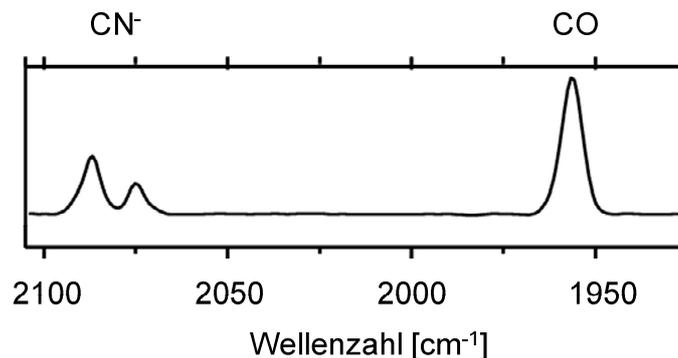


Abb. 5.25: FT-IR-Spektrum der aerob isolierten [NiFe] Hydrogenase (oxidiertes Zustand) von *Synechocystis* sp. PCC 6803 bei pH 8,0.

5.5.5 FT-IR-Spektroskopie: Redoxzustände

Die Sensitivität der FT-IR-Spektroskopie ermöglicht es generell, über die Änderung der Absorptionslage der CO- bzw. CN⁻-Streckschwingungen Aussagen über alle Redoxzustände im aktiven Zentrum der [NiFe] Hydrogenase zu machen, unabhängig davon, ob sie paramagnetisch oder ESR-inaktiv, also diamagnetisch sind. Die Verlagerung der spezifischen Absorptionsfrequenz ist bedingt durch Änderungen in der Elektronendichte am Eisen des aktiven Zentrums oder dessen Umgebung (Bagley et al., 1995; De Lacey et al., 1997; 2007; Bleijlevens et al., 2004 b; Fichtner et al., 2006).

Nach Inkubation des isolierten Enzyms von *Synechocystis* mit einem 10-fachen Überschuss DCIP wurde ein Spektrum aufgezeichnet, das dem des ursprünglich isolierten identisch ist (Daten nicht abgebildet). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass das Spektrum der aerob isolierten Hydrogenase den reinen und höchsten oxidierten Zustand des Enzyms charakterisiert (Abb. 5.26 a). Die Positionen der CO- und CN⁻-Absorptionspeaks stimmen am besten mit den Positionen der zweiatomigen Liganden im ESR-aktiven Ni_r-B-Redoxzustand von Standard [NiFe] Hydrogenasen überein. Daher wurde der Zustand der Hydrogenase von *Synechocystis* als Ni_r-B-ähnlich bezeichnet, obwohl er ESR-inaktiv ist.

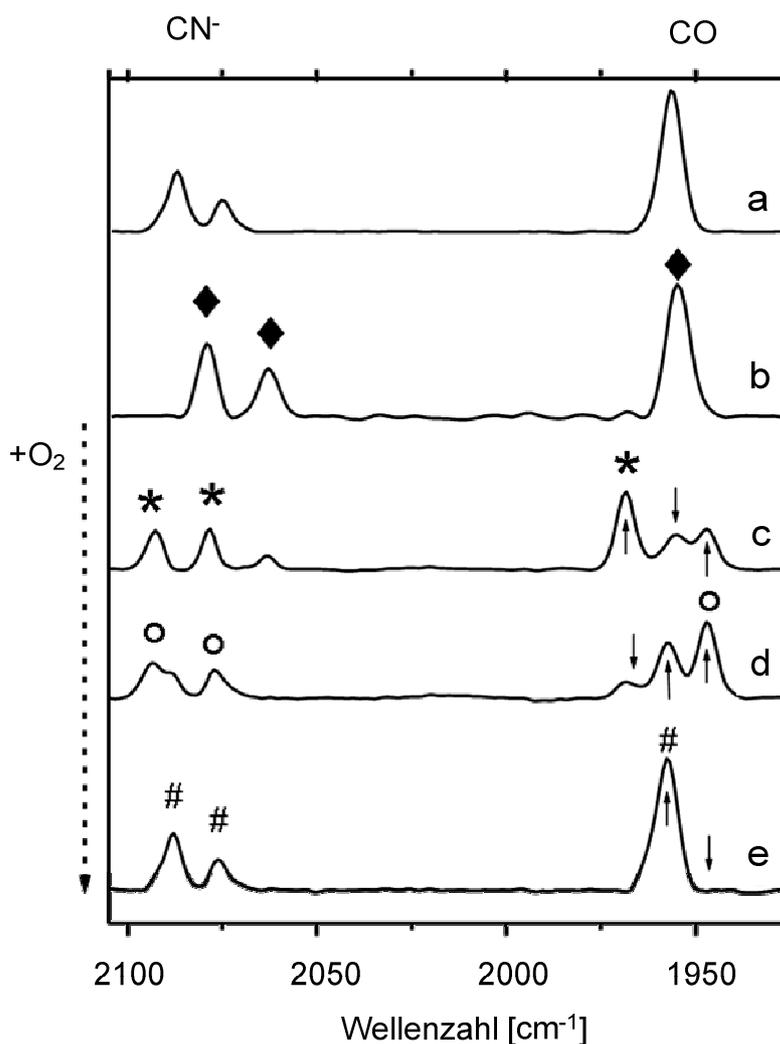


Abb. 5.26: FT-IR-Spektren der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 bei pH 8. (a) Oxidierter Zustand des ursprünglich aerob isolierten Enzyms, (b) vollständig reduzierter Zustand (5 % NADPH + H₂), (c, d, e) weitere Redoxzustände, aufgenommen während langsamer Reoxidation mit Luftsauerstoff. Die Spektren sind denen der Standard [NiFe] Hydrogenasen zugeordnet: ♦: Ni_a-SR (b), *: Ni_a-C (c), o: Ni_a-S (d) und #: Ni_r-B-ähnlich (a, e). Das an der Luft vollständig reoxidierte Spektrum (e) ist identisch mit dem ursprünglich isolierten oxidierten Zustand (a). Die Pfeile deuten die entstehenden bzw. abnehmenden Redoxzustände an.

Der höchste oxidierte Zustand der Hydrogenase von *Synechocystis* kann leicht durch katalytische Mengen von NADPH oder NADH und 30 min H₂-Begasung aktiviert werden. Das entsprechende Spektrum nach einer solchen Behandlung ist in Abb. 5.26 b dargestellt. Es zeigt einen reinen Redoxzustand mit Absorptionsbanden bei 2079 und 2063 cm⁻¹ für die Cyanide und 1955 cm⁻¹ für die CO-Gruppe. Die Positionen dieser Banden sowie die Tatsache, dass keine Ni-Signale im entsprechenden ESR-Spektrum (Abb. 5.24) vorhanden sind, unterstützen die Zuordnung zu dem aktiven, vollständig reduzierten, ESR-inaktiven Ni_a-SR Zustand von Standard [NiFe] Hydrogenasen. Eine Inkubation des Enzyms von *Synechocystis* mit einem 20-fachen Überschuss Natriumdithionit oder 10-fachen Überschuss NADPH/NADH in Kombination mit H₂-Begasung führten zu den gleichen FT-IR-Spektren und verdeutlichen, dass es sich um den höchsten reduzierten Zustand handelt.

Um den Reoxidationsprozess des reduzierten Enzyms spektroskopisch zu verfolgen, wurden in kurzen Intervallen Spektren als Funktion der Zeit aufgenommen, während Luft langsam und kontrolliert in die Transmissionszelle eindringen konnte. Während dieses Eindringens von Sauerstoff in die IR-Transmissionszelle mit reduzierter [NiFe] Hydrogenase im Zustand Ni_a-SR konnte ein weiteres Spektrum mit CO Streckschwingungen bei 1968 cm⁻¹ und CN⁻ Streckschwingungen bei 2092 und 2078 cm⁻¹ (Abb. 5.26 c (*)) aufgenommen werden. Dies ist charakteristisch für den Ni_a-C Zustand in Standard [NiFe] Hydrogenasen. Das für diesen Zustand typische ESR-Signal wurde bei der Hydrogenase von *Synechocystis* bisher nicht detektiert. Es ist nicht gelungen, den Übergangszustand Ni_a-C mit einem Redoxpotenzial, das erwartungsgemäß eng an dem von Ni_a-SR liegt, in ausreichenden Mengen unter den Applikationsbedingungen der ESR-Spektroskopie zu stabilisieren.

Während des weiteren langsamen Reoxidationsprozesses in der IR-Transmissionszelle verringern sich die Absorptionsbanden von Ni_a-C und ein anderer Zwischenzustand wird sichtbar (Abb. 5.26 d (o)), bevor das Enzym wieder vollständig oxidiert vorliegt (Abb. 5.26 e) und damit dem Ausgangsspektrum (Abb. 5.26 a) der isolierten Hydrogenase entspricht. Dieser Vorgang zeigt, dass das Enzym vollständig reoxidiert werden kann. Bei dem Zwischenzustand handelt es sich gemäß der Lage der Absorptionsbanden (1947 cm⁻¹ für den CO- und 2078/2093 cm⁻¹ für den CN-Liganden) um den ESR inaktiven, von den Standard [NiFe] Hydrogenasen bekannten Ni_a-S Redoxzustand.

Die Spektren (Abb. 5.26 c, d) zeigen neben den markierten Absorptionsbanden (*, o), die den Redoxzuständen Ni_a-C und Ni_a-S entsprechen, weitere kleinere Absorptionsbanden. Diese stammen von Hydrogenase-Molekülen, die sich schon in einem stärker oxidierten bzw. in einem noch reduzierteren Zustand befinden. Es liegt ein Gemisch aus mehreren Redoxzuständen vor.

Zur Darstellung der reinen Redoxzustände wurden diese kleineren Absorptionsbanden subtrahiert (Abb. 5.27). Mittels FT-IR-Spektroskopie können demnach vier Redoxzustände der Hydrogenase von *Synechocystis* identifiziert werden, die sich besonders gut anhand der Verschiebung der CO-Absorption unterscheiden lassen. Der oxidierte Zustand ist Ni_i-B

ähnlich und katalytisch inaktiv (Abb. 5.27 a). Die drei reduzierten Formen $\text{Ni}_a\text{-S}$, $\text{Ni}_a\text{-C}$ und $\text{Ni}_a\text{-SR}$ sind katalytisch aktiv (Abb. 5.27 b, c, d entsprechend).

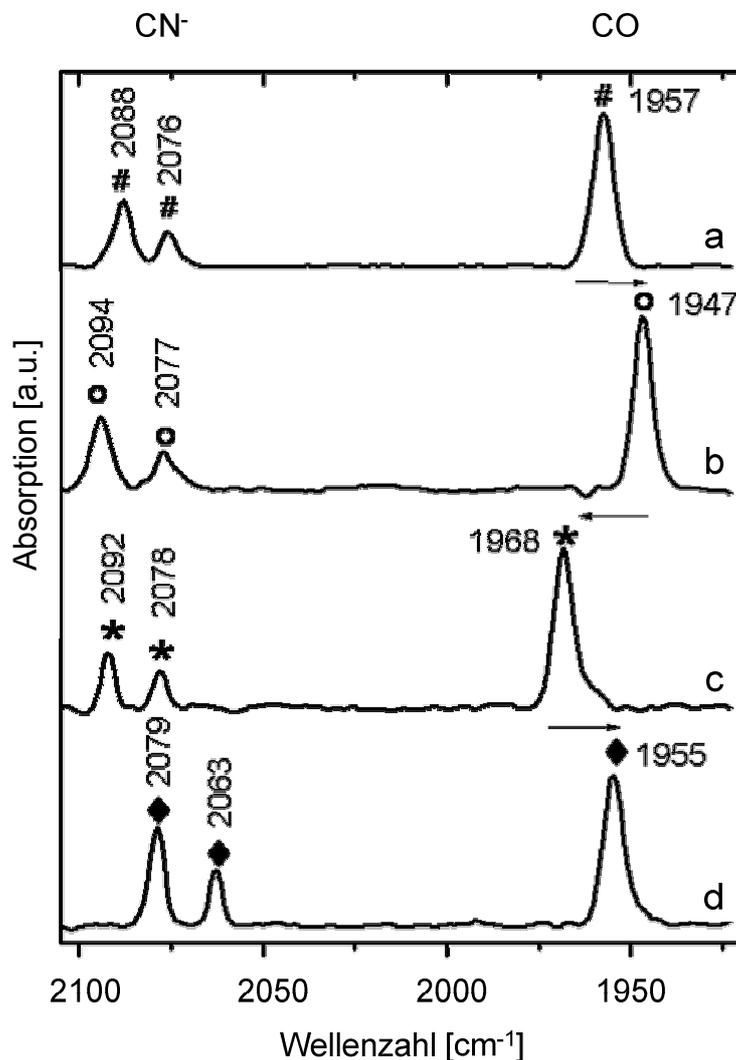


Abb. 5.27: FT-IR-Spektren der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 bei pH 8,0. (a) Höchster oxidiertes Zustand (#: $\text{Ni}_r\text{-B}$ -ähnlich) und (d) vollständig reduzierter Zustand des Enzyms. Die Spektren b, c, und d sind mit den Redoxzuständen o: $\text{Ni}_a\text{-S}$ (b), *: $\text{Ni}_a\text{-C}$: (c) und ♦: $\text{Ni}_a\text{-RS}$ (d) von Standard [NiFe] Hydrogenasen vergleichbar. Die Pfeile symbolisieren die relative Verschiebung der CO-Streckschwingungen verglichen mit dem vorherigen Redoxzustand. Die Spektren (b) und (c) wurden nach Subtraktion der überlagerten Redoxzustände erhalten (siehe Abb. 5.26 c, d).

5.6 Bestimmung des isoelektrischen Punkts

Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde in einem homogenen Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Im Gel enthaltene Trägerampholyte bauen einen stabilen, linearen pH-Gradienten von pH 3,0 - pH 9,5 auf. Die isolierte Hydrogenase von *Synechocystis* wurde, genauso wie der Kalibrierungsstandard im Bereich von pH 6,5 und im Bereich von pH 3,0,

appliziert. Eine diskrete Bande entstand während der Elektrophorese bei pH 4,55 (Abb. 5.28 Fraktion 4). Dabei handelt es sich um die im Bereich von pH 3,0 applizierte Probe. Die zurückgelegte Wegstrecke war in diesem Fall gering. Bei der Probe aus dem Bereich von pH 6,5 konnte sich keine diskrete Bande bilden. Die Laufzeit des Gels war nicht ausreichend, um alle Hydrogenase-Moleküle bei dem pH-Wert des spezifischen isoelektrischen Punktes (pI) zu fokussieren. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt, dass die [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* einen pI von 4,55 besitzt. Der theoretisch berechnete pI liegt bei 5,3 (Isoelectric Point Service, EMBL, Heidelberg). Das bedeutet, bei einem pH-Wert von 4,55 ist die Nettoladung des Enzyms Null. Es bewegt sich im elektrischen Feld nicht mehr. Die isolierte Hydrogenase liegt daher während der Experimente dieser Arbeit in einem Puffer von pH 8,0 als Anion vor.

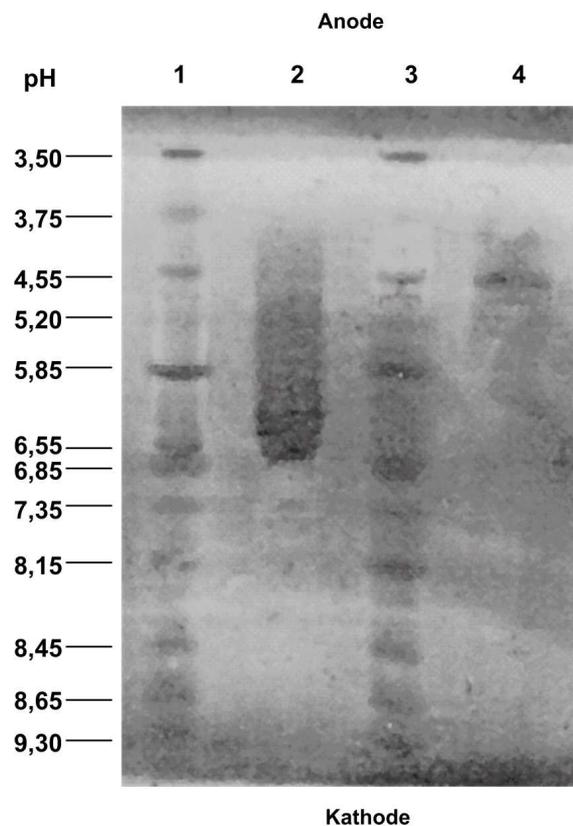


Abb. 5.28: Isoelektrische Fokussierung der isolierten [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 im PhastGel IEF 3,0 - 9,5 (PhastSystemTM, GE Healthcare). Coomassie Blau Färbung des broad pI calibration Markers (1 und 3) und des isolierten Enzyms (2 und 4). Der Auftrag von Fraktion 1 und 2 erfolgte in der Mitte des Gels bei pH 6,5. Fraktion 3 und 4 wurden auf Seite der Anode appliziert (pH 3,0).

5.7 Charakterisierung mittels Protein-Film-Elektrochemie

Bei der Protein-Film-Elektrochemie wird ein Proteinfilm auf einer Elektrodenoberfläche generiert. Im Falle der Hydrogenase wird davon ausgegangen, dass die Moleküle als Monolayer über die [FeS] Cluster der Elektronentransportkette mit der Elektrode interagieren (Léger et al., 2002). Dies führt dazu, dass der gemessene Strom direkt das Maß der Enzymaktivität widerspiegelt. Bei der Wasserstoffoxidation werden Elektronen des Wasserstoffs zur Elektrode geleitet, ein positiver Strom ist messbar. Umgekehrt wird ein negativer Stromfluss gemessen, wenn das Enzym der Elektrode Elektronen entzieht und damit Protonen reduziert. Zwei Arten von Experimenten wurden durchgeführt, um den katalytischen Elektronentransport der über Affinitätschromatographie isolierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* zu messen. Zum Einen wurde zyklische Voltammetrie angewendet, eine Methode, bei der die Spannung zyklisch zwischen einem positiven und einem negativen Elektrodenpotenzial variiert, während gleichzeitig der resultierende Stromfluss aufgezeichnet wird. Als zweite Methode wurden chronoamperische Messungen durchgeführt, in denen der Strom als Funktion der Zeit bei einem bestimmten Elektrodenpotenzial dargestellt wird.

5.7.1 Bildung des Protein-Films

Die Grundvoraussetzung zur Nutzung der Methode ist, die Hydrogenase so an eine geeignete Elektroden-Oberfläche zu binden, dass ihre Aktivität erhalten bleibt und Veränderungen des katalytischen Umsatzes unter einstellbaren Potenzialen direkt zu einer messbaren Elektronenbewegung führen. Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene Konditionen getestet, um die isolierte [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 an Elektroden zu binden. Im Vergleich zu einer glatten Graphit Elektrode zeigten Experimente mit der PGE-Elektrode (pyrolytic graphite edge electrode), bezogen auf die Oberfläche, eine deutlich höhere Aktivität der Hydrogenase. Aus diesem Grund wurden alle elektrochemischen Experimente an einer PGE-Elektrode durchgeführt. Aus der Isoelektrischen Fokussierung (Kapitel 5.6) wurde als Ergebnis deutlich, dass die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* bei pH-Werten $>4,55$ als Anion vorliegt. Die negativen Ladungen spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung an die funktionellen Gruppen der pyrolytischen Graphitoberfläche. In diesem Zusammenhang wurde die Verwendung von Polymixin getestet, einem kationischen, zyklischen Dekapeptid, das als geeignetes Koadsorbent zur Stabilisierung der Interaktion zwischen Elektrode und verschiedenen negativ geladenen [NiFe] Hydrogenasen bekannt ist (Hoeben et al., 2008; Léger und Bertrand, 2008). Die Zugabe von 200 $\mu\text{g/ml}$ Polymixin zur isolierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* hat jedoch einen negativen Einfluss auf die Stabilität des Enzymfilms bei Rotation der Elektrode. Aus den Vorversuchen gingen die in Abb. 5.29 dargestellten und im Folgenden stets verwendeten Bedingungen zur Bildung eines stabilen, aktiven Enzymfilms der Hydrogenase von *Synechocystis* auf der Elektrodenoberfläche hervor. Es wurde eine PGE-Elektrode verwendet, deren Kanten durch Polieren mit α -Aluminiumoxid

und anschließender Behandlung im Ultraschallbad vorbereitet worden war. Die isolierte Hydrogenase wurde mit einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ in 1 ml Puffer M bei pH 6,4 an die nicht rotierende PGE-Elektrode adsorbiert. Dies erfolgte durch zyklische Variation der Spannung von +200 mV bis -600 mV und wieder zurück mit 10 mV/s Scan-Raten. Vom 1. (blau) bis zum 10. Zyklus (hellgrün) kann die Zunahme des Proteinfilms auf der Elektrodenoberfläche durch die Erhöhung des negativen Stromflusses nachvollzogen werden, der direkt die Aktivität der Hydrogenase (Reduktion von Protonen) widerspiegelt. Ab dem 10. Zyklus verändert sich das Voltammogramm nicht mehr. Der Proteinfilm und damit der Stromfluss bleiben stabil. Auch nach dem Transfer in enzymfreien Puffer und bei Rotation der Elektrode bis zu 1000 rpm konnten einige Messungen durchgeführt werden, bevor die Aktivität der Hydrogenase durch Desorption des Enzyms von der Elektrode verloren ging. Das gemessene Potenzial wurde in Bezug zur Standard H_2 -Elektrode angegeben (V vs. SHE). Die Umrechnung des Potenzials der Referenzelektrode erfolgte gemäß der Gleichung 4.3.

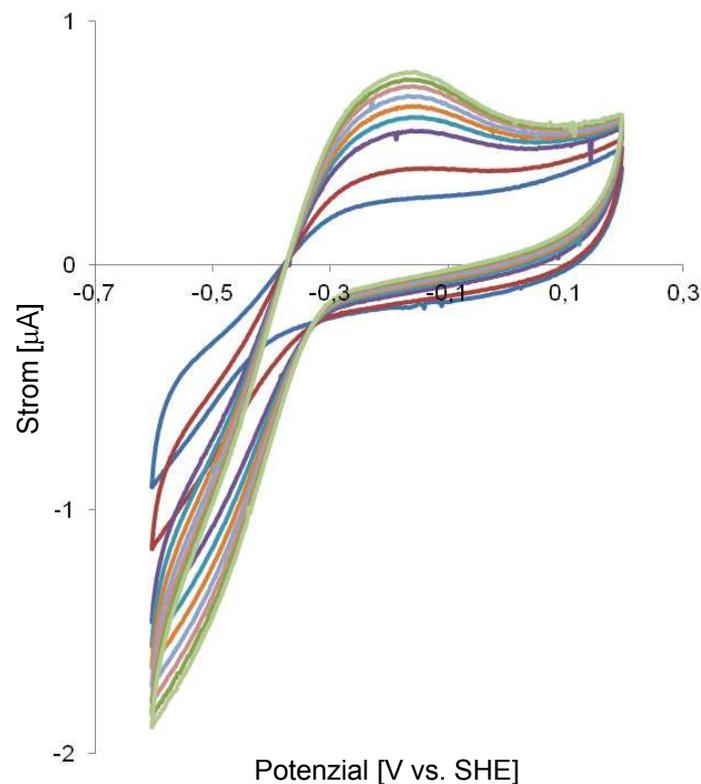


Abb. 5.29: Voltammogramme zur Bildung des Enzymfilms der [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 auf einer PGE-Elektrode. In einer anaeroben Kammer unter N_2 -Atmosphäre erfolgte die Bindung in 1 ml Puffer M (pH 6,4) mit $0,1 \mu\text{M}$ Enzym bei zyklischer Variation der Spannung von +200 mV bis -600 mV vs. SHE. Die Scan-Rate betrug 10 mV/s.

5.7.2 Rotation der Elektrode - Auswirkung auf die Aktivität

Eine wichtige Bedingung, um über den gemessenen Strom direkt Aussagen zur Enzymkinetik abzuleiten, ist, dass die Substratversorgung nicht limitierend ist und der Elektronentransfer an der Grenzfläche schneller als der enzyminterne verläuft (Léger et al., 2003). Die Rotation der Elektrode ermöglicht einen kontinuierlichen und schnelleren Zugang des Substrats an das gebundene Enzym, da die Lösung gemischt wird. Abb. 5.30 macht deutlich, dass die H^+ -Reduktion der gebundenen Hydrogenase (negativer Strom) durch Rotation bei 1000 rpm (rotes Voltammogramm) gegenüber einer stationären Elektrode (schwarzes Voltammogramm) gesteigert werden kann. Das Enzym setzt demnach so schnell Protonen um, dass der Nachschub aus der Lösung die Aktivität an der stationären Elektrode limitiert. Durch Rotation wird der Puffer gemischt und schneller neue Protonen bereit gestellt.

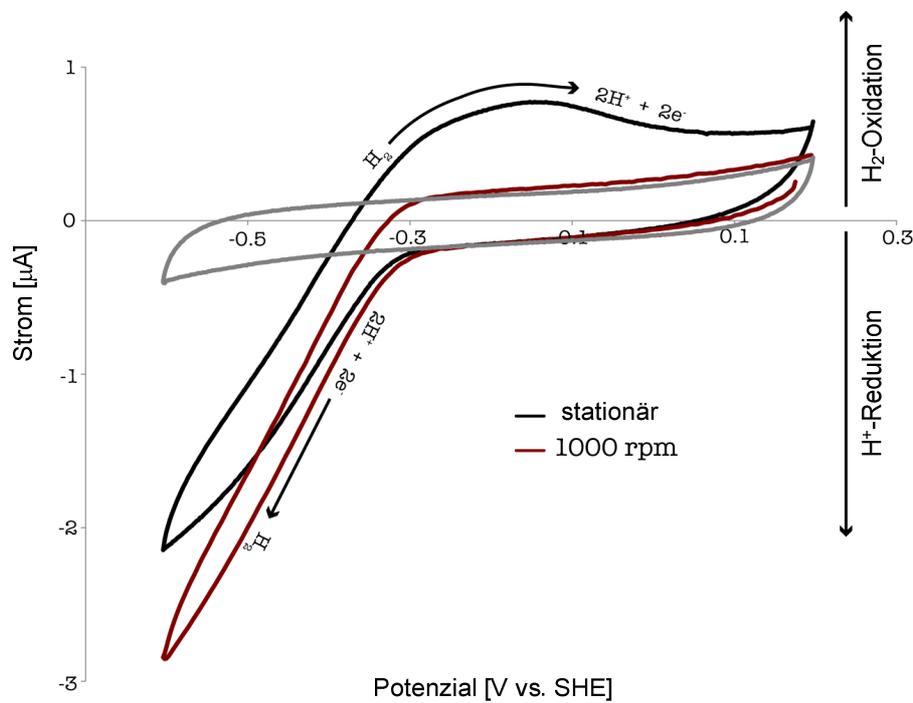


Abb. 5.30: Elektrochemische Messungen der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter 100 % N_2 -Atmosphäre in 75 mM Puffer bei pH 6,4. Dargestellt ist die Aktivität des Enzyms, gebunden als Film auf einer stationären Graphit-Elektrode (schwarz) sowie auf einer mit 1000 rpm rotierenden Graphit-Elektrode (rot). In grau abgebildet ist das Voltammogramm im gleichen Puffer ohne Enzym (blank).

Im Vergleich der beiden Voltammogramme ist ein weiterer Effekt augenfällig. Die zyklischen Voltammogramme an der stationären PGE-Elektrode zeigen einen sigmoidalen Verlauf. Ein positiver Strom ist messbar, der sich bei Rotation aufhebt. Während der Potenzialänderung zum Negativen wird an der stationären Elektrode durch H^+ -Reduktion H_2 gebildet, das so langsam aus der Lösung diffundiert, dass es zu einem Teil bei der Umkehrung des Potenzials wieder umgesetzt werden kann. Dieser Vorgang ist während einer Rotation der Elektrode

nicht möglich, da das gebildete H_2 weggerissen wird, also nicht in Reichweite des Enzyms verbleibt. Die geringere messbare H^+ -Reduktion an der stationären Elektrode könnte auch darin begründet sein, dass die Hydrogenase durch den am Enzym gebildeten und dort verbleibenden H_2 teilweise inhibiert wird. Die Rotation führt demnach entweder dazu, dass Protonen dem Enzym schneller zugänglich gemacht werden oder dass inhibierender H_2 von dem Enzym entfernt wird. In beiden Fällen ist die H^+ -Reduktion abhängig von der Rotationsrate. Die Elektrode ohne gebundenes Enzym zeigt ebenfalls einen geringen Stromfluss (grau). Dieser entsteht durch Entladen und Aufladen der Elektrode und ist kein Faraday'scher Strom.

Durch chronoamperische Messungen bei pH 6,0 wurde überprüft, welche Rotationsgeschwindigkeit ausreichend ist, um die katalytische Umsetzung der Hydrogenase nicht zu begrenzen. Nach Ausbildung eines Hydrogenase-Films wurde bei konstanter Spannung von -760 mV die Elektrode stufenweise von 0 rpm auf 3000 rpm (500 rpm alle 5 s) beschleunigt (Abb. 5.31). Die H^+ -Reduktion nimmt von 0 auf 500 rpm rapide zu und lässt sich bis auf 1000 rpm noch zusätzlich leicht steigern. Ab einer Rotation von 1000 rpm ist keine Zunahme der H^+ -Produktionsrate erkennbar. Daraus lässt sich schließen, dass eine Rotationsgeschwindigkeit von 1000 rpm notwendig ist, damit der gemessene Strom direkt das Maß der Enzymaktivität widerspiegelt und nicht durch Substratlimitierung oder durch H_2 -Inhibition beeinflusst wird.

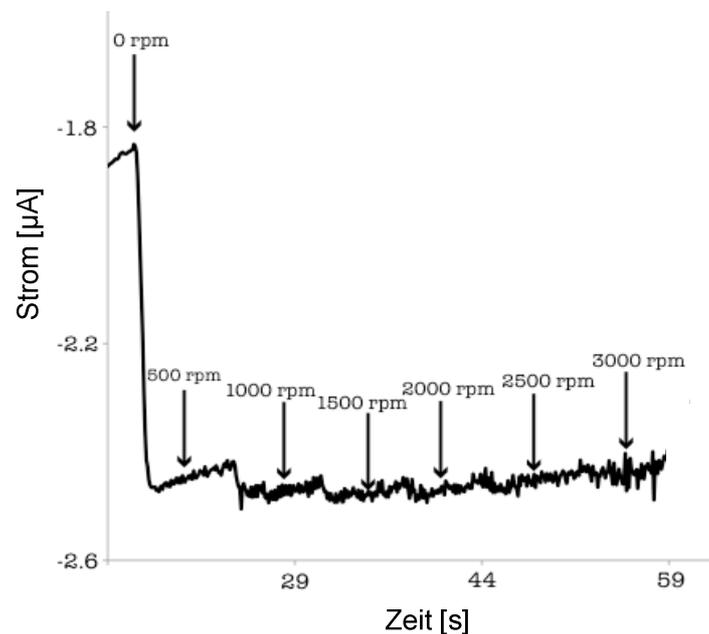


Abb. 5.31: Chronoamperische Messung der H^+ -Reduktion der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 bei unterschiedlicher Rotation der PGE-Elektrode. Das Experiment erfolgte unter 100 % N_2 -Atmosphäre in Puffer M (pH 6).

Im Gegensatz zur H^+ -Reduktion ist die H_2 -Oxidation unabhängig von der Rotationsrate. Dies zeigen die zwei Voltammogramme in der Abb. 5.32. In einer Atmosphäre aus 100 % H_2 wurde der Stromfluss an einer stationären Elektrode (schwarz) und an einer mit 1000 rpm rotierenden Elektrode (grau) gemessen. Die katalytische H_2 -Oxidations-Rate der Hydrogenase, sichtbar als positiver Stromfluss, ist bei der stationären Elektrode etwas größer als bei der rotierenden Elektrode. Dieser Effekt ist auf den Verlust des Enzymfilms zurückzuführen, der in dieser Darstellung der Messergebnisse nicht einkalkuliert wurde. Das Ergebnis macht deutlich, dass die Rotation der Elektrode keinen positiven Einfluss auf die H_2 -Oxidation hat. In diesem Fall wäre eine Steigerung des gemessenen Stromflusses zu erwarten gewesen.

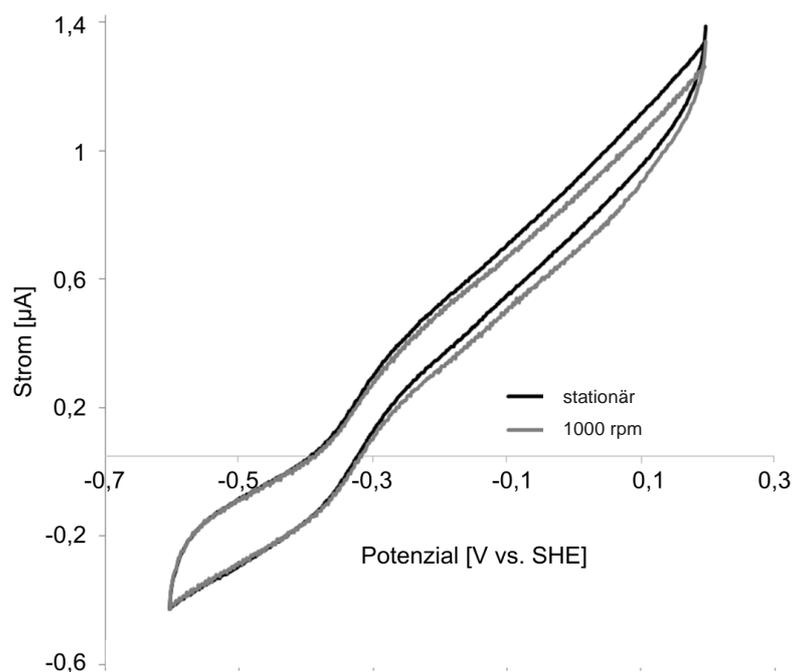


Abb. 5.32: Elektrochemische Messungen der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 unter 100 % H_2 -Atmosphäre in 75 mM Puffer bei pH 6,4. Dargestellt ist die Aktivität des Enzyms, gebunden als Film auf einer stationären Graphit-Elektrode (schwarz) sowie auf einer mit 1000 rpm rotierenden Graphit-Elektrode (grau).

5.7.3 pH-Abhängigkeit

In zyklischen Voltammogrammen unter 100 % N_2 -Atmosphäre wurde die Abhängigkeit der H^+ -Reduktion der [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* analysiert. Da diese Aktivität von der Rotationsrate abhängt, wurde bei allen pH-Werten die PGE-Elektrode mit 1000 rpm rotiert. Die verschiedenen pH-Werte wurden in Puffer M mit 0,1 M NaCl eingestellt. Abb. 5.33 zeigt die gemessene H^+ -Reduktion bei den pH-Werten 5,4; 6,3; 7,5 und 8,6. Nach jeder pH-Messung wurde eine Kontrollmessung bei pH 6,4 durchgeführt, um den graduellen Verlust des Enzymfilms an der Elektrode zu bestimmen. In einem Puffergemisch bei pH 6,4

war der ursprüngliche Proteinfilm generiert worden. Der Verlust an gebundenem Enzym ist bei allen Darstellungen zur pH-Abhängigkeit bereits eingerechnet. Der pH-Wert des Puffers M wurde nach jedem Experiment bei vorherrschender Messtemperatur überprüft. Die dargestellten Messergebnisse verdeutlichen, dass die H^+ -Reduktion mit sinkendem pH-Wert ansteigt.

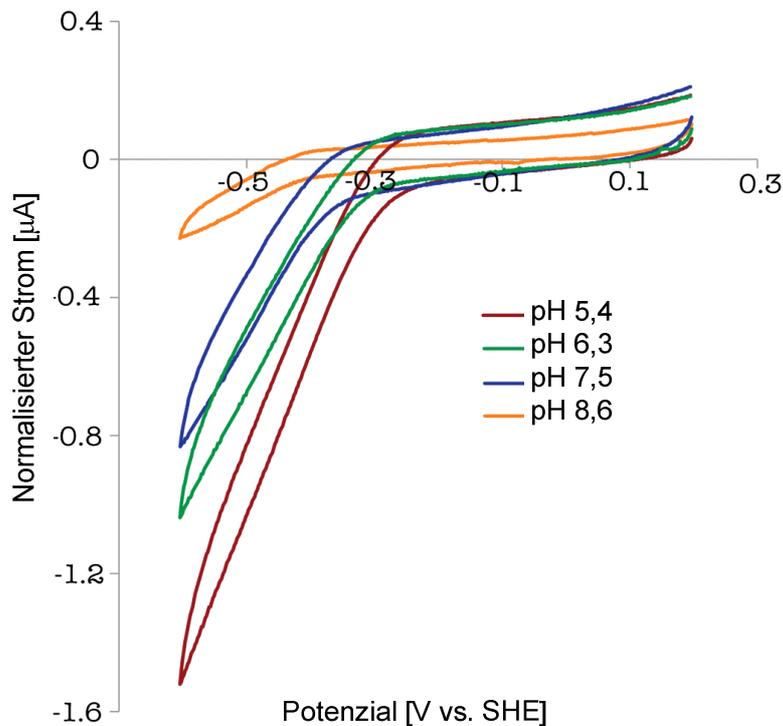


Abb. 5.33: Messung der H^+ -Reduktion der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Durchgeführt unter 100 % N_2 -Atmosphäre in Puffer M bei den pH-Werten (5,4; 6,3; 7,5 und 8,6) mit rotierender Elektrode bei 1000 rpm. Jede pH-Messung wurde auf den graduellen Verlust des Enzymfilms an der Elektrode durch Kontrollen in Puffer mit pH 6,4 vor und nach jeder Messung normalisiert.

In Abb. 5.34 sind die gemessenen pH-abhängigen Aktivitäten bei -560 mV vs. SHE zusammengefasst. Die Aktivität nimmt von pH 8,0 bis pH 5,0 stetig zu. Bei pH 4,5 wurde eine geringere Aktivität gemessen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die [NiFe] Hydrogenase bei pH 5,0 ihr Aktivitätsoptimum für die Katalyse der H^+ -Reduktion besitzt. Eine Verringerung des pH-Werts bedeutet in dem Fall allerdings ebenfalls eine Zunahme des Substrats (Protonen). Die pH-Abhängigkeit umfasst daher gleichzeitig die Substratabhängigkeit.

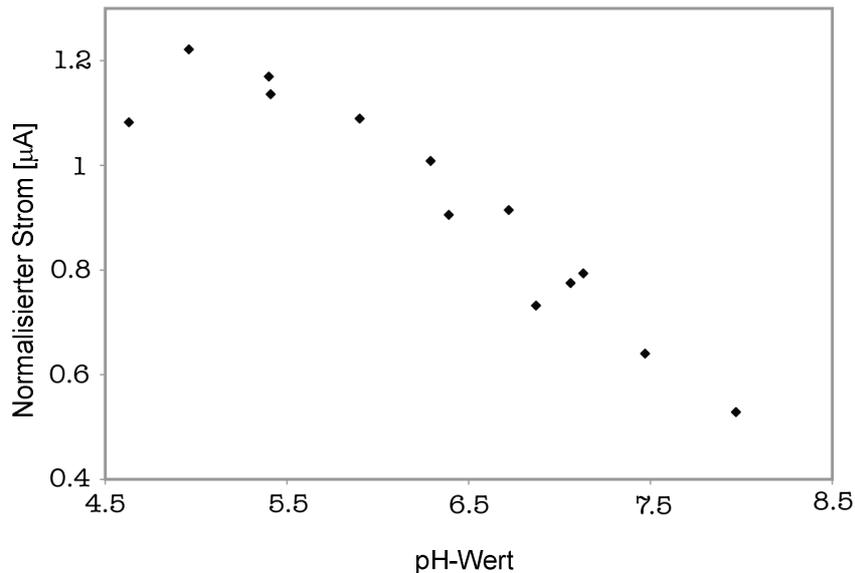


Abb. 5.34: H^+ -Reduktion der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Funktion des pH-Werts. Jeder Punkt repräsentiert den gemessenen Strom bei -560 mV vs. SHE bei entsprechendem pH-Wert. Jede pH-Messung wurde auf den graduellen Verlust des Enzymfilms an der Elektrode durch Kontrollen in Puffer mit pH 6,4 vor und nach jeder Messung normalisiert. Die Messungen erfolgten unter 100 % N_2 -Atmosphäre mit rotierender Elektrode bei 1000 rpm.

Unter 100 % H_2 -Atmosphäre wurde die Abhängigkeit der H_2 -Oxidation der [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* analysiert. Da diese Aktivität unabhängig von der Rotationsrate ist, wurde für alle pH-Werte eine stationäre PGE-Elektrode verwendet. Die verschiedenen pH-Werte wurden in Puffer M mit 0,1 M NaCl eingestellt. Abb. 5.35 zeigt die aufgenommenen Voltammogramme bei den pH-Werten 4,9; 5,4; 7,1 und 7,8. Eine deutliche Abhängigkeit der H_2 -Oxidation vom pH-Wert ist erkennbar. Je höher der pH-Wert, desto größer ist die Oxidationsrate. Dieser Zusammenhang muss genauso wie die pH-abhängige H^+ -Reduktion im Hinblick auf die Konzentration der Reaktanten betrachtet werden. Die Senkung des pH-Werts führt zu einer Konzentrationszunahme des Produkts der durch die Hydrogenase katalysierten H_2 -Oxidation. Bei pH-Werten größer als 7,8 nimmt die Rate der H_2 -Oxidation wieder ab und der Enzymfilm auf der Elektrode wird instabil, weshalb davon auszugehen ist, dass bei pH 7,8 das pH Optimum der katalysierten Reaktion liegt.

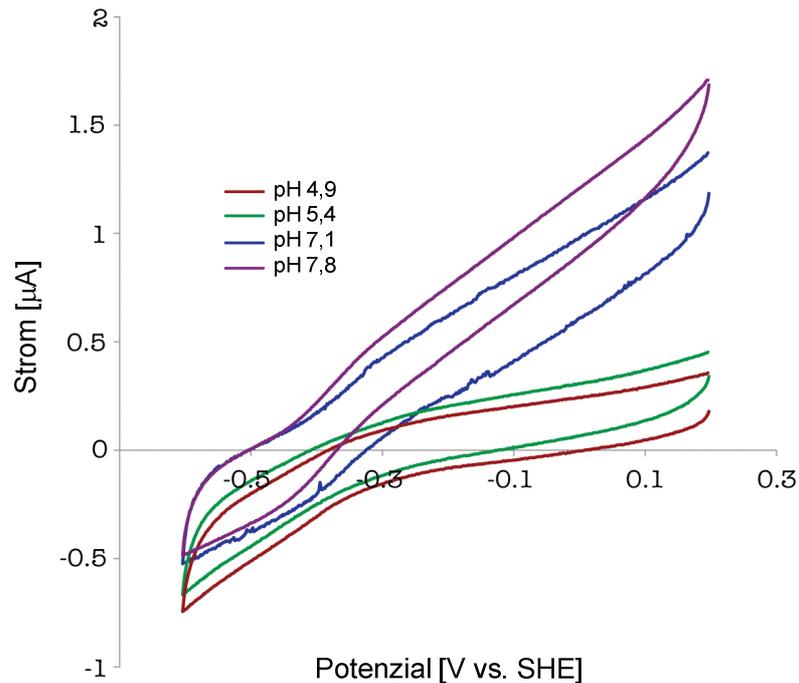


Abb. 5.35: Messung der H_2 -Oxidation der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 durchgeführt unter 100%iger H_2 -Atmosphäre bei 10 mV/s in 75 mM gemischtem Puffer bei den pH-Werten 4,9; 5,4; 7,1 und 7,8. Es wurde eine stationäre Elektrode verwendet, da Rotieren der Elektrode keine Steigerung des Stroms erzielt. Jede pH-Messung wurde auf den graduellen Verlust des Enzymfilms an der Elektrode durch Kontrollen in Puffer mit pH 6,4 vor und nach jeder Messung normalisiert.

5.7.4 Vergleich H_2 -Oxidation/ H^+ -Reduktion

In einem weiteren elektrochemischen Experiment wurde die Rate der H_2 -Oxidation und die der H^+ -Reduktion der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* verglichen (Abb. 5.36). Beide Reaktionen werden gegensätzlich vom pH-Wert beeinflusst. Das Optimum für die H_2 -Oxidation liegt bei pH 7,8, dass der H^+ -Reduktion bei pH 5. Um beide Raten miteinander zu vergleichen, wurde als Versuchsbedingung der mittlere pH-Wert von 6,4 gewählt.

In einer Atmosphäre aus 100 % N_2 wurde zunächst ein Voltammogramm mit rotierender Elektrode aufgezeichnet, das die Aktivität der H^+ -Reduktion widerspiegelt (rotes Voltammogramm). Das Ergebnis zeigt abzüglich des blanks (graues Voltammogramm) einen maximalen Stromfluss von 3 μA für die H^+ -Reduktion. Dieselbe Elektrode wurde 5 min an eine Atmosphäre aus 100 % H_2 adaptiert. Die anschließende Messung erfolgte ohne Rotation der Elektrode und zeigte abzüglich des blanks einen maximalen Stromfluss von 1,3 μA für die H_2 -Oxidation (schwarzes Voltammogramm). Der Verlust an Enzym über die Zeit von der Elektrodenoberfläche wurde einkalkuliert. Die Rate der H_2 -Produktion liegt demnach 2,3-mal höher als die der Oxidation. Dieses Experiment macht deutlich, dass die isolierte [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* die H_2 -Bildung gegenüber der H_2 -Oxidation grundsätzlich präferiert. Die Durchführung des Experiments bei pH 5,0 (pH-Optimum: H_2 -Bildung) zeigte,

dass die Neigung zur H_2 -Bildung bei diesem pH-Wert wie erwartet noch stärker ausfällt. Der Unterschied in der Aktivität beträgt ca. den Faktor 5,4. Bei pH 8,0 (pH-Optimum: H_2 -Oxidation) ist das Verhältnis umgekehrt. Die [NiFe] Hydrogenase präferiert bei diesem pH-Wert die H_2 -Oxidation gegenüber der H_2 -Produktion, allerdings nur um ca. den Faktor 2. Durch das in Abb. 5.36 dargestellte Experiment wird außerdem ersichtlich, dass die H_2 -Bildung unter 100 % H_2 -Atmosphäre (schwarzes Voltammogramm) vollständig gehemmt ist, da kein negativer Strom messbar ist. Diese Reaktion wird also durch das Produkt inhibiert.

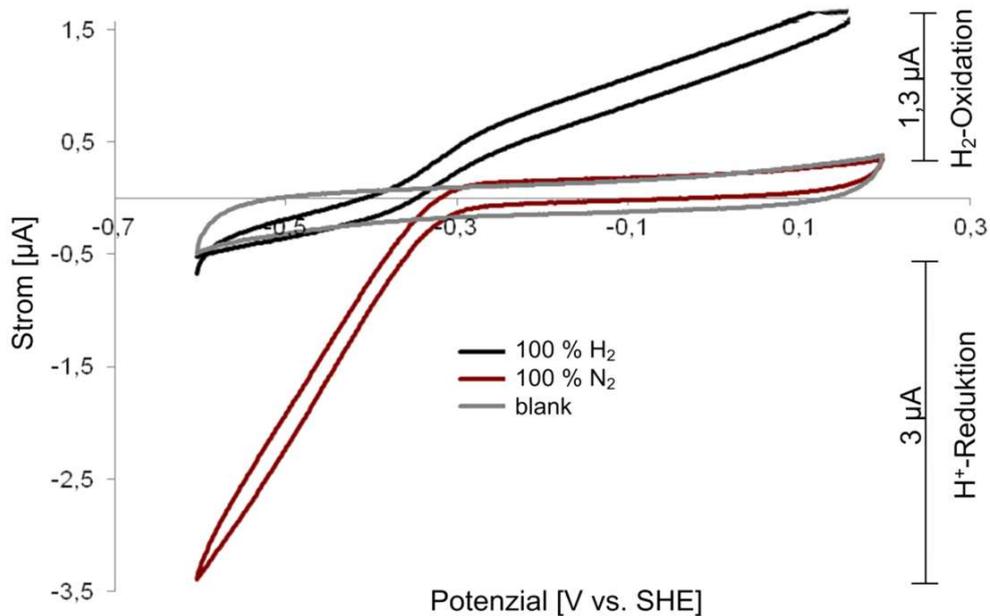


Abb. 5.36: Vergleichende Experimente zur H_2 -Oxidation bzw. H^+ -Reduktion der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Die Messung der H^+ -Reduktionsrate wurde unter 100 % N_2 -Atmosphäre in Puffer M bei pH 6,4 mit rotierender Elektrode bei 1000 rpm durchgeführt (rot). Die H_2 -Oxidationsrate wurde nach 5 min Adaptation unter 100 % H_2 -Atmosphäre in Puffer M bei pH 6,4 mit derselben Elektrode ohne Rotation durchgeführt (schwarz). Die Scanrate betrug jeweils 10 mV/s. In grau abgebildet ist das Voltammogramm im gleichen Puffer ohne Enzym (blank).

6 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten der NAD(P) gekoppelten bidirektionalen [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 werden im Folgenden mit den Charakteristika von Hydrogenasen anderer Organismen verglichen. Dabei liegt das besondere Interesse im Aufbau des aktiven Zentrums, der katalytischen Aktivität und der Sauerstoffempfindlichkeit in Bezug zu den O₂-toleranten Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* und zu den Standard [NiFe] Hydrogenasen. Außerdem wird die Identifizierung der [FeS] Cluster und des Cofaktors FMN sowie die physiologische Direktionalität und Funktion der Hydrogenase diskutiert. In diesem Zusammenhang interessieren außerdem die native Zusammensetzung des Hydrogenase-Komplexes sowie die Möglichkeit der Überexpression des Enzyms.

6.1 Überexpression

Um den geringen Gehalt der [NiFe] Hydrogenase im Wildtyp *Synechocystis* sp. PCC 6803 für Isolierungszwecke zu steigern, wurde in dieser Arbeit die Überexpression des Enzyms angestrebt. Das Unterfangen ist aufgrund der komplexen posttranslationalen Reifung einschließlich Zusammenbau des Metallzentrums und spezifischer Proteolyse schwierig (Böck et al., 2006). Die heterologe Expression in nicht verwandten Organismen gilt für Metalloenzyme im Allgemeinen als schwer realisierbar. Da sehr spezifische Maturationsfaktoren notwendig sind, kommt es häufig zu unlöslichen oder fehlgefalteten inaktiven Proteinen (Hall et al. 2005). Die Klonierung der strukturellen *hydSL*-Gene der [NiFe] Hydrogenase von *Thiocapsa roseopersicina* in *E. coli* führte beispielsweise zu einer Agglomeration inaktiver Enzyme in „Inclusion bodies“ (Shirshikova et al., 2009). Im Falle der NAD(P) gekoppelten bidirektionalen [NiFe] Hydrogenase der Klasse 3d, wie der Hydrogenase von *Synechocystis*, stellt zusätzlich zum Reifungsapparat die Klonierung und Expression der zahlreichen Untereinheiten eine generelle Barriere für ein starkes heterologes Expressionssystem dar (Friedrich und Schwartz, 1993; Porthun et al., 2002; Blokesch und Böck, 2002; Böck et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde versucht, die heterologe Expression der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* unter der Kontrolle des starken T7-Promotors in einer Hydrogenase-freien *E. coli* Mutante durchzuführen (Kapitel 5.1.4). In den verwendeten Zellen waren nur die strukturellen Gene der verschiedenen Hydrogenasen von *E. coli* und nicht die zur Assemblierung notwendigen *hyp*-Gene ausgeschaltet. Es wurden zunächst *E. coli* Überexpressionskonstrukte mit dem *hox*-Operon und dem Gen für die potenzielle Endopeptidase HoxW von *Synechocystis* erstellt. Die Induktion erfolgte unter anaeroben Bedingungen, um die *E. coli* eigenen Reifungsproteine zu aktivieren (Messenger und Green, 2003). Da keine Aktivität messbar war, wurde zusätzlich das *hyp*-Operon aus *Nostoc* sp. PCC 7120 in *E. coli* kloniert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind die Hyp-Proteine von *Nostoc* in der Lage, die Hydrogenase von *Synechocystis* zu assemblieren. Der

erhaltene Stamm zeigte ebenfalls keine Aktivität. In Proteingelen wurde nur eine verstärkte Expression von HoxW detektiert. Die Ergebnisse der Versuche unterstützen die Beurteilung, dass es sehr schwierig ist, eine multimere [NiFe] Hydrogenase aktiv in *E. coli* zu exprimieren. Parallel zu den Expressionsversuchen in *E. coli* war die homologe Überexpression der Hydrogenase von *Synechocystis* angestrebt. Die Klonierung des *psbAII*-Promotors vor das *hox*-Operon in *Synechocystis* führte zu einer Überexpression der entsprechenden Proteine mit gleichzeitiger Steigerung der Hydrogenaseaktivität in der Zelle (Kapitel 5.1.1). Der *psbAII*-Promotor ist einer der stärksten bekannten cyanobakteriellen Promotor (Elhai, 1993). Die Zunahme der Aktivität ist in Bezug auf den detektierten Expressionslevel und die postulierte Promotorstärke unerwartet gering. In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass die Aktivität der [NiFe] Hydrogenase weder durch Zugabe von höheren Nickel- noch Eisenkonzentrationen im Medium gesteigert werden konnte (Kapitel 5.1.2). Die Konzentrationen der beiden Elemente im standardisierten BG11-Medium sind daher ausreichend für den Zusammenbau der exprimierten Hydrogenase-Proteine. Es wurde vermutet, dass die Menge der Reifungsproteine die Ausbeute an aktiver Hydrogenase limitiert. Die zur Prozessierung der Hydrogenase in *Synechocystis* notwendigen sechs *hyp*-Gene liegen über das gesamte Genom verteilt vor (Hoffmann et al., 2006). In *Nostoc* sp. PCC 7120 sind die *hyp*-Gene hingegen in einem Gencluster lokalisiert. Die bidirektionalen Hydrogenasen beider Organismen weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (Ludwig et al., 2006). Aus den genannten Tatsachen ergab sich das Vorgehen, die *hyp*-Gene aus *Nostoc* in *Synechocystis* unter der Kontrolle des *psbAII*-Promotors zu exprimieren. Das Resultat war eine weitere Steigerung der Aktivität (Kapitel 5.1.3). Interessant in dem Zusammenhang ist ebenfalls, dass *Nostoc* sp. PCC 7120 nur eine Einheit von *hyp*-Genen in Gegenwart von sowohl der aufnehmenden als auch der bidirektionalen [NiFe] Hydrogenase besitzt (Tamagnini et al., 2007). Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Gene unspezifisch in die Reifung beider Hydrogenasen involviert sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen über die Vermutung hinaus. Sie zeigen die Realisierung der heterologen Überexpression dieser *hyp*-Gene mit der direkten Beteiligung in der Assemblierung der bidirektionalen Hydrogenase von *Synechocystis*. Dabei besteht die Möglichkeit einer veränderten Hydrogenase-Reifung von *Synechocystis* durch die heterologen Proteine. Zwei verschiedene Assemblierungsprozesse könnten eine Erklärung für die im folgenden Kapitel diskutierten zwei nativen Hydrogenase-Komplexe des Isolats darstellen.

6.2 Stabilität und Zusammensetzung des nativen Enzyms

Die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* wurde in dieser Arbeit unter aeroben Bedingungen mittels Affinitätschromatographie isoliert (Kapitel 5.2.1). In der Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie wurden die fünf Untereinheiten der Hydrogenase von *Synechocystis* mittels Edman-Abbau und Sequenzierung in einem

Verhältnis von 0,2:2:2:1:1 für HoxE:F:U:Y:H detektiert (Kapitel 5.2.2). Eine Gelfiltrations-Analyse der isolierten Hydrogenase zeigte außerdem zwei aktive Hydrogenaseformen (Kapitel 5.2.4). Eine aktive Form liegt dabei als Komplex mit einer Größe von ca. 175 kDa vor. Aus der Aminosäuresequenz der Hydrogenase von *Synechocystis* ergibt sich ein Molekulargewicht von ca. 176 kDa für einen Komplex, bestehend aus den Untereinheiten HoxEFUYH. Die zweite aktive Hydrogenaseform eluierte in der Gelfiltrations-Analyse entsprechend einer Größe von ca. 124 kDa. Diese beiden nativen Komplexe sind auch direkt nach der Isolierung in Puffer W in einem nativen Polyacrylamid-Gel sichtbar (Abb. 5.11).

Zusätzlich zu den aktiven Enzymformen wurden in der Gelfiltration zwei inaktive Fraktionen mit einer Größe von ca. 43 kDa und von mehr als 600 kDa detektiert. Das kleine Protein könnte eine Verunreinigung oder eine abdissoziierte Hox-Untereinheit darstellen. Bei dem großen Protein kann eine Tetramerisierung zu einem Enzymkomplex aus Hox(EFUYH)₄ stattgefunden haben. Allerdings ist dieser Komplex weder aktiv noch in dem nativen Gel direkt nach der Isolierung sichtbar, weshalb man eher davon ausgehen kann, dass eine Agglomeration des Enzym-Komplexes zu einem Tetramer vermutlich durch Effekte während des langen Laufes in der Gelfiltration begründet ist oder durch Auftauen und Einfrieren entsteht. Gelfiltrations-Analysen der isolierten [NiFe] Hydrogenase aus *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 führten zu der Vermutung, dass das Enzym als Tetramer vorliegt (Kanai et al., 2003). Allerdings wurde die Aktivität der Fraktionen nicht überprüft.

Die Stöchiometrie der Hox-Untereinheiten im Isolat zusammen mit den Ergebnissen der Gelfiltration und nativen Gelelektrophorese verdeutlichen, dass der Hydrogenase-Diaphorase-Komplex nach der Isolierung in mindestens zwei Formen mit unterschiedlicher Zusammensetzung vorliegt. Diese Formen könnten den physiologischen Zustand in der Zelle widerspiegeln. Ebenfalls ist möglich, dass ein Komplex, aus beiden Formen bestehend, während der Isolierung auseinander dissoziiert und teilweise Untereinheiten verloren gehen. Für *Rhodococcus opacus* wurde gezeigt, dass der Hydrogenase-Komplex bei der Aufreinigung in einen Hydrogenase- und einen Diaphoraseteil dissoziiert. Nur unter bestimmten Bedingungen wie Zugabe von NiCl₂, hohen Konzentrationen an moderat chaotropischen Salzen oder pH-Werten kleiner als sieben, bleiben alle Untereinheiten zusammen (Schneider et al., 1984 b). Aus diesem Grund wurden auch in dieser Arbeit die Pufferbedingungen variiert, um die Stabilität eines evtl. zusammenhängenden Komplexes zu erhöhen (Kapitel 5.2.3). Die Versuche führten stets zu mindestens zwei nativen Komplex-Formen. Arbeiten zur Isolierung der löslichen Hydrogenase (HoxEFUYH) aus *Allochromatium vinosum* ermöglichten nur die Anreicherung des Dimers HoxYH, auch nach Zugabe von NiCl₂ (Long et al., 2007). Es wurde vermutet, dass der Komplex bereits beim Zellaufbruch auseinander dissoziiert.

Die geringe Menge von HoxE in der isolierten Hydrogenase von *Synechocystis* deutet an, dass das Protein entweder teilweise während der Aufreinigung verloren geht oder nur in einigen Komplexen *in vivo* vorhanden ist. In Arbeiten mit *Thiocapsa roseopersicina* wurde die *in vivo*

Hydrogenaseaktivität durch Deletion von *hoxE* vollständig gehemmt, während *in vitro* die Aktivität unverändert blieb (Rákhely et al., 2004). Es wurde vermutet, dass HoxE eine Rolle beim Elektronentransport und bei der Membranverankerung spielt, die essenziell für die physiologische Funktion des Enzyms ist. Einen Verlust der kleinen Untereinheit HoxI (keine Sequenzähnlichkeit zu HoxE) der löslichen Hydrogenase HoxFUYHI₂ von *R. eutropha* wurde in Abhängigkeit verschiedener Salzkonzentrationen während der Aufreinigung aufgezeigt (Burgdorf et al., 2005 a). Die zahlreichen Beispiele aus der Literatur vermitteln den Eindruck, dass die Hydrogenase-Untereinheiten HoxYH eine stabile Einheit bilden, die mit verschiedenen Diaphorase-Untereinheiten nur locker assoziiert sind. Die Isolierung der Hydrogenase aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* ist in dem Zusammenhang ein weiteres Beispiel. Sie führte zu zwei bis drei unterschiedlichen Enzymformen in der Präparation. Es wurde vermutet, dass das Enzym lichtsensitiv ist und die unterschiedlichen Präparationsformen durch Lichteinfluss entstehen (Schröder et al., 2007).

Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass in *Synechocystis* sp. PCC 6803 die Hydrogenase als ein Operon transkribiert wird (Gutekunst et al., 2005). Transkriptionsstudien in *A. variabilis* ATCC 29413 weisen ebenfalls darauf hin, dass die strukturellen *hox*-Gene eine Transkriptionseinheit bilden (Boison et al., 2000). RT-PCR Experimente schließen allerdings nicht aus, dass zusätzliche Promotoren innerhalb des Operons vorliegen. Kiss et al. (2009) zeigten, dass die Transkriptmenge von *hoxEF* in *Synechocystis* bei Dunkel-Inkubation im Vergleich zu der von *hoxUYH* variiert. Die Quantifizierung der Transkriptmengen in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 ergab eine 3-fach höhere Menge von *hoxU* im Vergleich zu *hoxH*, obwohl die Gene ebenfalls in einem Operon (*hoxUYHW*) lokalisiert sind (Schmitz et al., 2001). In den Cyanobakterien *Synechococcus* sp. PCC 6301 und *Nostoc* sp. PCC 7120 sind die *hox*-Gene in die Gruppen *hoxEF* und *hoxUYHW* aufgeteilt, die über mehrere Kilobasen voneinander getrennt im Genom liegen (Boison et al., 1998). Interessant ist außerdem eine Studie, in der gezeigt wurde, dass in *Synechocystis* aus dem *hox*-Operon allein *hoxE* einer zirkadianen Expression unterliegt (Kucho et al., 2005). Die Literaturvergleiche lassen die Vermutung zu, dass die *hox*-Gene von *Synechocystis* in Abhängigkeit von Umweltparametern unterschiedlich transkribiert werden können. Damit bietet sich neben der Instabilität während des Reinigungsprozesses eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die in dieser Arbeit ermittelte Stöchiometrie der Hydrogenase-Untereinheiten im Isolat.

In einem weiterführenden Experiment wurde zellfreier cytosolischer Gesamtproteinextrakt von *Synechocystis* über native Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Hydrogenase mit einem Antikörper gegen HoxF detektiert (Kapitel 5.3.1). Mehrere Banden deuten darauf hin, dass *in vivo* verschiedene Hydrogenase-Komplexe mit unterschiedlicher Stöchiometrie der Untereinheiten vorliegen könnten. Auffällig ist, dass die Banden deutlich höher liegen als die zwei Banden der isolierten Hydrogenase im nativen Gel (Abb. 5.11). Wahrscheinlich ist daher, dass der Hydrogenase-Komplex in der Zelle an unterschiedliche Komponenten assoziiert ist (Kapitel 6.3) oder die Komplexe sich zu Dimeren oder

Multimeren zusammenlagern. Es müssen weiterführende Experimente folgen, um eine klare Aussage über den Hydrogenase-Komplex *in vivo* treffen zu können. In den meisten Mikroorganismen wurden bisher mehr als eine Hydrogenase nachgewiesen, die für spezielle physiologische Aufgaben bestimmt sind (Vignais und Billoud, 2007). Einige Hydrogenasen stellen Isoformen dar, die unter verschiedensten Wachstumsbedingungen exprimiert werden (Brugna-Guiral et al., 2003). Vor diesen Hintergründen ist durchaus denkbar, dass die bidirektionale [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* in unterschiedlichen Formen mit den Diaphorase-Untereinheiten HoxEFU assoziiert ist, um bei variierenden Umweltbedingungen verschiedene Funktionen zu erfüllen. In diesem Zusammenhang ist die in dem nächsten Kapitel diskutierte vielfältige zelluläre Lokalisierung des Enzyms interessant und gleichfalls die Tatsache, dass bei der in dieser Arbeit erfolgten Aufreinigung mehrere Proteine gemeinsam mit der Hydrogenase eluieren, die in ganz unterschiedlichen metabolischen Prozessen involviert sind.

6.3 Zelluläre Lokalisierung und potenzielle physiologische Funktion

Die zelluläre Lokalisierung der cyanobakteriellen bidirektionalen Hydrogenase wird kontrovers diskutiert. Lange Zeit wurde es als lösliches Enzym eingeordnet, nachdem es in aufgebrochenen *Nostoc* sp. PCC 7120 Zellen in der löslichen Fraktion detektiert wurde (Houchins und Burris, 1981). Untersuchungen anderer Organismen deuteten eher darauf hin, dass eine schwache Assoziation der bidirektionalen Hydrogenase mit Membranen besteht. In *Anabaena variabilis* wurde eine Verbindung mit der Thylakoidmembran vorgeschlagen (Serebryakova et al., 1994), während in *Synechococcus* sp. PCC 6301 immunologische Daten eine Assoziation mit der Plasmamembran andeuten (Kentemich et al., 1991). Eine periplasmatische Lokalisierung der Hydrogenase in *Synechocystis* wird ausgeschlossen, da das charakteristische Sequenzmotiv aus zwei nebeneinander liegenden Argininresten (engl. twin-arginine motif) fehlt (Appel und Schulz, 1996). Cournac et al. (2004) detektierten 10 - 25 % der Hydrogenaseaktivität von *Synechocystis* in der Membranfraktion und 70 % im cytosolischen Extrakt.

In dieser Arbeit wurde das Vorkommen der Hydrogenase aus *Synechocystis* mittels Western Blot-Analysen im cytosolischen Extrakt und in dem Extrakt der Gesamtmembranen eindeutig nachgewiesen (Kapitel 5.3.3). Trotz geringer Verunreinigung der isolierten Thylakoidmembran resultiert das Signal in dieser Fraktion sicherlich zum Teil aus Hydrogenase, die tatsächlich an die Membran assoziiert ist. Dies steht im Einklang mit früheren Analysen von Appel et al. (2000). Außerdem zeigen die Western Blot-Analysen, dass das Enzym wahrscheinlich ebenfalls mit der Plasmamembran verbunden ist. Es sieht so aus, als sei die Hydrogenase in *Synechocystis* sowohl mit der Thylakoid- als auch mit der Plasmamembran assoziiert. Zusätzliche Western Blot-Analysen sind notwendig, um dieses Ergebnis abzusichern.

Um weitere Anhaltspunkte für die zelluläre Lokalisierung des Enzyms zu erhalten, wurden die gemeinsam mit der Hydrogenase von der Affinitätschromatographie-Säule eluierenden Proteine identifiziert (Kapitel 5.3.2). Diese Proteine interagieren möglicherweise direkt mit der StrepTactin-Säule, denkbar ist aber auch, dass sie an die Hydrogenase gekoppelt sind. Unter den koeluierenden Proteinen befinden sich einige Thylakoid- bzw. Plasmamembran-assoziierte Proteine, die eventuell für die Membran-Assoziation der Hydrogenase in *Synechocystis* verantwortlich sein können. Diese Kandidaten gilt es, im Hinblick auf eine mögliche Verknüpfung, näher zu untersuchen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Identifizierung der peripheren Untereinheit M (slr1623) der NADPH Dehydrogenase (Komplex I). Es besteht eine hohe Sequenzähnlichkeit von HoxEFU zu den peripheren Teilen NuoEFG des Komplex I in *E. coli*. Da die drei konservierten Untereinheiten NuoEFG des Komplex I in Cyanobakterien fehlen, wird spekuliert, ob sie von HoxEFU ersetzt werden und darüber die Hydrogenase an die Atmung gekoppelt ist (Appel und Schulz, 1996; Schmitz und Bothe, 1996; Tamagnini et al., 2007). Eine physiologische Verbindung wurde durch Experimente von Cournac et al. (2004) nachgewiesen. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass der Komplex I in *Synechocystis* in der Thylakoidmembran lokalisiert ist (Ohkawa et al., 2001; Zhang et al., 2004; Schultze et al., 2009). Das Ergebnis aus der Analyse des Hydrogenase-Isolats ist ein erster Hinweis dafür, dass die Untereinheit M das Bindeglied zwischen beiden Komponenten darstellen und damit die Assoziation an die Thylakoidmembran erklären könnte. Weiterführende Experimente sind notwendig, um diesen neuen Anhaltspunkt zu untersuchen.

Weitere Proteine sind nennenswert, die als Koeluate identifiziert wurden und Hinweise auf mögliche physiologische Funktionen der Hydrogenase bieten. Interessant ist die Identifizierung der 2-Ketosäuren Dehydrogenase (sll0892), die entweder eine Lactat- oder Malat-Dehydrogenase in *Synechocystis* darstellt. Experimente weisen darauf hin, dass die Hydrogenase an die Lactat-Fermentation gekoppelt ist (persönliche Mitteilung Dr. Jens Appel). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass das Gen sll0892 eher für die Lactat- als für die Malat-Dehydrogenase kodiert. Des Weiteren eluieren alle drei Untereinheiten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (sll1721, slr1096, sll1841) gemeinsam mit der Hydrogenase. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Hydrogenase an diesen Komplex assoziiert ist und das Substrat NADH direkt übernimmt. Im Ganzen bieten die mit der Hydrogenase von *Synechocystis* eluierenden Proteine viele Ansatzpunkte, um der physiologischen Position und Membran-Assoziation des Enzyms näher zu kommen. Vielfältige Funktionen des Enzyms sind denkbar, die verschiedene native Formen plausibel machen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Enzym als ein Ventil für überschüssige Elektronen im Elektronentransport dient (Appel et al., 2000), dass es im Dunkeln über Fermentation H_2 produzieren kann (van der Oost und Cox, 1987; Houchins et al., 1984) und dass es H_2 unter Beteiligung des Komplex I oxidiert (Cournac et al., 2004).

Interessanterweise wurden in der vorliegenden Arbeit zwei AbrB-ähnliche Transkriptionsfaktoren sll0359 und sll0822 bei den Proteinen identifiziert, die gemeinsam mit der Hydrogenase von *Synechocystis* von der Affinitätschromatographie-Säule eluieren.

Die Transkription der Hydrogenase von *Synechocystis* wird durch verschiedene Parameter wie Lichtintensität, Sauerstoff und Stickstoffkonzentrationen beeinflusst (Kiss et al., 2009). Neben LexA, das an zwei Promotorregionen des *hox*-Operons bindet und die Transkription aktiviert (Gutekunst et al., 2005; Oliveira und Lindblad, 2005), interagiert ebenfalls das AbrB-ähnliche Protein sll0359 mit der *hox*-Promotorregion (Oliveira und Lindblad et al., 2008). Es wird vermutet, dass sll0359 wie LexA als Transkriptionsaktivator des Operons fungiert. Der zweite AbrB-ähnliche Transkriptionsfaktor sll0822 wurde ebenfalls bereits mit der Expression des Hydrogenase-Operons von *Synechocystis* in Verbindung gebracht. In einer Arbeit von Ishii und Hihara (2008) wurde eine sll0822 *Synechocystis* Deletionsmutante erstellt, die im Vergleich zum Wildtyp eine stärkere Expression des *hox*-Operons aufweist. Es liegt also die Vermutung nahe, dass Sll0822 direkt in die negative Regulation der *hox*-Expression involviert ist. Ishii und Hihara (2008) zeigten außerdem, dass sowohl sll0359 als auch sll0822 in Bezug zur N₂-Konzentration reguliert werden.

Transkriptionsstudien bei CO₂-Limitierung legten dar, dass in *Synechocystis* die beiden AbrB-Proteine und LexA mit dem *sbtA/sbtB*-Promotor interagieren (Lieman-Hurwitz et al., 2009). Diese Gene werden unter CO₂-Mangel exprimiert und kodieren einen Na⁺/HCO₃⁻-Transporter (Shibata et al., 2002; Wang et al., 2004). SbtB koeluiert genauso wie CcmK (involviert in die CO₂-Konzentrierung zur Steigerung der Carboxylierungsrate der RuBisCO) mit der Hydrogenase. Dies lässt vermuten, dass die Cyanobakterien in dieser Arbeit CO₂ limitiert waren. Die Anzucht erfolgte unter Begasung mit Luft und daher mit einer CO₂-Konzentration von ca. 0,04 %. Unter geringen CO₂-Konzentrationen wird die Rate der Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat durch die RuBisCO und in Folge dessen die Photorespiration erhöht. Die Untereinheit des Glycin Decarboxylase-Komplexes (slr0879) koeluierte ebenfalls mit der Hydrogenase. Dies könnte bedeuten, dass die Hydrogenase unter CO₂-Mangel eine bisher unbekannte Funktion bei der Photorespiration einnimmt.

6.4 Physiologische Direktionalität der [NiFe] Hydrogenase

Die bidirektionale [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* kann die Reaktion $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{H}_2$ grundsätzlich in beide Richtungen katalysieren. Welche Präferenz besitzt das Enzym *in vivo*? Physiologisch nutzt es NAD(P)H als Elektronendonator und NAD(P) als Elektronenakzeptor. Die Hydrogenase ist daher abhängig vom Redoxstatus der Zelle.

Um der physiologischen Direktionalität näher zu kommen, wurde das Verhältnis zwischen H₂-Produktion und -Oxidation der isolierten [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* elektrochemisch untersucht. Die beiden Reaktionen sind grundsätzlich stark vom pH-Wert beeinflusst. Das in dieser Arbeit ermittelte pH-Optimum der H₂-Bildung liegt bei pH 5, das

der H₂-Oxidation bei pH 8 (Kapitel 5.7.3). Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Hydrogenasen, z. B. von *Hydrogenophaga* sp. AH-24 (Yoon et al., 2008). Im mittleren pH-Bereich beider Reaktionen (pH 6,4) ist die H₂-Bildung gegenüber der H₂-Oxidation um den Faktor 2,3 höher. Daraus lässt sich schließen, dass das Enzym von *Synechocystis* die H₂-Produktion gegenüber der H₂-Oxidation grundsätzlich präferiert (Kapitel 5.7.4). Bei pH 5 fällt die aufgezeigte Neigung zur H₂-Bildung noch stärker aus. Der Unterschied in der Aktivität beträgt ca. den Faktor 5,4. Unter eher physiologischen Bedingungen (pH 8) ist die Rate der H₂-Oxidation des gereinigten Enzyms gegenüber der H₂-Produktion dagegen etwa doppelt so groß. Nach einem lange bestehenden Paradigma weisen isolierte [NiFe] Hydrogenasen bei pH 8 typischerweise ca. 100- bis 1000-fach höhere H₂-Oxidations- zu Produktionsaktivitäten auf (Frey, 2002; van Haaster et al., 2008). Die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* ist in dieser Hinsicht außergewöhnlich und lässt sich in Bezug auf die Raten der katalysierten Einzelreaktionen eher mit den [FeFe] Hydrogenasen vergleichen. Bei diesen Hydrogenasen beträgt die Rate der H₂-Oxidation bei pH 8 ca. 10-mal mehr als die der H₂-Bildung. Der K_m-Wert für H₂ liegt bei dieser Enzym-Klasse im Bereich von 100 µM (van Haaster et al., 2005). Da [FeFe] Hydrogenasen in der Zelle hauptsächlich die H₂-Produktion katalysieren, liegt die Vermutung nahe, dass auch die *Synechocystis* Hydrogenase unter physiologischen Bedingungen eher H₂ bildet. Allerdings führt diese einfache Schlussfolgerung auch zu Konflikten, da es [FeFe] Hydrogenasen gibt, die *in vivo* H₂ konsumieren (Pereira et al., 1998). Die Vermutung der physiologischen Direktionalität des Enzyms steht mit früheren Arbeiten im Einklang. Es wurde gezeigt, dass das Enzym während der Adaptation an höhere Lichtverhältnisse (dunkel nach hell) über die Photosynthese und im Dunkeln über Fermentation H₂ produziert (Houchins et al., 1984; van der Oost und Cox, 1987; Appel et al., 2000; Cournac et al., 2004). Zwar wurde gezeigt, dass die Hydrogenase durch H₂-Oxidation auch Elektronen unter Beteiligung des Komplex I der Atmung aufnehmen kann (Cournac et al., 2004), dennoch könnte es sich bei der in dieser Arbeit untersuchten Hydrogenase um einen Vertreter einer neuen Art von H₂-produzierenden [NiFe] Hydrogenasen handeln, die spezifisch für Cyanobakterien sind und biotechnologische Bedeutung erlangen könnten.

In Bezug zur technologischen Nutzbarkeit ist ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit von Bedeutung. Die elektrochemischen Analysen der Hydrogenase von *Synechocystis* zeigen, dass die H₂-Bildung unter 1 atm H₂ vollständig gehemmt ist (Kapitel 5.7.4). Die H₂-Bildung wird also durch das Produkt inhibiert. Dies steht mit früheren Experimenten an Cyanobakterien im Widerspruch, die zeigten, dass die Zugabe von H₂ die Aktivität der bidirektionalen Hydrogenase nicht beeinflusst (Houchins and Burris, 1981). Es sind weitere Analysen notwendig, um exakt zu bestimmen, ab welcher Konzentration das Produkt die H₂-Bildung inhibiert.

6.5 [FeS] Cluster und FMN

Das UV/VIS-Spektrum der oxidierten Hydrogenase von *Synechocystis* (Kapitel 5.5.1) entspricht in etwa den Spektren der sequenzähnlichen Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* (Schneider und Schlegel, 1976; Buhrke et al., 2005 b) und *Rhodococcus opacus* 1b (Schneider et al., 1984 a). Alle Spektren zeigen Maxima bei 390 nm und 440 - 450 nm. Durch Vergleiche dieser Spektren untereinander sowie mit den, aus der Literatur bekannten Absorptions-Charakteristika für [FeS] Cluster (Lippard und Berg, 1995) und FMN (Chapman und Reid, 1999), konnten in der Hydrogenase von *Synechocystis* Hinweise auf die Existenz von $[2\text{Fe}_2\text{S}]^{2+}$ Clustern, $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}$ Clustern und FMN gefunden werden. Allerdings zeigt sich bei den Spektren der drei Hydrogenasen ein Unterschied im Verhältnis der Peakhöhen zueinander. Während die cyanobakterielle Hydrogenase bei 440 nm am stärksten absorbiert, fallen bei den beiden anderen Hydrogenasen die Peakhöhen mit größer werdender Wellenlänge kleiner aus. Dies weist darauf hin, dass die Anzahl der vorhandenen [FeS] Cluster variiert. Da alle Absorptionsbanden sich stark überlagern, ist es nicht möglich, Aussagen über die Konzentration der einzelnen [FeS] Cluster und des FMN in der Hydrogenase von *Synechocystis* zu treffen. Außerdem muss bei der Betrachtung des Spektrums berücksichtigt werden, dass das Isolat nicht aus äquimolaren Hox-Untereinheiten zusammengesetzt ist. Die Diaphorase-Untereinheiten HoxFU, für die die meisten [FeS] Cluster und die Bindestelle des FMN über die Sequenz vorhergesagt sind (Appel und Schulz, 1996), liegen im Verhältnis 2:1 zur Hydrogenase vor.

Das UV/VIS-Spektrum der oxidierten Hydrogenase von *Synechocystis* weist zwei zusätzliche Peaks bei 325 nm und 425 nm auf, die bei den Spektren der Hydrogenasen von *R. eutropha* und *R. opacus* nicht vorhanden sind. UV/VIS-Spektren des NDH-1 Komplexes von *E. coli* und *Neurospora crassa* zeigen ebenfalls eine Redox-Komponente, die bei 325 nm und 425 nm absorbiert und in der peripheren Untereinheit NuoI des Komplexes lokalisiert ist. Die Komponente wurde durch Vergleichsspektren mit EchF, einer Untereinheit der Hydrogenase von *Methanosarcina barkeri* und mit $2[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Ferredoxin von *Clostridium pasteurianum* als $2[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster identifiziert (Friedrich et al., 2000; Rasmussen et al., 2001). HoxU von *Synechocystis* besitzt eine größere Sequenzähnlichkeit zu NuoG des NDH-1 Komplexes von *E. coli* als zu NuoI. Ein Alignment zeigt aber, dass es ein ähnliches Sequenzmotiv wie NuoI für die Bindung eines $2[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Clusters besitzt (Abb. 6.1).

Die Tatsache, dass dieses Sequenzmotiv in den Hydrogenasen von *R. eutropha* und *R. opacus* fehlt, erklärt die oben erwähnten Unterschiede bezüglich der Absorption bei 325 nm und 425 nm zwischen den UV/VIS-Spektren der Hydrogenasen. Insgesamt lassen die Vergleiche den Schluss zu, dass die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* ein $2[4\text{Fe}_4\text{S}]$ gebunden hat.

NuoI	<i>E. coli</i>	-----
EchF	<i>M. barkeri</i>	-----
Ferredoxin	<i>C. pasteurianum</i>	-----
HoxU	<i>R. opacus</i>	-MSIEIEIDGVTVTTEESRTLVDVAAEAGVYIPTI CYLKKGKPSLGT CRVCSVKLNG--TV
HoxU	<i>R. eutropha</i>	-MSIQITIDGKTLTTEEGRTLVDVAAENGVIPTI CYLKDKPCLGT CRVCSVKVNG--NV
HoxU	<i>Synechocystis</i>	MSVVTLTIDDKAIAIEEGASILQAAKEAGVPIPTI CHLEGISAAA CRICMVEVEGTNKL
HoxU	<i>A. variabilis</i>	MSVKTLTINDQLISAQEEETLLQAAQEAGIHIPTI CHLEGVGDVGACRI CLVEVAGSNKL
NuoI	<i>E. coli</i>	-----MTLKELLVGFQTQVRSIWMIGLHGSFNQTRM
EchF	<i>M. barkeri</i>	-----MGMLNLVLTNISRKP
Ferredoxin	<i>C. pasteurianum</i>	-----
HoxU	<i>R. opacus</i>	VA ACT IRVANGMKIEVDEPEVDMRKANVELLFAEGNHNC PSCEKSGRC KLQAVGYEVD M
HoxU	<i>R. eutropha</i>	AA ACT IVRVSKGLNVEVNDPELVDMRKALVEFLFAEGNHNC PSCEKSGRC QLQAVGYEVD M
HoxU	<i>Synechocystis</i>	MP AC VTAVSEEMVVHTNTEKLQYRRMTVELL FSEGNHVCAIC VANGN CELQDMAITVGM
HoxU	<i>A. variabilis</i>	LP AC VT KVAEGMEVSTNS DR LQ RYRRTIV EMLFAEGNHIC SVC VANN CELQDLAI EMGM
NuoI	<i>E. coli</i>	Y PEEPVYLPPRYRGRIVL TRDPGE ERC V ACNLC AV AC CP VG CI S LQ KAETK DGRWY PEF -
EchF	<i>M. barkeri</i>	- ATRLYPFEIREPFKEFKGRIV FD PENCI LC GLCQK CP PD AI TVTKADKT -----
Ferredoxin	<i>C. pasteurianum</i>	-----MAYKI ADSCV SCG AC ASE CPVNAISQ GD SI -----
HoxU	<i>R. opacus</i>	M VS RFQY RFP PERVQD HASE TI WLERDRCIFCQRC VE FVR D KATG KK IF SIS NR GGDS R IE
HoxU	<i>R. eutropha</i>	M VS RF PYRFP VRVVD HASE KI WLERDRCIFCQRC VE FIR D KASGR K IF SIS HR G P ES R IE
HoxU	<i>Synechocystis</i>	D HS RFKY QFP KREVDL SH PM FGIDH NR CILCTFC VR VC DE IEGA H VWD VAY RGA E CK IV S
HoxU	<i>A. variabilis</i>	D H VR LEYH FP NR KVD IS DR FG V DH NR CVLCTFC IR VC DE IEGA HT WDM AG R GT NS H V IT
NuoI	<i>E. coli</i>	---FRIN FS CI FC GI CEE AC PTTA I Q L T PD FEM GEY KRQ DLV EY ED LL IS GP K Y PE
EchF	<i>M. barkeri</i>	---FWEL NL FR CI M CTE CV NG CP KG CL S IS NER AK TGA EE V IK IA VP IV DK PK AP KA APS
Ferredoxin	<i>C. pasteurianum</i>	---FF VI D AD T CI DC GN CA N VC PV G AP V Q E-----
HoxU	<i>R. opacus</i>	ID AD LAN- AMP PE Q VR E AV AIC PV GT II E KRV GY DD P IG RR K YE I ET VR R AR AL GG EE --
HoxU	<i>R. eutropha</i>	ID AE LAN- AMP PE Q VR E AV AIC PV GT II E KRV GY DD P IG RR K YE I Q SV R AR AL E GED K--
HoxU	<i>Synechocystis</i>	GL N Q P W GT VD ACT SC GK CV D AC PT GS I FK GE TT A E K IG DRR K VE FL AT AR E KE W VR--
HoxU	<i>A. variabilis</i>	DL S Q P W GT SD ICT SC GK CV N AC PT GA IF Y Q GS SV G EM K R DR AK LD FL VT ARE K Q W N L--

Abb. 6.1: Alignment der kleinen Diaphorase-Untereinheiten: EchF von *Methanosarcina barkeri* (CAA76122.1), HoxU von *Rhodococcus opacus* (AAB57890.1), *Ralstonia eutropha* (AAP85842.1), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (NP_441415.1), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (YP_325149.1) sowie der Komplex I Untereinheit NuoI von *E. coli* (AP_002879.1) und 8Fe-Ferredoxin von *Clostridium pasteurianum* (AAA83524.1). Bindemotive für [FeS] Cluster sind im Alignment hervorgehoben. Schwarz: [2Fe2S] Cluster, grau: [4Fe4S] Cluster, rot: 2[4Fe4S] Cluster.

Ein ESR-spektroskopischer Nachweis dieses Clusters ist schwierig, weil beide [4Fe4S] Cluster identische Oxidation-Reduktions-Charakteristika aufweisen (Prince und Adams, 1987). Bei Reduktion der Probe kommt es aufgrund der Spin-Kopplung beider Cluster zu einem Spektrum mit mehreren breiten und sehr schwachen Signalen, die oft von anderen [FeS] Clustern überlagert und daher nicht detektierbar sind (Rasmussen et al., 2001). Dies ist wahrscheinlich auch der Fall bei den ESR-Spektren der Hydrogenase von *Synechocystis*. Bei einer Temperatur von 10 K ist zwar ein komplexes Spektrum des reduzierten Enzyms mit starker Linienverbreiterung sichtbar (Abb. 5.22), allerdings kommen als Ursprung des Signals dieses Spektrums eher ein $[2Fe2S]^{1+}$ und ein $[4Fe4S]^{1+}$ Cluster in Betracht, die magnetisch koppeln (siehe unten). Möglich ist, dass dieses Signal das eines $2[4Fe4S]$ Clusters überlagert. Das UV/VIS-Spektrum des oxidierten Enzyms von *Synechocystis* zeigt keine Absorptionspeaks bei Wellenlängen, die spezifisch für $[3Fe4S]^{1+}$ Cluster sind. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den aufgenommenen Daten der ESR-Spektroskopie. In der unbehandelten aerob

isolierten Hydrogenase von *Synechocystis* konnte zwar in der ESR-Spektroskopie ein sehr schwaches Signal (0,05 Spin/Protein) für ein $[3\text{Fe}_4\text{S}]^{1+}$ Cluster detektiert werden (Kapitel 5.5.2), die geringe Intensität des Signals deutet allerdings darauf hin, dass ein kleiner Teil eines $[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Clusters während der aeroben Aufreinigung durch O_2 geschädigt wurde und als $[3\text{Fe}_4\text{S}]^+$ Cluster erscheint. Dieses Phänomen wurde bereits für die NAD^+ reduzierenden Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* (Schneider et al., 1979; Erkens et al., 1996) und *Rhodococcus opacus* (Schneider et al., 1984 a) sowie für die bidirektionale Hydrogenase von *Anabaena variabilis* (Serebryakova et al., 1996) beschrieben.

Nach Zugabe von DCIP im Überschuss, zur Oxidation aller möglicherweise vorhandenen $[\text{FeS}]$ Cluster, zeigten die aufgenommenen ESR-Spektren der Hydrogenase von *Synechocystis* keine Zunahme des $[3\text{Fe}_4\text{S}]^+$ Cluster Signals. Die gleichen Beobachtungen bezüglich der Signalstärke bei verschiedenen anaerob oxidierenden Bedingungen wurden auch für das Enzym von *Ralstonia eutropha* gemacht (Happe et al., 2000). Bei der Hydrogenase von *Anabaena variabilis* nahm nach wiederholter Exposition mit O_2 die Intensität des $[3\text{Fe}_4\text{S}]^+$ Cluster Signals zu (Serebryakova et al., 1996). Aus diesen spektroskopischen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das Signal von einem aerob geschädigten $[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster stammt und dass die $[\text{NiFe}]$ Hydrogenase von *Synechocystis* kein $[3\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster, wie es in Standard $[\text{NiFe}]$ Hydrogenasen von z. B. *D. vulgaris* Miyazaki F (Higuchi et al., 1997) oder von *D. gigas* (Volbeda et al., 1995) üblicherweise vorkommt, besitzt. Dort bilden drei $[\text{FeS}]$ Cluster eine Elektronentransportkette in der kleinen Untereinheit (Volbeda et al., 1995). Das proximale $[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster ist essenziell für die H_2 -Produktion und kommt in allen Hydrogenasen mit einem bimetalischen aktiven Zentrum vor (Fontecilla-Camps et al., 1997). Das mediale $[3\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster wurde in *D. gigas* durch Aminosäure-Austausch gegen ein $[4\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster ersetzt, ohne einen signifikanten Effekt auf die katalytische Aktivität auszuüben (Rousset et al., 1998). Generell scheint ein $[3\text{Fe}_4\text{S}]$ Cluster für Hydrogenasen nicht essenziell zu sein.

Bei 20 K und 40 K aufgenommene ESR-Spektren der reduzierten Hydrogenase von *Synechocystis* zeigen die Präsenz von funktionalen, nicht gekoppelten $[\text{FeS}]$ Clustern und einem Flavon (Kapitel 5.5.3). Die Signale der Komponenten konnten reversibel aktiviert und inaktiviert werden. Die gemessenen g-Tensor-Werte der $[\text{FeS}]$ Cluster (Tab. 6.1) und deren Veränderung in Abhängigkeit der Temperatur sind charakteristisch für ein $[4\text{Fe}_4\text{S}]^+$ und ein oder zwei $[2\text{Fe}_2\text{S}]^+$ Cluster (Ohnishi, 1998; Guigliarelli et al., 1995; Guigliarelli und Bertrand, 1999; Schumann et al., 2008; Saggiu et al., 2009). Die beiden bzw. die drei Cluster sind im Enzym dicht benachbart, da sie bei Temperaturen kleiner als 20 K magnetisch koppeln. Diese Spektren ähneln bei niedrigen Temperaturen denen der NAD gekoppelten Hydrogenasen von *Pyrococcus furiosus* (Bryant und Adams, 1989) und *Rhodococcus opacus* 1b (Schneider et al., 1984 a) sowie der bidirektionalen Hydrogenase von *Anabaena variabilis* (Serebryakova et al., 1996). In *A. variabilis* wurden Signale eines reduzierten $[4\text{Fe}_4\text{S}]^+$ und $[2\text{Fe}_2\text{S}]^+$ Clusters identifiziert. Bei *P. furiosus* wurde ein $[2\text{Fe}_2\text{S}]^+$ Cluster

gefunden, welches bei niedrigen Temperaturen magnetisch an ein weiteres [FeS] Cluster koppelt. In *R. opacus* konnte gezeigt werden, dass ein [4Fe4S]⁺ und ein [2Fe2S]⁺ Cluster bei niedrigen Temperaturen miteinander interagieren. Aufgrund der Form des gekoppelten Spektrums wurde die Distanz zwischen den Clustern auf 1,2 - 1,5 nm geschätzt. Beide Cluster sind in der kleinen Diaphorase-Untereinheit (HoxU) lokalisiert (Schneider et al., 1984 a).

Tab. 6.1: Darstellung der durch Simulation ermittelten g-Tensor-Werte von [FeS] Clustern in der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Vergleich zu [FeS] Clustern mit ähnlichen g-Tensor-Werten in den Hydrogenasen von *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Serebryakova et al., 1996), von *Pyrococcus furiosus* (Bryant und Adams, 1989) und von *Rhodococcus opacus* 1b (Schneider et al., 1984 a)

Cluster	<i>Synechocystis</i>		<i>A. variabilis</i>		<i>P. furiosus</i>	<i>R. opacus</i>	
	[2Fe2S]	[4Fe4S]	[2Fe2S]	[4Fe4S]	[2Fe2S]	[2Fe2S]	[4Fe4S]
g_x	2,016/2,002	2,04	2,021	2,05	2,03	2,004	2,04
g_y	1,935	1,95	1,94	-	1,93	1,93	1,95
g_z	1,928	1,88	1,935	1,88	1,92	-	1,86

Neben den Spektren ist auch die Aminosäure-Sequenz der kleinen Diaphorase Untereinheit von *R. opacus* sehr ähnlich zu der von *Synechocystis* (Abb. 6.1). Daher ist wahrscheinlich, dass die detektierten ESR-Signale ebenfalls von einem [4Fe4S] und einem [2Fe2S] Cluster stammen, die in der kleinen Diaphorase-Untereinheit (HoxU) von *Synechocystis* gebunden sind. In der Sequenz von HoxU ist das Bindemotiv C_{X10-13}CR[LV]C_{X13}C für ein [2Fe2S] Cluster und das Sequenzmotiv ExNHxC[AS][VIS]CV_{X4}CxLQ für ein [4Fe4S] vorhanden. Die Möglichkeit, ob Letzteres ein [3Fe4S] Cluster bindet (Appel und Schulz, 1996), kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

In der Aminosäuresequenz der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sind insgesamt acht potenzielle Bindemotive für verschiedene [FeS] Cluster erkennbar (Tab. 3.2). Vor diesem Hintergrund ist interessant, dass in den ESR-Spektren lediglich entsprechende Signale mit 2 Spin/Protein detektiert wurden. Möglicherweise koppeln die Cluster untereinander oder mit anderen naheliegenden paramagnetischen Spezies wie Ni³⁺ zu einem ESR-stillen System.

6.6 Ligandierung des aktiven Zentrums

Die FT-IR-spektroskopischen Untersuchungen der Hydrogenase von *Synechocystis* zeigen ein für Standard [NiFe] Hydrogenasen charakteristisches Muster aus drei Absorptionsbanden im Bereich zwischen 1900 cm⁻¹ und 2100 cm⁻¹ (Kapitel 5.5.4). Die Wellenzahlen liegen in der Region für Streckschwingungen von Dreifachbindungen. Anhand der Wellenzahlen, FT-IR-Studien mit ¹⁵NH₃, ¹³CO₂ und zusätzlichen chemischen Analysen konnten die Banden der Standard Hydrogenasen als eine CO und zwei CN⁻-Gruppen identifiziert werden (Bagley et al., 1995; Happe et al., 1997; Pierik et al., 1999). Sie wurden den in Kristallstrukturen von

Desulfovibrio gigas entdeckten drei anorganischen zweiatomigen Liganden des Eisenatoms im aktiven Zentrum zugeordnet (De Lacey et al., 1997; 2002; Pierik et al., 1999).

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der FT-IR-Spektren der [NiFe] Hydrogenase aus *Synechocystis* mit den bereits veröffentlichten Spektren muss geschlossen werden, dass eine Standard-Ligandierung des aktiven Zentrums mit zwei CN⁻ und einem CO am Eisen-Atom, wie in Kapitel 3.7 dargestellt, vorliegt.

6.7 Redoxzustände

Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit mittels FT-IR-Spektroskopie vier verschiedene Redoxzustände des aktiven Zentrums identifiziert (Kapitel 5.5.5). Neben dem vollständig oxidierten und reduzierten Zustand konnten zwei Zwischenzustände während einer kontrollierten Reoxidation des vollständig reduzierten Enzyms gemessen werden. Die Redoxzustände wurden über die Änderungen der CO- und CN⁻-Frequenzschwingungen unterschieden. Die Frequenzschwingungen variieren durch veränderte Elektronendichten während der Katalyse im aktiven Zentrum. Ladungsänderungen am Nickel-Atom können durch Delokalisierung der Elektronen im gesamten aktiven Zentrum, über die zweiatomigen Liganden des Eisen-Atoms, wahrgenommen werden (Amara et al., 1999). Arbeiten an Fe(CO)(CN)₂-Modell-Komplexen zeigten, dass der Effekt bei dem CO-Liganden ausgeprägter ist als bei den CN⁻-Liganden (Lai et al., 1998). Damit ist gerade die CO-Absorptionslage sehr charakteristisch für einen Redoxzustand. Alle bisher bekannten Redoxzustände von Hydrogenasen können mittels FT-IR-Spektroskopie unterschieden und analysiert werden. Ein Vergleich der Positionen gemessener Frequenzschwingungen von CO- und CN⁻-Liganden der Hydrogenase von *Synechocystis*, den Standard Hydrogenasen von *A. vinosum*, *D. gigas* und *D. vulgaris* Miyazaki F und den löslichen [NiFe] Hydrogenasen von *R. eutropha* und *A. vinosum* ist in Tab. 6.2 dargestellt.

Es wird deutlich, dass die für die *Synechocystis* Hydrogenase gemessenen Wellenzahlen der zweiatomigen Liganden den Redoxzuständen Ni_r-B, Ni_a-S, Ni_a-C, Ni_a-SR der Standard Hydrogenase von *D. vulgaris* Miyazaki F am ähnlichsten sind. Die leichte Abweichung (max. 8 cm⁻¹) der absoluten Bandenlage kann durch unterschiedliche Aminosäuren oder durch Wassermoleküle nahe des aktiven Zentrums bedingt sein.

Tab. 6.2: Positionen der detektierten CN⁻- und CO-Streckschwingungen der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803, verglichen mit den Streckschwingungen definierter Redoxzustände der Standard [NiFe] Hydrogenasen von *A. vinosum* (MBH), *D. gigas* und *D. vulgaris* Miyazaki F sowie mit der löslichen [NiFe] Hydrogenase von *A. vinosum* (SH) (De Lacey et al., 1997; Bleijlevens et al., 2004 b; Fichtner et al., 2006; Long et al., 2007).

Redoxzustände	Enzyme	CO [cm ⁻¹]	CN1 [cm ⁻¹]	CN2 [cm ⁻¹]
Ni _u -A	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>A. vinosum</i> MBH	1945	2083	2093
	<i>D. gigas</i>	1947	2083	2093
	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1956	2085	2094
Ni _u -S	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>A. vinosum</i> SH	1962	-	-
	<i>A. vinosum</i> MBH	1950	2089	2099
	<i>D. gigas</i>	1950	2089	2099
	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1958	2089	2100
Ni _r -B	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803*	1957	2076	2088
	<i>A. vinosum</i> MBH	1944	2079	2090
	<i>D. gigas</i>	1946	2079	2090
	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1955	2081	2090
Ni _r -S	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	n. d.	n. d.	n. d.
	<i>A. vinosum</i> MBH	1911	2053	2067
		1932	2074	2086
	<i>D. gigas</i>	1914	2055	2067
	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1922	2061	2070
Ni _a -S	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	1947	2078	2093
	<i>A. vinosum</i> SH	1968	-	-
	<i>A. vinosum</i> MBH	1932	2074	2086
	<i>D. gigas</i>	1934	2075	2087
Ni _a -C	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1943	2074	2086
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803*	1968	2079	2093
	<i>A. vinosum</i> MBH	1950	2074	2087
	<i>D. gigas</i>	1952	2073	2086
Ni _a -SR	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1961	2074	2085
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	1955	2063	2079
	<i>A. vinosum</i> SH	1948	-	-
	<i>A. vinosum</i> MBH	1936	2059	2073
	<i>D. gigas</i>	1940	2059	2073
	<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F	1948	2061	2074

*kein ESR-Signal, n. d. (nicht detektiert), - (nicht zugewiesen)

Abb. 6.2 gibt einen Überblick über die Richtung und das Ausmaß der gemessenen Frequenzverschiebungen beider Hydrogenasen. Bei der Betrachtung der Bandenlagen fällt auf, dass die CO-Schwingungen, besonders bei der *Synechocystis* Hydrogenase, eine größere Frequenzänderung bei wechselnden Redoxzuständen aufweisen. Das bestätigt die oben erwähnte höhere Sensitivität des Liganden für unterschiedliche Elektronendichten am Eisen auch für das in dieser Arbeit untersuchte Enzym. Außerdem wird durch die Darstellung deutlich, dass die Liganden beider Hydrogenasen nicht nur bei sehr ähnlichen Wellenzahlen absorbieren, sondern im Falle des CO-Liganden zusätzlich von einem Redoxzustand zum nächsten in die gleiche Richtung verschoben sind. Der CO-Ligand besitzt leere π^* -Orbitale, wodurch eine starke π -Rückbindung zum Ligand ermöglicht wird. Die CO-Schwingung hängt

im Wesentlichen von der Stärke dieser Rückbindung vom Eisen ab. Nimmt am Eisen die Elektronendichte zu, werden die antibindenden π^* -Orbitale stärker besetzt. Dies führt zu einer Abnahme der CO-Bindungsstärke und damit zu einer niedrigeren Schwingungsfrequenz (Alsfasser et al., 2007).

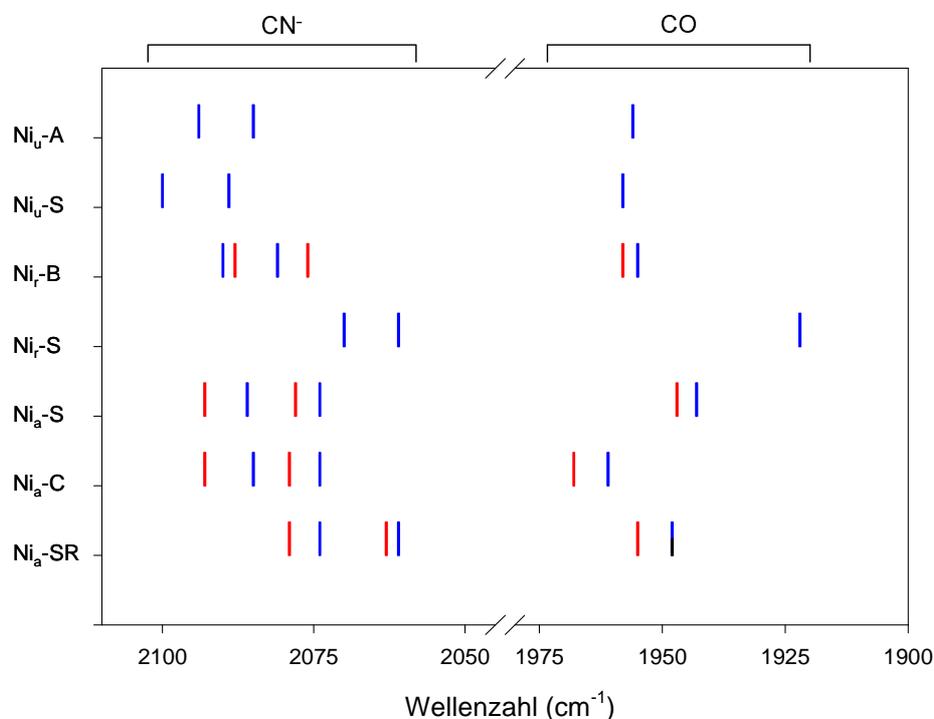


Abb. 6.2: Vergleich der gemessenen Absorptionslagen von CN⁻- und CO-Streckschwingungen der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (rot) mit denen von *D. vulgaris* Miyazaki F (blau) (Fichtner et al., 2009).

Vom inaktiven oxidierten Ni_r-B ähnlichen Zustand der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* ausgehend ist die Reaktivierung zum Zustand Ni_a-S mit einer Verschiebung der CO-Absorptionsbande zu niedrigeren Wellenzahlen verbunden. Bei dem Prozess nimmt daher die Elektronendichte am Eisen- und Nickelatom zu. Die entsprechenden CN⁻-Liganden zeigen eine schwache gegenläufige Verschiebung zu größeren Wellenzahlen. CN⁻-Liganden sind schlechtere π -Elektronen-Akzeptoren als CO-Liganden. Andere Faktoren wie verringerte Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den CN⁻-Liganden und benachbarten Aminosäuren (z. B. durch Deprotonierung) können die Ursache für die leichte Zunahme der internen Bindungsstärke darstellen. Der Effekt gegenläufiger Verschiebungen von CN⁻- und CO-Absorptionsbanden ist in Standard [NiFe] Hydrogenasen genauso wie in CN⁻/CO Modell-Komplexen bekannt (Lai et al., 1998; Fichtner et al., 2006) und tritt bei der Hydrogenase von *D. gigas* zwischen den Zuständen Ni_a-S und Ni_a-C auf.

Bei der Hydrogenase von *Synechocystis* nimmt die Elektronendichte im aktiven Zentrum vom Ni_a-S zum Ni_a-C Zustand ab und anschließend zum vollständig reduzierten Zustand (Ni_a-SR) wieder zu. Diese drei Redoxzustände sind katalytisch aktiv. Der Wechsel in der

Elektronendichte zwischen den Zuständen ist charakteristisch für zahlreiche Standard [NiFe] Hydrogenasen (De Lacey et al., 1997; 2007; Bleijlevens, et al., 2004 b; Fichtner et al., 2006). Hieraus kann geschlossen werden, dass die eigentlich katalytische Reaktion in den Standard Hydrogenasen und in der Hydrogenase von *Synechocystis* recht ähnlich verläuft. Ein Unterschied liegt dagegen bei den inaktiven Enzymformen vor.

In Abb. 6.3 sind die in Kapitel 3.9 beschriebenen Redoxzustände für Standard Hydrogenasen den in dieser Arbeit gemessenen Redoxzuständen für die Hydrogenase von *Synechocystis* schematisch gegenübergestellt.

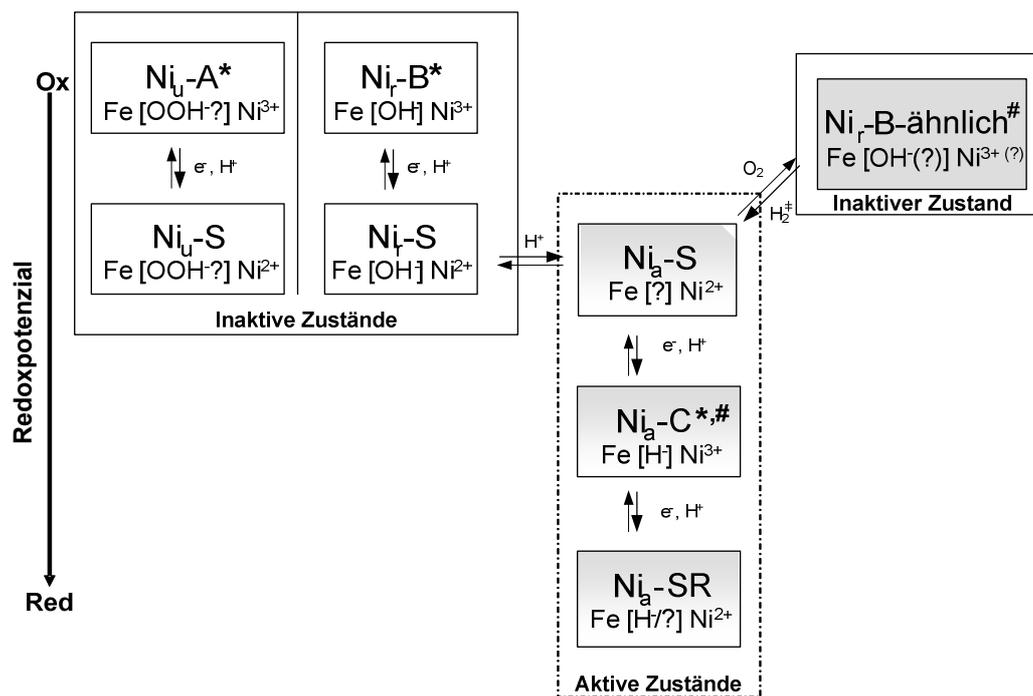


Abb. 6.3: Schema der Redoxzustände des aktiven Zentrums von Standard [NiFe] Hydrogenasen (weiß) und der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (grau). Die Oxidationszustände von Nickel sind angegeben. Die katalytisch aktiven Zustände sind in dem gepunkteten Kasten dargestellt (nach Lubitz et al., 2007; Ogata et al., 2009; Fontecilla-Camps et al., 2007 und Ergebnisse dieser Arbeit). * Paramagnetische Zustände $^{\#}$ und katalytische Mengen NAD(P)H, $^{\#}$ kein detektiertes Nickel-ESR-Signal bei der Hydrogenase von *Synechocystis*.

Inaktives Enzym

In oxidierter inaktiver Form zeigt die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* eine vergleichbare FT-IR-Absorptionsbande des CO-Liganden wie der Ni_I-B Zustand von Standard Hydrogenasen (Abb. 6.2). Auffällig ist, dass im Enzym von *Synechocystis* nur ein inaktiver Redoxzustand detektiert werden konnte. Im Vergleich dazu sind in Standard Hydrogenasen vier verschiedene inaktive Zustände bekannt (Ni_U-A , Ni_U-S , Ni_I-B und Ni_I-S). In höchster oxidierter Form liegt meist eine Mischung der beiden Zustände Ni_U-A und Ni_I-B vor (Volbeda et al., 1995), die sich stark in ihrem Reaktivierungsverhalten unterscheiden.

Ni_r-B wird innerhalb von Sekunden bis Minuten reaktiviert, während Ni_u-A Stunden benötigt (Fernandez, et al., 1985; Kurkin et al., 2004; Fichtner et al., 2006; De Lacey et al., 2007).

Der Ni_r-B Zustand ist durch ein paramagnetisches Ni³⁺ gekennzeichnet und daher ESR-aktiv. In den ESR-spektroskopischen Analysen des vollständig oxidierten Enzyms von *Synechocystis* konnte kein Nickel-Signal detektiert werden (Kapitel 5.5.2). Das aktive Zentrum oder dessen Umgebung ist demnach im Vergleich zu Standard Hydrogenasen modifiziert.

Möglicherweise liegt das oxidierte inaktive [NiFe] Zentrum der Hydrogenase von *Synechocystis* in einem diamagnetischen Ni²⁺ Zustand vor. Ein Beispiel, bei dem ein Ni²⁺ im oxidierten Zustand vorgeschlagen wurde, ist die O₂-tolerante lösliche NAD⁺ reduzierende Hydrogenase von *R. eutropha* (Happe et al., 2000; van der Linden et al., 2004; 2006). In dieser Hydrogenase sind allerdings vier anstelle von zwei CN-Liganden neben einem CO-Liganden identifiziert worden. Einer der beiden zusätzlichen CN-Liganden bindet direkt am Nickel-Atom, schützt so das aktive Zentrum vor O₂ und hält es in einem Ni²⁺ „low spin“ Zustand. Anders als bei der Hydrogenase von *Synechocystis* verändert sich außerdem bei keinem der zweiatomigen Liganden, die an Eisen gebunden sind, während der Katalyse die Frequenz der Streckschwingungen (van der Linden et al., 2004; 2006). Die aktiven Zentren beider Enzyme sind daher strukturell unterschiedlich und die Ursachen der ESR-stillen Redoxabläufe vermutlich ebenfalls.

Die den cyanobakteriellen aufnehmenden Hydrogenasen ähnliche Hydrogenase von *A. ferrooxidans* ist ein weiteres Beispiel, bei der im höchsten oxidierten Redoxzustand kein ESR-Signal für ein paramagnetisches Nickel gemessen wurde. Auch in diesem Fall wurde vorgeschlagen, dass ein zusätzlicher Ligand am Nickel gebunden sein könnte. Aufgrund von starker Inhomogenität der Proteinpräparation konnte bei der Hydrogenase von *A. ferrooxidans* die genaue Anzahl der zweiatomigen Liganden im aktiven Zentrum nicht bestimmt werden. Allerdings ändern sich bei diesem Enzym während der Katalyse, genauso wie bei der Hydrogenase von *Synechocystis*, die Frequenzen der Streckschwingungen der zweiatomigen Liganden, die an Eisen des Enzyms gebunden sind (Schröder et al., 2007). Daher ist ein struktureller Aufbau des aktiven Zentrums, wie bei der Hydrogenase von *R. eutropha*, für die Hydrogenase von *A. ferrooxidans* unwahrscheinlich.

Durch die FT-IR-Analysen dieser Arbeit ist für die *Synechocystis* Hydrogenase klar auszuschließen, dass ein zusätzlicher CN-Ligand in Bezug zur Standard Ligandierung an Nickel assoziiert ist. Allerdings könnte ein anderer Ligand oder Mechanismus dafür verantwortlich sein, dass bei diesem Enzym in aerober Umgebung Ni²⁺ stabilisiert wird.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass eine Kopplung des Ni³⁺ im Ni_r-B Zustand mit einer anderen naheliegenden paramagnetischen Spezies ein insgesamt ESR-stilles System bewirkt. Eine solche Kopplung könnte gleichzeitig die geringe Anzahl an ESR-detektierbaren [FeS] Clustern im Vergleich zu den über die Sequenz vorhergesagten erklären (Kapitel 6.5). Die übrigen bekannten inaktiven oxidierten Zustände Ni_r-S, Ni_u-S und Ni_u-A der Standard

Hydrogenasen kommen für die *Synechocystis* Hydrogenase in jedem Fall weniger in Betracht als Ni_r-B. Der Ni_r-S Zustand kann aufgrund sehr unterschiedlicher Positionen der CO-Absorptionsbande ausgeschlossen werden. Da die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* sich innerhalb von Minuten reaktivieren lässt (Cournac et al., 2002; 2004; Vignais et al., 2002; Ergebnisse dieser Arbeit), scheidet Ni_u-A ebenfalls aus. Der Ni_u-S Zustand tritt durch Reduktion von Ni_u-A in Erscheinung.

Aufgrund vergleichbarer CO-Streckschwingungen und dem für Ni_r-B charakteristischen schnellen Reaktivierungsverhalten aber fehlendem ESR-Signal für Nickel, wird die vollständig oxidierte Form der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* als Ni_r-B ähnlich beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass dieser Zustand genauso ein neuartiger oxidiertes Zustand mit schnellem Reaktivierungsverhalten und einer Ni²⁺ Spezies sein kann.

Aktives Enzym

Von dem vollständig oxidierten Ni_r-B ähnlichen Zustand geht die Hydrogenase von *Synechocystis* unter reduzierenden Bedingungen direkt in den ersten katalytisch aktiven Zustand (Ni_a-S) über. Falls Ni_r-B in *Synechocystis* den Brückenligand OH⁻ trägt, wird dieser in dem Reduktionsschritt protoniert und als H₂O aus dem aktiven Zentrum entfernt. Mittels FT-IR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass der Schritt mit einer Zunahme der Elektronendichte am Eisen bzw. am Nickel im aktiven Zentrum einhergeht (Abb. 6.2). Dies kann durch die Reduktion des Nickels von Ni³⁺ zu Ni²⁺ bedingt sein. Es wird diskutiert, ob die Bindestelle des Brückenliganden im Ni_a-S Zustand unbesetzt bleibt oder mit einem H₂-Molekül besetzt ist (Amara et al., 1999; Léger et al., 2002; De Lacey et al., 2002; Fichtner et al., 2006).

Ni_a-S wird weiter zu Ni_a-C reduziert. Im Ni_a-C Zustand ist ein verbrückendes Hydrid (H⁻) zwischen Nickel und Eisen vorhanden (Brecht et al., 2003; Foerster et al., 2005). Ein letzter Ein-Elektron-Reduktionsschritt führt zum vollständig reduzierten Ni_a-SR. Die katalytischen Zustände der Hydrogenase von *Synechocystis* sind denen der Standard Hydrogenasen sehr ähnlich. Die Elektronendichte im aktiven Zentrum der Hydrogenasen nimmt vom Ni_a-S zum Ni_a-C Zustand ab und anschließend zum vollständig reduzierten Zustand (Ni_a-SR) wieder zu. Die Abnahme der Elektronendichte bedeutet, dass der Oxidationszustand von Nickel wahrscheinlich in Ni³⁺ wechselt, in jedem Fall nicht in Ni¹⁺ übergeht. Das Vorhandensein von Ni³⁺ im Ni_a-C Zustand von Standard Hydrogenasen wurde durch zahlreiche Versuche belegt (Davidson et al., 2000; Brecht et al., 2003; Foerster et al., 2003). In der *Synechocystis* Hydrogenase konnte kein Ni³⁺ Signal mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Kapitel 5.5.3). Dies kann, wie ebenfalls für den ESR-stillen Ni_r-B Zustand diskutiert, durch eine Kopplung des Ni³⁺ mit einer anderen naheliegenden paramagnetischen Spezies begründet sein. Das Fehlen des Nickel-Signals kann auch daher kommen, dass das aktive Zentrum während des katalytischen Vorgangs in einem diamagnetischen Ni²⁺ Zustand verbleibt. Ein

unbekannter Nickel-Ligand könnte so modifiziert werden, dass die katalytische H_2 -Spaltung dort stattfinden kann. Dieser Ligand könnte die Elektronen direkt aufnehmen und an den Akzeptor abgeben. In diesem Zusammenhang sind Studien der [Fe] Hydrogenase interessant (Shima et al., 2008; Hiromoto et al., 2009). Es wurde vorgeschlagen, dass das Methenyl-Tetrahydromethanopterin (Methenyl- H_4MP) Substrat im aktiven Zentrum binden kann und dort während der Katalyse das Hydrid direkt aufnimmt, so dass Methylene- H_4MP entsteht. Das H_2 -Molekül soll an das „low-spin“ Fe^{2+} binden, welches seinen Redoxstatus während der Katalyse behält. Da die katalytischen Zustände der Hydrogenase von *Synechocystis* denen der Standard Hydrogenasen in Bezug auf die FT-IR-spektroskopischen Eigenschaften der zweiatomigen Liganden sehr ähnlich sind, ist es aber sehr unwahrscheinlich, dass Ni^{2+} bestehen bleibt. Zudem handelt es sich bei Ni_a-C um einen Intermediär-Zustand, gemessen während der langsamen Rückoxidation des vollständig reduzierten Enzyms von *Synechocystis* in der FT-IR-Zelle. Es ist daher am wahrscheinlichsten, dass der Zustand nicht in ausreichender Menge für ESR-spektroskopische Messungen stabilisiert werden konnte. Zur Stabilisierung von Ni_a-C ist es daher in Zukunft erforderlich, das spezifische Redoxpotenzial dieses Zustands für die *Synechocystis* Hydrogenase über Redox titrationen oder Elektrochemie zu bestimmen.

Die Zunahme der Elektronendichte beim Übergang von Ni_a-C zu dem vollständig reduzierten Zustand Ni_a-SR beruht vermutlich auf der Reduktion des Nickels um ein Elektron. Während der katalytischen Vorgänge wird die Elektronendichte am aktiven Zentrum ebenfalls durch die Bindung bzw. das Entfernen des Hydrids beeinflusst. Die Effekte auf Eisen sind allerdings gering und werden durch Verschiebung der Elektronendichten am Nickel kompensiert.

Weder in den reduzierten Formen noch in dem vollständig oxidierten Zustand der Hydrogenase von *Synechocystis* konnte ein Nickel-ESR-Signal detektiert werden. In Kapitel 6.5 wurde deutlich, dass die detektierten ESR-Spektren der [FeS] Cluster des Enzyms denen der Hydrogenase von *R. opacus* (Schneider et al., 1984 a), *P. furiosus* (Bryant und Adams, 1989) und der Hydrogenase des Cyanobakteriums *A. variabilis* (Serebryakova et al., 1996) sehr ähnlich sind. Interessanterweise konnten auch in diesen Hydrogenasen keine Signale eines paramagnetischen Nickels gefunden werden. Dies scheint demnach ein verbreitetes Phänomen dieser Hydrogenase-Typen zu sein, dessen Ursache aufzuklären bleibt.

6.8 Sauerstoffempfindlichkeit

In Gegenwart von Sauerstoff werden die meisten [NiFe] Hydrogenasen reversibel inhibiert. In dieser Arbeit wurde die [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* unter aeroben Bedingungen isoliert und lag daher in einem inaktiven Zustand vor. Das Enzym lässt sich innerhalb weniger Minuten reaktivieren (Cournac et al., 2002; 2004; Vignais et al., 2002). Die isolierte Hydrogenase konnte in dieser Arbeit durch katalytische Mengen von NADH/NADPH und 30 min Begasung mit H_2 in den vollständig reduzierten Zustand Ni_a-SR überführt werden

(Kapitel 5.5.5). Das Enzym wird in *Synechocystis* unter aeroben Bedingungen exprimiert (Appel et al., 2000). Die ständige Präsenz des inaktiven Enzyms ermöglicht es den Zellen, bei wechselnden Umweltbedingungen sofort H_2 zu metabolisieren und deutet auf die Wichtigkeit dieses Metabolismus für die Zelle in Übergangszuständen hin. Eine *de novo* Synthese des Enzyms würde, auch aufgrund des komplexen Assemblierungsprozesses, einige Zeit in Anspruch nehmen. Experimente zeigten, dass *Chlamydomonas reinhardtii* Kulturen nach Entfernung von Sauerstoff erst nach einer 10 min Verzögerung, *Synechocystis* Kulturen dagegen sofort, H_2 produzierten (Cournac et al., 2002). Der Unterschied resultiert darin, dass die Grünalgen ihre sehr O_2 -empfindlichen [FeFe] Hydrogenasen erst unter anaeroben Bedingungen exprimieren können.

Im Vergleich zu vielen O_2 -sensitiven [NiFe] Hydrogenasen verläuft die Reaktivierung unter Zugabe von NADH/NADPH ungewöhnlich schnell und ähnelt der O_2 -toleranten löslichen Hydrogenase von *R. eutropha* (Burgdorf et al., 2005 b). Das Reaktivierungsverhalten von Hydrogenasen wird mit der Identität des Sauerstoffliganden, der im aktiven Zentrum gebunden ist, begründet. Der O_2 -Ligand, der die H_2 -Bindung blockiert, muss bei der Reaktivierung protoniert und als Wasser aus dem aktiven Zentrum entfernt werden (Garcin et al., 1999; Higuchi et al., 1999). Dabei ist der zweiatomige O_2 -Ligand des Redoxzustands Ni_u -A vermutlich schwerer zu entfernen als der Hydroxo-Ligand des Ni_r -B Zustands (van Gastel et al., 2005; Volbeda et al., 2005). Es wird angenommen, dass die Gegenwart einer Hydroxo-Gruppe im Ni_r -B Zustand das aktive Zentrum gegenüber einer weiteren und stärkeren Inaktivierung von Sauerstoff schützt. Ni_r -B kann innerhalb von Sekunden bis Minuten aktiviert werden, während die Aktivierung von Ni_u -A Stunden benötigt (Fernandez et al., 1985; Kurkin et al., 2004; Fichtner et al., 2006; De Lacey et al., 2007).

Interessanterweise zeigt diese Arbeit, dass die spektroskopischen Charakteristika der inaktiven Hydrogenase von *Synechocystis* weder denen der Standard Hydrogenasen noch denen der löslichen Hydrogenase von *R. eutropha* in allen Punkten gleichen. Vielmehr besitzt das Enzym von beiden Hydrogenase-Typen etwas und stellt eine Art Zwischenstufe dar. In Standard Hydrogenasen wurden bis zu vier verschiedene oxidierte Zustände detektiert. Die inaktive Hydrogenase von *Synechocystis* liegt dagegen in einem einzigen Redoxzustand vor, der dem Ni_r -B Zustand ähnlich ist. Der Ni_u -A Zustand ist nicht vorhanden. Es wurde außerdem kein ESR-Signal für Nickel detektiert. Vom Ni_r -B Zustand aus erfolgt unter reduzierenden Bedingungen direkt der Übergang zum katalytisch aktiven Enzym. Dies erklärt das schnellere Reaktivierungsverhalten des Enzyms von *Synechocystis* im Vergleich zu den Standard Hydrogenasen.

Die löslichen [NiFe] Hydrogenasen von *Ralstonia* besitzen, genauso wie die Hydrogenase von *Synechocystis*, keinen inaktiven Ni_u -A Zustand und kein ESR-Signal während der Katalyse, welches Nickel zugeordnet werden kann (Happe et al., 2000). Allerdings sind die molekularen Ursachen für die Abwesenheit des Ni_u -A Zustands der beiden Enzyme unterschiedlich.

Die Hydrogenase von *Synechocystis* weist ein $\text{NiFe(CN)}_2(\text{CO})$ Zentrum entsprechend den Standard Hydrogenasen auf. Das aktive Zentrum von Standard-Hydrogenasen ist in Abb. 3.4 B dargestellt. FT-IR-Daten der Hydrogenase von *R. eutropha* deuten dagegen auf ein $\text{Ni(CN)Fe(CN)}_3(\text{CO})$ aktives Zentrum hin. Das Nickel-Atom ist auf Grund des zusätzlichen CN^- -Liganden mindestens fünffach koordiniert. Es wird angenommen, dass die sechste Koordinationsstelle unter aeroben Bedingungen mit einem O_2 -Ligand besetzt wird. Das Eisen ist mit seinen sechs Liganden nicht katalytisch aktiv und gleichzeitig vor der Bindung mit einer O_2 -Spezie geschützt (Happe et al., 2000). Ein Verlust der Extra-CN-Liganden induziert die für Hydrogenasen übliche O_2 -Sensitivität (van der Linden et al., 2004; Bleijlevens et al., 2004 a).

Die anderen zwei O_2 -toleranten Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* besitzen, wie das Enzym von *Synechocystis*, eine Standard-Ligandierung (Pierik et al., 1998; Vincent et al., 2005). Die Membran-gebundene Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* zeigt ein einzigartiges Redoxverhalten des proximalen [FeS] Clusters auf, das die Bildung von $\text{Ni}_i\text{-A}$ verhindern soll (Saggu et al., 2009). Außerdem ist eine von den Standard Hydrogenasen abweichende Aminosäurekonstellation in der Nähe des aktiven Zentrums verantwortlich für eine hohe Affinität zu H_2 (Ludwig et al., 2009). Aufgrund der ermittelten Direktionalität der Hydrogenase von *Synechocystis* in Richtung H_2 Produktion ist nicht damit zu rechnen, dass eine außergewöhnlich hohe Affinität zu H_2 durch spezielle Aminosäuresignaturen nahe des aktiven Zentrums vorliegt, die vor O_2 schützen. Mittels ESR-spektroskopischer Analysen konnte außerdem kein [FeS] Cluster mit einzigartigem Redoxverhalten detektiert werden. Damit fällt wahrscheinlich auch der zweite bekannte Mechanismus zum Schutz des aktiven Zentrums vor O_2 , und damit vor der Ausbildung von $\text{Ni}_i\text{-A}$, weg.

In der regulatorischen Hydrogenase von *R. eutropha* wurde weder ein $\text{Ni}_i\text{-A}$ Zustand noch ein $\text{Ni}_i\text{-B}$ Zustand gefunden (Pierik et al., 1998). Die Strategie dieses Enzyms ist, dass ein enger Gaskanal durch die großen Aminosäuren Isoleucin und Phenylalanin den Zugang von O_2 zum aktiven Zentrum begrenzt und damit die Bildung der inaktiven Zustände verhindert, während gleichzeitig die Öffnung für das kleinere Molekül H_2 groß genug bleibt. (Volbeda et al., 2002; Buhrke et al., 2005 a; Duché et al., 2005). Standard Hydrogenasen der Gattung *Desulfovibrio* besitzen an der Position des Kanalendes die kleinen Aminosäuren Valin und Leucin (Abb. 6.4 A), die einen leichten Sauerstoffzugang und die Ausbildung von beiden inaktiven Zuständen plausibel erscheinen lassen. In einem Sequenzalignment sind die Aminosäuren, die vermutlich das Ende des Gaskanals in der Hydrogenase von *Synechocystis* begrenzen, mit den Aminosäuren der oben genannten Hydrogenasen verglichen (Abb. 6.4 B).

Dem Alignment sind außerdem die lösliche Hydrogenase von *P. furiosus* (Bryant und Adams, 1989) und die bidirektionale Hydrogenase von *A. variabilis* (Serebryakova et al., 1996) zugefügt, deren ESR-spektroskopische Charakteristika denen der Hydrogenase von *Synechocystis* sehr ähnlich sind. Bisher liegen keine FT-IR-Daten der beiden Enzyme vor, weshalb eine Existenz von $\text{Ni}_i\text{-A}$ nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Da

allerdings alle drei Hydrogenasen kein ESR-aktives Nickel-Signal zeigen, ist sehr wahrscheinlich, dass der Redoxzustand nicht vorliegt. Im Alignment wird deutlich, dass die drei Enzyme an dem postulierten Ende des Gaskanals Leucin und Isoleucin aufweisen. Diese beiden Aminosäuren nehmen von der Größe eine Mittelstellung zwischen den bereits diskutierten ein. Die drei Hydrogenasen liegen in ihrer O₂-Empfindlichkeit zwischen Standard Hydrogenasen mit Ni_u-A und Ni_r-B und den O₂-resistenten regulatorischen Hydrogenase ohne diese beiden Zustände.

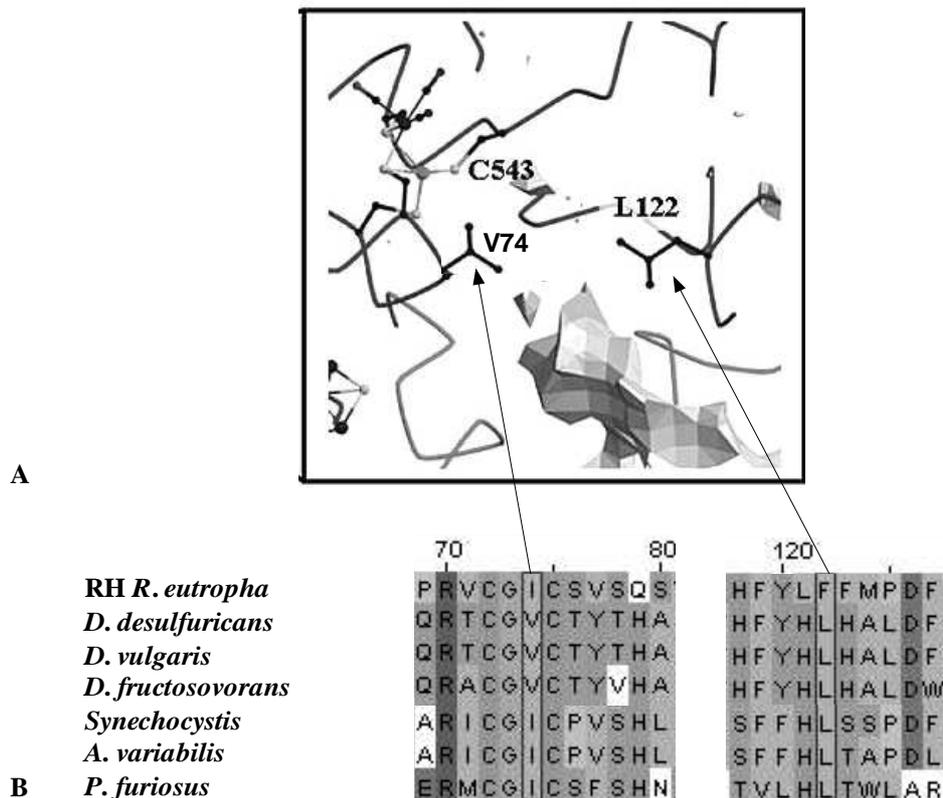


Abb. 6.4: (A) aktives Zentrum der [NiFe] Hydrogenase von *Desulfovibrio fructosovorans* mit modelliertem Gaskanal (verändert nach Dementin et al., 2009). (B) Alignment der Standard Hydrogenasen von *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (AAF43138.1), *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (AAA23370.1) und *Desulfovibrio fructosovorans* (pdb1FRF), der regulatorischen Hydrogenasen (RH) von *Ralstonia eutropha* (NP_942663.1), der löslichen Hydrogenase von *Anabaena variabilis* ATCC (CAA55878.1), *Pyrococcus furiosus* (AAL81558.1) und *Synechocystis* sp. PCC 6803 (NP_441411.1).

Die Größe der Aminosäuren an diesen Positionen könnte einen ersten Erklärungsansatz für die Abwesenheit des Ni_u-A Zustands, das Vorhandensein eines Ni_r-B-ähnlichen Zustands und dem damit verbundenen schnellen anaeroben Aktivierungsverhalten der Hydrogenase von *Synechocystis* bieten. Möglicherweise steht auch die Direktionalität des Enzyms mit der Aminosäurekonstellation in Verbindung.

Es lässt sich festhalten, dass die bidirektionale [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* einige Merkmale der Standard Hydrogenasen wie die Ligandierung des aktiven Zentrums und die

IR-spektroskopischen Charakteristika der drei katalytisch aktiven Redoxzustände teilt. Im Unterschied zu dieser Enzym-Gruppe konnte kein [3Fe4S] Cluster, kein paramagnetisches Nickel und nur ein inaktiver Redoxzustand (Ni_I-B-ähnlich) detektiert werden. Diese Eigenschaften ähneln denen der löslichen Hydrogenase von *R. eutropha* und stehen teilweise im Zusammenhang mit dem schnellen Reaktivierungsverhalten und der damit verbundenen geringeren O₂-Empfindlichkeit der beiden Enzyme. Im Gegensatz zu dem Enzym von *R. eutropha* besitzt die Hydrogenase von *Synechocystis* eine für die Klasse der [NiFe] Hydrogenasen bisher unbekannte Direktionalität hin zur H₂-Produktion. Diese Tatsache macht das Enzym für eine biotechnologische Verwendung besonders interessant.

7 Ausblick

Im Zuge weiterer Charakterisierungen der [NiFe] Hydrogenase von *Synechocystis* könnten zusätzliche Klonierungen zur Überexpression der Hydrogenase erfolgen, um die Ausbeute bei der Isolierung weiter zu steigern:

- In einer Western Blot-Analyse wurde eine HoxH-Doppelbande detektiert (Abb. 5.4), die darauf schließen lässt, dass auch in *Synechocystis* eine Endopeptidase zur Hydrogenase-reifung und Prozessierung der großen Untereinheit notwendig ist. Die Peptidase wird vermutlich von *hoxW* kodiert (Hoffmann et al., 2006). Zu der Überexpression der Hox- und Hyp-Proteine scheint eine homologe Überexpression von HoxW in *Synechocystis* zur weiteren Steigerung der Ausbeute an aktiver [NiFe] Hydrogenase sinnvoll.
- Außerdem ist interessant, neben dem in dieser Arbeit verwendeten *psbAII*-Promotor ein anderes Expressionssystem mit einem starken induzierbaren Promotor zu etablieren. Es wurden bereits erste Konstrukte mit dem *Synechocystis* eigenen *petJ*-Promotor und dem *nirA*-Promotor aus *Synechococcus* sp. PCC 7942 erstellt. Letzter wird durch Ammonium reprimiert und durch Nitrit induziert (Maeda et al., 1998). *NirA* kodiert die Nitrit-Reduktase. Unter Verwendung des *nirA*-Promotor konnte in *Synechocystis* die Expression eines Gens für die Tocopherolsynthese um ca. das 5-fache erhöht werden (Qi et al., 2005). *PetJ* kodiert Cytochrom c_6 und der *petJ*-Promotor wird durch Kupfer reguliert (Tous et al., 2001; Sobotka et al., 2008).
- Die Fusion des Strep-tag (II) an *hoxF* oder die bei der Klonierung eingefügte Antibiotikaresistenz vermindert die Expression des *hox*-Operons (Kapitel 5.1.1). Aus diesem Grund wäre es interessant den Strep-tag (II) an eine alternative Stelle zu fusionieren, einen anderen Fusions-tag zu testen oder ein Konstrukt ohne Resistenzkassette zu erstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit aufgezeigt, eine Form der nativen Hydrogenase-Komplexe über Affinitätschromatographie, Gelfiltration und Anionen-Austausch-Chromatographie zu isolieren. Mit dieser Probe empfiehlt sich, in Zukunft neben ESR-Spektroskopie eine Eisen- und Nickel-Bestimmung, z. B. mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS), durchzuführen. Bei gleichzeitiger Ermittlung der Stöchiometrie der Untereinheiten mittels Edman-Sequenzierung und der FMN-Konzentration sind genaue Aussagen über die Anzahl von FMN und über die Anzahl und Identität der [FeS] Cluster in der Hydrogenase zu erhalten. Erkenntnisse über die Menge von FMN im Protein sind für die Interpretation der katalytischen Vorgänge von Bedeutung. Es wird spekuliert, ob in der kleinen Hydrogenase-Untereinheit HoxY ein weiteres katalytisch aktives FMN gebunden sein könnte wie in der löslichen Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* (van der Linden et al., 2004).

Weitere biochemische Eigenschaften wie die Temperaturabhängigkeit der Hydrogenase oder die K_m -Werte für NADH, NAD(P)H und für Ferredoxin sind zu untersuchen, letztere, um Aussagen über den physiologischen Elektronendonator in der Zelle treffen zu können. Partielle Deletionen von *hox*-Genen in *Synechocystis* in Zusammenhang mit Aktivitätsmessungen könnten Informationen darüber geben, ob unterschiedlich zusammengesetzte Hydrogenase-Komplexe verschiedene physiologische Funktionen erfüllen.

Nachdem die grundsätzliche Kristallisationsfähigkeit des Proteins in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, können darauf aufbauend mit dem einzelnen, stabilen und aktiven Hydrogenase-Komplex die Bedingungen dahingehend optimiert werden, große Einkristalle zu gewinnen. Die Struktur eines Hydrogenase-Diaphorase-Komplexes ist bisher nicht bekannt und soll neue Erklärungsansätze für die aerobe Inaktivierung und höhere O_2 -Toleranz dieser Gruppe von Hydrogenasen liefern. Damit wäre eine Interpretation der bisherigen funktionellen Charakterisierung des Proteins durch spektroskopische Messergebnisse aus FT-IR- und ESR-Experimenten direkt mit den strukturellen Eigenschaften, insbesondere der spezifischen Proteinumgebung des aktiven Zentrums, zu korrelieren.

Des Weiteren wäre aufschlussreich, die Hydrogenase (HoxYH) getrennt von der Diaphorase (HoxEFU) zu isolieren und spektroskopisch zu analysieren. Damit ließe sich näher untersuchen, welche Ursache die Abwesenheit des Nickel-Signals in der ESR-Spektroskopie hat. Diskutiert wurde, dass ein ESR-aktives Nickel mit einer weiteren paramagnetischen Spezies koppelt. Dies könnte eines der zahlreichen [FeS] Cluster der Diaphorase sein. Daher gilt es zu untersuchen, ob die Hydrogenase-Untereinheiten ohne die Diaphorase ein Nickel-Signal in der ESR-Spektroskopie zeigen.

Über Redox-Tritrationen, in Kombination mit FTIR-Spektroskopie, werden zurzeit die Potenziale der vier identifizierten Redoxzustände der Hydrogenase bestimmt. So kann gegebenenfalls ein Ni_a -C-Signal bei spezifischem Redoxpotenzial für ESR-spektroskopische Analysen stabilisiert werden.

Um die in dieser Arbeit detektierte Neigung des Enzyms in Richtung H_2 -Bildung im Vergleich zu anderen [NiFe] und [FeFe] Hydrogenasen zu bewerten und das Enzym als potenziellen Katalyst für die begehrte H_2 -Produktion auszumachen, ist es interessant den K_m -Wert für H_2 zu bestimmen. In dem Zusammenhang ist es ebenfalls wichtig, genau zu untersuchen, ab welcher Konzentration H_2 die eigene Synthese inhibiert und ab welcher O_2 -Konzentration das Enzym inaktiviert wird. Dies kann mittels Protein-Film-Elektrochemie analysiert werden.

Um die O_2 -Toleranz der Hydrogenase von *Synechocystis* zu erhöhen, könnten Mutanten konstruiert werden, die veränderte Aminosäurekonstellationen am hydrophoben Kanal und am aktiven Zentrum aufweisen. Bis zur Aufklärung der Röntgenstruktur des Enzyms kann dabei die Struktur der Standard Hydrogenasen als Orientierung dienen.

8 Literatur

- Adams, M. W. W., Eccleston, E. and Howard, J. B. (1989) Iron-sulfur clusters of hydrogenase I and hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. 86, 4932 - 4936.
- Agarwal, R., Ortleb, S., Sainis, J. K. and Melzer, M. (2009) Immunoelectron microscopy for locating calvin cycle enzymes in the thylakoids of *Synechocystis* 6803. *Mol. Plant.* 2, 32 - 42.
- Alsfasser, R., Janiak, C., Klapötke, T. M. and Meyer, H. J. (2007) *Moderne Anorganische Chemie*. 3. Auflage. E. Riedel (Hrsg.), Walter de Gruyter, New York, Berlin.
- Amara, P., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C. and Field, M. J. (1999) A Hybrid Density Functional Theory/Molecular Mechanics Study of Nickel-Iron Hydrogenase: Investigation of the Active Site Redox States. *Am. Chem. Soc.* 121, 4468 - 4477.
- Anderson, S. and McIntosh, L. (1991) Light activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a blue-light requiring process. *J. Bacteriol.* 173, 2761 - 2767.
- Appel, J. and Schulz, R. (1996) Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* 1298, 141 - 147.
- Appel, J. and Schulz, R. (1998) Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis - hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poisoning? *J. Photochem. Photobiol.* 47, 1 - 11.
- Appel, J., Phunpruch, S., Steinmüller, K. and Schulz, R. (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch. Microbiol.* 173, 333 - 338.
- Armstrong, F. A. and Wilson, G. S. (2000) Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochim. Acta* 45, 2623 - 2645.
- Armstrong, F. A. and Fontecilla-Camps, J. C. (2008) A natural choice for activating hydrogen. *Science* 321, 498 - 499.
- Backasch, N. (2008) Untersuchungen zur Biosynthese und Funktion von Tocopherol und Plastochinon im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Fachbereich Biologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel.
- Baffert, C., Demuez, M., Cournac, L., Burlat, B., Guigliarelli, B., Bertrand, P., Girbal, L. and Léger, C. (2008) Hydrogen-Activating Enzymes: Activity Does Not Correlate with Oxygen Sensitivity. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 2052 - 2054.
- Bagley, K. A., Duin, E. C., Roseboom, W., Albracht, S. P. J. and Woodruff, W. H. (1995) Infrared-Detectable Groups Sense Changes in Charge Density on the Nickel Center in Hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochem.* 34, 5527 - 5535.
- Banks, C. E. and Compton, R. G. (2005) Edge Plane Pyrolytic Graphite Electrodes in Electroanalysis: An Overview. *Anal. Sci.* 21, 1263 - 1268.
- Berman-Frank, I., Lundgren, P. and Falkowski, P. (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* 154, 157 - 164.
- Bernhard, M., Buhrke, T., Bleijlevens, B., De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Albracht, S. P. and Friedrich, B. (2001) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and its interaction with a histidine protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 15592 - 15597.
- Black, L. K., Fu, C. and Maier, R. (1994) Sequences and characterization of hupU and hupV genes of *Bradyrhizobium japonicum* encoding a possible nickel-sensing complex involved in hydrogenase expression. *J. Bacteriol.* 176, 7102 - 7106.
- Bleijlevens, B., Buhrke, T., van der Linden, E., Friedrich, B. and Albracht, S. P. J. (2004 a) 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.* 279, 46686 - 46691.
- Bleijlevens, B., van Broekhuizen, F., De Lacey, A. L., Roseboom, W., Fernandez, V. M. and Albracht, S. P. (2004 b) The activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9, 743 - 752.

- Blokesch, M. and Böck, A. (2002) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J. Mol. Biol.* 324, 287 - 296.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8, 93 - 99.
- Böck, A., King, P. W., Blokesch, M. and Posewitz, M. C. (2006) Maturation of hydrogenases. *Adv. Microb. Physiol.* 51, 1 - 71.
- Boison, G., Schmitz, O., Schmitz, B. and Bothe, H. (1998) Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Curr. Microbiol.* 36, 253 - 258.
- Boison, G., Bothe, H. and Schmitz, O. (2000) Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the Cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR. *Curr. Microbiol.* 40, 315 - 321.
- Bothe, H., Kentemich, T. and Dai, H. (1991) Recent aspects on the hydrogenase–nitrogenase relationship in cyanobacteria. *Dev. Plant Soil. Sci.* 48, 367 - 375.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 - 254.
- Brecht, M., van Gestel, M., Buhrke, T., Friedrich, B. and Lubitz, W. (2003) Direct detection of an hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H₂-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 13075 - 13083.
- Brugna-Guiral, M., Tron, P., Nitschke, W., Stetter, K. O., Burlat, B., Guigliarelli, B., Bruschi, M. and Giudici-Orticoni, M. T. (2003) [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics. *Extremophiles* 7, 145 - 157.
- Bryant, D. A. (1994) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bryant, F. O. and Adams, M. W. W. (1989) Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 264, 5070 - 5079.
- Buhrke, T., Lenz, O., Krauss, N. and Friedrich, B. (2005 a) Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J. Biol. Chem.* 280, 23791 - 13796.
- Buhrke, T., Löscher, S., Lenz, O., Schlodder, E., Zebger, I., Andersen, L. K., Hildebrandt, P., Meyer-Klaucke, W., Dau, H., Friedrich, B. and Haumann, M. (2005 b) Reduction of Unusual Iron-Sulfur Clusters in the H₂-sensing Regulatory Ni-Fe Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biol. Chem.* 280, 19488 - 19495.
- Burgdorf, T., van der Linden, E., Bernhard, M., Yin, Q. Y., Back, J. W., Hartog, A. F., Muijsers, A. O., de Koster, C. G., Albracht, S. P. J. and Friedrich, B. (2005 a) The Soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 Consists of Six Subunits and Can Be Specifically Activated by NADPH. *J. Bacteriol.* 187, 3122 - 3132.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P. J. and Friedrich, B. (2005 b) [NiFe] Hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: Modular Enzymes for Oxygen-Tolerant Biological Hydrogen Oxidation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 10, 181 - 196.
- Chapman, S. K. and Reid, C. A. (1999) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 131: Flavoprotein Protocols. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Chochois, V., Dauvillée, D., Beyly, A., Tolleter, D., Cuiné, S., Timpano, H., Ball, S., Cournac, L. and Peltier, G. (2009) Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. *Plant Physiol.* 151, 631 - 640.
- Cournac, L., Mus, F., Bernard, L., Guedeney, G., Vignais, P. M. and 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. Hydrogen Energy* 27, 1229 - 1237.
- Cournac, L., Guedeney, G., Peltier, G. and Vignais, P. M. (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.
- Czeslik, C., Seemann, H. and Winter, R. (2007) *Basiswissen Physikalische Chemie*. 2. Auflage. B. G. Teubner Verlag/GWW Fachverlage GmbH, Wiesbaden.

- Davidson, G., Choudhury, S. B., Gu, Z., Bose, K., Roseboom, W., Albracht, S. P. and Maroney, M. J. (2000) Structural examination of the nickel site in *Chromatium vinosum* hydrogenase: redox state oscillations and structural changes accompanying reductive activation and CO binding. *Biochemistry*. 39, 7468 - 7479.
- De Lacey, A. L., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C. and Fernandez, V. M. (1997) Infrared spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 7181 - 7189.
- De Lacey, A. L., Stadler, C., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Fan, H. -J., Li, S. and Hall, M. B. (2002) IR spectroelectrochemical study of the binding of carbon monoxide to the active site of *Desulfovibrio fructosovorans* Ni-Fe hydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7, 318 - 326.
- De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Rousset, M. and Cammack, R. (2007) Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies. *Chem. Rev.* 107, 4304 - 4330.
- Dementin, S., Burlat, B., De Lacey, A. L., Pardo, A., Adryanczyk-Perrier, G., Guigliarelli, B., Fernandez, V. M. and Rousset, M. (2004) A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* 279, 10508 - 10513.
- Dementin, S., Feroux, F., Cournac, L., De Lacey, A., Volbeda, A., Léger, C., Burlat, B., Martinez, N., Champ, S., Martin, L., Sanganas, O., Haumann, M., Fernandez, V., Guigliarelli, B., Fontecilla-Camps, J. C. and Rousset, M. (2009) Introduction of Methionines in the Gas Channel Makes [NiFe] Hydrogenase Aero-Tolerant. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 10156 - 10164.
- Dole, F., Fournel, A., Magro, V., Hatchikian, E. C., Bertrand, P. and Guigliarelli, B. (1997) Nature and electronic structure of the Ni-X dinuclear center of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Implications for the enzymatic mechanism. *Biochemistry*. 36, 7847 - 7854.
- Duché, O., Elsen, S., Cournac, L. and 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.
- Elhai, J. (1993) Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 179 - 184.
- Elliott, J. I. and Brewer, J. M. (1978) The inactivation of Yeast Enolase by 2,3-Butanedione. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 351 - 357.
- Elsen, S., Colbeau, A., Chabert, J. and Vignais, P. M. (1996) The hupTUV operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 178, 5174 - 5181.
- Erkens, A., Schneider, K. and Müller, A. (1996) The NAD-linked soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16: detection and characterization of EPR signals deriving from nickel and flavin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 1, 99 - 110.
- Fernandez, V. M., Rao, K. K., Fernandez, M. A. and Cammack, R. (1984) Activation and deactivation of the membrane-bound hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*, Norway strain. *Biochimie* 68, 43 - 48.
- Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C. and Cammack, R. (1985) Properties and reactivation of two different deactivated forms of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 832, 69 - 79.
- Fichtner, C., Laurich, C., Bothe, E. and Lubitz, W. (2006) Spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry* 45, 9706 - 9716.
- Florin, L., Tsokoglou, A. and 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.
- Foerster, S., Stein, M., Brecht, M., Ogata, H., Higuchi, Y. and Lubitz, W. (2003) Single crystal EPR studies of the reduced active site of [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 83 - 93.
- Foerster, S., van Gastel, M., Brecht, M. and Lubitz, W. (2005) An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni-C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F hydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10, 51 - 62.

- Fontecilla-Camps, J. C., Frey, M., Garcin, E., Hatchikian, C., Montet, Y., Piras, C., Vernède, X. and Volbeda, A. (1997) Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *A. Biochimie* 79, 661 - 666.
- Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C. and Nicolet, Y. (2007) Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chemical reviews* 107, 4273 - 4303.
- Fontecilla-Camps, J. C., Amara, P., Cavazza, C., Nicolet, Y. and Volbeda, A. (2009) Structure-function relationships of anaerobic gas-processing metalloenzymes. *Nature* 460, 814 - 822.
- Forzi, L. and Sawers, R. G. (2007) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals*. 20, 565 - 578.
- Frey, M. (2002) Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes. *ChemBioChem* 3, 153 - 160.
- Friedrich, B. and Schwartz, E. (1993) Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 351 - 583.
- Friedrich, B., Buhrke, T., Burgdorf, T. and Lenz, O. (2005) A hydrogen-sensing multiprotein complex controls aerobic hydrogen metabolism in *Ralstonia eutropha*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 97 - 101.
- Friedrich, T., Brors, B., Hellwig, P., Kintscher, L., Rasmussen, T., Scheide, D., Schulte, U., Mäntele, W. and Weiss, H. (2000) Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta.* 1459, 305 - 309.
- Garcin, E., Vernède, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure* 7, 557 - 566.
- Gfeller, R. P. and Gibbs, M. (1985) Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: II. Role of Plastoquinone. *Plant Physiol.* 77, 509 - 511.
- Ghirardi, M. L., Dubini, A., Yu, J. and Maness, P. C. (2009) Photobiological hydrogen-producing systems. *Chem. Soc. Rev.* 38, 52 - 61.
- Grigorieva, G. and Shestakov, S. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 367 - 370.
- Guigliarelli, B. and Bertrand, P. (1999) Application of EPR spectroscopy to the structural and functional study of iron-sulfur proteins. *Adv. Inorg. Chem.* 47, 421 - 497.
- Guigliarelli, B., More, C., Fournel, A., Asso, M., Hatchikian, E. C., Williams, R., Cammack, R. and Bertrand, P. (1995) Structural organization of the Ni and (4Fe-4S) centers in the active form of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Analysis of the magnetic interactions by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34, 4781 - 4790.
- Guiral, M., Aubert, C. and Giudici-Ortoniconi, M. T. (2005) Hydrogen metabolism in the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 22 - 24.
- Gutekunst, K., Phunpruch, S., Schwarz, C., Schuchardt, S., Schulz-Friedrich, R. and Appel, J. (2005) LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Mol. Microbiol.* 58, 810 - 823.
- Gutekunst, K., Hoffmann, D., Lommer, M., Egert, M., Suzuki, I., Schulz-Friedrich, R. and Appel, J. (2006) Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1452 - 1459.
- Gutthann, F., Egert, M., Marques, A. and Appel, J. (2007) Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 161 - 169.
- Hall, J. F., Ellis, M. J., Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, T., Seki, E., Hasnain, S. S. and Yokoyama, S. (2005) Towards the high-throughput expression of metalloproteins from the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *J. Synchrotron. Radiat.* 12, 4 - 7.
- Hallenbeck, P. C. and Benemann, J. R. (1978) Characterization and partial purification of the reversible hydrogenase of *Anabaena cylindrica*. *FEBS Lett.* 94, 261 - 264.
- Happe, R. P., Roseboom, W., Pierik, A. J., Albracht, S. P. and Bagley, K. A. (1997) Biological activation of hydrogen. *Nature* 385, 126.
- Happe, R. P., Roseboom, W., Egert, G., Friedrich, C. G., Massanz, C., Friedrich, B. and Albracht, S. P. J. (2000) Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Letters* 466, 259 - 263.

- Happe, T. and Kaminski, A. (2002) Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 269, 1022 - 1032.
- Hemschemeier, A., Fouchard, S., Cournac, L., Peltier, G. and Happe, T. (2008) Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta* 227, 397 - 407.
- Higuchi, Y., Yagi, T. and 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.
- Higuchi, Y., Ogata, H., Miki, K., Yasuoka, N. and Yagi, T. (1999) Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure* 7, 549 - 556.
- Hiramoto, T., Warkentin, E., Moll, J., Ermler, U. and Shima, S. (2009) The crystal structure of an [Fe]-hydrogenase-substrate complex reveals the framework for H₂ activation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 6457 - 6460.
- Hoeben, F. J., Heller, I., Albracht, S. P., Dekker, C., Lemay, S. G. and Heering, H. A. (2008) Polymyxin-coated Au and carbon nanotube electrodes for stable [NiFe]-hydrogenase film voltammetry. *Langmuir* 24, 5925 - 5931.
- Hoffmann, D., Gutekunst, K., Klissenbauer, M., Schulz-Friedrich, R. and Appel, J. (2006) Mutagenesis of hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Additional homologues of hypA and hypB are not active in hydrogenase maturation. *FEBS J.* 273, 4516 - 4527.
- Houchins, J. P. and Burris, R. H. (1981) Physiological Reactions of the Reversible Hydrogenase from *Anabaena* 7120. *Plant Physiol.* 68, 717 - 721.
- Houchins, J. P. (1984) The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 768, 227 - 255.
- Howarth, D. C. and Codd, G. A. (1985) The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1561 - 1569.
- Hube, M., Blokesch, M. and Böck, A. (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. *J. Bacteriol.* 184, 3879 - 3885.
- IPCC-Intergovernmental Panel on Climate Change (2007) Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, Pachauri, R. K. and Reisinger, A. (Eds.) IPCC, Geneva, Switzerland.
- Ishii, A. and Hihara, Y. (2008) An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 148, 660 - 670.
- Jones, A. K., Lenz, O., Strack, A., Buhrke, T. and Friedrich, B. (2004) NiFe hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry.* 43, 13467 - 13477.
- Kanai, T., Ito, S. and Imanaka, T. (2003) Characterization of a Cytosolic NiFe-Hydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* 185, 105 - 111.
- 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. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109 - 136.
- Kentemich, T., Caspar, M. and Bothe, H. (1991) The reversible hydrogenase in *Anacystis nidulans* is a component of the cytoplasmatic membrane. *Naturwissenschaften* 78, 559 - 560.
- Kiss, E., Kós, P. B. and Vass, I. (2009) Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biotechnol.* 142, 31 - 37.
- Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T. and Friedrich, B. (2000) The H₂-sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe]-hydrogenases. *J. Bacteriol.* 182, 2716 - 2724.

- Kucho, K., Okamoto, K., Tsuchiya, Y., Nomura, S., Nango, M., Kanehisa, M. and Ishiura, M. (2005) Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 187, 2190 - 2199.
- Kunert, A., Hagemann, M. and Erdmann, N. (2000) Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *J. Microb. Meth.* 41, 185 - 194.
- Kurkin, S., George, S. J., Thorneley, R. N. and Albracht, S. P. J. (2004) Hydrogen-induced activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum* as studied by stopped-flow infrared spectroscopy. *Biochemistry* 43, 6820 - 6831.
- Labarre, J., Chauvat, F. and Thuriaux, P. (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171, 3449 - 3457.
- Lai, C. H., Lee, W. Z., Miller, M. L., Reibenspies, J. H., Darensbourg, D. J. and Darensbourg, M. Y. (1998) Responses of the Fe(CN)₂(CO) Unit to Electronic Changes as Related to Its Role in [NiFe]Hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 10103 - 10114.
- Lambert, G. R. and Smith, G. D. (1981) Hydrogen uptake by the nitrogen-starved cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 360 - 367.
- Leach, M. R. and Zamble, D. B. (2007) Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 159 - 165.
- Léger, C., Jones, A. K., Albracht, S. P. J and Armstrong, F. A. (2002) Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [NiFe] hydrogenase and other enzymes. *J. Phys. Chem.* 106, 13058 - 13063.
- Léger, C., Elliott, S. J., Hoke, K. R., Jeuken, L. J. C., Jones, A. K. and Armstrong, F. A. (2003) Enzyme Electrokinetics: Using Protein Film Voltammetry to investigate Redox Enzymes and their Mechanisms. *Biochemistry*, 42, 8653 - 8662.
- Léger, C. and Bertrand, P. (2008) Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies. *Chemical reviews* 108, 2379 - 2438.
- Lenz, O., Gleiche, A., Strack, A. and Friedrich, B. (2005) Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J. Bacteriol* **187**, 6590 - 6595.
- Leroux, F., Dementin, S., Burlat, B., Cournac, L., Volbeda, A., Champ, S., Martin, L., Guigliarelli, B., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J., Rousset, M. and Léger, C. (2008) Experimental approaches to kinetics of gas diffusion in hydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11188 - 11193.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148, 538 - 548.
- Lichty, J. J., Malecki, J. L., Agnew, H. D., Michelson-Horowitz, D. J. and Tan, S. (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Prot. Expr. Purific.* 41, 98 - 105.
- Lieman-Hurwitz, J., Haimovich, M., Shalev-Malul, G., Ishii, A., Hihara, Y., Gaathon, A., Lebendiker, M. and Kaplan, A. (2009) A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO₂ by modulating low-CO₂-induced gene expression. *Environ. Microbiol.* 11, 927 - 936.
- Lippard, S. J. and Berg, J. M. (1995) *Bioanorganische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Long, M., Liu, J., Chen, Z., Bleijlevens, B., Roseboom, W. and Albracht, S. P. J. (2007) Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* and some EPR and IR properties of the hydrogenase module. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 62 - 78.
- Lubitz, W., Reijerse, E. and van Gestel, M. (2007) [NiFe] and [FeFe] Hydrogenases Studied by Advanced Magnetic Resonance Techniques. *Chem. Rev.* 107, 4331 - 4365.
- Ludwig, M., Schulz-Friedrich, R. and 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.
- Ludwig, M., Cracknell, J. A., Vincent, K. A., Armstrong, F. A. and Lenz, O. (2009) Oxygen-tolerant H₂ Oxidation by Membrane-bound [NiFe] Hydrogenases of *Ralstonia* Species. Coping with low level H₂ in air. *J. Biol. Chem.* 284, 465 - 477.

- Maeda, S., Kawaguchi, Y., Ohe, T. A. and Omata, T. (1998) Cis-acting sequences required for NtcB-dependent, nitrite-responsive positive regulation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *J. Bacteriol.* 180, 4080 - 4088.
- Maness, P. C. and Weaver, P. F. (2001) Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 751 - 756.
- Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Vass, I. and Nagy, F. (1998) UV-B-induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* 273, 17439 - 17444.
- Matias, P. M., Soares, C. M., Saraiva, L. M., Coelho, R., Morais, J., LeGall, J. and Carrondo, M. A. (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.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L. and Seibert, M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 122, 127 - 135.
- Messenger, S. L. and Green, J. (2003) FNR-mediated regulation of hyp expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 228, 81 - 86.
- Misra, H. S. and Tuli, R. (2000) Differential expression of photosynthesis and nitrogen fixation genes in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Physiol.* 122, 731 - 736.
- Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernède, X., Hatchikian, E. C., Field, M. J., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J. C. (1997) Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat. Struct. Biol.* 4, 523 - 526.
- Mukai, K., Kimura, T., Helbert, J. and Kevan, L. (1973) Environment of the iron-sulfur chromophore in adrenodoxin studied by EPR and ENDOR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 295, 49 - 56.
- Murata, N. and Omata, T. (1983) Isolation of cyanobacterial plasma membranes. *Methods Enzymol.* 167, 245 - 251.
- Mus, F., Cournac, L., Cardellini, V., Caruana, A. and Peltier, G. (2005) Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1708, 322 - 332.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E. and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure* 15, 13 - 23.
- Ogata, H., Mizoguchi, Y., Mizuno, N., Miki, K., Adachi, S., Yasuoka, N., Yagi, T., Yamauchi, O., Hirota, S. and Higuchi, Y. (2002) Structural studies of the carbon monoxide complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: suggestion for the initial activation site for dihydrogen. *Am. Chem. Soc.* 124, 11628 - 11635.
- Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., Kano, K. and Higuchi, Y. (2005) Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure* 13, 1635 - 1642.
- Ogata, H., Lubitz, W. and Higuchi, Y. (2009) [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Trans.* 7, 7577 - 7587.
- Ohkawa, H., Sonoda, M., Shibata, M. and Ogawa, T. (2001) Localization of NAD(P)H dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183, 4938 - 4939.
- Ohnishi, T. (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 186 - 206.
- Oliveira, P. and Lindblad, P. (2005) LexA, a transcriptional regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 251, 59 - 66.
- Oliveira, P. and Lindblad, P. (2008) An AbrB-like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 190, 1011 - 1019.
- Pal, D. and Chakrabarti, P. (2001) Non-hydrogen bond interactions involving the methionine sulfur atom. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 19, 115 - 128.

- Pandelia, M. E., Ogata, H., Currell, L. J., Flores, M. and Lubitz, W. (2010) Inhibition of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F by carbon monoxide: an FTIR and EPR spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797, 304 - 313.
- Patil, D. S. (1994) Nickel-iron-selenium hydrogenase. *Methods Enzymol.* 243, 68 - 94.
- Pereira, I. A. C., Romão, C. V., Xavier, A. V., LeGall, J. and Teixeira, M. (1998) Electron transfer between hydrogenases and mono- and multiheme cytochromes in *Desulfovibrio* ssp. *J. Biol. Inorg. Chem.* 3, 494 - 498.
- Phunpruch, S. (1999) Mutational and transcriptional analysis of a hydrogenase gene cluster in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität, Marburg.
- Pierik, A. J., Schmelz, M., Lenz, O., Friedrich, B. and Albracht, S. P. J. (1998) Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*. *FEBS Lett.* 438, 231 - 235.
- Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A. and Albracht, S. P. (1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *J. Biol. Chem.* 274, 3331 - 3337.
- Porthun, A., Bernhard, M. and Friedrich, B. (2002) Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* 177, 159 - 166.
- Prince, R. C. and Adams, M. W. (1987) Oxidation-reduction properties of the two Fe₄S₄ clusters in *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 262, 5125 - 5128.
- Qi, Q., Hao, M., Ng, W., Slater, S. C., Baszis, S. R., Weiss, J. D. and Valentin, H. E. (2005) Application of the *Synechococcus nirA*-Promotor to establish an inducible expression System for engineering the *Synechocystis* tocopherol pathway. *Appl. Env. Microb.* 71, 5678 - 5684.
- Rákhely, G., Kovács, A. T., Maróti, G., Fodor, B. D., Csanádi, G., Latinovics, D. and Kovács, K. L. (2004) Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 722 - 728.
- Rasmussen, T., Scheide, D., Brors, B., Kintscher, L., Weiss, H. and Friedrich, T. (2001) Identification of Two Tetranuclear FeS Clusters on the Ferredoxin-Type Subunit of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Biochemistry* 40, 6124 - 6131.
- Reed, R. H. and Stewart, W. D. P. (1985) Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Mar. Biol.* 88, 1 - 9.
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H. F., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S. and Böck, A. (2003) Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science*, 299, 1067 - 1070.
- Rey, L., Fernandez, D., Brito, B., Hernando, Y., Palacios, J. M., Imperial, J. and Ruiz-Argueso, T. (1996) The hydrogenase gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains an additional gene (hypX), which encodes a protein with sequence similarity to the N10-formyltetrahydrofolate-dependent enzyme family and is required for nickel-dependent hydrogenase processing and activity. *Mol. Gen. Genet.* 252, 237 - 248.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1 - 61.
- Roberts, L. M. and Lindahl, P. A. (1994) Analysis of oxidative titrations of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase; implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* 33, 14339 - 14350.
- Roseboom, W., Blokesch, M., Böck, A. and Albracht, S. P. J. (2005) The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different. *FEBS Lett.* 579, 469 - 472.
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. and Böck, A. (1994) Maturation of the large subunit (HYCE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. *Eur. J. Biochem.* 220, 377 - 384.
- Rousset, M., Montet, Y., Guigliarelli, B., Forget, N., Asso, M., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J. C. and Hatchikian, E. C. (1998). [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11625 - 11630.

- Rupprecht, J., Hankamer, B., Mussgnug, J. H., Ananyev, G., Dismukes, C. and Kruse, O. (2006) Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 442 - 449.
- Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14, 255 - 274.
- Saggu, M., Zebger, I., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., Hildebrandt, P. and Lenzian, F. (2009) Spectroscopic insights into the oxygen-tolerant membrane-associated [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biol. Chem.* 284, 16264 - 16276.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 - 5467.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical. Biochemistry* 166, 368 - 379.
- Schink, B. and Schlegel, H. G. (1979) The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 567, 315 - 324.
- Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F. and Bothe, H. (1995) Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* 233, 266 - 76.
- Schmitz, O. and Bothe, H. (1996) The diaphorase subunit HoxU of the bidirectional hydrogenase in electron transferring protein in cyanobacterial respiration? *Naturwissenschaften* 83, 525 - 527.
- Schmitz, O., Boison, G. and Bothe, H. (2001) Quantitative analysis of expression of two circadian clock-controlled gene clusters coding for the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Microbiol.* 41, 1409 - 1417.
- Schmitz, O., Boison, G., Salzmann, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S. H. and Happe, T. (2002) HoxE- a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1554, 66 - 74.
- Schneider, K. and Schlegel, H. G. (1976) Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim. Biophys. Acta* 452, 66 - 80.
- Schneider, K., Cammack, R., Schlegel, H. G. and Hall, D. O. (1979) The iron-sulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta* 578, 445 - 461.
- Schneider, K., Cammack, R. and Schlegel, H. G. (1984 a) Content and localization of FMN, Fe-S clusters and nickel in the NAD-linked hydrogenase of *Nocardia opaca* 1b. *Eur. J. Biochem.* 142, 75 - 84.
- Schneider, K., Jochim, K. and Schlegel, H. G. (1984 b) Effect of nickel on activity and subunit composition of purified hydrogenase from *Nocardia opaca* 1b. *Eur. J. Biochem.* 138, 533 - 541.
- Schopf, J. W. (1993) Microfossils of the early archean apex chert - new evidence of the antiquity of life. *Science* 260, 640 - 646.
- Schröder, O., Bleijlevens, B., de Jongh, T. E., Chen, Z. J., Li, T. S., Fischer, J., Foerster, J., Friedrich, C. G., Bagley, K. A., Albracht, S. P. J. and Lubitz, W. (2007) Characterization of a cyanobacterial-like uptake [NiFe] hydrogenase: EPR and FTIR spectroscopic studies of the enzyme from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 212 - 233.
- Schultze, M., Forberich, B., Rexroth, S., Dyczmons, N. G., Roegner, M. and Appel, J. (2009) Localization of cytochrome b₆f complexes implies an incomplete respiratory chain in cytoplasmic membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1479 - 1485.
- Schumann, S., Saggu, M., Möller, N., Anker, S. D., Lenzian, F., Hildebrandt, P. and Leimkühler, S. (2008) The Mechanism of Assembly and Cofactor Insertion into *Rhodobacter capsulatus* Xanthine Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 283, 16602 - 16611.
- Schütz, K., Happe, T., Troshina, O., Lindblad, P., Leitão, E., Oliveira, P. and Tamagnini, P. (2004) Cyanobacterial H₂ production - a comparative analysis. *Planta* 218, 350 - 359.
- Schwartz, E. and Friedrich, B. (2006) The H₂-Metabolizing Prokaryotes. *Prokaryotes* 2, 496 - 563.
- Serebryakova, L. T., Zorin, N. A. and Lindblad, P. (1994) Reversible hydrogenase in *A. variabilis* ATCC 29413. *Arch. Microbiol.* 161, 140 - 144.

- Serebryakova, L. T., Medina, M., Zorin, N. A., Gogotov, I. N. and Cammack, R. (1996) Reversible hydrogenase of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: catalytic properties and characterization of redox centres. *FEBS Letters* 383, 79 - 78.
- Shevchuk, N. A., Bryksin, A. V., Nusinovich, Y. A., Cabello, F. C., Sutherland, M. and Ladisch, S. (2004) Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res.* 32, e19.
- Shibata, M., Katoh, H., Sonoda, M., Ohkawa, H., Shimoyama, M., Fukuzawa, H., Kaplan, A. and Ogawa, T. (2002) Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: function and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* 277, 18658 - 18664.
- Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K. and Ermler, U. (2008) The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science* 321, 572 - 575.
- Shirshikova, G. N., Khusnutdinova, A. N., Postnikova, O. A., Patrusheva, E. V., Butanaev, A. M. and Tsygankov, A. A. (2009) Expression of Ni-Fe hydrogenase structural genes derived from *Thiocapsa roseopersicina* in *Escherichia coli*. *Dokl. Biochem. Biophys.* 425, 124 - 126.
- Sobotka, R., Dühring, U., Komenda, J., Peter, E., Gardian, Z., Tichy, M., Grimm, B. and Wilde, A. (2008) Importance of the Cyanobacterial Gun4 Protein for Chlorophyll Metabolism and Assembly of Photosynthetic Complexes. *J. Biol. Chem.* 283, 25794 - 25802.
- Stadtman, E. R. (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* 40, 1250 - 1258.
- Stesmans, A. and van Gorp, G. (1989) Novel method for accurate g measurements in electron-spin resonance. *Rev. Sci. Instruments* 60, 2949 - 2952.
- Stoll, S. and Schweiger, A. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Resonance* 178, 42 - 55.
- Tamagnini, P., Costa, J. L., Almeida, L., Oliveira, M. J., Salema, R. and Lindblad, P. (2000) Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Curr. Microbiol.* 40, 356 - 361.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R. and Lindblad, P. (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 1 - 20.
- Tamagnini, P., Leitão, E. and Oxelfelt, F. (2005) Uptake hydrogenase in cyanobacteria: novel input from non-heterocystous strains. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 67 - 69.
- Tamagnini, P., Leitão, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D. J., Heidorn, T. and Lindblad, P. (2007) Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 692 - 720.
- Tard, C. and Pickett, C. J. (2009) Structural and Functional Analogous of the Active Sites of the [Fe]-, [NiFe]-, and [FeFe]-Hydrogenases. *Chem. Rev.* 109, 2245 - 2274.
- Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R. and Böck, A. (2000) Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *Eur. J. Biochem.* 267, 1995 - 1999.
- Theodoratou, E., Huber, R. and Böck, A. (2005) [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochem. Soc. Transact.* 33, 108 - 110.
- Tous, C., Vega-Palas, M. A. and Vioque, A. (2001) Conditional Expression of RNase P in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Allows Detection of Precursor RNAs. Insight in the *in vivo* maturation pathway of transfer and other stable RNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 29059 - 29066.
- Troshina, O., Serebryakova, L. T., Sheremetieva, M. E. and Lindblad, P. (2002) Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1283 - 1289.
- van der Linden, E., Burgdorf, T., Bernhard, M., Bleijlevens, B., Friedrich, B. and Albracht, S. P. (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.* 9, 616 - 626.
- van der Linden, E., Burgdorf, T., De Lacey, A. L., Buhrke, T., Scholte, M., Fernandez, V. M., Friedrich, B. and Albracht, S. P. J. (2006) An improved purification procedure for the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*: new insights into its (in)stability and spectroscopic properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 247 - 260.

- van der Oost, J. and Cox, R. P. (1987) Hydrogenase activity in nitrate-grown cells of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822. *Arch. Microb.* 151, 40 - 43.
- van Gastel, M., Fichtner, C., Neese, F. and Lubitz, W. (2005) EPR experiments to elucidate the structure of the ready and unready states of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 7 - 11.
- van Haaster, D. J., Hagedoorn, P. L., Jongejan, J. A. and Hagen, W. R. (2005) On the relationship between affinity for molecular hydrogen and the physiological directionality of hydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 12 - 14.
- van Haaster, D. J., Silva, P. J., Hagedoorn, P. L., Jongejan, J. A. and Hagen, W. R. (2008) Reinvestigation of the Steady-State Kinetics and Physiological Function of the Soluble NiFe-Hydrogenase I of *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 190, 1584 - 1587.
- Vignais, P. M., Billoud, B. and Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455 - 501.
- Vignais, P. M., Cournac, L., Hatchikian, E. C., Elsen, S., Serebryakova, L., Zorin, N. and Dimon, B. (2002) Continuous monitoring of the activation and activity of [NiFe]-hydrogenases by membrane-inlet mass spectrometry. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1441 - 1448.
- Vignais, P. M. and Billoud, B. (2007) Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chem. Rev.* 107, 4206 - 4272.
- Vincent, K. A., Parkin, A., Lenz, O., Albracht, S. P., Fontecilla-Camps, J. C., Cammack, R., Friedrich, B. and Armstrong, F. A. (2005) Electrochemical definitions of O₂ sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 18179 - 18189.
- Vincent, K. A., Parkin, A. and Armstrong, F. A. (2007) Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem. Rev.* 107, 4366 - 4413.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J. C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373, 580 - 587.
- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J. C. (1996) Structure of the NiFe hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12989 - 12996.
- Volbeda, A., Montet, Y., Vernède, X., Hatchikian, E. C. and Fontecilla-Camps, J. C. (2002) High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. *International J. Hydrogen Energy* 27, 1449 - 1461.
- Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B. W., Roseboom, W., Albracht, S. P., Garcin, E., Rousset, M. and Fontecilla-Camps, J. C. (2005) Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10, 239 - 249.
- Wang, R., Healey, F. P. and Myers, J. (1971) Amperometric measurement of hydrogen evolution in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 48, 108 - 110.
- Wang, H. L., Postier, B. L. and Burnap, R. L. (2004) Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. *J. Biol. Chem.* 279, 5739 - 5751.
- Weisshaar, H. and Böger, P. (1985) Pathways of hydrogen uptake in the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Arch. Microbiol.* 142, 349 - 353.
- Whitton, B. A. and Potts, M. (2000) *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Williams, J. G. K. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods. Enzymol.* 167, 766 - 778.
- Wittig, I. and Schägger, H. (2005) Advantages and limitations of clear native polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* 5, 4338 - 4346.
- Wittig, I., Karas, M. and Schägger, H. (2007) High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-Gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1215 - 1225.
- Wohlleben W., Arnold, W., Bissonette, L., Pelletier, A., Tanguay, A., Roy, P. H., Gamboa, G. C. Barry, G. F., Aubert, E., Davies, J. et al. (1989) On the evolution of Tn21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (*acc1*) for gentamicin acetyltransferase-3-I

- (AAC(3)-I), another member of the Tn21-based expression cassette. *Mol. Gen. Genet.* 217, 202 - 208.
- Yoon, K. S., Tsukada, N., Sakai, Y., Ishii, M., Igarashi, Y. and Nishihara, H. (2008) Isolation and characterization of a new facultatively autotrophic hydrogen-oxidizing Betaproteobacterium, *Hydrogenophaga* sp. AH-24. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 94 - 100.
- Zang, X., Liu, B., Liu, S., Arunakumara, K. K. and Zhang, X. (2007) Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Microbiol.* 45, 241 - 245.
- Zhang, L., Happe, T. and Melis, A. (2002) Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* 214, 552 - 561.
- Zhang, P., Battchikova, N., Jansen, T., Appel, J., Ogawa, T. and Aro, E. M. (2004) Expression and functional roles of the two distinct NDH-1 complexes and the carbon acquisition complex NdhD3/NdhF3/CupA/Sll1735 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell* 16, 3326 - 3340.

Danksagung

Vor allen anderen bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz für das Thema, das Interesse an meiner Arbeit und die Unterstützung bei der Verwirklichung der Kooperationsprojekte im In- und Ausland. Sehr geschätzt habe ich, dass Gespräche bei Bedarf immer möglich waren und ich viel Raum für eigenständiges Arbeiten hatte.

Meinen Dank richte ich außerdem an Herrn Dr. Jens Appel, mit dessen fachlicher Kompetenz und Diskussionsbereitschaft ich stets rechnen konnte auch ohne direkte Präsenz. Eine interessante Zeit und viele Erfahrungen verdanke ich dem Aufenthalt an seiner ehemaligen Wirkungsstätte.

In diesem Zusammenhang geht mein Dank ebenfalls an Frau Prof. Dr. Anne Jones und Chelsea Mc Intosh von der Arizona State University für die gute Zusammenarbeit in der Elektrochemie.

Ich danke Herrn Dr. Ingo Zebger und Dr. Miguel Saggi von der Technischen Universität Berlin für die Kooperation bei den spektroskopischen Untersuchungen an der Hydrogenase und besonders für ihre Flexibilität und Einsatzbereitschaft.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Juan-Carlos Fontecilla-Camps und Claudine Darnault vom Institut de Biologie Structurale in Grenoble für ihre eingebrachten Erfahrungen bei den Kristallisierungsversuchen.

Ich danke den ehemaligen und den jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die außerordentliche Hilfsbereitschaft sowie für unterhaltsame Stunden im Labor und fernab der Arbeit. Vielen Dank an jene, die diese Arbeit Korrektur lasen.

Mein besonderer Dank richtet sich an Torsten Staller für seine Liebe, Fürsorge und Reisebereitschaft.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern und meinem Bruder.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frauke Germer
Geburtsdatum: 04.01.1979
Geburtsort: Delmenhorst
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Abschlüsse

Juli 1998 Abitur am Gymnasium, Ganderkesee
Febr. 2001 PTA, Pharmazeutisch-technische Assistentin
an der Völker-Schule, Osnabrück

Hochschulausbildung

Okt. 2001 - Sept. 2006 Studiengang Biologie/Diplom, Universität Bremen
Sept. 2004 - März 2005 Auslandssemester (WS 2004/05) Université Joseph-Fourier
einschließlich 4-monatigem Praktikum im Institut de Biologie
Structurale (IBS), Grenoble, Frankreich
Jan. - Sept. 2006 Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für Marine Mikro-
biologie, Bremen. Thema: Charakterisierung eines DNA-
Abschnitts des anaeroben Myrcenabbaus und Versuche zur
Isolierung der Linalool-Dehydratase aus *Castellaniella* (ex
Alcaligenes) defragrans 65Phen
seit Jan. 2007 Doktorarbeit an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

1. Germer, F., Zebger, I., Saggu, M., Lenzian, F., Schulz, R. and Appel, J. (2009) Overexpression, isolation and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe]-hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 284, 36462 - 3647.

Weitere Veröffentlichung:

2. Barz, M., Beimgraben, C., Staller, T., Germer, F., Opitz, F., Marquardt, C., Schwarz, C., Vanselow, K., Schmitz-Streit, R., LaRoche, J., Schulz, R., Appel, J., (2009) Distribution analysis of hydrogenases in surface waters of marine and freshwater environments. *PLoS ONE* (submitted).

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt.

Kiel,

Frauke Germer