

**Spektroskopische und elektrochemische
Untersuchung der [NiFe]-Hydrogenase
aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

angefertigt am
Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie
in Mülheim an der Ruhr

von
Caroline Fichtner
aus
Ennepetal

Mülheim 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Lubitz
Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2005

ENDOR, HYSORE, EPR,
FTIR kann auch nicht mehr.

UV/VIS und DFT,
oh Gott, mir tut der Kopf schon weh.

rpm und Cys und min,
hat das alles einen Sinn?

HEPES, CHES und TAPS,
ist doch alles hier nur Spass!

OTTLE, EXAFS und CO,
da wird doch nur ein Doktor froh!

Zusammenfassung

Die [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F gehört zu einer Gruppe strukturell sehr ähnlicher [NiFe]-Hydrogenasen, die die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff katalysieren und damit bei der Energiegewinnung der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Das Interesse der Forschung konzentriert sich auf die Aufklärung des Reaktionsmechanismus, um dieses Wissen auf die biotechnologische Gewinnung von Wasserstoff als alternativen Energieträger übertragen zu können.

Das katalytisch aktive Zentrum der Hydrogenase besteht aus einem heterobimetallischen [NiFe]-Cluster, der während des Reaktionsablaufes verschiedene Redoxzustände einnimmt, die sich *in vitro* elektrochemisch einstellen lassen. Da für die *in vitro*-Studien an der [NiFe]-Hydrogenase hochreines Protein in einer hohen Konzentration benötigt wurde, war die Etablierung einer effizienten Isolierung aus der bakteriellen Zelle und Methoden zur Charakterisierung der Enzymaktivität notwendig.

Durch proteinfilmvoltammetrische Experimente konnte gezeigt werden, daß die [NiFe]-Hydrogenase ein im Vergleich zu anderen Standardhydrogenasen stark sauerstoffempfindliches Enzym ist und eine anaerobe Inaktivierung nur nach Zugabe von Na_2SO_3 möglich ist, was zur Hypothese führte, daß im inaktiven, oxidierten Zustand „Ni-A“ ein Sulfoxid im aktiven Zentrum gebunden ist.

Die verschiedenen Redoxzustände unterscheiden sich desweiteren in ihren Absorptionseigenschaften des infraroten Lichtes. Erstmalig konnten die charakteristischen Absorptionsbanden dieser Hydrogenase im Infrarot-Bereich zwischen 1900 cm^{-1} und 2200 cm^{-1} identifiziert und den einzelnen Redoxzuständen zugeordnet werden. Dies beantwortet zweifelsfrei die Frage nach der Identität der drei zweiatomigen Liganden im aktiven Zentrum, bei denen es sich um ein CO- und zwei CN^- -Moleküle handelt. Die pH-Wert-abhängigen, spektroelektrochemischen Experimente zeigten darüber hinaus, daß jeder Redoxübergang mit einer Protonierung gekoppelt ist.

Die Untersuchung der wellenlängenabhängigen Photokonversion des reduzierten, aktiven Zustandes „Ni-C“ in den lichtinduzierten Zustand „Ni-L“ mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie zeigte durch den Vergleich mit UV/VIS-spektroskopischen Messungen, daß die beteiligten Übergänge Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer-Charakter besitzen, und ermöglichte die Beschreibung des Prozesses anhand eines Modells. Die Schlußfolgerungen sind zur Annahme konsistent, daß im Zustand Ni-C die Substratbindestelle mit einem Hydrid (H^-) besetzt ist.

Die Ergebnisse der Experimente erlaubten Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Redoxzustände, so daß hieraus ein Reaktionsmechanismus postuliert werden konnte.

Inhaltsverzeichnis

1	Wasserstoff - Energieträger der Zukunft	1
2	Hydrogenasen	5
2.1	Vorkommen und Funktion der Hydrogenasen	5
2.2	Molekulare Struktur der Hydrogenasen	8
2.3	Die Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase	11
2.4	Motivation und Fragestellung	16
3	Theorie	19
3.1	Grundlagen der Infrarot-Spektroskopie	19
3.2	Grundlagen der Elektronenspinresonanz	25
3.3	Grundlagen elektrochemischer Techniken	33
4	Materialien	43
4.1	Laborgeräte	43
4.2	Geräte für die Spektroskopie	44
4.3	Material	44
4.4	Puffer	46
4.5	Medien	48
5	Gewinnung und Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase	49
5.1	Anzucht von <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F	49
5.2	Isolierung und Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase	53
5.3	Katalytische Aktivität der [NiFe]-Hydrogenase	62
5.4	Zusammenfassung	78
6	Spektroelektrochemie an der [NiFe]-Hydrogenase	79
6.1	Probenvorbereitung	80
6.2	Durchführung	81

6.3	FTIR-Spektren der einzelnen Redoxzustände	83
6.4	pH-Wert-Abhängigkeit des Ni-SI-Zustandes	92
6.5	Die zusätzlichen Ni-R-Zustände	95
6.6	Potentiometrische Titration	96
6.7	Implikationen für den Reaktionsmechanismus	104
6.8	Zusammenfassung	109
7	Proteinfilmvoltammetrie an der [NiFe]-Hydrogenase	111
7.1	Probenvorbereitung	113
7.2	Durchführung	113
7.3	Zyklovoltammetrie mit stationärer Elektrode	116
7.4	Anaerobe Inaktivierung	118
7.5	Inaktivierung in Anwesenheit von Na ₂ SO ₃	124
7.6	Aerobe Inaktivierung	127
7.7	Zusammenfassung	133
8	Wellenlängenabhängigkeit der Photokonversion Ni-C → Ni-L	135
8.1	Probenvorbereitung	136
8.2	Durchführung	137
8.3	Das Aktionsspektrum des Konversionsprozesses	139
8.4	UV/VIS-Spektroskopie an der [NiFe]-Hydrogenase	145
8.5	Implikationen für den Reaktionsmechanismus	149
8.6	Zusammenfassung	150
9	Zusammenfassung und Ausblick	153
	Abkürzungen	159
	Literaturverzeichnis	161

1 Wasserstoff - Energieträger der Zukunft

Angesichts immer knapper werdender fossiler Brennstoffe und des wachsenden globalen Bedarfs an Energieträgern gewinnt die Suche nach nachwachsenden Rohstoffen und deren umweltverträglicher Nutzung eine immer größere Bedeutung. Da die Energiegewinnung aus Sonnenlicht mittels Sonnenkollektoren und die Nutzung der Windkraft aufgrund ihres geringen Energieerntefaktors wenig effizient sind [19], konzentriert sich das Interesse auf molekularen Wasserstoff (H_2) als hocheffizienten Energiespeicher. Die Nutzung des Wasserstoffs in einer Brennstoffzelle produziert durch die Verbrennung von Wasserstoff mit Sauerstoff (O_2) Elektrizität, wobei als „Abfallprodukt“ dieser Reaktion nur Wasser (H_2O) entsteht. Nach derzeitigem Stand der Technik ist das Problem der Wasserstoffnutzung jedoch dessen Produktion. Da er nicht als natürliche Ressource in reiner Form vorkommt, muß er hergestellt werden. Die technischen Produktionsverfahren besitzen jedoch den Nachteil eines hohen Energiebedarfs und der Entstehung umweltschädlicher Abfallprodukte, z.B. des Treibhausgases Kohlendioxid (CO_2).

Im Gegensatz dazu wäre eine biotechnologische Wasserstoffproduktion umweltfreundlich und effizient, da aus den beiden natürlichen Ressourcen Sonnenlicht und Wasser Wasserstoff ohne die Entstehung von schädlichen Nebenprodukten gebildet wird. Das größte Potential auf diesem Gebiet besitzt die photobiologische Produktion von Wasserstoff, der die Kopplung photosynthetischer Prozesse mit der enzymatischen Katalyse der Wasserstoffbildung zugrunde liegt (vgl. Abbildung 1.1). Aus Wasser und der Energie des Sonnenlichtes wird mit Hilfe zweier Enzymkomplexe molekularer Wasserstoff hergestellt. Der erste Enzymkomplex, bestehend aus photosynthetischen und Elektronentransportproteinen, nutzt die Energie des Lichtes, um Wasser zu spalten. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden auf einen Elektronenakzeptor übertragen. Der zweite Enzymkomplex katalysiert die Synthese von Wasserstoff. Er besteht aus einer

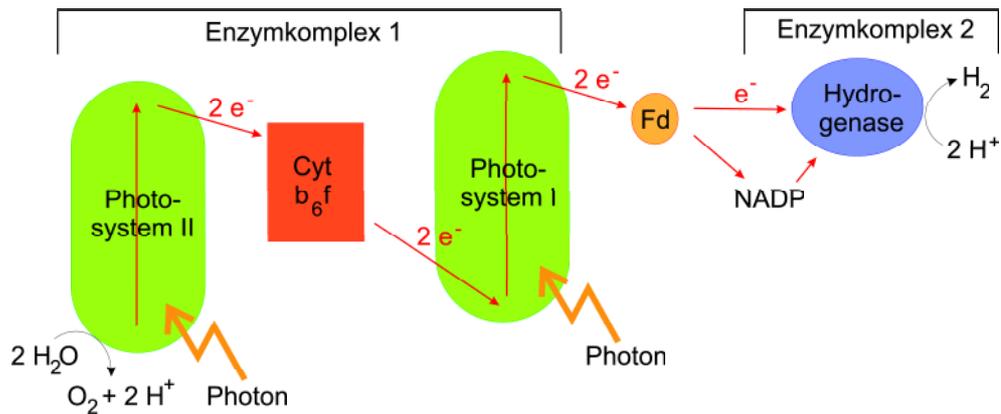


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der photobiologischen Wasserstoffproduktion durch Kopplung der Photosynthese (Photosysteme I und II) und der Hydrogenase-Aktivität.

sogenannten Hydrogenase, die Protonen zu molekularem Wasserstoff reduzieren kann. Hierzu benötigt sie Elektronen, die sie im Falle der photobiologischen Wasserstoffproduktion vom Elektronenakzeptor der Photosysteme erhalten würde.

Dieses gekoppelte System könnte in die Zelle einer Alge oder eines Cyanobakteriums eingefügt werden, was diesen Organismus zur Wasserstoff-Synthese befähigen würde. Eine Anzucht solcher Zellen im großen Maßstab würde demnach entsprechend viel Wasserstoff liefern.

Doch die Evolution hat die Kombination dieser beiden Prozesse in keinem Organismus hervorgebracht. Im Gegenteil sind viele Hydrogenasen empfindlich gegenüber Sauerstoff, der jedoch Nebenprodukt der Wasserspaltung durch Photosystem II ist. Eine biotechnologische Wasserstoffproduktion erfordert somit die Anpassung beider Systeme aneinander, um zu lohnenden Ausbeuten für eine großtechnische Nutzung zu gelangen. Die nötigen Modifikationen setzen jedoch das Verständnis der Funktionsweisen und der Regulation beider Enzymkomplexe voraus. Dies betont die Notwendigkeit der Grundlagenforschung auf den Gebieten der Photosynthese- und der Hydrogenaseforschung, auf denen intensiv gearbeitet wird, um die Reaktionsmechanismen aufzuklären.

Alternativ zum photobiologischen Ansatz wird ein biotechnischer Ansatz zur Wasserstoffproduktion verfolgt. Hierbei würden die minimalen aktiven Einheiten beider Enzymkomplexe auf Elektrodenoberflächen zweier Halbzellen fixiert, die räumlich voneinander getrennt sind, so daß Gase nicht in das jeweils

andere Kompartiment diffundieren können. Dies wäre eine Möglichkeit, dem oben beschriebenen Problem der Sauerstoffempfindlichkeit der Hydrogenasen zu begegnen. Auch dieser Ansatz erfordert vor der Realisierung ein detailliertes Verständnis der Funktion der beteiligten Enzyme.

Die vorliegende Arbeit ist in den Bereich der Grundlagenforschung an Hydrogenasen einzuordnen und untersucht den katalytischen Mechanismus einer speziellen Hydrogenase, der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. Dieses Enzym gehört zu einer Gruppe strukturell sehr ähnlicher Hydrogenasen, den Standardhydrogenasen, und kann als Modellprotein angesehen werden, an dem der Reaktionsablauf studiert wird. Die Erkenntnisse dieser Forschung tragen zu einer Entwicklung der photobiologischen oder biotechnischen Wasserstoffproduktion bei. Den komplexen Prozessen, die bei der Katalyse in der Hydrogenase ablaufen, wird mit der Kombination verschiedener Methoden, hauptsächlich elektrochemischer und spektroskopischer Techniken, nachgegangen.

2 Hydrogenasen

Die Hydrogenasen sind eine Klasse von Enzymen, die in der Lage sind, heterolytisch molekularen Wasserstoff (H_2) zu spalten und gleichfalls im umgekehrten Prozess Protonen zu reduzieren, so daß Wasserstoff generiert wird:



Sie sind nach der Empfehlung der *Enzyme Commission* [92] in der Enzymklasse 1.12 (Hydrogenasen) zusammengefasst, innerhalb derer sie weiterhin aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronenakzeptoren, z.B. Cytochrom c_3 (Enzymklasse EC 1.12.2.1), Coenzym F420 (EC 1.12.98.1) oder Ferredoxin (EC 1.12.7.2), differenziert werden.

2.1 Vorkommen und Funktion der Hydrogenasen

Hydrogenasen kommen in einer Vielzahl von Mikroorganismen vor, die verschiedenen phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. Klassifiziert man diese Bakterien nach ihrem Verhältnis zum Sauerstoff, lassen sie sich in folgende Gruppen einteilen: anaerobe Bakterien (z.B. die Gattungen *Desulfovibrio* oder *Clostridium*), fakultativ anaerobe Bakterien (z.B. die Gattung *Escherichia*), anaerobe, anoxygen phototrophe Bakterien (z.B. die Gattungen *Rhodobacter*, *Allochromatium* oder *Thiocapsa*) sowie aerobe Bakterien (z.B. die Gattungen *Ralstonia*, *Bacillus*, *Azotobacter* oder *Rhizobium*). Darüber hinaus sind Hydrogenasen auch bei Cyanobakterien (z.B. die Gattung *Anabaena*), die eine aerobe, oxygen phototrophe Lebensweise besitzen, und Algen (z.B. die Gattungen *Chlamydomonas*, *Chlorella* oder *Scenedesmus*) gefunden worden.

Für alle Organismen gilt, daß der Verbrauch von Wasserstoff durch die Hydrogenase die Zelle mit Reduktionsäquivalenten (Protonen und Elektronen) versorgt [1]. Diese sind in der Lage, eine Reihe von Substraten, wie z.B. CO_2 , zu reduzieren, und damit genügend Energie zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), des universellen Energieäquivalents, zu generieren. Eine ATP-Synthese

2 Hydrogenasen

ist zudem dann direkt möglich, wenn membranassoziierte Hydrogenasen, die auf der Membranaußenseite lokalisiert sind, Wasserstoff spalten und sich aufgrund des Abtransports der Elektronen über Elektronenakzeptorproteine wie z.B. Cytochrome über die bakterielle Membran ein elektrochemischer Gradient ausbildet, der seinerseits die ATP-Synthase antreibt.

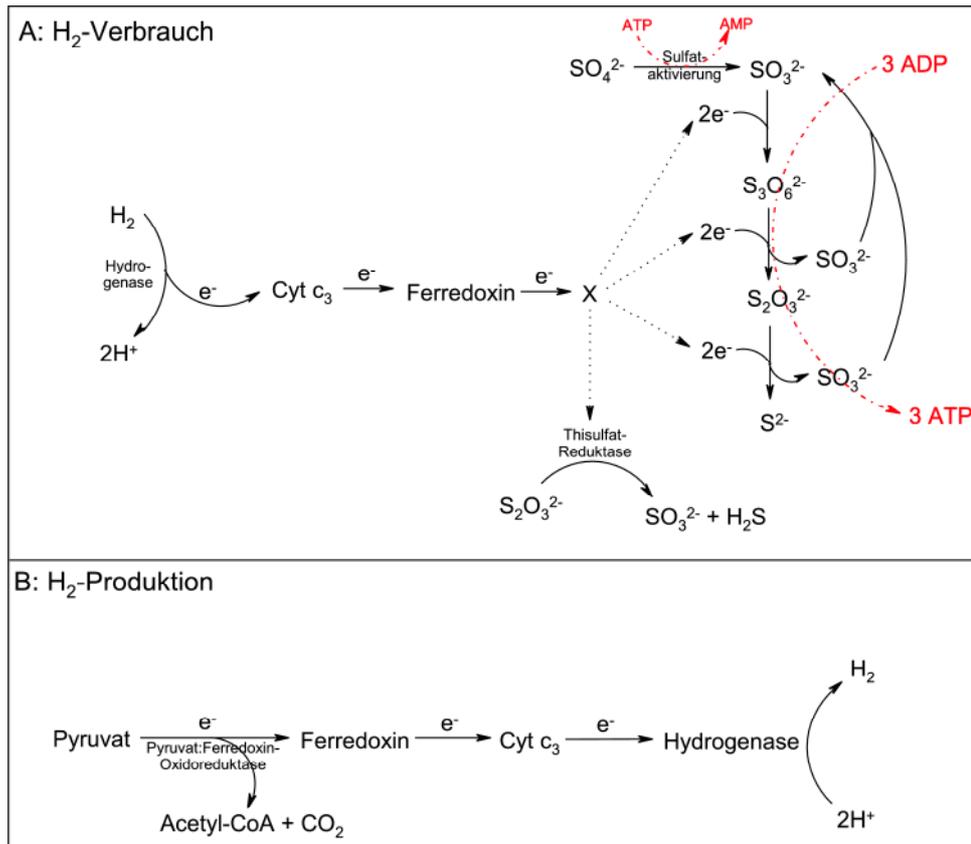


Abbildung 2.1: Wasserstoff-Metabolismus in *Desulfovibrio* (modifiziert nach [1] und [103]). X ist ein bisher unbekannter Elektronentransporter.

Die **anaeroben Mikroorganismen**, die organische Substrate (z.B. Pyruvat oder Lactat) fermentieren, um ihre Versorgung mit ATP sicherzustellen, entsorgen dabei entstehende überschüssige Elektronen, indem sie Protonen reduzieren, so daß Wasserstoff entsteht. Die Hauptquelle dieser Reduktionsäquivalente, die letztlich zur Wasserstoffproduktion führen, ist die Oxidation von Pyruvat. Es wird in Acetyl-CoenzymA und Formiat überführt, und letzteres wird durch die Reaktion der Formiat-Wasserstoff-Lyase, an der auch die Hydrogenase beteiligt ist, zu Wasserstoff und CO₂ zersetzt. Das Pyruvat kann außerdem durch die Re-

aktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoenzymA und CO_2 oxidiert werden. Anschließend überträgt das reduzierte Ferredoxin seine Elektronen auf eine Hydrogenase [2] (Abbildung 2.1B). Darüber hinaus wird eine Regeneration der bei der Fermentation organischer Säuren gebildeten Reduktionsäquivalente erreicht, indem durch eine NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase NADH oxidiert und Ferredoxin reduziert wird. Die Oxidation des Ferredoxins erfolgt dann über die Reduktion von Protonen, katalysiert durch die Hydrogenase [1].

In diese große Gruppe gehören auch die **anaeroben Sulfatreduzierer** der Gattung *Desulfovibrio*, die deshalb gesondert erwähnt werden, da die Hydrogenase, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, aus dem Stamm *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F isoliert wird. Sie nutzen die Elektronen, die bei der Oxidation des Wasserstoffs durch die Hydrogenase entstehen, um Sulfat zu Sulfid oder Schwefelwasserstoff zu reduzieren [1]. Die Elektronen des Wasserstoffs gelangen über Cytochrom c_3 und Ferredoxin zum Elektronenakzeptor Sulfat (Abbildung 2.1A).

Im Falle der **aeroben, Stickstoff-fixierenden Bakterien und Cyanobakterien** werden Reduktionsäquivalente, die bei der ATP-abhängigen Reduktion von Stickstoff zu NH_3 verfügbar werden, bei einer Seitenreaktion mit Protonen zu Wasserstoff umgesetzt. Pro Molekül reduziertem Stickstoff entsteht so ein Molekül Wasserstoff. Das Vorhandensein der Hydrogenase verhindert hier einen hohen Energieverlust, da durch die Spaltung dieses Wasserstoffs letztendlich ATP synthetisiert werden kann [2].

Aerobe, Wasserstoff-oxidierende Bakterien sind in der Lage, chemoautotroph auf Wasserstoff als Elektronendonator, Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor und CO_2 als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dabei übertragen sie letztlich die Elektronen, die aufgrund der Wasserstoff-Oxidation durch eine membrangebundene Hydrogenase anfallen, über die Atmungskettenkomplexe auf Sauerstoff. Bei dieser exergonen Reaktion entsteht Wasser und Energie in Form von ATP. Da in diesen Bakterien damit letztlich die Knallgasreaktion ($2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$) abläuft, werden sie auch als „Knallgasbakterien“ bezeichnet. Eine weitere cytoplasmatische Hydrogenase sorgt in diesen Bakterien darüber hinaus für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten zur CO_2 -Fixierung [1].

Photosynthetischen Bakterien ist gemein, daß sie Wasserstoff als Reduktionsmittel bei der CO_2 -Fixierung benutzen. Manche dieser Spezies sind dabei

in der Lage, nur mit CO_2 als Kohlenstoffquelle und Wasserstoff als Energiequelle zu wachsen. Die Nutzung des Wasserstoffs ist in diesen Fällen durch die Hydrogenase gewährleistet. Im Dunkeln sind diese Organismen in der Lage, heterotroph zu wachsen und ihre Energie durch die Fermentation organischer Verbindungen zu gewinnen. Hierbei produzieren sie Wasserstoff über Hydrogenasen, um Reduktionsäquivalente zu regenerieren [1].

Viele der erwähnten Mikroorganismen besitzen nicht nur eine, sondern mehrere Hydrogenasen unterschiedlichen Typs, die verschiedene Aufgaben im Wasserstoff-Metabolismus wahrnehmen und zu bestimmten Zeiten in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle exprimiert werden, so daß der Organismus auf veränderte Umweltbedingungen effizient reagieren kann.

2.2 Molekulare Struktur der Hydrogenasen

Die bislang entdeckten Hydrogenasen werden anhand der Metallzusammensetzung ihres aktiven Zentrums unterschieden und lassen sich danach in drei Klassen einteilen. In den zuerst beschriebenen Hydrogenasen wurde Eisen als einziges Metall identifiziert, das in [FeS]-Clustern organisiert ist. Das aktive Zentrum dieser sogenannten [Fe]-Hydrogenasen wird als *H-Cluster* bezeichnet und besteht aus einem [4Fe4S]-Cluster, der über ein Cystein-Thiolat mit einem ungewöhnlichen [2Fe]-Cluster verbunden ist. Dieser [2Fe]-Cluster besitzt seinerseits fünf zweiatomige Liganden (CO und CN^-) und einen verbrückenden 1,3-Propandithiol-Rest [90].

Später zeigten neue Erkenntnisse, daß manche Hydrogenasen ein für die Funktion essentielles Nickelatom beinhalten und daß die Gruppe der sogenannten [NiFe]-Hydrogenasen die zahlenmäßig größte ist. Eine Untergruppe bilden die [NiFeSe]-Hydrogenasen, bei denen ein das aktive Zentrum koordinierendes Cystein durch ein Selenocystein ausgetauscht ist [46].

Eine weitere Gruppe besteht aus den Hydrogenasen, deren aktives Zentrum kein Metallatom besitzt. Prominentester Vertreter der sogenannten [FeS]-Clusterfreien Hydrogenasen ist die Hmd (*H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase*) aus dem methanogenen Archaeum *Methanothermobacter marburgensis*. Diese Hydrogenase katalysiert die Übertragung eines Hydrids (H^-) von einem H_2 auf das Substrat Methenyl-Tetrahydromethanopterin, so daß Methylen-Tetrahydromethanopterin entsteht. Die Struktur des aktiven Zentrums ist noch unbekannt; gezeigt wurde bisher, daß ein Kofaktor mit einem ge-

ringen Molekulargewicht existiert, an den ein Eisenatom und zwei CO-Moleküle assoziiert sind [80].

Die [NiFe]-Hydrogenasen, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, sind heterodimere Proteine, die aus den zwei Untereinheiten α und β bestehen (Abbildung 2.2). Die [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio (D.) vulgaris* gehört zur Enzymklasse EC 1.12.2.1 (Wasserstoff:Ferricytochrom-c₃-Oxidoreduktase) und hat ein Gesamtgewicht von 87,383 kDa; wobei die große Untereinheit α , bestehend aus 534 Aminosäuren, 59,090 kDa und die kleine Untereinheit β , bestehend aus 267 Aminosäuren, 28,748 kDa wiegt. Diese Angaben sind Ergebnisse der Analyse der Kristallstruktur der reduzierten [NiFe]-Hydrogenase bei einer Auflösung von 1,4 Å [55]. Zusammen mit den [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. gigas*, *D. fructosovorans* und *Allochromatium (A.) vinosum* gehört sie zu den sogenannten *Standardhydrogenasen*, da sich ihre strukturellen und spektroskopischen Eigenschaften sehr ähneln und an diesen Vertretern die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden. Auch für die anderen beiden [NiFe]-Hydrogenasen der Gattung *Desulfovibrio* sind die Gen- und Aminosäuresequenzen und Kristallstrukturen bekannt. Diese drei Standardhydrogenasen besitzen eine relativ hohe genetische Übereinstimmung: So beträgt die Homologie der Hydrogenase-Sequenzen aus *D. vulgaris* Miyazaki F und *D. gigas* 69% und diejenige aus *D. vulgaris* Miyazaki F und *D. fructosovorans* 66%.

Die große Untereinheit enthält das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase, das an der Grenzfläche zwischen großer und kleiner Untereinheit lokalisiert ist. Der exakte Aufbau dieses aktiven Zentrums war lange Zeit umstritten. Zunächst wurde aufgrund bestimmter genetischer Motive die Existenz von mehreren [FeS]-Clustern postuliert, die als aktive Zentren an der Wasserstoffumsetzung beteiligt sein sollten [89]. Weitere Untersuchungsergebnisse zeigten allerdings, daß das Element Nickel ebenfalls Bestandteil der Hydrogenase zu sein scheint [49]. Durch Elektronenspin-Resonanz (EPR)-spektroskopische Messungen (deren Grundlagen in Kapitel 3.2 erläutert werden) an ⁶¹Ni-isotopenmarkierten Hydrogenase-Proben konnten diese Hinweise bestätigt werden, da die Proben ein charakteristisches Nickel-Signal zeigten [4, 115]. Erst die Röntgenstrukturanalyse ermöglichte einen detaillierten Einblick in den Aufbau dieses ungewöhnlichen Metallzentrums. Durch die Analyse von Kristallen der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* wurde gezeigt, daß das Nickelatom zusammen mit einem Eisenatom einen heterobimetallischen Cluster bildet, der seinerseits von vier Cysteinresten koordiniert wird [122] (vgl. Abbildung 2.2). Erkennbar war

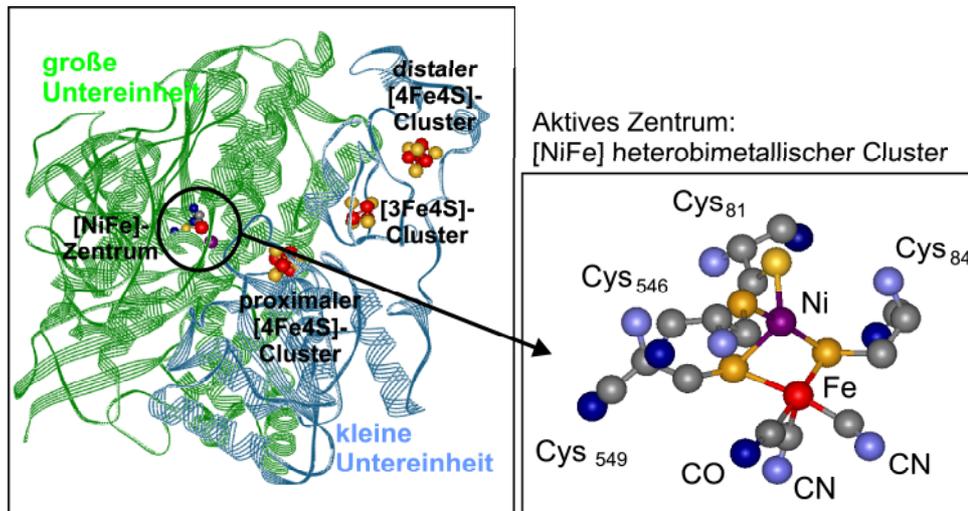


Abbildung 2.2: Röntgenstruktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F [58] (Eintrag in der Proteindatenbank (PDB) 1H2R). Links ist eine Übersicht über das gesamte Protein dargestellt, bestehend aus der kleinen (grün) und der großen Untereinheit (blau). Der rechte Teil der Abbildung gibt die Struktur des aktiven Zentrums wieder. Der Brückenligand, der im Falle des oxidierten Enzyms vorhanden ist, wurde nicht dargestellt. Obwohl Higuchi *et al.* [55,58] annahmen, daß es sich bei den zweiatomigen Fe-Liganden um SO, CO oder CN⁻ handelt, werden hier die Ergebnisse der [NiFe]-Hydrogenasen aus *A. vinosum* und *D. gigas* übernommen. Die Begründung hierzu liefert Kapitel 6.

in dieser Struktur mit einer Auflösung von 2,85 Å auch, daß am Eisenatom drei zweiatomige Liganden gebunden waren, deren Identität allerdings nicht bestimmt werden konnte. 1995 entdeckten Bagley *et al.* [11], daß die Hydrogenase aus *A. vinosum* im Bereich des infraroten Lichts zwischen 2100 cm⁻¹ und 1900 cm⁻¹, einem Bereich, in dem viele Proteine normalerweise keine Absorptionen mehr aufweisen, Absorptionsbanden besaß, die den drei Eisenliganden zugeordnet werden konnten. 1997 gelang es dann Happe *et al.* [53] mit Hilfe einer chemischen Analyse und der Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie nachzuweisen, daß es sich bei diesen drei Liganden um ein CO- und zwei CN⁻-Moleküle handelte [99].

Die Analyse der Röntgenstruktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F im oxidierten (PDB-Eintrag 1H2A) [58] und reduzierten Zustand (PDB-Eintrag 1H2R) [55] ergab, daß auch diese Hydrogenase ein heterobimetallisches [NiFe]-Zentrum besitzt. Im Gegensatz zu den Befunden, die für die [NiFe]-Hy-

drogenasen aus *D. gigas* und *A. vinosum* gemacht wurden, wurde hier postuliert, daß die drei zweiatomigen Liganden ein SO-Molekül und zwei CO- und/oder CN⁻-Moleküle sind [55, 58]. Das aktive Zentrum wird in diesem Fall durch die vier Cysteinreste Cys81, Cys84, Cys546 und Cys549 koordiniert. Cys546 und Cys81 binden dabei terminal an das Nickel, während Cys84 und Cys549 eine verbrückende Funktion zwischen Nickel und Eisen einnehmen (Abbildung 2.2). Die noch freien Koordinierungsstellen des Nickels und des Eisens werden durch einen Brückenliganden besetzt, der je nach Redoxzustand des Enzyms unterschiedlicher Natur ist. Ein noch nicht gelöstes Problem der Hydrogenase-Forschung ist die Frage nach der Natur dieses Liganden in den verschiedenen Redoxzuständen des Enzyms. Bei den Hydrogenasen aus *D. gigas* und *A. vinosum* deuten einige Ergebnisse darauf hin, daß im oxidierten Zustand Sauerstoff-Spezies als Brückenliganden vorkommen [17, 28, 47, 118]. Für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F hingegen wurde eine Schwefel-Spezies postuliert [56]. Im reduzierten Zustand ist der Brückenligand ein Derivat des Substrates Wasserstoff [43] oder das Substrat selbst, wobei vermutet wird, daß dieser nur an das Nickel bindet.

Die kleine Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenasen enthält drei [FeS]-Cluster, die eine Diagonale durch das Protein vom aktiven Zentrum in der Mitte des Proteins zu seiner Außenseite bilden. Der dem aktiven Zentrum am nächsten liegende Cluster, der proximale Cluster, ist ein [4Fe4S]-Cluster, genauso wie der distale Cluster, der an der Proteinoberfläche lokalisiert ist. Dazwischen befindet sich ein [3Fe4S]-Cluster (Abbildung 2.2). Diesen drei [FeS]-Clustern wird die Funktion der Elektronenweiterleitung vom aktiven Zentrum zum Elektronenakzeptor, der an der Proteinaußenseite assoziiert ist, zugeschrieben.

2.3 Die Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase

Als Oxidoreduktase ist es die Aufgabe der Hydrogenase, ein Substrat, in diesem Fall Wasserstoff, zu oxidieren, die Elektronen weiterzuleiten und damit einen Elektronenakzeptor zu reduzieren. Der Elektronentransport findet im Falle der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F über die [FeS]-Cluster statt. Der terminale Elektronenakzeptor ist hier das Sulfat, welches zu Sulfid reduziert wird (s. Abbildung 2.1). Die Oxidation des Wasserstoffs, bzw. die Reduktion von Protonen erfordert eine Reihe von Redoxreaktionen, während deren Ablauf die Hydrogenase unterschiedliche Redoxzustände annimmt. Die einzelnen Re-

doxzustände, die in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt sind, besitzen daher jeweils charakteristische Eigenschaften. Während die katalytische Reaktion am

Ni-A/B	Ni ^{III}	Fe ^{II}	[4Fe4S] ²⁺	[3Fe4S] ¹⁺	[4Fe4S] ²⁺
Ni-SU/SI	Ni ^{II}	Fe ^{II}	[4Fe4S] ²⁺	[3Fe4S] ⁰	[4Fe4S] ²⁺
Ni-C	Ni ^{III}	Fe ^{II}	[4Fe4S] ¹⁺	[3Fe4S] ⁰	[4Fe4S] ¹⁺
Ni-R	Ni ^{II}	Fe ^{II}	[4Fe4S] ¹⁺	[3Fe4S] ⁰	[4Fe4S] ¹⁺

Abbildung 2.3: Schematische Übersicht über die verschiedenen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase. Die Bezeichnung der Zustände ist ganz rechts in blau angegeben. Rot markierte Cluster bedeuten, daß diese paramagnetisch sind und deshalb ein EPR-Signal besitzen. Die formalen Oxidationsstufen des Nickels und des Eisens sind in römischen Zahlen angegeben.

[NiFe]-Zentrum abläuft, dienen die [FeS]-Cluster der Weiterleitung der Elektronen und der Übertragung auf den Elektronenakzeptor Cytochrom c_3 . Das Redoxpotential des [NiFe]-Zentrums liegt bei ca. -300 ± 100 mV (abhängig vom Redoxzustand), während die [4Fe4S]-Cluster ein Redoxpotential von -320 ± 10 mV besitzen [116]. Der [3Fe4S]-Cluster hingegen weist ein deutlich positiveres Redoxpotential von -70 ± 10 mV auf [116]. Dennoch beeinflußt dies die Elektronentransferrate nicht, da die am Elektronentransfer beteiligten Zentren nicht weiter als 14 Å auseinanderliegen und die Wasserstoffumsetzung der langsamere und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist [95].

In einer aeroben Umgebung liegt die Hydrogenase in ihren oxidierten Zuständen Ni-A und Ni-B vor. Das Nickel ist in diesem Fall paramagnetisch und hat die formale Oxidationsstufe +III. Die Hydrogenase besitzt in diesem Zustand ein rhombisches EPR-Spektrum, das durch die sogenannten g -Werte (s. Kapitel Theorie) $g_x = 2,32$, $g_y = 2,23$ und $g_z = 2,01$ charakterisiert ist (s. Abbildung 2.4). Darüber hinaus zeigt das EPR-Spektrum zusätzlich ein isotropes Signal bei $g = 2,01$. Dieses stammt von dem oxidierten [3Fe4S]-Cluster, welcher ebenfalls paramagnetisch ist. Trotz der Tatsache, daß in Ni-A und Ni-B die Oxidationsstufen des Nickels und der [FeS]-Cluster identisch sind, ist Ni-B durch andere g -Werte charakterisiert: $g_x = 2,33$, $g_y = 2,16$ und $g_z = 2,01$ (s. Abbildung 2.4). Noch offen ist die Frage nach dem Unterschied dieser beiden

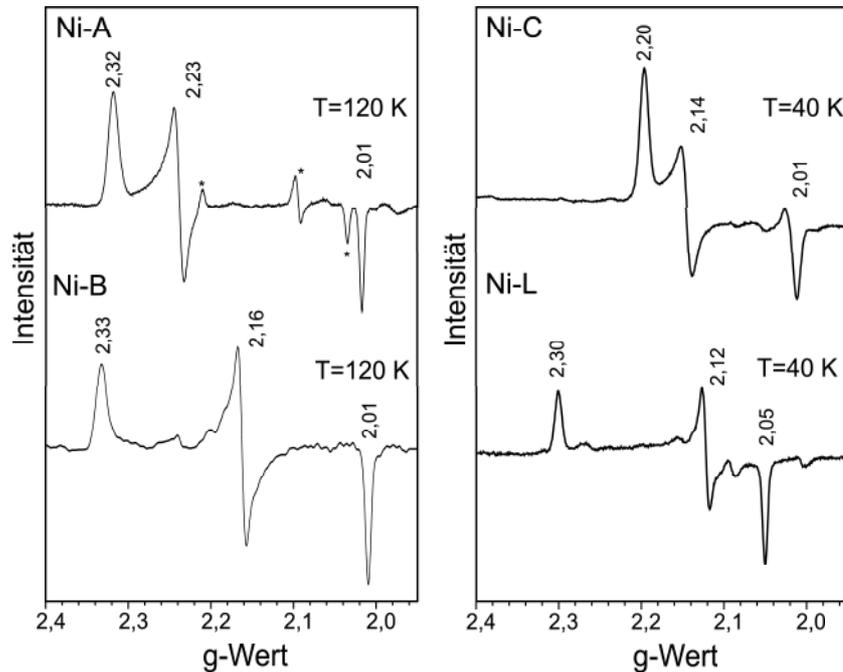


Abbildung 2.4: Übersicht über die cw-EPR-Spektren der paramagnetischen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase. Die Spektren der oxidierten Zustände Ni-A und Ni-B wurden bei 120 K aufgenommen, bei der die Relaxationsrate des paramagnetischen, oxidierten [3Fe4S]-Cluster so schnell ist, daß das Signal bei der Messung nicht detektiert wird. Die mit einem * markierten Signale im Ni-A-Spektrum stammen von einem Präparationsartefakt unbekannter Natur. Im Falle der Spektren von Ni-C und Ni-L handelt es sich um die sogenannten „unsplit“-Signale, da der paramagnetische, proximale [4Fe4S]-Cluster bei einer Meßtemperatur von 40 K eine schnelle Relaxationsrate besitzt und sich das Signal der magnetischen Interaktion mit dem NiFe-Zentrum herausmittelt.

oxidierten Zustände. Für die [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. gigas* und *A. vinosum* wurde gezeigt, daß die Aktivierungszeiten des Enzyms bis zur Ausprägung voller Aktivität in einer wasserstoffhaltigen Umgebung abhängig davon ist, ob sich die Hydrogenase im Zustand Ni-A oder Ni-B befindet. Im Zustand Ni-A bedarf es einiger Stunden der Aktivierung, während im Zustand Ni-B nur wenige Sekunden benötigt werden, bis das Enzym beginnt, den vorhandenen Wasserstoff zu verbrauchen [23, 68, 77]. Die molekularen Ursachen dieses Aktivierungsverhaltens sind derzeit noch nicht geklärt. Angenommen wird, daß ein Zusammenhang mit dem Brückenliganden besteht. Den oxidierten Zuständen ist gemein, daß der Brückenligand in beiden Fällen eine Sauerstoffspezies ist [28, 119]. Uneinigkeit besteht darüber hinaus jedoch über die Natur dieses Brückenliganden. So

wurde für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* mittels spezieller Anwendungen der EPR-Spektroskopie (die Doppelresonanzmethoden ^1H und ^2H ENDOR [39] und ^{17}O ENDOR [28], s. dazu auch Kapitel 3.2.4) gezeigt, daß im Zustand Ni-A ein Austausch mit dem Lösungsmittel nicht möglich ist, d.h. der Ligand für Protonen nicht zugänglich ist. Dahingegen favorisierten Davidson *et al.* [29] aufgrund von Ergebnissen der Röntgenabsorptionsspektroskopie-Methode EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*) und Stadler *et al.* [108] aufgrund von Dichtefunktional-Theorie (DFT)-Rechnungen die Annahme, daß es sich um einen protonierten Liganden handelt. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen an der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Miyazaki *et al.* [120] bestätigt, da mit Hilfe einer Impulstechnik der EPR-Spektroskopie, HYSCORE (*hyperfine sublevel correlation*, s. Kapitel 3.2.4), für Ni-A ein austauschbares Proton gezeigt wurde, welches dem Brückenliganden zugeordnet werden kann [120]. Demnach könnte der Brückenligand für Ni-A entweder ein OH^- oder eine zweiatomige Sauerstoffspezies wie z.B. OOH^- sein. Elektrochemische Messungen der Aktivierung und Inaktivierung von Ni-A [70] postulieren als mögliche Alternative dazu ein Peroxo-Ion (OO^-). Lamle *et al.* ziehen darüber hinaus die Möglichkeit in Betracht, daß zusätzlich zu einem Hydroxid als Brückenligand eine oxidierende Spezies (wie z.B. ein Sauerstoffatom) an einem der Cysteine gebunden ist (z.B. als Sulfoxid $\text{S}=\text{O}$ oder als oxidierte Sulfhydryl-Gruppe $-\text{S}-\text{OH}$) [70]. Dahingegen wurde aufgrund von Röntgenstrukturanalysen dieser Hydrogenase im Zustand Ni-A ein SO als Brückenligand sowie ein weiteres Atom in der Nähe des Cysteins Cys546, bei dem es sich vermutlich um ein Sauerstoffatom handelt, postuliert [93].

Im Falle des Zustandes Ni-B herrscht über die Natur des Brückenliganden weitgehend Einigkeit. Da hier eine Zugänglichkeit für Protonen gefunden wurde [17, 47], wird angenommen, daß es sich um ein OH^- handelt. Auch die HYSCORE-Messungen [120] und DFT-Rechnungen [108, 109, 120] bestätigen die hohe Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit eines Hydroxid-Ions für Ni-B.

Sowohl im Zustand Ni-A als auch im Zustand Ni-B befindet sich das ungepaarte Elektron des Nickels im $3d_{z^2}$ -Orbital (vgl. Kapitel 3.2). Das [NiFe]-Zentrum liegt in einer räumlichen Struktur vor, die der einer quadratischen Pyramide entspricht. Hierbei wird die Grundfläche der Pyramide von den drei Schwefelatomen der Cysteine Cys81, Cys84 und Cys546 sowie dem Brückenliganden gebildet. Das Schwefelatom des Cysteins Cys549 bildet die Spitze der Pyramide, das Nickel befindet sich im Zentrum der Grundfläche und das $3d_{z^2}$ -Orbital

steht auf der Grundfläche. In beiden oxidierten Zuständen wird aufgrund dieser Symmetrie des Ligandenfeldes angenommen, daß das Nickel die formale Oxidationsstufe +III (Ni^{III} low-spin) besitzt. Hier gilt, daß die g -Werte $g_x, g_y > 2,0$ und $g_z \approx g_e = 2,0$ sind.

In der Abwesenheit von Sauerstoff und unter reduzierenden Bedingungen stellt sich ausgehend von Ni-A, bzw. Ni-B ein Zustand ein, dem ein weiteres Elektron hinzugefügt wird. Der Zustand ist im Falle einer „low-spin“-Konfiguration diamagnetisch, da er kein ungepaartes Elektron mehr besitzt, und zeigt deshalb kein EPR-Signal. Er wird mit Ni-SU, bzw. Ni-SI bezeichnet, wobei SU für *silent unready* und SI für *silent* steht. Das Nickel besitzt nun die formale Oxidationsstufe +II. Das Eisen weist in allen Redoxzuständen ebenfalls die formale Oxidationsstufe +II (Fe^{II} low-spin) aufgrund der starken Liganden CO und CN⁻ auf [63]. Der [3Fe4S]-Cluster wird in diesem Schritt reduziert und ist dann ebenfalls diamagnetisch.

Weitere Reduktion der Hydrogenase führt zu einer Re-Etablierung eines EPR-Spektrums, das nun durch die g -Werte $g_x = 2,20$, $g_y = 2,14$ und $g_z = 2,01$ gekennzeichnet ist (Abbildung 2.4). Dieser Zustand wird Ni-C genannt und ist durch eine hohe katalytische Aktivität gekennzeichnet [114]. Neben dem [3Fe4S]-Cluster sind nun auch die beiden [4Fe4S]-Cluster reduziert (Abbildung 2.3). Bei tiefen Temperaturen wirkt sich dies auf das EPR-Spektrum des Zustandes Ni-C aus, da dann das Signal der [4Fe4S]-Cluster und des Nickels Spin-gekoppelt sind. Bei höheren Temperaturen ($T \geq 50$ K) mittelt sich diese Interaktion aufgrund der kürzeren Relaxationszeit der [4Fe4S]-Cluster heraus [50]. Für den Zustand Ni-C konnte zunächst durch DFT-Rechnungen [109,110], später auch durch EPR- und HYSORE-Messungen [42,43] gezeigt werden, daß der Brückenligand ein Hydrid (H⁻) ist, welches bei katalytischer Spaltung des Wasserstoffs im aktiven Zentrum bindet. Auch hier befindet sich das freie Elektron des Nickel im $3d_{z^2}$ -Orbital, so daß der Komplex eine quadratisch-pyramidale Struktur bildet.

Ausgehend von diesem Zustand läßt sich bei Temperaturen von $T \geq 120$ K durch Belichtung ein artifizierlicher Zustand herstellen, der Ni-L genannt wird. Er ist durch ein EPR-Spektrum mit den g -Werten $g_x = 2,30$, $g_y = 2,12$ und $g_z = 2,05$ gekennzeichnet (Abbildung 2.4). Auffällig ist die deutliche Abweichung der g_z -Komponente von g_e , so daß für diesen Zustand davon ausgegangen wird, daß das Nickel die formale Oxidationsstufe +I (Ni^I low-spin) besitzt und sich das ungepaarte Elektron im $3d_{x^2-y^2}$ -Orbital befindet. Bei Temperaturen oberhalb

von 120 K ist dieser Zustand nicht mehr stabil und geht in den Zustand Ni-C zurück. Der Photokonversionsprozeß von Ni-C nach Ni-L wird im Kapitel 8 dieser Arbeit ausführlich behandelt.

Bei weiterer Reduktion des Zustandes Ni-C verschwindet das EPR-Signal des Nickels erneut. Dies bedeutet bei Annahme einer Reduktion des Nickels, daß diesem Zustand, der Ni-R genannt wird, wieder die formale Oxidationsstufe +II zugeordnet werden muß. Die [FeS]-Cluster erfahren hier keine weitere Reduktion mehr; wie schon bei Ni-C befinden sie sich alle im reduzierten Zustand [3] (Abbildung 2.3).

Neben der EPR-spektroskopischen Charakteristika, die die paramagnetischen Zustände Ni-A, Ni-B, Ni-C und Ni-L kennzeichnen, besitzen sämtliche Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase, also auch die diamagnetischen Zustände Ni-SU, Ni-SI und Ni-R, FTIR-spektroskopische Merkmale, die in Kapitel 6 ausführlich behandelt werden.

2.4 Motivation und Fragestellung

Den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten an der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F liegen zwei grundsätzliche Fragestellungen zugrunde: Zum einen entstanden die Untersuchungen aus der Motivation heraus, den Mechanismus der Wasserstoffspaltung durch [NiFe]-Hydrogenasen zu verstehen. Zum anderen beruht das Interesse darauf, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Vertreter der strukturell sehr ähnlichen [NiFe]-Hydrogenasen verschiedener Spezies genauer zu analysieren.

Drei der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen sind inzwischen FTIR-spektroskopisch detailliert untersucht worden, so daß die FTIR-spektroskopische Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F (Kapitel 6) dieses Bild erweitert. Darüber hinaus eröffnet sich die Möglichkeit, die in unbekanntem Hydrogenase-Proben vorhandenen Redoxzustände mit Hilfe dieser Spektroskopie zu identifizieren und sie somit als Kontrollverfahren einzusetzen.

Gemeinsam mit einer pH-Wert-abhängigen elektrochemischen Analyse sollen die FTIR-spektroskopischen Ergebnisse Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus erlauben (Kapitel 6).

Einen tieferen Einblick in die Art und Weise der Wasserstoffumsetzung auf atomarer Ebene soll durch die Untersuchung der Wellenlängenabhängigkeit der Konversion des Enzyms von einem aktiven Zustand (Ni-C) in einen lichtange-

regten Zustand (Ni-L) erlangt werden, die mittels EPR-Spektroskopie durchgeführt wird (Kapitel 8).

Ebenfalls von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis der Hydrogenase und für die Nutzung der Hydrogenase in einem System zur biologischen Wasserstoffproduktion sind Erkenntnisse über die Sauerstoffempfindlichkeit sowie die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften. Dieser Fragestellung wird auf elektrochemischem Wege nachgegangen (Kapitel 7). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden mit den Erkenntnissen verglichen, die an anderen Standard-[NiFe]-Hydrogenasen gewonnen wurden.

Für sämtliche dieser Experimente benötigt man das Enzym zum einen in einer besonders hohen Konzentration, die *in vivo* nicht erreicht wird. Zum anderen sind die Untersuchungsergebnisse nur dann direkt auf das System Hydrogenase übertragbar, wenn keine anderen Faktoren, wie z.B. andere Proteine aus dem bakteriellen Zellextrakt, die Messungen beeinflussen. Um es *in vitro* studieren zu können, ist es erforderlich, die Isolierung und Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase aus dem anaeroben Sulfatreduzierer *D. vulgaris* Miyazaki F zu etablieren und verschiedene Möglichkeiten zur Messung der katalytischen Aktivität zu entwickeln. Diese Arbeiten werden in Kapitel 5 vorgestellt und die katalytischen Eigenschaften mit denen anderer Standard-[NiFe]-Hydrogenasen verglichen.

3 Theorie

3.1 Grundlagen der Infrarot-Spektroskopie

Die Anwendung spektroskopischer Methoden auf Makromoleküle, wie z.B. Proteine, ermöglicht es, detaillierte Einblicke in den Aufbau und die Funktionsweise des Moleküls zu erhalten. Die Grundlage dieser spektroskopischen Techniken ist die Eigenschaft von Materie, Energie zu absorbieren und dadurch in einen energetisch angeregten Zustand zu gelangen. Es kommt genau dann zu einem solchen Übergang, wenn die Energie elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge λ der Energiedifferenz ΔE zwischen Grund- und angeregtem Zustand entspricht:

$$\Delta E = h \frac{c}{\lambda} = h \cdot \nu \quad (3.1)$$

mit $h =$ Planck'sches Wirkungsquantum, $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$. Die Frequenz dieser Strahlung ν stimmt mit dem Quotient aus der Lichtgeschwindigkeit c und der Wellenlänge λ überein.

Die Infrarot-Spektroskopie beruht auf der Absorption von infraroter Strahlung, die sich energetisch dem langwelligen Anteilen des Lichtes anschließt. Sie wird vom Menschen als Wärmestrahlung wahrgenommen und besitzt Wellenlängen von 760 nm bis 1000 μm (760 nm bis 3000 nm: nahes Infrarot, 3 μm bis 30 μm : mittleres Infrarot, 30 μm bis 1000 μm : fernes Infrarot). Während die Energie des sichtbaren Lichtes ausreicht, elektronische Übergänge zu induzieren, ist die Energie der infraroten Strahlung so gering, daß nur Molekülschwingungen ($\Delta E \approx 40 \text{ kJ/mol}$) und Molekülrotationen ($\Delta E \approx 4 \text{ kJ/mol}$) angeregt werden [45].

3.1.1 Das Modell des anharmonischen Oszillators

Die Absorptionseigenschaften eines Moleküls lassen sich hinreichend genau mit dem Modell des anharmonischen Oszillators erklären, zu dessen vereinfachter Beschreibung man das Modell des *harmonischen Oszillators* heranziehen kann [10]. Betrachtet man eine einzelne Bindung in einem Molekül, läßt sie sich als

eine Feder beschreiben, die sich zwischen zwei Massen m_1 und m_2 (den Atomen) befindet. Erfährt das System eine Auslenkung, wird es zu einer harmonischen Schwingung angeregt. Sie besitzt die Frequenz

$$\nu_{vib} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.2)$$

Hierbei entsprechen k der Kraftkonstante, die ein Maß für die Bindungsstärke ist, und μ der reduzierten Masse:

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (3.3)$$

Aus der quantenmechanischen Betrachtung des harmonischen Oszillators geht hervor, daß er nur diskrete Energieniveaus annehmen kann:

$$E_{(v)} = \left(v + \frac{1}{2}\right) h \cdot \nu_{vib} \quad (3.4)$$

mit $v = 0, 1, 2, 3, \dots$ als Schwingungsquantenzahlen. Dies impliziert, daß die Energieniveaus äquidistant sind. Im niedrigsten Energieniveau mit $v = 0$ besitzt der Oszillator aufgrund der Heisenberg'schen Unschärferelation die Energie

$$E = \frac{1}{2} h \nu_{vib} . \quad (3.5)$$

Die Beschreibung realer Systeme mit dem Modell des harmonischen Oszillators ist jedoch auf die Betrachtung von Auslenkungen nahe der Gleichgewichtslage begrenzt. Bei großen Schwingungsamplituden vergrößert sich der Abstand zwischen den beiden Atomen, bis es zur Dissoziation, d.h. zum Bruch der Bindung kommt; im Falle sehr kleiner Abstände stoßen die Atome sich gegenseitig ab. Dieser Zusammenhang wird durch die Morse-Potentialkurve (s. Abbildung 3.1) beschrieben, deren mathematischer Ausdruck von P.M. Morse entwickelt wurde, und im Modell des *anharmonischen Oszillators* berücksichtigt [10]. Einhergehend mit der veränderten Potentialkurve besagt das Modell zudem, daß die Energieniveaus nicht mehr äquidistant sind, sondern die Energiedifferenzen mit zunehmender Schwingungsquantenzahl immer kleiner werden. Da die Besetzung der höheren Energieniveaus bei Raumtemperatur gemäß der Boltzmann-Verteilung jedoch sehr gering ist, gehen alle Übergänge, die bei der Infrarot-Spektroskopie betrachtet werden, vom niedrigsten Energieniveau mit $v = 0$ aus.

Die Betrachtung eines vielatomigen Moleküls zeigt, daß ein nicht-lineares Molekül bestehend aus N Atomen $3N-6$ Schwingungsfreiheitsgrade besitzt, die

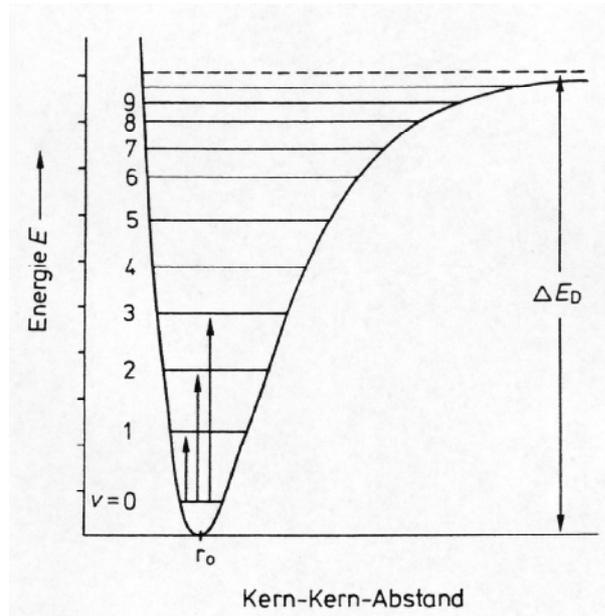


Abbildung 3.1: Potentialkurve (Morse-Potential) des anharmonischen Oszillators (verändert nach [45]).

auch als Normalmoden bezeichnet werden. Diese unterteilen sich in Streck- und Beugeschwingungen. Im Falle der Streckschwingungen, die auch als Valenzschwingungen bezeichnet werden, ändert sich die Bindungslänge. Sie können symmetrisch (ν_s) oder asymmetrisch (ν_{as}) sein. Beugeschwingungen oder Deformationsschwingungen gehen einher mit der Änderung des Bindungswinkels bei annähernd konstantem Bindungsabstand. Auch sie werden wiederum in symmetrische (δ_s) und asymmetrische (δ_{as}) Beugeschwingungen differenziert. Eine Absorption infraroter Strahlung tritt jedoch nur bei solchen Schwingungen auf, bei denen sich mindestens eine Komponente des elektrischen Dipolmomentes ändert; das Übergangsdipolmoment bestimmt dabei die Größe des Extinktionskoeffizienten. In diesem Fall spricht man von einem *infrarot-aktiven* Molekül.

3.1.2 FTIR-Spektroskopie

Die *Fourier-Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie* beruht auf der simultanen Aufnahme vieler Wellenlängen mittels eines Interferometers als apparative Basis. Das für gewöhnlich in den FTIR-Spektrometern verwendete Interferometer ist das *Michelson-Interferometer* (Abbildung 3.2).

Es besteht aus einer Strahlungsquelle, dem Globar, und den optischen Ele-

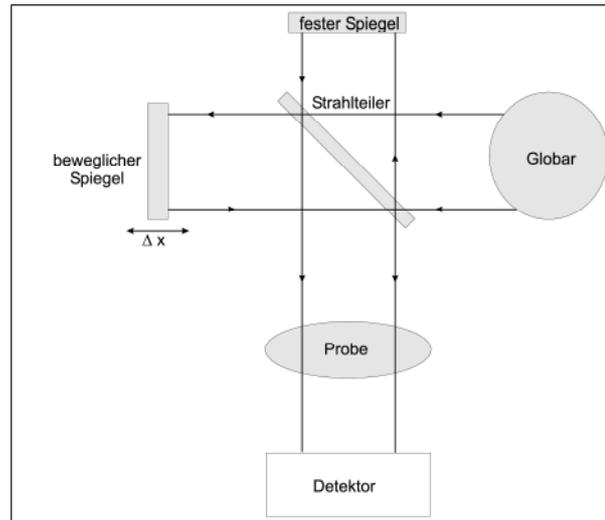


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Michelson-Interferometers.

menten Strahlteiler sowie fester und beweglicher Spiegel (Abbildung 3.2). Der Strahlteiler spaltet die vom Globar emittierte Strahlung in zwei Teilstrahlen auf, von denen der reflektierte Strahl auf den festen Spiegel und der transmittierende Strahl auf den beweglichen Spiegel fällt. Durch die Änderung der Position des beweglichen Spiegels läßt sich die Weglänge des von ihm reflektierten Strahls variieren, so daß es beim Aufeinandertreffen der beiden Teilstrahlen je nach Weglängendifferenz, Wellenlänge und Phase zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz kommt und die Intensität des Meßsignals oszilliert. Der resultierende Strahl trifft nun auf die Probe und wird als Schwebung $I(x)$ vom Detektor registriert. Dieses Interferogramm entspricht einer Funktion der Intensität in Abhängigkeit von der Position x des beweglichen Spiegels:

$$I(x) = I(\tilde{\nu})(1 + \cos 2\pi\tilde{\nu}x) \quad (3.6)$$

Die Frequenz der Oszillation ist dabei abhängig von der Frequenz der interferierenden Strahlung. Die vom Detektor wahrgenommene Schwebung ist das Integral aller oszillierenden Beiträge:

$$I(x) = \int_0^{\infty} I(\tilde{\nu})(1 + \cos 2\pi\tilde{\nu}x)d\tilde{\nu} \quad (3.7)$$

Um aus dem Interferogramm $I(x)$ ein Infrarotspektrum $I(\tilde{\nu})$ zu erhalten, bei der die Intensität als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ angegeben wird, wird eine Fourier-Transformation durchgeführt. Hierbei wird das Interferogramm in einzelne Sinusfunktionen zerlegt, wodurch die Frequenzen der am Interferogramm

beteiligten Schwingungen errechnet werden können. Der Zusammenhang zwischen dem Interferogramm $I(x)$ und dem Infrarotspektrum $I(\tilde{\nu})$ läßt sich mit folgender Gleichung beschreiben [10]:

$$I(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} \left\{ I(x) - \frac{1}{2} I(0) \right\} \cos 2\pi \tilde{\nu} x dx \quad (3.8)$$

Vorteile der Fourier-Transform-Technik

Die Vorteile der FT-Technik gegenüber der dispersiven Technik, bei der durch Drehen eines Gitters oder Prismas in einem Monochromator sukzessive alle Wellenlängen eingestellt werden, sind eine deutliche Zeitersparnis aufgrund der simultanen Aufnahme aller Spektralbereiche (Multiplex-Vorteil), ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis durch das Fehlen von dispersiven Elementen (Jaquinot-Vorteil) und eine hohe Präzision durch die Verwendung eines HeNe-Lasers als interner Kalibrierungsstandard der Position des beweglichen Spiegels (Connes-Vorteil) [45].

3.1.3 Infrarot-Spektroskopie an Proteinen

Im Allgemeinen besitzen Proteine drei breite Absorptionsbanden von besonderer Bedeutung, die auf der Absorption des Proteinrückgrates beruhen. Als Proteinrückgrat bezeichnet man die Peptidgruppen (C=O- und N-H-Gruppe) einer jeden Aminosäure, die durch die Peptidbindung miteinander verknüpft sind und die kettenartige Primärstruktur eines Proteins verursachen. Die *Amid A-Bande* bei 3300 cm^{-1} repräsentiert die Absorption der N-H-Streckschwingung. Die *Amid I-Bande* bei 1650 cm^{-1} charakterisiert die C=O-Streckschwingung und die *Amid II-Bande* bei 1550 cm^{-1} die N-H-Beugeschwingung. Da die Schwingungen benachbarter Peptidgruppen jedoch nicht voneinander unabhängig sind, besteht das Proteinrückgrat aus einer Reihe schwach gekoppelter Oszillatoren, deren Kopplungsstärke, die Bandenlage, die Linienbreite und Intensität der Bande Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur eines Proteins erlauben. Die Amid-Banden eines Proteins besitzen eine hohe Intensität und dominieren ein Infrarotspektrum, da jede Aminosäure mit ihren Peptidgruppen zu dieser Absorption beiträgt [45]. Aufgrund dessen überdecken sie die Absorptionen der Schwingungen, die von den funktionellen Gruppen der einzelnen Aminosäuren verursacht werden. Möchte man darüber hinaus Informationen erlangen über solche Aminosäuren, die während eines Reaktionszyklusses Veränderungen erfahren, erfordert dies die Aufnahme von Differenzspektren, bei denen ein Spek-

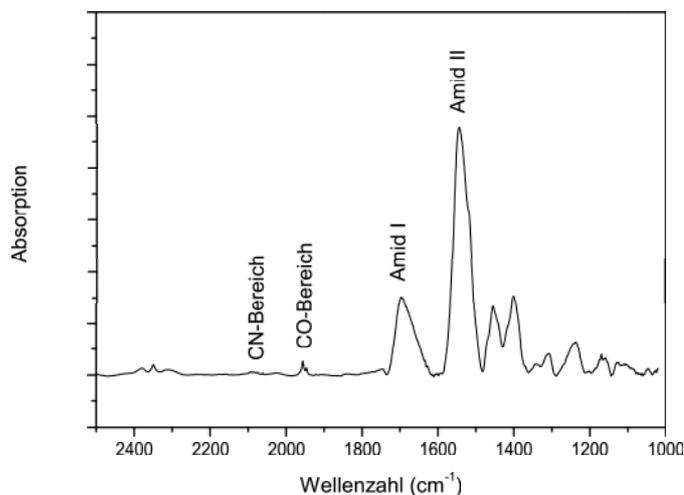


Abbildung 3.3: Einkanal-Infrarot-Spektrum der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F von 2500 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} . Im Gegensatz zu den Amid-Banden besitzen die CO- und CN⁻-Banden sehr kleine Amplituden.

trum eines Grundzustandes von dem eines angeregten Zustandes subtrahiert wird, so daß die Absorptionen der Schwingungen, die sich während der Reaktion nicht geändert haben, im Differenzspektrum nicht mehr auftreten. Die Analyse solcher Spektren erfordert die Zuordnung einzelner Banden zu bestimmten Aminosäuren. Dies kann mit Hilfe einer Isotopenmarkierung geschehen, bei der eine isotopenmarkierte Aminosäure in das Protein inkorporiert wird. Aufgrund der Änderung der reduzierten Masse kommt es nun zu einer Frequenzverschiebung, so daß sich die relevanten Banden der Aminosäure im Spektrum identifizieren lassen. Desweiteren ermöglicht der gezielte Austausch einer bestimmten Aminosäure durch Mutagenese eine Bandenzuordnung durch einen Vergleich des Spektrums des mutierten Proteins mit dem des unveränderten Protein.

Die Infrarotspektren von [NiFe]-Hydrogenasen weisen neben den Amid-Banden Absorptionsbanden im Bereich von 2200 cm^{-1} bis 1900 cm^{-1} auf (Abbildung 3.3). Sie beruhen nicht auf der Absorption funktioneller Gruppen der Aminosäuren, sondern auf der Absorption von zweiatomigen Liganden im aktiven Zentrum (C=O-Schwingungen bei ca. 1950 cm^{-1} und C≡N-Schwingungen um 2070 cm^{-1} ; s. Abbildung 3.3 und Kapitel 6). Die Analyse dieser Spektren ermöglicht Einsichten in das aktive Zentrum während der Katalyse und erlaubt Rückschlüsse auf einen möglichen Reaktionsmechanismus.

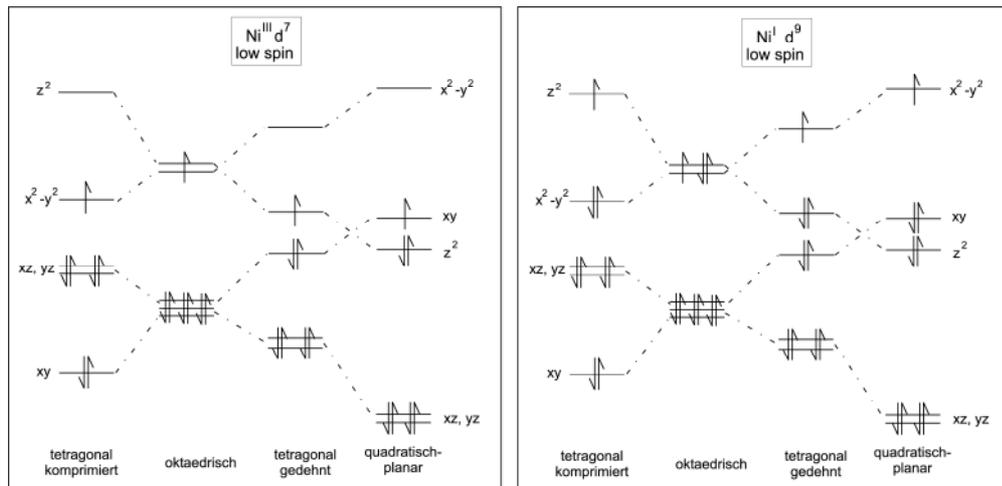


Abbildung 3.4: Geometrie des Kristallfeldes eines Nickelatoms in den formalen Oxidationsstufen Ni^{III} und Ni^{I} und Besetzung der fünf d-Orbitale (verändert nach [81]).

3.2 Grundlagen der Elektronenspinresonanz

Die Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie findet überwiegend als Absorptionsspektroskopie Anwendung. Sie beruht auf der Absorption von Mikrowellen-Strahlung durch paramagnetische Substanzen in einem äußeren Magnetfeld. In biologischen Systemen findet man solche paramagnetischen Substanzen, die sich durch das Vorkommen von ungepaarten Elektronen charakterisieren lassen, in Form von freien Radikalen, die z.B. als Zwischenstufen enzymkatalysierter Reaktionen entstehen können, und bei Metallatomen der Übergangsklasse, die in aktiven Zentren der Enzyme vertreten sind. Besitzt ein Protein kein paramagnetisches Zentrum, erlauben es die Techniken der Molekularbiologie und Biochemie, eine paramagnetische Sonde in das Protein einzufügen, die dann die Zugänglichkeit des Systems für die EPR-Spektroskopie erlauben (*Spinlabeling* [62]). Die [NiFe]-Hydrogenase besitzt in ihrem aktiven Zentrum ein Nickelatom, welches in den formalen Oxidationsstufen Ni^{III} , Ni^{II} und Ni^{I} auftritt, und ein Eisenatom, das nur in der formalen Oxidationsstufe Fe^{II} in seiner „low-spin“-Konfiguration vorkommt. Die Formen Ni^{III} und Ni^{I} besitzen hierbei im „low-spin“-Zustand ein ungepaartes Elektron und sind daher paramagnetisch (Abbildung 3.4). Ni^{II} und Fe^{II} sind diamagnetische Ionen, die kein ungepaartes Elektron aufweisen.

Ein ungepaartes Elektron besitzt ein magnetisches Moment μ_S , das durch den

Eigendrehimpuls des Elektrons \mathbf{S} induziert wird:

$$|\mu_S| = g_e \cdot \mu_B \cdot |\mathbf{S}| \quad (3.9)$$

Hier entspricht μ_B dem Bohr'schen Magneton als Maßeinheit des magnetischen Moments und die Proportionalitätskonstante g dem Landé- oder g -Faktor. Für den g -Faktor des freien Elektrons gilt $g \approx 2$, nach relativistischer quantenmechanischer Korrektur erhält man einen Wert von: $g_e = 2,00232$. In einem äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 besitzt dieses magnetische Moment eine Energie von:

$$E = g_e \cdot \mu_B \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{B}_0 = g_e \cdot \mu_B \cdot m_S \cdot B_0 \quad (3.10)$$

Das freie Elektron besitzt die Spinquantenzahl $\mathbf{S} = \frac{1}{2}$, woraus eine Magnetquantenzahl $m_S = \pm \frac{1}{2}$ resultiert, so daß das ungepaarte Elektron in einem äußeren Magnetfeld nur zwei Orientierungsmöglichkeiten besitzt: Es kann sich parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 ausrichten. Dieser Effekt wird nach seinem Entdecker *Zeeman-Effekt* genannt, die Kopplung des magnetischen Momentes des Elektrons mit dem äußeren Magnetfeld wird als *Elektron-Zeeman-Wechselwirkung* bezeichnet. Die Energien dieser beiden Zustände sind unterschiedlich und betragen

$$E = \pm \frac{1}{2} g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (3.11)$$

Die Energiedifferenz beträgt demnach

$$\Delta E = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (3.12)$$

Um vom energetisch niedrigeren dieser Zustände in den energetisch höheren Zustand zu gelangen, muß also der Energiebetrag ΔE aufgebracht werden. In der Elektronenspinresonanz geschieht dies durch die Absorption eines Photons geschieht, das die Energie von Mikrowellen besitzt:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (3.13)$$

Die Frequenz ν liegt bei einem typischen EPR-Experiment im Bereich von 9 GHz (X-Band) bis 95 GHz (W-Band), was einer Wellenlänge von ca. 3 cm, bzw. 3 mm entspricht.

3.2.1 Der g -Faktor

Jedes Elektron besitzt ein magnetisches Moment μ_J , das durch den Gesamtdrehimpuls \mathbf{J} induziert wird:

$$|\mu_J| = g \cdot \mu_B \cdot |\mathbf{J}| \quad (3.14)$$

Der Gesamtdrehimpuls \mathbf{J} setzt sich dabei aus dem Eigendrehimpuls \mathbf{S} und dem Bahndrehimpuls \mathbf{L} zusammen. Für ein ungepaartes Elektron, welches sich nicht in einem Kristallfeld befindet, reduziert sich der Gesamtdrehimpuls auf den Eigendrehimpuls:

$$|\mu_J| = |\mu_S| = g_e \cdot \mu_B \cdot |\mathbf{S}| \quad (3.15)$$

mit $g_e = 2,00232$.

Befindet sich das ungepaarte Elektron jedoch in einem Molekülsystem, trägt auch der Bahndrehimpuls zum magnetischen Moment bei. Die magnetischen Momente treten nun in Wechselwirkung, die als *Spin-Bahn-Kopplung* bezeichnet wird. Sie kann eine Abschwächung oder Verstärkung des äußeren Magnetfeldes \mathbf{B}_0 verursachen und damit die Energiedifferenz ΔE vergrößern oder verkleinern. Die Spin-Bahn-Kopplung berechnet sich aus dem Skalarprodukt $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$, wobei \mathbf{L} dem Bahndrehimpuls und \mathbf{S} dem Eigendrehimpuls entspricht. Die Proportionalitätskonstante λ entspricht der Intensität der Wechselwirkung und ist für jedes Orbital unterschiedlich. Die Spin-Bahn-Kopplung führt somit zu einer Abweichung des g -Faktors vom Wert des freien Elektrons. Der g -Faktor wird anisotrop, d.h. abhängig von der Orientierung des Magnetfeldes relativ zum molekularen Achsensystem, was in einem EPR-Spektrum mit mehreren Absorptionslinien resultiert. Der anisotrope g -Faktor muß daher als Tensor angesehen werden und wird durch die drei Hauptwerte g_x , g_y und g_z charakterisiert.

Prinzipiell lassen sich nun vier Fälle unterscheiden, die sich in einer charakteristischen Linienform im EPR-Spektrum widerspiegeln [96] (vgl. Abbildung 3.5):

1. *Isotropes EPR-Spektrum*

In diesem Fall ist das magnetische Moment μ_B unabhängig von der Orientierung des ungepaarten Elektrons im äußeren Magnetfeld und die drei g -Werte sind gleich: $g_x = g_y = g_z$. Im EPR-Spektrum zeigt sich nur ein einziges symmetrisches Signal. Ein isotropes Spektrum entsteht auch bei schneller statistischer Bewegung des Moleküls, was zur Ausmittelung der g -Werte führt und nur ein isotropes Signal bei g_{iso} übrig läßt.

2. *Axiales EPR-Spektrum, Fall 1*

Die g -Werte g_x und g_y sind gleich, während g_z größer ist: $g_x = g_y < g_z$. Das Spektrum ist durch ein kleines Signal bei einem geringen Magnetfeld und ein großes Signal bei größerem Magnetfeld charakterisiert.

3. *Axiales EPR-Spektrum, Fall 2*

In diesem Fall entspricht das EPR-Spektrum dem Spiegelbild des axialen Spektrums von Fall 1. Der g -Wert g_z ist dabei kleiner als g_x und g_y : $g_x = g_y > g_z$.

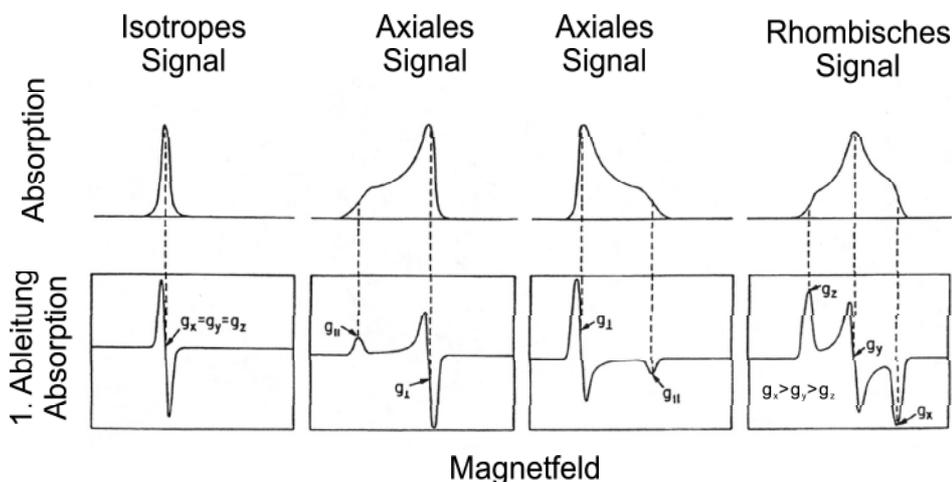


Abbildung 3.5: Darstellung der möglichen EPR-Spektren eines $S=\frac{1}{2}$ -Systems (verändert nach [96]).

4. Rhombisches EPR-Spektrum

Das EPR-Spektrum wird als rhombisch bezeichnet, wenn sich alle drei g -Werte unterscheiden: $g_x \neq g_y \neq g_z$. In diesem Fall weist das Spektrum drei charakteristische Absorptionssignale auf.

3.2.2 Die rhombischen EPR-Spektren von Ni^{III} und Ni^{I}

Die EPR-Spektren der [NiFe]-Hydrogenase zeigen ein rhombisches Signal, das auf der Absorption des paramagnetischen Nickelatoms im aktiven Zentrum beruht. Da das Nickel in den formalen Oxidationsstufen Ni^{III} und Ni^{I} ein ungepaartes Elektron besitzt, hat es einen Eigendrehimpuls von $\mathbf{S}=\frac{1}{2}$. Die g -Werte nehmen Abweichungen vom g -Wert des freien Elektrons g_e an, die kleiner als 0,4 sind. Ein solches Signal ist typisch für Übergangsmetalle, die ein einfaches ungepaartes Elektron in einem d-Orbital besitzen. Die Spin-Bahn-Kopplung kann vom Elektron dazu genutzt werden, durch Rotation um die Achsen x , y und z in ein anderes d-Orbital zu gelangen (Abbildung 3.6). Liegt dieses Orbital energetisch höher als das Ausgangsorbital, wird ein lokales magnetisches Feld induziert, das dem äußeren Magnetfeld entgegen steht. Für die Resonanzbedingung aus Gleichung 3.13 benötigt man daher ein größeres Magnetfeld \mathbf{B}_0 , so daß der g -Faktor kleiner wird. Umgekehrt kann das Elektron aber auch in ein energetisch tiefer liegendes Orbital gelangen, wodurch ein lokales Magnetfeld

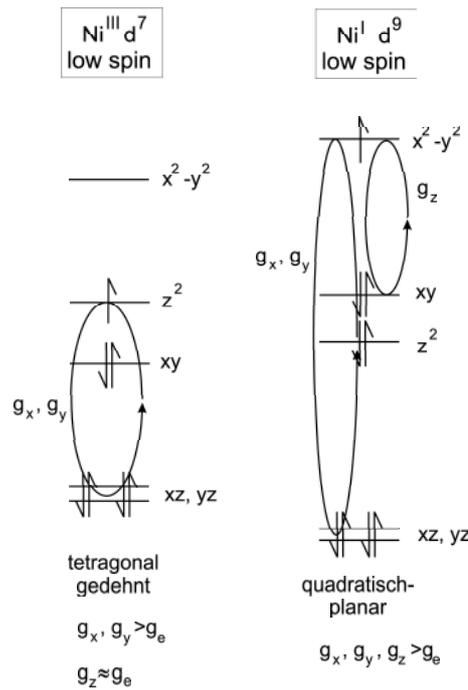


Abbildung 3.6: Die Spin-Bahn-Kopplung bewirkt einen Übergang des Elektrons vom Ausgangsorbital in ein anderes d-Orbital durch Rotation um die Achsen x , y und z .

induziert wird, welches sich zum äußeren addiert. Dementsprechend wird hier ein schwächeres Magnetfeld \mathbf{B}_0 benötigt, um die Resonanzbedingung 3.13 zu erfüllen, so daß der g -Faktor größer wird.

Der g -Wert erlaubt somit Rückschlüsse auf die elektronischen Einflüsse der Umgebung auf das Nickel. Diese sind in den paramagnetischen Redoxzuständen der [NiFe]-Hydrogenase unterschiedlich, was zu charakteristischen EPR-Signalen führt, nach denen sich die Redoxzustände unterscheiden lassen. In den Fällen, in denen das aktive Zentrum einen Brückenliganden enthält und das Nickel die formale Oxidationsstufe Ni^{III} besitzt, läßt sich das Kristallfeld des Nickels als tetragonal gedehnten Oktaeder beschreiben. Fehlt dieser Ligand (Ni^I), handelt es sich um eine vierfache Koordination des Nickels, die sich als quadratisch-planares Kristallfeld darstellen läßt. Befindet sich das ungepaarte Elektron im $3d_{z^2}$ -Orbital des Ni^{III}, ergibt sich auf der Basis von störungstheoretischen Berechnungen ein g_z -Wert von $g_z = g_e \approx 2,0$, g_x, g_y haben einen Wert ≈ 2 . Im Falle eines Ni^I, dessen ungepaartes Elektron sich im $3d_{x^2-y^2}$ -Orbital aufhält, ist $g_z \neq g_e$; hier gilt für alle Werte $g_x, g_y, g_z > 2$.

3.2.3 Die Hyperfeinwechselwirkung

Die Eigenschaften eines ungepaarten Elektrons werden wesentlich von seiner Umgebung bestimmt, in der sich eine Vielzahl von Atomkernen befinden, die ihrerseits einen Kernspin \mathbf{I} besitzen. Besitzt das System einen Kernspin $\mathbf{I}_k \neq 0$, kommt es zum einen zur Kern-Zeeman-Wechselwirkung und zum anderen zur Wechselwirkungen zwischen dem ungepaarten Elektron und dem Kern, die als Hyperfeinwechselwirkung bezeichnet wird. Da ein Kern mit einem Kernspin $\mathbf{I}_k \neq 0$ ein magnetisches Moment besitzt, welches mit dem äußeren Magnetfeld wechselwirkt, ist die *Kern-Zeeman- Wechselwirkung* als Analogon der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung zu verstehen. Kerne, deren Kernspin $\mathbf{I}_k \neq \frac{1}{2}$ ist, weisen zusätzlich ein elektrisches Quadrupolmoment auf, das mit dem elektrischen Feldgradienten wechselwirkt, der seinerseits durch die Elektronen in der Umgebung des Kernes erzeugt wird. Diese Wechselwirkung wird als *Kern-Quadrupol- Wechselwirkung* bezeichnet.

Die *Hyperfeinwechselwirkung* setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: Zum einen kommt es zu einer Wechselwirkung der Dipolmomente von Kernspins mit dem Elektronenspin, der als dipolarer Anteil bezeichnet wird. In Lösungen wird dieser dipolare Anteil der Hyperfeinwechselwirkung jedoch durch die Brown'sche Molekularbewegung herausgemittelt. Dennoch lassen sich auch hier Kopplungen des Elektronspins zu Kernspins beobachten, die als Fermi-Kontaktanteil der Hyperfeinwechselwirkung bezeichnet werden. Die Ursache dieser Wechselwirkung ist eine von Null verschiedene Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons am Kernort. Da dies nur für s-Orbitale zutrifft, welche eine kugelsymmetrische Form aufweisen, ist der Fermi-Kontaktanteil notwendigerweise isotrop. Die quantenmechanische Beschreibung all dieser Wechselwirkungen liefert der *Spin-Hamiltonoperator*:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_{\text{Hyperfein}} + \mathcal{H}_{\text{Kern-Zeeman}} + \mathcal{H}_{\text{Quadrupol}} + \mathcal{H}_{\text{Elektron-Zeeman}}$$

Die Grundlagen der EPR-Spektroskopie können in den Lehrbüchern [9, 10, 61] nachgeschlagen werden.

3.2.4 EPR-Verfahren

CW-EPR

CW-EPR steht für *continuous wave EPR* und beschreibt das EPR-spektroskopische Verfahren, bei dem man die Absorption der Probe durch ununter-

brochenes Bestrahlen mit Mikrowellen einer festen Frequenz als Funktion des äußeren Magnetfeldes misst. Zusätzlich wird das Magnetfeld sinusförmig moduliert. Das gemessene Spektrum entspricht somit der ersten Ableitung des Absorptionssignals; der Vorteil der Feldmodulation besteht in einer größeren Auflösung.

ENDOR

Ein CW-EPR-Experiment führt aufgrund der Vielzahl an Übergängen, die in Systemen eines Elektronenspins, der mit vielen Kernspins gekoppelt ist (Hyperfein-Kopplung), möglich sind, nicht zu einer ausreichenden Auflösung, um alle Einflüsse auf das Elektron erkennen zu können, d.h. alle Parameter des Spin-Hamiltonoperators bestimmen zu können. Die *electron nuclear double resonance* (ENDOR)-Spektroskopie [104] umgeht dies, indem sie nur die Kernspinübergänge betrachtet und diese über eine Absorptionsänderung einer simultan eingestrahlten Elektronenspinresonanz nachweist. Mit Hilfe der hohen Auflösung der NMR-Spektroskopie und der großen Empfindlichkeit der EPR-Spektroskopie können dann meist alle Hyperfein-Kopplungen bestimmt werden. In einem ENDOR-Experiment wird nicht nur die Resonanzbedingung des Elektronenspins, sondern auch die des Kernspins durch Einstrahlen von Energie in Form von Radiowellen erfüllt (daher bezeichnet man ENDOR auch als Doppelresonanzmethode).

Impuls-EPR

Impuls-Verfahren erlauben es, durch gezielte äußere Störungen (Mikrowellenimpulse definierter Länge) bestimmte Beiträge des Spin-Hamiltonoperators zu unterdrücken, so daß die restlichen Beiträge umso besser detektiert werden können. Somit lassen sich Wechselwirkungen isolieren und Korrelationen detektieren, die durch CW-EPR-Verfahren nicht beobachtet werden können.

Impuls-Verfahren [61] wurden ausgehend von der Entdeckung von Kernspin-Echos durch Erwin Hahn erst für die NMR-, dann auch für die EPR-Spektroskopie entwickelt. Bei einem 2-Impuls-ESEEM (*electron spin echo envelope modulation*)-Experiment [87] wird der Spin, bzw. die resultierende makroskopische Magnetisierung durch den ersten Mikrowellenimpuls ($\pi/2$ -Impuls) aus seiner Gleichgewichtslage entlang der z-Achse in die xy-Ebene gedreht (Abbil-

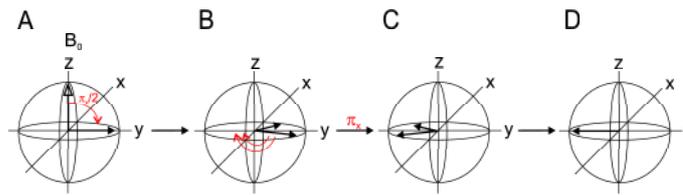


Abbildung 3.7: Das Verhalten der Spins während einer 2-Impuls-ESEEM-Sequenz. Erläuterungen hierzu befinden sich im Text.

Abbildung 3.7A) und gerät damit außer Phase (Abbildung 3.7B). Ein weiterer Mikrowellenimpuls (π -Impuls) refokussiert die Spins und induziert schließlich das Spin-Echo (Abbildung 3.7C und D, Abbildung 3.8). Wird die Zeit zwischen den beiden Impulsen verlängert, verändert sich die Intensität des Echos. Die Relaxation des Echos kann aufgrund von Hyperfein- und Quadrupol-Wechselwirkungen mit Kernen $I_j \neq 0$, die sich in der Nähe des ungepaarten Elektrons befinden, moduliert sein. Die Analyse der Modulation erlaubt daher Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit umgebenden Kernen.

Die einzelnen Impulsverfahren unterscheiden sich anhand der angewendeten Impulssequenz. Die weiteste Verbreitung findet das 2-Impuls-ESEEM-Verfahren, bei dem ein $\frac{\pi}{2}$ -Impuls von einem π -Impuls durch die Zeit τ getrennt ist. Die gleiche Zeit verstreicht, bis das Echo entsteht (Abbildung 3.8). Während des Expe-

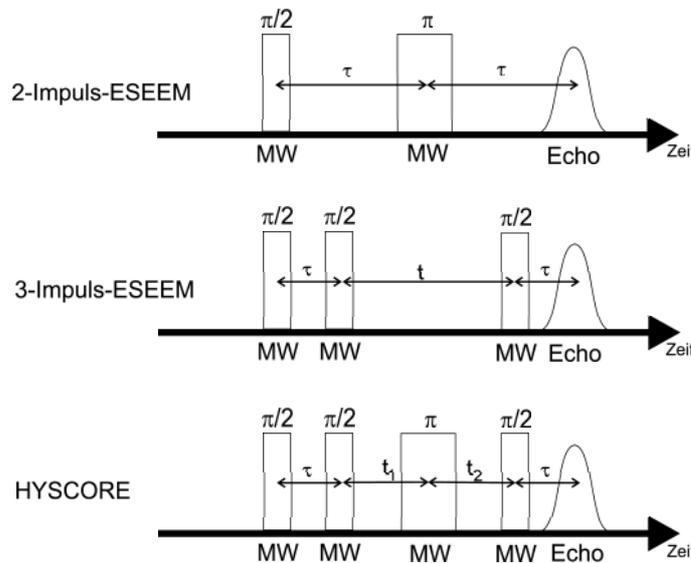


Abbildung 3.8: Impulssequenzen verschiedener Impulsverfahren.

rimentes wird die Zeit τ zwischen den beiden Impulsen verlängert und die Am-

plitude des Echos beobachtet. Die zeitabhängige Modulation dieses Echos kann durch eine Fourier-Transformation in ein frequenzabhängiges Spektrum umgewandelt werden, so daß Hyperfein- und Quadrupol-Wechselwirkungen identifiziert werden können. Eine Weiterentwicklung der 2-Impuls-ESEEM ist die 3-Impuls-ESEEM [87] (Abbildung 3.8), deren Impulssequenz zur Entstehung eines stimulierten Echos führt. Während die Zeit zwischen dem ersten und zweiten Impuls konstant gehalten wird, wird die Zeit zwischen dem zweiten und dritten Impuls variiert und die Modulation des stimulierten Echos aufgenommen.

Ein HYSORE (*hyperfine sublevel correlation*)-Experiment basiert auf diesem 3-Impuls-ESEEM-Verfahren, wobei zwischen dem zweiten und dritten Impuls ein weiterer π -Impuls eingeschoben wird (Abbildung 3.8), durch den Korrelationen zwischen Kernspin-Übergängen der zwei Magnetfeldorientierungen des Elektrons induziert werden. Um ein Modulationssignal zu erhalten, wird dabei die Echoamplitude als Funktion der Zeiten t_1 und t_2 (vgl. Abbildung 3.8) zwischen den Impulsen aufgenommen. Durch eine zweidimensionale Fourier-Transformation wird dieses Singal anschließend in ein frequenzabhängiges Spektrum umgewandelt. Das HYSORE-Experiment kann somit als zweidimensionales Vier-Impuls-Verfahren bezeichnet werden [60], das die zwei ENDOR-Frequenzen einer bestimmten Hyperfeinkopplung korreliert.

3.3 Grundlagen elektrochemischer Techniken

3.3.1 Thermodynamik von Redoxreaktionen

Grundsätzlich lassen sich Redoxreaktionen in die zwei Einzelreaktionen Oxidation und Reduktion unterteilen, die z.B. an den zwei Elektroden einer elektrochemischen Zelle stattfinden können. Dabei ist die Anode der Ort der Oxidation und die Kathode der Ort der Reduktion. Befindet sich dieses System außerhalb eines thermodynamischen Gleichgewichtes, ist ein Stromfluß zwischen den beiden Elektroden meßbar. Das Potential E der Elektroden ist durch die Nernst-Gleichung (benannt nach ihrem Entdecker Walther Hermann Nernst) gegeben [10]:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (3.16)$$

Es ist somit abhängig vom tabellierten Standardpotential E^0 der betrachteten Reaktion und den Konzentrationen der beteiligten Substanzen [Ox] und [Red]. Weiterhin gehen in diese Gleichung die Temperatur T und die Anzahl der über-

ragenden Elektronen n ein ($R =$ allgemeine Gaskonstante, $8,314 \text{ J}(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$, $F =$ Faraday-Konstante, 96500 C). Das Potential E kann für jede der an den beiden Elektroden ablaufenden Teilreaktion bestimmt werden. Die Differenz dieser beiden Potentiale ermöglicht im Falle einer Kombination der beiden Teilreaktionen eine Aussage über die spontane Reaktionsrichtung. Konventionsgemäß werden diese Potentiale gegen eine Referenz angegeben, die Standardwasserstoffelektrode, NHE (*normal hydrogen electrode*), deren Potential definitionsgemäß $E = 0$ ist. Die NHE besteht aus einer Platinelektrode, die bei 298 K und einer Atmosphäre von 1 bar Wasserstoff in eine Elektrolytlösung mit $\text{pH} = 0$ eintaucht.

Auch Proteine sind in der Lage, eine Vielzahl von Redoxreaktionen zu katalysieren. Hierzu weisen sie redoxaktive (meist metallische) Zentren auf. Im Falle der [NiFe]-Hydrogenase, die die Redoxreaktion $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ katalysiert, spielen sich die Redoxreaktionen am [NiFe]-Zentrum ab.

In biologischen Systemen treten Redoxreaktionen jedoch häufig mit anderen Reaktionen gekoppelt auf, z.B. mit der Bindung von Substraten oder Liganden oder einer Konformationsänderung. Da der theoretische Hintergrund der sehr häufig auftretenden Kombination eines Ladungstransfers mit einem Protonentransfer in Kapitel 6.6 ausführlich behandelt wird, soll darauf an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Die dort beschriebenen Zusammenhänge gelten im Prinzip für die Bindung eines beliebigen Liganden an das Redoxzentrum eines Proteins, sofern die Dissoziationskonstanten der oxidierten und der reduzierten Form unterschiedlich sind und das Potential von der Konzentration des Liganden abhängig ist.

3.3.2 Potentiometrische Titration

Das Redoxpotential E_0 eines Redoxpaares entspricht dem Potential, welches man anlegen muß, damit das Verhältnis der oxidierten zu reduzierten Spezies $\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} = 1$ ist. Zur experimentellen Bestimmung eines Redoxpotentials führt man eine potentiometrische Titration durch, bei der das Verhältnis $\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$ bei einem definierten Potential ermittelt wird. Dies geschieht meist durch spektroskopische Techniken, wenn die Spezies Ox und Red unterschiedliche Absorptionssignale aufweisen. Die Einstellung des Potentials kann dabei durch die sukzessive Zugabe eines Reduktionsmittels oder durch das Anlegen eines Potentials mittels eines Potentiostaten erfolgen. Die Konzentration der reduzierten, bzw. der oxidierten Spezies lassen sich dabei in Abhängigkeit des angelegten

Potentials angeben nach:

$$[Red] \sim \frac{1}{1 + e^{\frac{nF}{RT}(E-E^0)}} \quad (3.17)$$

$$[Ox] \sim \frac{e^{\frac{nF}{RT}(E-E^0)}}{1 + e^{\frac{nF}{RT}(E-E^0)}} \quad (3.18)$$

In vielen Fällen, in denen Redoxpotentiale von Proteinen untersucht werden, interagiert das Protein nicht direkt mit der Elektrode, so daß es nicht zur Ausbildung eines elektrochemischen Gleichgewichtes kommen kann. Dies erfordert den Einsatz von Mediatoren, die die Elektronen zwischen der Elektrode und dem Protein hin- und hertransportieren. Daher spricht man auch von *vermittelter Potentiometrie* [71]. Im Allgemeinen sind die Mediatoren kleine Moleküle, meist Farbstoffe, die Redoxmediatoren genannt werden. Aus ihnen werden diejenigen ausgewählt, deren eigenes Redoxpotential dem der betrachteten Reaktion sehr nahe kommt. Bei der Untersuchung eines größeren Potentialbereichs verwendet man eine Redoxmediator-Mischung.

3.3.3 Chronoamperometrie

Chronoamperometrische Experimente beruhen auf der Messung des Stromes in Abhängigkeit von der Zeit. Das zwischen Arbeits- und Gegenelektrode angelegte Potential kann dabei im Zeitverlauf konstant gehalten oder nach Ablauf einer definierten Zeitspanne sprunghaft geändert werden. Im Allgemeinen sind solche Prozesse diffusionskontrolliert, da ein Elektronentransfer nur über eine Distanz von wenigen Ångström erfolgen kann, so daß er in elektrochemischen Experimenten nur an der Grenzfläche Metall/Lösung abläuft. Wird das Potential nun sprunghaft von einem Wert kleiner als das Standardpotential der betrachteten Reaktion auf einen Wert größer als das Standardpotential geschaltet, werden zunächst die unmittelbar an der Elektrode befindlichen reduzierten Moleküle Red oxidiert, bis sich ein Konzentrationsverhältnis $[Ox]/[Red]$ entsprechend der Nernst-Gleichung einstellt. Da der Elektronentransfer jedoch räumlich limitiert ist, baut sich ein Konzentrationsgradient auf, bei dem unmittelbar an der Elektrode nur die Spezies Ox auftritt und am weitesten von der Elektrode entfernten Punkt nur die Spezies Red. Gemäß des Fick'schen Diffusionsgesetzes werden die reduzierten Moleküle in Richtung der Elektrode diffundieren, während die oxidierten Moleküle von ihr weg diffundieren, so daß der anfängliche Konzentrationsgradient zunehmend an Steilheit verliert (Abbildung 3.9). Der gemess-

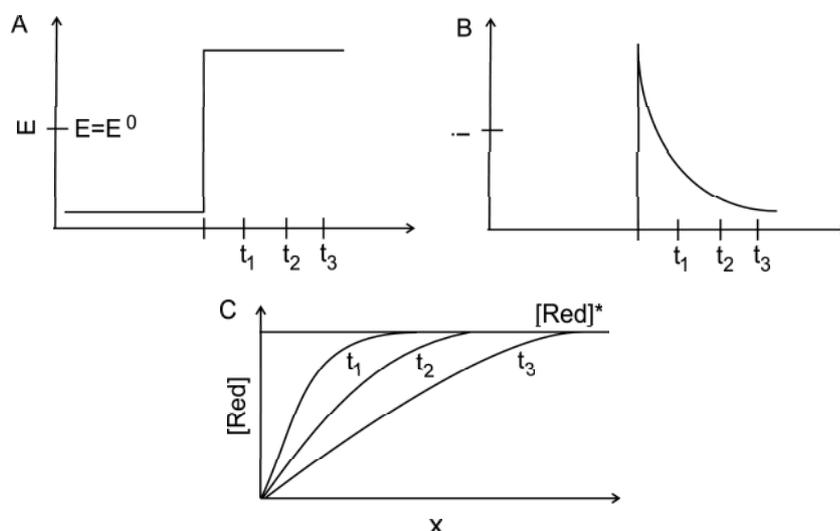


Abbildung 3.9: Das chronoamperometrische Experiment: A: Anregungssignal, B: Antwortsignal, C: Konzentrationsprofil der reduzierten Spezies, bei dem x den Abstand zur Elektrode darstellt. $[\text{Red}]^*$ bezeichnet die Konzentration in der Volumenphase.

sene Strom ist somit diffusionskontrolliert und lässt sich quantitativ durch die Cottrell-Gleichung beschreiben [13]:

$$i(t) = \frac{nFA\sqrt{D}[\text{Red}]}{\sqrt{\pi}\sqrt{t}} \quad (3.19)$$

Die vollständige Beschreibung des elektrochemischen Verhaltens eines Systems, die auch die Abhängigkeit des Stroms vom angelegten Potential beinhaltet, würde eine Serie von Potentialschritten in einem chronoamperometrischen Experiment bedingen, bei dem die Potentialschritte sehr klein (ca. 1 mV) sein müssten. Zudem ist die Identifizierung von potentialabhängigen Merkmalen z.B. aufgrund des Vorhandenseins verschiedener Spezies in einer Probe, aus den Strom-Zeit-Kurven relativ schwierig.

3.3.4 Zyklische Voltammetrie

Einen einfacheren Weg, viele Informationen über das elektrochemische Verhalten eines Systems zu erhalten, bieten Experimente, bei denen anstelle von Strom-Zeit-Kurven die Strom-Potential-Abhängigkeit durch eine mit der Zeit lineare Variation des Potentials (Anlegen einer Dreiecksspannung $E(t)$) aufgenommen werden. Diese Methode wird *linear sweep voltammetry* genannt [13]. Beginnt das Experiment bei einem positiveren als dem Standardpotential der

betrachteten Reaktion, fließt zunächst nur ein nicht-faradayischer Strom. Erreicht das angelegte Potential die Nähe des Standardpotentials, setzt eine Reduktion und damit ein Stromfluß ein (Abbildung 3.10). Der Strom steigt so lange, bis die Konzentration der oxidierten Spezies in der Nähe der Elektrode gegen 0 geht und der Massentransport der oxidierten Spezies zur Elektrode sein Maximum erreicht. Danach sinkt er wieder, da ein Verarmungseffekt einsetzt. Hieraus resultiert eine Stromkurve, die ein Oxidationsmaximum besitzt (vgl. Abbildung 3.10). Wird die Richtung des angelegten, variierten Potentials

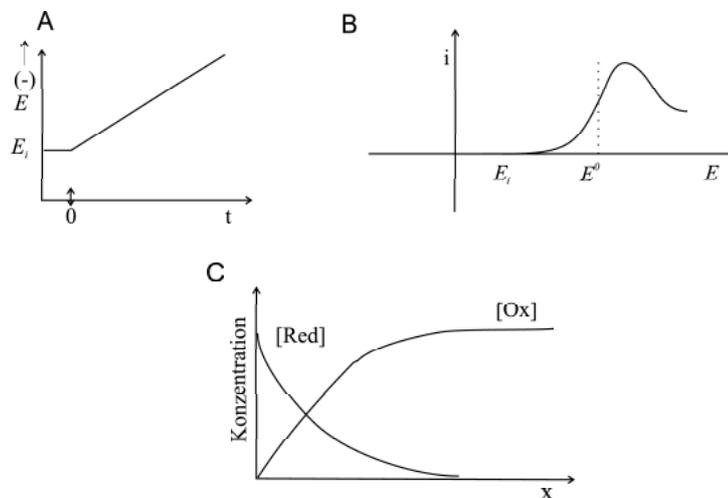


Abbildung 3.10: Das Linear-Sweep-Experiment. A: Linear-Sweep-Potential, beginnend bei E_i . B: Stromentwicklung in Abhängigkeit des Potentials. C: Konzentrationsprofile der reduzierten und oxidierten Spezies.

nun umgekehrt, d.h. daß das Startpotential negativer als das Standardpotential ist, werden die sich in der Nähe der Elektrode befindlichen reduzierten Moleküle oxidiert und erneut nimmt der Strom so lange zu, bis die reduzierte Spezies verbraucht ist (Abbildung 3.11). Auch dieser Prozeß resultiert wiederum in einer Stromkurve, die ein Reduktionsminimum enthält (Abbildung 3.11). Da hierbei jedes Potential zweimal (einmal aus der oxidativen, einmal aus der reduktiven Richtung) angelegt wird (vgl. Abbildung 3.11A), bezeichnet man diese Methode als *zyklische Voltammetrie*. Die wichtigsten Größen, die aus einem zyklischen Voltammogramm abgelesen werden können, sind die Spannung und der Strom des Oxidationsmaximums und des Reduktionsminimums (Peakspannungen $E_{min,max}$ und Peakströme $i_{min,max}$, vgl. Abbildung 3.12). Nach der Randles-Sevcik-Gleichung [13] ist der Peakstrom proportional zur Konzentra-

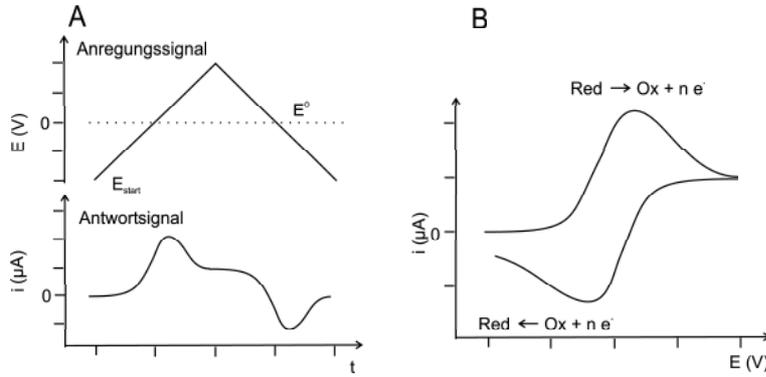


Abbildung 3.11: Das Zyklovoltammetrie-Experiment. A: Anregungs- und Antwortfunktion. B: Typische Darstellung eines zyklischen Voltammogramms.

tion C der redoxaktiven Spezies und hängt darüber hinaus von der Größe der Elektrodenoberfläche A und des Diffusionskoeffizienten D des Proteins ab. Bei Raumtemperatur ($T=298\text{ K}$) und für C in mol/cm^3 , A in cm^2 und D in cm^2/s ergibt sich $i_{\text{min,max}}$ zu:

$$i_{\text{max,min}} = 2,69 \cdot 10^5 n^{\frac{3}{2}} \cdot A \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot C \cdot \omega^{\frac{1}{2}} \quad (3.20)$$

Dabei entspricht ω der Aufnahmegeschwindigkeit in V/s . Das Redoxpotential der betrachteten Reaktion ergibt sich als Mittelwert der Potentiale des Oxidationsmaximums und des Reduktionsminimums:

$$E^0 \approx \frac{E_{\text{max}} + E_{\text{min}}}{2} \quad (3.21)$$

Eine weitere wichtige Größe ist die Potentialdifferenz zwischen den Potentialen des Oxidationsmaximums und des Reduktionsminimums $\Delta E = E_{\text{max}} - E_{\text{min}}$ sowie das Halbpotential $E/2$ und der Halbstrom $i/2$ (s. Abbildung 3.12). Diese Größen gelten als diagnostische Kriterien, anhand derer Aussagen über den Reaktionsmechanismus, vor allem die Reversibilität einer Reaktion, getroffen werden können. Für reversible Systeme, wie sie in Kapitel 7 behandelt werden, gilt:

- $\Delta E = \frac{59\text{ mV}}{n}$ für $T=298\text{ K}$
- $|E_{\text{min/max}} - E/2| = \frac{56,5\text{ mV}}{n}$ für $T=298\text{ K}$
- $E^0 = \frac{1}{2}(E_{\text{min}} + E_{\text{max}})$, wenn $D_{\text{Ox}} = D_{\text{Red}}$
- $i_{\text{min,max}} \sim C$

- $\frac{i_{min}}{i_{max}} = 1$ für alle ω

Für quasireversible Systeme gilt hingegen unter anderem, daß die Potentialdifferenz ΔE eine Funktion der Aufnahme­geschwindigkeit ω ist. Elektrochemisch irreversible Systeme weisen überhaupt kein Oxidationsmaximum auf und das Reduktionsminimum E_{min} verschiebt sich bei Änderung der Aufnahme­geschwindigkeit ω .

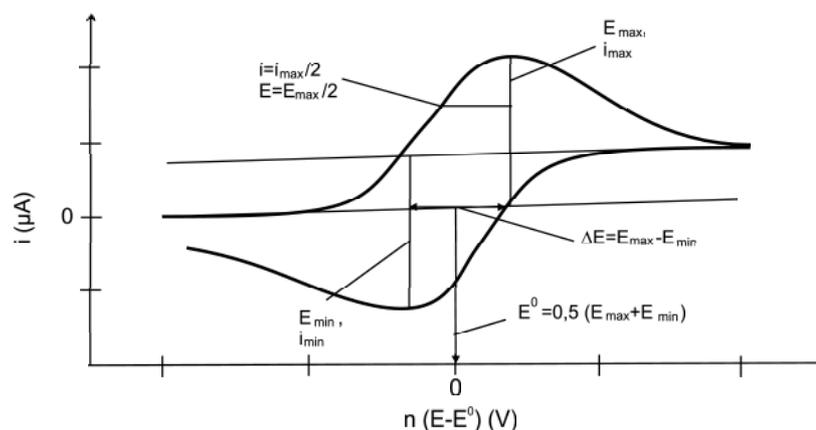


Abbildung 3.12: Wichtigste Größen in einem zyklischen Voltammogramm zur Überprüfung der diagnostischen Kriterien.

3.3.5 Proteinfilmvoltammetrie

Im Gegensatz zur vermittelten Potentiometrie an Proteinen (vgl. Kapitel 3.3.2) interagiert bei der *direkten Elektrochemie* die Elektrode mit dem untersuchten Protein direkt ohne den Einsatz von Redoxmediatoren.

Ist die redoxaktive Spezies, z.B. das Protein, auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert, wie dies bei der Proteinfilmvoltammetrie der Fall ist, sind die betrachteten Prozesse unabhängig von der Diffusion des Proteins zur Elektrode und die Prozesse nicht mehr diffusionskontrolliert. Die Proteinfilmvoltammetrie ist eine direkte elektrochemische Methode, bei der das Protein eine starke Interaktion mit der Elektrode eingeht. Es adsorbiert auf der Elektrodenoberfläche, wobei sicher gestellt sein muß, daß das Elektrodenmaterial zum einen nicht die native Konformation des Proteins beeinflusst und zum anderen natürliche Elektronenakzeptoren des Proteins nachempfendet.

Ein zyklisches Voltammogramm eines idealisierten, nicht diffusionskontrollierten Systems weist bei zunehmendem Potential zunächst einen zunehmenden,

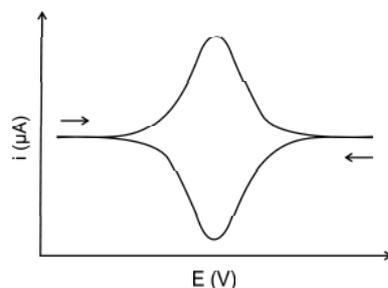


Abbildung 3.13: Idealisiertes zyklisches Voltammogramm [71] einer redoxaktiven Spezies, die auf der Elektrode immobilisiert wurde.

oxidativen Strom auf, der sein Maximum dann erreicht, wenn das angelegte Potential dem Redoxpotential des Systems entspricht. Er fällt mit weiter zunehmendem Potential wieder auf 0 A ab und erreicht im reversen Durchgang, bei dem das Potential sukzessive verringert wird, ein Minimum wiederum beim Redoxpotential. Weitere Erniedrigung des Potentials führt zum erneuten Anstieg des Stroms auf 0 A. Im idealisierten Fall entsprechen sich also die Potentiale des Strommaximums und -minimums und stimmen mit dem Redoxpotential überein (Abbildung 3.13). Im Realfall allerdings besitzt der Strom eine zusätzliche Komponente, der Nicht-Faraday'sche Strom, die auf das „Laden der Elektrode“ zurückzuführen ist. Er läßt sich jedoch aus den experimentellen Daten herausrechnen, so daß man dem idealisierten Fall recht nahe kommt [7, 72].

Die Fläche unterhalb eines Maximums, bzw. Minimums im zyklischen Voltammogramm ist idealerweise gleich groß und entspricht der Ladung, die auf das redoxaktive Zentrum übertragen worden ist (nF Elektronen pro Mol adsorbierter Proteins). Der Maximal-, bzw. Minimalstrom ist abhängig von der Aufnahmegeschwindigkeit ω , der Elektrodenoberfläche A , der Konzentration der Proteinmoleküle auf der Elektrodenoberfläche Γ und der Anzahl der Elektronen n

$$i_{max,min} = \frac{n^2 F^2 A \Gamma \omega}{4RT} . \quad (3.22)$$

Ist das Protein auf der Elektrode adsorbiert, ergibt die Auftragung des Stroms $i_{max,min}$ gegen die Aufnahmegeschwindigkeit ω einen linearen Zusammenhang [71].

Katalytische Voltammetrie

Zyklische Voltammetrie an Proteinen, die in Abwesenheit des Substrates durchgeführt werden, bezeichnet man auch als *nicht-katalytische Voltammetrie*. Bei Zugabe des Substrates zum Reaktionsansatz reagiert dieses mit dem redoxaktiven Protein und verändert das aktive Zentrum entsprechend. Es wird anschließend durch Abgabe der Elektronen an die Elektrode regeneriert. Beide Prozesse resultieren in einem zyklischen Voltammogramm, welches keine Minima oder Maxima aufweist, sondern katalytische Wellen zeigt (*katalytische Voltammetrie*) [72]. Da das Protein direkt mit der Elektrode interagiert, ist der gemessene Strom ein direktes Maß für die katalytische Aktivität, und das Voltammogramm gibt dessen Abhängigkeit vom angelegten Potential wieder. Bei der Durchführung dieser Experimente rotiert die Elektrode um ihre Achse, so daß einerseits das Protein auf der Elektrodenoberfläche ständig mit Substrat versorgt und andererseits das entstehende Produkt kontinuierlich abtransportiert wird. Der maximal erreichbare Strom des einzelnen Experiments ist also abhängig von der Rotationsrate der Elektrode. Im Grenzfall einer unendlichen Rotationsrate würde sie den Strom nicht mehr beeinflussen, und die katalytische Aktivität wäre nicht mehr durch den Massentransport kontrolliert.

Vorteile der Proteinfilmvoltammetrie

Im Vergleich zur vermittelten und diffusionskontrollierten Voltammetrie bietet die Proteinfilmvoltammetrie den Vorteil, die experimentellen Bedingungen, z.B. den pH-Wert oder das Substrat, ohne großen Aufwand zu ändern, da hierzu nur die die Elektrode umgebende Lösung ausgetauscht werden muß, während der Proteinfilm selbst erhalten werden kann. Dies resultiert darüber hinaus in einem sehr geringen Materialverbrauch. Die proteinfilmvoltammetrischen Messungen selbst sind innerhalb weniger Minuten abgeschlossen und die Analyse der Voltammogramme ist durch den Wegfall von Diffusions- oder Transportphänomenen vereinfacht. Zur Bestimmung von Redoxpotentialen ist es zudem nicht notwendig, spektroskopische Analysen durchzuführen. Somit bietet die Proteinfilmvoltammetrie eine komfortable Technik zur Untersuchung redoxaktiver Proteine.

4 Materialien

4.1 Laborgeräte

Anaerob-Zelt (Glove Box) + Zubehör	Töpfer, Göppingen
Anaerob-Zelt für Elektrochemie	M. Braun Inertgas-Systeme, Garching
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Holzner, Nußloch
Clark-Elektrodeneinheit DW1	Hansatech Instruments, Norfolk (GB)
Elektrodenmotor M636	EG&G Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN (USA)
Fermenter Biostat DL50	B. Braun Biotech, Melsungen
FPLC-System Äkta basic	Amersham Biosciences, Freiburg
Gasverteilungssystem (Anaerobe Line) + Vakuumpumpe Vac V-500	Werkstätten, MPI Mülheim Büchi, Flawil (CH)
Kulturbox	Dinkelberg analytics, Gablingen
Kühlzentrifuge Avanti J20XP	Beckman Instr., München
Massenspektrometer Finnigan Delta ^{Plus} XP	Thermo Electron Corporation, Langen Amersham Biosciences, Freiburg
Phastgel-System	Knick, Berlin
pH-Meter	Eco Chemie, Utrecht (NL)
Potentiostat Autolab PGSTAT20	EG&G Princeton Applied Research, Oak Ridge, TN (USA)
Potentiostat Model 273A	Air Liquide, Krefeld
Raumtemperaturadsorber Oxisorb	Miele, Gütersloh
Spülmaschine	Branson, Danbury, CT (USA)
Ultraschallgerät Digital Sonifier	Beckman Instr., München
Ultrazentrifuge	ATI Unicam, Cambridge (UK)
UV/VIS-Spektrometer	Millipore, Bedford, MA (USA)
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q	

4.2 Geräte für die Spektroskopie

EPR-X-Band-Spektrometer ESP380E	Bruker Biospin, Rheinstetten
FTIR-Spektrometer IFS 66v/s	Bruker Optics, Ettlingen
Lufttrocknung KEN30	Zander Aufbereitungstechnik, Essen
MCT Detektor KMPV	Kolmar Technologies, Newburyport, MA (USA)
Nd:YAG-Laser GCR-130	Spectra Physics, Darmstadt
OPO-Laser VISIR 120	GWU Lasertechnik, Erftstadt
optisch transparente Elektrochemie- Dünnschicht-Zelle (OTTLE-Zelle)	David Moss, Freiburg
Thermostat RML6	Lauda, Lauda-Königshofen

4.3 Material

1,1'-Dibenzyl-4,4'-bipyridindichlorid (Benzylviologen, $E'_0 = -313$ mV)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1,2-Naphthochinon ($E'_0 = 175$ mV)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-[N'-cyclohexylamino]ethansulfonsäure (CHES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-[N'-morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar-Agar	Serva, Heidelberg
Aluminiumoxid-Politur (<i>alumina slurry</i>)	Buehler, Lake Bluff, IL (USA)
Anthrachinon-2-sulfonat ($E'_0 = -190$ mV)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antischaum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Biorad DC Protein Assay	BioRad, München
Bromphenolblau	biomol, Hamburg
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaF ₂ -Fenster	Korth Kristalloptik, Kiel
Deuteriumgas 2.7	Air Liquide, Krefeld
Dichlorophenolindophenol ($E'_0 = 268$ mV)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase I	Roche, Mannheim

Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
Indigodisulfonat ($E'_0 = -125$ mV)	Acros, New Jersey (USA)
Indigotrisulfonat ($E'_0 = -35$ mV)	Acros, New Jersey (USA)
Kohlenmonoxidgas 4.7	Air Liquide, Krefeld
Konzentratoren:	
Centricon, Centriprep, Microcon	Millipore, Bedford, MA (USA)
Methylenblau ($E'_0 = 13$ mV)	Acros, New Jersey (USA)
Methylviologen ($E'_0 = -440$ mV)	Acros, New Jersey (USA)
N'-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N'-tris[hydroxymethyl]-methyl-3-aminopropansulfonsäure (TAPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Lactat 60%	Acros, New Jersey, USA
Neutralrot ($E'_0 = -325$ mV)	Merck, Darmstadt
Pepton	Serva, Heidelberg
Phastgele, 10-15% SDS	Amersham Biosciences, Freiburg
PhastGel Blue R (Coomassie Blau)	Amersham Biosciences, Freiburg
Phenazin Methosulfat ($E'_0 = 115$ mV)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenosafranin ($E'_0 = -225$ mV)	Acros, New Jersey (USA)
Polymyxin B Sulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Säulenmaterialien:	
DEAE Toyopearl 650S	Tosoh Bioscience, Stuttgart
Sephacryl S200 HR	Amersham Biosciences, Freiburg
Superdex 75	Amersham Biosciences, Freiburg
Standard Protein Marker:	
Low Molecular Weight Calibration Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
TAPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ultrafiltrationsmembranen YM30	Millipore, Bedford, MA (USA)
Ultrafiltrationszelle	Amicon, Witten
Wasserstoffgas 5.0	Air Liquide, Krefeld

Allgemeine Laborchemikalien werden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

4.4 Puffer

PROBENPUFFER

Tris-Puffer: 25 mM Tris/HCl
pH 7,4

Säulenpuffer A: 25 mM Tris/HCl
pH 7,4 10 mM NaCl

Säulenpuffer B: 1 M NaCl

SDS-GELELEKTROPHORESE

Probenpuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA
 2,5% SDS
 0,01% Bromphenolblau
 5% β -Mercaptoethanol

Färbelösung: 1 Tablette Phastgel Blue R (Coomassie Blau)
Stammlsg. 0,2% 80 ml H₂O
 120 ml Methanol

Für eine 0,1%ige Lösung wird die Stammlösung 1:1 mit 20%iger Essigsäure gemischt.

Entfärber: 10% Essigsäure
 40% Ethanol
 50% H₂O

Konservierer: 10% Glycerin

 REDOXMIX

RX(H ₂ O):	3,06 mg	Phenazin Methosulfat
pH 5,4-8,0	6,17 mg	Indigotrisulfonat
	4,66 mg	Indigodisulfonat (Indigocarmin)
	2,89 mg	Neutralrot
	2,57 mg	Methylviologen
	74,55 mg	KCl

Die wasserlöslichen Redoxmediatoren werden in 19 ml Tris-Puffer gelöst. Der pH-Wert wird auf den erforderlichen Wert eingestellt.

RX(DMSO)	2,90 mg	Dichlorophenolindophenol
	1,58 mg	1,2-Naphthochinon
	3,20 mg	Methylenblau
	3,28 mg	Anthrachinon-2-sulfonat
	3,67 mg	Phenosafranin

Die wasserunlöslichen Redoxmediatoren werden in 1 ml DMSO gelöst. Zur Herstellung eines Milliliters Redoxmix werden RX(H₂O) und RX(DMSO) im Verhältnis 20:1 gemischt. Die Endkonzentration jedes Redoxmediators beträgt 500 μ M und die des KCl 200 mM. Notwendige Verdünnungen werden mit Tris-Puffer des erforderlichen pH-Wertes vorgenommen.

 HYDROGENASE-PUFFERMIX

pH 4,0-9,0	15 mM	Na-Acetat
	15 mM	MES
	15 mM	HEPES
	15 mM	TAPS
	15 mM	CHES
	100 mM	NaCl

Der gewünschte pH-Wert wird mit konzentrierter NaOH oder HCl eingestellt.

4.5 Medien

Medien für *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F

Agarmedium:	3,0 g/l	Na_2SO_4
pH 7,2	1,0 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,5 g/l	KH_2PO_4
	3,0 g/l	Pepton, tryptisch verdaut
	1,0 g/l	Hefeextrakt
	10 ml/l	Na-Lactat (50%ig)
	0,25 g/l	$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
	1 Spatelspitze	Eisenpulver
	10 g/l	Agar-Agar
Flüssigmedium:	4,0 g/l	Na_2SO_4
pH 7,2	0,6 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	0,4 g/l	KH_2PO_4
	3,0 g/l	Pepton, tryptisch verdaut
	0,8 g/l	Hefeextrakt
	10 ml/l	Na-Lactat (50%ig)
	0,01 g/l	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	1 ml/l	Antischaum (10%ig)

5 Gewinnung und Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase

5.1 Anzucht von *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F

5.1.1 Durchführung

Die zellbiologischen Arbeiten an *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F werden ausschließlich in anaerober Umgebung in einem Anaerob-Zelt, der sogenannten *Glove Box*, durchgeführt, in der eine Atmosphäre aus Stickstoff und 2% - 5% Wasserstoff herrscht (Abbildung 5.1). Eventuell eindringender Sauerstoff wird mittels Palladium-Katalysatoren zu Wasser umgesetzt, welches am Katalysator-Material kondensiert. Der Wasserstoff- und Sauerstoff-Gehalt wird mittels eines Analysegerätes (*Oxygen-Hydrogen Gas Analyzer*) ständig kontrolliert.

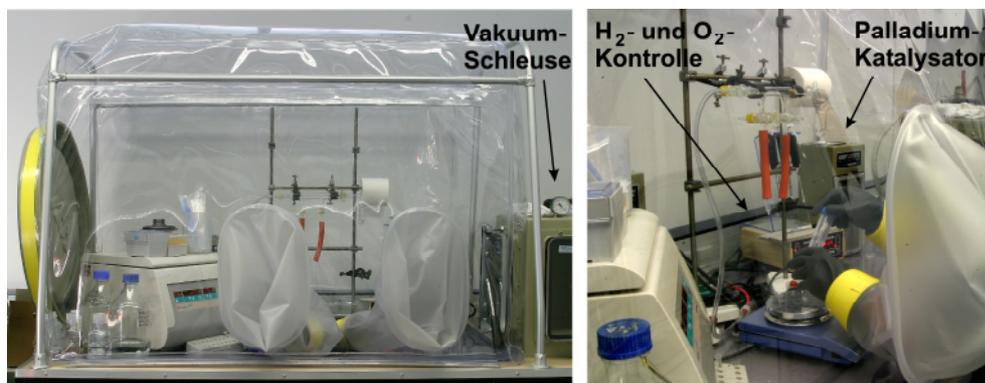


Abbildung 5.1: Gesamtansicht und Innenraum der Glove Box. Über die Vakuumschleuse werden die benötigten Materialien sauerstofffrei in die Glove Box importiert.

Zur Herstellung von 10 ml Agarkulturen werden einige Mikroliter Zellsuspension aus einer Glycerin-Gefrierkultur mit Hilfe einer Impföse in ein 10 ml Glasröhrchen überführt, welches zur Hälfte mit warmem, noch flüssigem Agarmedium (vgl. Kapitel 4.5) gefüllt ist. Anschließend wird das Röhrchen vollständig mit Agarmedium gefüllt und verschlossen. Diese Agarkulturen werden in einer Kul-

turbox unter Ar-Atmosphäre bei 310 K für drei Tage kultiviert. Werden die Agarkulturen nicht sofort weiterverwendet, können sie bei 277 K für maximal 8 Wochen gelagert werden.

Nach der dreitägigen Wachstumsphase wird ein Drittel einer solchen Agarkultur in kleinen Portionen in eine 50 ml Glasflasche gefüllt. Die Glasflasche wird bis zum Flaschenrand mit Flüssigmedium (vgl. Kapitel 4.5) gefüllt und mit einem Septendeckel luftdicht verschlossen. Sie wird bei 310 K drei Tage kultiviert.

Die herangewachsenen 50 ml Kulturen werden als Inokulum von 1 l Kulturen genutzt. Hierzu wird der Inhalt einer 50 ml Kultur in eine 500 ml Glasflasche überführt, welche anschließend wiederum bis zum Flaschenrand mit Flüssigmedium aufgefüllt wird. Aliquots der 50 ml Kulturen werden desweiteren dazu verwendet, Gefrierkulturen herzustellen. Ein Aliquot wird in einem Reaktionsgefäß mit sterilem Glycerin im Verhältnis 1:2 gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gefrierkulturen werden bei 193 K gelagert. Abbildung 5.2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Vorkulturen.



Abbildung 5.2: Vorkulturen von *D. vulgaris*. Links: 10 ml Agarkultur nach drei Tagen Wachstum bei 310 K in einer Ar-Atmosphäre. Mitte: 50 ml Vorkulturen nach eintägigem Wachstum bei 310 K. Rechts: 500 ml Vorkultur nach dreitägigem Wachstum bei 310 K.

Zwei 500 ml Kulturen (oder eine 1 l Kultur) werden nach der dreitägigen Kultivierung bei 310 K zur Vermehrung der Vorkulturen auf fünf 1 l Medienansätze verteilt, die wiederum drei Tage bei 310 K inkubiert und anschließend als Inokulum des 50 l Fermenters (Abbildung 5.3) benutzt werden.

Zur Kultivierung der Zellen im 50 l Fermenter werden die Bestandteile von 40 l Flüssigmedium abgewogen und in den Fermenter gegeben. Sie werden in 43 l

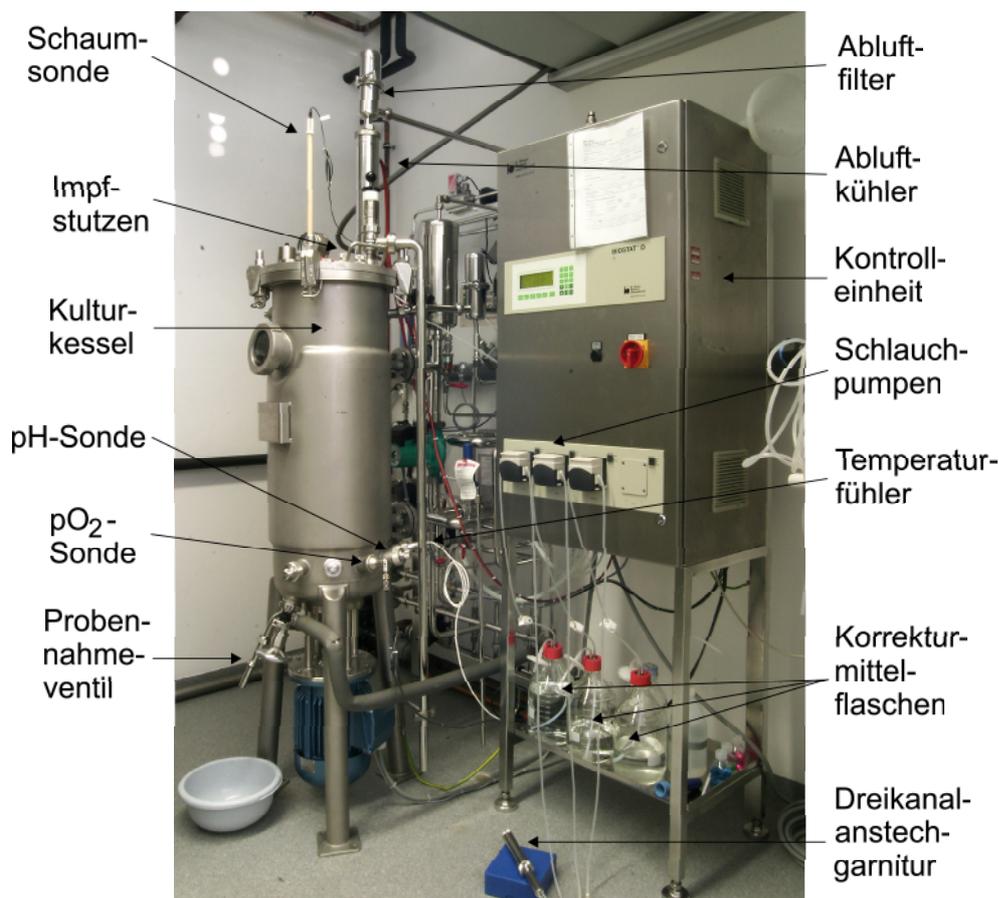


Abbildung 5.3: Frontalansicht des Fermenters Biostat DL50

Wasser gelöst und 30 min bei 394 K und 2 bar autoklaviert. Eine Stunde vor dem Animpfen wird durch Begasen mit Stickstoff eine anaerobe Atmosphäre im Fermenter hergestellt. Nach der Zugabe von 5 ml 10%igem Antischaum wird das Medium im Fermenter mit fünf 1 l Vorkultur angeimpft. Während der zweitägigen Wachstumsphase wird der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von 2 M H₂SO₄ zwischen den Werten 7,0 und 7,4 gehalten. In dieser Zeit wird darüber hinaus die durch die Bakterien verbrauchte Kohlenstoffquelle Lactat in regelmäßigen Abständen durch Zugabe von jeweils 100 ml 50%igem Na-Lactat nachgefüllt.

5.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Anzucht von *D. vulgaris* Miyazaki F erfolgte in einem Bioreaktor von 50 l Fassungsvermögen (50 l Fermenter, Abbildung 5.3). Über die Impfstutzen

wurde das Medium in den Kulturkessel gefüllt und dort autoklaviert. Um ein anaerobes Medium zu gewährleisten, wurde es nach dem Autoklaviervorgang für die gesamte Kultivierungsdauer mit Stickstoff begast.

Vernachlässigt man den durch den Autoklaviervorgang bedingten Wasserverlust, der zu einer Änderung der Konzentration der einzelnen Medienkomponenten führt, hat dies einen negativen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien. Daher wurde dem Medienansatz zusätzlich 3 l Wasser hinzugefügt [15]. Als Inokulum des Fermenters wurden fünf 1 l Vorkulturen verwendet, die sich am Ende ihrer logarithmischen Wachstumsphase befanden (s. Abbildung 5.4).

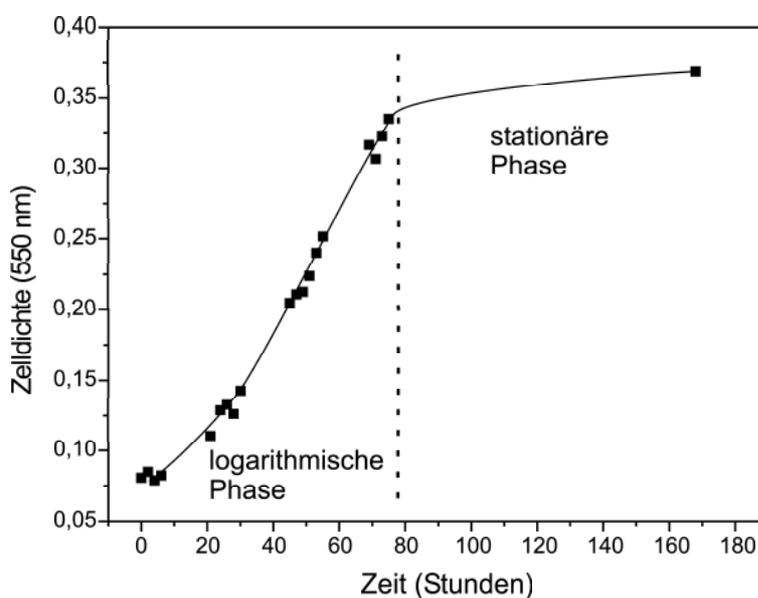


Abbildung 5.4: Wachstumskurve einer 1 l Vorkultur von *D. vulgaris* Miyazaki F. Die Zelldichte wurde durch die Messung der Streuung bei 550 nm verfolgt, die durch die Bakterienzellen verursacht wird. Die Vorkultur wird nach einer Wachstumszeit von drei Tagen als Inokulum des Fermenters verwendet. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Zellen am Ende ihrer logarithmischen Wachstumsphase.

Während des Wachstums der Zellen im Fermenter wurden die Parameter Schaumanteil, pH-Wert, O₂-Gehalt und Temperatur ständig kontrolliert. Die Steuereinheit des Fermenters erlaubte zum einen das Ablesen der gemessenen Parameter, zum anderen die automatische Anpassung einiger Parameter. So wurde der pH-Wert zwischen den Werten von 7,0 und 7,4 gehalten. Dies geschah über die automatische Zufuhr von 2 M H₂SO₄ aus einer der drei Korrekturmittelflaschen über die Dreikanalanstechgarnitur, die mit dem Kulturkessel über einen der Impfstutzen verbunden ist, sobald die pH-Sonde einen pH-Wert größer als

7,2 registrierte. Bei Feststellung erhöhter Schaumkonzentration ist die automatische Zugabe von Antischaum über eine weitere Korrekturmittelflasche möglich. Die dritte Korrekturmittelflasche enthielt 50%iges Natrium-Lactat, mit dem die Bakterienzellen in regelmäßigen Abständen „gefüttert“ wurden. Durch Stoffwechselprozesse entstehendes H₂S verließ den Kulturkessel über den Abluftfilter.

Die Korrelation der Fütterungshäufigkeit und -zeitpunkte mit der Zellmasse und der Hydrogenasemenge erlaubte die Optimierung der Fütterung auf eine maximale Hydrogenase-Ausbeute. Trotz der dauerhaften Stickstoffbegasung konnte in einem Zeitraum zwischen 17 und 27 Stunden nach dem Animpfen ein Anstieg des Sauerstoffgehaltes in der Kultur aufgrund der Stoffwechseltätigkeit der Bakterien beobachtet werden. Die erste Fütterung mit 100 ml Natrium-Lactat hat zu dem Zeitpunkt zu erfolgen, bei dem der Sauerstoffgehalt gerade über 0% ansteigt. Danach wurden vier bis fünf Mal jeweils 100 ml Natrium-Lactat in einem Abstand von 2,5 Stunden hinzugegeben. Erreichte der Sauerstoffgehalt sein Maximum von $20 \pm 2\%$, wurde die Fütterung eingestellt. In den folgenden Stunden sank er wieder auf 0%. In der Zeit abnehmenden Sauerstoffgehaltes und vor allem dann, wenn kein Sauerstoff mehr vorhanden ist, ist die Zugabe von Natrium-Lactat für die Zellen letal. Die Einhaltung dieses Fütterungsprotokolls resultierte in einer maximalen Zellmenge mit einer maximalen Hydrogenaseausbeute. Nach zweitägigem Wachstum (ca. 44 Stunden) wurden die Zellen durch Zentrifugation vom flüssigen Medium abgetrennt, wozu die Zentrifugationsgefäße über das Probenentnahmeventil gefüllt wurden. Als weiteres Kriterium einer hohen Hydrogenasemenge dient die Farbe des Zellsediments. Ein grau-braunes Zellsediment impliziert eine große Menge an Hydrogenase, während eine grau-schwarze Färbung erkennen läßt, daß die Zellen sich zwar vermehrt haben, die Hydrogenasemenge jedoch minimal ist.

5.2 Isolierung und Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase

5.2.1 Durchführung

Die einzelnen Schritte der Isolierung und Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase sind im Flußdiagramm 5.5 aufgeführt und werden in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

5 Gewinnung und Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase

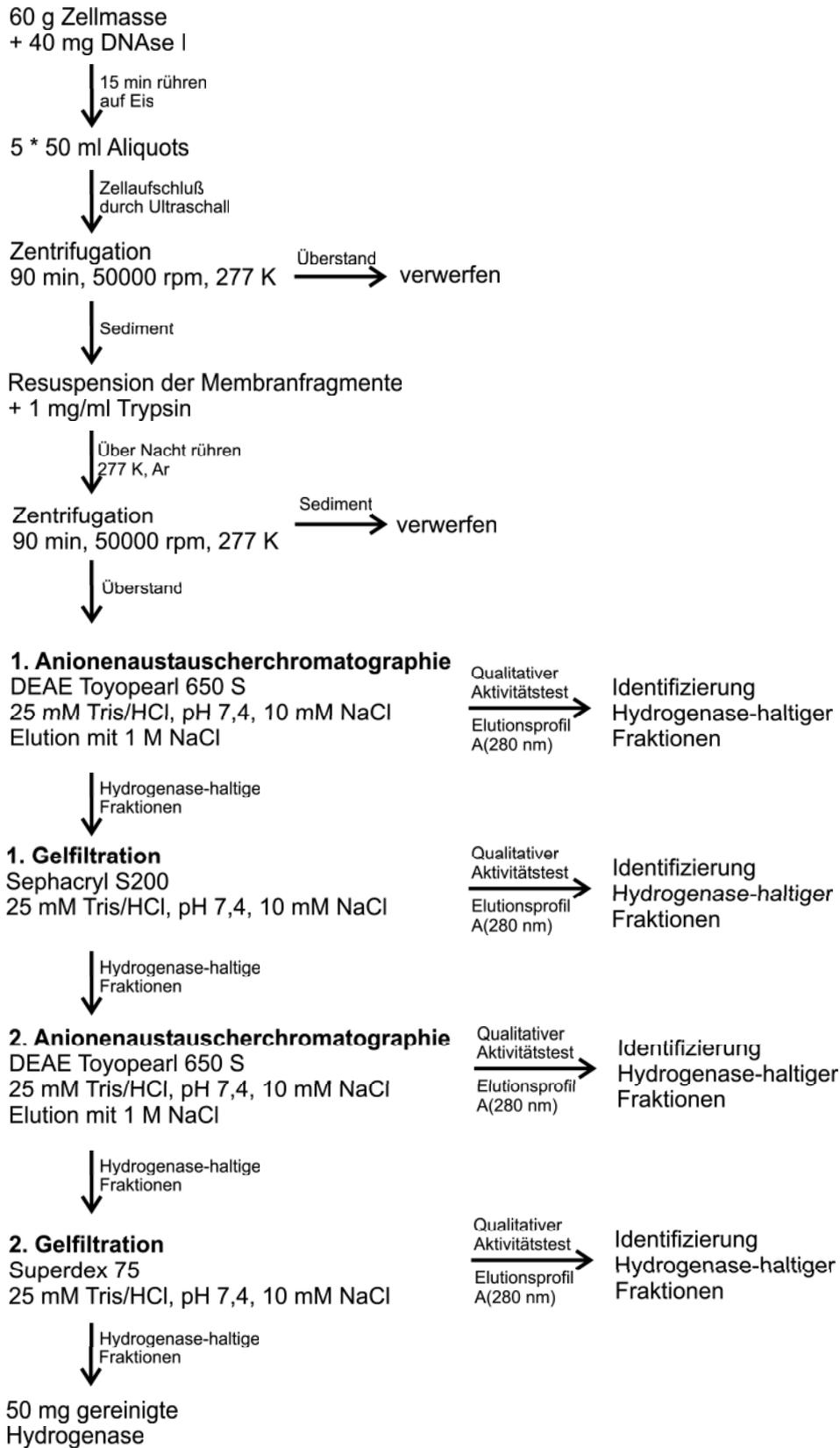


Abbildung 5.5: Flußdiagramm der Isolierung und Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase aus dem Bakterium *D. vulgaris* Miyazaki F.

5.2.1.1 Zellernte

Die Bakterien werden 30 min bei 6500 rpm ($10543 \cdot g$) und 277 K abzentrifugiert (Rotor JLA-8.1000, Beckman). Das Zellpellet wird bei 193 K eingefroren und gelagert. Die Ausbeute von 45 l Flüssigkultur betrug durchschnittlich 100 g nasses Zellmaterial.

5.2.1.2 Zellaufschluß

50 - 60 g Zellmaterial werden aufgetaut und in eiskaltem Tris-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,0) resuspendiert (Verhältnis 1 g Zellmaterial : 2 ml Puffer). Anschließend werden sie erneut abzentrifugiert (30 min, 10000 rpm ($12096 \cdot g$), 277 K, Rotor JA 25.50, Beckman). Das Zellsediment wird nun in 200 ml eiskaltem Tris-Puffer aufgenommen, dem 40 mg DNase I zugesetzt wurde, das zum einen einer partiellen Zellwandlyse und zum anderen der Zerkleinerung der DNA diene. Die Suspension wird 15 min auf Eis gerührt und anschließend in 50 ml Portionen in 100 ml Bechergläser aliquotiert. Die Zellen eines jeden Aliquots werden durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen (Branson Digital Sonifier, Programm 10: Dauer eines Intervalls: 5 min, Dauer eines Ultraschallpulses: 2,5 s, Gesamtpulszeit: 1 min, 70% Output, Makro-Tip). Jedes Aliquot wird hierzu drei Mal einem Ultraschallbehandlungszyklus unterzogen. Während der Ultraschallbehandlung werden die Zellen auf Eis gekühlt, so daß die Temperatur 288 K nicht überschreitet, und danach abzentrifugiert (90 min, 50000 rpm ($183960 \cdot g$), 277 K, Rotor Ti 60, Beckman), um die löslichen Zellbestandteile von den Membranfragmenten zu trennen. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wird verworfen, da die Hydrogenase über einen Membrananker an der Cytoplasma-Membran gebunden ist.

5.2.1.3 Trypsin-Behandlung der Membranfragmente

Das membranhaltige Sediment des Ultrazentrifugationsschrittes wird in eiskaltem Tris-Puffer resuspendiert (Verhältnis 1 g Pellet : 4 ml Puffer) und 1 mg/ml Trypsin hinzugegeben. Das Trypsin schneidet zwischen den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin und trennt im Falle der [NiFe]-Hydrogenase den 19 Aminosäuren langen Membrananker vom Rest des nun löslichen Proteins. Die Suspension wird in einer Glasflasche mit Septendeckel über Nacht bei 277 K in einer Ar-Atmosphäre gerührt und schließlich zur Entfernung der Membranfragmente zentrifugiert (90 min, 50000 rpm ($183960 \cdot g$), 277 K, Rotor Ti 60,

Beckman). Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes enthält nun die lösliche [NiFe]-Hydrogenase.

5.2.1.4 Säulenchromatographische Reinigung

Die chromatographischen Reinigungsschritte erfolgen bei 277 K und werden mit Hilfe des FPLC-Systems Äkta basic (Amersham Biosciences) durchgeführt. Abwechselnd werden zwei Schritte nach dem Prinzip der Anionenaustauschchromatographie und zwei Gelfiltrationsschritte vorgenommen. Die Anionenaustauschchromatographie beruht auf der ionischen Wechselwirkung des Proteins mit dem Säulenmaterial, wobei unterschiedliche Proteine eine unterschiedliche Affinität zu diesem Material aufweisen. Bei einer charakteristischen Konzentration von NaCl dissoziiert das Protein vom Säulenmaterial, da die Affinität des Salzes höher ist als die des Proteins, so daß das Salz das Protein verdrängt. Die Gelfiltration basiert hingegen auf der Wanderung des Proteins durch die Matrix des Säulenmaterials, die je nach Proteingröße unterschiedlich schnell erfolgt. Je kleiner das Protein ist, desto länger ist der Weg, den es durch die Säulenmaterialmatrix zurücklegt und desto länger dauert die Elution.

Erste Anionenaustauschchromatographie

Zu Beginn dieses chromatographischen Schrittes wird die Säule (XK50/20, Durchmesser: 50 mm, Höhe: 20 cm; Säulenvolumen: 330 ml; Säulenmaterial: DEAE Toyopearl 650S) mit einem Säulenvolumen Säulenpuffer A (25 mM Tris/HCl, pH 7,4, 10 mM NaCl) äquilibriert (Durchflußgeschwindigkeit 5 ml/min), um so optimale Bindungsbedingungen für das gewünschte Protein zu schaffen, bevor der Überstand des letzten Ultrazentrifugationsschrittes (vgl. Kapitel 5.2.1.3) aufgetragen wird (Auftragsgeschwindigkeit 2 ml/min). Nachdem ungebundene Proteine und Pigmente durch Waschen mit Säulenpuffer A entfernt wurden, werden die an das Säulenmaterial gebundenen Proteine mittels eines linearen Salzgradienten von 0 - 200 mM NaCl eluiert. Hierzu werden Säulenpuffer A und Säulenpuffer B (1 M NaCl) automatisch in einem entsprechenden Verhältnis gemischt, um die gewünschte Salzkonzentration zu erhalten. Die [NiFe]-Hydrogenase wird bei einer Konzentration von ca. 100 mM NaCl abgetrennt. Der Gradient besitzt eine Länge von zwei Säulenvolumen mit Fraktionsgrößen von 12 ml. Die bei diesen Salzkonzentrationen noch auf der Säule verbleibenden Proteine werden durch Erhöhung des Gradienten auf

1 M NaCl entfernt. Nach Abschluß der Elution wird die Säule mit Säulenpuffer A reäquilibriert. Die hydrogenasehaltigen Fraktionen, die mittels des qualitativen Aktivitätstests identifiziert wurden (s. Kapitel 5.3.1), werden mittels einer Ultrafiltrationszelle (30 kDa Ausschlussmembran YM 30) auf ein Volumen von ca. 20 ml einkonzentriert.

Erste Gelfiltration

Die Gelfiltrationssäule (XK26/100, Durchmesser: 26 mm, Höhe: 100 cm; Säulenvolumen: 480 ml; Säulenmaterial: Sephacryl S200) wird mit Säulenpuffer A äquilibriert und die vereinigten und einkonzentrierten Fraktionen der ersten Anionenaustauschchromatographie aufgetragen. Abhängig von ihrer Größe wandern die Proteine getrieben vom Pufferdurchfluß (2 ml/min) durch die vom Säulenmaterial gebildete Matrix. So wird eine weitere Abtrennung der Hydrogenase von den Proteinen erreicht, die ebenfalls bei 100 mM NaCl von der ersten Säule eluierten. Die Elutionslänge beträgt zwei Säulenvolumen mit einer Fraktionsgröße von 10 ml.

Zweite Anionenaustauschchromatographie

Auch bei diesem Schritt wird die Säule (XK26/20, Durchmesser: 26 mm, Höhe: 20 cm; Säulenvolumen: 74 ml; Säulenmaterial: DEAE Toyopearl 650S) zunächst mit Säulenpuffer A äquilibriert und anschließend die Fraktionen der ersten Gelfiltration aufgetragen. Die Elution erfolgt über einen linearen Gradienten von 0 - 225 mM NaCl bei einer Länge von zwei Säulenvolumina mit einer Fraktionsgröße von 4 ml. Die [NiFe]-Hydrogenase eluiert bei ca. 150 mM NaCl. Hydrogenasehaltige Fraktionen werden vereint und auf 20 ml einkonzentriert.

Zweite Gelfiltration

Zur Entfernung des Salzes wird die Hydrogenase-Lösung aus der zweiten Anionenaustauschchromatographie erneut über eine Gelfiltrationssäule gegeben (XK26/60, Durchmesser: 26 mm, Höhe: 60 cm; Säulenvolumen: 318 ml; Säulenmaterial: Superdex 75). Die Elution erfolgt über ein Säulenvolumen mit einer Fraktionsgröße von 4 ml. Die hydrogenasehaltigen Fraktionen werden vereint und mittels Ultrafiltrationseinheiten auf ca. 500 μ l einkonzentriert.

5.2.1.5 Kontrolle der Reinheit

UV/VIS-Spektroskopie

Die Reinheit der Hydrogenase in den einkonzentrierten Fraktionen der letzten Gelfiltrationssäule wird durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich bestimmt. Hierzu wird eine Verdünnung von 1:100 oder 1:200 angefertigt, die gegen den zur Verdünnung verwendeten Puffer als Referenz im Bereich 250 - 800 nm gemessen wird. Die Absorptionmaxima bei 280 nm und 400 nm werden ermittelt. Der Quotient $Q = \frac{A_{400\text{ nm}}}{A_{280\text{ nm}}}$ bestimmt den Anteil der Hydrogenase am Gesamtproteingehalt in der Probe, die aufgrund der [FeS]-Cluster bei 400 nm spezifisch absorbiert. Ein Wert von $Q = 0,29$ impliziert hierbei einen Hydrogenaseanteil des Gesamtproteins von mehr als 97% [25].

Über die Absorption bei 400 nm und den Extinktionskoeffizienten der Hydrogenase bei 400 nm läßt sich mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes

$$\log \frac{I_0}{I} = A = c \cdot \epsilon \cdot d$$

(mit I_0 = eingestrahlte Intensität, I = Intensität nach Durchgang durch die Probe, A = Absorption, c = Konzentration, ϵ = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke der Küvette) die Konzentration der Probe errechnen. Der Extinktionskoeffizient der Hydrogenase beträgt $\epsilon_{400\text{ nm}} = 47000 \text{ (M} \cdot \text{cm)}^{-1}$.

SDS-Gelelektrophorese

Um die Qualität der Proteinreinigung zu überprüfen, werden während des Reinigungsprozesses Aliquots des Probenmaterials gesammelt, die in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert werden. Hierzu werden 14 μl Probe mit 8 μl Puffer (vgl. Kapitel 4.4) vermischt und 5 min bei 368 K im Wasserbad gekocht. 2 μl der so denaturierten Proben werden auf das Gel (Gradientengel 10-15% SDS) aufgetragen. Zur Abschätzung der Proteingrößen wird der Standard-Marker „Low Molecular Weight“ aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgt in der PhastGel Apparatur bei einer Spannung von 250 V und einem Strom von 10 mA. Nach Ablauf der Trennung wird das Gel 5 min im Entfärber (vgl. Kapitel 4.4) fixiert und anschließend 40 min in der Färbelösung (vgl. Kapitel 4.4) gefärbt. Im folgenden 40 minütigen Entfärbeschritt werden die proteinfreien Bereiche wieder entfärbt, so daß die Proteine als blaue Banden im Gel sichtbar werden. Das ausreichend entfärbte Gel wird für 10 min kon-

serviert (Konservierer, vgl. Kapitel 4.4) und über Nacht bei 310 K getrocknet. Danach kann es zur dauerhaften Aufbewahrung laminiert werden.

5.2.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kolorimetrischer Assay verwendet (BioRad DC Protein Assay), dem die Proteinbestimmungsmethode nach Lowry [78] zugrunde liegt. Diese Methode basiert auf der Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und dem Folin-Reagenz. Bei dieser Reaktion entsteht ein farbiger Komplex, der eine Absorption bei 750 nm aufweist.

Zunächst werden die Datenpunkte zur Erstellung einer Eichgerade aufgenommen, wozu Proben bekannter Konzentrationen von Rinderserumalbumin (Standardproben) mit der Kupfer-Tartrat-Lösung und dem Folin-Reagenz gemischt werden. Nach einer Reaktionszeit von 15 min wird die Absorption bei 750 nm gegen eine Referenz (Ansatz ohne Protein) gemessen und gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Hieraus ergibt sich eine Eichgerade. Zur Verkleinerung des Fehlers dieser Eichgerade wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Von der Probe unbekannter Proteinkonzentration werden geeignete Verdünnungen (z.B. 1:100 und 1:200) angefertigt und genauso behandelt wie die Standardproben. Über die Eichgerade kann von der Absorption bei 750 nm auf die Gesamtproteinkonzentration der Probe geschlossen werden.

5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die in Kapitel 5.2 beschriebenen Schritte zur Isolierung der Hydrogenase sind im wesentlichen den Veröffentlichungen von Yagi *et al.* [124] und Higuchi *et al.* [59] entnommen. Um die Hydrogenasemenge zu maximieren und die notwendige Präparationsdauer zu minimieren, wurden Abweichungen von den dort beschriebenen Vorgehensweisen vorgenommen. Sie betreffen die Auswahl der Säulenmaterialien und die Anzahl der säulenchromatographischen Schritte.

Während der säulenchromatographischen Aufreinigung wurden die hydrogenasehaltigen Fraktionen eines Säulenlaufs mit Hilfe des qualitativen Aktivitätstests (s. Kapitel 5.3.1) identifiziert und dem Absorptionsmaximum bei 280 nm des Elutionsprofils zugeordnet. Die Elutionsprofile der vier säulenchromatographischen Schritte sind in Abbildung 5.6 dargestellt, aus denen die zunehmende Reinheit des Extraktes durch die Abnahme der Anzahl der Absorptionsma-

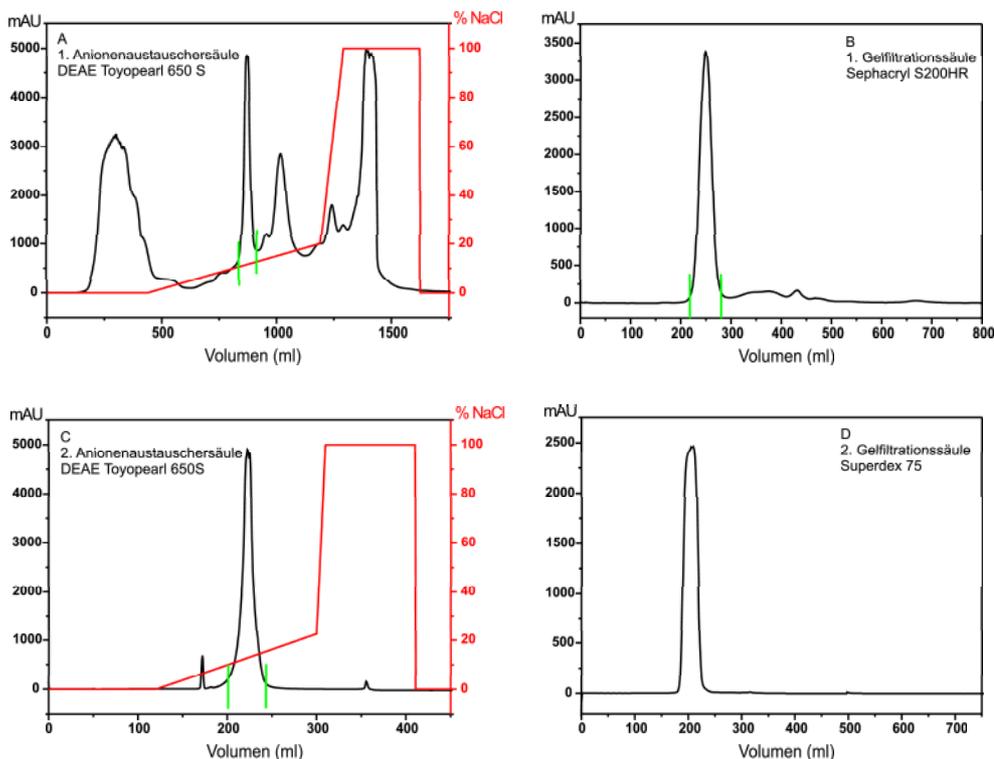


Abbildung 5.6: Elutionsprofile der vier Chromatographie-Säulen zur Isolierung der Hydrogenase. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm, die vom FPLC-System aufgenommen wird (schwarze Linie) sowie die Salzkonzentration (rote Linie), die beim Durchlauf eines linearen Gradienten erreicht wird. Der hydrogenasehaltige Peak ist durch grüne Markierungen gekennzeichnet. Die Fraktionen innerhalb dieser Begrenzungen wurden jeweils auf die folgende Säule aufgegeben.

xima hervorgeht. Nach dem letzten Säulenlauf wurden die hydrogenasehaltigen Fraktionen aufkonzentriert und die Proteinkonzentration mittels des kolorimetrischen Assays nach Lowry [78] bestimmt (vgl. Kapitel 5.2.1.6). Zur Überprüfung der Reinheit der Präparation wurde ein UV/VIS-Spektrum (vgl. Kapitel 5.2.1.5 und Abbildung 5.8) und ein SDS-Gel angefertigt (vgl. Kapitel 5.2.1.5 und Abbildung 5.7). Der kritische Schritt des gesamten Reinigungsprozesses ist die Trypsin-Behandlung der Membranfragmente. Erfolgt diese unvollständig, verbleibt ein Teil der Hydrogenasemoleküle in der Membranfraktion, die nach dem letzten Ultrafiltrationsschritt verworfen wird. Diese sedimentierte Membranfraktion wurde deshalb stichprobenartig einer weiteren Trypsin-Behandlung unter den in Kapitel 5.2.1.3 aufgeführten Bedingungen unterzogen. In den sich anschließenden säulenchromatographischen Aufreinigungsschritten

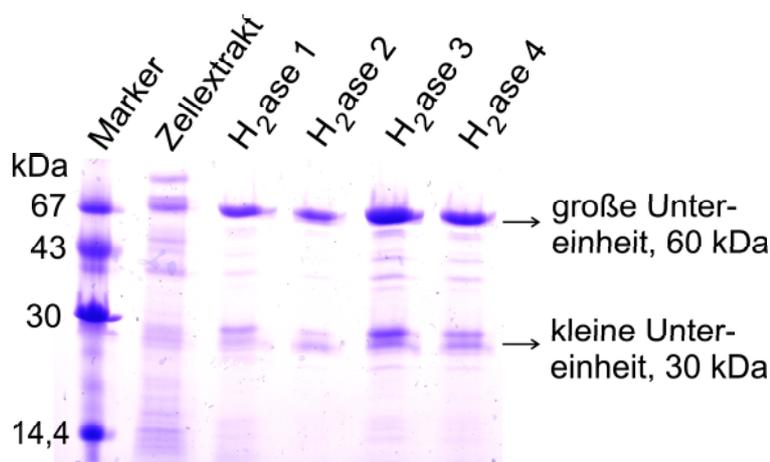


Abbildung 5.7: SDS-Gel der chromatographischen Reinigungsschritte. Hierbei wurden Aliquots der hydrogenasehaltigen Fraktionen eines jeden Säulenlaufs aufgetragen. H₂ase x (x = 1, 2, 3, 4) entspricht somit den hydrogenasehaltigen Fraktionen nach dem x-ten säulenchromatographischen Schritt. Die Banden schwacher Intensität zwischen denen der großen und kleinen Untereinheit stammen von Hydrogenase-Fragmenten, die zu einem geringen Anteil während des Trypsin-Abbaus entstehen. Sie stören jedoch weder spektroskopische und elektrochemische Messungen noch Kristallisationsexperimente [93]. Bei dem Erscheinen der kleinen Untereinheit als Doppelbande handelt es sich um ein Artefakt des Gellaufs.

zeigte sich allerdings, daß diese Fraktion keine [NiFe]-Hydrogenase mehr enthielt. Demnach reicht eine einmalige Trypsinbehandlung aus, um das Protein vollständig aus der Membran zu isolieren.

Aus dem UV/VIS-Spektrum ließen sich die Absorptionen bei 400 nm und 280 nm ablesen. Sie betrug bei 280 nm 1,62 Absorptionseinheiten und bei 400 nm 0,48 Absorptionseinheiten. Aus dem Quotienten $Q = \frac{A_{400 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}}} = \frac{0,48}{1,62} = 0,30$ ergab sich ein Reinheitsgrad von $97 \pm 2\%$ [25]. Eine Abschätzung der Hydrogenase-Konzentration ist unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes möglich (vgl. Kapitel 5.2.1.5). Im dargestellten Beispiel betrug die Konzentration 2 mM. Das aufgereinigte Protein wurde bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Isolierung der [NiFe]-Hydrogenase wurden jeweils 50-60 g Zellmaterial aufgearbeitet, da bei einer größeren Zellmenge die Proteinaufnahmekapazität der vorhandenen Säulen überschritten wurde. Auf eine Hochskalierung des Reinigungsprozesses durch die Verwendung größerer Säulen wurde aus ökonomischen Gründen verzichtet, da die Anschaffung des hierzu benötigten Materials und die notwendige Zeit zur Etablierung des hochskalierten Prozes-

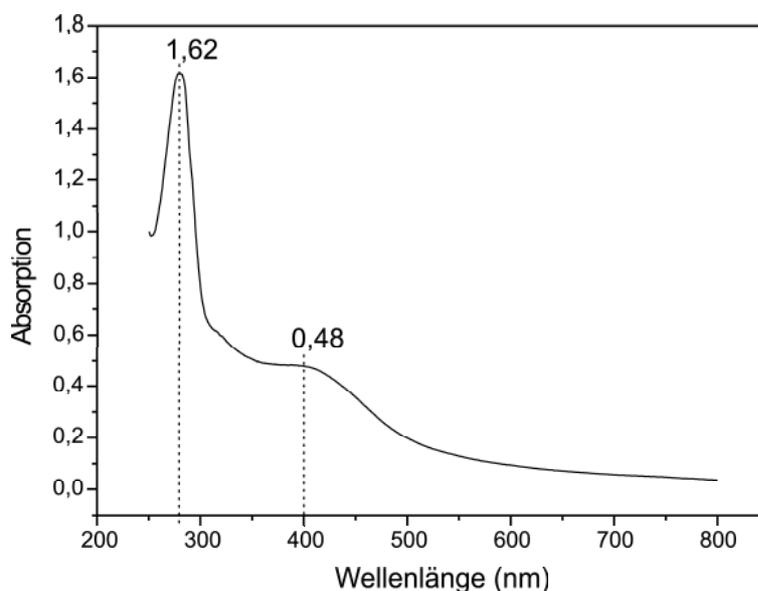


Abbildung 5.8: UV/VIS-Spektrum der [NiFe]-Hydrogenase. Gemessen wurde eine 1:200-Verdünnung der vereinten und einkonzentrierten Fraktionen der letzten Gelfiltrationssäule.

ses nicht im Verhältnis zu dessen Gewinn stehen. Die Hydrogenase-Menge, die man aus 60 g Zellen gewinnt, reicht aus, um damit ca. fünf hochkonzentrierte (ca. 1 mM) Proben für die EPR-Spektroskopie herzustellen, die die Technik mit dem höchsten Materialverbrauch ist.

5.3 Katalytische Aktivität der [NiFe]-Hydrogenase

Die spezifische Aktivität der Hydrogenase, die Umsetzung von molekularem Wasserstoff zu Protonen und Elektronen, bzw. die Produktion von Wasserstoff, wird genutzt, um zum einen während der Aufreinigung diejenigen Fraktionen eines Säulenlaufs zu identifizieren, die die Hydrogenase enthalten (Kapitel 5.3.1), und zum anderen, um die Aktivität der Hydrogenase in *Units* zu bestimmen (Kapitel 5.3.2). Eine Unit entspricht dabei der Produktion oder dem Verbrauch von einem $\mu\text{mol H}_2$ pro min und mg Protein; $1\text{U} = 1 \frac{\mu\text{mol H}_2}{\text{mg}\cdot\text{min}}$.

Die katalytische Aktivität der [NiFe]-Hydrogenase wurde sowohl durch Messung der Wasserstoffproduktion und -aufnahme (s. Kapitel 5.3.2.1) sowie durch Messung des H/D-Austausches (s. Kapitel 5.3.2.2) bestimmt. Die Reaktionsrichtung der Hydrogenase wird dadurch beeinflusst, daß im Reaktionsansatz vor

der Zugabe des Enzyms im Falle der Wasserstoffproduktion kein Wasserstoff vorlag, während im Falle der Wasserstoffaufnahme die Lösung mit Wasserstoff gesättigt wurde.

5.3.1 Qualitativer Test

Für diesen Test wird ein Aliquot der zu untersuchenden Probe in Tris-Puffer verdünnt, dem 3 mM Methylviologen zugesetzt wurden (100 μ l Probe in 1 ml Puffer). Der Ansatz wird in ein Injektionsgefäß gefüllt, das mit einem durch einen Aluminiumdeckel gehaltenen Gummistopfen luftdicht verschlossen ist. Bei 310 K wird die Probe mit Wasserstoffgas gesättigt; nach ca. 5 - 10 min zeigt sich eine Blaufärbung, wenn die Probe Hydrogenase enthält. Die Hydrogenase oxidiert den Wasserstoff zu Protonen und Elektronen, und die Elektronen reduzieren ihrerseits das Methylviologen, welches im oxidierten Zustand farblos und im reduzierten Zustand blau gefärbt ist. Da dieser Test innerhalb weniger Minuten zeigt, ob eine Probe Hydrogenase enthält oder nicht, wird er zur Identifizierung hydrogenasehaltiger Fraktionen der säulenchromatographischen Reinigungsschritte angewendet.

5.3.2 Quantitative Tests

5.3.2.1 Amperometrische Bestimmung

Meßaufbau

Der amperometrische Test beruht auf der Bestimmung von Wasserstoff an einer sogenannten Clark-Elektrode (vgl. Abbildung 5.9). Diese dient ursprünglich zur

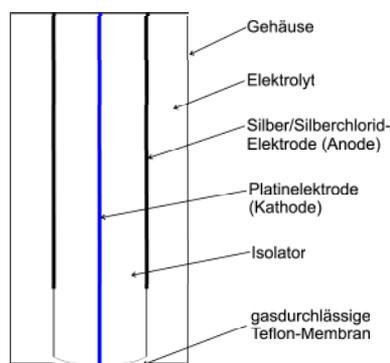


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Clark-Elektrode. Zwischen der Anode und der Kathode wird eine Polarisationsspannung von 600 mV angelegt.

Messung von Sauerstoff und besteht aus einer Platin- und einer Silber/Silberchlorid-Elektrode. Die Elektroden sind vom Reaktionsraum durch eine Teflonmembran getrennt, die undurchlässig für Wasser und Ionen ist, jedoch durchlässig für O₂, H₂ und CO. Bei Umkehrung der Polarität der Spannung und Polarisierung der Platin-Elektrode bei 0,6 V im Vergleich zur Silber/Silberchlorid-Elektrode finden an den Elektroden folgende Reaktionen statt:

1. Platinelektrode: $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$
2. Silber/Silberchlorid-Elektrode: $AgCl(s) \rightarrow Ag^+ + Cl^-$

Die Elektrode befindet sich am Boden eines Reaktionsgefäßes, in das ein Volumen von maximal 4 ml eingefüllt werden kann. Es ist zur Temperierung von einem Wassermantel umgeben und befindet sich auf einem Magnetrührer, so daß ein in der Reaktionslösung befindlicher teflonummantelter Magnet (Rührfisch) für eine optimale Durchmischung sorgen kann.

Durchführung

Zur **Vorbereitung der Elektrode** wird diese zunächst mit einer Ammoniak-Lösung (25% NH₃ + H₂O 1:1) abgespült. Die Elektrode wird in gesättigte KCl-Lösung mit 10 mM HCl gebracht und einige Minuten im Sauerstoff-Modus betrieben. Danach wird sie mit Wasser abgespült und vorsichtig getrocknet. Auf die Platinelektrode wird ein Tropfen gesättigte AgCl-Lösung (3 M KCl gesättigt mit AgCl) aufgebracht und die Teflonmembran mit Hilfe des Applikators aufgespannt. Nun wird sie für einige Zeit im Wasserstoff-Modus betrieben, wobei sich auf der Silber/Silberchlorid-Elektrode Silberchlorid ablagert.

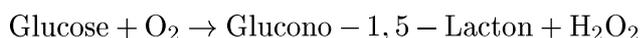
Die **Kalibrierung der Elektrode** erfolgt mit Hilfe von H₂-gesättigtem Wasser, dessen stabiles Spannungssignal das Maß für die eingesetzte Wasserstoffkonzentration ist. Eine zu 100% gesättigte wässrige Lösung enthält bei 298 K 780 μM und bei 303 K 750 μM Wasserstoff.

Um die **Wasserstoffproduktion** der Hydrogenase zu bestimmen, werden folgende Lösungen mit Hilfe von gasdichten Spritzen in den Reaktionsraum pipetiert:

- 1,7 ml Tris-Puffer, gesättigt mit Ar
- 12 μl Methylviologen (100 mM)
- 150 μl Glucose (1 M)

- 30 μl Glucose-Oxidase (30 mg/ml)

Der Reaktionsraum wird verschlossen, so daß kein weiterer Sauerstoff mehr eindringen kann. Der restliche noch vorhandene Sauerstoff wird durch die Glucose-Oxidase verbraucht, die die folgende Reaktion katalysiert:



Nun wird dem Reaktionsansatz 100 μl 1 M Dithionit (frisch angesetzt, Stammlösung gesättigt mit Ar) zugegeben. Die Lösung im Reaktionsraum färbt sich blau, da das Dithionit das Methylviologen reduziert. Dieses kann die Elektronen anschließend an die Hydrogenase abgeben, die sie benötigt, um Protonen zu reduzieren. Anschließend folgt die Zugabe der Hydrogenase, und die Wasserstoff-Entstehung gemessen als Spannungszunahme wird mit Hilfe eines x,y-Flachbrett-Schreibers aufgenommen.

Zur Bestimmung der **Wasserstoffaufnahme**-Aktivität werden folgende Lösungen in den Reaktionsraum pipettiert:

- 1,7 ml Tris-Puffer mit 2,2 M KCl, gesättigt mit Ar
- 12 μl Benzylviologen (100 mM)
- 150 μl Glucose (1 M)
- 30 μl Glucose-Oxidase (30 mg/ml)

Vor der Zugabe der Glucose-Oxidase wird die Lösung mit Wasserstoff angereichert. Dies geschieht entweder durch Sättigung des Puffers mit Wasserstoff im Reaktionsraum mittels Begasung oder durch Zugabe eines Aliquots (100 μl) Wasserstoff-gesättigten Puffers. Die zugegebene Wasserstoffmenge muß bei der Berechnung der Aktivität berücksichtigt werden. Nach Zugabe der Glucose-Oxidase wird die Einstellung eines stabilen Potentials abgewartet und der Lösung anschließend 2 μl 100 mM Dithionit (frisch angesetzt, Stammlösung gesättigt mit Ar) zugesetzt, welches in diesem Fall für die Entfernung sämtlicher Sauerstoffreste sorgt. Hiernach wird die Hydrogenase hinzugegeben und das Absinken des Spannungssignals verfolgt.

Unter Berücksichtigung der eingesetzten Mengen an Hydrogenase und an Wasserstoff kann aus der Steigung des ersten linearen Teils der aufgezeichneten Kurven die Aktivität in *Units* berechnet werden.

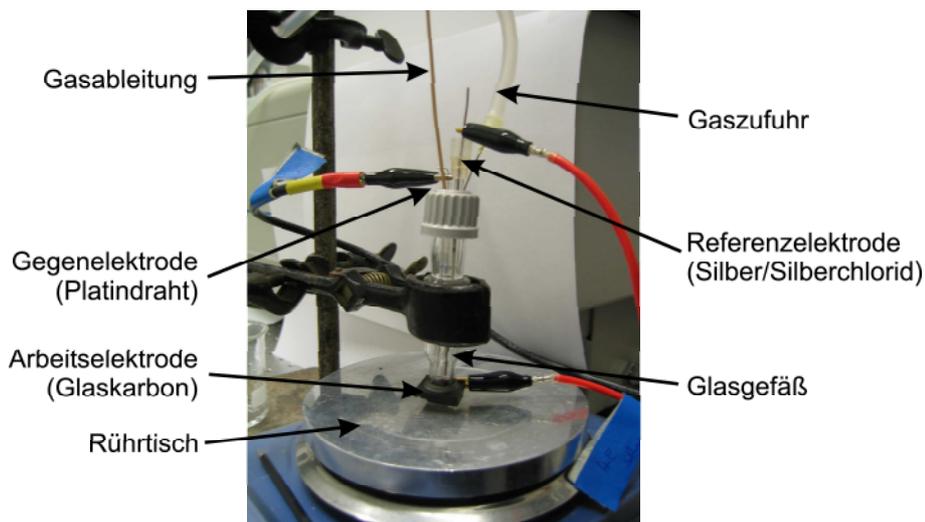


Abbildung 5.10: Glasgefäß mit Drei-Elektroden-Ableitung zur elektrochemischen Vorbehandlung der Hydrogenase.

Probenvorbereitung

Zur quantitativen Messung der Wasserstoffaufnahme- und -abgabeaktivität der Zustände Ni-B, Ni-SI, Ni-C und Ni-R wurden die Proben zunächst auf elektrochemischem Wege 10 min bei -640 mV aktiviert, um dann definierte Spannungen anzulegen, bei denen der gewünschte Zustand maximal angereichert wird. Diese Spannungen wurden durch FTIR-Experimente ermittelt (vgl. Kapitel 6.3). Die elektrochemische Vorbehandlung geschah in einem Glasgefäß (s. Abbildung 5.10), dessen Boden aus Glaskarbon bestand und der als Arbeitselektrode diente. In die Lösung, die in eine Vertiefung des Glaskarbonbodens gefüllt und gerührt wurde, tauchten zudem eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode und eine Platin-Gegenelektrode ein (Abbildung 5.10). Das Potential in der Lösung wurde mit Hilfe eines Potentiostaten eingestellt. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Im Falle der Zustände Ni-A und Ni-SU wurden die Proben bei einem pH-Wert von 6,0 einer Vorbehandlung unterzogen, die für die FTIR-Spektroskopie entwickelt wurde (s. Kapitel 6.1.3), die Messungen wurden jedoch auch bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. Nach der elektrochemischen Behandlung wurde ein Aliquot von 30 μl in den Aktivitätstest eingesetzt und der Verbrauch oder die Produktion von Wasserstoff verfolgt (s. Kapitel 5.3.2.1).

Ergebnisse

Alle Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase wiesen eine katalytische Aktivität auf. Der Wasserstoffverbrauch bzw. die -abgabe begannen ohne Verzögerung direkt nach der Zugabe des Enzyms zum Reaktionsansatz. Abbildung 5.11 zeigt beispielhaft die Kurven der Wasserstoffaufnahme und des Verbrauchs für die Hydrogenase im Zustand Ni-B. Die Messprofile der verschiedenen Zustände unterschieden sich nur in der Steigung der entsprechenden Kurven. Daraus wurde die Aktivität in Units berechnet. Tabelle 5.1 gibt eine Übersicht über die Aktivitäten der verschiedenen Zustände. Für die Messungen der Zustände Ni-B,

Tabelle 5.1: Übersicht über die Aktivitäten der verschiedenen Zustände, gemessen mit der amperometrischen Methode.

Initial-Zustand	pH-Wert Potential (mV)	angelegtes	H ₂ -Abgabe (U)	H ₂ -Aufnahme (U)
Ni-R	7,4	-600	11 ± 6	18 ± 7
Ni-C	7,4	-400	7,5 ± 3	10 ± 8,5
Ni-SI	7,4	-250	8 ± 6,5	6,5 ± 4
Ni-SU	7,4	-200	7 ± 4	5 ± 4
Ni-B	7,4	+120	8 ± 3,5	9 ± 4
Ni-A	7,4	+100	6 ± 4	4 ± 4

Ni-SI, Ni-C und Ni-R wurde der Fehler durch Mittelung von vier Wiederholungen der Messserie bestimmt; im Falle von Ni-A und Ni-SU wurde nur eine Messserie durchgeführt und der Fehler abgeschätzt. Die Aktivität war im Rahmen des Fehlers für die verschiedenen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase gleich und bewegte sich in einer Größenordnung von 10 Units.

Diskussion

Aus früheren Aktivitätsmessungen an [NiFe]-Hydrogenasen anderer Spezies ist geschlossen worden, daß die Zustände Ni-A und Ni-B sich u.a. darin unterscheiden, wieviel Zeit bis zur Herstellung kompletter Aktivität verstreicht. Im Allgemeinen wurde festgestellt, daß das Enzym im Zustand Ni-A sich lange Zeit in einer reduzierenden Umgebung befinden muß, bevor sich die katalytische Aktivität entwickelt. Für Ni-B ist diese Zeit deutlich kürzer. Im Falle der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* beschrieb Bleijlevens [23], daß bei Messung der

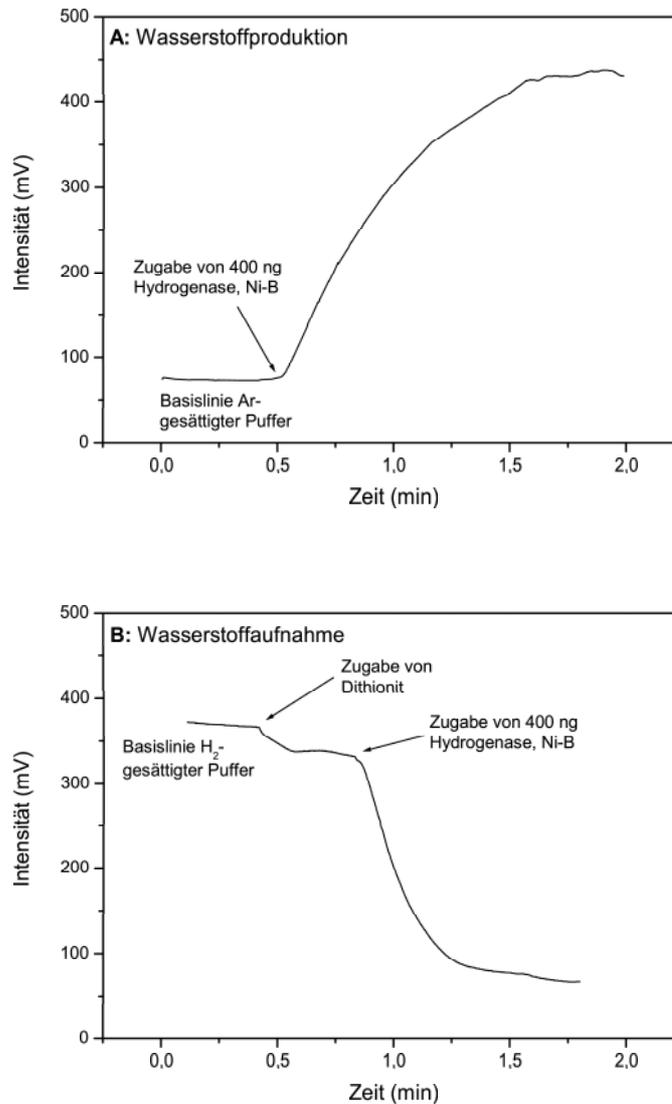


Abbildung 5.11: Amperometrische Messung der Wasserstoffproduktion (A) und Wasserstoffaufnahme (B) der [NiFe]-Hydrogenase im Zustand Ni-B bei einem pH-Wert von 7,4. Die Aktivitäten betragen 12 U im Falle der Wasserstoffproduktion und 9 U im Falle der Wasserstoffaufnahme.

Wasserstoffaufnahmeaktivität in Anwesenheit des Elektronenakzeptors Benzylviologen für die Zustände Ni-A und Ni-SU kein Verbrauch festzustellen war, das Enzym ist in diesen Zuständen also inaktiv. Im Falle von Ni-B wurde eine Aktivierungszeit von einigen Minuten gemessen, bevor sich der Verbrauch von Wasserstoff voll ausprägte. Das Enzym kann in diesem Zustand also mit Wasserstoff reagieren, muß aber erst aktiviert werden. Eventuell eingetragener Sauerstoff wurde hier mittels Glucose und Glucose-Oxidase entfernt.

Stopped-Flow Infrarot-Studien am gleichen Enzym zeigten indes, daß bei Mischung der Hydrogenase mit Wasserstoff sowohl im Zustand Ni-A als auch im Zustand Ni-B eine Umwandlung in die reduzierten Zustände zu beobachten war [68]. Die Verzögerung bis zur Aktivierung des Enzyms war für Ni-A jedoch erheblich länger als für Ni-B. Die Autoren dieser Studie erklärten die vorhandene Aktivität im Zustand Ni-A mit einem intermolekularem Elektronentransfer von Molekülen im Ni-B-Zustand zu Molekülen im Ni-A-Zustand, so daß die letzteren in den Zustand Ni-SU übergangen, für den gezeigt werden konnte, daß er langsam zu aktivieren sei. Sie bestätigten damit die Interpretation von Blejlevens [23], daß Ni-A und Ni-SU nicht, Ni-B und Ni-SI jedoch sehr bereitwillig mit Wasserstoff reagierten [68].

Auch Bagley *et al.* [11] stellten bei Messung der Wasserstoffaufnahmeaktivität fest, daß im Falle der oxidierten Zustände eine Verzögerung auftrat, bevor sich die Aktivität entwickelte. Dem Reaktionsansatz wurde hier Dithionit zugegeben, um eine vollständig anaerobe Umgebung zu gewährleisten.

Auch für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* wurde die Aktivierung der oxidierten Zustände mittels Aktivitätsmessungen untersucht. Berlier *et al.* [14] fanden bei Messung der H/D-Austauschaktivität heraus, daß bei Zugabe von Dithionit zum Reaktionsansatz im Falle der oxidierten Hydrogenase keine Verzögerungsphase zu beobachten war. Fernandez *et al.* [41] hingegen fanden bei Messung der Wasserstoffabgabeaktivität nur eine verkürzte Verzögerungsphase, wenn der Reaktionsansatz Dithionit enthielt. Ähnliche Beobachtungen machten auch Lissolo *et al.* [77] und Teixeira *et al.* [115]. Mege *et al.* [86] fanden ebenfalls keine Verzögerungsphase, als sie die Wasserstoffabgabeaktivität an der immobilisierten Hydrogenase in Anwesenheit von reduziertem Methylviologen maßen. Als Gründe für die verkürzte Aktivierungszeit wurde von Fernandez *et al.* [41] zum einen genannt, daß das Dithionit eventuell noch vorhandenen Sauerstoff entferne und dadurch eine schnellere Aktivierung erlaube. Ein zusätzliches System zur Sauerstoffentfernung wurde in den oben erwähnten Studien nicht einge-

setzt. Zum anderen hielten die Autoren die Reduktion eines Redoxzentrums für notwendig, bevor eine Aktivierung stattfinden konnte. Diese Reduktion würde durch das Dithionit vorgenommen.

Man erwartet somit für den dritten Vertreter der Standardhydrogenasen, die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F, daß auch hier im Falle der oxidierten Zustände eine Verzögerungsphase nachzuweisen ist, auch wenn sie aufgrund der Anwesenheit von Dithionit in den Reaktionsansätzen eventuell kurz sein kann. Die Tatsache, daß die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F in diesen Zuständen *sofort* eine Aktivität aufweist, ist somit überraschend (vgl. Abbildung 5.11). Der Zustand Ni-B wurde erreicht, indem die Hydrogenase zunächst reduziert und damit aktiviert wurde, bevor sie elektrochemisch oxidiert wurde. Vorstellbar ist, daß sich nicht die gesamte Enzympopulation im Ni-B-Zustand befand, sondern einige Moleküle weiterhin in einem reduzierten Zustand verblieben. Diese könnten, da sie schon aktiv sind, sofort reagieren und eine Aktivität erzeugen, bis nach kurzer Zeit auch die Moleküle des Ni-B-Zustandes aktiviert worden sind. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Aktivierungszeit von Ni-B sehr kurz ist (≤ 1 s) und dadurch die Aktivität scheinbar unverzögert auftritt. Auch spektroelektrochemische FTIR-Experimente (vgl. Kapitel 6.6) und proteinfilmvoltammetrische Experimente (vgl. Kapitel 7.4), die die Reaktivierung der oxidierten Zustände untersuchen, weisen auf eine sehr schnelle Reaktion hin.

Im Falle der Probe, in der sich die Hydrogenase hauptsächlich im Zustand Ni-A befinden sollte, ist keine vorherige Aktivierung vorgenommen worden. Hierbei läßt sich die spontane Aktivität nur dadurch erklären, daß die Moleküle in dieser Probe möglicherweise nicht nur im Zustand Ni-A, sondern auch im Zustand Ni-B vorlagen, welche dann aufgrund ihrer geringeren Aktivierungszeit sofort reagierten, während die Moleküle im Ni-A-Zustand erst später zur Aktivität beitrugen.

Ist die [NiFe]-Hydrogenase hingegen erst einmal aktiviert und befindet sich in einem der reduzierten Zustände Ni-SI, Ni-C oder Ni-R, kommt es sofort zu einer Reaktion mit Wasserstoff, da diesen eine Beteiligung am katalytischen Zyklus unterstellt wird [32, 40, 83]. Dies wurde sowohl an der hier untersuchten Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F, als auch im Falle der [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. gigas* [33] und *A. vinosum* [23] beobachtet. Die in Tabelle 5.1 angegebenen Aktivitäten sind im Rahmen des Fehlers für alle Zustände gleich, da offensichtlich in allen Proben, also auch in den Proben der oxidierten Hydro-

genase, Moleküle in Zuständen des katalytischen Zyklusses (Ni-SI, Ni-C, Ni-R) vorlagen, die eine sofortige Reaktion verursachten. Befinden sich sämtliche Hydrogenasemoleküle dann im katalytischen Zyklus, weisen sie unabhängig vom Initialzustand eine immer gleich große Aktivität auf.

Generell müssen die absoluten Aktivitätswerte in Units (vgl. Tabelle 5.1) kritisch betrachtet werden, da es sehr schwer ist, den Fehler dieser Werte exakt anzugeben. Jeder Faktor, der in die Berechnung der Aktivität eingeht, besitzt selbst bereits einen gewissen Fehler, da er ebenfalls experimentell ermittelt wurde. So wird die Proteinmenge mittels eines Proteintests bestimmt (vgl. Kapitel 5.2.1.6), der Wasserstoffgehalt über eine Kalibrierung zu Beginn der Messung, die Wasserstoffmenge, die in einer gewissen Zeit verbraucht oder produziert wird, über die Steigung der Kurve, die ihrerseits graphisch auf dem Schreiber Ausdruck ermittelt wird, so daß die in die Berechnung der Aktivität eingehenden Faktoren selbst eine gewisse Schwankungsbreite mitbringen. Der in Tabelle 5.1 angegebene Fehler ist die Standardabweichung, die sich aus den Aktivitäten von vier Messserien ergab. Die oben angegebenen Gründe verursachen, daß dieser Fehler relativ groß ist. Er läßt jedoch einen Vergleich der Größenordnung der Aktivitäten mit denen von [NiFe]-Hydrogenasen anderer Spezies zu. Tabelle 5.2 gibt einen Überblick darüber. Hieraus wird ersichtlich, daß die

Tabelle 5.2: Übersicht über die Aktivitäten verschiedener [NiFe]-Hydrogenasen.

Spezies	Test	Aktivität (U)
<i>A. vinosum</i> [51, 99]	H ₂ -Aufnahme, Enzym aktiviert	100-200
<i>D. gigas</i> [122]	H ₂ -Aufnahme, Enzym aktiviert	500 ± 50
<i>D. vulgaris</i>	H ₂ -Aufnahme, Enzym aktiviert	18 ± 7

[NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F eine um einen Faktor zehn bis 50 geringere Aktivität aufweist als die anderen Enzyme. Dies ist angesichts der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten dieser drei Standardhydrogenasen unerwartet. Ein Aktivitätsverlust der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F, der auf die elektrochemische Probenvorbehandlung zurückzuführen ist, kann ausgeschlossen werden, da die Aktivitätsmessungen nicht nur mit Proben verschiedener Initialzustände durchgeführt wurde, sondern auch unbehandelte (*as isolated*), bzw. durch Wasserstoffgas kurz reduzierte Proben verschiedener Präparationen getestet wurden. Auch hier befindet sich die gemessene

Aktivität in der gleichen Größenordnung. Es wurde festgestellt, daß die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F ein sehr empfindliches Enzym ist, was sich zum einen durch einen zunehmenden Aktivitätsverlust bemerkbar machte, der während der Lagerung des Proteins für mehrere Stunden bei 277 K auf Eis auftrat, zum anderen an der geringen Reaktivierung zeigt, die nach einer Inaktivierung durch Oxidation mit O₂ in proteinfilmvoltammetrischen Experimenten zu beobachten war (vgl. Kapitel 7.6). Dies weist auf eine hohe Sauerstoffempfindlichkeit des Enzyms hin. Da die Isolierung der Hydrogenase aerob durchgeführt wurde, ist es denkbar, daß ein Teil der in den Aktivitätstests eingesetzten Enzymmenge durch Sauerstoff schon während der Aufreinigung derart inaktiviert wurde, daß eine Reaktivierung im Aktivitätstest nicht möglich war. Da diese inaktiven Moleküle jedoch nicht denaturiert sein müssen, wurde deren Anteil bei der Bestimmung der Proteinmenge berücksichtigt, so daß die Aktivität der katalytisch aktiven Moleküle unterbewertet wurde.

5.3.2.2 H/D-Austausch

Diesem Aktivitätstest, dessen Anwendung auf die Hydrogenase u.a. von Jouanneau *et al.* [65] und Vignais *et al.* [121] beschrieben wurde, liegt die Eigenschaft der Hydrogenase zugrunde, in der Abwesenheit von Elektronenakzeptoren die Wasserstoff-Isotope ¹H (H) und ²H (D) gegeneinander auszutauschen. Die Methode basiert auf der Analyse gelöster Gase, die einem Massenspektrometer über ein Membraneinlaß zugeführt und dort detektiert werden. Die Fähigkeit der Hydrogenase zum H/D-Austausch wird als Beweis dafür angesehen, daß sie den Wasserstoff heterolytisch in ein Proton (H⁺) und ein Hydrid (H⁻) spaltet: $\text{H}_2 \rightarrow \text{H}^+ + \text{H}^-$.

In einem D₂O-Puffer liegen die Ionen D⁺ und OD⁻ vor. Die Produkte der heterolytischen Wasserstoffspaltung H⁺ und H⁻ können nun mit den Ionen des Puffers reagieren:



Die Hydrogenase kann nun neben H₂ auch die Wasserstoffspezies HD heterolytisch in H⁺ und D⁻, bzw. H⁻ und D⁺ spalten, welche erneut mit den Ionen des Puffers reagieren:





Es entstehen somit die gasförmigen Wasserstoffspezies H_2 , HD und D_2 .

Meßaufbau

Die Messung der H/D-Austauschaktivität wurde am Massenspektrometer Finnigan Delta^{Plus}XP durchgeführt. Der Reaktionsansatz wird in ein temperierbares Reaktionsgefäß mit einem maximalen Fassungsvermögen von 4 ml gefüllt, dessen Boden eine gasdurchlässige Silikonmembran (Typ Mem213) enthält. Über eine Vakuumpumpe werden die Gase aus dem Reaktionsansatz durch die Membran in das Massenspektrometer gesaugt, eine Technik, die man als *membrane introduction mass spectrometry* (MIMS) bezeichnet. Nach der Passage einer Kühlfalle (200 K) zur Entfernung von Wasserspuren treffen sie mit Elektronen zusammen, die zuvor in einem elektrischen Feld (70 V) beschleunigt wurden. Die Reaktion der beschleunigten Elektronen mit den Gasmolekülen führt zu einer Ionisation der Gase, wobei positiv geladene Radikale entstehen. Diese Ionenquelle (Ort der Entstehung der Gasionen) besteht aus einem Teil, in dem die Elektronen von einem erhitzten Draht emittiert und beschleunigt werden. Der Elektronenstrom wird durch ein angelegtes Magnetfeld fokussiert und interagiert im zweiten Kompartiment der Ionenquelle mit den Gasmolekülen der Probe. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und passieren nun die sogenannte Ionenoptik (Sektorfeld), in der sie durch elektrische und magnetische Felder gemäß ihres Verhältnisses Masse/Ladung (m/z) aufgeteilt und auf Detektoren gelenkt werden. Diese Detektoren, die sogenannten Faraday-Cups, registrieren das Auftreffen eines Iones als Strom. Das Faraday-Cup besteht aus einer Metallschale, in der das Auftreffen eines Ions zum einen zur Neutralisation des Ions und zum anderen zur Emission von Sekundärelektronen führt. Diese Sekundärelektronen sorgen für eine Verstärkung des Signals, das durch einen PC digitalisiert wird. Die Amplitude des Signals ist proportional zu der Menge an Ionen, die auf das Faraday-Cup auftreffen. Abhängig vom angelegten Magnetfeld und der Beschleunigungsspannung treffen die Ionen auf ein bestimmtes Faraday-Cup, wobei aufgrund der geringen Masse eines Elektrons die Masse des Ions mit der Masse des Gasmoleküls, aus

dem es entstanden ist, gleichgesetzt wird. Im Falle der Massen 2 u, 3 u und 4 u ist der relative Massenunterschied zwischen der Masse 2 u und 4 u so groß, daß diese beiden nicht gleichzeitig detektiert werden können. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit der Cups, auf die die Massen 3 u und 4 u treffen, verglichen zu denen, in denen die Massen 2 u und 3 u detektiert werden, erfolgt die Aktivitätsmessung auf der Basis der Wasserstoffspezies D₂ (Masse 4 u) und HD (Masse 3 u).

Durchführung

Der Reaktionsansatz enthält die folgenden Lösungen:

- 1,5 ml Tris-D₂O-Puffer, gesättigt mit Ar
- 100 µl Glucose (1M)
- 3 µl Glucose-Oxidase (30 mg/ml)
- 5 µl Katalase (100 U/µl)
- 400 µl Tris-D₂O-Puffer, gesättigt mit H₂
- Hydrogenase

Die Zugabe von Glucose und Glucose-Oxidase dient der vollständigen Entfernung des Sauerstoffs aus dem Reaktionsansatz. Desweiteren wird Katalase hinzugefügt, um das bei der Reaktion der Glucose-Oxidase entstehende Wasserstoffperoxid abzubauen, das die Aktivität der Hydrogenase beeinflusst. Der Sauerstoffgehalt kann vor Zugabe des Wasserstoff-gesättigten Puffers ebenfalls im Massenspektrometer kontrolliert werden. Der Wasserstoff-Gehalt wird durch Detektion der Masse 2 u überprüft, bevor vor der Hydrogenase-Zugabe auf Detektion der Massen 3 u und 4 u umgeschaltet wird. Zur Kalibrierung des Signals wird ein Aliquot D₂-gesättigten Puffers (2 µl 810 µM) in 2 ml Ar-gesättigten Puffer gegeben und das Signal dieses Aliquots mit der Stoffmenge an D₂ (1,62 nmol) korreliert. Die Aktivitätsmessung wird bei 303 K durchgeführt.

Ergebnisse

Die Messung des H/D-Austausches erfolgte am oxidierten Enzym im *As isolated*-Zustand und am aktivierten Enzym; *as isolated* bedeutet, daß das Enzym

in den oxidierten Zuständen Ni-A und Ni-B vorkommt und nach der Proteinaufreinigung keiner weiteren Behandlung unterworfen wurde. Die Aktivierung wurde bei Raumtemperatur in 100%iger Wasserstoffatmosphäre durchgeführt. Dazu befand sich die Enzymlösung in einem Injektionsgefäß, das luftdicht verschlossen wurde und dessen Atmosphäre beliebig variiert werden konnte.

Abbildung 5.12 zeigt die Entwicklung der Wasserstoffspezies D₂ (Masse: 4 u) und HD (Masse: 3 u), die entstehen, wenn das Enzym in D₂O-Puffer gebracht wird, der mit 20% Wasserstoffgas (H₂) gesättigt ist. In beiden Fällen ist ein zweiphasiger Verlauf zu erkennen. Im Falle des oxidierten Enzyms ist zunächst eine langsame Konzentrationszunahme der Massen 3 u und 4 u zu beobachten. Nach ca. 25 min erhöhte sich die Geschwindigkeit der Konzentrationszunahme deutlich, um dann nach dem Verbrauch des H₂ im Reaktionsansatz wieder abzunehmen, da es nun zu einer Spaltung der Spezies HD und D₂ kam.

Im Falle des reduzierten Enzyms (vgl. Abbildung 5.12B) ist der erste Teil der Kurve sehr steil, die Aktivität somit groß, während der zweite Anstieg etwas weniger steil verlief. Zur Abschätzung der Aktivität in *Units* wurde die Steigung des jeweils ersten Kurvenabschnittes im linearen Bereich bestimmt und die Aktivität mit Hilfe der eingesetzten Enzymmenge und der Kalibrierung für das D₂-Gas berechnet (Tabelle 5.3). Die Steigung der Kurven betrug im Falle des oxidierten Enzyms 6,44 mV/s bei der Masse 3 u und 21,2 mV/s bei Masse 4 u und im Falle der reduzierten Hydrogenase 240 mV/s bei Masse 3 u und 527,2 mV/s bei Masse 4 u. Eine Stoffmenge von 1,62 nmol D₂ ergab ein Signal von 7097 mV, 1,57 nmol HD führten zu einem Signal von 692 mV. Bei einer eingesetzten Proteinmenge von 27 µg im Falle der oxidierten Hydrogenase und 900 ng der reduzierten Hydrogenase entspricht dies den in Tabelle 5.3 angegebenen Aktivitäten.

Tabelle 5.3: Übersicht über die H/D-Austausch-Aktivität der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F in oxidiertem und reduziertem Zustand.

Zustand	Wasserstoffspezies	Aktivität (U)
<i>as isolated</i>	HD	0,03 ± 50%
<i>as isolated</i>	D ₂	0,01 ± 50%
reduziert	HD	35 ± 50%
reduziert	D ₂	8 ± 50%

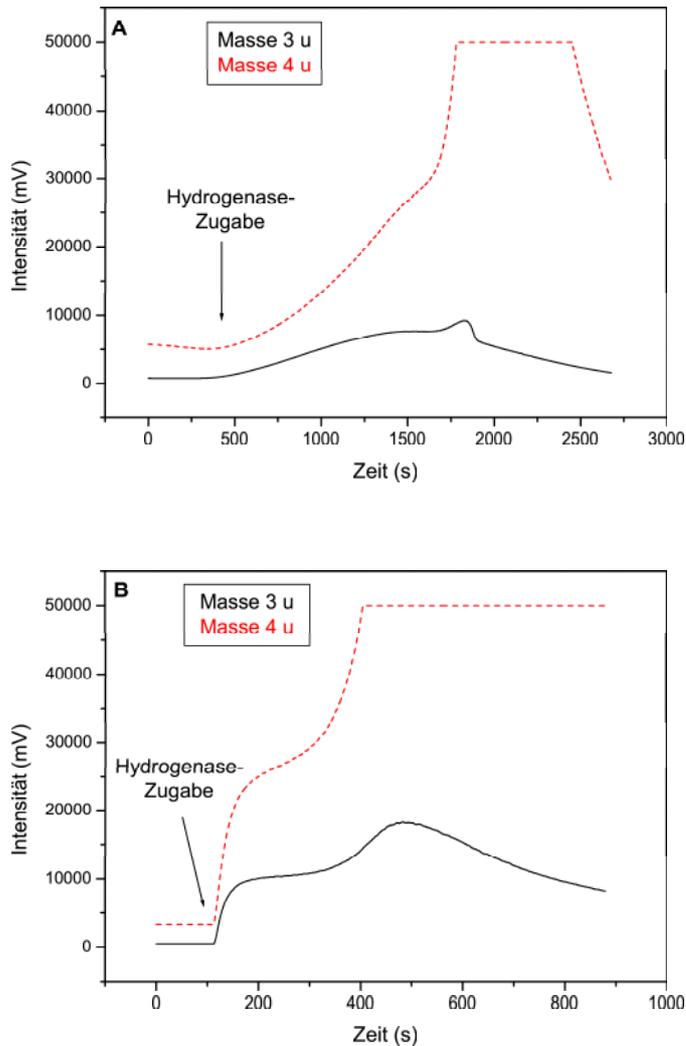


Abbildung 5.12: Messung der H/D-Austausch-Aktivität der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F. Dargestellt ist die Entwicklung der Wasserstoffspezies HD (schwarze Kurve) und D₂ (rote Kurve) nach Zugabe von (A) 27 µg Hydrogenase im oxidierten Zustand und (B) 9 ng Hydrogenase im reduzierten Zustand. Bei einer Intensität von 50000 mV erfährt der Detektor der Masse 4 u eine Sättigung.

Diskussion

Vergleicht man die katalytischen Aktivitäten der [NiFe]-Hydrogenase in bezug auf die gebildeten Wasserstoffspezies, fällt auf, daß sie sich um einen Faktor 3–4,5 unterscheiden. Die Entstehung des HD ist um diesen Faktor schneller als die des D₂. Grund hierfür ist der Isotopeneffekt, unter dem man die stärkere Affinität der Hydrogenase zum Wasserstoffisotop H₂ als zum Isotop D₂ versteht. Er wurde schon 1973 von Yagi *et al.* [125] beschrieben und inzwischen bei vielen Hydrogenasen festgestellt. Bei Messung der ortho-para-Konversion und des H/D-Austausches durch die Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F wurde eine um den Faktor 2,2–3,5 beschleunigte Reaktion in H₂O im Vergleich zur Reaktion in D₂O festgestellt [125]. Auch Jouanneau *et al.* stellten fest, daß im Falle der Hydrogenase von *Rhodobacter capsulatus* die Entwicklung von HD in den beiden Systemen D₂-H₂O und H₂-D₂O gleich blieb, die Raten der H₂- bzw. D₂-Entwicklung sich jedoch stark unterschieden. Das Verhältnis HD/H₂ betrug in diesem Fall 0,41 und das Verhältnis HD/D₂ 1,43 [65].

Doch auch bei diesen Messungen sind die absoluten Aktivitätswerte kritisch zu betrachten. Aufgrund des zweiphasigen Verlaufs wird deutlich, daß nicht die gesamte eingesetzte Proteinmenge sofort reagierte. Jedoch wurde bei der obigen Abschätzung die anfängliche Aktivität auf die gesamte Proteinmenge bezogen. Zudem ist es nur eine grobe Näherung, den anfänglichen Kurvenverlauf mit einer linearen Funktion anzufitten. Weiterhin wurde der Verbrauch des Massenspektrometers, das dem Reaktionsansatz die Gase kontinuierlich entzieht, nicht berücksichtigt. Eine diesbezügliche Korrektur würde die Aktivität etwas erhöhen. Deshalb sind die Messergebnisse mit einem großen Fehler behaftet, der auf $\pm 50\%$ abgeschätzt wurde.

Im Falle des oxidierten Enzyms im *as isolated*-Zustand läßt sich der zweiphasige Verlauf der Reaktion mit der unterschiedlichen Aktivierungszeit der hier anwesenden Zustände Ni-A und Ni-B erklären. Zunächst reagieren die Enzymmoleküle im Zustand Ni-B mit dem in der Lösung vorhandenen Wasserstoff, und nach einer Aktivierungszeit von ca. 25 min steigt die Aktivität erneut an, da nun auch die sich im Ni-A-Zustand befindlichen Moleküle aktiv werden.

Erstaunlicherweise weist auch die reduzierte Probe einen zweiphasigen Verlauf auf. Der erste Anstieg der Kurve deutet die Aktivität der reduzierten Zustände an. Deutlich erkennbar ist der steilere Verlauf der Gasentwicklung nach der Enzymzugabe verglichen zum oxidierten Enzym. Der zweite Anstieg könnte durch

solche Moleküle ausgelöst werden, die erst nach ca. 6 min nach der Zugabe des Enzyms zum Reaktionsansatz aktiv geworden sind. Die Aktivierungszeit des Enzyms, die es im Injektionsgefäß am Gasverteilungssystem verbrachte, betrug 10 min. Bevor es dann in den Reaktionsansatz gegeben wurde, befand es sich weitere ca. 10 min in dieser Atmosphäre. Zusammen mit der weiteren Inkubationszeit von 6 min im Reaktionsansatz würde sich dies zu einer Aktivierungszeit von ca. 25 min aufsummieren, die auch benötigt wurden, um die Moleküle des später aktiven Zustandes Ni-A zu aktivieren. Denkbar wäre also, daß sich in der reduzierten Probe noch Moleküle des Ni-A-Zustandes befanden, für die die erste Aktivierungszeit von 10 min in 100% H₂ nicht ausreichte.

5.4 Zusammenfassung

Dieses Kapitel zeigt, daß eine effiziente Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F etabliert werden konnte. Hierzu wurden die Wachstumsbedingungen der Mikroorganismen und die Konditionen der Proteinpräparation so optimiert, daß aus einer Zellmasse von 120 g durchschnittlich 100 mg [NiFe]-Hydrogenase mit einem Reinheitsgrad von $97 \pm 2\%$ gereinigt werden konnten. Neben der Aufreinigung wurden Methoden zur Identifizierung der Hydrogenase und zur Bestimmung ihrer Aktivität eingerichtet, die standardmäßig während einer Aufreinigung und der Herstellung von Proben für die Spektroskopie Anwendung finden. Die Tatsache, daß das aufgereinigte Protein die verschiedenen spezifischen Aktivitäten einer Hydrogenase aufweist, bestätigt eine korrekte Identifizierung der [NiFe]-Hydrogenase im Proteingemisch, das nach Aufschluß der *D. vulgaris* Miyazaki F-Zellen gewonnen wurde. Darüber hinaus zeigten die Messungen jedoch in bezug auf das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten Unterschiede zu den anderen Standardhydrogenasen, die einer weiteren, detaillierteren Untersuchung bedürfen (vgl. Kapitel 7).

6 Spektroelektrochemie an der [NiFe]-Hydrogenase

Die spektroelektrochemischen Messungen dienen der detaillierten Charakterisierung der einzelnen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase sowie der Redoxübergänge zwischen ihnen. Sie wurden mittels Infrarot-Spektroskopie durchgeführt, da es nur diese spektroskopische Methode erlaubt, alle Redoxzustände zu detektieren, während z.B. der EPR-Spektroskopie nur die paramagnetischen Zustände zugänglich sind. Zur Durchführung der Messungen wurde eine optisch transparente Elektrochemie-Dünnschicht (OTTLE)-Zelle benutzt, wie sie von Moss *et al.* [88] beschrieben wurde (Abbildung 6.1).

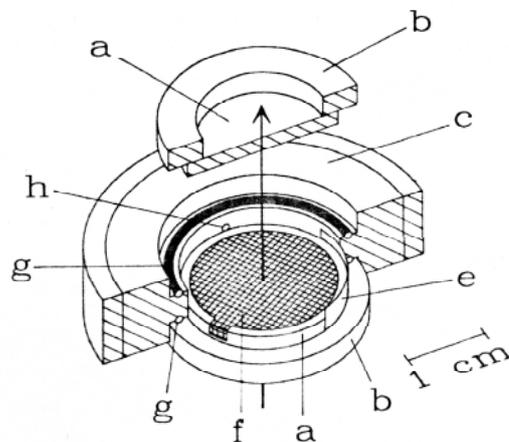


Abbildung 6.1: Schnittbild einer optisch transparenten Elektrochemie-Dünnschicht-Zelle (OTTLE-Zelle). a) CaF₂-Fenster befestigt auf b) Plexiglasring; c) Kunststoffkörper; e) Platinelektrode (Gegenelektrode); f) Goldnetz (Arbeitslektrode); g) Gummi-O-Ring; h) Kapillarverbindung zur Referenzelektrode; Pfeil: optische Achse. Die Abbildung wurde modifiziert nach [88].

Die Nutzung dieser Zelle ermöglicht durch Anlegen einer Spannung zwischen Referenz- und Arbeitslektrode die Durchführung von Redoxreaktionen an der

zwischen den CaF_2 -Fenstern befindlichen Lösung und die anschließende Aufnahme eines Infrarot-Spektrums. Besonders vorteilhaft ist hierbei, daß ein Transfer der Lösung nicht notwendig ist, der bei der Durchführung der beiden Methoden in verschiedenen Messanordnungen vorgenommen werden müßte. Dies führt außerdem dazu, daß Probenverluste nur minimal sind und die Messungen zeiteffizient durchgeführt werden können.

6.1 Probenvorbereitung

6.1.1 Pufferaustausch

Am Ende des Aufreinigungsprozesses (vgl. Kapitel 5.2) wird die Hydrogenase in Tris-Puffer (pH-Wert 7,4) aufgenommen. Soll sie bei einem anderen pH-Wert untersucht werden, ist ein Pufferaustausch erforderlich. Hierzu wird eine Probe zunächst in einem zehnfachen Volumen des gewünschten Puffers verdünnt und anschließend wieder auf das Ausgangsvolumen einkonzentriert. Dieser Vorgang wird zehn Mal wiederholt.

6.1.2 Probenvorbereitung

50 μl einer 3 mM Hydrogenase-Lösung werden mit 50 μl Redoxmix (vgl. Kapitel 4.4) versetzt, in dem die Konzentration eines jeden Redoxmediators 250 μM beträgt. Das Gemisch aus Enzym und Redoxmix hat eine Hydrogenase-Konzentration von 1,5 mM, eine Redoxmediatorkonzentration von je 125 μM und eine KCl-Konzentration von 100 mM.

6.1.3 Probenvorbehandlung für die Zustände Ni-A und Ni-SU

Zur Anreicherung der Zustände Ni-A und Ni-SU in der Probe [17] wird das Gemisch aus Enzym und Redoxmix in ein Reaktionsgefäß gefüllt, welches in einem gasdicht verschlossenem Glasgefäß (Injektionsgefäß mit Gummistopfen) steht. Nachdem die Luft im Injektionsgefäß gegen Wasserstoffgas ausgetauscht wurde, wird die Hydrogenase durch Inkubation bei 310 K für 10 min aktiviert. Danach erfolgt ein Gasaustausch gegen Kohlenmonoxidgas (CO), welches 10 min bei Raumtemperatur mit der Hydrogenase reagiert. Schließlich wird die Hydrogenase oxidiert, indem das CO entfernt und statt dessen Luft in das Glasgefäß gelassen wird. Die Prozedur des Gasaustauschs geschieht am Gasverteilungssystem. Über eine Kanüle, die durch den Gummistopfen gestochen wird,

steht die Atmosphäre des Injektionsgefäßes in Kontakt mit den Gasauslässen. Sämtliche Gase (außer Luft) passieren vor dem Zugang in das Injektionsgefäß die Reinigungssäule Oxisorb, die Sauerstoffreste aus den Gasen entfernt. Der Austausch der Atmosphäre im Injektionsgefäß geschieht durch abwechselndes Evakuieren über die angeschlossene Vakuumpumpe und anschließendes Begasen. Nach erfolgter dreiminütiger Oxidation durch Luft bei Raumtemperatur wird die Enzymlösung auf Eis gelagert, bis sie in die OTTLE-Zelle gefüllt wird (ca. 10-15 min).

6.1.4 Befüllung der OTTLE-Zelle

Die OTTLE-Zelle wird zunächst mit 25 μl Redoxmix (125 μM pro Redoxmediator) befüllt und verschlossen, um die Zwischenräume zwischen den Dichtungen und den CaF_2 -Fenstern der Zelle mit Flüssigkeit zu füllen. Anschließend wird die Zelle wieder geöffnet und das Goldnetz mit einem Papiertuch vorsichtig getrocknet. Nun werden 25 μl des Hydrogenase-Gemisches in die OTTLE-Zelle gefüllt, diese verschlossen und die drei Elektroden eingesetzt. Es ist sicherzustellen, daß die Referenzelektrode mit der Lösung in Kontakt steht. Hierzu wird die Verschraubung mit Redoxmix gefüllt und die Referenzelektrode luftblasen-frei eingesetzt.

6.2 Durchführung

6.2.1 Messaufbau

Die spektroelektrochemischen Messungen wurden am FTIR-Spektrometer IFS 66v/S durchgeführt. Die infrarote Strahlungsquelle dieses Spektrometers ist ein wassergekühlter Siliziumcarbidstift (Globalar), der breitbandige MIR-Strahlung emittiert. Das Michelson-Interferometer besitzt einen Strahlteiler aus KBr; die Spiegel sind mit Aluminium beschichtet. Der bewegliche Spiegel, der sich auf einem Luftpolster um maximal 4 cm auslenken läßt, ermöglicht eine maximale spektrale Auflösung von 0,25 cm^{-1} . Der Detektor dieses Spektrometers ist ein stickstoffgekühlter MCT-Detektor (HgCdTe-Detektor), welcher in einem spektralen Bereich von 5000 bis 850 cm^{-1} Signale aufnehmen kann. Während der Messungen wurde die Kammer evakuiert, die die Optik des Spektrometers enthält. Die Steuerung des Spektrometers geschieht durch einen PC und durch die vom Spektrometer-Hersteller bezogene Software OPUS. Wegen der

störenden Absorption von Wasser und CO₂ im infraroten Bereich wird die Probenkammer dauerhaft mit H₂O- und CO₂-armer Luft gespült. Zusätzlich befindet sich das Spektrometer auf einem schwingungsgedämpften Tisch, um es von äußeren Erschütterungen zu entkoppeln.

6.2.2 Messprinzip

Die verwendete OTTLE-Zelle, die direkt in das FTIR-Spektrometer eingebaut wird, erlaubt die elektrochemische Modifizierung der Enzymlösung mittels eines Goldnetzes, das zwischen den CaF₂-Fenstern lokalisiert ist. Dieses Goldnetz dient als Arbeitselektrode. Die Enzymlösung steht zudem in Kontakt mit zwei weiteren Elektroden (s. Abbildung 6.1), der Gegenelektrode (Platinelektrode) und der Referenzelektrode (Silber/Silberchloridelektrode). Die Elektroden werden ihrerseits an einen Potentiostaten angeschlossen, der das angelegte Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode kontrolliert und während der Messung den Strom aufzeichnet. Dies geschieht über einen an den Potentiostaten angeschlossenen PC mittels der Software M270. Die Messungen werden bei einer Temperatur von 303 K im Falle der Redoxzustände Ni-B, Ni-SI, Ni-C und Ni-R sowie bei 288 K im Falle von Ni-A und Ni-SU durchgeführt. Sie wird über einen Thermostaten konstant gehalten. Nach einer elektrochemischen Äquilibrierungszeit von etwa 10 min, in der das gewünschte Potential anliegt, werden die FTIR-Spektren aufgenommen. Das elektrochemische Gleichgewicht ist erreicht, wenn sich der vom Potentiostaten aufgezeichnete Strom nicht mehr ändert. Jedes Spektrum wird gegen einen Hintergrund gemessen, der ein Spektrum des Redoxmixes ohne Hydrogenase darstellt. Nach der Spektrenaufnahme werden durch Absorption von Wasserdampf entstandene Banden subtrahiert, indem ein Wasserdampfspektrum entsprechend skaliert und vom gemessenen Spektrum abgezogen wird. Zusätzlich erfolgt eine Basislinienkorrektur. Für die Messungen wurden folgende Parameter eingestellt: Spektrale Auflösung: 2 cm⁻¹; Apodisationsfunktion: Blackman-Harris 3-Term; Zerofilling-Faktor: 2; Phasenkorrektur: Mertz; Phasenauflösung: 32 cm⁻¹.

6.2.3 Kalibrierung der Referenzelektrode

Bei den spektroelektrochemischen Messungen erfolgt die Potentialeinstellung immer relativ zur Referenzelektrode. Diese ist eine Silber/Silberchloridelektrode, standardmäßig wird das Potential jedoch gegen die Standardwasserstoffelektro-

de (*normal hydrogen electrode*, NHE) angegeben. Deshalb muß es nachträglich um die Differenz zwischen Silber/Silberchloridelektrode und Standardwasserstoffelektrode korrigiert werden, welche experimentell ermittelt wird. Die Kalibrierung der Elektrode erfolgt mit Methylviologen und wird nach jedem Experiment durchgeführt. Methylviologen wird dazu in einigen Millilitern des im Experiment verwendeten Puffers gelöst. Von dieser Lösung wird ein „Square-Wave“-Voltammogramm aufgenommen, wobei als Gegenelektrode eine Platinelektrode, als Arbeitselektrode eine Graphitelektrode und als Referenz die zu testende Silber/Silberchloridelektrode verwendet wird. Nach Aufnahme des „Square-Wave“-Voltammogramms wird das Potential des ersten Peaks bestimmt, der das Reduktionspotential des ersten von zwei Reduktionsschritten des Methylviologens anzeigt. Es beträgt unter Standardbedingungen -448 mV gegen NHE. Die Differenz zwischen dem im Voltammogramm bestimmten Wert und -448 mV ist der Ausgleich der Referenzelektrode zur NHE. Durch Addition dieses Wertes können nun die im Experiment verwendeten Potentiale korrigiert werden.

6.3 FTIR-Spektren der einzelnen Redoxzustände

Zu Beginn der FTIR-spektroskopischen Arbeiten waren die Infrarot-Spektren der einzelnen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Miyazaki F nicht bekannt. Für die [NiFe]-Hydrogenasen aus *A. vinosum* [3], *D. gigas* [33] und *D. fructosovorans* [35] hingegen existierten bereits IR-spektroskopische Charakterisierungen. Die FTIR-Spektren dieser Hydrogenasen zeigen ein charakteristisches Muster aus drei Banden im Bereich zwischen 1900 cm^{-1} und 2100 cm^{-1} . Mit Hilfe dieser Spektren und einer chemischen Analyse wurden die Banden den drei zweiatomigen Liganden des Eisens zugeordnet und als ein CO- und zwei CN⁻-Moleküle identifiziert [53, 99]. Für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F wurde bisher lediglich ein einziges Spektrum im *as isolated*-Zustand von Higuchi *et al.* [56] publiziert. Es besteht aus insgesamt fünf Banden, wovon sich drei im Bereich zwischen 2100 cm^{-1} und 2050 cm^{-1} und zwei im Bereich zwischen 1960 cm^{-1} und 1900 cm^{-1} befinden, und erinnert daher sehr an die schon bekannten Spektren der anderen Hydrogenasen. Dennoch gehen Higuchi *et al.* [56] aufgrund von massenspektrometrischen Analysen davon aus, daß einer der Eisenliganden ein SO-Molekül sein könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten spektroelektrochemischen FTIR-Messungen dienten dazu, die verschiedenen Redoxzustände der [NiFe]-Hydro-

genase zu charakterisieren und dadurch die Fragestellung nach der Identität der Eisenliganden zu beantworten. Da sich die einzelnen Redoxzustände in ihrem Redoxpotential unterscheiden, ermöglicht die Elektrochemie einen selektiven Übergang von einem Redoxzustand in den nächsten. Die Kopplung der Elektrochemie mit der FTIR-Spektroskopie liefert dann das entsprechende Spektrum eines Redoxzustandes.

6.3.1 Ergebnisse

Durch Anlegen eines bestimmten Potentials an die Hydrogenase-Lösung wurden die Spektren der einzelnen Redoxzustände aufgenommen und die spezifischen Absorptionen der Eisenliganden identifiziert (Abbildung 6.2). Das erforderliche Potential zur Einstellung eines bestimmten Redoxzustandes wurde durch ein spektroskopisches Abtasten des Potentialbereichs zwischen 200 mV und –800 mV bestimmt, indem das Potential in 50 mV-Schritten geändert und nach jedem Potentialschritt ein Spektrum aufgenommen wurde. Bei den in Abbildung 6.2 angegebenen Potentialen wies das jeweilige Spektrum den maximalen Anteil des jeweiligen Zustandes auf. Ein jedes Spektrum besteht aus drei charakteristischen Banden, die auf den Absorptionen der C=O- und C≡N-Bindungen der Eisenliganden beruhen, wie in Kapitel 6.3.2 diskutiert wird. Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die Absorptionen dieser Liganden bei den verschiedenen Zuständen.

Tabelle 6.1: Absorptionsbanden der verschiedenen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F. Der Fehler beträgt $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

Redoxzustand	$\tilde{\nu}_{\text{CO}} (\text{cm}^{-1})$	$\tilde{\nu}_{\text{CN}} (\text{cm}^{-1})$	$\tilde{\nu}_{\text{CN}} (\text{cm}^{-1})$
Ni-A	1956	2084	2094
Ni-B	1955	2081	2090
Ni-SU	1946	2075	2086
Ni-SIr	1922	2056	2070
Ni-SIa	1943	2075	2086
Ni-C	1961	2074	2085
Ni-R	1948	2061	2074
Ni-R'	1933/1919	2050	2065

Vergleicht man die Spektren der Zustände Ni-A und Ni-SU mit denen der rest-

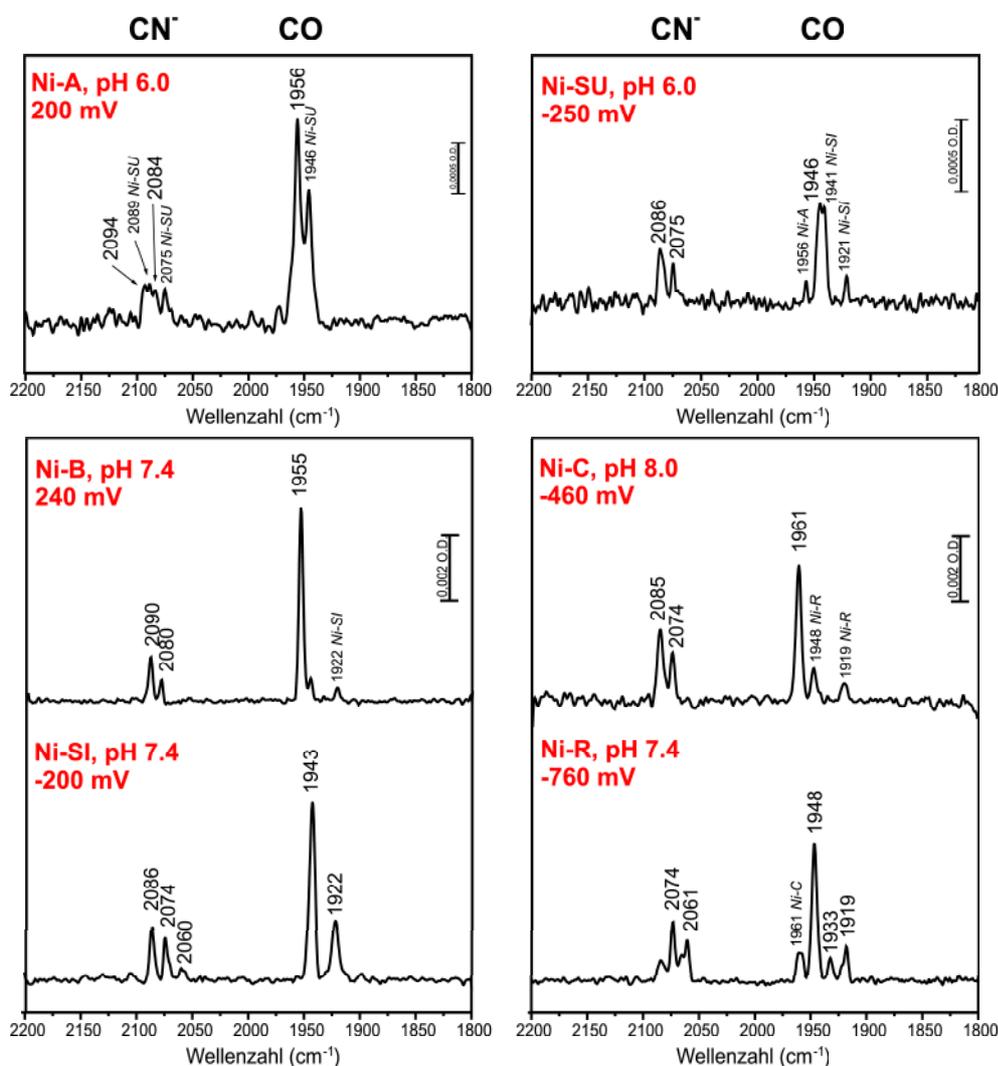


Abbildung 6.2: FTIR-Spektren der verschiedenen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase (Konzentration 1,5 mM in 25 mM Tris-Puffer mit 100 mM KCl und 125 μ M pro Redoxmediators). Jedes Spektrum besteht aus 200 gemittelten Einzelspektren. Die Spektren der Zustände Ni-A und Ni-SU wurden bei 288 K, die der Zustände Ni-B, Ni-SI, Ni-C und Ni-R bei 303 K gemessen. Angegeben ist zudem das Potential gegen NHE, das angelegt wurde, um den Anteil des jeweiligen Zustandes zu maximieren.

lichen Zustände, fällt die geringere Qualität der erstgenannten Spektren auf (Abbildung 6.2). Die Zustände Ni-A und Ni-SU wurden durch eine Vorbehandlung der Probe erzeugt (vgl. Kapitel 6.1.3), welche jedoch zu einem 40%igem Verlust an Protein führte. Das erniedrigte das Signal/Rausch-Verhältnis, so daß das Rauschen in diesen Spektren bei gleicher Anzahl gemittelter Einzelspektren deutlich ausgeprägter ist. Weiterhin ist erkennbar, daß die dargestellten Proben zum Teil mehr als einen Redoxzustand enthalten, da mehr als drei charakteristische Banden im Spektrum auftreten. Dies gilt vor allem für Ni-A, Ni-SU und in geringem Maße auch für Ni-C und Ni-R (Abbildung 6.2). Ein gewisser Anteil der Moleküle in der Probe verblieb auch bei angelegtem Potential in einem anderen Redoxzustand, der im Vergleich zum überwiegenden Zustand um ein Elektron reduziert oder oxidiert ist. Im Falle des Zustandes Ni-SI zeigt das Vorhandensein von mehr als drei Banden die Existenz von mehr als einer Redoxspezies an. Dies wird in Kapitel 6.4 ausführlich behandelt. Ähnliches gilt für den Zustand Ni-R (Kapitel 6.5).

6.3.2 Diskussion

Wie schon für die [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. gigas* [33], *D. fructosovorans* [35] und *A. vinosum* [3] beobachtet wurde, besteht auch im Falle der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* jedes Spektrum aus drei charakteristischen Banden. Diese drei Absorptionsbanden beruhen auf der Schwingung der Bindungen der drei zweiatomigen Liganden des Eisens. Für die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* konnte durch die infrarotspektroskopische Analyse von ^{13}C und ^{15}N isotopenmarkierten Proben gezeigt werden, daß es sich bei den Eisenliganden um ein CO- und zwei CN^- -Moleküle handelt [53]. Da die Infrarot-Spektren der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* nahezu identisch sind, ordneten De Lacey *et al.* [33] die drei durch die Analyse der Kristallstruktur entdeckten Liganden des Eisens ebenfalls einem CO- und zwei CN^- -Molekülen zu. Die Identität der Eisenliganden wurde später durch chemische Analysen an der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* bestätigt [99]. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Infrarot-Spektren der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F mit den bereits publizierten Spektren muß geschlossen werden, daß auch hier die Eisenliganden ein CO- und zwei CN^- -Moleküle sind. Higuchi *et al.* [56] diskutierten das Vorhandensein zweier Banden im CN^- -Bereich mit dem Vorhandensein zweier Zustände in der *as isolated*-Probe, so daß jeder Zustand einen CN^- -Liganden aufweisen würde. Doch die Spektroelektrochemie zeigte bei maximaler Anrei-

cherung eines jeden Redoxzustandes und der Aufnahme seines IR-Spektrums, daß jeder dieser Zustände zwei Banden im „CN⁻-Bereich“ (2100 cm⁻¹ bis 2050 cm⁻¹) besitzt. Somit ist belegt, daß zwei der Eisenliganden CN⁻-Moleküle sein müssen. Daß es sich bei dem dritten Liganden um ein CO-Molekül handelt, steht auch für Higuchi *et al.* außer Frage [56].

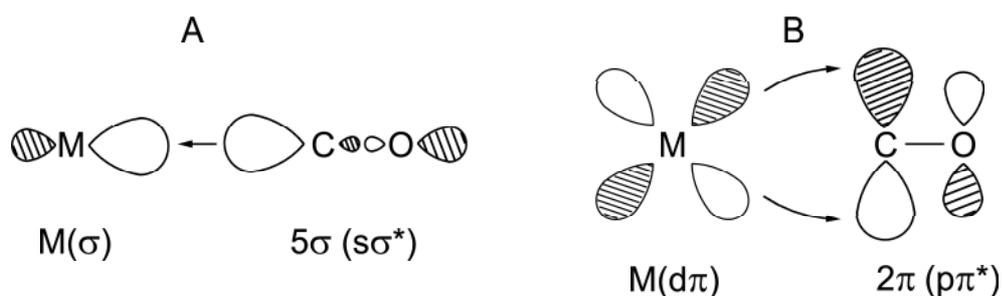


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der Metall-CO-Bindung (verändert nach [67]): A: σ -Donor-Bindung aus dem 5σ -Orbital in ein unbesetztes Metall- σ -Orbital. B: π -Rückbindung aus einem besetzten Metall- $d\sigma$ -Orbital in ein 2π -Orbital des CO.

Die Verschiebung der Banden bei einer Änderung des Redoxzustandes des Enzyms beruht auf Veränderungen in der Koordinationssphäre des Eisens. In einer solchen Metallbindung nimmt das besetzte 5σ -Orbital eine σ -Donor-Funktion und die beiden unbesetzten 2π -Orbitale eine π -Akzeptorfunktion ein (Abbildung 6.3). Die Schwingungen der Liganden werden durch den stark antibindenden Charakter der 2π -Orbitale beeinflusst, da die π -Rückbindung zwischen Metall und Ligand den C-O-, bzw. C-N-Abstand vergrößert. Der Einfluß der σ -Donorbindung ist dagegen schwächer, da das 5σ -Orbital nur einen schwach antibindenden Charakter hat. Das Ausmaß der π -Rückbindung zwischen Metall und Ligand wird wesentlich von der Elektronendichte am Metall beeinflusst [38]. So kommt es bei einer Erhöhung der Elektronendichte am Eisen zu einer veränderten Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen in den antibindenden Molekülorbitalen der beiden Liganden. Im Falle des CO-Liganden erhöht sich die Elektronendichte im 2π -Orbital, während im Falle des CN⁻-Liganden dem 5σ -Orbital mehr Elektronen zur Verfügung stehen. Dies führt zu einer Schwächung der CO-Bindungsordnung, und damit geht eine Frequenzverringering einher. Eine Abnahme der Elektronendichte am Eisen hat den entgegengesetzten Effekt. Doch auch andere Faktoren wie z.B. die Bildung von Wasserstoffbrücken zu den CN⁻-Liganden und die Position von Wassermolekülen im Protein, tragen zu den Bandenverschiebungen bei. Messungen an Modellkomplexen, die den

Fe(CO)(CN)₂-Komplex des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase simulieren, ergaben einen linearen Zusammenhang zwischen der CO- und der CN⁻-Schwingungsfrequenz [69]. Trägt man die Schwingungsfrequenz $\tilde{\nu}_{\text{CO}}$ gegen $\tilde{\nu}_{\text{CN}}$ auf, besitzt die Gerade eine positive Steigung. Dies zeigt, daß der Effekt von elektronischen Änderungen am Eisen eine größere Auswirkung auf die Schwingungsfrequenz des CO-Liganden als auf die der CN⁻-Liganden hat [69]. Zudem zeigt sich die höhere Sensitivität der CO-Schwingungen auch anhand der Frequenzabhängigkeit vom Redoxpotential, die für die CO-Schwingung eine größere Steigung aufweist als die CN⁻-Schwingung. Somit ist gerade die CO-Bande sehr charakteristisch für einen Zustand (Tabelle 6.1). Die CN⁻-Banden zeigen eine geringere Variabilität; mehrere Zustände besitzen CN⁻-Banden bei den gleichen Frequenzen. Der bessere Indikator für einen Zustand ist somit die Lage seiner CO-Bande.

Vergleicht man die Lage der Banden mit den für [NiFe]-Hydrogenasen anderer Spezies publizierten Absorptionsbanden [3,33], fällt auf, daß die Verschiebungen der Banden von einem Zustand zum nächsten immer in die gleiche Richtung erfolgen (Abbildung 6.4 und Tabelle 6.2). Das bedeutet, daß die Änderungen, die sich in der Koordinationssphäre des Eisens ereignen, in allen drei Enzymen vergleichbar sind. Hieraus kann geschlossen werden, daß zum einen die Intermediate der katalytischen Reaktion und zum anderen der Reaktionsmechanismus dieser drei homologen [NiFe]-Hydrogenasen recht ähnlich sind. In den oxidierten Zuständen Ni-A und Ni-B sowie im Zustand Ni-SU ist die Elektronendichte des Eisens gleichartig, da die Eisenliganden vergleichbare Absorptionsbanden aufweisen. Mit der Reduktion von Ni-B zu Ni-SIr kommt es zu einer Erhöhung der Elektronendichte auf dem Eisen, die über den Zustand Ni-SIa bis zum Zustand Ni-C wieder abnimmt, bis sie der der oxidierten Zustände entspricht. Dies zeigt sich in den zuerst abnehmenden Frequenzen (Ni-B: 1955 cm⁻¹ → Ni-SIr: 1922 cm⁻¹), die allmählich wieder zunehmen (Ni-SIr: 1922 cm⁻¹ → Ni-SIa: 1943 cm⁻¹ → Ni-C: 1961 cm⁻¹). Beim Übergang vom Zustand Ni-C zum Zustand Ni-R kommt es dann noch einmal zu einer Erhöhung der Elektronendichte am Eisen. Im Falle der oxidierten Zustände Ni-A und Ni-B ist der Vergleich der FTIR-Spektroskopie mit der EPR-Spektroskopie interessant. Während die FTIR-Spektroskopie keine deutlichen Unterschiede der Koordinationssphäre des Eisens nachweist (die Spektren sind nahezu identisch), unterscheiden sich die EPR-Spektren der beiden Zustände deutlich (vgl. Abbildung 2.4). Als „Sonde“ der EPR-Spektroskopie dient bei der [NiFe]-Hydrogenase das paramagnetische

6.3 FTIR-Spektren der einzelnen Redoxzustände

Tabelle 6.2: Vergleich der Absorptionsbanden der [NiFe]-Hydrogenasen dreier Spezies

Ni-A	CO	CN ⁻	CN ⁻
<i>D. gigas</i> [33]	1947	2083	2093
<i>A. vinosum</i> [3]	1945	2083	2093
<i>D. vulgaris</i>	1956	2084	2094
Ni-B	CO	CN	CN
<i>D. gigas</i>	1946	2079	2090
<i>A. vinosum</i>	1944	2079	2090
<i>D. vulgaris</i>	1955	2081	2090
Ni-SU	CO	CN ⁻	CN ⁻
<i>D. gigas</i>	1950	2089	2099
<i>A. vinosum</i>	1950	2089	2099
<i>D. vulgaris</i>	1946	2075	2086
Ni-SIr	CO	CN ⁻	CN ⁻
<i>D. gigas</i>	1914	2055	2069
<i>A. vinosum</i>	1911	2053	2067
<i>D. vulgaris</i>	1922	2056	2070
Ni-SIa	CO	CN ⁻	CN ⁻
<i>D. gigas</i>	1934	2075	2086
<i>A. vinosum</i>	1932	2074	2086
<i>D. vulgaris</i>	1943	2075	2086
Ni-C	CO	CN ⁻	CN ⁻
<i>D. gigas</i>	1952	2073	2086
<i>A. vinosum</i>	1950	2074	2087
<i>D. vulgaris</i>	1961	2074	2085
Ni-R	CO	CN ⁻	CN ⁻
<i>D. gigas</i>	1940	2060	2073
<i>A. vinosum</i>	1936	2059	2073
<i>D. vulgaris</i>	1948	2061	2074

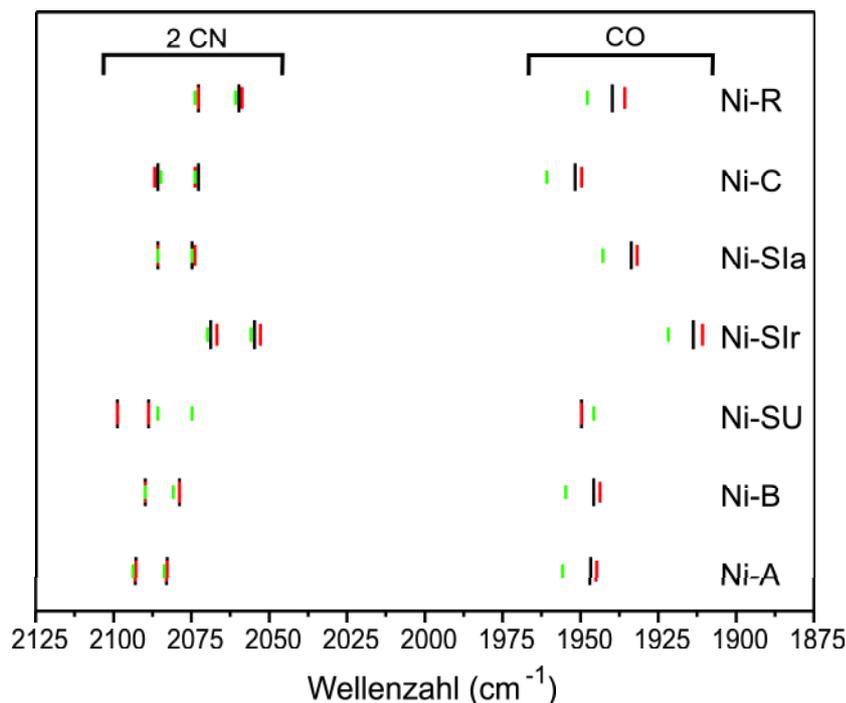


Abbildung 6.4: Überblick über die CO- und CN⁻-Banden, die bei den [NiFe]-Hydrogenasen der Spezies — *D. gigas* (entnommen aus [33]), — *A. vinosum* (entnommen aus [3]) und — *D. vulgaris* Miyazaki F gemessen wurden.

Nickelatom, so daß die EPR-Spektren die Eigenschaften des Nickels und seiner elektronischen Umgebung abbilden, die demnach bei den Zuständen Ni-A und Ni-B verschieden sind, was sich in den unterschiedlichen g -Tensoren ausdrückt. Die Liganden, die die Differenzen zwischen Ni-A und Ni-B ausmachen, wirken somit nur auf die elektronische Struktur des Nickels, nicht jedoch auf die des Eisens.

Der Vergleich der drei Spezies zeigt darüber hinaus, daß die Lage der CN⁻-Banden eines jeden Zustandes in allen Spezies nahezu identisch ist, d.h. Abweichung ergeben sich nur maximal +2 cm⁻¹ der Banden von *D. vulgaris* Miyazaki F zu den anderen beiden Spezies. Eine Ausnahme hiervon macht nur der Zustand Ni-SU. Auffällig ist jedoch die systematische Abweichung der CO-Banden um +10 cm⁻¹ der [NiFe]-Hydrogenase von *D. vulgaris* Miyazaki F im Vergleich zu den anderen beiden Enzymen.

Auswirkung auf die Frequenz der Schwingung der C=O-Bindung haben nur Moleküle, die sich in unmittelbarer Nähe zum CO-Liganden befinden und mit ihm in irgendeiner Art und Weise, sei es durch Bindung, van der Waals-Wechsel-

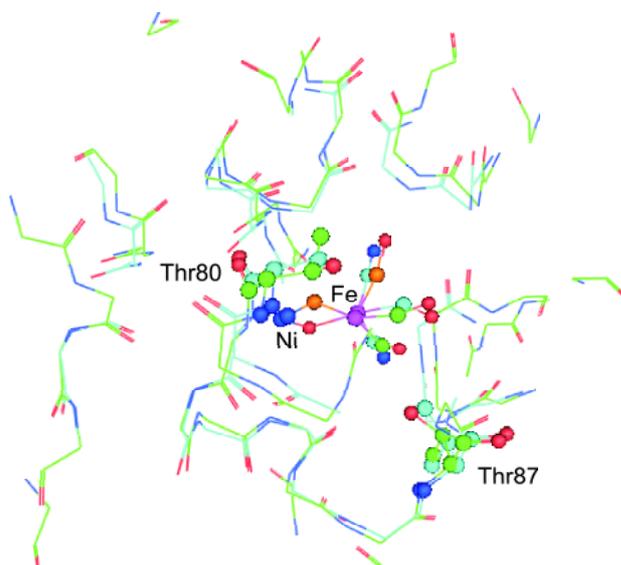


Abbildung 6.5: Vergleich der Kristallstrukturen der [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. vulgaris* Miyazaki F (PDB-Eintrag 1H2A [58], grüne Kohlenstoffatome, oranger Brückenligand) und *D. gigas* (PDB-Eintrag 2FRV [122], hellblaue Kohlenstoffatome, roter Brückenligand). Dargestellt ist ein Bereich mit einem Radius von 10 Å um das Nickelatom.

wirkung oder Wasserstoffbrückenbindung, wechselwirken. Da die Kristallstrukturen der beiden Enzyme aus *D. vulgaris* Miyazaki F [58] und *D. gigas* [122] bekannt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Vergleich der beiden Strukturen im Bereich des aktiven Zentrums sowie ihrer Aminosäuresequenzen durchgeführt (Abbildung 6.5). Der CO-Ligand wird in beiden Fällen von einer Reihe hydrophober Aminosäuren umgeben, zu denen Valin Val81, Leucin Leu82 und Prolin Pro501 (Numerierung für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F) gehören [32]. Die Aminosäuresequenz der Proteine in einem Radius von 5 Å um das Nickelatom herum ist nahezu identisch. Es ergeben sich nur zwei Abweichungen, die die Aminosäuren Threonin Thr80 und Thr87 betreffen. Diese sind in *D. gigas* gegen ein Alanin an der der Position 80 entsprechenden Stelle sowie ein Valin an der der Position 87 äquivalenten Stelle ausgetauscht. Diese Aminosäuren liegen jedoch deutlich zu weit vom CO-Liganden entfernt, als daß sich Auswirkungen auf die Frequenz der CO-Schwingung ergeben könnten (Abstand $C\alpha(\text{Thr}80)\text{--Fe}$: 6,04 Å; Abstand $C\alpha(\text{Thr}87)\text{--Fe}$: 8,33 Å). Der systematische Unterschied zwischen den beiden Enzymen beruht also auf einem Unterschied, der nicht mit Abweichungen in der Aminosäuresequenz begründet werden kann. So wäre z.B. denkbar, daß im Protein in seiner nativen Form

Wassermoleküle vorhanden sind, deren exakte Position in der Kristallstruktur oft nicht definiert werden kann. Die Wassermoleküle bilden zusammen mit den geladenen Aminosäuren ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, die zu Ladungsverschiebungen führen können, die ihrerseits wiederum in der Lage sind, die Frequenzverschiebung auch beim CO-Liganden zu bewirken.

6.4 pH-Wert-Abhängigkeit des Ni-SI-Zustandes

6.4.1 Ergebnisse

Die elektrochemischen Messungen wurden bei verschiedenen pH-Werten im Bereich zwischen den Werten pH 5,4 und pH 8,0 durchgeführt. In diesem Bereich ändert sich die Lage der Absorptionsbanden der einzelnen Zustände nicht. Im Falle des Zustandes Ni-SI allerdings, der bei einem pH-Wert von 7,4 zwei CO-Banden bei 1943 cm^{-1} und 1922 cm^{-1} sowie drei CN^- -Banden bei 2060 cm^{-1} , 2074 cm^{-1} und 2086 cm^{-1} aufweist, änderte sich das Verhältnis der Amplituden der beiden CO-Banden zueinander. Zudem änderten sich hier auch die Lagen der CN^- -Banden (Abbildung 6.6).

Bei einem pH-Wert von 5,4 wurde der Zustand Ni-SI hauptsächlich durch die CO-Bande bei 1943 cm^{-1} und die CN^- -Banden bei 2086 cm^{-1} und 2075 cm^{-1} repräsentiert. Die zweite CO-Bande bei 1922 cm^{-1} war nur zu einem sehr geringen Anteil präsent, ebenso wie eine weitere CN^- -Bande bei 2059 cm^{-1} . Mit zunehmendem pH-Wert vergrößerte sich der Anteil dieser beiden Banden. Bei einem pH-Wert von 7,8 besaßen die beiden CO-Banden ungefähr gleich große Amplituden. Zu erkennen ist zudem eine deutliche Verschiebung einer der CN^- -Banden von 2075 cm^{-1} bei pH 5,4 nach 2070 cm^{-1} bei pH 7,8. Bei einem pH-Wert von 8,0 überwog dann die CO-Bande bei 1922 cm^{-1} zusammen mit den CN^- -Banden bei 2056 cm^{-1} und 2070 cm^{-1} .

6.4.2 Diskussion

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß es zwei Formen des Zustandes Ni-SI gibt, die folgendermaßen charakterisiert werden können:

- 1. Form (Ni-SIa): $\tilde{\nu}_{\text{CO}} = 1943\text{ cm}^{-1}$, $\tilde{\nu}_{\text{CN}} = 2075\text{ cm}^{-1}$ und 2086 cm^{-1}
- 2. Form (Ni-SIr): $\tilde{\nu}_{\text{CO}} = 1922\text{ cm}^{-1}$, $\tilde{\nu}_{\text{CN}} = 2056\text{ cm}^{-1}$ und 2070 cm^{-1}

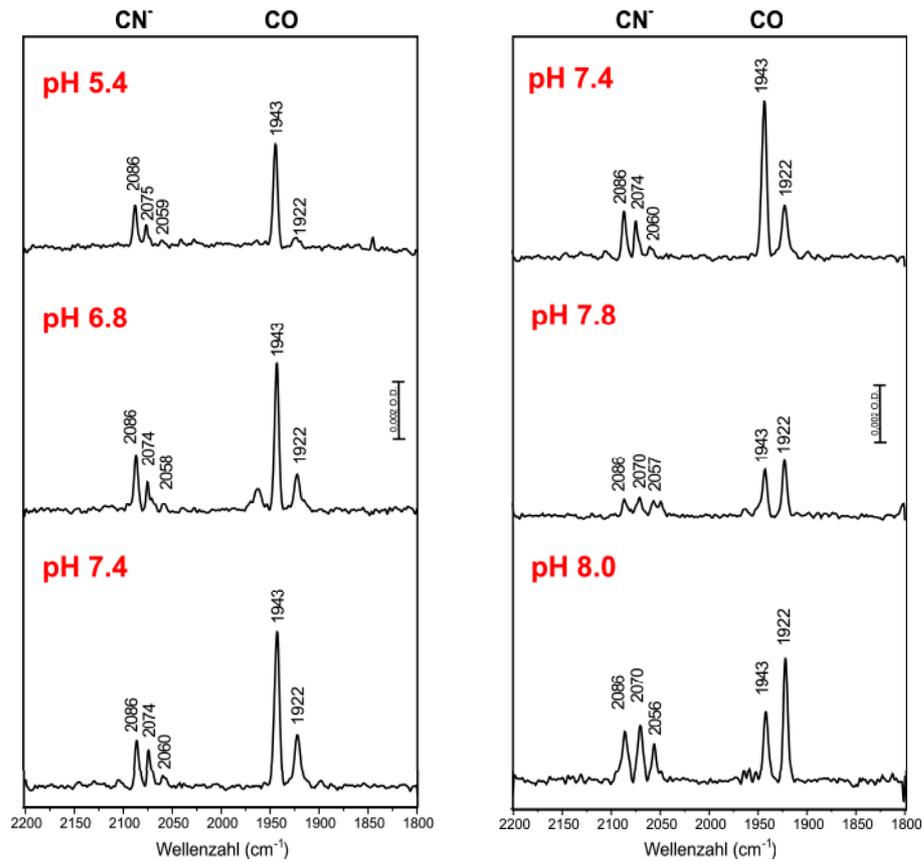


Abbildung 6.6: Die beiden Formen der Ni-SI-Zustände bei verschiedenen pH-Werten. Die Konzentration der [NiFe]-Hydrogenase betrug 1,5 mM in 25 mM Tris-Puffer mit 100 mM KCl und 125 μ M eines jeden Redoxmediators. Jedes Spektrum besteht aus 200 gemittelten Einzelspektren und wurde bei 303 K aufgenommen.

Die erste Form wird mit Ni-SIa, die zweite Form mit Ni-SIr bezeichnet. Diese Nomenklatur folgt De Lacey *et al.* [33], wobei *a* für *active* und *r* für *ready* steht. Diese beiden Zustände stehen in einem Säure-Base-Gleichgewicht miteinander, da ihr Verhältnis vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Hierbei stellt der Zustand Ni-SIa die protonierte Form dar, während der Zustand Ni-SIr die unprotonierte Form repräsentiert. Der pK_a -Wert des Ni-SI-Zustandes beträgt $pK_a = 7,8 \pm 0,1$, da bei diesem pH-Wert die Anteile der Zustände Ni-SIa und Ni-SIr gleich groß sind (s. Abbildung 6.7). Dieser Wert befindet sich im Bereich

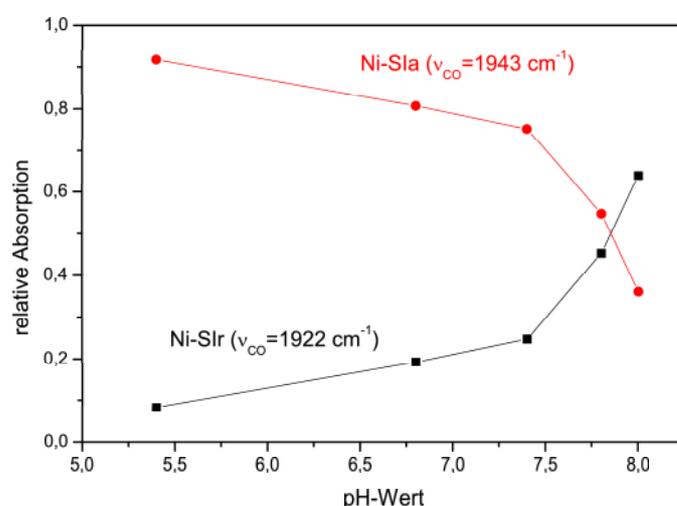


Abbildung 6.7: Darstellung der Abhängigkeit der relativen Absorption der CO-Banden der Ni-SI-Zustände vom pH-Wert. Der pK_a -Wert beträgt $7,8 \pm 0,1$. Die Berechnung der relativen Absorption wird in Kapitel 6.6 beschrieben.

der für Cystein-Thiole tabellierten pK_a -Werte [112]:

	pK _a -Wert bei 298 K		
	α-COOH-Gruppe	α-NH ₃ ⁺ -Gruppe	Seitengruppe
Cystein	1,8	10,8	8,3

So ist anzunehmen, daß in der Form Ni-SIa ein Cysteinrest protoniert vorliegt. Das Säure-Base-Gleichgewicht der zwei Ni-SI-Zustände wurde auch für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* beobachtet [33].

Die Verschiebung der Bande um $+20 \text{ cm}^{-1}$ beim Übergang von der unprotonierten Form Ni-SIr zur protonierten Form Ni-SIa steht im Einklang mit einer

Abnahme der Elektronendichte auf dem Eisen aufgrund der höheren eigenen Elektronendichte des Thiolates verglichen zu einem Thiol [33].

6.5 Die zusätzlichen Ni-R-Zustände

6.5.1 Ergebnisse

Betrachtet man das Spektrum des Zustandes Ni-R (Abbildung 6.2), zeigen sich neben den drei Hauptbanden des Zustandes bei 1948 cm^{-1} , 2061 cm^{-1} und 2074 cm^{-1} zwei weitere CO-Banden, deren Amplitude sehr klein ist. Die Frequenzen dieser zusätzlichen Banden betragen 1933 cm^{-1} und 1919 cm^{-1} . Die vierte in diesem Spektrum sichtbare CO-Bande hatte eine Frequenz von 1961 cm^{-1} und spiegelt den Anteil an Hydrogenase-Molekülen wider, die sich noch im Ni-C-Zustand befinden. Die Banden bei 1919 cm^{-1} und 1933 cm^{-1} tauchen jedoch nur bei sehr niedrigen Spannungen auf, also nur im vollständig reduzierten Zustand des Enzyms. Ihr Auftreten ist unabhängig vom pH-Wert; auch ihr Verhältnis zueinander ändert sich nicht bei veränderten pH-Werten.

6.5.2 Diskussion

Da die zusätzlichen Banden nur im Bereich stark negativer Spannungen auftreten, stellen sie Zustände dar, bei denen das Enzym sich in seiner am stärksten reduzierten Form befindet. Sie repräsentieren Subformen oder Intermediate des Ni-R-Zustandes, bei denen die elektronische Konfiguration des aktiven Zentrums von der des Enzyms im Ni-R-Zustand abweicht, so daß sich die Absorptionen verschieben. Sie werden mit Ni-R' bezeichnet. Vermutlich besitzen diese zusätzlichen Zustände ebenfalls CN^- -Banden, die jedoch aufgrund des geringen Anteils dieser Zustände und der wahrscheinlichen Überlappung mit den CN^- -Banden des Ni-R-Zustandes nicht aufzulösen sind.

Zusätzliche Ni-R-Zustände sind auch bei den [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. gigas* [122], *D. fructosovorans* [35] und *A. vinosum* [18] entdeckt und beschrieben worden. Diese Zustände zeigen jedoch eine pH-Wert-Abhängigkeit und werden deshalb unterschiedlichen Protonierungszuständen des reduzierten aktiven Zentrums zugeordnet.

6.6 Potentiometrische Titration

Die potentiometrischen Titrations dienen der Bestimmung der Mittelpunktpotentiale der einzelnen Redoxgleichgewichte zwischen den Zuständen. Hierzu wurde im Potentialbereich zwischen -600 mV und $+200$ mV zu jeder angelegten Spannung ein FTIR-Spektrum aufgenommen, um die spektralen Veränderungen während der Redoxübergänge in Abhängigkeit der Spannung beobachten zu können. Zur Analyse der Daten wurde die charakteristische CO-Bande eines jeden Zustandes als Referenz herangezogen. Die relative Absorption der CO-Bande wurde ermittelt, indem zunächst die absoluten Absorptionen jeder CO-Bande des zu analysierenden Spektrums summiert wurden und dieser Wert als relative Absorption von 1,0 festgelegt wurde. Die relative Absorption des Einzelzustandes wurde als Anteil des Zustandes an der gesamten Probe betrachtet, indem die absolute Absorption des Einzelzustandes durch die Summe aller absoluten Absorptionen dividiert wurde. So erhielt man die Abhängigkeit der relativen Absorption der CO-Bande eines Zustandes vom angelegten Potential. Der relative Fehler dieser Rechenoperation kann mit $\pm 1\%$ angegeben werden.

Da es sich um Redoxprozesse handelt, konnten die sich ergebenden Datenpunkte mit Hilfe der Nernst-Gleichung angefitet werden, um das Mittelpunktpotential des Überganges von einem in den nächsten Zustand zu bestimmen:

$$E_h = E'_m - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]} \quad (6.1)$$

Hierbei ist E_h = gemessenes Halbzellenpotential, das dem an der OTTLE-Zelle anliegenden Potential entspricht, E'_m = Mittelpunktpotential (formales Potential) der Reaktion bei gegebenem pH-Wert und Temperatur, R = allgemeine Gaskonstante, T = Temperatur in K, n = Anzahl der übertragenden Elektronen, F = Faraday-Konstante, $[\text{Ox}, \text{Red}]$ = Konzentration der oxidierten und reduzierten Moleküle. Um die Datenpunkte der Titrationskurven anzufitten, wurde folgende Gleichung zugrunde gelegt, die sowohl das Entstehen als auch das Verschwinden eines Zustandes in Betracht zog:

$$y = \left(\frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - E'_m \text{ auf}}{RT/nF}}} + A_2 \right) + \left(\frac{A_3 - A_4}{1 + e^{\frac{E'_m \text{ ab} - x}{RT/nF}}} + A_4 \right) \quad (6.2)$$

Hierbei sind $A_{1,3}$ = minimale relative Absorptionen, $A_{2,4}$ = maximale relative Absorptionen, $E'_m \text{ auf}$ = Mittelpunktpotential der Entstehung eines Zustandes in

mV, $E'_m{}^{ab}$ = Mittelpunktspotential des Verschwinden eines Zustandes in mV. Bei einer Temperatur von 303 K vereinfacht sich der Ausdruck $e^{\frac{x-E'_m}{RT/nF}} = 10^{\frac{x-E'_m}{\ln 10 \cdot RT/nF}}$ zu $10^{\frac{x-E'_m}{60 \text{ mV}/n}}$.

6.6.1 Ergebnisse

Die potentiometrischen Titrations wurden bei verschiedenen pH-Werten im Bereich zwischen pH 5,4 und pH 8,0 durchgeführt und sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Der Redoxübergang Ni-A/Ni-SU konnte nur bei einem pH-Wert von 6,0 durchgeführt werden. Zur Anreicherung des Zustandes Ni-A ist eine Vorbehandlung der Probe notwendig (vgl. Kapitel 6.1.3), die nur bei diesem pH-Wert zu einer überwiegenden Menge an Molekülen im Zustand Ni-A führte. Im Falle des Zustandes Ni-SI wurden zur Darstellung der Titrationskurve die relativen Absorptionen der beiden Zustände Ni-SI_r und Ni-SI_a unter der Annahme addiert, daß die beiden Zustände den gleichen Extinktionskoeffizienten besitzen. Zur Bestimmung der Mittelpunktspotentiale aus diesen Titrationskurven wurde von jedem Übergang der Wert E'_m , der dem Mittelpunktspotential entspricht, sowie sein Fehler aus den Fitergebnissen abgelesen. Damit erhielt man für jeden Redoxübergang zwei E'_m -Werte, von denen einer der Abnahme des Anfangszustandes und der zweite der Zunahme des Endzustandes zuzuordnen ist. Diese beiden Werte wichen nicht mehr als 15 mV voneinander ab. Das Mittelpunktspotential des Redoxüberganges wurde als Mittelwert dieser beiden Werte definiert (Tabelle 6.3). Aus den Werten ergibt sich, daß zunächst mit zunehmendem

Tabelle 6.3: Mittelpunktspotentiale der verschiedenen Redoxübergänge der [NiFe]-Hydrogenase.

pH	E'_m A/SU	E'_m B/SI	E'_m SI/C	E'_m C/R
6,0	-96 ± 5 mV			
5,4		-69 ± 3 mV	-246 ± 3,5 mV	-354,5 ± 4 mV
6,8		-136,5 ± 1,5 mV	-311 ± 2 mV	-426,5 ± 3 mV
7,4		-149,5 ± 3 mV	-372,5 ± 5 mV	-437 ± 5,5 mV
7,8		-162,5 ± 2mV	-336,5 ± 3 mV	-411,5 ± 4 mV
8,0		-145 ± 3,5 mV	-342 ± 5 mV	-405,5 ± 8,5 mV

pH-Wert von 5,4 nach 7,4 die Mittelpunktspotentiale abnehmen. Bei weiterer Zunahme des pH-Wertes bis 8,0 schwanken sie dann allerdings um einen Pla-

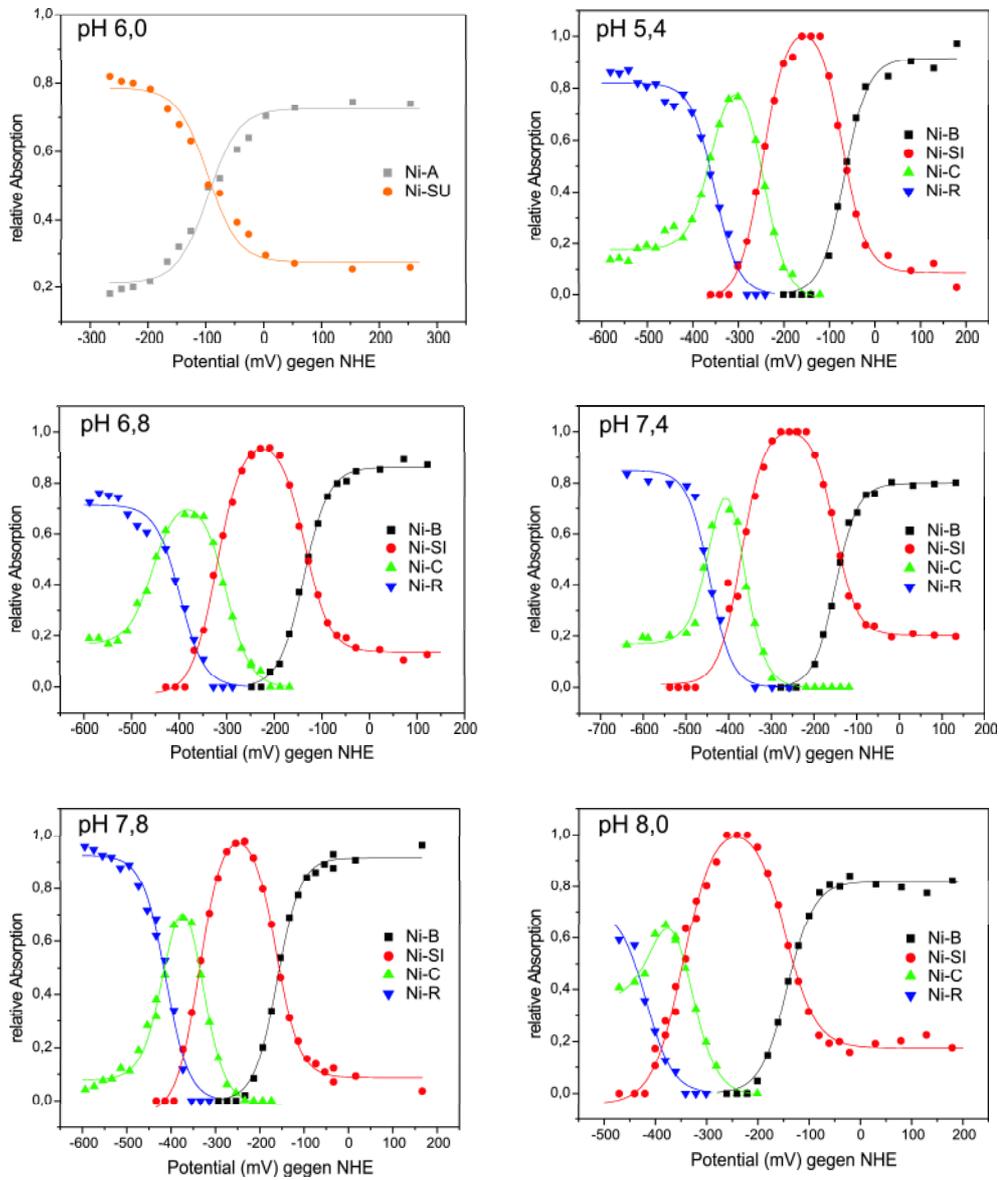


Abbildung 6.8: Bestimmung der Mittelpunktpotentiale der verschiedenen Redoxübergänge der [NiFe]-Hydrogenase. Dargestellt sind die relativen Absorptionen der CO-Banden eines jeden Zustandes gegen das angelegte Potential. Jeder dieser Datenpunkte wurde aus einem FTIR-Spektrum mit 200 gemittelten Einzelspektren gewonnen. Die durchgezogenen Linien sind Fits der Datenpunkte mit Hilfe der Gleichung 6.2 und unter der Annahme von $n=1$. Die Standardabweichungen χ^2 der Fits betragen $\chi^2 < 0,001$ und die Korrelationskoeffizienten R^2 nahmen Werte zwischen 0,95 und 0,99 an.

teauwert. Abbildung 6.9 verdeutlicht diesen Zusammenhang.

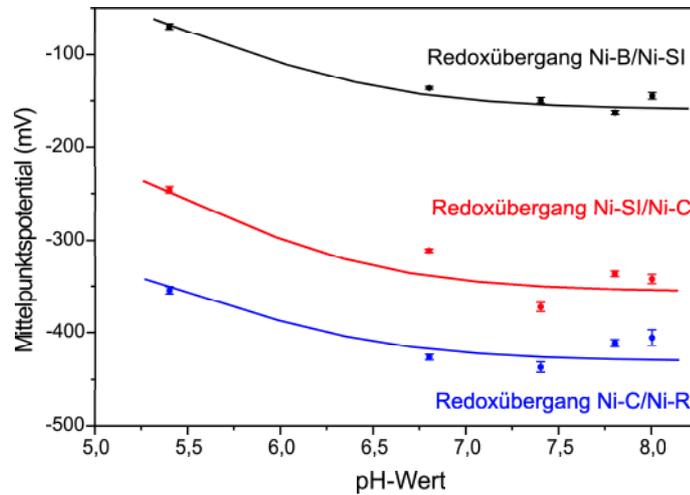


Abbildung 6.9: Abhängigkeit der Mittelpunktpotentiale der verschiedenen Redoxübergänge in der [NiFe]-Hydrogenase vom pH-Wert. Bei den Kurven, die die Datenpunkte miteinander verbinden, handelt es sich nicht um einen Fit, sondern nur um eine Ausgleichskurve, die einem Teil einer Boltzmann-Kurve entspricht und den Charakter der Abhängigkeit verdeutlichen soll.

Neben der Durchführung der Redox-titrations wurde versucht, die Kinetiken der Aktivierung und der Inaktivierung zu untersuchen, indem die zeitliche Änderung des Spektrums während des Anlegens eines Potential beobachtet wurde. Im Falle der Aktivierung wurde an eine Probe im *as isolated* Zustand ein Potential von -450 mV angelegt, um die aktiven Zustände Ni-C und Ni-R zu erreichen, während zur Inaktivierung eine Probe im Zustand Ni-SI bei 0 mV oxidiert wurde, um zum Zustand Ni-B zu gelangen. In beiden Fällen verlief die Reaktion sehr schnell; der Endzustand wurde in dem Zeitraum erreicht, in dem die elektrochemischen Äquilibriumierung der OTTLE-Zelle noch nicht abgeschlossen war (ca. 3 min). Dies machte eine Auswertung der kinetischen Daten unmöglich.

6.6.2 Diskussion

Bei genauer Betrachtung der Abbildung 6.8 fällt auf, daß die Redox-titrations nicht vollständig ablaufen. Die Darstellung der relativen Absorption gegen das angelegte Potential zeigt Abweichungen von 0% bzw. 100% eines Zustandes. In diesen Fällen gab es Potentialbereiche, bei dem Mischungen zweier Zustände

vorlagen; Anreicherungen nur eines Zustandes in Reinform waren nicht möglich. So blieb bei allen pH-Werten ein Rest der Moleküle während der Oxidation immer im Zustand Ni-SIr. Auch bei der Reduktion bei negativen Spannungen wurden nicht alle Moleküle, die sich im Zustand Ni-C befanden, zum Zustand Ni-R reduziert. Die Erniedrigung des Potentials unter ca. -600 mV war bei einem pH-Wert von 7,8 und 8,0 nicht möglich, da dann die Probe austrocknete und das Protein denaturierte.

Die Tatsache, daß der Aktivierungsprozeß von Ni-A und Ni-B nach Ni-R und der Inaktivierungsprozeß von Ni-SI nach Ni-B innerhalb von wenigen Minuten abgeschlossen sind, steht im Gegensatz zu dem, was für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* beobachtet wurde. Hier war ein maximales Signal des Ni-R-Zustandes erst nach 77 min bei einer Temperatur von 313 K erreicht. Für die Inaktivierung wurde hier eine kinetische Barriere von 79 kJ/mol ermittelt. Die Redoxreaktion Ni-B/Ni-SI war nicht reversibel; in die oxidative Richtung konnte kein Gleichgewicht erreicht werden [33]. Aufgrund der Tatsache, daß die FTIR-Spektren der Zustände Ni-A und Ni-B sehr ähnlich sind und die Banden teilweise überlappen, ist es sehr schwer, das Verhältnis von Molekülen im Ni-A-Zustand zu solchen im Ni-B-Zustand in einer *as isolated*-Probe abzuschätzen. So ist denkbar, daß der Anteil an Ni-B in den hier untersuchten Proben recht hoch war, so daß die Aktivierungsreaktion schnell abgeschlossen war. EPR-Messungen an Proben im *as isolated*-Zustand der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F belegen, daß der Anteil der Moleküle im Ni-A-Zustand im Allgemeinen zwischen 20% und 40% liegt. Auch für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* wurde festgestellt, daß die Reduktion von Ni-B ein schneller Prozeß ist [33]. Die Tatsache, daß die Aktivierung einer *as isolated*-Probe im Falle von *D. gigas* so lange dauert, könnte mit einem höheren Anteil an Molekülen im Ni-A-Zustand erklärt werden. Dafür spricht auch, daß während der Reduktion der Zustand Ni-SU transient beobachtet werden konnte, was in der hier vorliegenden Untersuchung nicht der Fall war.

Die Redoxtitrationen wurden durchgeführt, um die Mittelpunktspotentiale bei verschiedenen pH-Werten der einzelnen Übergänge zu bestimmen. Die Titrationskurven konnten mathematisch durch eine Nernst-Gleichung beschrieben werden. Die besten Anpassungen ergaben sich bei der Annahme, daß bei jedem Übergang ein Elektron übertragen wird ($n=1$). Die Daten zeigen darüber hinaus, daß das Mittelpunktspotential pH-Wert-abhängig ist. Das bedeutet, daß die Redoxreaktion von einer Änderung des Protonierungszustandes begleitet wird.

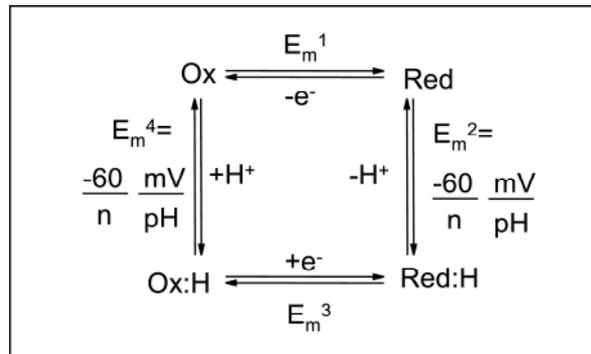
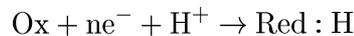
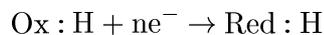
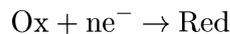


Abbildung 6.10: Rechteckschema für einen Redoxprozeß, der mit einer Protonierungsreaktion gekoppelt ist. Modifiziert nach [22, 71].

Die Änderung des Mittelpunktspotentials pro pH-Einheit läßt sich mit Hilfe der Nernst-Gleichung theoretisch bestimmen. Sie beträgt für den Fall, daß der pH-Wert mindestens eine pH-Einheit von den pK-Werten der oxidierten und reduzierten Spezies entfernt ist, bei Ein-Elektronenübergängen und einer Temperatur von 303 K $-60 \text{ mV/pH-Einheit}$ [22] (Abbildung 6.10). In diesem Falle ist die oxidierte Spezies unprotoniert, die reduzierte Spezies jedoch protoniert:



Ist der pH-Wert jedoch größer als der pK-Wert der reduzierten Spezies oder kleiner als der pK-Wert der oxidierten Spezies, ist das Mittelpunktspotential pH-unabhängig, da im ersteren Falle beide Spezies deprotoniert und im letzteren Falle protoniert sind:



Die Beziehung zwischen dem Mittelpunktspotential und dem pH-Wert wird in einem sogenannten *Pourbaix-Diagramm* (benannt nach seinem Entdecker Marcel Pourbaix, [100]) dargestellt (Abbildung 6.11). Abbildung 6.9 zeigt diese Pourbaix-Diagramme für die Redoxübergänge der [NiFe]-Hydrogenase. Vergleicht man diese mit dem Schema in Abbildung 6.11, kann man den Plateaubereich um den pK-Wert der reduzierten Spezies identifizieren. Er beginnt bei einem pH-Wert von ca. 6,5. Hier ist der pH-Wert größer als der pK_{red} -Wert und das Mittelpunktspotential unabhängig vom pH-Wert. Bei den kleineren pH-Werten ist das Mittelpunktspotential dagegen abhängig vom pH-Wert, was

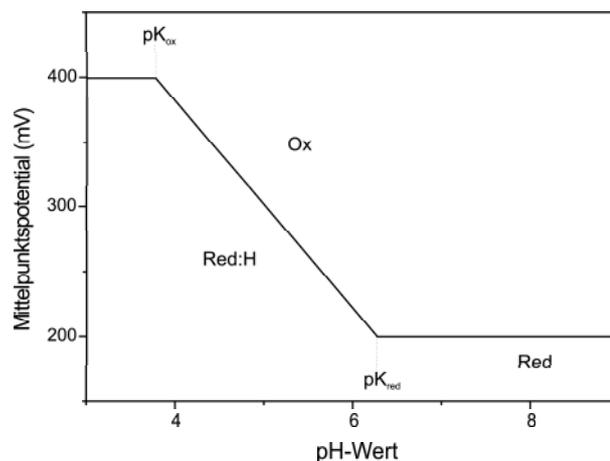


Abbildung 6.11: Vereinfachtes Pourbaix-Diagramm für eine Ein-Elektron-Ein-Proton-Reaktion.

sich an der Steigung im Pourbaix-Diagramm (Abbildung 6.9) bemerkbar macht. Der Plateauwert in der Nähe des pK_{ox} fehlt jedoch, da es nicht möglich ist, in einem pH-Bereich unterhalb von $pH = 5,4$ Messungen an der [NiFe]-Hydrogenase durchzuführen. Aus diesem Diagramm kann man zudem den pK_{red} -Wert der einzelnen Übergänge abschätzen. Er beträgt für alle Redoxübergänge $pK_{red} \approx 6,5 - 7$. Daraus läßt sich schließen, daß die Gruppen, die bei den Redoxübergängen protoniert werden, alle einen vergleichbar großen pK -Wert besitzen.

Das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase ist von vier Cysteinen umgeben, welche theoretisch alle protonierbar sind. Somit wäre denkbar, daß an die Schwefelatome dieser Cysteine während der Redoxreaktionen Protonen binden, da der pK -Wert einer Cystein-Thiol-Gruppe bei $pK \approx 8$ liegt [112]. Andererseits ist genauso denkbar, daß andere protonierbare Aminosäurereste diese Protonen aufnehmen, z.B. Glutamat oder Aspartat, wobei auch hier der tabellierte pK -Wert vom gemessenen abweicht; er liegt bei 4,3, bzw. 3,9 [112]. Für ein Glutamat als Akzeptor eines Protons während des katalytischen Zyklusses spricht eine molekularbiologische Studie an der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. fructosovorans*, bei der ein konservierter Glutamatrest (Glu34) gegen ein Glutamin ausgetauscht wurde. Die Mutante zeigte eine deutlich geringere katalytische Aktivität [34]. Redox-titrationen sind nicht nur am IR-Signal des CO-Liganden verfolgt worden, sondern auch am Nickel-Signal mittels EPR-Spektroskopie. Tabelle 6.4 gibt einen Überblick über die publizierten Mittelpunktpotentiale im Vergleich

Tabelle 6.4: Übersicht über publizierte Mittelpunktspotentiale verschiedener [NiFe]-Hydrogenasen

Organismus	Redoxübergang	E'_m	pH	Δ/pH	Referenz
<i>D. gigas</i>	Ni-A/Ni-SU	-145 mV	7,2	-60 mV	[26]
<i>D. gigas</i>	Ni-A/Ni-SU	-220 mV	8,5	-	[114]
<i>D. gigas</i>	Ni-SI/Ni-C	-300 mV	8,5	-	[115]
	Ni-C/Ni-R	-370 mV	8,5	-	
<i>D. gigas</i>	Ni-SI/Ni-C	-270 mV	7,0	-120 mV	[27]
	Ni-C/Ni-R	-390 mV	7,0	-60 mV	
<i>D. gigas</i>	Ni-A/Ni-SU	-150 mV	7,0	-	[116]
<i>D. gigas</i>	Ni-B/Ni-SI	-140 mV	8,0	-	[102]
	Ni-SI/Ni-C	-330 mV	8,0	-	
	Ni-C/Ni-R	-405 mV	8,0	-	
<i>D. gigas</i>	Ni-A/Ni-SU	-230 mV	8,0	-55 mV	[33]
	Ni-B/Ni-SI	-150 mV	8,0	-36 mV	
	Ni-SI/Ni-C	-380 mV	8,0	-47 mV	
	Ni-C/Ni-R	-445 mV	8,0	-43 mV	
<i>A. vinosum</i>	Ni-A/Ni-SU	-82 mV	6,4	-36 mV	[18]
	Ni-A/Ni-SU	-190 mV	9,4	-36 mV	
	Ni-B/Ni-SI	-77 mV	6,4	-33 mV	
	Ni-B/Ni-SI	-175 mV	9,4	-33 mV	
<i>D. vulgaris</i>	Ni-A/Ni-SU	-96 mV	6,0	-	diese Arbeit
	Ni-B/Ni-SI	-145 mV	8,0	-30 mV	
	Ni-SI/Ni-C	-342 mV	8,0	-37 mV	
	Ni-C/Ni-R	-405 mV	8,0	-43 mV	

zu den in dieser Arbeit vorgestellten Potentiale für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F. Dieser Vergleich zeigt, daß die verschiedenen Redoxübergänge bei allen drei Enzymen Mittelpunktspotentiale aufweisen, die bei gleichem pH-Wert nur geringfügig voneinander abweichen. Die pH-Wert-Abhängigkeiten werden von den einzelnen Autoren, sofern sie gemessen wurden, mit Werten angegeben, die kleiner oder gleich -60 mV/pH-Wert-Einheit sind. Einzige Ausnahme ist das Redoxpotential des Ni-SI/Ni-C-Übergangs der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas*, das bei einer EPR-spektroskopischen Redox-titration eine pH-Wert-Abhängigkeit von -120 mV/pH aufwies [27]. Dies wurde durch IR-spektroelektrochemische Titrations jedoch später widerlegt [33] (vgl. Tabelle 6.4). Unabhängig davon, ob die Redox-titrations mit Hilfe der EPR-Spektroskopie am Nickel oder der FTIR-Spektroskopie am Eisen durchgeführt wurden, zeigt sich für alle drei Enzyme, daß bei jedem Redoxübergang ein Proton übertragen wird, da die pH-Wert-Abhängigkeit maximal -60 mV/pH beträgt, und die Datenpunkte der Titrations unter der Annahme eines Ein-Elektronen-Übergangs am besten angepasst werden konnten.

Die Tatsache, daß die EPR-spektroskopischen Titrations, die Änderungen am Nickel aufzeigen, und die FTIR-spektroskopischen Titrations, die Änderungen am Eisen widerspiegeln, in bezug auf das Mittelpunktspotential und dessen pH-Wert-Abhängigkeit zu den gleichen Ergebnissen führen, lassen den Schluß zu, daß diese beiden Metallatome elektronisch stark interagieren. Wird die Hydrogenase, die sich in einem bestimmten Redoxzustand befindet, um ein Elektron reduziert, führt dies zum einen zu einer Änderung des Nickel-EPR-Signals und zum anderen zu einer Frequenzverschiebung der Absorptionen der Eisenliganden. Dies äußert sich in beiden Fällen in veränderten Spektren, die Analyse der Redox-eigenschaften zeigt jedoch, daß den Änderungen die gleichen Ursachen zugrunde liegen.

6.7 Implikationen für den Reaktionsmechanismus

Basierend auf den Ergebnissen der publizierten Untersuchungen der [NiFe]-Hydrogenasen wurden zunächst Reaktionsmechanismen postuliert, die das Nickel als einziges Metallatom im aktiven Zentrum betrachteten [2,12,27,101,115,116]. Nach der Lösung der Kristallstruktur der Hydrogenase und der Entdeckung des Eisens mit seinen drei Liganden als weitere Bestandteile des aktiven Zentrums wurden Mechanismen formuliert, die dies und weitere spektroskopische

und elektrochemische Untersuchungsergebnisse berücksichtigen [44, 68, 74, 122]. Hinzu kamen weitere Hypothesen zum katalytischen Zyklus der Hydrogenase, die aufgrund von quantenchemischen Berechnungen aufgestellt wurden [5, 30, 31, 83, 91, 97, 111].

Aufgrund der EPR-spektroskopischen Messungen sind folgende Eigenschaften der Redoxzustände bekannt: Ni-A, Ni-B und Ni-C sind paramagnetisch (mit $S=\frac{1}{2}$), können also nur die formale Oxidationsstufe +III oder +I besitzen. Der [3Fe4S]-Cluster ist in den Zuständen Ni-A und Ni-B oxidiert, ansonsten reduziert. Die [4Fe4S]-Cluster sind in den Zuständen Ni-C und Ni-SI reduziert, ansonsten oxidiert. Der Brückenligand in Ni-B ist sehr wahrscheinlich ein OH^- und in Ni-C ein H^- (s. Kapitel 2.3). Die FTIR-spektroskopischen Untersuchungen belegen, daß die formale Oxidationsstufe des Nickels zwischen +III und +II wechselt: Die Reduktion von Ni-B zu Ni-SI führt zu einer Erniedrigung der Schwingungsfrequenz des CO-Liganden um ca. 20 cm^{-1} . Die damit einhergehende Zunahme der Elektronendichte am Eisen ist mit der Reduktion des Nickels von Ni^{III} nach Ni^{II} konsistent. Bei Reduktion von Ni-SI nach Ni-C erhöht sich die Frequenz wieder, was bedeutet, daß die Elektronendichte am Eisen wieder abnimmt und das Nickel von Ni^{II} nach Ni^{III} oxidiert wird und nicht weiter zu Ni^{I} reduziert wird. Die Annahme eines Nickels mit der formalen Oxidationsstufe +III im Zustand Ni-C wird auch aufgrund von EPR-Messungen [115, 116], HYSCORE-Messungen [20, 43], EXAFS-Messungen [29] und DFT-Rechnungen [83, 109] gefordert.

Der katalytische Zyklus, der schematisch in Abbildung 6.12 dargestellt ist, beginnt zunächst mit der Aktivierung des Enzyms, wobei es vom oxidierten Zustand Ni-B in einen reduzierten Zustand übergeht. Dabei wird der Brückenligand OH^- protoniert und verläßt als H_2O das aktive Zentrum. Das Proton hierzu stammt aus der wässrigen Lösung, in der sich das Protein befindet. Zwischen der Wiederbesetzung der Brückenposition durch ein neues OH^- und dessen Protonierung verbunden mit dem Verlassen des Wassers der Brückenposition stellt sich ein Gleichgewicht ein. Dies wird erst dann verschoben, wenn Wasserstoff im Überschuß vorhanden ist. Denkbar wäre, daß die Elektronen, die notwendig sind, um das aktive Zentrum und den [3Fe4S]-Cluster zu reduzieren, so daß der Zustand Ni-SI entsteht, durch ein Wasserstoffmolekül (H_2) zur Verfügung gestellt werden. In zwei hypothetischen, nicht stabilisierbaren Intermediaten bindet ein Wasserstoffmolekül zunächst an das Nickel, das immer noch die formale Oxidationsstufe Ni^{III} besitzt. Dort wird aufgrund der Bindung an das

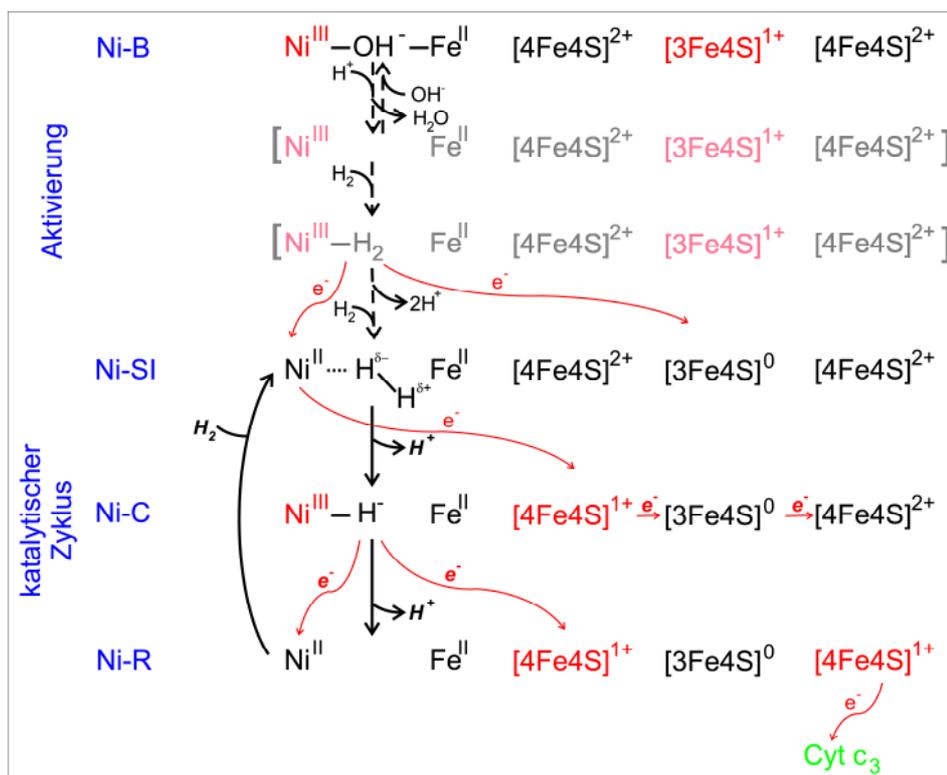


Abbildung 6.12: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der [NiFe]-Hydrogenase basierend auf den Ergebnissen der FTIR-Spektroelektrochemie. Rot markierte Cluster sind paramagnetisch und damit durch die EPR-Spektroskopie detektierbar. Die Zustände in eckigen Klammern symbolisieren hypothetische, nicht stabilisierbare Intermediate. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen die Aktivierungsreaktion, die durchgezogenen Pfeile den katalytischen Zyklus, in dem das zu spaltene H₂ in seine Bestandteile (zwei H⁺ und zwei Elektronen) kursiv dargestellt sind.

Nickel die H-H-Bindung gelockert, ein Elektron reduziert den [3Fe4S]-Cluster mit seinem recht hohen Mittelpunktpotential von -70 mV [116] und ein weiteres das Nickel. Die Protonen verlassen das aktive Zentrum durch ein Netzwerk aus Wassermolekülen oder ein Protonentransferweg, der durch protonierbare Aminosäuren gebildet wird. Die Position des Brückenliganden ist dann wieder frei und im Zustand Ni-SI kann erneut ein Wasserstoffmolekül binden. Die Reduktion des Ni-B geht einher mit einer Erhöhung der Elektronendichte am Eisen. Diese wird ausgelöst durch die Reduktion des Nickels um ein Elektron. Zudem trägt der Austausch des Brückenliganden von einem OH⁻, welches eine hohe Elektronendonorfähigkeit besitzt, gegen ein Wasserstoffmolekül mit einer sehr viel geringeren Elektronendonorfähigkeit zur Erhöhung der Elektronen-

dichte bei. Die mit der Reduktion verbundene Protonierung hingegen dämpft den Effekt und führt zu einer Verminderung der Elektronendichte. Dennoch überwiegen die zuerst genannten Effekte, so daß daraus eine Frequenzverschiebung zu kleineren Wellenzahlen resultiert.

Bei einer Bindung eines Wasserstoffmoleküls an das Nickel im Zustand Ni-SI kommt es zur Polarisierung der H-H-Bindung, bei dem das H-Atom, das dem Nickel am nächsten kommt, eine negative Partialladung tragen wird, während das H-Atom, welches weiter entfernt vom Nickel lokalisiert ist und nur über das erste H-Atom mit ihm verbunden ist, partiell positiv geladen sein wird (Abbildung 6.12). Es ist bekannt, daß Nickel die Schwächung der H-H-Bindung katalysiert [116], so daß im nun folgenden Übergang von Ni-SI zu Ni-C diese Bindung gespalten wird. Die Spaltung der H-H-Bindung wird durch die Anwesenheit einer Base unterstützt, die ein Proton aufnehmen kann. Diese Base, die in elektrostatische Wechselwirkung zu dem H-Atom mit der positiven Partialladung tritt, kann zum einen ein H_2O oder ein OH^- -Ion des Puffers sein, in dem sich die Hydrogenase befindet, zum anderen ein Aminosäurerest, der protonierbar und in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert ist, wie z.B. ein koordinierendes Cystein oder das in den Standardhydrogenasen konservierte Glutamat Glu34, dessen Austausch gegen ein Glutamin zu einer verminderten Aktivität führte. Ein Proton verläßt somit das aktive Zentrum durch Protonierung einer Base, ein Hydrid bleibt als Brückenligand zurück. Bei der Reaktion wird ein Elektron des Nickels auf den proximalen [4Fe4S]-Cluster übertragen [50], so daß das Nickel zu Ni^{III} zurück oxidiert wird. Die Reoxidation bewirkt, wie oben schon angedeutet, die Erniedrigung der Elektronendichte des Eisens, was in der Frequenzverschiebung zu größeren Wellenzahlen sichtbar wird. In diesem Fall trägt die Protonierung, die durch die pH-Wert-abhängigen Redox titrationen bewiesen wurde, mit zu einer Abnahme der Elektronendichte bei und verstärkt die Frequenzverschiebung. Der Wechsel des Brückenliganden zu einem Hydrid führt hingegen zu einer Elektronendichteerhöhung, kann den Nettoeffekt der Frequenzerhöhung jedoch nicht umkehren. Die Frequenzverschiebung ist hier im Vergleich der drei betrachteten Redox titrationen mit 18 bzw. 39 cm^{-1} am größten, da hier zwei Effekte in die gleiche Richtung wirken (Ni-SIa (1943 cm^{-1}) \rightarrow Ni-C (1961 cm^{-1}): $\Delta = 18 \text{ cm}^{-1}$; Ni-SIr (1922 cm^{-1}) \rightarrow Ni-C (1961 cm^{-1}): $\Delta = 39 \text{ cm}^{-1}$).

Der Übergang von Ni-C zu dem am stärksten reduzierten Zustand Ni-R ist wiederum begleitet von einer Frequenzabnahme, d.h. einer Erhöhung der Elek-

tronendichte des Eisens. Diese beruht auf der Reduktion des Nickels um ein Elektron. Die Protonierung, die mit der Redoxreaktion verbunden ist, und die Änderung des Brückenliganden vom Hydrid zu einer freien Bindestelle bewirken eine Erniedrigung der Elektronendichte und dämpfen damit das Ausmaß der Frequenzerniedrigung, so daß diese hier nur 13 cm^{-1} beträgt (Ni-C (1961 cm^{-1}) \rightarrow Ni-R (1948 cm^{-1}): $\Delta = 13\text{ cm}^{-1}$). Wie auch schon bei der Redoxreaktion Ni-B/Ni-SI bestimmt hier hauptsächlich die Reduktion des Nickels das Ausmaß der Frequenzverschiebung. Da sich das Nickel in unmittelbarer Nähe zum Eisen befindet, üben die Änderungen der Elektronenkonfiguration des Nickels den größten Einfluß auf die Elektronendichte des Eisens aus. Ein Elektron des Hydrids reduziert nun formal das Nickel, das zweite Elektron den proximalen [4Fe4S]-Cluster, während das übrigbleibende Proton das aktive Zentrum verläßt. Nun kann der katalytische Zyklus erneut beginnen. Die [FeS]-Cluster übertragen ihrerseits ihre Elektronen auf einen Elektronenakzeptor (in der Zelle Cytochrom c_3 , im Aktivitätstest z.B. der artifizielle Elektronenakzeptor Methyl- oder Benzylviologen).

In vielen der bisher publizierten Reaktionsmechanismen wird postuliert, daß die Bindestelle des Brückenliganden im Zustand Ni-SI unbesetzt bleibt und im Zustand Ni-R ein Wasserstoffmolekül am aktiven Zentrum assoziiert ist [5,30,31,71,75,91,97,107]. Anhand der Frequenzverschiebungen im IR-Spektrum dieser beiden diamagnetischen Zustände läßt sich zwischen dem oben beschriebenen Modell und den publizierten Vorschlägen nicht unterscheiden, da beide Möglichkeiten die gleichen Auswirkungen auf die Änderung der Elektronendichte am Eisen bewirken. Der Übergang von Ni-B nach Ni-SI ist begleitet vom Austausch des OH^- als Brückenliganden. Ob dieser nun gegen ein H_2 ausgetauscht wird oder die Bindestelle frei bleibt, bewirkt in beiden Fällen eine Erniedrigung der Elektronendichte am Eisen. Eine ähnliche Situation findet man im Falle des Übergangs von Ni-SI nach Ni-C. Auch hier bewirkt sowohl der Austausch des Hydrids gegen eine freie Bindestelle als auch gegen die Bindung eines H_2 die Erniedrigung der Elektronendichte. Fraglich ist jedoch, woher das Elektron kommt, das benötigt wird, wenn der katalytische Zyklus im Zustand Ni-SI mit der Aufnahme eines H_2 beginnt, woraus der Zustand Ni-R resultiert, bei dem mindestens einer der zwei [4Fe4S]-Cluster reduziert ist. Deshalb wird hier die Annahme favorisiert, daß im Zustand Ni-SI ein H_2 als Brückenligand bindet.

6.8 Zusammenfassung

Die FTIR-spektroelektrochemischen Messungen ermöglichten eine umfassende Charakterisierung der einzelnen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F und der Redoxübergänge zwischen ihnen. Erstmals wurde eindeutig belegt, daß es sich bei den Eisenliganden dieser Hydrogenase um ein CO- und zwei CN⁻-Moleküle handelt, wie dies für die anderen Vertreter der Standardhydrogenasen ebenfalls der Fall ist. Zudem sind mit den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten nun die charakteristischen FTIR-Absorptionsbanden der einzelnen Redoxzustände dieser Hydrogenase bekannt, die eine systematische Verschiebung der CO-Bande um +10 cm⁻¹ aufweisen. Diese weist auf einen grundsätzlichen strukturellen Unterschied der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F im Vergleich zu den anderen Standardhydrogenasen hin, der jedoch nicht durch die Analyse der Kristallstruktur geklärt werden kann. Die Ergebnisse dieser Messungen geben darüber hinaus Hinweise auf einen möglichen Reaktionsmechanismus, der die Protonen- und Elektronenbilanz eines jeden Zustandes berücksichtigt.

7 Proteinfilmvoltammetrie an der [NiFe]-Hydrogenase

Die Proteinfilmvoltammetrie ist eine elektrochemische Methode, bei der auf eine eingefasste pyrolytische Graphit-Elektrode (*pyrolytic graphite edge (PGE) electrode*) (s. Abbildung 7.1) ein Proteinfilm aufgebracht wird. Die Enzymmoleküle adsorbieren dabei auf der Elektrodenoberfläche, stabilisiert durch das Koadsorbent Polymyxin B. Polymyxin B ist ein Peptid, das von *Bacillus polymyxa* produziert und in der Humanmedizin als Antibiotikum eingesetzt wird. Seine Strukturformel ist in Abbildung 7.2 dargestellt. Die genaue Funktion während des Adsorptionsprozesses ist noch nicht bekannt, vermutlich handelt es sich um eine elektrostatische Stabilisierung, bei der das Polymyxin als Polykation Salzbrücken zwischen den negativ geladenen Enzymmolekülen ausbildet [98]. Es wird hierbei angenommen, daß die Hydrogenasemoleküle über den distalen [4Fe4S]-Cluster mit der Elektrodenoberfläche interagieren und sich eine monomolekulare Schicht ausbildet [73]. Dadurch wird eine direkte „Kommunikation“ zwischen Protein und Elektrode ermöglicht und der Einsatz von Redoxmediatoren vermieden. Dies hat den Vorteil, daß der gemessene Strom als direktes Maß der inhärenten Enzymaktivität angesehen werden kann, sofern die Substratversorgung nicht limitierend und der Grenzflächenelektronentransfer sehr schnell ist [54, 72]. Mit dieser Methode lassen sich die Kinetiken und die damit einhergehende Thermodynamik der katalytischen Prozesse untersuchen [7, 8]. Desweiteren lässt sich die Antriebskraft der Reaktion (*driving force*) genau kontrollieren, indem das angelegte Potential variiert werden kann. Dies bedeutet für den Fall der Hydrogenase, daß sie sowohl in Richtung der Wasserstoffoxidation als auch der Protonenreduktion durch die Einstellung des adäquaten Potentials gelenkt werden kann. Im Falle der Wasserstoffoxidation werden die Elektronen des Wasserstoffs der Elektrode zugeführt, was in einem positiven Strom resultiert. Umgekehrt entziehen die Hydrogenase-Moleküle der Elektrode Elektronen, wenn Protonen reduziert werden; der Strom erhält nun konventi-

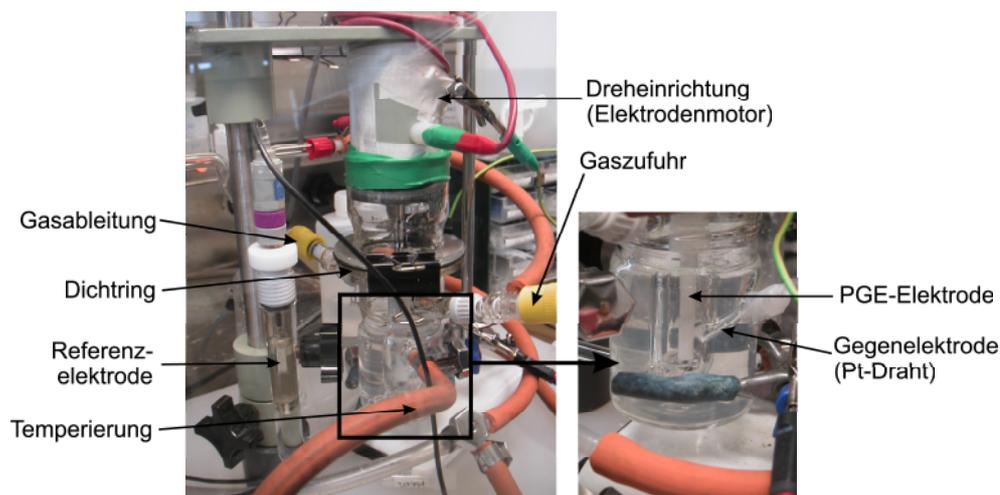


Abbildung 7.1: Ansicht der elektrochemischen Zelle, die für die Proteinvoltammetrie benutzt wurde. Links die Gesamtansicht mit Elektrodenmotor und Glaszelle, die mittels eines O-Rings und zweier Laborklemmen dicht miteinander verschlossen wurden. Rechts ein Ausschnitt, der die PGE-Elektrode und die Gegenelektrode zeigt, die in die Pufferlösung eintauchen. Dieses Kompartiment ist umgeben von einem Glasmantel, der über einen Thermostaten eine Temperierung der Lösung ermöglicht.

ongemäß ein negatives Vorzeichen. Der gemessene Strom läßt sich direkt mit der Enzymaktivität korrelieren, da die Elektrode in eine Rotation mit einer hohen Geschwindigkeit versetzt wird, so daß die Reaktionen unabhängig vom Massentransport des Substrates zum Enzym sind [54].

Ist die Elektrode einmal mit einem Proteinfilm belegt, kann sie in verschiedene Lösungen, z.B. Puffer unterschiedlicher pH-Werte, transferiert werden, was einen problemlosen und schnellen Wechsel der experimentellen Bedingungen ermöglicht. Zudem erlaubt der Messaufbau (Abbildung 7.1) die Zufuhr verschiedener Gase, so daß sehr einfach die Auswirkung unterschiedlicher gelöster Gase auf die Hydrogenase-Aktivität untersucht werden kann.

Die in diesem Kapitel vorgestellten proteinfilmvoltammetrischen Experimente dienen der Untersuchung

1. der anaeroben Inaktivierung der Hydrogenase durch SO_2 ,
2. der aeroben Inaktivierung der Hydrogenase durch Sauerstoff und
3. der Reaktivierung der Hydrogenase durch eine Verdrängung von Inhibitoren durch Wasserstoff,

indem die katalytische Aktivität anhand des gemessenen Stroms verfolgt wird.

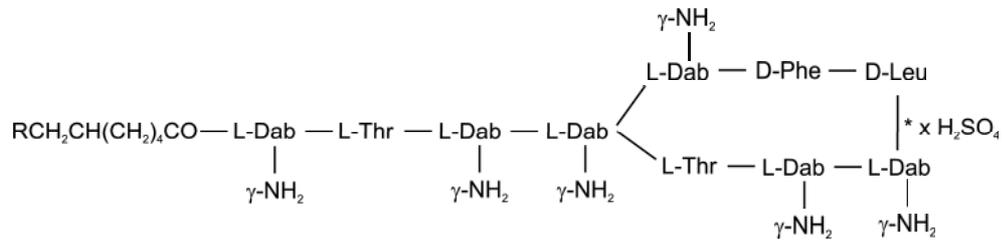


Abbildung 7.2: Strukturformel von Polymyxin B. Der Rest R kann eine CH₃-Gruppe oder ein Proton sein. Die Abkürzung Dab steht für α, γ -Diaminobutylsäure.

7.1 Probenvorbereitung

Für die proteinfilmvoltammetrischen Experimente wurde aufgereinigte Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F (s. Kapitel 5.2) verwendet, die sich in Tris-Puffer (pH 7,4) befand. Die Konzentration der verwendeten Hydrogenase-Stammlösungen betrug 1,2 mM, bzw. 4 mM. Notwendige Verdünnungen wurden mit dem Hydrogenase-Puffermix (vgl. Kapitel 4.4) des gewünschten pH-Wertes vorgenommen.

7.2 Durchführung

7.2.1 Messaufbau

Alle Experimente wurden in einer Stickstoff-Atmosphäre in einem Anaerob-Zelt an der in Abbildung 7.1 abgebildeten elektrochemischen Zelle durchgeführt. Eine schematische Darstellung des Aufbaus liefert Abbildung 7.3. Die Arbeitselek-

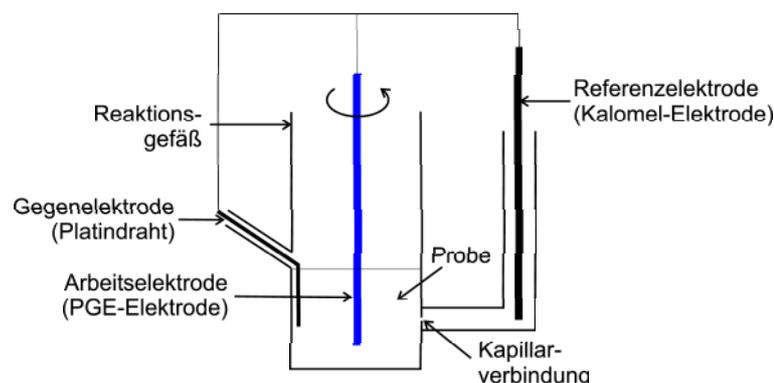


Abbildung 7.3: Schematische Darstellung der elektrochemischen Zelle, die zur Durchführung der proteinfilmvoltammetrischen Experimente benutzt wurde.

trode besteht aus einem schmalen Zylinder aus pyrolytischem Graphit, das in die entsprechende Pufferlösung taucht. Das Graphit ist umgeben von einer Teflonhülse, die zudem einen Kontaktstab aus Messing enthält. Diese Teflonhülse wurde in ihrer Länge der Glaszelle angepasst und so konstruiert, daß sie einfach und schnell mittels einer kleinen Schraube an die Halterung des Elektrodenmotors angebracht werden kann [113]. Neben der PGE-Arbeits Elektrode vervollständigen eine gesättigte Kalomel-Elektrode (*saturated calomel electrode, SCE*) als Referenzelektrode und ein Platin-Draht als Gegenelektrode die Drei-Elektroden-Ableitung dieses Aufbaus. Die Referenzelektrode befindet sich in einem mit 100 mM NaCl-Lösung gefülltem Seitenarm, der in kapillarem Kontakt zum Reaktionskompartiment steht. Nachfolgend wird das Potential immer in bezug zur Standardwasserstoffelektrode NHE angegeben. Hierzu wird das Potential der Referenzelektrode entsprechend der Gleichung $E_{NHE} = E_{SCE} + y_T$ korrigiert, wobei der Faktor y_T von der Temperatur abhängig ist. Die folgende Übersicht listet die Faktoren für die gemessenen Temperaturen im Anaerob-Zelt auf [13]:

Temperatur	y_T
295 K	0,2432
296 K	0,2425
297 K	0,2419
298 K	0,2412

Die Kontrolle des Potentials erfolgte über einen Potentiostaten, der über einen PC mit Hilfe der Software GPES gesteuert wird.

Über die Gasein- und -auslässe läßt sich die Atmosphäre der Glaszelle variieren. Hierzu sind an der Rückwand des Anaerob-Zeltes verschiedene Gaszylinder fixiert, die mit einem Gasleitungssystem verbunden sind, das den kontrollierten Einlaß der Gase in die Glaszelle erlaubt.

7.2.2 Generierung eines Proteinfilms

Vor der Aufbringung eines Proteinfilms auf die Elektrode wurde sie gründlich mit wässriger Aluminiumoxid-Politur (Alumina, Partikelgröße 1 μm) poliert, um eine frische, unbesetzte Graphit-Oberfläche zu schaffen. Diese enthält eine Vielzahl der funktionalen Gruppen $-\text{COO}^-$ und $-\text{COOH}$, die mit den Proteinmolekülen interagieren können [8]. Die Elektrode wurde anschließend kurz im

Ultraschallbad von Alumina-Resten befreit und mit destilliertem Wasser abgespült. Der Proteinfilm wurde auf zwei alternativen Wegen erzeugt. Bei Anwendung der ersten Methode wurde 1,5 μl 40 μM Hydrogenaselösung auf die frisch polierte Elektrodenoberfläche aufpipettiert, diese sofort auf den Elektrodenmotor montiert und in den Puffer getaucht. Diese schnelle Methode führte zu einer relativ geringen Besetzung der Oberfläche, so daß der gemessene Strom in den folgenden Experimenten relativ klein war. Eine dichtere Besetzung erhielt man bei Anwendung der zweiten Methode, bei der die frisch polierte Elektrode in die sogenannte *DvH forming solution* getaucht wurde. Sie besteht aus folgenden Komponenten:

- 15 μl 40 μM Hydrogenase-Lösung (Endkonzentration 600 nM)
- 10 μl 20 mg/ml Polymyxin B Sulfat (Endkonzentration 200 $\mu\text{g/ml}$)
- 975 μl Hydrogenase-Puffermix, pH 6

Bei stationärer Elektrode in einer Stickstoffatmosphäre wurde das Potential nun zwischen -558 mV und 242 mV mit einer Geschwindigkeit von 10 mV/s variiert, bis sich das resultierende zyklische Voltammogramm nicht mehr änderte. Dies war nach ca. 15 Durchläufen der Fall. Danach wurde die *DvH forming solution* gegen Hydrogenase-Puffermix ausgetauscht.

7.2.3 Zykovoltammetrie und Chronoamperometrie

Die zykovoltammetrischen und chronoamperometrischen Experimente wurden mit Hilfe eines Potentiostaten durchgeführt, der durch einen Computer kontrolliert werden konnte. Im Falle der Zykovoltammetrie wurde ein definierter Potentialbereich in einer bestimmten Richtung zyklisch abgefahren, wobei die Geschwindigkeit und die Anzahl der Durchläufe zuvor definiert wurden. Dabei wurde der Strom in Abhängigkeit vom Potential gespeichert. Dies diente der Bestimmung der Potentialabhängigkeit der Wasserstoffoxida- und Protonenreduktionsaktivität. Bei der Chronoamperometrie hingegen wurde das Potential für eine bestimmte Zeit festgelegt und der Strom in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen. Nach Ablauf des Zeitintervalls wurde das Potential sprunghaft geändert (Potentialschritt) und erneut für eine definierte Zeit festgehalten. Auf diese Weise konnten bis zu zehn Potentialschritte mit einer Gesamtlänge von 10000 s aufgenommen werden.

7.3 Zyklovoltammetrie mit stationärer Elektrode

7.3.1 Ergebnisse

Wie in Kapitel 7.2.2 bereits erwähnt, wurde die Zyklovoltammetrie mit stationärer Elektrode angewandt, um einen Proteinfilm auf der Elektrode zu generieren. Hierzu wurde die frisch polierte Elektrode in die *DvH forming solution* getaucht, das Potential zyklisch zwischen den Grenzen von -558 mV und 242 mV variiert und der dabei auftretende Strom aufgenommen. Abbildung 7.4 zeigt die Potential-Strom-Abhängigkeit einer solchen Serie von zyklischen Voltammogrammen. Während der Durchläufe erhöhte sich der Strom in bestimmten Bereichen zunächst sprunghaft (21% vom ersten zum zweiten Durchgang gemessen bei einem Potential von -300 mV), in den folgenden 18 Zyklen stieg er nur noch um insgesamt 10% (bezogen auf -300 mV). Nach 20 Zyklen blieb der Strom konstant. Aufgrund eines Nicht-Faraday'schen Stroms, der durch das Auf- und Entladen der Elektrode entsteht, besitzt die Kurve eine Asymmetrie. Deutliche Abweichungen von einem Voltammogramm einer unbesetzten Elektrode (graue Kurve in Abbildung 7.4) wurden im Potentialbereich unterhalb von -200 mV sichtbar. Hierbei handelte es sich um eine sigmoidale Reduktionskurve in Richtung des abnehmenden Potentials und ein Oxidationsmaximum bei zunehmendem Potential. Mit zunehmender Anzahl an Durchläufen vergrößerte sich die Amplitude der Reduktionskurve, wobei das Potential des Reduktionsminimums jedoch konstant bei $E_{min} = -400$ mV blieb. In der gleichen Zeit nahm die Amplitude des Oxidationsmaximums zu. Zudem verschob sich sein Maximalpotential E_{max} von -290 mV im ersten Durchgang zu -300 mV im letzten Durchgang (s. Abbildung 7.4). Das Mittelpunktspotential E^0 dieses Übergangs beträgt -350 mV und die Peakdifferenz $\Delta E = E_{max} - E_{min} = 100$ mV.

7.3.2 Diskussion

Die sigmoidale Reduktionskurve, die bei der Generierung des Proteinfilms im zyklischen Voltammogramm der Hydrogenase sichtbar ist, resultiert aus der Reduktion von Protonen zu Wasserstoff, die bei einem Potential von -400 mV (pH 6,0) stattfindet. Der durch die Hydrogenase gebildete Wasserstoff wird dann bei höherem Potential wieder oxidiert, was zu dem Oxidationspeak im Voltammogramm führt. Für einen reversiblen elektrochemischen Prozeß gilt, daß die Peakdifferenz bei einer Temperatur von 298 K mit $\Delta E = \frac{59 \text{ mV}}{n}$ (mit n =Anzahl der übertragenen Elektronen) angegeben werden kann. Bei einer Peakdifferenz

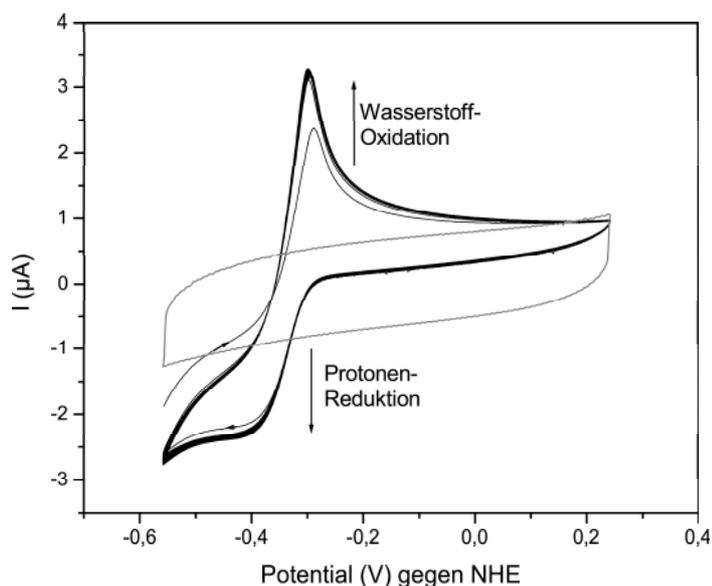


Abbildung 7.4: Generierung eines Proteinfilms auf der stationären PGE-Elektrode in einer Stickstoffatmosphäre. Dargestellt sind 20 zyklische Voltammogramme, wobei der erste Durchlauf dem Voltammogramm mit dem geringsten Strom entspricht. Die Pfeilspitzen auf dem ersten Voltammogramm deutet die Richtung des Durchlaufes an. Die Hydrogenase-Konzentration in der *DvH forming solution* (pH 6,0) betrug 600 nM. Weitere experimentelle Bedingungen: Temperatur $T=298$ K, Aufnahmegeschwindigkeit 10 mV/s. Die graue Kurve zeigt ein Voltammogramm der Elektrode in Hydrogenase-Puffermix (pH 6,0) ohne Hydrogenase (Aufnahmegeschwindigkeit 100 mV/s).

von $\Delta E = 100$ mV ergibt sich die Anzahl der übertragenen Elektronen mit $n=1,7 \approx 2$. Dies entspricht den bei der Wasserstoffoxidation frei werdenden, bzw. der Protonenreduktion benötigten zwei Elektronen gemäß:



Das Auftreten der katalytischen Merkmale im Voltammogramm belegt, daß die Hydrogenase in der Lage ist, sehr schnell und einfach Elektronen mit der PGE-Elektrode auszutauschen. Transferiert man die Elektrode nach der Generierung des Proteinfilms in Puffer ohne Enzym, sind die katalytischen Merkmale immer noch zu beobachten. Somit ist nachgewiesen, daß die Hydrogenase tatsächlich an der Elektrode adsorbiert ist. Trotz der Tatsache, daß die oxidierten Zustände Ni-A und Ni-B nicht katalytisch aktiv sind, ist die Elektroaktivität schon im ersten Durchlauf präsent. Demnach wird die Generierung des

Films nicht durch eine Aktivierung, sondern nur durch die rein physikalische Adsorption der Enzymmoleküle an der Elektrode kontrolliert. Im Falle der Hydrogenase aus *A. vinosum* wurde das Protein vor der Generierung des Films mehrere Stunden in einer Stickstoffatmosphäre mit 10% H₂ inkubiert. Dennoch unterschieden sich die zyklischen Voltammogramme nicht von denen, die ohne eine Prä-Aktivierung der Hydrogenase aufgenommen wurden [98], was ebenfalls belegt, daß die Aktivierung für diesen Prozeß keine Rolle spielt.

7.4 Anaerobe Inaktivierung

7.4.1 Ergebnisse

Unter der anaeroben Inaktivierung versteht man die elektrochemische Oxidation der Hydrogenase von einem aktiven Zustand in einen inaktiven Zustand in anaerober Atmosphäre. Im zyklischen Voltammogramm entspricht dies dem Übergang von einem Potential von ca. -200 mV bis 242 mV bei kontinuierlicher Potentialerhöhung. Im umgekehrten Fall, bei kontinuierlicher Potentialerniedrigung, kommt es ab einem bestimmten Potential zu einem Stromanstieg, ausgelöst durch die Reaktivierung des Enzyms einhergehend mit dem Übergang in einen aktiven Redoxzustand. Das Mittelpunktspotential dieses Übergangs wird mit E_{switch} bezeichnet, da das Enzym hier vom inaktiven in den aktiven Zustand „umschaltet“.

Abbildung 7.5A zeigt zyklische Voltammogramme der [NiFe]-Hydrogenase in einer Wasserstoffatmosphäre bei einem pH-Wert von 6,0 und einer Temperatur von 318 K sowie bei rotierender Elektrode. Im ersten Voltammogramm (rote Kurve) ist eine deutliche Stromverminderung in Richtung eines positiveren Potentials zu beobachten, die sich beim reversen Durchgang noch verstärkt, danach steigt der Strom jedoch wieder an, was der Reaktivierung des Enzyms entspricht. Dieser Effekt der anaeroben Inaktivierung auf das Voltammogramm wurde in den nachfolgenden Durchgängen immer geringer und konnte schließlich nicht mehr beobachtet werden. Hier stieg der Strom kontinuierlich auch im Bereich positiver Potentiale an. Ebenso wenig konnte eine Reaktivierung beobachtet werden.

In einem weiteren Experiment, das in Abbildung 7.5B dargestellt ist, kam es während der ersten drei Durchgänge unbeabsichtigt zu einer Verminderung des Wasserstoff-Partialdruckes, wobei sich der genaue Partialdruck während eines Durchgangs nachträglich nicht bestimmen ließ. In den letzten beiden

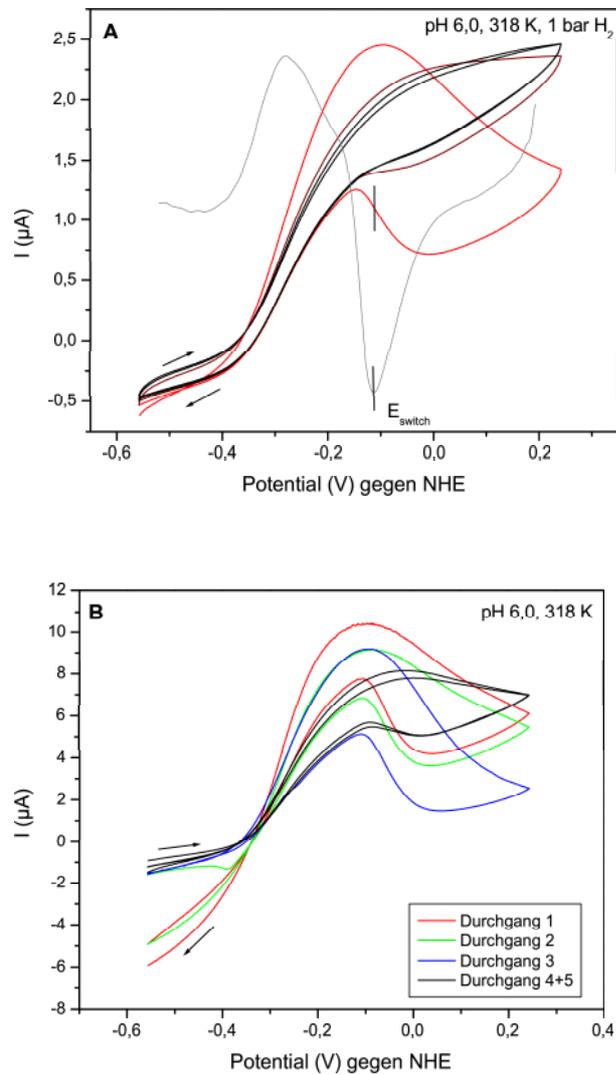


Abbildung 7.5: Zyklische Voltammogramme eines Proteinfilms der [NiFe]-Hydrogenase zur Untersuchung der anaeroben Inaktivierung. A: Die Hydrogenase wurde auf die PGE-Elektrode aufpipettiert, um einen Proteinfilm zu generieren. Das rote Voltammogramm entspricht dem ersten Durchgang, das dunkelrote dem zweiten und die schwarzen dem dritten und vierten Durchgang. Die graue Kurve entspricht der ersten Ableitung dI/dE des ersten Voltammogrammes in reduktiver Potentialrichtung. Das Umschaltpotential E_{switch} ist durch eine Markierung angezeigt; es beträgt -108 ± 3 mV. B: Der Proteinfilm wurde durch kontinuierliche Veränderung des Potentials zwischen -558 mV und 242 mV generiert. Der Wasserstoffpartialdruck der verschiedenen Durchgänge nahm in den ersten drei Durchgängen kontinuierlich ab, betrug in den letzten beiden Durchgängen jedoch 1 bar. Experimentelle Bedingungen: pH=6,0, T=318 K, Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode 2500 rpm, Aufnahmegeschwindigkeit 10 mV/s (A), bzw. 2 mV/s (B).

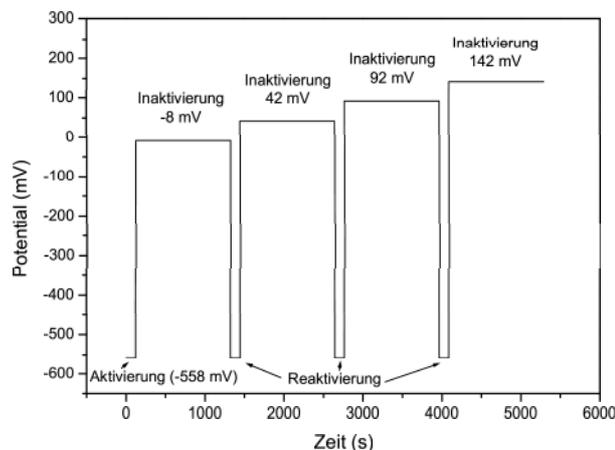


Abbildung 7.6: Schematische Darstellung des chronoamperometrischen Versuchsablaufes zur anaeroben Inaktivierung. Die Aktivierungs-, bzw. Reaktivierungsdauer betrug jeweils 120 s und die Inaktivierungsdauer jeweils 1200 s. Die Strom-Zeit-Diagramme dieses Experimentes ist in Abbildung 7.7 dargestellt.

Durchgängen betrug der Wasserstoff-Partialdruck wieder 1 bar. Hier erkennt man in den ersten drei Durchgängen wiederum die anaerobe Inaktivierung und die entsprechende Reaktivierung, die sich mit abnehmendem Partialdruck verstärkt, was an einer größeren Stromabnahme im Falle der Inaktivierung bzw. -zunahme im Falle der Reaktivierung festgemacht werden kann. Betrug der Wasserstoff-Partialdruck jedoch wieder 1 bar, ließ sich das Enzym nicht mehr anaerob inaktivieren; im Voltammogramm ist nur noch ein schwacher Effekt erkennbar. Es wurde anschließend vergeblich versucht, diese mehr zufällig beobachteten Inaktivierungs- und Reaktivierungsprozesse zu reproduzieren. Hierbei wurden die Parameter Temperatur, pH-Wert, Wasserstoff-Partialdruck (1 bar oder 0,1 bar H₂), Hydrogenase-Präparation und Aufnahmegeschwindigkeit variiert. Im Falle des Wasserstoff-Partialdrucks konnte jedoch nur ein minimaler Wert von 0,1 bar definiert eingestellt werden. Zudem wurde darauf geachtet, daß das Enzym bei der Generierung des Proteinfilms nicht aktiviert wurde. Daher wurde die Methode der Proteinfilm-Generierung gewählt, bei der die Hydrogenase auf die frisch polierte PGE-Elektrode aufpipettiert wurde. In allen Fällen entsprachen die resultierenden zyklischen Voltammogramme in ihrem Verlauf denen des fünften Durchlaufs der Abbildung 7.5A; ein Aus- und Einschalten der Enzymaktivität konnte nicht beobachtet werden.

Für den Fall, daß eine anaerobe In- und Reaktivierung beobachtet werden kann-

te, läßt sich hieraus das Umschaltpotential E_{switch} bestimmen. Dazu wird die erste Ableitung des Stromes nach dem Potential dI/dE der Voltammogrammhälfte gebildet, die die Reaktivierung beschreibt (reduktive Potentialrichtung von 242 mV bis -558 mV). In Abbildung 7.5A ist die erste Ableitung des ersten Durchgangs als graue Kurve dargestellt. Das Umschaltpotential E_{switch} beträgt -108 ± 3 mV bei einem pH-Wert von 6,0.

Auch chronoamperometrische Experimente vermittelten den gleichen Eindruck: Unabhängig vom Inaktivierungspotential wurde auch hier nur eine unvollständige Inaktivierung erreicht, wie Abbildung 7.7 verdeutlicht. Hierbei wurde das Enzym zunächst kurz aktiviert (120 s bei -558 mV) und dann bei einem Potential von -8 mV, 42 mV, 92 mV oder 142 mV für 1200 s inaktiviert. Vor jeder Inaktivierung wurde es erneut für 120 s bei -558 mV aktiviert (vgl. Abbildung 7.6). Bei einer vollständigen Inaktivierung sollte der Strom $0 \mu\text{A}$ betragen, da die Hydrogenase durch ein positives Potential oxidiert und dadurch inaktiviert wird. Im hier dargestellten Fall konnte jedoch auch während der Inaktivierung ein katalytischer Strom gemessen werden.

7.4.2 Diskussion

Das aus den zyklischen Voltammogrammen bestimmte Umschaltpotential $E_{switch} = -108 \pm 3$ mV (pH 6,0) gibt das Potential an, bei dem das Enzym vom inaktiven in den aktiven Zustand übergeht und beginnt, katalytisch aktiv zu werden. Übertragen auf die verschiedenen Redoxzustände entspräche dies den Übergängen Ni-A/Ni-SU und Ni-B/Ni-SI. Deren durch FTIR-Spektroelektrochemie bestimmte Mittelpunktspotentiale (s. Kapitel 6.8) betragen -96 ± 5 mV (pH 6,0) für den Übergang Ni-A/Ni-SU und -69 ± 3 mV (pH 5,4) für den Übergang Ni-B/Ni-SI. In diesem pH-Wert-Bereich gilt die nach der Nernst-Gleichung zu fordernde Abhängigkeit des Potentials vom pH-Wert bei einem Ein-Elektron-Übergang gekoppelt mit einem Protontransfer von -60 mV/pH-Wert-Einheit, da sich der pH-Wert zwischen den pK-Werten der Reaktion befindet (vgl. Kapitel 6.6). Dies ergibt für einen pH-Wert von 6,0 ein Mittelpunktspotential von -105 mV. Diese Werte entsprechen recht genau dem Umschaltpotential E_{switch} , so daß der in der Proteinfilmvoltammetrie beobachtete Aktivierungseffekt genau diesen beiden Übergängen zuzuordnen ist. Die Korrelation der Ergebnisse aus der Proteinfilmvoltammetrie und der Spektroelektrochemie wurde nicht nur bei der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F in den hier beschriebenen Experimenten beobachtet, sondern auch bei der [NiFe]-Hydrogenase aus *A.*

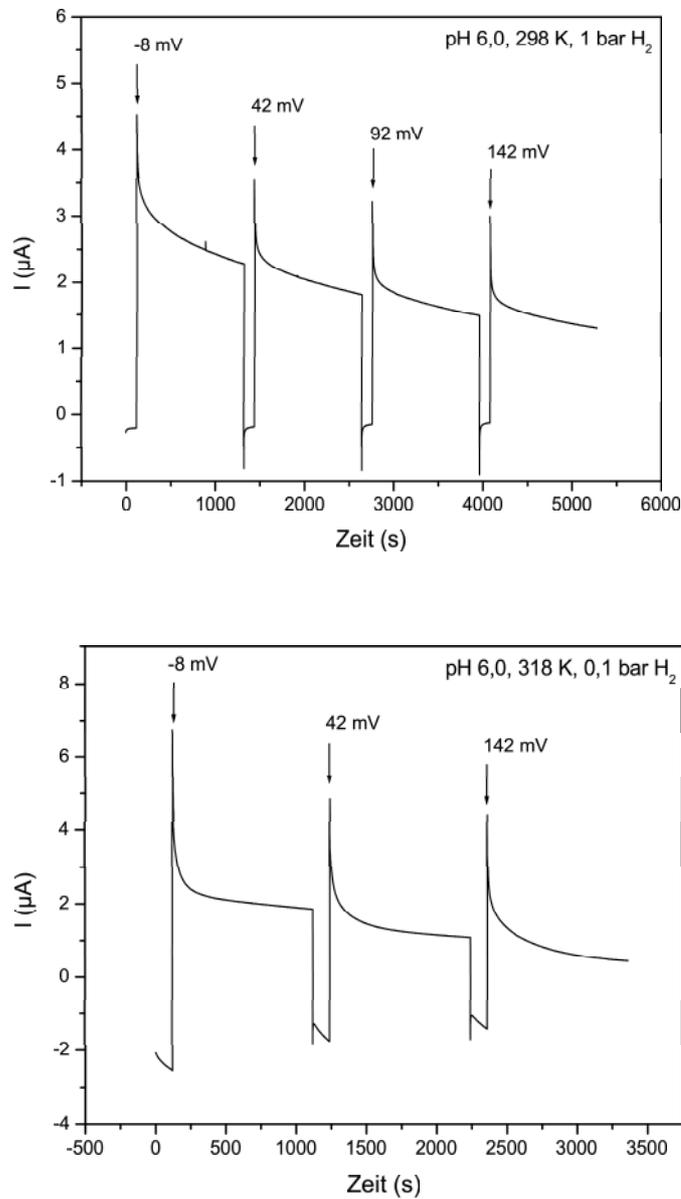


Abbildung 7.7: Zeitabhängige Stromentwicklung der Chronoamperometrie zur Untersuchung des Einflusses des Potentials auf die Inaktivierung. Details zur Versuchsdurchführung befinden sich im Text. Experimentelle Bedingungen: Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode 2500 rpm, $T=298$ K, bzw. $T=318$ K, Wasserstoffpartialdruck $p_{\text{H}_2}=1$ bar, bzw. $p_{\text{H}_2}=0,1$ bar.

vinosum [64]. Die FTIR-spektroelektrochemischen Experimente (s. Kapitel 6.6) an der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F zeigten weiterhin, daß das Enzym bei einem Potential von -558 mV in den reduzierten Zuständen Ni-C und Ni-R vorliegt. Wird das Potential von dort aus auf einen positiveren Wert ≈ -10 mV angehoben, sollte sich der Zustand Ni-B einstellen, wie dies IR-spektroskopisch beobachtet wurde. Da dies einer der oxidierten Zustände ist, sollte er keine Aktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu ist in den oben beschriebenen chronoamperometrischen Experimenten jedoch ein katalytischer Strom meßbar, der auf eine noch vorhandene Aktivität hinweist. Dies könnte mit der Beobachtung verbunden sein, daß in allen FTIR-Spektren des Zustandes Ni-B ein sehr schwaches Signal des Zustands Ni-SI zu detektieren war. Ni-SI gehört zu den am katalytischen Zyklus beteiligten Zuständen und könnte einen Teil der hier beobachteten Aktivität erklären. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den FTIR-spektroskopischen und den proteinfilmvoltammetrischen Experimenten ist die Anwesenheit von Wasserstoff bei letzteren. In Abwesenheit von Wasserstoff (FTIR-Spektroelektrochemie) geht die Hydrogenase bei hohem Potential in den Zustand Ni-B über, in dem sie inaktiv ist. In Anwesenheit von Wasserstoff (Proteinfilmvoltammetrie) scheint sie trotz eines oxidierenden Potentials den inaktiven Zustand Ni-B nicht einzunehmen und deshalb weiterhin einen katalytischen Strom anzuzeigen.

Das Vorhandensein des katalytischen Stromes in den chronoamperometrischen Experimenten hat vermutlich die gleiche Ursache wie die Tatsache, daß nur unter schwer zu reproduzierenden Bedingungen eine anaerobe Inaktivierung im zyklischen Voltammogramm beobachtet werden konnte. Im Falle des Experimentes, das in Abbildung 7.5A dargestellt ist, wurde ein Aliquot einer Enzympräparation verwendet, die erst kurz vor Beginn der Messung in die anaerobe Umgebung des Anaerob-Zeltes gebracht wurde. Die übrigen Experimente wurden mit solchen Proben durchgeführt, die sich schon einige Tage im Gefrierschrank des Anaerob-Zeltes befanden und 4-5 mal in der Stickstoffatmosphäre aufgetaut wurden. Vorstellbar ist, daß sich Teile des Enzyms kurz nach dem Transfer aus der aeroben in die anaerobe Umgebung noch in einem Zustand befanden, der anaerob inaktiviert werden kann. Einmal reduziert, wie dies nach dem ersten Durchlauf eines zyklischen Voltammogramms der Fall war, wurde dieser Zustand nicht mehr erreicht. Das Auftauen der anderen Proben in der anaeroben Atmosphäre könnte die gleiche Auswirkung haben. Diese Proben könnten dadurch schon aktiviert worden sein, ohne daß sie auf der Elektrode

einem elektrischen Potential ausgesetzt wurden. Das zu einem geringen Prozentsatz ebenfalls im Anaerob-Zelt vorhandene Wasserstoffgas könnte diesen Effekt begünstigen. Vergleicht man diese Befunde mit den Erkenntnissen aus der FTIR-Spektroelektrochemie, die belegen, daß eine einmal reduzierte Hydrogenase bei anaerober Oxidation nicht mehr in den Ni-A-Zustand zurückkehrt, sondern als einzigen oxidierten Zustand den Zustand Ni-B annimmt, könnte vorstellbar sein, daß es sich bei dem Zustand, der die anaerobe Inaktivierung in den proteinfilmvoltammetrischen Experimenten zeigt, um Ni-A handelte.

7.5 Inaktivierung in Anwesenheit von Na_2SO_3

7.5.1 Ergebnisse

Ausgehend von der Vermutung, daß sich der Zustand Ni-A in der hier untersuchten [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F in der Natur seines Brückenliganden von denen der anderen Standardhydrogenasen unterscheidet und anstelle einer Sauerstoffspezies eine Schwefelspezies bindet, wie dies Higuchi *et al.* postulierten [58], wurde den in den folgenden Experimenten verwendeten Puffern Na_2SO_3 in verschiedenen Konzentrationen zugefügt. Abbildung 7.8A zeigt die Auswirkungen der Na_2SO_3 -Konzentration auf das zyklische Voltammogramm der Hydrogenase. Vergleicht man das zyklische Voltammogramm, das unter Na_2SO_3 -freien Bedingungen aufgenommen wurde, mit einem, das bei einer Konzentration von $45 \mu\text{M}$ Na_2SO_3 entstand, so bewirkte das Na_2SO_3 offensichtlich eine anaerobe Inaktivierung des Enzyms, so daß sich ebenfalls ein deutlicher Reaktivierungseffekt bemerkbar machte. Spuren von Sauerstoff im Reaktionsansatz verstärkten diesen Effekt weiter, wie aus Abbildung 7.8B deutlich wird. Dieses zyklische Voltammogramm weist eine hohe Ähnlichkeit zu den in Abbildung 7.5 dargestellten auf. Doch trotz des Vorhandenseins des Na_2SO_3 im Reaktionsansatz schwächte sich die Inaktivierung bei jedem weiteren Durchgang kontinuierlich ab, so daß das zyklische Voltammogramm nach einiger Zeit einem solchen ähnelte, das in der Abwesenheit von Na_2SO_3 aufgenommen wurde und keine Inaktivierungs- und Reaktivierungsmerkmale aufweist. Der Austausch des Na_2SO_3 -haltigen Puffers gegen Na_2SO_3 -freien Puffer hatte die gleichen Auswirkungen.

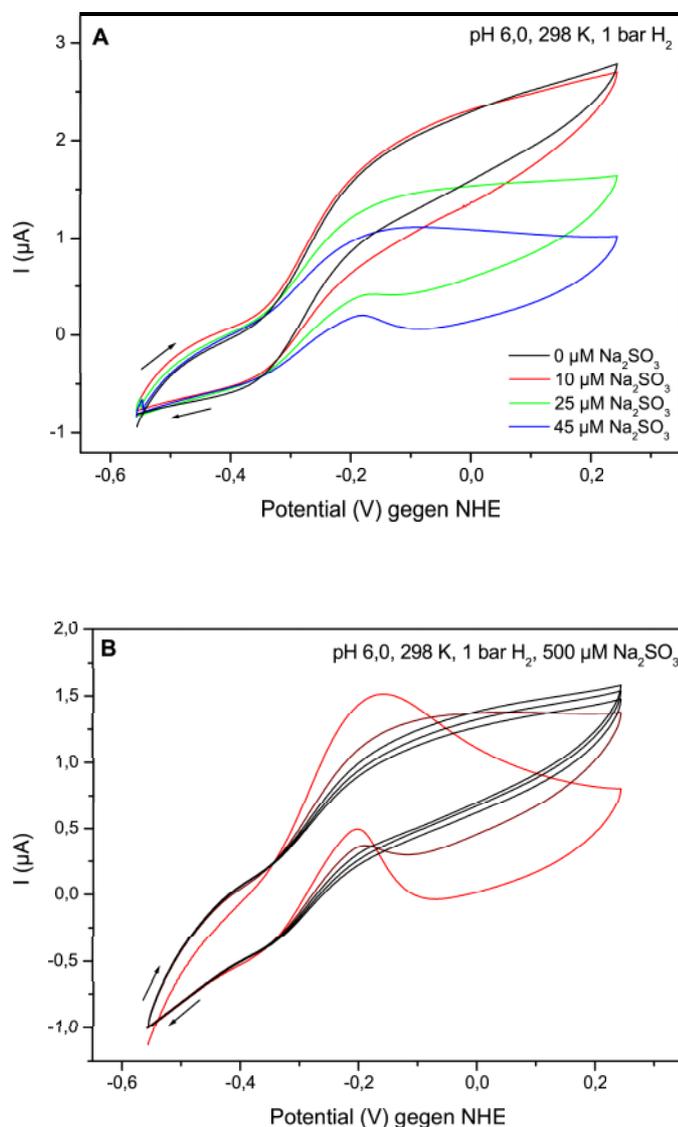


Abbildung 7.8: Zyklische Voltammogramme der [NiFe]-Hydrogenase bei Zugabe von Na_2SO_3 zum Puffer des Reaktionsansatzes. A: Abhängigkeit der Stärke des Inaktivierungseffekts von der Na_2SO_3 -Konzentration. Der Hydrogenasefilm wurde durch Aufpipettieren von $1,5 \mu\text{l}$ einer $40 \mu\text{M}$ Hydrogenase-Lösung auf die frisch polierte PGE-Elektrode gewonnen. B: Der Proteinfilm wurde während der kontinuierlichen Veränderung des Potentials zwischen -558 mV und 242 mV generiert. Mit der Zugabe des Na_2SO_3 wurden dem Reaktionsansatz Spuren von Sauerstoff zugefügt, die den Inaktivierungseffekt noch verstärkten. Experimentelle Bedingungen: Aufnahmegeschwindigkeit 10 mV/s , Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode 2500 rpm , $T=298 \text{ K}$, $\text{pH}=6,0$, $\text{pH}_2=1 \text{ bar}$.

7.5.2 Diskussion

Angesichts der Tatsache, daß die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F nicht so leicht anaerob zu inaktiveren ist wie dies für die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* der Fall ist [64], stellte sich die Frage, ob dies an der Natur des Brückenliganden im inaktiven Zustand Ni-A liegen könnte. Higuchi *et al.* [58] postulierten schon anhand der ersten Kristallstruktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F, daß der Brückenligand im oxidierten Zustand eine Schwefel- oder Sauerstoffspezies sein könnte. Später unterstützten sie die Annahme eines Schwefelliganden anhand von gaschromatographischen Experimenten, die die Freisetzung von H₂S bei Inkubation der Hydrogenase mit Wasserstoff belegten [57]. Neuere kristallographische Erkenntnisse gehen davon aus, daß der Brückenligand in Ni-A ein SO ist und ein weiteres Sauerstoffatom zwischen den Cysteinen Cys81 und Cys546 lokalisiert zu sein scheint [93].

Da in einer Na₂SO₃-Lösung zu einem geringen Anteil auch SO₂ vorhanden ist, wurde diese gewählt, um den Effekt auf die Inaktivierung der Hydrogenase zu untersuchen. Die oben dargestellten Ergebnisse deuten in der Tat darauf hin, daß das Na₂SO₃ die anaerobe Inaktivierung bewirkt und daß diese durch das Vorhandensein von Sauerstoff noch verstärkt wird. Die Bindung könnte eine Dissoziation eines der Sauerstoffatome bewirken, das jedoch das aktive Zentrum nicht verläßt, sondern in der Nähe der Cysteine verbleibt. Zuviel Sauerstoff in der Anwesenheit von Na₂SO₃ führt indes zu einer irreversiblen Denaturierung des Enzyms, die mit einem Signalverlust einhergeht. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist durchaus vorstellbar, daß das in der Na₂SO₃-Lösung vorhandene SO₂ an das aktive Zentrum der Hydrogenase bindet, sofern sie im oxidierten Zustand vorliegt, das angelegte Potential also positiv ist. Sauerstoff, der seinerseits eine Inaktivierung der Hydrogenase bewirkt, könnte die Verdrängung des SO₂ durch den stets vorhandenen Wasserstoff verzögern und daher zu einer Verstärkung der Inaktivierung führen.

Um die schwierige anaerobe Inaktivierung der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F und diese Beobachtungen zu verstehen, müssen die hier dargestellten einleitenden und vorbereitenden Experimente ausgedehnt und erweitert werden. Ergänzend sind Erkenntnisse anderer Techniken wie z.B. der Röntgenkristallographie oder der EPR-Spektroskopie notwendig, um ein schlüssiges Bild der oxidierten Zustände und der Aktivierung zu erhalten.

7.6 Aerobe Inaktivierung

7.6.1 Ergebnisse

Kommt die Hydrogenase in Berührung mit Sauerstoff, führt dies unverzüglich zu einem Verlust der katalytischen Aktivität; ein Prozeß, der als aerobe Inaktivierung bezeichnet wird. Abbildung 7.9A zeigt ein zyklisches Voltammogramm, bei dem während der ersten Hälfte des Durchlaufes bei einem Potential von 50 mV Sauerstoff injiziert wurde; sofort kam es hier zu einem Absinken des Stromes auf 0 A, da das Enzym oxidiert und damit inaktiviert wurde. In der zweiten Hälfte des Durchlaufes in reduktiver Potentialrichtung wurde das Enzym reaktiviert, was sich im zyklischen Voltammogramm in einem Anstieg des Stromes bemerkbar macht. Dieser Anstieg kann zur Bestimmung des Umschaltpotentials E_{switch} dieses Prozesses verwendet werden. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die Hydrogenase bei einem Potential von 42 mV durch die Zugabe von Sauerstoff zum Reaktionsansatz inaktiviert wurde. Das Potential wurde weitere 10 min bei 42 mV gehalten, so daß das Enzym nicht reaktivieren konnte, jedoch Zeit genug war, um den Sauerstoff durch Wasserstoff aus der Pufferlösung zu verdrängen. Dann wurde ein zyklisches Voltammogramm aufgenommen, welches in Abbildung 7.9B dargestellt ist. Zur Bestimmung des Umschaltpotentials wurde von dessen erster Hälfte die erste Ableitung gebildet (graue Kurve in Abbildung 7.9B); man erhält damit einen Wert von -91 ± 3 mV.

Eine genauere Untersuchung der aeroben Inaktivierung erfolgte durch ein chronoamperometrisches Experiment. Hierbei wurde das Enzym zunächst für 60 s bei -588 mV aktiviert. Anschließend wurde das Potential auf -108 mV eingestellt und weitere 60 s dort gehalten. Nun folgte die Inaktivierung, zu der das Potential auf einen Wert von 42 mV eingestellt wurde und gleichzeitig mit diesem Potentialschritt $200 \mu\text{l}$ O_2 -gesättigter Puffer zum Reaktionsansatz gegeben wurden. Nach einer Zeit von 600 s, in der der überschüssige Sauerstoff durch den Wasserstoff-Gasstrom entfernt wurde, wurde das Potential wieder erniedrigt, um das Enzym zu reaktivieren. Abbildung 7.10 zeigt den Stromverlauf im Falle eines Reaktivierungspotentials von -108 mV. Mit Zugabe des Sauerstoffes bei oxidierendem Potential verschwand der katalytische Strom vollständig. Sobald das Potential jedoch reduziert wird, floß wieder ein Strom, d.h. daß das Enzym reaktiviert wurde. Hierbei ist eine schnelle und eine langsame Phase der Reaktivierung zu erkennen. Nach Erreichen eines Maximalwertes sank die

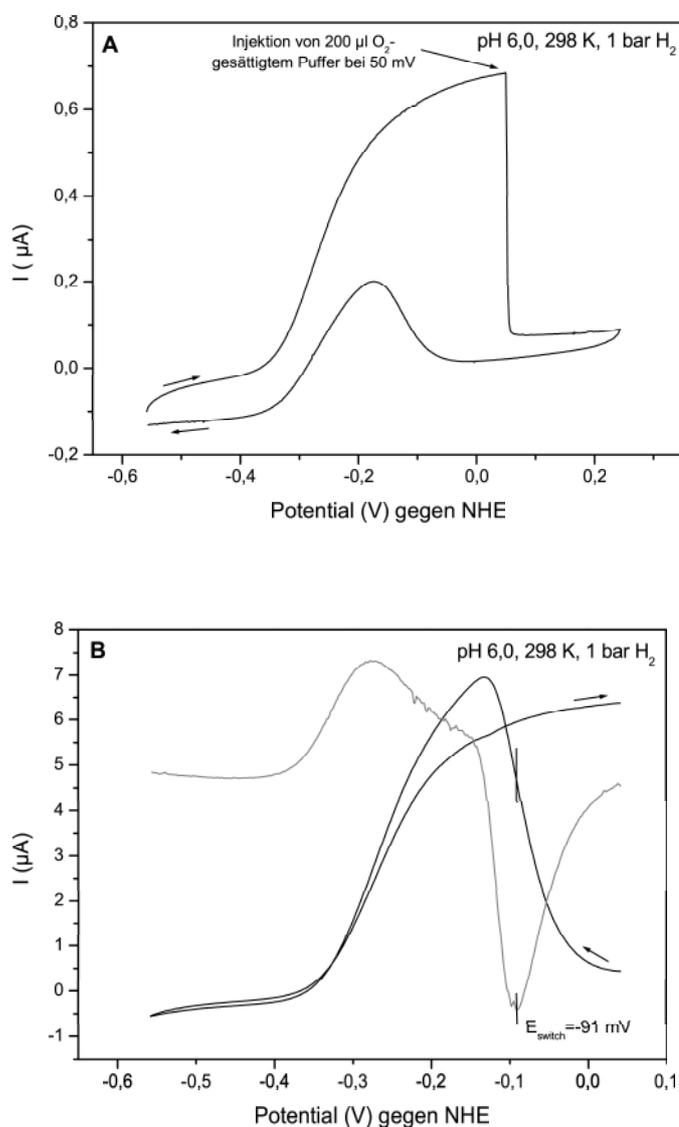


Abbildung 7.9: Aerobe Inaktivierung der [NiFe]-Hydrogenase. A: Zyklisches Voltammogramm eines Hydrogenase-Films, der bei einem Potential von 50 mV durch Injektion von O_2 -gesättigtem Puffer inaktiviert wurde. In reduktiver Richtung ist die Reaktivierung erkennbar. B: Zyklisches Voltammogramm der inaktiven Hydrogenase. Vor Beginn der Datenaufnahme wurde das Enzym durch Zugabe von 200 μl O_2 -gesättigtem Puffer inaktiviert. Aus dieser Kurve wurde mittels der ersten Ableitung dI/dE das Umschaltpotential E_{switch} bestimmt (graue Kurve). Es ist durch die vertikalen Balken markiert. Experimentelle Bedingungen: Aufnahmegeschwindigkeit 2 mV/s (A), bzw. 1 mV/s (B), Rotationsrate der Elektrode 2500 rpm, pH=6,0, T=298 K, p_{H_2} =1 bar. In beiden Voltammogrammen zeigen die Pfeile die Richtung der Potentialveränderung an.

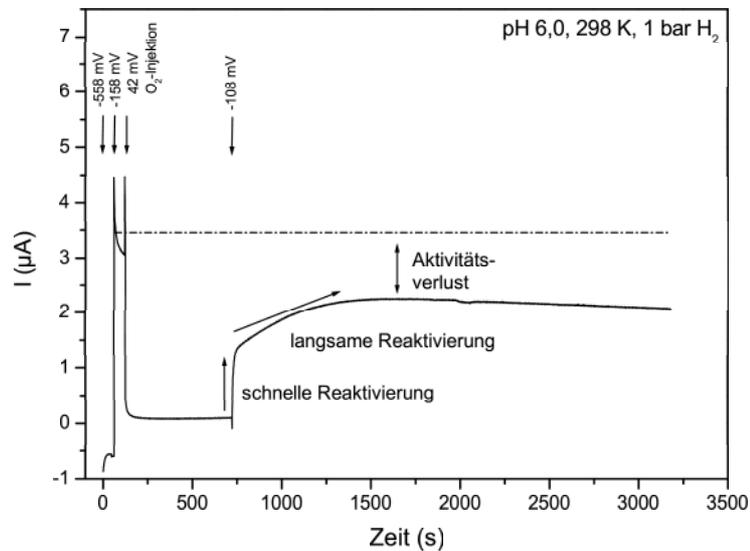


Abbildung 7.10: Strom-Zeit-Diagramm eines chronoamperometrischen Experiments zur aeroben Inaktivierung. Die Rotationsgeschwindigkeit der Elektrode betrug 2500 rpm. Bei einem Potential von 42 mV wurde das Enzym durch Zugabe von Sauerstoff inaktiviert. Eine Beschreibung der Potentialschritte befindet sich im Text.

Aktivität kontinuierlich ab. Zudem läßt die Höhe des Stroms nach der Reaktivierung erkennen, daß die Aktivität nicht vollständig wieder hergestellt werden konnte. Ein Verlust von ca. 35% weist auf eine hohe Sauerstoffempfindlichkeit hin.

Das oben erläuterte Experiment wurde erweitert, um die Reaktivierung der Hydrogenase zu studieren. Hierzu wurde das Reaktivierungspotential, welches dem letzten Potentialschritt dieser chronoamperometrischen Folge entspricht, variiert. Die entsprechenden Strom-Zeit-Verläufe zeigt Abbildung 7.11. Durch die Normierung des Stroms auf den Wert bei einem Zeitpunkt $t=71$ s kurz nach dem Potentialschritt auf -108 mV ist es möglich, den Einfluß des Reaktivierungspotentials auf den Anteil an reaktiviertem Protein zu untersuchen. Hier zeigte sich, daß ein abnehmendes Reaktivierungspotential einen immer größeren Aktivitätsverlust verursacht. Bei einem Reaktivierungspotential von -108 mV oder größer lassen sich deutlich beide Phasen ausmachen, während ein Reaktivierungspotential von -158 mV oder kleiner dazu führt, daß die Reaktivierungskinetik keine langsame Phase mehr aufweist.

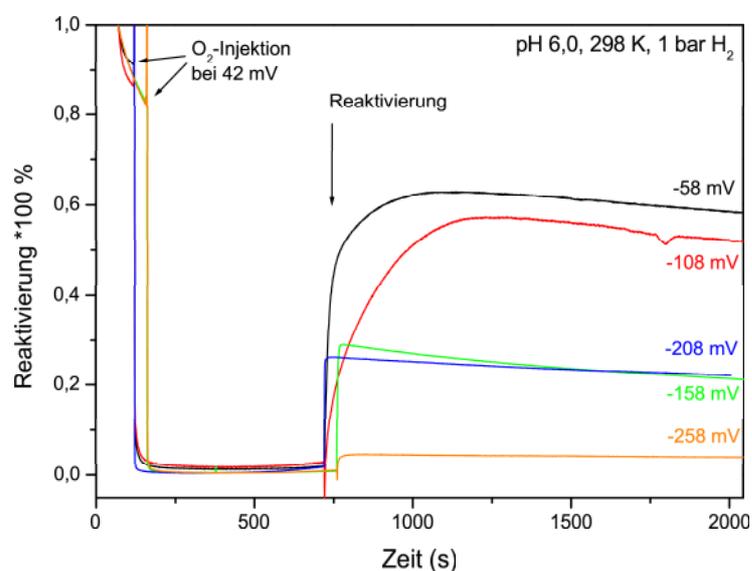


Abbildung 7.11: Einfluß des Reaktivierungspotentials auf die Höhe der Reaktivierung und die Reaktivierungsphasen. Dargestellt sind die Strom-Zeit-Verläufe chronoamperometrischer Experimente, die mit denen aus Abbildung 7.10 übereinstimmen. Lediglich das Reaktivierungspotential wurde variiert. Im Falle der Reaktivierungspotentiale von -208 mV und -258 mV betrug die Dauer des zweiten Potentialschritts (-158 mV) 100 s anstatt 60 s . Für jede Messung wurde ein neuer Proteinfilm generiert. Zur Vergleichbarkeit des Reaktivierungsanteils sind die Stromverläufe auf den Strom beim Zeitpunkt $t=71\text{ s}$ normiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die Elektrode nach dem Potentialschritt von -558 mV auf -108 mV bei $t=60\text{ s}$ 10 s zur Äquilibrierung benötigt [64].

7.6.2 Diskussion

Das Umschaltpotential E_{switch} , welches den Punkt angibt, bei dem die Hydrogenase vom Sauerstoff-inaktivierten Zustand in den aktiven Zustand wechselt, befindet sich mit $-91 \pm 3\text{ mV}$ bei einem pH-Wert von $6,0$ in dem Bereich, der schon für die anaerobe Reaktivierung gefunden wurde (s. Kapitel 7.4) und der anhand der FTIR-spektroelektrochemischen Ergebnisse als das Mittelpunktspotential der Übergänge Ni-A/Ni-SU und Ni-B/Ni-SI identifiziert wurde. Die Tatsache, daß dieser Wert um 17 mV höher ist als das Umschaltpotential der anaeroben Reaktivierung könnte darauf hindeuten, daß der hier betrachtete Übergang hauptsächlich dem Ni-A/Ni-SU-Übergang entspricht, da das spektroelektrochemisch bestimmte Mittelpunktspotential von $-96 \pm 5\text{ mV}$ (pH $6,0$) mit

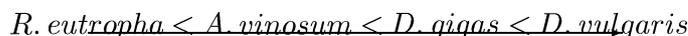
diesem eine höhere Übereinstimmung aufweist als das Mittelpunktspotential des Übergangs Ni-B/Ni-SI (-105 mV bei pH 6,0). Die Argumentation kann dahingehend erweitert werden, daß demzufolge im Falle der anaeroben Reaktivierung der Übergang Ni-B/Ni-SI dominiert, da hier ein Umschaltpotential von -108 ± 3 mV bei pH 6,0 bestimmt wurde.

Einen Hinweis auf die Anwesenheit des Zustandes Ni-A bei der aeroben Inaktivierung liefert das Vorhandensein einer langsamen Phase in der Reaktivierungskinetik. Für die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum*, bei der bei aerober Reaktivierung ebenfalls zwei Phasen identifiziert wurden, wurde gezeigt, daß die langsame Reaktivierung mit EPR-Experimenten zur Aktivierung des Zustandes Ni-A [70] im Einklang steht. Interessanterweise ist das Auftreten einer langsamen Phase jedoch abhängig vom Reaktivierungspotential. Da das Inaktivierungspotential in allen betrachteten Fällen gleich ist, kann man davon ausgehen, daß die Ausgangssituation identisch ist und daß beide oxidierten Zustände Ni-A und Ni-B präsent sind. Ist der Elektronendruck höher, wie dies bei einem negativen Potential der Fall ist, reaktiviert nur der Zustand Ni-B. Bei geringerem Elektronendruck hingegen reaktiviert zuerst der Zustand Ni-B mit einer schnellen Rate und danach der Zustand Ni-A mit einer langsamen Rate.

Die Untersuchungen der aeroben Inaktivierung und Reaktivierung belegen deutlich die Sauerstoffempfindlichkeit der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F, die sich in einem geringen Anteil des Enzyms äußert, der nach der aeroben Inaktivierung durch Reduktion in Anwesenheit von Sauerstoff reaktiviert werden kann. In Abbildung 7.10 ist dies durch die gestrichelte Linie oberhalb der Stromkurve angedeutet, die den Ausgangsstromwert markiert und damit die Höhe des Stroms, zu der der Proteinfilm ohne Aktivitätsverlust zurückkehren sollte. Auf diesen Wert wurden die Strom-Zeit-Verläufe in Abbildung 7.11 normiert, so daß die Höhe der Stromkurven nach der Reaktivierung den Anteil an reaktiviertem Enzym widerspiegelt. Mindestens 40% des Proteins denaturieren durch den Kontakt mit Sauerstoff innerhalb von 10 min, wobei hier berücksichtigt werden muß, daß ein geringer Anteil der Aktivität dadurch verloren geht, daß nicht alle Proteinmoleküle dauerhaft an der PGE-Elektrode adsorbieren. Dieser Aktivitätsverlust ist unabhängig von der Sauerstoffeinwirkung und kann auch im Fall der anaeroben Experimente beobachtet werden; sein Anteil beträgt etwa 10% (s. Abbildung 7.7). Mit einer maximalen Reaktivierung von etwa 60% ist die Hydrogenase deutlich empfindlicher gegenüber Sauerstoff als z.B. die Hydrogenase aus *A. vinosum* [70]. Die Sauerstoffempfindlichkeit

7 Proteinfilmvoltammetrie an der [NiFe]-Hydrogenase

verschiedener [NiFe]-Hydrogenasen kann in die folgende Reihenfolge gebracht werden [6]:



Sauerstoffempfindlichkeit

Vergleicht man diese Reihenfolge mit dem Lebensraum der einzelnen Organismen (s. Abbildung 7.12), ergibt sich ein unmittelbarer Zusammenhang. Je geringer die Sauerstoffempfindlichkeit der [NiFe]-Hydrogenase ist, desto exponierter ist der Lebensraum für Sauerstoff. Als aerobes, Stickstoff-fixierendes Bakterium lebt *R. eutropha* in den aeroben Bereichen eines aquatischen Habitates, die Schwefelpurpurbakterien, zu denen *A. vinosum* gehört, befinden sich im Grenzgebiet zwischen aerober und anaerober Zone, während die Schwefelreduzierer der Gattung *Desulfovibrio* die tiefen anaeroben Zonen besiedeln (Abbildung 7.12). Dementsprechend hat sich im Laufe der Evolution eine Toleranz der anaeroben Bakterien gegenüber Sauerstoff entwickelt, die sowohl Modifikationen des aktiven Zentrums betreffen als auch die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Gasmoleküle durch veränderte Aminosäuren beeinflussen. Die lösliche [NiFe]-Hydrogenase aus *R. eutropha* besitzt z.B. zusätzliche Cyanid-Liganden am Nickel und am Eisen [16, 52, 117], während die regulatorische [NiFe]-Hydrogenase Mutationen an Positionen aufweist, die bei den verschiedenen Sulfatreduzierern konserviert sind [21].

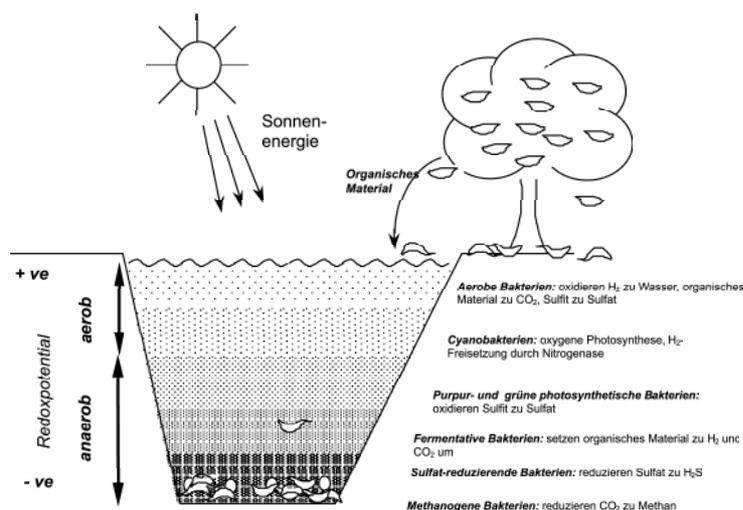


Abbildung 7.12: Zonen eines aquatischen bakteriellen Ökosystems (verändert nach [24]).

7.7 Zusammenfassung

Die proteinfilmvoltammetrischen Experimente an der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F konnten durch den Vergleich mit der bereits intensiv untersuchten [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* markante Unterschiede zwischen diesen beiden zur Gruppe der Standardhydrogenasen gehörenden Enzyme belegen. Trotz identischer aktiver Zentren verhalten sie sich im Hinblick auf Inaktivierung und Reaktivierung unterschiedlich. Zudem ergaben sich Hinweise auf die Natur des Brückenliganden in Ni-A, der im Falle der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* ein SO₂ sein könnte. Auch auf der Basis von Röntgenstrukturanalysen wird das Vorhandensein einer Schwefeloxidspezies im Zustand Ni-A postuliert, wobei hier angenommen wird, daß ein SO-Molekül an das Nickel bindet und sich ein Sauerstoffatom in der Nähe des Cysteins Cys546 befindet [93]. Die Proteinfilmvoltammetrie erweitert somit das Verständnis der spezifischen Unterschiede der einzelnen [NiFe]-Hydrogenasen in bezug auf ihr Inaktivierungs- und Reaktivierungsverhalten und ihre Sauerstoffempfindlichkeit, die in direktem Zusammenhang mit der evolutionären Anpassung der Hydrogenasen an den Lebensraum des Bakteriums steht. Ein endgültiges Verständnis der Prozesse setzt allerdings weiterführende elektrochemische und spektroskopische Experimente voraus, als deren Ideengeber die hier diskutierten Ergebnisse dienen werden. So muß unter anderem spektroskopisch und durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt werden, ob SO₂ oder SO tatsächlich als Brückenligand im oxidierten Zustand Ni-A bindet und eine anaerobe Inaktivierung auslöst. Zudem gilt es zu verstehen, warum die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F sich anaerob nicht wie die Standardhydrogenasen anderer Spezies inaktivieren läßt und ob die katalytische Aktivität, die sie im Bereich oxidativer Spannungen aufweist, eventuell auf einer extrem hohen Affinität zum Substrat Wasserstoff beruht, und ob das Enzym bei Spannungen oberhalb von 300 mV seine Aktivität einstellt.

8 Wellenlängenabhängigkeit der Photokonversion Ni-C \rightarrow Ni-L

Neben den Redoxzuständen, von denen eine Beteiligung am katalytischen Prozess der [NiFe]-Hydrogenase vermutet wird, gibt es einen weiteren Zustand, der allerdings physiologisch nicht relevant ist. Dieser Zustand, der mit Ni-L bezeichnet wird, läßt sich anreichern, indem die [NiFe]-Hydrogenase im Zustand Ni-C bei Temperaturen unterhalb von 100 K mit weißem Licht bestrahlt wird, und ist bei diesen Temperaturen stabil. Eine Erwärmung über 100 K führt dazu, daß der Ni-C-Zustand wieder gebildet wird. Die Entstehung des Zustandes Ni-L ist von einer Änderung des EPR-Signals begleitet. Es zeichnet sich durch einen g -Tensor mit den g -Werten 2,30; 2,12 und 2,01 aus. Der zusätzliche Ni-L-Zustand mit einem relativ kleinen Anteil am EPR-Spektrum ist ein transienter Zustand, der während des Übergangs von Ni-C zu Ni-L entsteht [37]. Bei [NiFe]-Hydrogenasen verschiedener Spezies sind bis zu drei verschiedene Ni-L-Formen entdeckt und beschrieben worden [84, 85, 118].

Für die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* wurde gezeigt, daß die Photokonversion, d.h. die Entstehung von Ni-L aus Ni-C durch Belichtung, in D₂O nahezu sechs mal langsamer abläuft als in H₂O [118]. Außerdem konnte für die [NiFe]-Hydrogenasen aus *Thiocapsa roseopersicina* [123], *Ralstonia eutropha* [20], *D. gigas* [39] und *D. vulgaris* Miyazaki F [42] nachgewiesen werden, daß die große Protonenkopplung, die mittels ¹H-ENDOR im Zustand Ni-C gemessen wurde, im Zustand Ni-L nicht mehr vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, daß an der Photoreaktion die Bewegung eines Protons beteiligt ist. Es wurde postuliert, daß die Position des Brückenliganden zwischen Nickel und Eisen im Zustand Ni-L unbesetzt bleibt [20, 43, 123]. Diese Annahme wird durch relativistische DFT-Rechnungen unterstützt, bei denen versucht wird, die Parameter, die ein EPR-Spektrum charakterisieren (z.B. den g -Tensor), korrekt zu berechnen. Bei den Zuständen Ni-C und Ni-L gelingt dies am besten unter der Annahme, daß das Nickel im Zustand Ni-C formal die Oxidationsstufe Ni^{III} und

im Zustand Ni-L formal die Oxidationsstufe Ni^I besitzt und der Brückenligand zwischen Nickel und Eisen im Zustand Ni-C ein Hydrid (H⁻) ist, während im Zustand Ni-L die Brückenposition unbesetzt bleibt [43].

Obwohl der Zustand Ni-L durch EPR-spektroskopische Messungen schon detailliert untersucht wurde [36, 37, 84, 85, 118, 123], ist das Wissen um die Entstehung dieses Zustandes darauf begrenzt, daß dazu Licht des sichtbaren Spektralbereiches verwendet werden muß. Daher wurde der Photoprozeß in Abhängigkeit der eingestrahlten Wellenlänge untersucht, sowie zur näheren Charakterisierung der beteiligten Übergänge die UV/VIS-Spektren des reduzierten und oxidierten Enzyms eingehender betrachtet.

8.1 Probenvorbereitung

8.1.1 EPR-Spektroskopie

80 µl einer Hydrogenase-Lösung der Konzentration 1,5 mM werden in ein EPR-Röhrchen von 3 mm Innendurchmesser (X-Band-Röhrchen) gefüllt und der Lösung ein Rührfisch hinzugefügt. Das Röhrchen wird mit einem kurzen Stück Silikonschlauch versehen, welcher mit einem Glas- oder Plastikstopfen verschlossen ist. Über eine Kanüle, die durch den Silikonschlauch gestochen wird, steht die Atmosphäre des Röhrchens in Verbindung mit dem Gasverteilungssystem. Zunächst wird das Röhrchen über die am Gasverteilungssystem angeschlossene Vakuumpumpe vorsichtig evakuiert. Anschließend wird Wasserstoffgas eingelassen und die Hydrogenase-Lösung so für 6 h bei 100% H₂ aktiviert. Während dieser Zeit wird in gleicher Art und Weise einmal pro Stunde ein Gasaustausch durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Hydrogenase nur mit Wasserstoffgas in Berührung kommt, und um eventuell eindringende Luft zu entfernen. Danach wird der Rührfisch entfernt und die Lösung im Röhrchen sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Hydrogenase befindet sich nun im Zustand Ni-C; weitere EPR-aktive Zustände sind nicht präsent. Vor der Durchführung einer jeden Messung wird die Probe vollständig in den Ni-C-Zustand überführt, indem sie 10 min in flüssigem Ethanol bei 200 K inkubiert wird. Bei dieser Temperatur ist der Ni-L-Zustand nicht mehr stabil und Moleküle, die sich im Ni-L-Zustand befinden, gehen in den Ni-C-Zustand zurück. Noch im Dunkeln wird die Probe in das Spektrometer eingebaut und anschließend gemessen.

8.1.2 UV/VIS-Spektroskopie

1 ml Hydrogenase-Lösung der Konzentration $30 \mu\text{M}$ werden in eine Quartz-Küvette gefüllt, die eine Schichtdicke von 1 cm besitzt. Die Küvette wird mit einem Stopfen von der Außenatmosphäre getrennt und in gleicher Weise wie eine Probe für die EPR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 8.1.1) aktiviert. Danach wird das Spektrum der Probe gegen eine Referenz (Probenpuffer ohne Hydrogenase) im UV/VIS-Spektrometer aufgenommen.

8.2 Durchführung

8.2.1 Messprinzip

Die EPR-Messungen wurden bei einer Frequenz von 9,7 GHz (X-Band) bei einer Temperatur von 40 K durchgeführt. Diese Temperatur wurde gewählt, da hierbei der Anteil des transienten Ni-L-Zustandes sehr gering ist, was die Datenanalyse vereinfacht. Zudem kommt es bei tieferen Temperaturen zu einer Spinkopplung des Nickels mit dem proximalen [4Fe4S]-Cluster, die zu einer Aufspaltung des EPR-Signals führt [50]. Nach Aufnahme eines ersten Spektrums ohne Belichtung wird die Probe bei einer definierten Wellenlänge angeregt. Die Anregung erfolgt durch einen OPO (*optical parametric oscillator*)-Laser mit einer Repetitionsrate von 10 Hz, der von einem Nd:YAG-Laser gepumpt wird. Die Energie des Lichtes, das die Probe anregt, wird kurz vor dem Auftreffen auf die Probe mittels eines Powermeters gemessen.

Die Photokonversion wird anhand des Verschwindens des g_x -Signals des Ni-C-Zustandes untersucht, da es im EPR-Spektrum unabhängig von den anderen Signalen auftritt und nicht mit anderen Signalen des Ni-C- oder Ni-L-Zustandes überlappt. Das Verschwinden dieses Signals wird auf zwei Arten detektiert. Zum einen wird die dunkel-adaptierte Probe mit verschiedenen Wellenlängen belichtet, deren Energie so gewählt ist, daß die Anzahl an Photonen mit der Anzahl übereinstimmt, die bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630 \text{ nm}$ und einer Energie von 2,6 mJ pro Laserpuls (Pulslänge: 6 ns) vorhanden ist. Die Energie einer Wellenlänge λ wird berechnet nach:

$$P(\lambda) = P(630) \cdot \frac{630}{\lambda} \quad (8.1)$$

Während einer Messdauer von drei Stunden wurde das EPR-Signal an der Position des magnetischen Feldes aufgenommen, die dem g_x -Signal des Ni-C-

Zustandes entspricht ($B_0 = 317,8 \text{ mT}$). Auf diesem Wege wurden 4096 Datenpunkte im Abstand von 2,6 s aufgenommen.

Zum anderen wurde die Photokonversion durch Aufnahme kompletter EPR-Spektren während einer Illuminationsdauer von 2 Stunden verfolgt. Der Zeitabstand der Einzelspektren beträgt 5 min; die Aufnahmedauer eines Spektrums in einem Magnetfeldbereich von 260 bis 360 mT beträgt 42 s. Mit dieser Methode wurden verschiedene Wellenlängen im Bereich von 355 nm bis 1064 nm in einem Abstand von 50 nm untersucht. Die Energie des Lichtes betrug dabei 5,6 mJ pro Puls.

8.2.2 Datenanalyse

Zur Berechnung der Photokonversion von Ni-C nach Ni-L wurden die Daten verwendet, die durch Anwendung der ersten Methode gewonnen wurden. Ihr lag folgende Gleichung zugrunde:

$$\text{Photokonversion} = \left(1 - \frac{I_x(t = \infty)}{I_x(t = 0)} \right) \cdot 100\% \quad (8.2)$$

wobei die Amplitude $I_x(t = \infty)$ des g_x -Signals des Ni-C-Zustandes extrapoliert gegen eine unendliche Belichtungsdauer durch Anpassen der Datenpunkte mit einer exponentiellen Funktion bestimmt wurde.

Der Vorteil der zweiten Methode ist, daß die EPR-Signale sämtlicher Zustände in einem Spektrum aufgenommen wurden; Nachteil ist jedoch eine geringe zeitliche Ungenauigkeit, die sich aufgrund der Aufnahmedauer eines Spektrums ergibt.

Zur Kontrolle, daß die Messungen innerhalb des linearen Teils der Sättigungskurve durchgeführt wurden, wurde die Photokonversion bei 630 nm und 355 nm bei vier verschiedenen Energien gemessen und gegen die eingestrahlte Energie aufgetragen. Dies bestätigte, daß erst oberhalb einer Energie von 5 mJ pro Puls der Sättigungsbereich erreicht wurde, in dem durch Erhöhung der Energie keine höhere Photokonversion erzielt werden konnte. Sämtliche Messungen wurden mit geringerer Energie durchgeführt.

Der Fehler sämtlicher Messungen, der hauptsächlich auf der Reproduzierbarkeit der optischen Einstellungen und auf der Ungenauigkeit des Powermeters beruhte, wurde auf 7% abgeschätzt.

8.3 Das Aktionsspektrum des Konversionsprozesses

8.3.1 Ergebnisse

Die Reduktion der [NiFe]-Hydrogenase mit Wasserstoffgas führte zu der Entstehung des Ni-C-Zustandes, dessen EPR-Spektrum durch die g -Werte $g_x = 2,20$, $g_y = 2,14$ und $g_z = 2,01$ charakterisiert ist (Abbildung 8.1A). Nach der 30 minütigen Belichtung der Probe außerhalb des Spektrometers bei 77 K mit dem weißen Licht einer Projektorlampe (250 W) verschwand das Ni-C-Signal vollständig, und das Signal des Ni-L-Zustandes konnte gemessen werden. Das EPR-Spektrum des Ni-L-Zustandes ist durch die g -Werte $g_x = 2,30$; $g_y = 2,12$ und $g_z = 2,05$ charakterisiert (Abbildung 8.1A). Wurde hingegen die Probe für kurze Zeit (10 min) innerhalb des Spektrometers belichtet, konnte ein zusätzliches Signal beobachtet werden, charakterisiert durch die g -Werte $g_x = 2,26$; $g_y = 2,11$ und $g_z = 2,05$. Dieses wurde einem transienten licht-induzierten Zustand zugeordnet. Die hier beobachteten Ni-L-Spektren gleichen denen, die für [NiFe]-Hydrogenasen anderer Spezies beschrieben wurden (*A. vinosum* [118], *D. gigas* [84,85], *D. fructosovorans* und *Desulfomicrobium baculatum* [84]). Weiterhin erkennt man in den Spektren (vgl. Abbildung 8.1) ein isotropes Signal bei $g = 2,01$. Dieses Signal stammt vom reduzierten [3Fe4S]-Cluster und überlappt mit der g_z -Komponente des Ni-C-Signals (Abbildung 8.1A).

Die Entstehung des Ni-L-Zustandes wurde bei verschiedenen Wellenlängen beobachtet, indem während der Belichtungsdauer von 2 Stunden im Abstand von 5 min EPR-Spektren aufgenommen wurden. Eine Auswahl solcher Spektren, die bei einer Anregungswellenlänge von 630 nm und einer Anregungsenergie von 5,6 mJ pro Puls aufgenommen wurden, zeigt Abbildung 8.1B. Die Abnahme des Ni-C-Signals ist hierbei proportional zur Zunahme des Ni-L-Signals, wie dies auch bei der Anregung einer solchen Probe mit weißem Licht beobachtet wurde, und erhöhte sich monoton mit zunehmender Belichtungsdauer. Bei der Meßtemperatur von 40 K erschien der transiente Ni-L-Zustand zu sehr geringem Anteil in allen Spektren. Die Intensität seines g_x -Signals erhöhte sich in den ersten 15 min der Belichtung, verringerte sich jedoch bei längerer Belichtungsdauer. Diese Beobachtung bestätigt frühere Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, daß dieser Zustand ein transienter Zustand ist, der vornehmlich bei niedrigeren Temperaturen und kurzen Belichtungszeiten auftritt [37, 84].

Aufgrund des Vorhandenseins mehrerer Ni-L-Zustände wurde zur Analyse der Photokonversion bei verschiedenen Anregungswellenlängen die Abnahme des

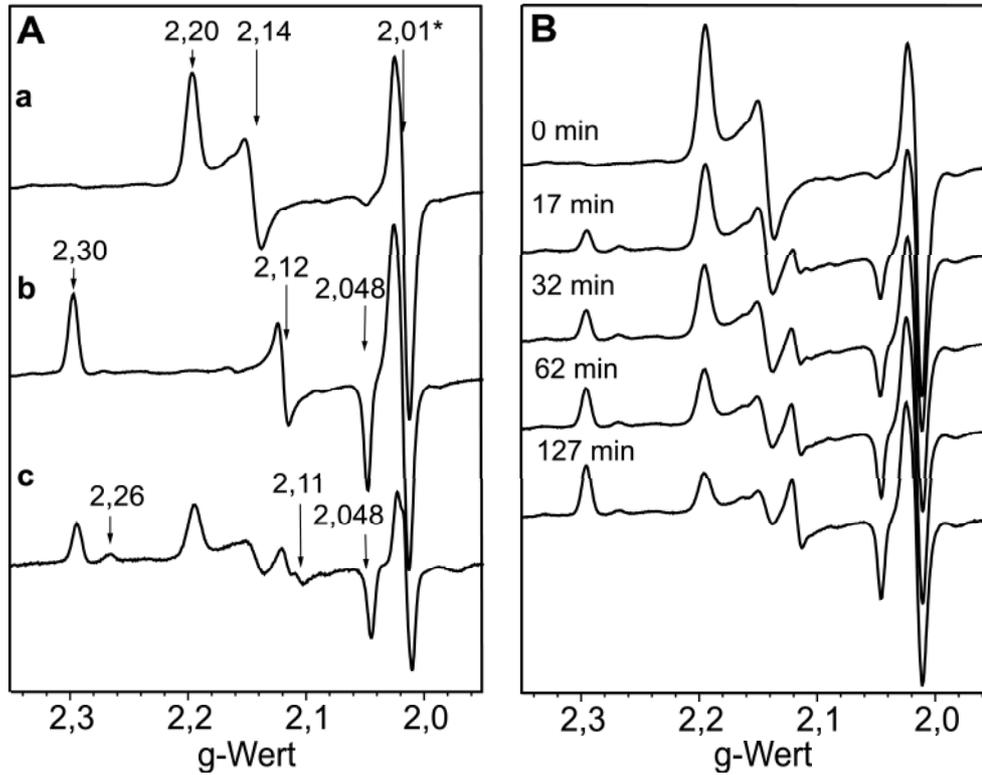


Abbildung 8.1: A: EPR-Spektren im X-Band (a) des Zustandes Ni-C und (b) des Zustandes Ni-L nach Belichtung der Probe außerhalb des Spektrometers mit weißem Licht bei 77 K für 20 min und (c) einer Mischung der Zustände Ni-C und Ni-L sowie des transienten Ni-L-Zustandes nach Belichtung der Probe für 10 min innerhalb des Spektrometers. Das Signal des reduzierten [3Fe4S]-Cluster ist mit * gekennzeichnet. Experimentelle Bedingungen: Mikrowellenfrequenz 9,76 GHz, Mikrowellenstärke 3,13 mW, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 1 mT.

B: Serie von EPR-Spektren, die während der Anregung der Hydrogenase bei $T=40$ K mit $\lambda = 630$ nm und 5,6 mJ pro Puls aufgenommen wurden. Experimentelle Bedingungen: Mikrowellenfrequenz 9,77 GHz, Mikrowellenstärke 2 mW, Modulationsfrequenz 100 kHz, Modulationsamplitude 0,5 mT.

Ni-C-Signals herangezogen. Hierzu wurde eine Serie von Experimenten durchgeführt, bei der nur das g_x -Signal des Ni-C-Zustandes betrachtet wurde ($g_x = 2, 20$; $B_0 = 317, 8 \text{ mT}$). Dieses Signal überlappt mit keinem anderen Signal anderer Redoxzustände oder der [FeS]-Cluster. Abbildung 8.2 zeigt beispielhaft zwei Kurven, die die Abnahme der g_x -Komponente des Ni-C-Signals darstellen. Sie wurden bei 530 nm und 870 nm aufgenommen und auf die EPR-Intensität bei $t=0$ (d.h. die Probe befand sich vollständig im Zustand Ni-C) normalisiert. Durch diese Kurven wird deutlich, daß die Photokonversion bei einer Wellenlänge von 870 nm langsamer ist als bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 530 \text{ nm}$. Überraschenderweise kann die Kurve bei 870 nm am besten mit einer mono-exponentiellen Abnahme angefitet werden, während zur Darstellung der Kurve bei 530 nm eine tri-exponentielle Funktion benötigt wird. Die Analyse aller Messungen ergab, daß die Photokonversion mit drei Zeitkonstanten bei Anregung mit Wellenlängen unterhalb von 780 nm und mit einer Zeitkonstante bei Anregung oberhalb von 780 nm abläuft. Die Zeitkonstante bei Anregung oberhalb von 780 nm erhöhte sich von 110 min bei $\lambda = 780 \text{ nm}$ bis zu 162 min bei $\lambda = 870 \text{ nm}$, was bedeutet, daß die Erzeugung von Ni-L mit geringer werdender Anregungsenergie immer schwieriger wird. Es wurde zudem versucht, die Rückreaktion dieser Photokonversion zu untersuchen, d.h. ausgehend vom Zustand Ni-L wieder in den Zustand Ni-C zurück zu gelangen, indem eine lichtadaptierte Probe im Ni-L-Zustand (erreicht durch Belichtung außerhalb des Spektrometers mit weißem Licht) mit Licht verschiedener Wellenlängen bei 40 K beleuchtet wurde. Bei keiner Wellenlänge zwischen 355 nm und 900 nm konnte ein Ni-C-Signal beobachtet werden.

Trägt man die Photokonversion, also den prozentualen Anteil der in Ni-L umgewandelten Moleküle, gegen die Anregungswellenlänge auf, erhält man ein sogenanntes Aktionsspektrum, das in Abbildung 8.3 dargestellt ist. Dieses Spektrum ist sehr breit und überspannt fast den gesamten Bereich des sichtbaren Lichtes. Die maximal erreichte Konversion von 75% wurde bei Anregung mit Licht der Wellenlängen $550 \text{ nm} < \lambda < 700 \text{ nm}$ erreicht. Im nahen Infrarotbereich ($\lambda > 900 \text{ nm}$) nahm die Konversion ab und bei einer Wellenlänge von $\lambda > 1050 \text{ nm}$ fand keine Photokonversion mehr statt. Wurde hingegen höher energetisches Licht zur Anregung benutzt ($550 \text{ nm} < \lambda < 350 \text{ nm}$), verringerte sich die Konversion von 65% auf 35%. Darüber hinaus lassen sich lokale Maxima bei 590 nm, 700 nm und 850 nm erkennen. Obwohl während der Messungen auf eine vollständige Belichtung der kompletten Probe geachtet wurde, konnte

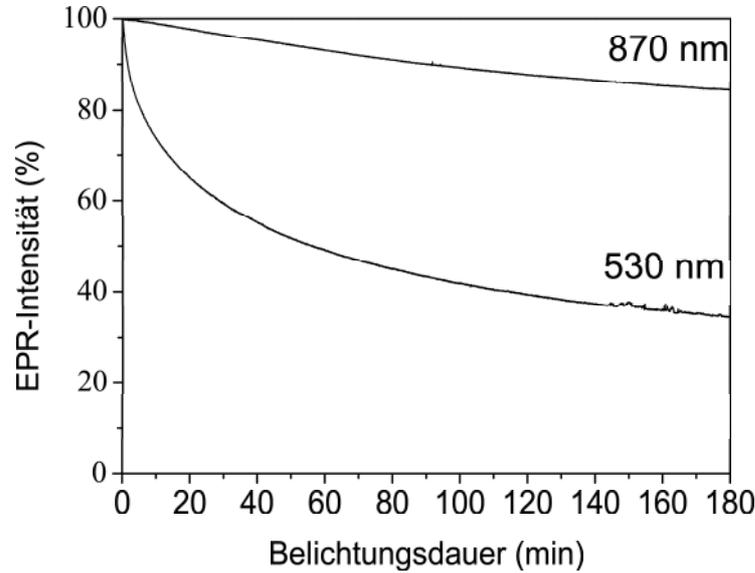


Abbildung 8.2: Abnahme des EPR-Signals des Zustandes Ni-C aufgenommen bei g_x ($g = 2, 20$; $B_0 = 317,8$ mT) während der Belichtung der Probe bei einer Wellenlänge von 530 nm und 870 nm. Die Kurven wurden mit exponentiellen Funktionen dritter Ordnung im Falle von $\lambda = 530$ nm und erster Ordnung im Falle von $\lambda = 870$ nm angefitet. Die Fitkurven sind in der Abbildung nicht dargestellt, da sie den Kurven exakt folgen (Standardabweichung $\sigma_{530 \text{ nm}}^2 = 0,04$; $\sigma_{870 \text{ nm}}^2 = 0,02$). Die experimentellen Bedingungen entsprachen denen in Abbildung 8.1B.

bei keiner der zur Anregung benutzten Wellenlängen eine Konversion von 100% erzielt werden. Dies könnte zum einen auf dem Effekt der Spektrophotoselektion beruhen, sowie zum anderen mit der Benutzung von polarisiertem Licht begründet werden. Dies impliziert, daß die Moleküle, die so orientiert sind, daß ihr Übergangsdipolmoment parallel zum \mathbf{k} -Vektor der einfallenden Photonen und damit im rechten Winkel zur Ebene des Polarisationsvektors ausgerichtet sind, nicht angeregt werden und im Ni-C-Zustand verbleiben. Werden Streuungseffekte vernachlässigt, berechnet sich die maximal mögliche Konversion nach:

$$\frac{\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \sin^2 \theta d\theta d\phi}{\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \sin \theta d\theta d\phi} \quad (8.3)$$

Hierbei sind θ und ϕ Polarwinkel; θ ist der Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment und dem \mathbf{k} -Vektor des eingestrahltten Photons. Die maximal er-

Tabelle 8.1: Zeitkonstanten t_i (min) und relative Amplituden (%), angegeben in Klammern, die die Fits charakterisieren, mit denen die Abnahme des Ni-C-Signals bei jeder gemessenen Wellenlänge beschrieben werden können. Der Fehler der Zeitkonstanten t_1 und t_2 betrug $\pm 0,1$ min, der der Konstanten $t_3 \pm 1$ min. Die Konstante y_0 gibt die Amplitude der g_x -Komponente des Ni-C-EPR-Signals bei $t=\infty$ an, d.h. den nicht zu Ni-L umgewandelten Anteil der Moleküle.

λ (nm)	y_0	t_1	t_2	t_3
355	69,8	2,2 (6,6)	20,3 (8,4)	149,8 (15,1)
430	52,5	2,7 (7,0)	15,9 (9,7)	94,2 (30,9)
480	44,2	2,8 (7,5)	19,1 (14,8)	129,5 (33,5)
530	28,3	2,4 (14,0)	20,2 (32,2)	110,0 (34,5)
580	24,0	2,5 (10,5)	18,7 (20,4)	100,9 (45,1)
630	30,8	4,0 (10,2)	26,0 (16,4)	110,0 (42,5)
680	28,7	2,9 (3,3)	9,9 (14,0)	110,0 (54,1)
750	45,8	1,5 (0,0003)	8,0 (14,4)	80,5 (39,8)
780	71,0	3,0 (3,6)	24,4 (5,2)	110,0 (20,2)
830	60,3			114,7 (39,7)
870	75,9			162,7 (24,0)
930	55,3			(9,3) ^a

^a Wert der Zeitkonstante unterliegt einem großen Fehler aufgrund der geringen Konversion.

reichbare Konversion beträgt 78,5% und ist durch eine horizontale Linie in Abbildung 8.3 angedeutet.

8.3.2 Diskussion

Die Abnahme des Ni-C-Signals während der Belichtung der Probe mit Licht bestimmter Wellenlängen kann durch eine tri-exponentielle Funktion im Bereich von 350 nm bis 780 nm beschrieben werden. Dahingegen wird nur eine Zeitkonstante zur Beschreibung der Vorgänge benötigt, wenn das anregende Licht eine Wellenlänge von $\lambda > 780$ nm besitzt. Bei allen Wellenlängen wird der Photo-konversionsprozeß von der größten Zeitkonstante t_3 dominiert (vgl. Tabelle 8.2). Die beiden anderen Zeitkonstanten werden dazu benötigt, vor allem den ersten Teil der Abnahme des Ni-C-Signals korrekt zu beschreiben. Die Beobachtung, daß die Zeitkonstante t_3 sich über den gemessenen Spektralbereich kaum ändert,

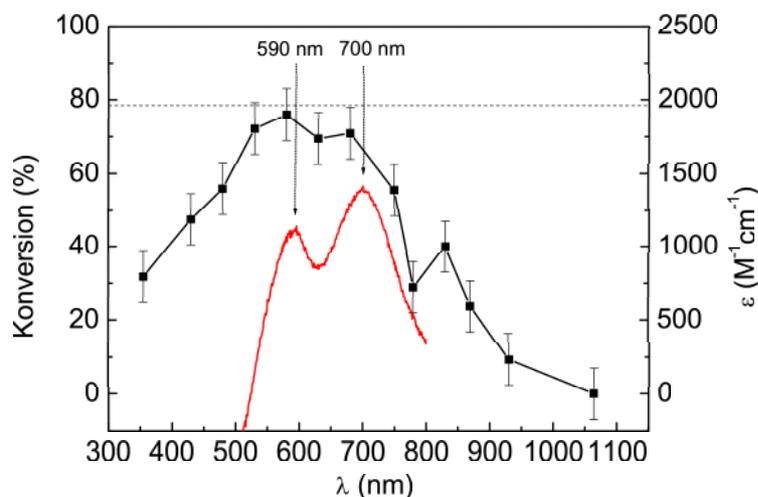


Abbildung 8.3: Photokonversion vom Zustand Ni-C zum Zustand Ni-L in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Dieses Spektrum repräsentiert das Aktionsspektrum des Konversionsprozesses (schwarze Kurve). Die Energie des anregenden Lichtes wurde so gewählt, daß die Probe bei jeder Wellenlänge mit der gleichen Anzahl an Photonen belichtet wurde. Der absolute Fehler eines jeden Datenpunktes beträgt 7% Konversion. Neben dem Aktionsspektrum enthält die Abbildung das UV/VIS-Spektrum der reduzierten Hydrogenase im Bereich von 500 nm bis 800 nm (vgl. Abbildung 8.5), von dem eine monoexponentielle Hintergrundfunktion abgezogen wurde (rote Kurve).

impliziert, daß die Photokonversion bei allen Wellenlängen mit dem gleichen Mechanismus stattfindet. Oberhalb einer Wellenlänge von 830 nm vergrößert sich t_3 entsprechend der verminderten Konversion von Ni-C nach Ni-L. Bei Anregung der Probe mit Licht einer Wellenlänge, die größer ist als 1050 nm, reicht die Energie nicht mehr aus, um eine Photokonversion auszulösen.

Zur Beschreibung der Abnahme des Ni-C-Signals während der Belichtung dient das in Abbildung 8.4 dargestellte einfache Modell. Dieses Modell berücksichtigt die Zustände Ni-C und Ni-L und den elektronisch angeregten Zustand Ni-C*, die an der Photokonversion beteiligt sind. Die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen diesen Zuständen werden durch die Konstanten k angegeben. Unter Berücksichtigung der Annahme, daß sich die Ausgangspopulation vollständig im Ni-C-Zustand befindet, läßt sich eine Gleichung formulieren, die die zeitlichen Vorgänge in allen drei Zuständen beschreibt. Vereinfachend wird angenommen, daß die Population des Ni-C*-Zustandes uni-direktional in Richtung des Ni-L-

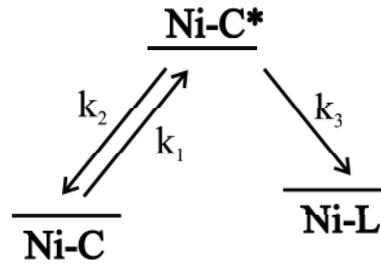


Abbildung 8.4: Modell zur Beschreibung des Photokonversionsprozesses. Ni-C* symbolisiert den elektronisch angeregten Zustand von Ni-C.

Zustandes reagiert ($k_2 = 0$, $k_3 = 1$). In diesem Falle wird die zeitliche Abhängigkeit des Ni-C-Zustandes durch eine mono-exponentielle Funktion beschrieben:

$$N_{\text{Ni-C}}(t) = N_{\text{Ni-C}}(0)e^{-k_1 \cdot t} \quad (8.4)$$

Dieses Modell ermöglicht ein Verständnis der Photokonversion bei einer Anregungswellenlänge $\lambda < 780$ nm. Bei längeren Wellenlängen wird die Zeitkonstante größer, was bedeutet, daß die Konstante k_1 kleiner wird.

Bei größeren Wellenlängen läßt sich der Prozeß nicht mehr ausreichend durch Gleichung 8.4 beschreiben. Mögliche Gründe hierfür können sein, daß mehr als ein elektronisch angeregter Zustand existiert oder daß ein Gleichgewicht zwischen den Zuständen herrscht ($k_2 \neq 0$, $k_3 \neq 1$). Beide Möglichkeiten würden zu einem multi-exponentiellen Verhalten führen. Eine Schwäche des obigen Modells ist, daß es die Spektrophotoselektion nicht berücksichtigt, und daß angenommen wird, daß die gesamte Population im Zustand Ni-L endet. Im Gegensatz zur Anregung mit Laserlicht tritt bei Anregung mit weißem Licht einer Projektorlampe keine Spektrophotoselektion auf und eine vollständige Konversion kann erreicht werden.

8.4 UV/VIS-Spektroskopie an der [NiFe]-Hydrogenase

Die Detektion lokaler Maxima im Aktionsspektrum der Photokonversion war der Anlaß, die UV/VIS-Spektren der Hydrogenase in ihrer oxidierten und reduzierten Form miteinander zu vergleichen. Dies soll Hinweise auf die Größe der Extinktionskoeffizienten und dadurch auf die Natur der Übergänge geben.

8.4.1 Ergebnisse

Sowohl von der oxidierten in den Zuständen Ni-A und Ni-B als auch von der reduzierten Hydrogenase in den Zuständen Ni-C und Ni-R wurden UV/VIS-Spektren aufgenommen (Abbildung 8.5). Die UV/VIS-Spektren der [NiFe]-Hydrogenasen werden von der Absorption der drei [FeS]-Clustern dominiert [94]. In Tabelle 8.2 sind die Absorptionsmaxima von [3Fe4S]- und [4Fe4S]-Clustern verschiedener FeS-Proteine in ihrer oxidierten und reduzierten Form zusammengefasst [76]. Das Spektrum der oxidierten [NiFe]-Hydrogenase zeigte eine breite Absorptionsbande um 420 nm, die durch die oxidierten [4Fe4S]-Cluster (390 nm) und den oxidierten [3Fe4S]-Cluster (415 nm und 455 nm) verursacht wird. Die Reduktion des Enzyms führte zu einer Reduktion aller [FeS]-Cluster und dadurch zu einer Verringerung der Bande bei 420 nm.

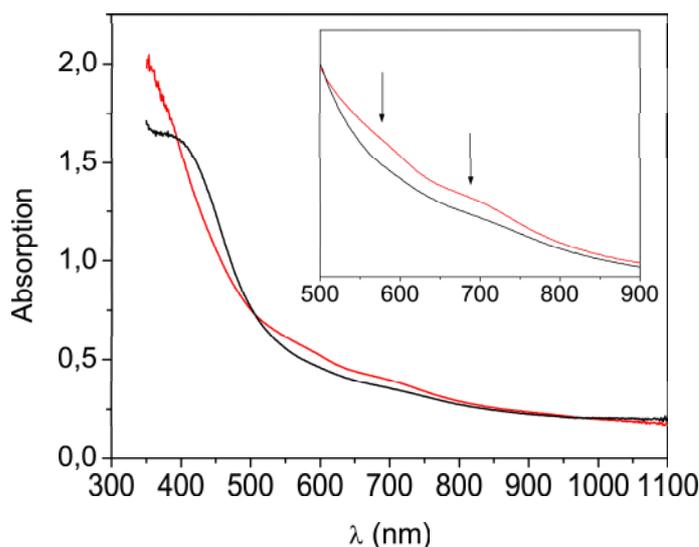


Abbildung 8.5: UV/VIS-Spektren der [NiFe]-Hydrogenase. Dargestellt ist das Spektrum des oxidierten Enzyms (schwarze Kurve) und des durch Wasserstoffgas reduzierten Enzyms (rote Kurve). Die eingefügte Box zeigt eine Vergrößerung des Bereichs von 500 nm bis 900 nm.

Bei Betrachtung der Vergrößerung in Abbildung 8.5 wird deutlich, daß das Spektrum des reduzierten Enzyms zwei Banden bei 590 nm und 700 nm besitzt, die im Spektrum des oxidierten Enzyms nicht präsent sind. Dieser Be-

Tabelle 8.2: UV/VIS-spektroskopische Charakteristika von [FeS]-Clustern in Proteinen, verändert nach Lippard&Berg [76]

[FeS]-Cluster	Zustand	Formalladung Fe	λ_{max} (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
[3Fe4S]	oxidiert	3 Fe^{3+}	415, 455	15600, 13200
[3Fe4S]	reduziert	2 Fe^{3+} , 1 Fe^{2+}	425	9600
[4Fe4S]	oxidiert	2 Fe^{3+} , 2 Fe^{2+}	390	15200
[4Fe4S]	reduziert	1 Fe^{3+} , 3 Fe^{2+}	strukturlos; Absorption verschwindet bei Reduktion	

fund wurde schon zuvor publiziert, jedoch nicht weiter analysiert [94]. Um ihre Extinktionskoeffizienten zu bestimmen, wurde eine exponentielle Hintergrundfunktion vom Spektrum des reduzierten Enzyms subtrahiert. Das resultierende Differenzspektrum ist in die Abbildung 8.3 eingefügt, und die Extinktionskoeffizienten wurden mit $1100 M^{-1}cm^{-1}$ und $1400 M^{-1}cm^{-1}$ bei einem Fehler von $300 M^{-1}cm^{-1}$ bestimmt (vgl. Abbildung 8.3).

8.4.2 Diskussion

Der Vergleich des Aktionsspektrums mit dem UV/VIS-Spektrum zeigt deutliche Übereinstimmungen. Beide Spektren zeigen Absorptionsmaxima bei 590 nm und 700 nm (vgl. Abbildung 8.3). Zu beobachten ist zudem, daß sich die Konversion vom gelben zum blauen Spektralbereich verringert, in dem die [FeS]-Cluster ihr Absorptionsmaximum besitzen. Obwohl diese Beobachtung verdeutlicht, daß die Konversion nicht direkt mit diesen großen Absorptionen gekoppelt ist ($\epsilon_{gesamt} \sim 47000 M^{-1}cm^{-1}$), könnte sie im blauen Spektralbereich unterschätzt werden, da die [FeS]-Cluster viele der auftreffenden Photonen absorbieren. Dennoch war es möglich, mit einer Anregungsenergie von 5,6 mJ pro Puls bei 355 nm den Konversionsprozess in gleicher Art und Weise zu sättigen, wie dies bei 630 nm und 5,6 mJ pro Puls der Fall war. Unter diesen Bedingungen änderten sich die zugehörigen Zeitkonstanten nicht. Dies zeigt, daß der Konversionsprozess nur in sehr geringem Maße von der Absorption der [FeS]-Cluster beeinflusst wird. Daraus kann geschlossen werden, daß die Absorptionsbanden bei 590 nm und 700 nm, die sowohl im Aktionsspektrum als auch im UV/VIS-Spektrum entdeckt wurden, sowie die Bande bei 850 nm, die mit geringer Intensität im UV/VIS-Spektrum auftritt, elektronische Übergänge beinhalten, die

den Konversionsprozeß vom Zustand Ni-C zum Zustand Ni-L antreiben.

Der Übergang vom Zustand Ni-C zum Zustand Ni-L betrifft hauptsächlich die elektronische und geometrische Struktur des [NiFe]-Zentrums. Es konnte gezeigt werden, daß im Zustand Ni-C der Brückenligand zwischen Nickel und Eisen ein Hydrid ist [20, 42, 43]. Im Falle des Zustandes Ni-C wird angenommen, daß das freie Elektron des Nickels sich im $3d_{z^2}$ -Orbital befindet, während beim Zustand Ni-L der Anteil des $3d_{x^2-y^2}$ -Orbitals höher ist [79]. Es ist nun naheliegend, die Banden bei 590 nm und bei 700 nm sowie eventuell auch die bei 850 nm den elektronischen Übergängen des [NiFe]-Zentrums zuzuordnen. Doch ist bekannt, daß das [NiFe]-Zentrum eine magnetische Spin-Spin-Interaktion mit dem proximalen [4Fe4S]-Cluster besitzt, wenn dieser reduziert ist. Diese Interaktion enthält einen signifikanten Anteil einer Austauschwechselwirkung [37, 50]. Ein Energie-Übertragungsmechanismus vom angeregten proximalen [4Fe4S]-Cluster zum [NiFe]-Zentrum kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Um festzustellen, ob [FeS]-Cluster Absorptionsbanden im Bereich des sichtbaren Lichtes besitzen, wurde nach UV/VIS-Spektren von [FeS]-Clustern in der Literatur gesucht. Die grundsätzlichen spektroskopischen Eigenschaften sind in Tabelle 8.2 zusammengefasst. Sie unterscheiden sich demnach hauptsächlich anhand des Redoxzustandes des [FeS]-Clusters. Im Falle des Zustandes Ni-C befinden sich die beiden [4Fe4S]-Cluster der [NiFe]-Hydrogenase in ihrem reduzierten ($S = \frac{1}{2}$) Zustand. Das UV/VIS-Spektrum eines oxidierten [4Fe4S]-Clusters zeigt verschiedene Banden, doch das eines reduzierten Clusters ist strukturlos im Bereich zwischen 500 nm und 900 nm [48, 66, 105]. Daraus folgt, daß die Banden, die sowohl im UV/VIS- als auch im Aktionsspektrum vorhanden sind, vom [NiFe]-Zentrum stammen.

Shupack *et al.* [106] charakterisierten 1964 die quadratisch-planaren Ni-Maleonitrildithiolat-Komplexe $\text{Ni}(\text{mnt})_2^-$ und $\text{Ni}(\text{mnt})_2^{2-}$, bei denen das Nickel durch vier Schwefelatome koordiniert ist und die eine elektronische Grundstruktur mit $3d_{yz}$ -Charakter besitzen (s. Abbildung 8.6). Für diese Komplexe wurden Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer-Übergänge ($\epsilon \sim 2500 - 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) sowie paritätsverbotene Übergänge ($\epsilon \sim 500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) im Spektralbereich zwischen 500 und 900 nm beschrieben. Die genauen Eigenschaften der letzteren werden immer noch diskutiert; sie könnten zu Übergängen gehören, bei denen Ligandenorbitale beteiligt sind. Obwohl $\text{Ni}(\text{mnt})_2^-$ eine andere elektronische Grundstruktur hat als das [NiFe]-Zentrum im Ni-C-Zustand und zudem kein Eisen enthält, dienen die Werte der Extinktionskoeffizienten der Banden

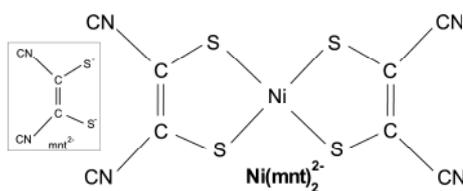


Abbildung 8.6: Struktur des Maleonitrildithiol-Anions (links) und des $\text{Ni}(\text{mnt})_2^{2-}$ -Komplexes.

des $\text{Ni}(\text{mnt})_2^{2-}$ als Bestätigung, daß es in UV/VIS-Spektren Übergänge gibt, die dem Nickel zuzuordnen sind. Die kleinen Werte der Extinktionskoeffizienten der Banden bei 590 nm und 700 nm, die im UV/VIS-Spektrum des reduzierten Enzyms identifiziert werden konnten, verdeutlichen, daß der hier stattfindende Übergang Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer-Charakter besitzt.

8.5 Implikationen für den Reaktionsmechanismus

Der Zustand Ni-C kann ausgehend vom Ni-L-Zustand bei Temperaturen oberhalb von 120 K wieder hergestellt werden. Das bedeutet, daß der Zustand Ni-C energetisch niedriger liegen muß als der Zustand Ni-L. Aufgrund der Tatsache, daß die Rückreaktion von Ni-L nach Ni-C nicht durch Belichtung erreicht werden kann, ist die Relaxation vom angeregten Zustand unidirektional in Richtung des Ni-L-Zustandes (vgl. Abbildung 8.4). Eine weitere mögliche Erklärung ist, daß der Zustand Ni-L kein Licht absorbieren kann.

Nicht nur die Belichtung des Zustandes Ni-C, sondern auch die Anregung eines Zustandes, bei dem Kohlenmonoxid exogen an das Nickel im aktiven Zentrum der Hydrogenase gebunden ist, führt zur Entstehung des Ni-L-Signals im EPR-Spektrum [94]. Während der letztgenannten Konversion wird das exogen gebundene Kohlenmonoxid wieder freigesetzt. Röntgenkristallographische Untersuchungen zeigen, daß sich die CO-gebundene und die CO-freie Form in der Elektronendichte am Cystein Cys546 unterscheiden, das zudem einen höheren Temperaturfaktor im Vergleich zu den anderen koordinierenden Cysteinen besitzt. Ogata *et al.* [94] erklären diesen Unterschied mit dem Wechsel des Protonierungszustandes eben dieses Cysteins. So soll Cys546 in der CO-freien Form protoniert vorliegen.

Hinweise auf das Vorhandensein einer Thiolgruppe sind bereits häufiger beschrieben worden [44, 82, 91]. In Kombination mit den hier vorgestellten EPR-

und UV/VIS-spektroskopischen Experimenten führt dies zu der Annahme, daß der Brückenligand im Zustand Ni-C, das Hydrid, bei Belichtung als Proton an Cys546 bindet, wodurch das Nickel formal als Ni^I zurückbleibt. Dies würde auch das beobachtete Verschwinden der ¹H Hyperfeinkopplung beim Übergang von Ni-C zu Ni-L erklären [20, 42, 123]. Im Zustand Ni-L ist CO nun in der Lage, an das Nickel im aktiven Zentrum zu binden.

Für die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* konnte gezeigt werden [51], daß bei Mischung des Enzyms im Zustand Ni-C mit CO-gesättigtem Puffer keine Änderung des EPR-Signals auftritt, das Enzym im Zustand Ni-C also nicht mit CO reagiert. Bei Belichtung dieser Probe bei einer Temperatur von 30 K entsteht der Ni-L-Zustand, der bei Erhöhung der Temperatur auf 200 K in die CO-gebundene Form übergeht [51]. Der Zusammenhang zwischen den Zuständen Ni-C, Ni-L und der CO-gebundenen Form Ni-CO läßt sich somit in folgendem Schema zusammenfassen (Abbildung 8.7):

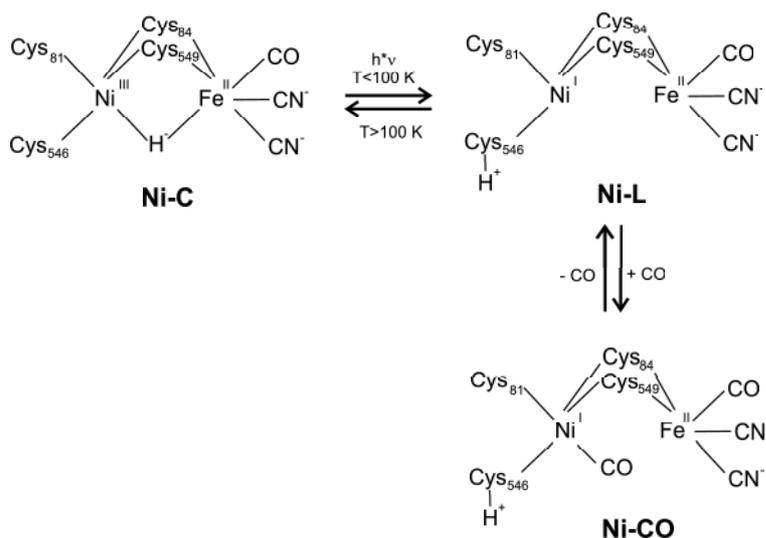


Abbildung 8.7: Schematische Darstellung der Photokonversion Ni-C → Ni-L und der Reaktion mit CO.

8.6 Zusammenfassung

Die Photokonversion vom Zustand Ni-C zum Zustand Ni-L ist mit einem breiten Aktionsspektrum im Bereich des sichtbaren Lichtes verbunden, in dem darüber hinaus lokale Maxima auftreten, die sich mit Absorptionsbanden im UV/VIS-Spektrum der reduzierten Hydrogenase korrelieren lassen. Diese Banden konn-

ten dem aktiven Zentrum zugeordnet werden und zeigen, daß im Photokonversionsprozeß elektronisch angeregte Zustände eine Rolle spielen. Aufgrund der Größe der Extinktionskoeffizienten können diesen Anregungen Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer-Charakter zugeschrieben werden. Der Vergleich der hier dargestellten Ergebnisse mit Ergebnissen und Interpretationen von Röntgenstrukturanalysen und ENDOR- und Puls-EPR-spektroskopischen Experimenten läßt die Schlußfolgerung zu, daß der Konversionsprozeß mit einer Dissoziation der Ni-H-Bindung einhergeht und daß das Proton des Brückenliganden das [NiFe]-Zentrum verläßt und eine Aminosäure, z.B. das koordinierende Cystein Cys546, protoniert.

9 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F mittels spektroskopischer und elektrochemischer Methoden untersucht. Die Hydrogenasen, die sowohl zur heterolytischen Spaltung von molekularem Wasserstoff als auch zur Synthese von Wasserstoff durch die Reduktion von Protonen in der Lage sind, stehen im Fokus der Grundlagenforschung, da man von der Erkenntnis über die Funktionsweise dieser Enzyme Impulse zur Entwicklung einer effizienten biotechnologischen Wasserstoffgewinnung erwartet. Aufgrund des global steigenden Energiebedarfs bei gleichzeitiger Endlichkeit der fossilen Energieträger wird Wasserstoff allgemein als die Energiequelle der Zukunft angesehen, dessen technische Gewinnung derzeit jedoch ökonomisch und ökologisch noch nicht zufriedenstellend ist.

Die spektroskopischen und elektrochemischen Untersuchungen an diesem Enzym leisten einen Beitrag zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus von [NiFe]-Hydrogenasen.

Isolierung und Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase

Der experimentelle Umgang mit Proteinen zur Erforschung ihrer Reaktionsmechanismen erfordert die Isolierung aus ihrer natürlichen Umgebung, z.B. einer Bakterienzelle, in der sie als ein Bestandteil einer komplexen Mischung vieler Proteine auftreten. Zudem werden gerade für bestimmte spektroskopische Experimente große Proteinmengen mit hohen Konzentrationen benötigt, wie sie *in vivo* nicht vorkommen.

So stand am Anfang der hier vorgestellten Untersuchung die Etablierung und Optimierung der Anzucht des Bakterienstammes *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, der die [NiFe]-Hydrogenase exprimiert, und der Reinigung des Enzyms aus diesem Organismus. Zur Erzielung maximaler Hydrogenase-Ausbeuten wurden die Wachstumsbedingungen der Zellen im 50 l Maßstab entsprechend angepaßt. Es stellte sich heraus, daß besonders die Zufuhr der durch die Zellen

sukzessive verbrauchten Kohlenstoffquelle Lactat einen kritischen Parameter darstellt. Diese sogenannte „Fütterung“ darf nur in der Wachstumsphase der Bakterien erfolgen, in der ihre Stoffwechselfähigkeit besonders hoch ist. Nachdem sie nach ca. 27 Stunden ihr Wachstum eingestellt haben, führt eine weitere Fütterung zum Tod der Zellen. Weitere kritische Parameter sind der pH-Wert und die Temperatur, die während der Kultivierungsdauer konstant gehalten wurden (pH \approx 7,2; T=310 K). Die dann folgende Aufreinigung der Hydrogenase aus den gesammelten Zellen erfolgte über einen Trypsin-Verdau, der sich an den Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung anschloß. Durch eine Trennung des Membranankers von dem Rest des intakten Proteins wurde das *in vivo* membranassoziierte Enzym von der Membran entfernt. Die [NiFe]-Hydrogenase konnte anschließend in einer vierstufigen säulenchromatographischen Reinigung (abwechselnd zwei Anionenaustauschchromatographien und zwei Gelfiltrationen) vom Rohextrakt, das neben der nun löslichen Hydrogenase viele weitere lösliche Proteine enthielt, isoliert werden. Der Reinheitsgrad der Hydrogenase am Ende des gesamten Reinigungsprozesses, der über das Verhältnis der Absorptionen A_{400} zu A_{280} bestimmt wurde, betrug $97 \pm 2\%$.

Enzymatische Aktivität

Vor Beginn der spektroskopischen und elektrochemischen Arbeiten wurde die [NiFe]-Hydrogenase durch amperometrische und massenspektrometrische Messungen der enzymatischen Aktivität charakterisiert. Im Vergleich zu strukturell sehr ähnlichen Vertretern der [NiFe]-Hydrogenasen weist die Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F eine sehr geringe Aktivität auf, was auf eine irreversible Inaktivierung durch Sauerstoff während der aeroben Aufreinigung eines Teils der Hydrogenase-Moleküle zurückzuführen sein könnte. Desweiteren zeigt sie eine deutlich schnellere Aktivierung beim Übergang vom oxidierten, inaktiven Zustand „Ni-B“ in den katalytischen Zyklus als andere Standard-[NiFe]-Hydrogenasen. Dies wurde anhand der für diese [NiFe]-Hydrogenasen typischen Verzögerungsphase bis zum Eintritt der katalytischen Aktivität festgemacht, die bei der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F so kurz zu sein scheint, daß sie nicht detektierbar war.

Die Gewinnung und Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase wird in Kapitel 5 dargestellt und diskutiert.

FTIR-spektroskopische Charakterisierung

[NiFe]-Hydrogenasen weisen im Spektralbereich von 1900 cm^{-1} bis 2200 cm^{-1} spezifische Absorptionsbanden auf, die auf Schwingungen der drei zweiatomigen Liganden CO und CN^- beruhen, welche an das Eisenatom des [NiFe]-Zentrums gebunden sind. Erstmals wurde für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F bewiesen, daß auch hier die drei Eisenliganden ein CO- und zwei CN^- -Moleküle sind. Zuvor bestand hierüber Unklarheit, da auf der Basis von Röntgenstrukturanalysen dieses Enzyms die genaue Natur der Liganden nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnte. Die Schwingungen dieser Liganden sind sensitiv für elektronische Änderungen der Umgebung: Elektronendichtezunahme und -abnahme am Eisenatom sowie Änderungen der Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den Liganden und umgebenden Aminosäuren ausbilden, führen zu einer Verschiebung der Absorptionsbanden im Infrarotspektrum. Dies erlaubte die Charakterisierung der einzelnen Intermediate der Hydrogenase (Redoxzustände), die sie im inaktiven Zustand und während des katalytischen Zyklus annimmt. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die Redoxzustände des katalytischen Zyklus zum Teil Subformen ausprägen: So existieren zwei Formen des Zustandes Ni-SI (Ni-SIr und Ni-SIa), die in einem Säure-Base-Gleichgewicht vorliegen. Der pK-Wert beträgt $\text{pK}=7,8 \pm 0,1$. Aufgrund dessen wird angenommen, daß die Protonierung an einem Cysteinrest in der Nähe des aktiven Zentrums erfolgt. Desweiteren weist auch der am stärksten reduzierte Zustand Ni-R Subformen auf, bei denen es sich jedoch nicht um unterschiedliche Protonierungsformen handelt, sondern vermutlich um strukturell veränderte Formen, deren Strukturänderung sich auf die Schwingung der Eisenliganden auswirkt.

Potentiometrische Titrations

Durch Anwendung einer Kombination von Elektrochemie und IR-Spektroskopie (Spektroelektrochemie) wurden potentiometrische Titrations durchgeführt, um die Redoxpotentiale der Übergänge in der [NiFe]-Hydrogenase zu bestimmen. Hierbei wurde das an die Hydrogenase angelegte Potential elektrochemisch eingestellt und die sich bei einem bestimmten Potential einstellenden Zustände FTIR-spektroskopisch identifiziert. Die Benutzung einer sogenannten OTTLE-Zelle ermöglichte die zur elektrochemischen Modifizierung zeitgleiche Messung der Infrarotspektren, da eine Drei-Elektroden-Anordnung direkt in der Küvette

installiert war. Die pH-Wert-abhängige Verschiebung der Redoxpotentiale aller Übergänge zeigte, daß bei jedem Übergang mit der Übertragung eines Elektrons gleichzeitig auch eine Protonierung durch ein einzelnes Proton vorgenommen wurde. Der pK-Wert betrug $pK=6,5-7$, was erneut auf eine Protonierung von Cysteinen in der Nähe des aktiven Zentrums hinweist.

Die charakteristischen Bandenverschiebungen, die beim Übergang von einem in den nächsten Redoxzustand auftraten, sowie die Redoxpotentiale der Übergänge erlaubten schließlich eine Aussage über den Reaktionsmechanismus der enzymkatalysierten Wasserstoffspaltung. Während des katalytischen Zyklus wechselt die Hydrogenase zwischen den Zuständen Ni-SI, Ni-C und Ni-R. Im Zustand Ni-SI bindet ein Wasserstoffmolekül an das Nickel. Dies führt zu einer Polarisierung der Bindung zwischen den H-Atomen, so daß ein H-Atom mit einer negativen Partiaalladung entsteht, das mit dem Nickel verbunden ist, und das zweite H-Atom eine positive Partiaalladung besitzt. Aufgrund der Anwesenheit einer Base, die in elektrostatischen Kontakt zur positiven Partiaalladung des zweiten H-Atoms tritt, bricht die Bindung zwischen den H-Atomen, und ein H-Atom verläßt als Proton das aktive Zentrum durch Bindung an die Base, bei der es sich um ein H_2O , ein OH^- oder eine Aminosäure in der Nähe des aktiven Zentrums, wie z.B. ein koordinierendes Cystein oder das Glutamat Glu34, handeln könnte. Somit ist der Zustand Ni-C entstanden, bei dem ein Hydrid am Nickelatom verbleibt. Nach der Übertragung der Elektronen auf die redoxaktiven Zentren ([NiFe]-Zentrum und [4Fe4S]-Cluster) verläßt das aus dem Hydrid hervorgegangene Proton das aktive Zentrum (Übergang Ni-C \rightarrow Ni-R), so daß die Substratbindestelle im meist reduzierten Zustand Ni-R unbesetzt bleibt. Nun kann der katalytische Zyklus erneut beginnen, da die Substratbindestelle frei ist, um wieder ein Wasserstoffmolekül aufzunehmen.

Die IR-spektroelektrochemischen Experimente werden in Kapitel 6 vorgestellt.

Proteinfilmvoltammetrie

Durch die Proteinfilmvoltammetrie, bei der die Hydrogenase auf einer Graphitelektrode immobilisiert wird, ist es möglich, die katalytische Aktivität unabhängig von Massentransport- und Diffusionsphänomenen als Strom zu messen. Die Experimente zeigten, daß es sich bei der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F um ein im Vergleich zu anderen [NiFe]-Hydrogenasen stark sauerstoffempfindliches Enzym handelt, das durch Sauerstoff zum Teil irreversibel inhibiert wird. Die Rückkehr in einen aktiven Zustand der ungeschädigten

Moleküle, die Reaktivierung, verläuft allerdings schneller, als dies für die strukturellen Verwandten beobachtet wurde.

Die inaktiven Zustände der Hydrogenase können auch in Abwesenheit von Sauerstoff erreicht werden, indem das Enzym durch ein hohes angelegtes Potential oxidiert wird. Im Falle der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F wurde diese anaerobe Inaktivierung jedoch nur erreicht, wenn dem Reaktionsansatz Na₂SO₃ hinzugefügt wurde. Daraus kann die Annahme abgeleitet werden, daß die Substratbindestelle im Falle des oxidierten Zustandes „Ni-A“ durch ein SO₂ besetzt wird, welches als Brückenligand zwischen dem Nickel- und dem Eisenatom bindet.

Kapitel 7 gibt einen detaillierten Einblick in die proteinfilmtammometrischen Experimente.

Wellenlängenabhängigkeit der Photokonversion Ni-C → Ni-L

Neben den oxidierten und den katalytischen Zuständen existiert ein weiterer Zustand, der durch Lichtanregung der Hydrogenase im reduzierten Zustand „Ni-C“ bei tiefen Temperaturen ($T \lesssim 100$ K) erreicht wird. Er wird mit „Ni-L“ bezeichnet. Die Untersuchung seines Entstehungsprozesses, der Photokonversion, lieferte Erkenntnisse über den Zustand Ni-C, der ein wichtiges Intermediat im katalytischen Zyklus ist. Die Photokonversion wurde mit Hilfe der cw-EPR-Spektroskopie untersucht, deren „Sonde“ das ungepaarte Elektron am Nickel ist. Ziel dieser Messungen war die Analyse der bisher unbekanntenen Wellenlängenabhängigkeit dieses Prozesses, um mit Hilfe eines UV/VIS-spektroskopischen Vergleichs Rückschlüsse auf die beteiligten Übergänge ziehen zu können. Durch Anregung der [NiFe]-Hydrogenase im Ni-C-Zustand bei verschiedenen Wellenlängen zwischen 300 nm und 1000 nm und der Bestimmung des Anteils der in Ni-L umgewandelten Moleküle (Konversion) konnte ein Aktionspektrum der Photokonversion aufgenommen werden. Es ist sehr breit und überspannt den gesamten Bereich des sichtbaren Lichtes, weist jedoch Absorptionsmaxima auf. Diese wurden auch in UV/VIS-Spektren der reduzierten Hydrogenase identifiziert und mit Hilfe der ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten elektronischen Übergängen des Nickels zugeordnet, die Ligand-zu-Metall-Ladungstransfer-Charakter besitzen. Anhand der Kinetiken der Photokonversionen bei verschiedenen Wellenlängen konnte ein einfaches Modell aufgestellt werden, das den Übergang beschreibt. Demnach gelangen die Moleküle durch Anregung von Ni-C in den höher energetischen Zustand Ni-C*, um sodann in

den energetisch niedrigeren Zustand Ni-L zu relaxieren, der seinerseits jedoch ein höheres Energieniveau besitzt als der Zustand Ni-C. Die Rückreaktion von Ni-L zu Ni-C gelingt durch die Zufuhr von Energie bei Erwärmung der Probe auf eine Temperatur $T \gtrsim 100$ K. Während der Photokonversion kommt es zu einer Änderung der formalen Oxidationsstufe des Nickels von Ni^{III} zu Ni^{I} einhergehend mit der Bewegung eines Protons. Es wird angenommen, daß das Hydrid, das in Ni-C die Substratbindestelle besetzt, in Ni-L als Proton an eine Aminosäure in der Nähe des aktiven Zentrums bindet, während die verbleibenden zwei Elektronen das Nickel reduzieren. Im Umkehrschluß bestätigt dies die Zuordnung des Hydrids als Ligand im Zustand Ni-C, so daß ein Reaktionsmechanismus basierend auf dieser Erkenntnis formuliert werden kann, wie dies in Kapitel 6 getan wurde.

Der Photokonversionsprozess wird in Kapitel 8 ausführlich behandelt.

Ausblick

Während der katalytische Zyklus der Wasserstoffspaltung inzwischen recht gut verstanden zu sein scheint, stellt sich noch immer die Frage, wie die Aktivierungs- und Inaktivierungsprozesse in der [NiFe]-Hydrogenase ablaufen. Zukünftige Experimente sollten somit hier ihren Schwerpunkt setzen und zudem versuchen zu klären, ob der Brückenligand im Zustand Ni-A der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki F tatsächlich eine Sulfoxid-Verbindung ist und auf welche Weise diese zur Aktivierung und Inaktivierung beiträgt. Diese Frage könnte durch die Kombination von Röntgenstrukturanalysen und spektroskopischen Verfahren beantwortet werden. Die nunmehr aus dieser Arbeit bekannten spezifischen IR-Absorptionsbanden liefern hier ein hilfreiches Werkzeug zur Identifizierung der Zusammensetzung bestimmter Proben nach einer Proteinmodifikation.

Abkürzungen

Abkürzung	ausführliche Form
1. Einheiten	
Å	Ångström, $1 \text{ Å} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
K	Kelvin, $273 \text{ K} = 0^\circ\text{C}$
l	Liter
M	molar, $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/l}$
min	Minute
nm	Nanometer
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
2. Chemische Substanzen	
CaF ₂	Kalziumfluorid
CHES	2-[N'-cyclohexylamino]ethansulfonsäure
CO	Kohlenmonoxid
Cys	Cystein (3-Letter-Code)
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fe	Eisen
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEPES	N'-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
MES	2-[N'-morpholino]ethansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
Ni	Nickel
SDS	Natriumdodecylsulfat

TAPS	N'-tris[hydroxymethyl]-methyl-3-aminopropansulfonsäure
Thr	Threonin (3-Lettercode)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

3. Spektroskopie und Elektrochemie

ENDOR	electron nuclear double resonance
EPR	electron paramagnetic resonance
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure
FTIR	Fourier-Transform Infrarot
HYSCORE	hyperfine sublevel correlation
IR	Infrarot
NHE	normal hydrogen electrode
NMR	nuclear magnetic resonance
PGE	pyrolytic graphite edge
OTTLE	optically transparent thin-layer electrochemical cell
SCE	saturated calomel electrode
UV/VIS	Spektralbereich von 200 - 1000 nm

4. weitere Abkürzungen

CN ⁻ -Ligand	Cyanid-Ligand
CO-Ligand	Carbonyl-Ligand
DFT	Dichtefunktionaltheorie
FPLC	fast phase liquid chromatography
PDB	Proteindatenbank Brookhaven

as isolated bedeutet, daß sich die Hydrogenase in den oxidierten Zuständen Ni-A und Ni-B befindet.

Literaturverzeichnis

- [1] M.W.W. Adams, L.E. Mortenson und J.-S. Chen. Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 594: 105–176, 1981.
- [2] S.P.J. Albracht. Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim. Biophys. Acta*, 1188: 167–204, 1994.
- [3] S.P.J. Albracht. *Hydrogen as a fuel: Learning from Nature*, Kapitel 7: *Spectroscopy - the functional puzzle*, R. Cammack, M. Frey und R. Robson (Hrsg.), Seiten 111–158. Taylor & Francis, 2001.
- [4] S.P.J. Albracht, E.-G. Graf und R.K. Thauer. EPR properties of Nickel in hydrogenase from *Methanobacter thermoautotrophicum*. *FEBS Lett.*, 140 (2): 311–313, 1982.
- [5] P. Amara, A. Volbeda, J.C. Fontecilla-Camps und M.J. Field. A Hybrid Density Functional Theory/Molecular Mechanics Study of Nickel-Iron Hydrogenase: Investigation of the Active Site Redox States. *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 4468–4477, 1999.
- [6] F.A. Armstrong. persönliche Mitteilung.
- [7] F.A. Armstrong. Insights from protein film voltammetry into mechanisms of complex electron-transfer reactions. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 5: 661–671, 2002.
- [8] F.A. Armstrong, H.A. Heering und J. Hirst. Reactions of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry. *Chem. Soc. Rev.*, 26: 169–179, 1997.
- [9] N.M. Atherton. *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellies Horwoord; Prentice Hall, 1993.
- [10] P.W. Atkins. *Physikalische Chemie*. VCH, 1996.

- [11] K.A. Bagley, E.C. Duin, W. Roseboom, S.P.J. Albracht und W.H. Woodruff. Infrared-Detectable Groups Sense Changes in Charge Density on the Nickel Center in Hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, 34: 5527–5535, 1995.
- [12] C. Bagyinka, J.P. Whitehead und M.J. Maroney. An X-ray Absorption Spectroscopic Study of Nickel Redox Chemistry in Hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 3576–3585, 1993.
- [13] A.J. Bard und L.R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1980.
- [14] Y.M. Berlier, G. Fauque, P.A. Lespinat und J. LeGall. Activation, Reduction and Proton-Deuterium Exchange Reaction of the periplasmic Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* in Relation with the Role of Cytochrome c_3 . *FEBS Letters*, 140: 185–188, 1982.
- [15] B. Braun Biotech. Herstellerangabe: Wasserverlust von 3 l pro Autoklavivorgang.
- [16] B. Bleijlevens, T. Buhrke, E. van der Linden, B. Friedrich und S.P.J. Albracht. 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 (5): 46686–46691, 2004.
- [17] B. Bleijlevens, B.W. Faber und S.P.J. Albracht. The [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* studied in EPR-detectable states: H/D exchange experiments that yield new information about the structure of the active site. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6: 763–769, 2001.
- [18] B. Bleijlevens, F.A. van Broekhuizen, A.L. De Lacey, W. Roseboom, V.M. Fernandez und S.P.J. Albracht. The activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 9: 743–752, 2004.
- [19] M. Bockhorst. www.energieinfo.de.
- [20] M. Brecht, M. van Gastel, T. Buhrke, B. Friedrich und W. Lubitz. Direct Detection of a Hydride Ligand in the [NiFe] Center of the Regulatory Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its Reduced State by HYSCORE and ENDOR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 13075–13083, 2003.

-
- [21] T. Buhrke, M. Brecht, W. Lubitz und B. Friedrich. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*: biochemical and spectroscopic analysis of mutant proteins modified at a conserved glutamine residue close to the [NiFe] active site. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 7: 897–908, 2002.
- [22] R. Cammack. *Bioenergetics - A Practical Approach*, Kapitel 5: *Redox states and potentials*, G.C. Brown und C.E. Cooper (Hrsg.), Seiten 85–109. IRL Press, Oxford, 1994.
- [23] R. Cammack. *Hydrogen as a fuel: Learning from Nature*, Kapitel 5: *Hydrogenases and their activities*, R. Cammack, M. Frey und R. Robson (Hrsg.), Seiten 73–92. Taylor & Francis, 2001.
- [24] R. Cammack. *Hydrogen as a fuel: Learning from Nature*, Kapitel 1: *Origins, evolution and the hydrogen biosphere*, R. Cammack, M. Frey und R. Robson (Hrsg.), Seiten 1–8. Taylor & Francis, 2001.
- [25] R. Cammack, V.M. Fernandez und E.C. Hatchikian. Nickel-Iron Hydrogenase. *Meth. Enzymol.*, 243: 43–68, 1994.
- [26] R. Cammack, D.S. Patil, R. Aguirre und E.C. Hatchikian. Redox properties of the ESR-detectable nickel in hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *FEBS Letters*, 142: 289–292, 1982.
- [27] R. Cammack, D.S. Patil, E.C. Hatchikian und V.M. Fernandez. Nickel and iron-sulphur centres in *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase: ESR spectra, redox properties and interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, 912: 98–109, 1987.
- [28] M. Carepo, D.L. Tierney, C.D. Brondino, T.C. Yang, A. Pamplona, J. Telsner, I. Moura, J.J.G. Moura und B.M. Hoffman. ¹⁷O ENDOR Detection of a Solvent-Derived Ni-(OH_x)-Fe Bridge That Is Lost upon Activation of the Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 281–286, 2002.
- [29] G. Davidson, S.B. Choudhury, Z. Gu, K. Bose, W. Roseboom, S.P.J. Albracht und M.J. Maroney. Structural Examination of the Nickel Site in *Chromatium vinosum* Hydrogenase: Redox State Oscillation and Structural Changes Accompanying Reductive Activation and CO Binding. *Biochemistry*, 39: 7468–7479, 2000.

- [30] L. De Gioia, P. Fantucci, B. Guigliarelli und P. Bertrand. Ab Initio Investigation of the Structural and Electronic Differences Between Active-Site Models of [NiFe] and [NiFeSe] Hydrogenases. *Int. J. Quantum Chem.*, 73: 187–195, 1999.
- [31] L. De Gioia, P. Fantucci, B. Guigliarelli und P. Bertrand. Ni-Fe Hydrogenases: A Density Functional Theory Study of Active Site Models. *Inorganic Chemistry*, 38: 2658–2662, 1999.
- [32] A.L. De Lacey, V.M. Fernandez, M. Rousset, C. Cavazza und E.C. Hatchikian. Spectroscopic and kinetic characterization of active site mutants of *Desulfovibrio fructosovorans* Ni-Fe hydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 8: 129–134, 2003.
- [33] A.L. De Lacey, E.C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, J.C. Fontecilla-Camps und V.M. Fernandez. Infrared-Spectroelectrochemical Characterization of the [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 7181–7189, 1997.
- [34] A.L. De Lacey, A. Pardo, V.M. Fernandez, S. Dementin, G. Adryanczyk-Perrier, E.C. Hatchikian und M. Rousset. FTIR spectroelectrochemical study of the activation and inactivation processes of [NiFe] hydrogenases: effects of solvent isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 9: 636–642, 2004.
- [35] A.L. De Lacey, C. Stadler, V.M. Fernandez, E.C. Hatchikian, H.-J. Fan, S. Li und M.B. Hall. 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, 2002.
- [36] F. Dole, A. Fournel, V. Magro, E.C. Hatchikian, P. Bertrand und B. Guigliarelli. Nature and Electronic Structure of the Ni-X Dinuclear Center of *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase. Implications for the Enzymatic Mechanism. *Biochemistry*, 36: 7847–7854, 1997.
- [37] F. Dole, M. Medina, C. More, R. Cammack, P. Bertrand und B. Guigliarelli. Spin-Spin Interactions between the Ni Site and the [4Fe-4S] Centers as a Probe of Light-Induced Structural Changes in Active *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase. *Biochemistry*, 35: 16399–16406, 1996.

- [38] C. Elschenbroich. *Organometallic Chemistry*. Teubner Studienbücher Chemie, 2004.
- [39] C. Fan, M. Teixeira, J.J.G. Moura, I. Moura, B.-H. Huynh, J. LeGall, H.D. Peck Jr. und B.M. Hoffman. Detection and Characterisation of Exchangeable Protons Bound to the Hydrogen-Activation Nickel Site of *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase: A ^1H and ^2H Q-Band ENDOR Study. *J. Am. Chem. Soc.*, 113: 20–24, 1991.
- [40] H.-J. Fan und M.B. Hall. Recent theoretical predictions of the active site for the observed forms in the catalytic cycle of Ni-Fe hydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6: 467–473, 2001.
- [41] V.M. Fernandez, R. Aguirre und E.C. Hatchikian. Reductive Activation and Redox Properties of Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Biochim. Biophys. Acta*, 790: 1–7, 1984.
- [42] S. Foerster. *EPR Spectroscopic Investigation of the Active Site of [NiFe]-Hydrogenase: A Contribution to the Elucidation of the Reaction Mechanism*. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2003.
- [43] S. Foerster, M. Stein, M. Brecht, H. Ogata, Y. Higuchi und W. Lubitz. Single Crystal EPR Studies of the Reduced Active Site of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 83–93, 2003.
- [44] J.C. Fontecilla-Camps. The active site of Ni-Fe hydrogenases: model chemistry and crystallographic results. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1: 91–98, 1996.
- [45] H.J. Galla. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme Verlag Stuttgart, 1988.
- [46] E. Garcin, X. Vernede, E.C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey und J.C. Fontecilla-Camps. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 7 (5): 557–566, 1999.
- [47] C. Gessner, M. Stein, S.P.J. Albracht und W. Lubitz. Orientation-selected ENDOR of the active center in *Chromatium vinosum* [NiFe] hydrogenase in the oxidized “ready“ state. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 4: 379–389, 1999.

- [48] B.R. Gibney, S.E. Mulholland, F. Rabanal und P.L. Dutton. Ferredoxin and ferredoxin-heme maquettes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 15041–15046, 1996.
- [49] E.-G. Graf und R.K. Thauer. Hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, a Nickel-containing enzyme. *FEBS Lett.*, 136 (1): 165–169, 1981.
- [50] B. Guigliarelli, C. More, A. Fournel, M. Asso, E.C. Hatchikian, R. Williams, R. Cammack und P. Bertrand. Structural Organization of the Ni and the (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, 1995.
- [51] R.P. Happe, W. Roseboom und S.P.J. Albracht. Pre-steady-state kinetics of the reactions of [NiFe]-hydrogenase from *Chromatium vinosum* with H₂ and CO. *Eur. J. Biochem.*, 259: 602–608, 1999.
- [52] R.P. Happe, W. Roseboom, G. Egert, C.G. Friedrich, C. Massanz, B. Friedrich und S.P.J. Albracht. Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett.*, 466: 259–263, 2000.
- [53] R.P. Happe, W. Roseboom, A.J. Pierik, S.P.J. Albracht und K.A. Bagley. Biological activation of hydrogen. *Nature*, 385: 126, 1997.
- [54] H.A. Heering, J. Hirst und F.A. Armstrong. Interpreting the Catalytic Voltammetry of Electroactive Enzymes Adsorbed on Electrodes. *J. Phys. Chem. B*, 102: 6889–6902, 1998.
- [55] Y. Higuchi, H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka und T. Yagi. 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, 1999.
- [56] Y. Higuchi, F. Toujou, K. Tsukamoto und T. Yagi. The presence of a SO molecule in [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki as detected by mass spectrometry. *J. Inorg. Biochem.*, 80: 205–211, 2000.

-
- [57] Y. Higuchi und T. Yagi. Liberation of Hydrogen Sulfide during the Catalytic Action of *Desulfovibrio* Hydrogenase under the Atmosphere of Hydrogen. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 255: 295–299, 1999.
- [58] Y. Higuchi, T. Yagi und N. Yasuoka. Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, 15 (5): 1671–1680, 1997.
- [59] Y. Higuchi, N. Yasuoka, M. Kakudo, Y. Katsube, T. Yagi und H. Inokuchi. Single Crystals of Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J. Biol. Chem.*, 262 (25): 2823–2825, 1987.
- [60] P. Hofer, A. Grupp, H. Nebenfuhr und M. Mehring. Hyperfine sublevel correlation (HYSCORE) spectroscopy: a 2D ESR investigation of squaric acid radical. *Chem. Phys. Lett.*, 132 (279–282), 1986.
- [61] A.J. Hoff. *Advanced EPR - Applications in biology and biochemistry*. Elsevier, 1989.
- [62] W.L. Hubbell und C. Altenbach. Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4 (566–573), 1994.
- [63] J.E. Huyett, M. Carepo, A. Pamplona, R. Franco, I. Moura, J.J.G. Moura und B.M. Hoffman. ^{57}Fe Q-Band Pulsed ENDOR of the Hetero-Dinuclear Site of Nickel Hydrogenase: Comparison of the NiA, NiB, and NiC States. *J. Am. Chem. Soc. U.S.A.*, 119: 9291–9292, 1997.
- [64] A.K. Jones, S.E. Lamle, H.R. Pershad, K.A. Vincent, S.P.J. Albracht und F.A. Armstrong. Enzyme Electrokinetics: Electrochemical Studies of the Anaerobic Interconversions between Active and Inactive States of *Allochromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 8505–8514, 2003.
- [65] Y. Jouanneau, B.C. Kelley, Y.M. Berlier, P.A. Lespinat und P.M. Vignais. Continuous monitoring, by Mass Spectrometry, of H_2 Production and Recycling in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.*, 143 (2): 628–636, 1980.
- [66] M.L. Kennedy und B.R. Gibney. Proton Coupling to $[\text{4Fe-4S}]^{2+/+}$ and

- [4Fe-4Se]^{2+/+} Oxidation and Reduction in a Designed Protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 6826–6827, 2002.
- [67] K. Kerpen. *Zur photochemischen Synthese und Reaktivität von Dien-substituierten Carbonyleisen-Komplexen - Blitzlichtphotolyse mit schneller Infrarot-Detektion*. Dissertation, Universität Essen-Duisburg, 2005.
- [68] S. Kurkin, S.J. George, R.N.F. Thorneley und S.P.J. Albracht. Hydrogen-Induced Activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum* as Studied by Stopped-Flow Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, 43: 6820–6831, 2004.
- [69] C.-H. Lai, W.-Z. Lee, M.L. Miller, J.H. Reibenspies, D.J. Darensbourg und M.Y. Darensbourg. 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, 1998.
- [70] S.E. Lamle, S.P.J. Albracht und F.A. Armstrong. Electrochemical Potential-Step Investigations of the Aerobic Interconversions of [NiFe]-Hydrogenase from *Allochromatium vinosum*: Insights into the Puzzling Difference between Unready and Ready Oxidized Inactive States. *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 14899–14909, 2004.
- [71] C. Leger und F.A. Armstrong. Chemistry of metals in biological systems - Direct electrochemistry of redox proteins. Seminarunterlage, EU Practical Training Course *Chemistry of Metals in Biological Systems*, Louvain-la-Neuve, 2002.
- [72] C. Leger, S.J. Elliott, K.R. Hoke, L.J.C. Jeuken, A.K. Jones und F.A. Armstrong. Enzyme Electrokinetics: Using Protein Film Voltammetry To Investigate Redox Enzymes and Their Mechanisms. *Biochemistry*, 42 (29): 8653–8662, 2003.
- [73] C. Leger, A.K. Jones, S.P.J. Albracht und F.A. Armstrong. Effect of a Dispersion of Interfacial Electron Transfer Rates on Steady State Catalytic Electron Transport in [NiFe]-hydrogenase and Other Enzymes. *J. Phys. Chem. B*, 106: 13058–13063, 2002.
- [74] C. Leger, A.K. Jones, W. Roseboom, S.P.J. Albracht und F.A. Armstrong. Enzyme Electrokinetics: Hydrogen Evolution and Oxidation by *Allochromatium*

- matium vinosum* [NiFe]-Hydrogenase. *Biochemistry*, 41: 15736–15746, 2002.
- [75] S. Li und M.B. Hall. Modeling the Active Site of Metalloenzymes. 4. Predictions of the Unready States of [NiFe] *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase from Density Functional Theory. *Inorg. Chem.*, 40: 18–24, 2001.
- [76] S.J. Lippard und J.M. Berg. *Principles of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, 1994.
- [77] T. Lissolo, S. Pulvin und D. Thomas. Reactivation of the Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* by Hydrogen. Influence of Redox Potential. *J. Biol. Chem.*, 259: 11725–11729, 1984.
- [78] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275, 1951.
- [79] W. Lubitz, M. Brecht, S. Foerster, M. van Gastel und M. Stein. EPR and ENDOR Studies of [NiFe] Hydrogenase: Contributions to Understanding the Mechanism of Biological Hydrogen Conversion. *in: Paramagnetic Resonance of Metallobiomolecules. ACS Symposium Series*, 858: 128–150, 2003.
- [80] E.J. Lyon, S. Shima, R. Boecher, R.K. Thauer, F.-W. Grevels, E. Bill, W. Roseboom und Albracht S.P.J. Carbon Monoxide as an Intrinsic Ligand to Iron in the Active Site of the Iron-Sulfur-Cluster-Free Hydrogenase H₂-Forming Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase As Revealed by Infrared Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc. U.S.A.*, 126 (43): 14239–14248, 2004.
- [81] D.W. Margerum und S.L. Anliker. *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, Kapitel 2: *Nickel(III) Chemistry and Properties of the Peptide Complexes of Ni(II) and Ni(III)*, J.R. Lancaster Jr. (Hrsg.), Seiten 29–51. VCH Publishers, 1988.
- [82] M.J. Maroney. *Comments Inorg. Chem.*, 17: 347–375, 1995.
- [83] M.J. Maroney und P.A. Bryngelson. Spectroscopic and model studies of the Ni-Fe hydrogenase reaction mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6: 453–459, 2001.

- [84] M. Medina, E.C. Hatchikian und R. Cammack. Studies of light-induced nickel EPR signals in hydrogenase: comparison of enzymes with and without selenium. *Biochim. Biophys. Acta*, 1275: 227–236, 1996.
- [85] M. Medina, R. Williams und R. Cammack. Studies of Light-induced Nickel EPR Signals in *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 90 (19): 2921–2924, 1994.
- [86] R.-M. Mege und C. Bourdillon. Nickel Controls the Reversible Anaerobic Activation/Inactivation of the *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase Redox Potential. *J. Biol. Chem.*, 260 (27): 14701–14706, 1985.
- [87] W.B. Mims. Envelope modulation in spin echo experiments. *Phys. Rev. B*, 5 (2409–2419), 1972.
- [88] D. Moss, E. Nabadryk, J.L.J. Breton und W. Mäntele. Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. *Eur. J. Biochem.*, 187: 565–572, 1990.
- [89] G. Nakos und L. Mortenson. Purification and properties of hydrogenase, an iron sulfur protein, from *Clostridium pasteurianum* W₅. *Biochim. Biophys. Acta*, 227: 576–583, 1971.
- [90] Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, C.E. Hatchikian und J.C. Fontecilla-Camps. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, 7: 13–23, 1999.
- [91] S. Niu, L.M. Thomson und M.B. Hall. Theoretical Characterization of the Reaction Intermediates in a Model of the Nickel-Iron Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 4000–4007, 1999.
- [92] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry und Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
- [93] H. Ogata. persönliche Mitteilung.
- [94] H. Ogata, Y. Mizogushi, N. Mizuno, K. Miki, S. Adachi, N. Yasuoka, T. Yagi, O. Yamauchi, S. Hirota und Y. Higuchi. Structural Studies of

- the Carbon Monoxide Complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Suggestion for the Initial Activation Site for Dihydrogen. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 11628–11635, 2002.
- [95] C.C. Page, C.C. Moser, Chen. X. und P.L. Dutton. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*, 402: 47–52, 1999.
- [96] G. Palmer. *Physical Methods in BioInorganic Chemistry*, Kapitel 3: *Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins*, L. Que (Hrsg.), Seiten 121–185. University Press, 2000.
- [97] M. Pavlov, M.R.A. Blomberg und P.E.M. Siegbahn. New Aspects of H₂ Activation by Nickel-Iron Hydrogenase. *Int. J. Quantum Chem.*, 73: 197–207, 1999.
- [98] H.R. Pershad, J.L.C. Duff, H.A. Heering, E.C. Duin, S.P.J. Albracht und F.A. Armstrong. Catalytic Electron Transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-Hydrogenase: Application of Voltammetry in Detecting Redox-Active Centers and Establishing That Hydrogen Oxidation Is Very Fast Even at Potentials Close to the Reversible H⁺/H₂ Value. *Biochemistry*, 38: 8992–8999, 1999.
- [99] A.J. Pierik, W. Roseboom, R.P. Happe, K.A. Bagley und S.P.J. Albracht. Carbon Monoxide and Cyanide as Intrinsic Ligands to Iron in the Active Site of [NiFe]-Hydrogenases. *J. Biol. Chem.*, 274 (6): 3331–3337, 1999.
- [100] M. Pourbaix. *Atlas d'équilibres électrochimiques*. Gauthier-Villars & Cie Editeur, Paris, 1963.
- [101] L.M. Roberts und P.A. Lindahl. Analysis of Oxidative Titration of *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase; Implications for the Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, 33: 14339–14350, 1994.
- [102] L.M. Roberts und P.A. Lindahl. Stoichiometric reductive titrations of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 2565–2572, 1995.
- [103] H.G. Schlegel. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag Stuttgart, 1992.

- [104] A. Schweiger. Pulsed electron spin resonance spectroscopy: Basic principles, techniques, and examples of applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30: 265, 1991.
- [105] W. Shin, P.R. Stafford und P.A. Lindahl. Redox Titrations of Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry*, 31: 6003–6011, 1992.
- [106] S.I. Shupack, E. Billig, R.J.H. Clark, R. Williams und H.B. Gray. The Electronic Structure of Square-Planar Metal Complexes. V. Spectral Properties of the Maleonitriledithiolate Complexes of Nickel, Palladium, and Platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, 86: 4594–4602, 1964.
- [107] P.E.M. Siegbahn und M.R.A. Blomberg. Transition-Metal Systems in Biochemistry Studied by High-Accuracy Quantum Chemical Methods. *Chem. Rev.*, 100: 421–437, 2000.
- [108] C. Stadler, A.L. De Lacey, Y. Montet, A. Volbeda, J.C. Fontecilla-Camps, J.C. Conesa und V.M. Fernandez. Density Functional Calculations for Modeling the Active Site of Nickel-Iron Hydrogenases. 2. Predictions for the Unready and Ready States and the Corresponding Activation Processes. *Inorg. Chem.*, 41: 4424–4434, 2002.
- [109] M. Stein. *Insight into the Mechanism of [NiFe] Hydrogenase by means of Magnetic Resonance Experiments and DFT Calculations*. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2001.
- [110] M. Stein und W. Lubitz. DFT calculations of the electronic structure of the paramagnetic states Ni-A, Ni-B and Ni-C of [NiFe] hydrogenase. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3: 2668–2675, 2001.
- [111] M. Stein und W. Lubitz. Relativistic DFT calculations of the reaction cycle intermediates of [NiFe] hydrogenase: a contribution to understanding the enzymatic mechanism. *J. Inorg. Biochem.*, 98: 862–877, 2004.
- [112] L. Stryer. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1975.
- [113] A. Sucheta, R. Cammack, J. Weiner und F.A. Armstrong. Reversible Electrochemistry of Fumarate Reductase Immobilized on an Electrode Surface. Direct Voltammetric Observations of Redox Centers and Their

- Participation in Rapid Electron Transport. *Biochemistry*, 32: 5455–5465, 1993.
- [114] M. Teixeira, I. Moura, A.V. Xavier, D.V. DerVartanian, J. LeGall, H.D. Peck Jr., B.-H. Huynh und J.J.G. Moura. *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase: Redox Properties of the Nickel and Iron-Sulfur Centers. *Eur. J. Biochem.*, 130: 481–484, 1983.
- [115] M. Teixeira, I. Moura, A.V. Xavier, B.-H. Huynh, D.V. DerVartanian, H.D. Peck Jr., J. LeGall und J.J.G. Moura. Electron Paramagnetic Resonance Studies on the Mechanism of Activation and the Catalytic Cycle of the Nickel-containing Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *J. Biol. Chem.*, 260: 8942–8950, 1985.
- [116] M. Teixeira, I. Moura, A.V. Xavier, J.J.G. Moura, J. LeGall, D.V. DerVartanian, H.D. Peck Jr. und B.-H. Huynh. Redox Intermediates of *Desulfovibrio gigas* [NiFe] Hydrogenase Generated Under Hydrogen. Mössbauer and EPR Characterization of the Metal Centers. *J. Biol. Chem.*, 264: 16435–16450, 1989.
- [117] E. van der Linden, T. Burgdorf, M. Bernhard, B. Bleijlevens, B. Friedrich und S.P.J. Albracht. 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, 2004.
- [118] J.W. van der Zwaan, S.P.J. Albracht, R.D. Fontijn und E.C. Slater. Monovalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *FEBS Lett.*, 2: 271–277, 1985.
- [119] J.W. van der Zwaan, J.M.C.C. Coremans, E.C.M. Bouwens und S.P.J. Albracht. Effect of $^{17}\text{O}_2$ and ^{13}CO on EPR spectra of nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1041: 101–110, 1990.
- [120] M. van Gastel, C. Fichtner und W. Lubitz. 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 (1), 2005.
- [121] P.M. Vignais, M.-F. Henry, Y.M. Berlier und P.A. Lespinat. Effect of pH on H- ^2H exchange, H $_2$ production and H $_2$ uptake, catalyzed by the

- membrane-bound hydrogenase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 681: 519–529, 1982.
- [122] A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A.L. De Lacey, V.M. Fernandez, E.C. Hatchikian, M. Frey und J.C. Fontecilla-Camps. Structure of the [Ni-Fe] Hydrogenase Active Site: Evidence for Biologically Uncommon Fe Ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 12989–12996, 1996.
- [123] J.P. Whitehead, R.J. Gurbiel, C. Bagyinka, B.M. Hoffman und M.J. Maroney. The Hydrogen Binding Site in Hydrogenase: 35-GHz ENDOR and XAS Studies of the Ni-C Active Form and the Ni-L Photoproduct. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 5629–5635, 1993.
- [124] T. Yagi, K. Kimura, H. Daidoji, F. Sakai, S. Tamura und H. Inokuchi. Properties of Purified Hydrogenase from the Particulate Fraction of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki. *J. Biochem.*, 79: 661–671, 1976.
- [125] T. Yagi, M. Tsuda und H. Inokuchi. Kinetic studies on hydrogenase-parahydrogen-orthohydrogen conversion and hydrogen-deuterium exchange reaction. *J. Biochem.*, 73: 1069–1081, 1973.

Eigene Publikationen

Veröffentlichung von Teilen der vorliegenden Arbeit

C. Fichtner, M. van Gastel und W. Lubitz. Wavelength dependence of the photo-induced conversion of the Ni-C to the Ni-L redox state in the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Chem. Phys. Phys. Chem.*, 5: 5507–5513, 2003.

C. Fichtner, Ch. Laurich, E. Bothe, W. Lubitz. Spectroelectrochemical Characterization of [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. In Vorbereitung.

Weitere Veröffentlichung

M. van Gastel, C. Fichtner, F. Neese und W. Lubitz. EPR experiments to elucidate the structure of the ready and unready states of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochem. Soc. Transactions*, 33: 7–11, 2005.

Posterpräsentationen auf Konferenzen

C. Fichtner, M. van Gastel und W. Lubitz. Pulse EPR studies of the redox intermediates of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* (Miyazaki F). 25.-30.5.2003, 10th Chianti Workshop on Magnetic Resonance, San Miniato (Italien).

C. Fichtner, M. van Gastel und W. Lubitz. The Nature of the Bridging Ligand in the Oxidized Redox States Ni-A and Ni-B of [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F Investigated by HYSCORE Spectroscopy. 27.-30.9.2003, COST 841 Working Group 2 Workshop “Active Centres of Hydrogenases”, Mülheim.

C. Fichtner, Ch. Laurich, E. Bothe, H. Görner und W. Lubitz. Spectroelectrochemical Characterization of [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. 27.-28.3.2004, Interne Revision des Max-Planck-Instituts für Bioanorganische Chemie, Mülheim.

C. Fichtner, Ch. Laurich, E. Bothe und W. Lubitz. Spectroelectrochemical Characterization of Different Redox States of [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. 24.-29.8.2004, 7th International Hydrogenase Conference, Reading (Großbritannien).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Caroline Fichtner
Geburtsdatum	17. September 1976
Geburtsort	Hagen, Westfalen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1983–1987	Katholische Grundschule Scharpenberg, Ennepetal
1987–1996	Reichenbach-Gymnasium, Ennepetal, Abschluß: Abitur

Hochschulbildung

10/1996–09/1998	Grundstudium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
10/1998–01/2002	Hauptstudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum, Abschluß: Diplom-Biologin
04/2001–01/2002	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum, Thema: Untersuchung der Proteinumgebung des primären und sekundären Chinons im bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
12/2001	Studienabschlußförderung durch die Ruth und Gerd Massenberg-Stiftung

06/2002 Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim, Thema: Spektroskopische und elektrochemische Untersuchung der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F

Berufliche Tätigkeit

12/1999–04/2000 Studentische Hilfskraft, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum

08/2000–12/2001 Studentische Hilfskraft, Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum

seit 06/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim

Danksagung

An erster Stelle möchte Herrn Prof. Dr. W. Lubitz für die Überlassung dieses interessanten Themas danken. Die perfekte instrumentelle und finanzielle Ausstattung ermöglichte die Durchführung der vielen verschiedenen Messungen mit unterschiedlichen Techniken an unterschiedlichen Geräten ebenso wie die Durchführung von Dienstreisen „im Auftrag der Hasen“. Danken möchte ich auch für die stetige Betreuung und das Interesse an den Forschungsergebnissen; daß die Bürotür sich bei Bedarf immer öffnen ließ und viel Platz für eigenständiges Arbeiten war.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und das Interesse am Fortgang der Arbeit während der vergangenen drei Jahre.

Bei den Professoren S. Albracht, Universität Amsterdam, und F. Armstrong, Universität Oxford, möchte ich mich für die spannenden Kooperationen bedanken, die mit zwei Forschungsaufenthalten in den jeweiligen Labors verbunden waren und einen entscheidenden Beitrag zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben. Für ihre große Hilfe bei der Durchführung der Experimente danke ich Winfried Roseboom in Amsterdam sowie Dr. Kylie Vincent und Alison Parkin in Oxford.

Für viel Hilfe zum einen bei der technischen Umsetzung und zum anderen bei der Interpretation der Ergebnisse der spektroelektrochemischen Experimente möchte ich Herrn Dr. E. Bothe herzlich danken.

Frau Prof. Dr. S. Braslavsky danke ich für die hilfreichen Diskussionen über die Photokonversion und die Interpretation des Aktionspektrums.

Bei Herrn PD Dr. Johannes Messinger möchte ich mich für seine Unterstützung bei der Realisierung des massenspektrometrischen Aktivitätstest bedanken, die

nicht nur in der Überlassung des Massenspektrometers bestand, sondern auch die Hilfe bei der Konstruktion des Reaktionsgefäßes umfaßte.

Für die Einführung in die Meßtechnik und andere Geheimnisse der EPR sowie für die Zusammenarbeit im „Ni-L-Projekt“ möchte ich Dr. Maurice van Gastel danken.

Eine ganz große Hilfe in diesem Institut stellen die technischen Mitarbeiter dar. So möchte ich mich bei Gudrun Klihm für Beistand und Meßhilfe in Sachen EPR und bei Less Currell für technische Unterstützung bei den FTIR-spektroskopischen Messungen bedanken. Ohne Christoph Laurich hätte die OTTLE-Zelle wohl nie funktioniert - ihm danke ich für seine Hilfe und Geduld mit mir und der Hase. Die ganze Arbeit hätte jedoch nie ohne die Hydrogenase entstehen können. Daher geht mein ganz besonderer Dank an Tanja Berndsen, nicht nur für die Riesenhilfe bei der Aufzucht und der Präp.

Der ganzen Lubitz-Gruppe, insbesondere dem Hydrogenase-Team, und der Mittagessen-Gruppe (hier gibt es eine Schnittmenge ;-)) danke ich für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, viel Diskussions- und Hilfsbereitschaft und viel Toleranz gegenüber Biologen... ;-). Das interdisziplinäre Arbeiten in dieser (heterogenen) Gruppe hat viel Spaß gemacht! (Verbleiben wir so!)

Besonders danken möchte ich Petra Kellers für den regen Austausch in Hase-Forschungs- und anderen Fragen, für eine schöne gemeinsame (Büro-)Zeit und vor allem für die extrem kritische, Andrés Standard entsprechende Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz herzlich danke ich auch meinen Eltern, meinen Geschwistern+Anhängen und Christoph für ihre fortwährende Unterstützung.