

**Die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase
aus
Desulfovibrio desulfuricans
ATCC 7757:**

**Aufreinigung, Kristallisation,
spektroskopische und elektrochemische
Charakterisierung**

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

Brian Wenk

aus

Bottrop in Westfalen

Mülheim 2010

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2010

**“Denn was auf Erden lebt ist nie so schlecht, dass es der Erde
nicht besond’ren Nutzen brächt’.”**

W. Shakespeare, Romeo und Julia, 2. Akt, 3. Szene

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Silakov, A., Wenk, B., Reijerse, E., Lubitz, W.:

"¹⁴N HYSCORE investigation of the H-cluster of the [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge"

Phys. Chem. Chem. Phys. 11, 6592-6599, 2009

Silakov, A., Wenk, B., Reijerse, E., Albracht, S. P., Lubitz, W.:

"Spin distribution of the H-cluster in the H_{ox}-CO state of the [FeFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*:

HYSCORE and ENDOR study of ¹⁴N and ¹³C interactions"

J. Biol. Inorg. Chem. 14, 303-313, 2009

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase DdH aus dem sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757 chromatographisch aufgereinigt, kristallisiert und mit den Mitteln der EPR-Spektroskopie und Elektrochemie untersucht. Die Enzymklasse der Hydrogenasen katalysiert die Synthese von Wasserstoff bzw. dessen heterolytische Spaltung. Das Verständnis der genauen Funktionsweise dieses Katalyse-Prozesses ist von besonderem Interesse, da man hofft, aus dieser grundlegende Erkenntnisse für eine zukünftige biotechnologische Wasserstoffproduktion zu gewinnen. Der [FeFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans* kommt dabei die Rolle eines „Modellenzym“ für diese Klasse zu. Bisher bekannt sind die Kristallstrukturen des Enzyms inklusive des grundlegenden Aufbaus seines katalytischen Zentrums.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird ein optimiertes Aufreinigungsprotokoll für die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase wiedergegeben, welches eine zeitliche und präparative Vereinfachung des bisherigen Protokolls darstellt und zu hochreinem Probenmaterial führt.

Im spektroskopischen Teil dieser Arbeit werden Fragestellungen zu Struktur und katalytischer Aktivität des aktiven Zentrums der [FeFe]-Hydrogenase behandelt.

Die Natur des Brückenliganden, welcher die beiden Eisenatome des als H-Kluster bezeichneten katalytischen Zentrums miteinander verbindet, konnte mittels der Impuls-EPR-Methode HYSORE aufgeklärt und als Stickstoffatom identifiziert werden. In der ursprünglichen Strukturanalyse war dieses Atom als Kohlenstoffatom charakterisiert worden. Die Natur des Brückenliganden ist von großer Bedeutung für die verschiedenen Modelle zum Reaktionsmechanismus.

In der Kristallstruktur der [FeFe]-Hydrogenase (CpI) aus *Clostridium pasteurianum* wurde als weiterer Ligand des distalen Eisenatoms ein Wassermolekül aufgelöst. Dieses Wassermolekül konnte bisher nicht identifiziert werden in der Kristallstruktur von DdH aus *D. desulfuricans*. Um das Vorhandensein oder Fehlen des Wassermoleküls an der wahrscheinlichen Bindungsstelle des aktiven Zentrums zu überprüfen, wurden Isotopenmarkierungen mit D₂O durchgeführt und das Enzym danach in den oxidierten Zustand gebracht. Die anschließenden Messungen wurden mit der Doppelresonanzmethode ENDOR (electron nuclear double resonance) ausgeführt, welche es erlaubt, die Elektron-Kern-Hyperfeinkopplungen der eingebrachten Isotope zu detektieren. Die erhaltenen Kopplungen geben einen Hinweis auf Wassermoleküle in der Nähe des katalytischen Zentrums. Um genauere Informationen über die Elektronenspindichte und deren Verteilung im Bereich des aktiven Zentrums zu gewinnen, wurde dieses mit dem Isotop ¹³C markiert. Die Markierung wurde mit ¹³CO-Gas durchgeführt, durch welches die natürlichen CO-Liganden des aktiven Zentrums ausgetauscht wurden. Dabei wurde ein Effekt ausgenutzt, welcher in der Literatur als „Umverteilung“ (engl.: Scrambling) beschrieben wird. Wird die Probe bei 275 K für längere Zeit belichtet, werden die CO-Liganden gegeneinander ausgetauscht. Somit konnte die Probe durch Belichtung bei gleichzeitiger Begasung mit ¹³CO-Gas markiert werden. Die Hyperfeinkopplungen der CO-Liganden wurde mittels cw-EPR, HYSORE- und Davies-ENDOR-Experimenten analysiert. Ein Teil der gewonnenen Proben wurde erfolgreich für Kristallisationsversuche eingesetzt. Die erhaltenen Kristallisationsbedingungen unterscheiden sich von den bisher bekannten und liefern Kristalle von definierten Kristallformen und Größen. Die [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* wurde erfolgreich mit den Mitteln der Elektrochemie untersucht. Im Unterschied zu vorherigen Messungen konnte hierbei zum ersten Mal eine kovalente Bindung des Enzyms mittels eines Kopplungsagens' an die Messelektrode erreicht werden. Die vorgenommenen Messungen erlauben einen detaillierten Blick auf das Inaktivierungs- und Reaktivierungsverhalten des Enzyms sowie dessen Inhibierung durch Sauerstoff und Kohlenmonoxid.

Abstract

Hydrogenases catalyse the synthesis of molecular hydrogen and its heterolytic cleavage. It is of particular interest to understand how the catalytic process exactly works as one can hope to obtain fundamental insight for a future biotechnological hydrogen production. The [FeFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* can be considered a “model enzyme” of this class. The crystal structure of the enzyme is known providing basic structural knowledge about its catalytic centre.

In this work the periplasmic [FeFe] hydrogenase DdH from the sulphate reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757 was purified, crystallised and investigated by means of EPR-spectroscopy and electrochemistry.

In the first part of this work an optimised purification protocol for the periplasmic [FeFe] hydrogenase is presented which represents a temporal and preparative simplification of current literature protocols and leads to highly homogeneous sample material.

In the spectroscopic part of this work questions concerning the structure and catalytic activity of the active centre of the hydrogenase are addressed. The nature of the bridge between the two irons of the catalytic centre known as H-cluster is of profound importance for the different models of the catalytic mechanism. In the original structural analysis this atom had been assigned as a carbon atom. Hereon different working groups discussed the probabilities for nitrogen, carbon or oxygen as the central atom of the bridging ligand.

The nature of the bridging ligand could be clarified by applying the pulsed EPR method HYSCORE and was identified as a nitrogen atom.

In the crystal structure of the [FeFe] hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* a water molecule as a further ligand of the distal iron atom of the H-cluster was identified. This water molecule could not be found in the crystal structure of DdH from *Desulfovibrio desulfuricans*. In order to check if a water molecule at the binding site of the active centre is present or not the protein was labelled with D₂O following ENDOR (electron nuclear double resonance) measurements. This allowed for the detection of the electron-nuclear hyperfine couplings of the incorporated isotopes. The couplings measured suggest that water molecules are present in the vicinity of the catalytic centre. In order to obtain more detailed information about the electron spin density and its distribution in the H-cluster labelling with ¹³C was done. Upon illumination at 275 K over longer periods of time the CO ligands interchange. On the basis of this effect it was possible to label the sample. The hyperfine couplings of the CO ligands were analysed by conducting cw-EPR-, HYSCORE- and Davies-ENDOR-experiments. The labelling was carried out with ¹³CO gas, with which the natural CO ligands were exchanged. In order to do that an effect known as “scrambling” was utilised .

A fraction of the protein samples was successfully used for crystallisation experiments. The obtained crystals differ from crystals from the [FeFe] hydrogenase DdH both in size and shape.

The [FeFe] hydrogenase DdH from *Desulfovibrio desulfuricans* was also investigated using electrochemical experiments. In contrast to previous measurements a covalent bonding of the enzyme to the measuring electrode was achieved for the first time by using a coupling agent. In the designed measurements the inactivation and reactivation of the enzyme was studied together with the inhibition by oxygen and carbon monoxide.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Wasserstoff als Energieträger der Zukunft	1
1.1	Motivation und Fragestellung	1
1.2	Die biologische Wasserstoffproduktion	3
1.3	Der Organismus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	7
1.3.1	Systematische Einordnung und Lebensraum	7
1.3.2	Der fermentative Metabolismus von <i>D. desulfuricans</i>	8
1.3.3	Der Wasserstoffmetabolismus	11
2	Hydrogenasen	13
2.1	Klassifizierung und Vorkommen von Hydrogenasen	13
2.1.a	[FeFe]-Hydrogenasen	13
2.1.b.1	[NiFe]-Hydrogenasen	15
2.1.b.2	[NiFeSe]-Hydrogenasen	16
2.1.c	[Fe]-Hydrogenasen	17
2.1.d	Vorkommen und Physiologische Stellung	17
2.2	Struktureller Aufbau der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	19
2.3	Maturation von [FeFe]-Hydrogenasen	20
2.4	Redoxzustände von DdH	21
3	Theoretischer Hintergrund	25
3.1	Grundlagen der EPR-Spektroskopie	25
3.1.1	Physikalische Grundlagen	25
3.1.2	EPR- und mit EPR assoziierte Verfahren	30
3.2	Grundlagen der Elektrochemie	34
3.3	Grundlagen der Proteinkristallisation	38
4	Verwendete Materialien	41
4.1	Pufferlösungen	41

4.2	Laborgeräte	45
5	Kultivierung von <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	49
5.1	Herstellung und Lagerung von Gefrierkulturen	49
5.2	Ansetzen der Vorkulturen	50
5.2.1	Ansetzen von 10ml-Agar-Röhrchen	50
5.2.2	Ansetzen der 50ml-Vorkultur	51
5.2.3	Ansetzen der 500ml-Vorkulturen	52
5.3	Betrieb der 10l-Hauptkultur	52
5.3.1	Aufbau	52
5.3.2	Anzucht	54
5.3.3	Ergebnisse und Diskussion	55
5.4	Anzucht unter Schwefelmangelbedingungen und H ₂ -Zugabe	56
5.4.1	Schwefelmangelmedium	56
5.4.2	Anzucht unter Wasserstoffbegasung	59
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	60
6	Aufreinigung der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase	63
6.1	Zellaufschluss und Proteinfällung	64
6.2	Säulenchromatographische Auftrennung	65
6.2.1	Qualitativer Hydrogenasetest	66
6.2.2	Quantifizierbarer Hydrogenasetest	67
6.2.3	1. Säule: Anionen-Austausch-Chromatographie	69
6.2.4	2. Säule: Gelfiltrations-Chromatographie	74
6.2.5	3. Säule Hydroxyapatit-Chromatographie	76
6.3	Reinheitsbestimmung	78
6.3.1	UV/VIS-Spektroskopie	78
6.3.2	SDS-PAGE	81
6.3.3	MALDI-TOF-MS	82
6.3.4	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)	83
6.3.5	Hydrographiemessungen	86
6.4	Diskussion	87

7	EPR-spektroskopische Messungen an unmarkierter und isoto­penmarkierter, nativ exprimierter [FeFe]-Hydrogenase	89
7.1	Probenvorbereitung und Durchführung	89
7.2	Auflösung des Zentralatoms in der Dithiolbrücke: ¹⁴ N-HYSCORE Messungen im H _{ox} -Zustand	93
7.3	Die Spindichte­verteilung des H-Kusters: ¹³ C-HYSCORE- und ENDOR-Messungen im H _{ox} -CO-Zustand	100
7.4	Puls- und CW-EPR-Messungen an D ₂ O- und H ₂ ¹⁷ O-markierter Probe: Besetzungszustand des distalen Eisens des H-Clusters	108
7.5	Ausblick	116
8	Elektrochemische Untersuchung der [FeFe]-Hydrogenase	119
8.1	Elektro­den­vor­be­rei­tung und Immo­bi­li­sie­rung der Probe	119
8.2	Zyklo­voltam­me­trie an im­mo­bi­li­siertem DdH-Protein: pH-Wert-Ab­hän­gig­keit der kataly­ti­schen Ei­gen­schaften	126
8.3	Inhi­bie­rung und Reak­ti­vie­rung des DdH-Enzyms: CO-Zu­gabe	127
8.4	Inhi­bie­rung und Reak­ti­vie­rung des DdH-Enzyms: O ₂ -Zu­gabe	129
9	Kristallisation der [FeFe]-Hydrogenase DdH	135
9.1	Probenvorbereitung	135
9.2	Ammoniumsulfat- und PEG-6000-Ansätze	135
9.3	Kristallisationsbedingung A	136
9.4	Kristallisationsbedingung B	137
9.5	Diskussion und Ausblick	138
10	Zusammenfassung und Ausblick	141

Literaturverzeichnis	145
Abkürzungen	161
Abbildungsverzeichnis	165
Tabellenverzeichnis	171
Selbständigkeitserklärung	173
Lebenslauf	
Anhang 1: Kristallisationstabellen	
Danksagung	

1 WASSERSTOFF ALS ENERGIETRÄGER DER ZUKUNFT

1.1 Motivation und Fragestellung

Hintergrund:

Die Verfügbarkeit großer Energiemengen war die Grundvoraussetzung für die Entstehung der modernen Industriegesellschaft. Der rasante Anstieg des weltweiten Energiebedarfs der letzten 150 Jahre ging einher mit gewaltigen technologischen und wissenschaftlichen Fortschritten und einer grundsätzlichen Umstrukturierung der menschlichen Gesellschaft, welche alle sozialen Bereiche umfasste. Das hohe Maß an Wohlstand, das in den großen Volkswirtschaften erreicht wurde, konnte nur entstehen durch die planmäßige Erschließung fossiler Energieträger wie Stein- und Braunkohle, Erdöl und Erdgas. Diese natürlichen Primärquellen haben sich über erdgeschichtliche Zeiträume als Sedimenteinträge pflanzlichen und tierischen Ursprungs gebildet und stellen somit einen Abzweig des biologischen Kohlenstoffkreislaufes dar. Bei der Förderung dieser Rohstoffe wurde das große Missverhältnis zwischen den langen Entstehungszeiten dieser Energieträger und deren schnellem und weiter steigendem Verbrauch lange Zeit ausgeblendet. So beträgt die Fördermenge an Steinkohle in der Bundesrepublik zurzeit ca. 25 Millionen Tonnen jährlich, was bei gleichbleibender Fördermenge und in Anbetracht der vorhandenen Vorkommen zwar eine Versorgung für weitere 350 Jahre sichern würde, der Weltbedarf an Steinkohle hingegen kann bei den derzeit verfügbaren Ressourcen jedoch nur für weitere 130 Jahre abgedeckt werden [1]. Bei Erdöl wird erwartet, daß in spätestens 20 Jahren ein zwangsweiser Rückgang der Fördermenge einsetzt, da sich die bekannten Vorkommen erschöpfen. In Anbetracht der Tatsache, daß die Weltbevölkerung weiter ansteigt und der Energiebedarf auch weiterhin wachsen wird, ist die Verknappung von Energieträgern somit ein ernstzunehmendes und dringliches Problem, daß nur über die Erschließung neuer Energieressourcen gelöst werden kann.

Neben der begrenzten Verfügbarkeit der fossilen Energieträger gewinnt auch der ökologische Aspekt der Nutzung fossiler Ressourcen zunehmend an Bedeutung. Fossile Energieträger stellen Kohlenstoffverbindungen dar, welche über die Verbrennung als CO_2 in die Atmosphäre freigesetzt werden. Mittlerweile ist es erwiesen, daß die seit den 1970er Jahren in zunehmendem Maße zu Tage tretenden Klimaänderungen und Umweltschäden von Menschen verursacht werden und zum großen Teil auf der Verbrennung der fossilen Brennstoffe und der daraus resultierenden Emission des Treibhausgases CO_2 beruhen. Dieser anthropogene Kohlendioxideintrag in die Atmosphäre kann im natürlichen CO_2 -Kreislauf nicht mehr kompensiert werden, so dass sich die Konzentration von CO_2 seit Mitte des 19. Jahrhunderts von 275 ppm auf 385 ppm erhöht hat, was weitreichende Folgen für das Weltklima und die Menschen hat. Die Folgen des Klimawandels sind vielfältig und folgenschwer und reichen von der Verschiebung von Klimazonen und einem veränderten Jahreszeitenrhythmus bis zum Ansteigen des Meeresspiegels und einer steigenden Anzahl von Überschwemmungen und Wetterextrema. Klimakonferenzen wie die zuletzt am 7. Dezember 2009 in Kopenhagen abgehaltene 15. UN-Klimakonferenz versuchen, die Erderwärmung und ihre globalen Auswirkungen zu begrenzen. Die Erarbeitung gemeinsamer weltweiter Strategien zur

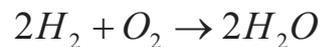
Eindämmung anthropogener Klimaveränderungen und ihrer Folgen indes ist schwierig, da ihnen zahlreiche ökonomische und nationalpolitische Interessen gegenüber stehen.

Die Erschließung von Technologien zur Nutzung erneuerbarer Energiearten und die Reduzierung des Kohlendioxidausstoßes stellt somit eine der wichtigsten Herausforderungen unserer Zeit dar.

Im Jahre 2001 lag der Anteil erneuerbarer Energien am Bruttostromverbrauch der BRD bei 8%, im Jahre 2010 bereits bei 15% [3]. Es ist nationales Ziel, diesen Anteil bis zum Jahre 2050 auf 50% auszubauen. Um dieses Ziel zu erreichen, werden erhebliche finanzielle Mittel aufgewendet.

Hierbei stellt zurzeit die Windenergie mit 6,2% Anteil an der Bruttostromerzeugung das wichtigste Standbein dar, gefolgt von Biomasse- und Photovoltaikanlagen.

Große Bedeutung in einem zukünftigen nachhaltigen Energiekonzept kann dabei dem Wasserstoff zukommen. Wasserstoff stellt letzten Endes eine Speicherform für Energie dar. Dabei ist er gekennzeichnet durch eine hohe Energiedichte und seinen schadstofffreien Umsatz. In Brennstoffzellen kann Wasserstoff mit Sauerstoff in elektrischen Strom umgewandelt werden, wobei in der Gesamtreaktion als Produkt Wasser entsteht:



Die Vorteile der Nutzung von Brennstoffzellen liegen neben Ihrer ökologischen Unbedenklichkeit in ihrem hohen Wirkungsgrad (z. Zeit je nach Art der Brennstoffzelle bis 68%) begründet. Soll Wasserstoff in Zukunft flächendeckend zur Energieversorgung genutzt werden, sind freilich viele technische Probleme noch zu lösen. So bleiben beim heutigen Stand der Technik Fragen zur Speicherung von Wasserstoff noch unbeantwortet. Eine mögliche Lösung dieses Problems könnten Speicher auf der Basis von Metallhydriden darstellen, deren Entwicklung intensiv vorangetrieben wird.

Das größte einer universellen Nutzung von Brennstoffzellen gegenüberstehende Hindernis besteht jedoch in der begrenzten Verfügbarkeit von Wasserstoff bzw. der Tatsache, dass dieser nur unter großem Energieaufwand hergestellt werden kann. Die heutigen industriell angewendeten Verfahren zur Gewinnung von Wasserstoff wie die Dampfreformierung von Erdgas oder die Elektrolyse [4] stellen für die Zukunft weder in ökologischer noch in ökonomischer Hinsicht einen gangbaren Weg dar. Darum werden zurzeit große Anstrengungen unternommen, alternative Wege zur Erzeugung von Wasserstoff zu erschließen. Die hier vorgestellten Untersuchungen sind vor dem Hintergrund dieser Problematik zu sehen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit:

Während die technische Produktion von Wasserstoff zurzeit nur mit einem hohen apparativen und energetischen Aufwand realisiert werden kann, stellt Wasserstoff für viele Organismen ein wichtiges Stoffwechsellintermediat dar, welches von diesen gezielt gebildet oder abgebaut wird. Hierzu bedienen sie sich einer Klasse von Enzymen, welche Hydrogenasen genannt werden und die Bildung von Wasserstoff unter „Normal-Bedingungen“ wie einem natürlichen Atmosphärendruck, normalen Umgebungstemperaturen und physiologischen pH-Wert-Bedingungen katalysieren. Da diese Proteine darüber hinaus zum Teil hohe spezifische Aktivität zeigen, also Wasserstoff mit hohen Raten synthetisieren, stehen sie im Fokus wissenschaftlicher Grundlagenforschung.

Die Katalyse wird möglich, da Hydrogenasen sehr spezifische aktive Zentren von in der Natur einzigartiger Zusammensetzung aufweisen. Diese grenzen sich unter anderem durch die Einbeziehung von ungewöhnlichen Cyanid- und Kohlenmonoxid-Liganden von aktiven Zentren anderer Enzyme ab. Von wenigen Ausnahmen abgesehen sind diese Liganden stets an ein zweikerniges, metallisches Zentrum kovalent gebunden, welches wahrscheinlich der

Ort der Substratbindung ist. Die Aufklärung der genauen chemischen Abläufe im Rahmen der Katalyse dieses Enzyms, zu der diese Arbeit einen Beitrag leisten soll, ist Grundvoraussetzung für eine mögliche technische Nutzung dieses biogenen Prozesses, sei es in Form der direkten Nutzung der biologischen Wasserstoffproduktion mit den Mitteln der Biotechnologie oder in Form neuartiger, chemisch synthetisierter Katalysatoren, für deren notwendige Beschaffenheit die Enzymklasse der Hydrogenasen wertvolle Hinweise geben kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase aus dem bakteriellen Organismus *Desulfovibrio desulfuricans* (DdH) spektroskopisch und elektrochemisch untersucht. Das erwähnte Enzym eignet sich hierbei besonders gut für die hier vorgestellten Untersuchungen. So ist seine Gewinnung vergleichsweise einfach zu bewerkstelligen, da im Unterschied zu den meisten anderen Hydrogenasen eine Aufreinigung dieses Enzyms unter aeroben Bedingungen durchführbar ist. Da es sich um ein nicht membrangebundenes oder -assoziiertes Protein handelt, war seine Kristallisation und die Auflösung seiner Struktur als zweites Enzym seiner Klasse möglich. Darum konnten in der Vergangenheit bereits grundlegende Informationen über die Zusammensetzung des aktiven Zentrums und Hinweise auf den katalytischen Mechanismus gewonnen werden.

Die [FeFe]-Hydrogenase DdH kann aufgrund dessen als Modellenzym dieser Klasse aufgefasst werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Forschungsergebnisse zielen darauf ab, zu einem besseren Verständnis insbesondere des katalytischen Reaktionsmechanismus' der Enzymklasse der Hydrogenasen beizutragen. Den Kern dieser Untersuchungen stellen dabei die in Kapitel 7 dargelegten EPR-spektroskopischen Messungen dar, in denen bislang offene Fragen zur Struktur des aktiven Zentrums behandelt werden. Die Aufklärung dieser Fragen erlaubt Rückschlüsse auf den wahrscheinlichen Reaktionsmechanismus. In der Vergangenheit waren verschiedene Reaktionsmechanismen diskutiert worden.

In Kapitel 8 dieser Arbeit werden anhand elektrochemischer Messungen Übergänge des Enzyms in verschiedene Redoxzustände erzeugt und dabei das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten studiert. Darüber hinaus erlauben die Zugaben der Inhibitoren CO und O₂, das Inhibitionsverhalten dieses Enzyms elektrochemisch zu untersuchen.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Messungen wurden ermöglicht durch ein für diese Enzymklasse neues Kopplungsverfahren des Proteins an den Meßaufbau.

1.2 Die biologische Wasserstoffproduktion

Die Entwicklung und Aufnahme molekularen Wasserstoffs in biologischen Systemen wurde zuerst Ende des 19. Jahrhunderts von dem deutschen Biochemiker Ernst Felix Immanuel Hoppe-Seyler bei Bakterien beschrieben. Der Begriff Hydrogenasen wurde im Jahre 1931 von Stephenson und Stickland bei Untersuchungen an dem Prokaryonten *Escherichia coli* geprägt [107]. Obwohl also diese Enzymklasse und damit einhergehend die Tatsache, daß der Umsatz von Wasserstoff im Stoffwechsel vieler Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielt, der Wissenschaft seit langem bekannt sind, blieb das Interesse an diesen Stoffwechselleistungen lange gering. Erst seit den beiden Ölkrisen der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts wird der biologischen Wasserstoffproduktion und ihrer möglichen Nutzung durch den Menschen zunehmend größere Beachtung geschenkt.

Der biologische Wasserstoffmetabolismus, welcher sich vorwiegend bei bakteriellen Organismen findet (siehe Kapitel 2.1), ist wahrscheinlich bereits früh in der Evolutionsgeschichte, vor der Entstehung einer oxidierenden Sauerstoffatmosphäre

entstanden [131]. Diese Annahme wird zum einen gestützt durch das Auftreten von Hydrogenasen bei basalen Organismen wie Cyanobakterien und Archaeen. Zum anderen würde sie die grundsätzliche Inhibierungstendenz aller bekannten Hydrogenasen gegenüber Sauerstoff erklären. Durch Nischenbildung dieser Organismen und Anpassung des Stoffwechsels sowie der Hydrogenasen selbst findet sich dieses typische Merkmal bei verschiedenen Hydrogenasen jedoch heute in unterschiedlich starker Ausprägung wieder. Eine biotechnologische Erzeugung von Wasserstoff muss indes immer diesem Umstand Rechnung tragen. Im Folgenden seien drei mögliche zukünftige Modelle zur H₂-Erzeugung mittels biologischer Systeme erläutert:

I) Fermentative H₂-Erzeugung:

Biologische Wasserstoffproduktion kann über die fermentative Umsetzung organischer Substrate wie z.B. Pyruvat und Laktat z.B. durch Spezies der Gattungen *Spirochaeta* oder *Clostridium* erfolgen [110]. Ein Nebeneffekt wäre hierbei die Erzeugung von Biomasse, welche wiederum zur Gewinnung von Biogas verwendet werden kann. Die Erzeugung von Biogas wird bereits seit einigen Jahren in größerem Umfang betrieben [109].

Die derzeitigen Nachteile dieses Verfahrens liegen in der geringen Ausbeute an H₂ im Vergleich zum technischen Aufwand bzw. dem Substratgehalt des Nährmediums. So liegt der maximale zurzeit erreichte Nutzungsgrad bei ca. 2 Mol H₂ pro Mol aufgewendete Glukose, während theoretisch 12 Mol H₂ pro Mol Glukose möglich wären [110]. Dies wiederum beruht zum Teil auf dem anpassungsfähigen Metabolismus der in Frage kommenden Bakterienspezies, welche neben Wasserstoff auch z.B. Butyrat oder Ethanol als Elektronen-Endakzeptor nutzen können.

Darum kann eine fermentative Produktion von Wasserstoff nur sinnvoll umgesetzt werden, wenn der Stoffwechsel der in Frage kommenden Organismen zur Gänze verstanden ist und diese biotechnologisch so angezogen werden können, daß maximale Ausbeuten an H₂ erreicht werden können, ohne die Anreicherung von giftigen oder aus anderen Gründen unerwünschten Nebenprodukten. Die Mittel der Molekularbiologie könnten dabei helfen, höhere Expressionsraten der beteiligten Hydrogenase-Enzyme zu erreichen. Auch hierfür müssten wichtige Fragen, vor allem in Bezug auf die Maturation der Proteine, noch geklärt werden.

II) Photosynthese-Gekoppelte H₂-Erzeugung

Photosynthese unter Sauerstoffbedingungen wird von höheren Pflanzen, einzelligen Algen und Cyanobakterien betrieben.

Die Kombination von Wasserstoffbildung mit der photosynthetischen Elektronentransportkette wäre eine ideale Ergänzung, da hierbei über die Wasserspaltung des Photosystems II sowohl Protonen als auch die notwendigen Elektronen zur Verfügung gestellt werden würden. Die einzigen Ressourcen dieses Prozesses wären Sonnenlicht und Wasser, welche praktisch unbegrenzt zur Verfügung stehen.

Eine solche Verknüpfung von Photosynthese und Wasserstoffmetabolismus wurde zum ersten Mal für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben [111]. In diesem System dient

der Wasserstoffmetabolismus dem Abbau überschüssiger Reduktionsäquivalente unter bestimmten physiologischen Bedingungen.

Abbildung 1.1 zeigt die Einbindung eines Hydrogenaseproteins in die photosynthetische Elektronentransportkette. Nach der Oxidation von H_2O am Reaktionszentrum von Photosystem II (PS II) findet über Plastochinon (PQ), Cytochrom (Cyt) und Plastocyanin (PC) die lichtabhängige Übertragung auf Photosystem I (PS I) statt [150].

Die Elektronenübertragung auf das Hydrogenaseprotein erfolgt dann mittels eines Ferredoxins (Fd) [112]. Eine weitere Elektronenquelle für die Bildung von Wasserstoff besteht über die Einschleusung von Elektronen, welche aus dem Abbau von Stärke stammen. Diese werden über eine NAD(P)H-Dehydrogenase (Ndh) auf Plastochinon übertragen.

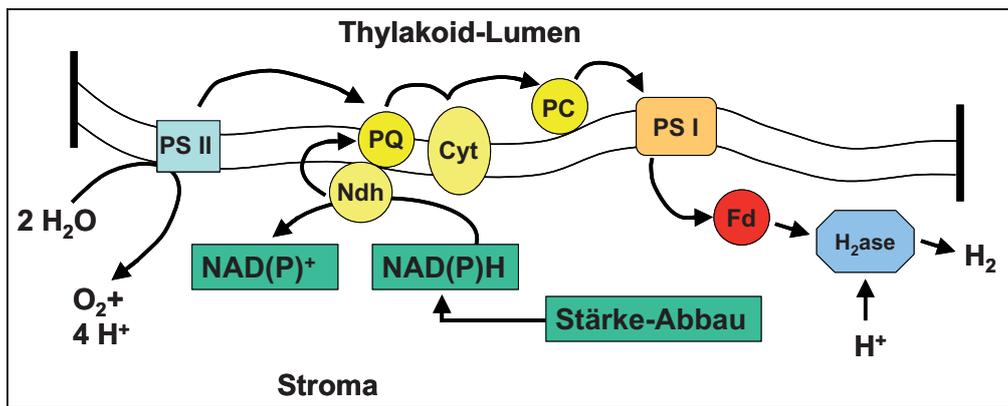


Abbildung 1.1: Photosynthetische Elektronentransportkette und Kopplung an den Hydrogenase-Stoffwechsel in *C. reinhardtii*

Der schwerwiegendste Nachteil dieses Modells ist wiederum die Sauerstoffsensitivität der Hydrogenasen. Diese kann entweder umgangen werden durch eine zeitliche Entkoppelung beider Teilprozesse oder der molekularbiologischen Veränderung der Hydrogenaseproteine, welche zu O_2 -toleranten Enzymen führt.

Auch für eine Photosynthese-gekoppelte Wasserstoffgewinnung sind weitere Forschungsanstrengungen notwendig, um einen den technischen Aufwand rechtfertigenden Nutzungsgrad dieser Systeme zu erreichen.

III) Semiartifizielle bioelektrochemische Zelle

Eine Möglichkeit, die physiologischen Besonderheiten, die bei der Photosynthese-Gekoppelten H_2 -Erzeugung beachtet werden müssen, zu umgehen, besteht im Bau einer bioelektrochemischen Zelle, welche grundsätzlich auf zwei Arten erstellt werden kann: Im ersten Fall wird eine Zelle mittels einer Anionen-Austausch-Membran in zwei Kammern unterteilt. Die Membran dient des Weiteren als Trennung zwischen einer Anode und einer Kathode, so dass über die Kompartimentierung zwei elektrische Halbzellen vorliegen. Auf die Anode werden Bakterien in Form eines Films aufgebracht, welche z.B. aus den Gattungen *Clostridium* oder *Klebsiella* stammen können und in der Lage sind, die Anode als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen. Aufgrund dieser Fähigkeit werden diese Organismen auch als elektrochemisch aktive oder Anoden-respirierende Bakterien (ARB) bezeichnet [113]. Als Substrate dienen einfache organische Verbindungen wie Laktat oder Butyrat, welche in der

Halbzelle in wässriger Lösung vorhanden sind, wobei über die beschriebene Anordnung die frei werdenden Elektronen von der Anode über eine elektrische Leiterbrücke zur Kathode in der zweiten Halbzelle geleitet werden. In der zweiten Halbzelle findet dann mittels des erzeugten Elektronenstroms an der Kathode die elektrolytische Wasserspaltung und H₂-Bildung statt. Diese Anordnung wird Mikrobielle Elektrolyse-Zelle (MEZ) genannt und ist in Abbildung 1.2.A gezeigt.

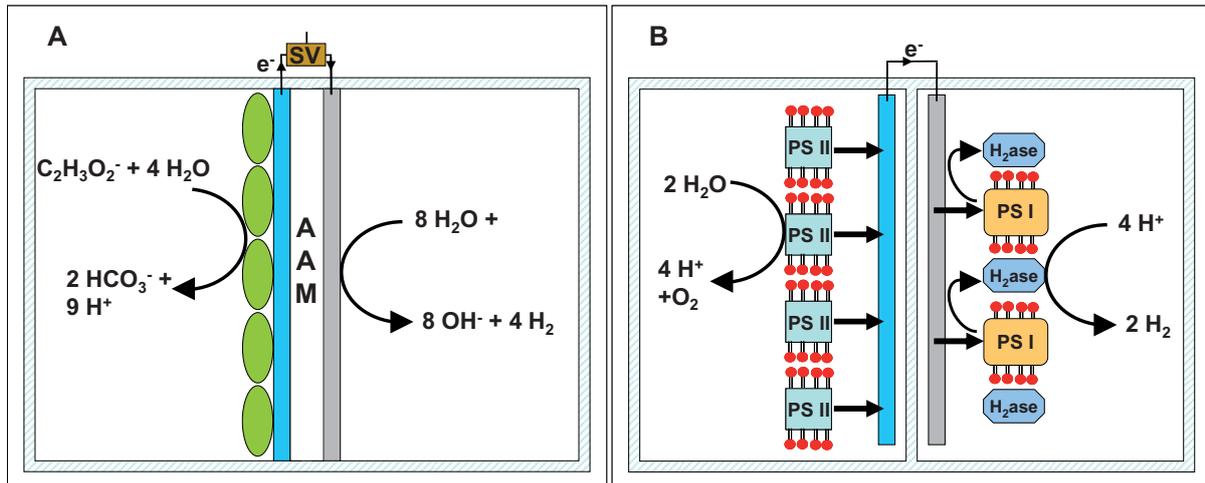


Abbildung 1.2: Semiartifizielle bioelektrochemische Zellen.

A: MEZ (Mikrobielle Elektrolyse-Zelle): SV: externe Spannungsversorgung, AAM: Anionen-Austausch-Membran, hellblau: Anode, grau: Kathode, grün: Bakterienfilm
 B: Photosystem-Hydrogenase-gekoppeltes System: hellblau: Anode, grau: Kathode, PS I, II: Photosystem I bzw. II, H₂ase: Hydrogenase

Da die frei werdenden Reduktionsäquivalente über anaerobe Fermentation entstehen, kann diese Anordnung auch als Spezialfall der fermentativen H₂-Erzeugung betrachtet werden. Der größte Nachteil dieser Methode besteht in großen Energieverlusten, welche vor allem an der Anode auftreten und für eine effiziente H₂-Produktion die zusätzliche externe Einspeisung von Elektronen über die Leiterbrücke nötig machen [114].

Der zweite Entwurf einer bioelektrochemischen Zelle (zu sehen in Abbildung 1.2.B) behält den grundsätzlichen Aufbau einer über eine semipermeable Membran geteilten Anordnung zweier Halbzellen bei, macht sich jedoch das Grundprinzip der in Punkt II beschriebenen Verbindung von Photosynthese und Hydrogenaseaktivität zunutze [115, 116]. Hierzu wird Photosystem II des Photosyntheseapparates an elektrischen Leitern, z.B. einer Goldoberfläche immobilisiert, welche als Anode für die Weiterleitung der über die Wasserspaltung gewonnenen Elektronen dient. Die Elektronen werden dann wie bei der bioelektrischen Zelle des ersten Typs über eine Leiterbrücke auf eine Kathode in der zweiten Halbzelle geleitet. Im Unterschied zum ersten Kompartiment, welches aufgrund der Wasserspaltung und der damit verbundenen Sauerstoffentwicklung aerob ist, muß dieser Teil der Zelle strikt anaerob gehalten werden.

Immobilisiert an die Kathode ist ein fusionierter Proteinkomplex von Photosystem I und Hydrogenase, auf welche die Elektronen übertragen werden, um Wasserstoff zu erzeugen.

Ein großes Problem neben der Immobilisierung der biologischen Komponenten und der Kopplung von Photosystem I und Hydrogenase besteht hierbei in der notwendigen aufwändigen Gewinnung und Reinigung dieser Komponenten und ihrer begrenzten Stabilität.

Die Weiterentwicklung dieser Technik kann jedoch wertvolle Erkenntnisse liefern für artifizielle, biologisch inspirierte Wasserstoffzellen, welche als Fernziel dieser Entwicklung angesehen werden können [117].

Allen drei vorgestellten Methoden ist gemein, daß sie zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine für eine industrielle Anwendung ausreichende Ausbeute an Wasserstoff liefern können. Zur Überwindung dieser Probleme ist weitere Grundlagenforschung nötig.

1.3 Der Organismus *Desulfovibrio desulfuricans*

1.3.1 Systematische Einordnung und Lebensraum

Desulfovibrio desulfuricans ATCC 7757 ist ein gram-negatives, anaerobes Proteobakterium, welches in der Klasse der Deltaproteobakterien der Ordnung der *Desulfovibrionales* zugeordnet ist. *D. desulfuricans* gehört in die Gruppe der Sulfat-Reduzierenden Bakterien (SRB) und wurde als Gruppe-I-Sulfatreduzierer klassifiziert. Diese Gruppe ist dadurch gekennzeichnet, dass die Energiequellen ihres Stoffwechsels wie Laktat, Malat oder Pyruvat lediglich bis auf die Stufe von Acetat und nicht bis auf die Stufe von CO₂ oxidiert werden. Die erste wissenschaftliche Beschreibung von *D. desulfuricans* wurde im Jahre 1895 von Beijerinck unter der Bezeichnung *Spirillum desulfuricans* durchgeführt.

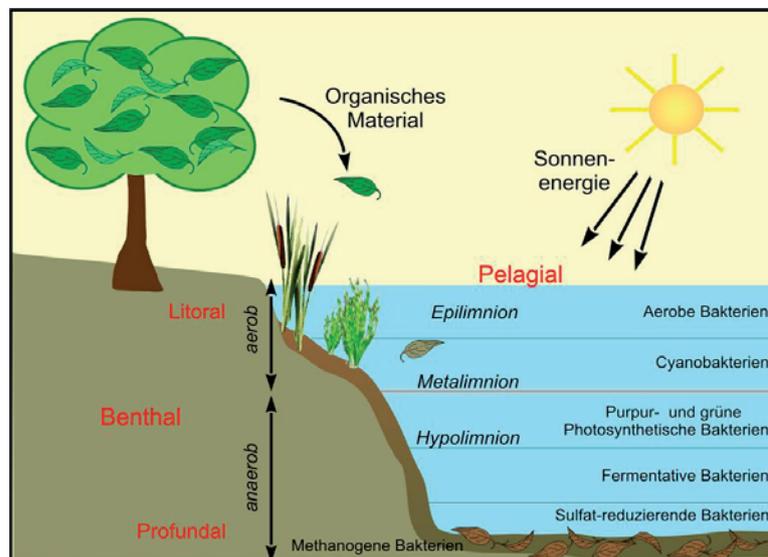


Abbildung 1.3: Habitate verschiedener Organismenklassen mit H₂-Metabolismus. Sulfat-Reduzierende Bakterien wie *D. desulfuricans* besiedeln die oberen Profundalschichten

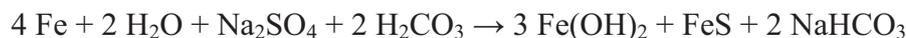
Der Organismus besiedelt die oberen Sedimentschichten in stehenden Gewässern. Trotz seines rein fermentativen Metabolismus' toleriert *D. desulfuricans* auch über mehrere Stunden Sauerstoffkonzentrationen nahe dem Atmosphärenwert, wenn auch mit verringerter oder eingestellter Zellteilungsaktivität [40]. Die Zellen sind, wie im Namen bereits

angedeutet, von vibrioider Form mit polarer, monotricher Begeißelung. Die Ordnung der *Desulfovibrionales* gehört zu den wenigen nicht-phototrophen Bakterien, in denen Cytochrome gefunden wurden. Sie sind nicht sporenbildend. Ihre DNA weist einen GC-Gehalt von 46-61% auf.

Bedeutung für den Menschen hat *Desulfovibrio desulfuricans* vor allem durch die von ihm indirekt verursachte anaerobe Korrosion von Eisen, welche an technischen Einrichtungen, wie Gas- und Flüssigkeitsleitungen, Schiffsrümpfen und Hafenanlagen zu großen Schäden führt [118, 119]. Der genaue Reaktionsweg dieser biogenen Eisenoxidation ist komplex und noch nicht zur Gänze verstanden. Diskutiert wird eine direkte Reaktion des Eisens mit dem von *Desulfovibrio* als Stoffwechselendprodukt gebildeten Schwefelwasserstoff. Hierbei ist von besonderer Bedeutung, daß der an Eisenoberflächen normalerweise haftende H₂-Film von den Bakterien konsumiert wird.

Unter diesen Umständen kommt es zu einer kathodischen Depolarisation des Eisens und zur Korrosion.

Die Gesamtreaktion lässt sich zusammenfassen als:



Neben der Oxidation von Eisen können auch andere Metalle und Legierungen als Folge der StoffwechsellLeistungen von *D. desulfuricans* korrodieren, unter anderem trifft dies auch auf Aluminium zu. Durch die Entwicklung neuer, nicht anaerob korrosiver Legierungen wird versucht, den ökonomischen Schaden dieses Prozesses abzumildern.

Weiterhin sind Spezies der Gattung *Desulfovibrio* für den hohen H₂S-Gehalt des schwarzen Meeres und die über die Ausfällung von Eisen in Form von Eisensulfiden hervorgerufene Schwarzfärbung dieses Binnengewässers verantwortlich.

1.3.2 Der fermentative Metabolismus von *Desulfovibrio desulfuricans*

Als chemoorganotropher Organismus setzt *D. desulfuricans* organische Verbindungen wie beispielsweise Laktat (wie in Abbildung 1.4 gezeigt) oder Malat um. Der Umfang konsumierbarer organischer Substrate ist dabei sehr groß und variiert zum Teil deutlich von Stamm zu Stamm. Insgesamt wurden über 100 verschiedene Substrate für die Gattung *Desulfovibrio* gefunden [120].

Speziell für einige Stämme von *D. desulfuricans* wurde auch die Verstoffwechsellung von Cholin nachgewiesen, was diese von anderen *Desulfovibrionales* abgrenzt. Namensgebend für die Gattung ist die Reduktion von Sulfat über Sulfid zu Sulfid oder Schwefelwasserstoff. Letztere Verbindung stellt das Endprodukt des Stoffwechsels dar. Organismen, welche zu dieser Stoffwechsellleistung fähig sind, werden als Desulfurizierer bezeichnet.

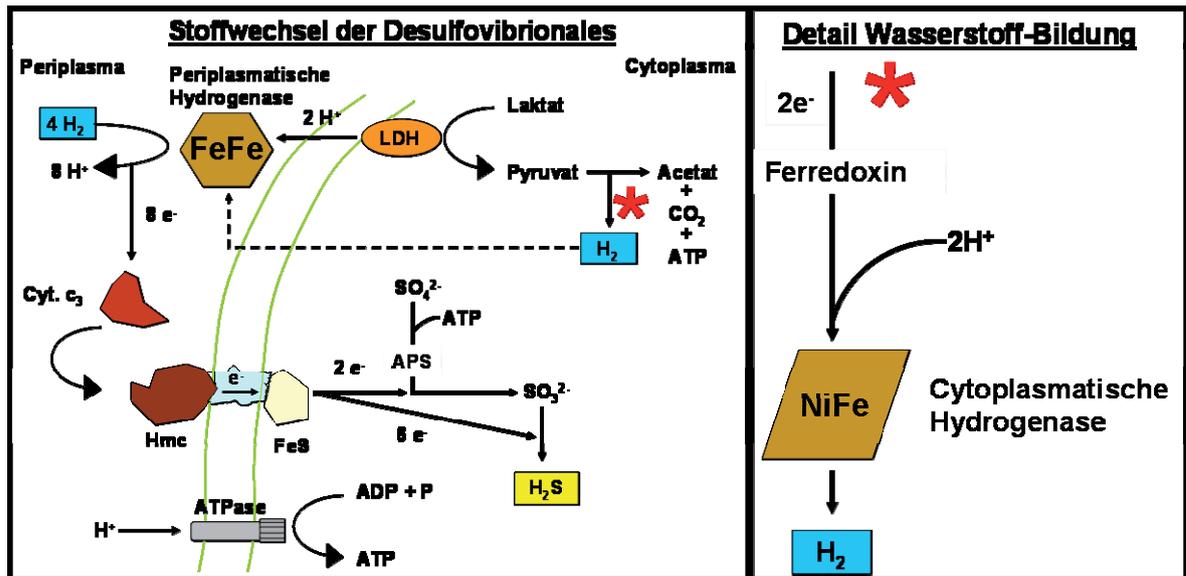


Abbildung 1.4: Grundzüge des Stoffwechsels von *D. desulfuricans*

Die einzelnen Stoffwechselleistungen sind im Text beschrieben.

Hmc: Cytochromkomplex, LDH: Laktatdehydrogenase, Cyt. c₃: Cytochrom c₃,

FeS: Eisen-Schwefel-Protein, FeFe: [FeFe]-Hydrogenase, NiFe: [NiFe]-Hydrogenase

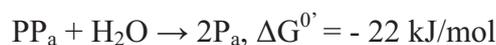
Bei diesem als dissimilatorische Sulfatreduktion (Sulfatatmung) bekannten Prozess werden insgesamt acht Elektronen in einem mehrstufigen Prozess auf den terminalen Elektronenakzeptor übertragen:

Sulfataktivierung und Reduktion zu Sulfit

Im ersten Schritt wird Sulfat über das Enzym ATP-Sulfurylase unter ATP-Verbrauch zu APS aktiviert.



Das entstehende PP_a (anorganisches Pyrophosphat) wird über die Pyrophosphat-Phosphohydrolase hydrolysiert. Im folgenden Schritt wird das „aktivierte Sulfat“ über die APS-Reduktase zu Sulfit reduziert:



Reduktion von Sulfit zu H₂S

In diesem zweiten Teilschritt werden insgesamt sechs Elektronen übertragen.

Der genaue Mechanismus ist strittig. Beteiligte Enzyme sind eine dissimilatorische Sulfitreduktase, welche für die Ordnung der Desulfivibrionales als Desulfoviridin („green protein“) identifiziert wurde. Aus Sulfit entsteht dabei in einem ersten Teilschritt über die Reduktion mit zwei Elektronen S₃O₆²⁻, welches sofort weiter reduziert wird.

Es entsteht Thiosulfat (S₂O₃²⁻), welches über eine Disproportionierungsreaktion mittels einer Thiosulfatreduktase zu SO₃²⁻ und H₂S umgesetzt wird. SO₃²⁻ wird dann wieder zu Thiosulfat

reduziert. Aus physiologischen Messungen weiß man, daß der Umsatz eines SO_4^{2-} -Moleküls der Nettobildung eines ATP-Moleküls entspricht [121].

Die Gesamtreaktion dieser Schritte kann zusammengefaßt werden über:



Zu beachten ist hierbei, daß der bakterielle Metabolismus nicht statisch ist, sondern sich flexibel auf verschiedene Umweltfaktoren einstellt. Dies trifft nicht nur auf die variable Nutzung von organischen Verbindungen als Elektronen- und Energiedonor zu, sondern auch auf die Verwendung des Elektronen-Endakzeptors und verschiedene alternative Wege des Elektronentransports. Ein Beispiel dafür ist das Vorkommen von Wasserstoff, welcher in verschiedenen Funktionen im Metabolismus auftritt.

Dies ist in Abschnitt 1.3.3 erläutert.

Große Bedeutung kommt der Vergesellschaftung mit anderen fakultativ oder obligat anaeroben Mikroorganismen zu, mit welchen die *Desulfovibrionales* sich in ihren Stoffwechsellleistungen symbiotisch ergänzen.

Neben der Wechselbeziehung mit methanogenen Bakterien, welche in der Lage sind, den von ihnen produzierten Wasserstoff wieder zu verstoffwechseln (Interspezies- H_2 -Transfer), kommt der Symbiose mit grünen Schwefelbakterien die größte Bedeutung zu. Im Gegensatz zur dissimilatorischen Schwefelreduktion der *Desulfovibrionales* besitzen diese einen assimilatorischen Schwefelstoffwechsel, welcher es Ihnen erlaubt, den von *Desulfovibrio* generierten Schwefelwasserstoff zu elementarem Schwefel umzusetzen (anoxygene Photosynthese). Diese Reaktionen stellen wichtige Stationen des biologischen Schwefelkreislaufes und gewissermaßen eine Verkürzung desselben dar, da sie die organische Fixierung des Schwefels durch Pflanzen und Mikroorganismen in organischen Verbindungen und deren darauffolgenden Abbau durch Destruenten umgehen (siehe Abbildung 1.5) [121, 127].

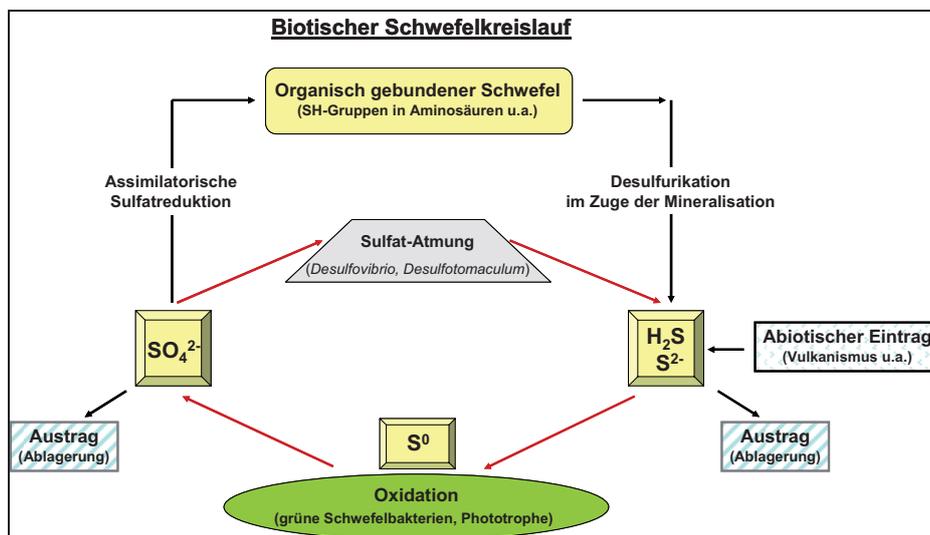


Abbildung 1.5: Biotischer Schwefelkreislauf

Die für die Reduktion des Sulfats nötigen Elektronen stammen letztendlich fast immer aus der Oxidation organischer Verbindungen. Aus diesen scheint in den meisten physiologischen Zuständen zuerst mittels einer cytoplasmatischen Hydrogenase Wasserstoff gebildet zu werden. Nach dessen Diffusion in das Cytoplasma kann dieser Wasserstoff über eine

periplasmatische Hydrogenase re-konsumiert werden, was sowohl eine Weiterleitung der Elektronen über mehrere Elektronen übertragende Moleküle zur Sulfatreduktion (siehe oben) ermöglicht, als auch den Aufbau eines Protonengradienten über die Cytoplasmamembran bedingt, dessen protonenmotorische Kraft von einer ATPase zur ATP-Gewinnung genutzt wird (siehe Abb. 1.4). Eine weitere Möglichkeit des Elektronentransportes besteht in der „direkten“ Einschleusung von Elektronen in die Sulfatreduktionskette über verschiedene Elektronen übertragende Moleküle unter Umgehung des Wasserstoffmetabolismus' [101]. Neben der intrinsischen H₂-Bildung des Organismus kann H₂ auch aus externen Quellen, wie anderen Wasserstoffbildnern bezogen werden. Diese Möglichkeit stellt ein weiteres Beispiel für eine Symbiose der *Desulfovibrionales* mit anderen Spezies und den Interspezies-H₂-Transfer dar [122].

1.3.3 Der Wasserstoffmetabolismus

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, kann der Organismus sowohl die Reduktion von Protonen als auch die Oxidation molekularen Wasserstoffs katalysieren.

Neben organischen Stoffen wie Laktat kann *Desulfovibrio* auch molekularen Wasserstoff als Elektronendonator zur Deckung seines Energiehaushaltes nutzen. Die Ordnung der *Desulfovibrionales* ist somit in ihrem Ernährungstypus fakultativ chemolithoheterotroph.

Für *D. desulfuricans* wurden zwei Klassen von Hydrogenasen nachgewiesen.

Die Klassifizierung wird in Kapitel 2.1 erläutert.

Die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* ist Gegenstand der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen. Aus diesem Grunde werden ihr genauer Aufbau und ihre Besonderheiten ebenfalls in einem gesonderten Abschnitt in Kapitel 2 dargelegt (Abschnitt 2.2).

Eine cytoplasmatisch lokalisierte [NiFe]-Hydrogenase (siehe Abbildung 1.4) wurde im Jahre 2001 beschrieben, welche große Ähnlichkeit mit der seit 1997 bekannten Struktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* aufweist [123, 124].

Darüber hinaus wurden über Hybridisierungsexperimente auch Gensequenzen gefunden, welche für eine wahrscheinlich membranassoziierte [NiFeSe]-Hydrogenase kodieren, wie sie auch in *Desulfovibrio baculatus* gefunden wurde [125, 126, 7].

Das Grundprinzip des Wasserstoffmetabolismus' in *D. desulfuricans* sieht eine von der im Cytoplasma vorliegenden [NiFe]-Hydrogenase katalysierte Protonenreduktion vor, deren Elektronenbedarf aus der Oxidation der Primärsubstrate gedeckt wird. Nach Diffusion über die Cytoplasmamembran kann der gebildete Wasserstoff dann von der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase DdH re-oxidiert werden. Über die Weitergabe verschiedener Carrier werden die hierbei frei werdenden Elektronen der Sulfatatmung zur Verfügung gestellt [121].

Dem Wasserstoffmetabolismus kommt dabei im Stoffwechsel von *Desulfovibrio* eine „Ventilfunktion“ zu, da Wasserstoff selber hoch volatil ist und so die Zelle verlassen kann, wenn er nicht re-oxidiert wird. *Desulfovibrio* hat dadurch die Möglichkeit, Überschüsse an Reduktionsäquivalenten abzubauen und durch die Regulation des Wasserstoffhaushaltes flexibel auf sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren. Die Arten von *Desulfovibrio* besitzen somit die bemerkenswerte Fähigkeit, sowohl als H₂-Produzenten als auch als H₂-Konsumenten zu agieren [101]. Die Einbeziehung des Wasserstoffmetabolismus' in den fermentativen Stoffwechsel von *D. desulfuricans* ist aus Abbildung 1.4 zu entnehmen. Wie in Abbildung 1.4 zu erkennen, handelt es sich bei den Elektronendonoren und -Akzeptoren der Hydrogenaseproteine um Cytochrome und Ferredoxine.

2 HYDROGENASEN

2.1 Klassifizierung und Vorkommen von Hydrogenasen

Die Enzymklasse der Hydrogenasen (Hydrogen : Oxidoreduktasen) katalysiert die einfachste chemische Reaktion, die Reduktion von zwei Protonen mit zwei Elektronen zu molekularem Wasserstoff bzw. die heterolytische Spaltung von Wasserstoff in zwei Protonen und zwei Elektronen:



Hydrogenasen stellen Schlüsselenzyme im Stoffwechsel vieler bakterieller wie auch einiger eukaryotischer Organismen dar. Sie bilden in der Klasse der Oxidoreduktasen (Klasse 1) die Untergruppe 12 (EC 1.12) [104]. Die weitere nomenklatorische Unterscheidung innerhalb dieser Untergruppe richtet sich nach der Art des physiologischen Elektronenakzeptors. Als Beispiele genannt seien NAD/NADP (EC 1.12.1), Ferredoxine (EC 1.12.7) und Cytochrome (EC1.12.2).

Hydrogenasen lassen sich, entsprechend der Zusammensetzung ihrer katalytischen Zentren, in drei Hauptklassen unterteilen [2].

2.1.a [FeFe]-Hydrogenasen

In dieser Arbeit werden Untersuchungen an der [FeFe]-Hydrogenase DdH aus *Desulfovibrio desulfuricans* vorgestellt. Aus diesem Grund soll diese Enzymklasse an erster Stelle und in detaillierterer Weise beschrieben werden. Die Struktur der [FeFe]-Hydrogenase DdH aus *D. desulfuricans* ist in Abbildung 2.3 in Kapitel 2.2 dargestellt [13].

[FeFe]-Hydrogenasen weisen ein zweikerniges Eisenzentrum, das H-Cluster auf, welches sich durch das Vorhandensein charakteristischer CO- und CN-Liganden auszeichnet [13, 71].

Jedes der Eisenatome ist mit jeweils einer CO- und CN-Gruppe verbunden. Darüber hinaus sind im oxidierten Zustand beide über einen dritten CO-Liganden miteinander verbrückt.

Außerdem besteht eine zweite Verbrückung der beiden Eisenatome über einen weiteren organischen Liganden. Die genaue Natur dieses Liganden war über einen längeren Zeitraum umstritten, da die erhaltenen Röntgenstrukturen sowohl Dithiopropan als auch Dithiomethylamin möglich erscheinen ließen [27].

In dieser Arbeit werden Ergebnisse vorgestellt, welche den Brückenliganden als Dithiomethylamin identifizieren.

Eines der beiden Eisenatome ist über die Bindung mit einem Cystein mit einem [4Fe-4S]-Cluster verbunden [152]. Dieses Eisenatom wird entsprechend seiner Nähe zu diesem Cluster als proximal oder Fe₁, das andere Eisenatom als distal oder Fe₂ bezeichnet.

Das distale Eisen weist somit im oxidierten Zustand eine Bindung weniger auf als das proximale Eisen. Mit Hilfe von Computeranalysen wurden im Wesentlichen zwei mögliche katalytische Funktionsmechanismen entwickelt, welche die offene Bindungsstelle am distalen Eisen mit einbeziehen [24]: Die erste Variante sieht eine Bindung des Wasserstoffmoleküls an der offenen Bindungsstelle des distalen Eisens vor. Dieses wird über eine Wasserstoffbrückenbindung zum Stickstoff des oben erwähnten Brückenliganden stabilisiert. Im nächsten Reaktionsschritt findet die heterolytische Spaltung statt, welche ein Proton am distalen Eisen und ein Proton am Stickstoffatom hinterlässt. In den folgenden

Reaktionsschritten wird zuerst das Proton am Stickstoffatom abgespalten. Nach Anlagerung des zweiten Protons an die freigewordene Bindungsstelle am Stickstoffatom wird auch dieses abgespalten, so dass das H-Cluster wieder im aktivierten Zustand mit einer offenen Koordinierungsstelle am distalen Eisen vorliegt. Die Reaktion in entgegengesetzter Richtung sieht entsprechend die Protonierung des sekundärenamins in der Brücke und die Übertragung von insgesamt zwei Protonen auf das distale Eisen vor.

Der zweite aufgrund von Energiekalkulationen vorgeschlagene Reaktionsmechanismus basiert auf einer Umlagerungsreaktion der die beiden Eisenatome verbrückenden CO-Gruppe hin zum distalen Eisen, welche eine offene Bindungsstelle am proximalen Eisen hinterlässt.

Diese wird im Folgenden vom bindenden Wasserstoffmolekül besetzt. Nach der heterolytischen Spaltung verbleibt ein Proton am distalen Eisen unter Ausbildung einer weiteren Bindung zum proximalen Eisen, während das zweite Proton eine Bindung zu einem der Schwefelatome im Brückenliganden eingeht. Letzteres Proton wird im folgenden Schritt abgespalten. Nach Abspaltung des anderen Protons lagert sich die noch am distalen Eisen gebundene CO-Gruppe wieder in ihre zentrale Position zwischen den Eisenmolekülen um.

In dieser Arbeit wird das erste dieser beiden Modelle bestätigt. Zum einen basieren die Modellrechnungen für die zweite Variante auf der Annahme einer Kohlenstoffgruppe als Brückenliganden. Zum anderen zeigen neue elektrochemische Untersuchungen an der [FeFe]-Hydrogenase aus *Chlamydomonas reinhardtii*, dass die Position der CO-Brücke sich im Laufe des Katalyse-Zyklus nicht ändert [5].

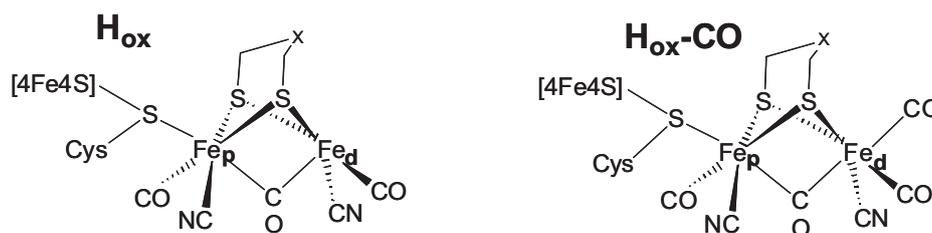


Abbildung 2.1: Das katalytische Zentrum der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* in den Zuständen H_{ox} und H_{ox-CO} . In beiden Fällen befindet sich das proximale Eisenatom (Fe_p) links und das distale Eisenatom (Fe_d) rechts. Der in der Literatur als C-, N- oder O-Atom beschriebene Ligand in der Brückenstruktur zwischen den Eisenatomen ist mit x gekennzeichnet.

Fast alle Hydrogenasen besitzen neben dem H-Cluster noch weitere [4Fe4S]- oder [2Fe2S]-Cluster, welche die Elektronenweitergabe von der Proteinoberfläche zum aktiven Zentrum vermitteln.

Ein weiteres Charakteristikum aller [FeFe]-Hydrogenasen ist ihre Sensitivität gegenüber Sauerstoff, welcher bereits in geringen Konzentrationen zu einer irreversiblen Inaktivierung des Enzyms führt und die für [NiFe]-Hydrogenasen ebenfalls bekannte O_2 -Empfindlichkeit übertrifft sowie eine auch bei [NiFe]-Hydrogenasen festzustellende Inhibierung durch Kohlenmonoxid.

Im Vergleich mit [NiFe]-Hydrogenasen weisen [FeFe]-Hydrogenasen eine deutlich höhere spezifische Aktivität auf (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen (verändert nach [106])

	[NiFe]-Hydrogenasen	[FeFe]-Hydrogenasen
H ₂ -Produktion*	700	6000-9000
H ₂ -Verbrauch*	700	28 000

* Moleküle Substrat pro Sekunde für 1 Hydrogenasemolekül bei 30 °C

Anders als im Falle der [NiFe]-Hydrogenasen sind für diese Enzymklasse viele Beispiele von Hydrogenasen beschrieben, welche lediglich aus einer Untereinheit bestehen [10]. Die Mehrzahl der bekannten [FeFe]-Hydrogenasen katalysiert unter physiologischen Bedingungen die Protonenreduktion, also die Wasserstoffsynthese.

2.1.b.1 [NiFe]-Hydrogenasen

Die meisten der bisher beschriebenen Hydrogenasen fallen in diese Klasse [2].

Das katalytische Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen weist einige grundsätzliche strukturelle Ähnlichkeiten mit dem H-Cluster von [FeFe]-Hydrogenasen auf, da beide Enzymklassen die gleiche chemische Reaktion katalysieren. Jedoch bestehen auch einige große Unterschiede in Ihrem Aufbau, zumal zwischen beiden keine phylogenetische Verwandtschaft vorliegt: Wie das H-Cluster setzt sich auch das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen aus einem zweikernigen Metallzentrum zusammen. Dieses ist über insgesamt vier Cysteine in die Aminosäurestruktur des Enzyms eingefügt. Zwei dieser Cysteine verbinden das Nickel- und das Eisenatom miteinander. Das Eisenatom weist wie die Eisenatome im H-Cluster der [FeFe]-Hydrogenasen CN- und CO-Liganden auf. Abbildung 2.2 zeigt das katalytische Zentrum und die Gesamtstruktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki.

Neben diesem aktiven Zentrum besitzen [NiFe]-Hydrogenasen gewöhnlich drei [Fe-S]-Cluster, deren Funktion insbesondere in der Weiterleitung der während der heterolytischen Wasserstoffspaltung freiwerdenden Elektronen liegt, wie dies auch für [FeFe]-Hydrogenasen der Fall ist [10].

[NiFe]-Hydrogenasen liegen in den meisten Fällen als Heterodimer vor, wobei die große Untereinheit (α) von ca. 60 kDa das aktive Zentrum enthält, während in der kleinen Untereinheit (β) die [Fe-S]-Cluster lokalisiert sind.

Einige Hydrogenasen dieser Klasse, wie die [NiFe]-Hydrogenase (Hase I) aus dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* weisen neben einer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber O₂ auch eine geringere CO-Empfindlichkeit auf [32, 9].

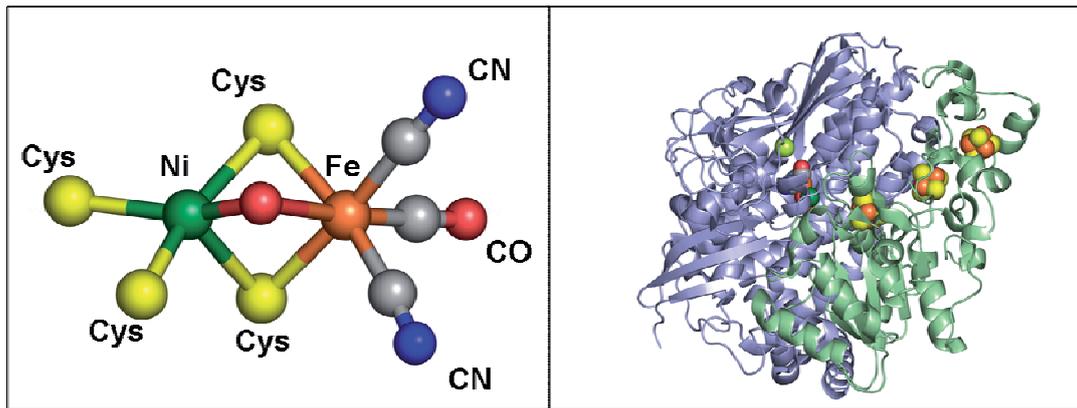


Abbildung 2.2: Das katalytische Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen (links) sowie die Gesamtstruktur (rechts) der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki in Bänder-Darstellung. Ni: Nickel, Fe: Eisen, Cys: Thiolatgruppen von Cysteinen

[NiFe]-Hydrogenasen werden weiter unterteilt in vier Untergruppen [10].

In Gruppe I werden eine Reihe Wasserstoff evolvierende Hydrogenasen eingeordnet. Die Enzyme dieser Gruppe sind stets membrangebunden.

Sie zeichnen sich aus durch ein konserviertes Aminosäuremotiv der Abfolge RRxFxK (x bezeichnet variable Aminosäuren), welches eine Adressierung für eine Translokation über die Cytoplasmamembran darstellt. Das Motiv befindet sich N-terminal in der kleinen Untereinheit und wird auch als TAT-Sequenz (von „twin-arginine transport“) bezeichnet.

Gruppe-II-Hydrogenasen sind gekennzeichnet durch das Fehlen einer solchen Signalsequenz. Entsprechend liegt hier eine cytoplasmatische Lokalisierung vor.

Einige Hydrogenasen dieser Gruppe nehmen die Funktion eines physiologischen H₂-Sensors wahr. Unter physiologischen Bedingungen katalysieren sie die H₂-Oxidation.

Gruppe-III-Hydrogenasen sind bidirektionale heteromultimere Enzyme, welche im Cytoplasma vorliegen. Sie enthalten stets Ko-Faktoren.

In Gruppe IV sind membran-assoziierte [NiFe]-Hydrogenasen eingeordnet, welche über die Bildung von Wasserstoff überschüssige Reduktionsäquivalente abbauen.

Die Hydrogenasen der Gruppen eins, drei und vier treten in Bakterien und Archebakterien auf. Vertreter der Gruppe zwei finden sich in Bakterien und Cyanobakterien.

2.1.b.2 [NiFeSe]-Hydrogenasen

[NiFeSe]-Hydrogenasen entsprechen in ihrem Grundaufbau den [NiFe]-Hydrogenasen. Lediglich eines der das katalytische Zentrum am Nickelatom koordinierenden Cysteine ist durch ein Selenocystein ersetzt [7]. [NiFeSe]-Hydrogenasen wurden bisher in nur relativ wenigen Organismen gefunden. Sie sind deshalb von besonderem Interesse, da sie eine den

[FeFe]-Hydrogenasen vergleichbar hohe katalytische Aktivität aufweisen (siehe Tabelle 2.2), welche noch unter relativ hohen Sauerstoffpartialdrücken aufrecht erhalten wird [6].

Tabelle 2.2: Vergleich der spezifischen Aktivitäten verschiedener [NiFeSe]-Hydrogenasen mit [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen

(angegeben in U*/mg, verändert nach [151])

(*DvH*: *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, *Dg*: *Desulfovibrio gigas*, *Dmb*: *Desulfomicrobium baculatum*)

H₂-Produktion: Gas-chromatographische Messung bei pH 7,0 mit Dithionit als Elektronendonator.

H₂-Verbrauch: Spektrophotometrische Messung bei 25°C mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor,

	<i>DvH</i> [NiFeSe] Hase	<i>DvH</i> [NiFe] ₁ Hase	<i>DvH</i> [FeFe] Hase	<i>Dg</i> [NiFe] Hase	<i>Dmb</i> [NiFeSe] Hase	<i>Dmb</i> NJ [NiFeSe] Hase
H ₂ -Produktion*	6908	174	4800	440	2000	8600
H ₂ -Verbrauch*	900	89	50 000	1500	---	---

*U: 1 μmol umgesetztes H₂ pro Minute

2.1.c [Fe]-Hydrogenasen

Diese Hydrogenaseklasse enthält keine [Fe-S]-Cluster oder Nickel.

2006 wurde die Kristallstruktur eines essentiellen Ko-Faktors veröffentlicht, welcher für die Funktion des Enzyms unabdingbar ist [8]. Der Ko-Faktor enthält ein Eisenatom, welches zwei CO-Liganden aufweist. Das Vorkommen von [Fe]-Hydrogenasen beschränkt sich auf eine Reihe methanogener Archaeobakterien, in denen sie die reversible Reduktion von methenyl-H₄MPT⁺ und H₂ zu methenyl-H₄MPT katalysieren. Sie werden deshalb auch als Hmd (H₂-bildende Methylenetetrahydromethanopterinhydrogenasen, EC 1.12.98.2) bezeichnet.

Neben dieser Klassifikation, welche sich auf den Aufbau ihres katalytischen Zentrums bezieht, können Hydrogenasen auch nach ihrem physiologischen Elektronendonator oder – akzeptor eingeteilt werden. Bekannte Moleküle, welche als solche fungieren, sind neben NAD und Cytochromen auch Koenzym F₄₂₀ und Ferredoxine. Eine weitere Einteilung ergibt sich zwangsläufig aus der Tatsache, dass es sowohl physiologisch wasserstoffoxidierende wie auch protonenreduzierende Hydrogenasen gibt. Diese werden im ersten Fall als Aufnahme- (engl.: uptake) Hydrogenasen und im zweiten Fall als Wasserstoff erzeugende (engl.: hydrogen evolving) Hydrogenasen bezeichnet.

2.1.d Vorkommen und Physiologische Stellung

Hydrogenasen wurden bisher in einer Vielzahl vorwiegend prokaryotischer Organismen entdeckt [2], wo sie in den verschiedensten Phyla, wie Cyanobakterien, Proteobakterien und Chlorobien vorkommen. Jedoch gibt es auch Beispiele für Hydrogenasen aus eukaryotischen Organismen. In diesem Fall sind die Enzyme jedoch immer in die Zelle kompartimentierende Organellen, wie den Chloroplasten photosynthetischer Grünalgen oder den Hydrogenosomen parasitischer Protozoen lokalisiert [10].

Einhergehend mit dem in Prokaryonten fast universellen Auftreten von Hydrogenasen sind diese in vielfältiger Weise in den Stoffwechsel der entsprechenden Organismen eingebunden. Je nachdem, ob das Enzym unter physiologischen Bedingungen die Oxidation molekularen Wasserstoffs oder die Bildung molekularen Wasserstoffs aus Protonen und Elektronen katalysiert, können zwei grundsätzliche Funktionen unterschieden werden. Im ersteren Fall wird Wasserstoff verstoffwechselt und dient als Energiequelle.

So nutzen stickstofffixierende Rhizobien, welche als Endosymbionten beispielsweise in Lupinen vorkommen, Aufnahme-Hydrogenasen, um den über den Nitrogenasekomplex freiwerdenden Wasserstoff wieder zu verstoffwechseln [2].

H₂-Oxidation findet sich sowohl bei aeroben als auch besonders bei anaeroben Bakterien. Hier dient Wasserstoff vor allem zur Reduktion von Energie speichernden Elektronenakzeptoren. Dies ist möglich, da das Redoxpotential von Wasserstoff mit -480 mV relativ niedrig liegt [135]. Beispiele für wasserstoffoxidierende Aerobier sind die Knallgasbakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Ralstonia* und *Bacillus*. In die Gruppe der anaeroben, Wasserstoff oxidierenden Organismen fallen Vertreter aller Organismengruppen, welche unter anaeroben Bedingungen Elektronentransportphosphorylierung betreiben. Entsprechend fungieren Nitrat, Sulfat, Fumarat, Carbonat, Schwefel oder Eisenionen als Elektronenendakzeptoren [136]. Wasserstoff kann auch als Elektronendonator in anaerob photosynthetisch aktiven Bakterien auftreten [137, 138].

Die Elektronen des Wasserstoffs können auch häufig in reduktive Reaktionen zur Kohlendioxidfixierung eingespeist werden, was die entsprechenden Organismen zu autotrophem Wachstum befähigt.

Der zweite Fall der Wasserstoffsynthese kann beispielhaft an der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden. In der Grünalge ist der Hydrogenasestoffwechsel an die photosynthetische Elektronentransportkette gekoppelt und wird auch über diese reguliert [14]. Unter physiologischen Bedingungen, bei denen über die Photosysteme ein hohes Redoxpotential aufgebaut wird, was besonders in anaeroben Nährstoffmangelsituationen der Fall ist, dient die Wasserstoffbildung dazu, überschüssige Elektronen zu entfernen. In diesem Fall findet die Elektronenweitergabe vom Photosystem I über ein Ferredoxin statt.

Die reduktive Bildung von Wasserstoff dient somit in vielen Fällen dem Abbau überschüssigen Reduktionspotentials.

Dies wurde ebenfalls für den fermentativen Metabolismus von Clostridien bewiesen [139].

Hydrogenaseaktivität bei Eukaryoten konnte bisher bei Ciliaten (*Nycterus ovalis* [141]), Trichomondaen (*Trichomonas vaginalis* [142]), Chitridiomyceten (*Neocaliastix frontalis* [143]) und einzelligen Grünalgen wie *Chlorella fusca* [144] und *Scenedesmus obliquus* [145] nachgewiesen werden. Für Protozoen und Pilze spielt das Vorhandensein von Hydrogenosomen eine Rolle, diese stellen Organellen mit zwei Membranen dar, welche Hydrogenase- und auch Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Proteine besitzen [141, 146, 147].

In der Gattung *Desulfovibrio* sind sowohl eine [NiFe]- wie auch eine periplasmatisch lokalisierte [FeFe]-Hydrogenase und in einigen Arten eine [NiFeSe]-Hydrogenase identifiziert worden [125]. Entsprechend dem von Odom und Peck vorgeschlagenen Wasserstoffzyklus für das Wachstum von sulfatreduzierenden Bakterien mit Laktat als Energiequelle [17] können diesen unterschiedliche Funktionen zugewiesen werden.

Nach diesem Modell wird im Cytoplasma der Zelle Wasserstoff durch die [NiFe]-Hydrogenase gebildet.

Die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase dient zur Oxidation des ins Periplasma diffundierten Wasserstoffs und in der Konsequenz der Erzeugung eines Protonengradienten über die Cytoplasmamembran, welcher durch in der Cytoplasmamembran verankerte

ATPasen zur ATP-Gewinnung verwendet wird, während die Elektronen auf Elektronenakzeptoren wie Cytochrom c_3 und Ferredoxin übertragen werden [101] und letztlich der Reduktion des terminalen Elektronenakzeptor Sulfat zu Sulfid oder Schwefelwasserstoff dienen.

Das Beispiel *Desulfovibrio* zeigt somit auch, dass ein Organismus verschiedene Hydrogenasen auch unterschiedlicher Klassen besitzen kann, welchen über die Lokalisation in verschiedenen Kompartimenten, unterschiedliche Expressionsmuster und Aktivitätsraten spezifische Aufgaben im Metabolismus zukommen. Der Organismus wird über die Regulation dieser Schlüsselenzyme in die Lage versetzt, seinen Stoffwechsel auf veränderte Umweltbedingungen anzupassen.

2.2 Struktureller Aufbau der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase DdH aus *Desulfovibrio desulfuricans*

Ziel dieser Arbeit ist die spektroskopische Untersuchung der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans*, weshalb diese deshalb an dieser Stelle in detaillierter Weise beschrieben werden soll.

Die [FeFe]-Hydrogenasen der Gattung *Desulfovibrio* sind die bisher einzigen gefundenen Enzyme dieser Klasse, welche im Periplasma lokalisiert sind. Eine weitere Besonderheit stellt die Tatsache dar, dass sie unter physiologischen Bedingungen Wasserstoff oxidieren, also Aufnahme-Hydrogenasen sind [10, 100]. Der Großteil der bisher untersuchten [FeFe]-Hydrogenasen katalysiert die Reaktion in entgegengesetzter Richtung.

Die Gensequenz der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* konnte im Jahre 1999 aufgeklärt werden [12]. Die Gene *hydA* und *hydB* kodieren für die große Untereinheit (46 kDa) bzw. kleine Untereinheit (13,5 kDa) des als Heterodimer vorliegenden Enzyms. Die beiden Gene werden lediglich durch 11 Basenpaare voneinander getrennt, weswegen man von einer simultanen Transkription beider Untereinheiten ausgeht. Beim Vergleich mit der ebenfalls im Jahre 1999 erhaltenen Proteinstruktur [13] fällt auf, dass im maturierten Enzym die letzten 24 C-terminalen translatierten Aminosäuren der großen Untereinheit fehlen. Ähnliches gilt für die kleine Untereinheit, bei der die ersten 34 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs nicht strukturell aufgelöst werden konnten. Man nimmt an, dass es sich bei diesen Bereichen um Signalpeptide zur Adressierung des Enzyms in das Periplasma handelt, welche nach erfolgter Translokation abgespalten werden. Auch weisen die [FeFe]-Hydrogenasen der Gattung *Desulfovibrio* eine TAT-Sequenz auf, wie diese auch bei periplasmatischen [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe II (siehe 2.1.b.1) gefunden wurde.

Die das H-Cluster umgebende Aminosäureumgebung umfasst einen Bereich von ca. 350 Aminosäuren, welcher in der gesamten Enzymklasse stark konserviert ist [11].

Der strukturelle Aufbau wird aus Abbildung 2.3 ersichtlich: Die große Untereinheit beherbergt das H-Cluster sowie zwei [4Fe-4S]-Cluster, welche mit dem an das zweikernige Eisencluster gebundenen [4Fe-4S]-Cluster in einer Reihe liegen, die vom H-Cluster zur Oberfläche des Enzyms führt. Die kleine Untereinheit setzt sich aus 4 α -Helices zusammen, die miteinander verbunden ein Band bilden, welches die große Untereinheit umspannt. Sie weist keine in sie inkorporierten anorganischen Bestandteile auf, weshalb ihr eine für die Gesamtstruktur des Moleküls stabilisierende Funktion zugesprochen wird.

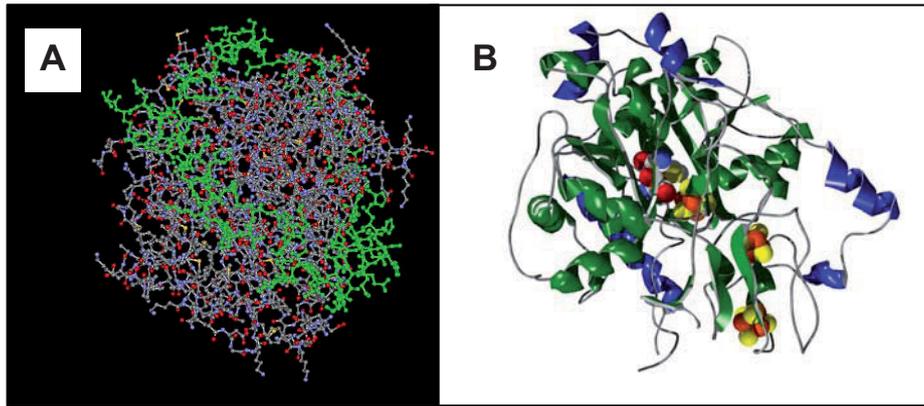


Abbildung 2.3: [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans*
 A: Kugel-Stab-Modell: Das Protein ist grob globulär mit einem Durchmesser von 57 Å * 56 Å * 47Å
 Die kleine Untereinheit (grün) trägt keine anorganischen Cluster. Sie umschließt die große Untereinheit ringförmig
 B: Bändermodell: zu erkennen sind die beiden [FeS]-Cluster und das H-Cluster im Inneren des Proteins

2.3 Maturation von [FeFe]-Hydrogenasen

Die Maturation der Hydrogenasen ist von besonderem Interesse vor allem aufgrund der Inkorporation des hochgradig ungewöhnlichen zweikernigen Metallzentrums mit seinen für biologische Systeme atypischen CN- und CO-Liganden.

Während für [NiFe]-Hydrogenasen bereits viele Maturationsfaktoren (die sogenannten *hyp*-Gene) identifiziert werden konnten [10], ist das Wissen um die Maturation von [FeFe]-Hydrogenasen noch begrenzter. Im Jahre 2004 konnten mit Hilfe von Insertionsmutanten die Gene *hyd* E, F und G identifiziert werden [18]. Bei Hyd E und G handelt es sich um Radikal-SAM (S-Adenosyl-Methionin)-Proteine, während das Protein F GTPase-Aktivität aufweist [20].

Für Hyd F aus *Clostridium acetobutylicum* konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Protein ein [4Fe-4S]-Cluster und ein zweikerniges Eisencluster mit CO- und CN-Liganden besitzt [19] und imstande ist, das Hydrogenase-Apoprotein zu funktionalem Protein zu maturieren.

Letztere Beobachtung deckt sich mit in-vitro-Aktivitäts-Studien mit den heterolog exprimierten Hyd E, F und G-Maturationsproteinen [22]. Man geht deshalb davon aus, dass zuerst das Apoprotein gebildet wird und anschließend die Einbindung der Cluster über Hyd F erfolgt. Hyd G katalysiert die Spaltung von Tyrosin, was zur Bildung von p-Kresol führt und einen Teilschritt sowohl bei der Bildung von CO wie auch CN darstellt [91].

Für *D. desulfuricans* ist bekannt, dass die Maturationsgene in einem gemeinsamen Operon mit *hydA* und *hydB* vorliegen [21].

2.4 Redoxzustände von DdH

Im Zuge seiner katalytischen Aktivität durchläuft das Enzym einen Zyklus, in dessen Verlauf das H-Cluster in fester Folge eine Reihe verschiedener Redoxzustände einnimmt [45]. Die bisher bekannten Redoxzustände wurden mit den Mitteln der EPR-/Mössbauer- und FT-IR-Spektroskopie sowie elektrochemischen Messungen ermittelt und sind in Abbildung 2.4 als schematische Abfolge der H₂-Oxidations-Reaktion dargestellt.

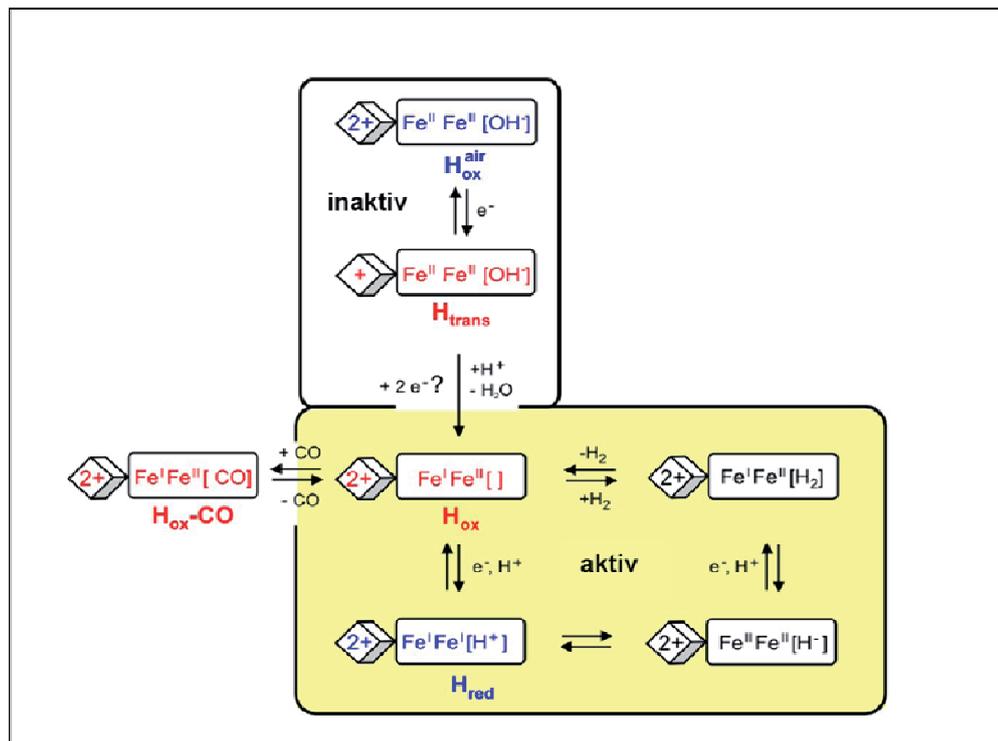


Abbildung 2.4: Die Redox-Zustände der [FeFe]-Hydrogenase
Zur Beschreibung der einzelnen Zustände siehe Text.
Die Zustände des eigentlichen Zyklus' sind gelb unterlegt.

H_{ox}^{air}-Zustand:

Nach der Präparation des Enzyms unter aeroben Bedingungen liegt dieses in einem überoxidierten, sauerstofftoleranten Zustand vor (H_{ox}^{air}, „as-isolated“), mit dem [4Fe-4S]-Cluster im Ladungszustand 2+. Die beiden Eisenatome des [2Fe]-Subclusters haben in diesem Redoxzustand die Oxidationszahl II. Im Schema ausgelassen sind die beiden anderen [4Fe-4S]-Cluster des Enzyms, welche während des katalytischen Zyklus' auch ihren Ladungszustand ändern und im H_{ox}^{air}-Zustand ebenfalls oxidiert vorliegen. Aufgrund von Kristallstrukturanalysen wird davon ausgegangen, dass während des H_{ox}^{air}-Zustands die freie Bindestelle am distalen Eisenatom von einer Sauerstoffspezies (OH⁻ oder H₂O) besetzt ist [27]. Wegen der diamagnetischen Natur dieses Zustandes ist letzterer für EPR-spektroskopische Messungen nicht zugänglich.

H_{trans}-Zustand:

Beim Übergang vom überoxidierten in den oxidierten Zustand und somit beim Eintritt in den katalytischen Kreislauf tritt dieser Zustand auf. Dabei kommt es zu einer Potentialänderung um $E_m = -75$ mV. In diesem Durchgangszustand ist das zweikernige Eisencluster noch oxidiert, während das [4Fe4S]-Cluster ein Elektron aufgenommen hat und so eine Nettoladung von 1+ vorliegt. Die erwähnte Sauerstoffspezies ist in diesem Zustand noch vorhanden.

H_{ox}-Zustand:

Der bei einem Potential von $E_m = -261$ mV entstandene H_{ox}-Zustand hingegen zeichnet sich dadurch aus, daß das bei Bildung des H_{trans}-Zustands vom [4Fe-4S]-Cluster aufgenommene Reduktionsäquivalent auf das zweikernig Eisencluster übertragen wird. Während man formal die Oxidationszahlen für Fe₁ und Fe₂ mit I und II angibt, befindet sich das zweikernige Subcluster faktisch wahrscheinlich in einem Valenz-Mischzustand.

Die H_{trans}- und H_{ox}-Zustände als paramagnetische Zustände sind für EPR-Messungen zugänglich. Uneinigkeit besteht über den Besetzungszustand der freien Bindestelle am distalen Eisenatom in diesem Zustand. Die Auswertung der Kristallstruktur von Cpl aus *Clostridium pasteurianum* ergab an dieser Stelle Elektronenspindichte, welche der erwähnten Sauerstoffspezies zugeordnet wurde [26]. Für die Kristallstruktur von DdH konnte diese Beobachtung nicht wiederholt werden [27]. Jedoch bestand bei beiden Analysen Unsicherheit darüber, in welchem Redoxzustand die Kristalle wirklich vorlagen. Die in Kapitel 7.3 vorgenommene EPR-Analyse an isotoopenmarkiertem DdH-Protein erlaubt zum ersten Mal einen Blick auf die Bindsituation der freien Bindestelle unter definierten Redoxbedingungen. Wie alle Zustände des katalytischen Zyklus zeichnet sich auch der H_{ox}-Zustand durch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff aus.

H_{red}-Zustand:

Die Bindung von Wasserstoff führt über weitere Zwischenstufen zum H_{red}-Zustand. Da es sich beim Übergang vom H_{ox}- zum H_{red}-Zustand wahrscheinlich ebenso wie bei den vorigen Elektronenübergängen um Ein-Elektronen-Übergänge handelt, liegt auch dieser Zustand, wie bereits der überoxidierte Zustand diamagnetisch vor und weist somit kein EPR-Signal auf. Im Gegensatz zum [4Fe4S]-Subcluster des H-Clusters, welches laut Mössbauer-Studien weiterhin oxidiert vorliegt, sind die beiden anderen [FeS]-Cluster in einem reduzierten Zustand vorhanden.

Das Potential des H_{red}-Zustands liegt bei -350 mV. Potentiale unter -500mV führen zur Zerstörung des zweikernigen Clusters.

H_{ox}-CO-Zustand:

Die Zugabe des Inhibitors CO im H_{ox}-Zustand führt zu diesem Zustand, bei dem die putative Substratbindestelle des distalen Eisenatoms durch das CO-Molekül besetzt ist. Hierbei findet kein Elektronenübergang statt, weshalb er nicht als weiterer Redoxzustand angesehen werden kann. Der Zustand kann sich im Laufe der Zeit durch den „Kannibalisierungseffekt“ in einer

Probe anreichern; Der Abbau eines kleinen Teils der Probe führt zur Freisetzung unter anderem der CO-Liganden des H-Clusters. Diese binden sich wiederum an die freie Bindestelle der H-Cluster intakter Moleküle und erzeugen so den H_{ox} -CO-Zustand.

Die für EPR-Messungen zugänglichen H_{ox} - und H_{ox} -CO-Zustände wurden wie in Kapitel 7.1 beschrieben eingestellt.

3 THEORETISCHER HINTERGRUND

3.1 Grundlagen der EPR-Spektroskopie

Die EPR- (elektronen-paramagnetische Resonanz) Spektroskopie erlaubt die Untersuchung paramagnetischer Substanzen, d.h. Verbindungen, welche ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen. Sie detektiert selektiv den Spinübergang des ungepaarten Elektrons in einem äußeren Magnetfeld.

Biologische Proben, welche ungepaarte Elektronen aufweisen und somit mit den Mitteln der EPR untersucht werden können, können Radikale sein, aber auch z.B. lichtinduzierte paramagnetische Anregungszustände, welche im Verlauf der Photosynthese oder anderer Reaktionen entstehen, bei denen Elektronen übertragen werden. Des Weiteren findet sich ein weites Anwendungsfeld für die Untersuchung von Molekülen, in welche Übergangsmetallionen inkorporiert sind, wie dies beispielsweise für die Enzymklasse der Hydrogenasen der Fall ist.

Durch das Einbringen organischer Radikalmoleküle (Spinsonden) können auch Proben untersucht werden, welche kein paramagnetisches Zentrum besitzen. Die EPR ist eine sehr selektive Methode, deren Limitierung auf paramagnetische Zentren zugleich die Ursache ihrer hohen Empfindlichkeit darstellt. Mit den Mitteln der EPR-Spektroskopie können nicht nur Informationen erhalten werden über die Art eines paramagnetischen Zentrums eines Moleküls, sondern auch über dessen Struktur, Dynamik und lokale Umgebung.

3.1.1 Physikalische Grundlagen

Ein freies, ungepaartes Elektron besitzt einen Eigendrehimpuls (Spin) S , welcher in der klassischen physikalischen Betrachtungsweise einer Rotation um die Elektronenachse entspricht. Mit dem Spin assoziiert ist ein magnetisches Moment μ_S , welches definiert ist als:

$$|\mu_S| = g_e \cdot \mu_B \cdot |S| \quad (3.1)$$

Hierbei ist μ_B das Bohrsche Magneton ($= 9,27 \cdot 10^{-24} \text{ J/T}$). Der g-Faktor (Landé-Faktor) ist für das freie Elektron eine Konstante mit dem Wert 2,00232.

In einem EPR-Experiment wird eine Probe mit einem ungepaarten Elektron in ein äußeres magnetisches Feld B_0 gebracht. Aufgrund der Spinquantenzahl $S = \frac{1}{2}$ des freien Elektrons sind quantenmechanisch zwei Spineinstellungen (ausgedrückt durch die Magnetquantenzahlen $m_s = +\frac{1}{2}$ und $m_s = -\frac{1}{2}$) und somit zwei Energiewerte erlaubt, die das Elektron einnehmen kann. Diese entsprechen einer parallelen und antiparallelen Orientierung in Bezug auf die Feldrichtung des angelegten Magnetfelds B_0 (siehe Abbildung 3.1).

Das magnetische Moment des Elektrons tritt in Wechselwirkung mit dem angelegten Magnetfeld, wobei die mittels der folgenden Formel beschriebene Wechselwirkungsenergie entsteht:

$$E = g_e \mu_B m_s B_0 \quad (3.2)$$

Aus der Formel wird ersichtlich, dass der Energieunterschied beider Zustände direkt von der Stärke des angelegten Magnetfeldes B_0 abhängt. Es ist ebenso erkennbar, dass bei ausgeschaltetem Magnetfeld beide Zustände energetisch gleich sind. In diesem Fall spricht man von entarteten Energieniveaus.

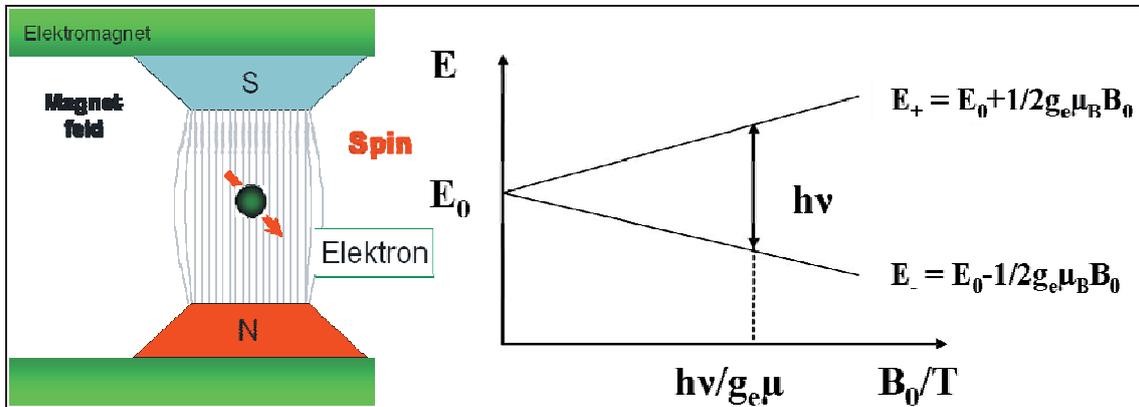


Abbildung 3.1: Zeeman-Aufspaltung im homogenen Magnetfeld

Die Aufspaltung in verschiedene Energieniveaus bei Anlegen eines äußeren homogenen Magnetfeldes wird nach ihrem Entdecker Pieter Zeeman als Zeeman-Effekt, die Kopplung von angelegtem Magnetfeld und magnetischem Moment des Elektrons entsprechend Elektron-Zeeman-Wechselwirkung genannt.

Bei der EPR handelt es sich um eine Resonanztechnik.

Das bedeutet, es kommt zum Übergang in ein anderes Energieniveau, wenn elektromagnetische Strahlung mit einer Frequenz ν eingestrahlt wird, welche genau der Energiedifferenz ΔE zwischen beiden Zustände entspricht.

Die Resonanzbedingung, bei der ein Übergang in das höhere Energieniveau stattfindet, lautet somit:

$$\Delta E = g \cdot \mu_B \cdot B_0 = h \cdot \nu \quad (3.3)$$

Eine typische, in der EPR-Spektroskopie verwendete Magnetfeldstärke ist 0,34 T (X-Band). Mit dem g -Wert des freien Elektrons $g = 2,00232$ und $\mu_B = 9,27 \cdot 10^{-24}$ J/T erhält man für die Resonanzfrequenz:

$$\nu = \frac{2,00232 \cdot (9 \cdot 10^{-24}) \cdot 0,34 \cdot g \cdot \mu_B \cdot B_0}{6,6 \cdot 10^{-34} \cdot h} \approx 9,27 \cdot 10^9 \text{ Hz} \approx 9,27 \text{ GHz}$$

Aus der Beispielrechnung wird ersichtlich, daß die in der EPR-Spektroskopie zur Induktion der Spinübergänge verwendete elektromagnetische Strahlung im Bereich der Mikrowellen liegt.

In Standard-EPR-Verfahren wird aus technischen Gründen meist die Frequenz der Mikrowellenstrahlung konstant gehalten und die Magnetfeldstärke verändert, die Resonanzbedingung wird „durchfahren“.

Im thermischen Gleichgewicht ist das Besetzungsverhältnis zwischen oberem und unterem Niveau durch die Boltzmann-Verteilung statistisch definiert:

$$\frac{n_{+1/2}}{n_{-1/2}} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} \quad (3.4)$$

(n = Besetzungszahl des Energieniveaus, k = Boltzmann-Konstante ($1,3805 \cdot 10^{-23}$ J/K), T = Temperatur)

Das Besetzungsverhältnis ist somit abhängig von der Temperatur und dem Energieunterschied beider Niveaus.

Bei Erfüllung der Resonanzbedingung findet somit eine Nettoabsorption statt.

Entscheidend für die Messung eines EPR-Spektrums mit Mikrowellenstrahlung konstanter Frequenz sind die Raten der Relaxation (z.B. Spin-Gitter- und Spin-Spin Relaxation), durch die der Spin wieder vom angeregten in den energetisch niedrigeren Energiezustand zurückfällt und die Rate der Anregung. Sind die Relaxationsprozesse zu langsam, kommt es zur sogenannten Sättigung.

Der g-Tensor

Wie bereits zuvor erwähnt, ist der g-Faktor (Landé-Faktor) für das freie Elektron eine Konstante und besitzt den Wert 2,00232. Ungepaarte Elektronen in einem Molekülsystem besitzen jedoch neben dem Spin auch einen Bahndrehimpuls, welcher ebenfalls zum magnetischen Gesamtmoment des Elektrons beiträgt. Die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Momenten wird als Spin-Bahn-Kopplung bezeichnet und kann zu einer lokalen Verstärkung oder Abschwächung des äußeren Magnetfeldes B_0 führen. Die Spin-Bahn-Kopplung bewirkt somit eine Veränderung von ΔE , was ausgedrückt wird durch g-Werte, welche vom g-Wert des freien Elektrons abweichen (siehe Gleichung 3.3).

Die Veränderungen sind dabei abhängig von der Orientierung des Magnetfeldes relativ zum molekularen Achsensystem, da der Bahndrehimpuls direkt von der Molekülstruktur abhängt. Darum wird der g-Wert als Tensor mit den Hauptwerten g_x , g_y und g_z im entsprechenden Molekülachsensystem betrachtet.

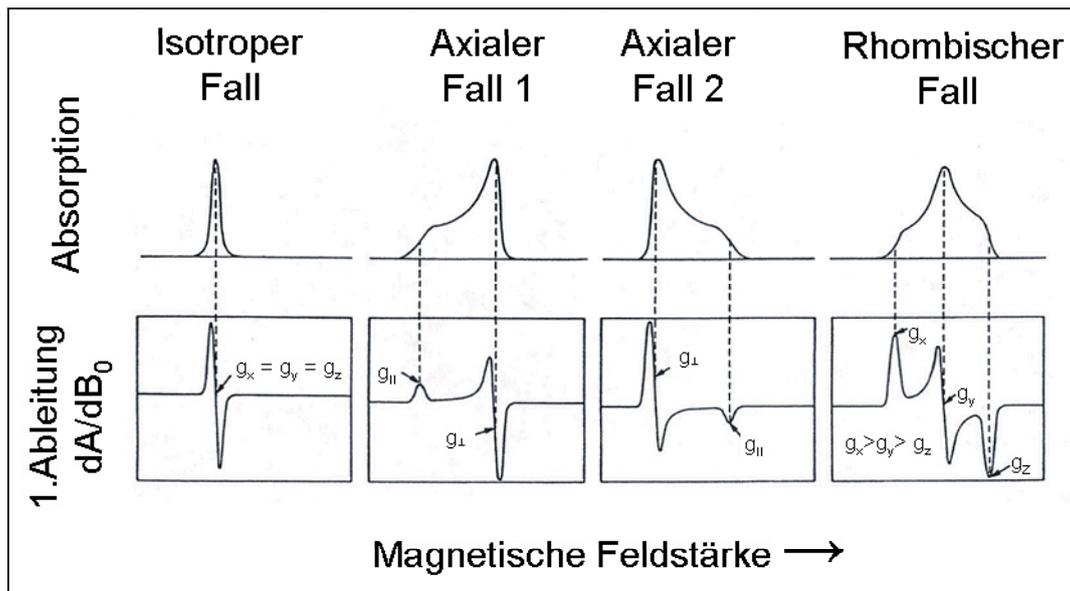


Abbildung 3.2: mögliche EPR-Spektrenformen eines Spin $\frac{1}{2}$ -Systems

In Abbildung 3.2 sind die grundsätzlich möglichen Spektrenformen gezeigt, welche sich hierdurch ergeben können.

In einem isotropen EPR-Spektrum ist $g_x = g_y = g_z$, so daß sich nur ein einziges, symmetrisches Absorptionssignal zeigt. In diesem Fall ist das magnetische Moment unabhängig von der Orientierung im angelegten Magnetfeld.

Ein Spektrum mit einem isotropen Signal entsteht auch bei Messung einer Probe in flüssiger Lösung, wenn die Moleküle sich in der Lösung schnell bewegen. In diesem Fall wird ein gemittelter g -Wert $g_{\text{iso}} = \frac{(g_x + g_y + g_z)}{3}$ gefunden.

In gefrorener Lösung, wenn $g_x = g_y < g_z$ ist, resultiert daraus ein axiales Spektrum mit einem kleinen Signal bei geringerer und einem größeren Signal bei höherer magnetischer Feldstärke (Fall 1).

Ein anderes axiales Spektrum wird beobachtet, wenn $g_x = g_y > g_z$, wobei hier das größere Signal bei niedrigerer Magnetisierung erhalten wird (Fall 2).

Wenn sich alle drei g -Werte von einander unterscheiden, wird das resultierende Spektrum als rhombisch bezeichnet.

Die Hyperfeinwechselwirkung

Neben der durch den g -Wert ausgedrückten Wechselwirkung von Elektronenspin und Bahndrehimpuls findet man auch Wechselwirkungen, welche auf der Interaktion mit den Kernen beruhen. Besitzen die Kerne einen Kernspin $I > 0$, unterliegen diese zum einen dem Kern-Zeeman-Effekt. Dieser ist analog dem Elektron-Zeeman-Effekt und führt zu einer Linienaufspaltung von $(2I + 1)$. Da das Kernmagneton μ_k bedeutend kleiner ist als das Bohrsche Magneton des Elektrons μ_B , sind die energetischen Differenzen der Niveaus ebenfalls wesentlich geringer. Darum ist dieser Effekt in der CW-EPR normalerweise nicht sichtbar.

Eine andere Art der Interaktion, welche zur weiteren Aufspaltung der Absorptionslinien führt, ist die Hyperfeinwechselwirkung. Diese ist die Wechselwirkung zwischen dem Elektronenspin und dem Kernspin. Sie setzt sich aus zwei verschiedenen Anteilen zusammen: Gibt es eine von Null verschiedene Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons am Kern,

führt dies zur isotropen Fermi-Kontakt-Wechselwirkung. Diese Voraussetzung ist in s-Orbitalen erfüllt.

Im Unterschied dazu gibt es einen anisotropen Anteil der Hyperfeinwechselwirkung, welcher als abstandsabhängige, dipolare Wechselwirkung von Elektronen- und Kernspin zu verstehen ist. Da hier, wie dies auch für den g-Wert der Fall ist, die Orientierungsabhängigkeit der dipolaren Wechselwirkung beachtet werden muß, ist dieser Anteil der Hyperfeinwechselwirkung ebenfalls als Tensor zu behandeln. Abbildung 3.3 zeigt das einfachste Beispiel einer Hyperfeinwechselwirkung in dem Term-Schema des Wasserstoffatoms H. Dieses besteht aus einem ungepaarten Elektron in einem 1s-Orbital und einem Proton. Es liegt ein Spinsystem $S = 1/2$, $I = 1/2$ vor.

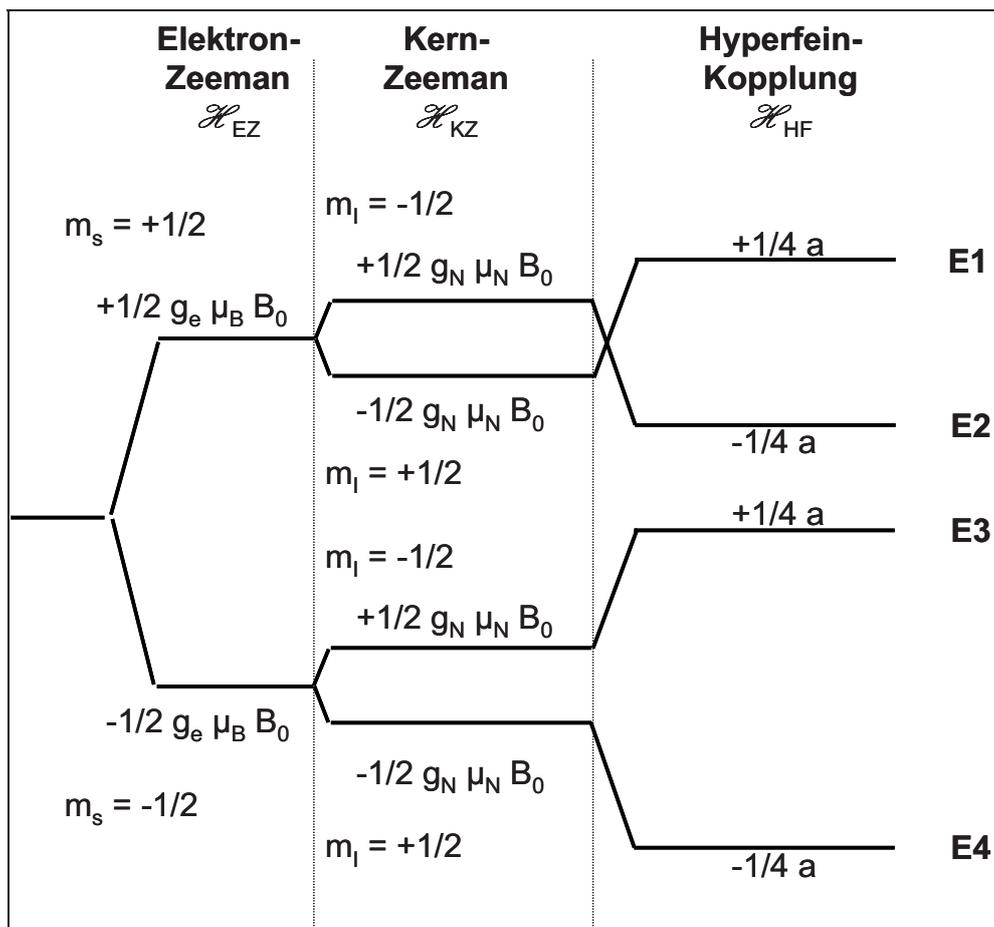


Abbildung 3.3: 4-Energieniveau-Schema eines Systems mit $S = 1/2$ und $I = 1/2$.

Bei Kernspins $I > 1/2$ kommt es zu weiteren Energieniveau-Aufspaltungen, welche zu komplizierteren Termschemata führen. Ebenso steigt die Anzahl der Aufspaltungslinien proportional mit der Zahl koppelnder Kerne.

Die unterschiedlichen molekularen Wechselwirkungen, welche einen Beitrag zum magnetischen Resonanzspektrum liefern, werden im Hamilton-Operator zusammengefaßt:

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

$$\mathcal{H} = \mu_e \vec{B}_0 \mathbf{g} \hat{S} - \mu_n \mathbf{g}_n \vec{B}_0 \hat{I} + A_{\text{iso.}} \hat{S} \hat{I} + \hat{S} \mathbf{A}_{\text{dip.}} \hat{I} \quad (3.5)$$

Der g -Tensor und die Hyperfeinaufspaltung stellen somit entscheidende Meßgrößen dar, deren Interpretation Informationen liefern über die Bindungssituation und Geometrie der zu untersuchenden Verbindung.

Wie aus Gleichung 3.5 ersichtlich, wird das EPR-Spektrum durch feldabhängige und feldunabhängige Terme bestimmt. Um die verschiedenen Terme zu trennen, wird die EPR bei verschiedenen Mikrowellenfrequenzen durchgeführt.

Der für EPR-Messungen genutzte Mikrowellenbereich wird in verschiedene Frequenzbereiche unterteilt, die mit Buchstaben bezeichnet sind. Die nachfolgende Tabelle 3.1 gibt die Benennung der einzelnen Frequenzfenster an. In dieser Arbeit wurden Messungen im X- und Q-Bandbereich sowie in einigen Fällen auch W-Bandbereich durchgeführt.

Tabelle 3.1: Frequenzbereiche der verschiedenen Messfenster („Bänder“) in der EPR-Spektroskopie

Mittelfrequenz/GHz	Band	Magnetfeld/T ($g = g_e$)
1	L	0,04
3	S	0,1
9	X	0,3
24	K	0,9
35	Q	1,3
94	W	3,4

Im Folgenden sollen die in Kapitel 7 dieser Arbeit zur Anwendung gebrachten Messverfahren kurz erläutert werden.

3.1.2 EPR- und mit EPR assoziierte Verfahren

Continuous Wave (CW)-EPR

Die CW-EPR misst die Übergänge magnetischer Energieniveaus in Systemen mit ungepaarten Elektronen. Diese werden induziert über die kontinuierliche Einstrahlung einer Mikrowelle konstanter Frequenz und Amplitude. Die Probe wird dazu in einen Mikrowellenresonator eingebracht und einem homogenen Magnetfeld ausgesetzt. Als Mikrowellen-Strahlungsquelle wird z.B. ein Klystron eingesetzt, die Strahlung wird über Hohlleiter in den Resonator geführt.

Innerhalb des Resonators wird eine stehende Welle erzeugt. Entsprechend der Resonatorbauweise entstehen räumliche Bereiche mit maximalen magnetischen und minimalen elektrischen Feldern. Die zu untersuchende Probe ist in diesen Bereichen zu platzieren. Wenn die EPR-Resonanzbedingung erfüllt ist, führt dies zu einer Absorption von eingestrahelter Mikrowellenleistung. Diese Absorption in Abhängigkeit vom äußeren Magnetfeld B_0 ergibt ein EPR-Spektrum.

Ferner wird ein magnetisches Modulationsfeld mit einer Frequenz von bis zu 100 kHz erzeugt, welches das Magnetfeld sinusförmig moduliert. Infolge der zusätzlichen Modulation wird ein besseres Signal-/Rauschverhältnis erreicht.

Gepulste EPR-Verfahren

Bei gepulsten Verfahren wird die Mikrowellenstrahlung nicht kontinuierlich, sondern in Form von Impulsen in die Probe eingestrahlt.

Das Spinsystem wird durch einen oder mehrere Mikrowellenimpulse angeregt. Hierdurch können zwei Arten von Signalen erhalten werden. Zum einen kommt es zum sogenannten freien Induktions-Zerfall. Da der freie Induktions-Zerfall in den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen jedoch keine Rolle spielt, soll auf ihn an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Im zweiten Fall wird ein sogenanntes Spinecho erzeugt. Zur Erzeugung eines Echos ist im einfachsten Fall des Hahn-Echos die Anwendung einer 2-Puls-Sequenz erforderlich, wie in Abbildung 3.4 gezeigt.

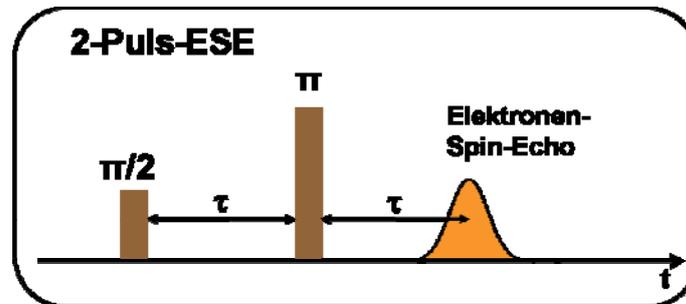


Abbildung 3.4: Puls-Schema eines 2-Puls-ESE (Hahn-Echo)-Experiments

Der Effekt der gezeigten Mikrowellenpulsfolge auf das Spinsystem ist in Abbildung 3.5 verdeutlicht. Durch den ersten Puls wird die makroskopische z-Magnetisierung um 90° in die xy-Ebene gedreht (Abbildung 3.5 A). Nach einer Evolutionszeit τ , in der die einzelnen Spins mit unterschiedlichen Larmor-Frequenzen in der xy-Ebene präzedieren, wird die

Magnetisierung durch einen 180° -(π)-Puls invertiert und so um die xz-Ebene gespiegelt (Abbildung 3.5 B). Aufgrund der Invertierung wandern die Spins in entgegengesetzter Richtung weiter. Das heißt, die schnellen Spins müssen eine längere Strecke zurücklegen als die langsamen, so daß sie nach einer weiteren Evolutionszeit τ refokussieren (Abbildungen 3.5 C und D). Die Refokussierung führt dazu, daß nach der Zeit 2τ derselbe Informationsgehalt wie nach dem ersten Puls in Form des sogenannten Spin-Echos gemessen werden kann.

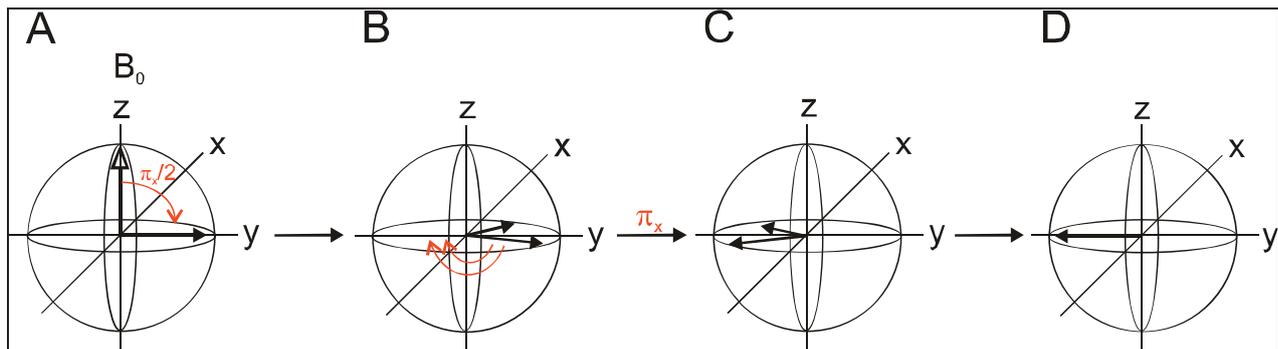


Abbildung 3.5: Auslenkung der Magnetisierung während einer 2-Puls-ESE-Sequenz

Ausgehend von diesem einfachsten Echo-Experiment wurde eine Reihe von gepulsten EPR-Verfahren entwickelt, welche sich durch ihre Impuls-Sequenzen unterscheiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren sollen kurz genannt werden.

ENDOR

Als ENDOR (engl.: „electron nuclear double resonance“) wird eine Messmethode bezeichnet, welche neben der mikrowellenbasierten EPR auch die NMR, also die Anregung von Kernspins mittels Radiowellen nutzt [72]. Im ENDOR-Experiment werden die induzierten Kernspinübergänge mittels der Absorptionsänderung der Elektronenspinübergänge detektiert. Hierbei wird ausgenutzt, daß die Kernspins nur jeweils einzeln mit dem Elektronenspin koppeln, so daß die Linienzahl nur additiv ansteigt (in der EPR multiplikativ), und man daher mit der ENDOR-Methode Spektren geringerer Liniendichte erhält, die es meist erlauben, alle Hyperfeinkopplungen aufzulösen. ENDOR verbindet dabei die hohe Auflösung der NMR- mit der großen Empfindlichkeit der EPR-Spektroskopie.

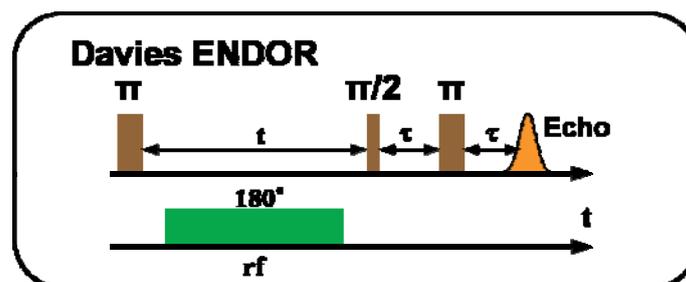


Abbildung 3.6: Pulsschema bei Davies-ENDOR-Messungen

In Abbildung 3.6 ist die Pulsfolge der Davies-ENDOR-Methode dargestellt, welche auch in Kapitel 7 Anwendung findet. In diesem Experiment wird zuerst ein Mikrowellenimpuls eingestrahlt, welcher eine Auslenkung um 180° bewirkt, gefolgt von einem in Resonanz zu einem der NMR-Übergänge liegendem RF-(Radiofrequenz)-Impuls. Hierdurch werden letztlich Intensitätsänderungen im Elektronenspinecho herbeigeführt, was Rückschlüsse auf die Kopplungen der magnetischen Momente der Elektronen mit den magnetischen Momenten benachbarter Kernspins erlaubt.

ESEEM

ESEEM (engl.: „electron spin echo envelope modulation“) ist eine weitere Methode, mit der Hyperfein-Wechselwirkungen geringer Intensität zwischen Elektronenspins und benachbarten Kernen gemessen werden können. Bei einem ESEEM-Experiment werden sowohl die Frequenz der Mikrowellenpulse als auch das magnetische Feld B_0 konstant gehalten.

Die Pulsfolge ist in Abbildung 3.7 zu sehen. Hierbei wird die Zeit τ zwischen dem ersten und dem zweiten Impuls konstant gehalten und die Zeit t zwischen dem zweiten und dritten Impuls schrittweise verlängert (inkrementiert), wodurch Modulationen des Echos ausgelöst werden können. Diese basieren auf Hyperfeinwechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit paramagnetischen Kernen $I > 1/2$. Die zeitabhängige Modulation des entstehenden Echos wird über eine Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgerechnet.

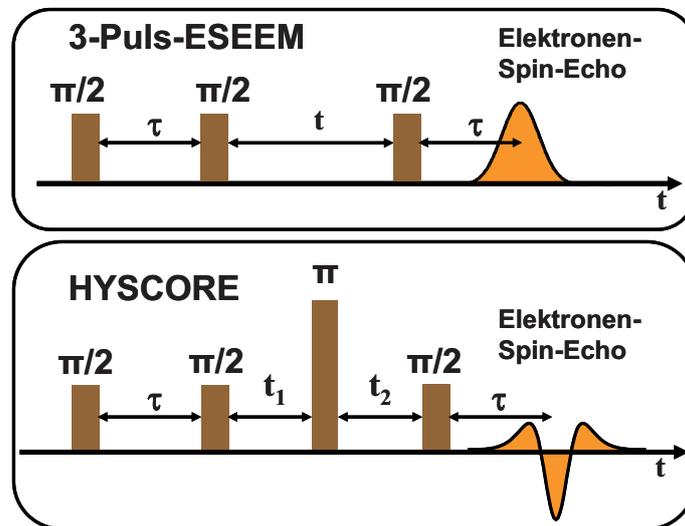


Abbildung 3.7: Pulsschema bei 3-Puls-ESEEM- und HYSORE-Messungen

HYSORE

HYSORE (engl.: „hyperfine sublevel correlation“) ist ein Verfahren, welches sich aus dem 3-Impuls-ESEEM-Verfahren ableitet. Im Unterschied zu diesem ist zwischen dem zweiten und dritten $\pi/2$ -Puls ein zusätzlicher π -Puls eingefügt (siehe Abbildung 3.7). Dieser wird Kohärenztransferimpuls genannt. Hierdurch ist es möglich, Kernspin-Elektronenspin-Wechselwirkungen für die beiden Magnetfeldorientierungen des Elektrons zu detektieren.

Die Zeiten t_1 und t_2 werden dabei inkrementiert. Nach einer doppelten Fourier-Transformation erhält man die Modulation des stimulierten Echos in einem zweidimensionalen Spektrum mit zwei Frequenzachsen.

Für einen tiefer gehenden Einblick in die EPR und weitere Messmethoden sei auf die Lehrbücher der Spektroskopie [72-77, 148] verwiesen.

3.2 Grundlagen der Elektrochemie

Die Elektrochemie erlaubt es, Reaktionen, bei denen Ladungen übertragen werden, in einer Lösung mittels einer Elektrodenanordnung zu untersuchen. So ist es mit dieser Technik möglich, über das Anlegen einer Spannung Elektronenübergänge redoxaktiver Proteine zu induzieren und die Potential- und Zeitabhängigkeit dieser Vorgänge zu messen. Hierbei finden an der Anode Oxidationsprozesse statt, während die Kathode Ort der Reduktion ist. Die Kombination der Raten beider Teilschritte erlaubt beispielsweise Aussagen über die spontane Reaktionsrichtung einer zu untersuchenden katalytischen Reaktion. Die Elektroden sind in einer elektrochemischen Zelle angeordnet, welche die Meßkammer darstellt. Das zwischen den Elektroden vorhandene Potential E berechnet sich dabei nach der Nernst-Gleichung:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} * \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (3.6)$$

(E : Elektrodenpotential; E^0 : Standard-Elektrodenpotential; R : allgemeine Gaskonstante, 8,314 J/mol * K; Temperatur (Kelvin); n : Anzahl der übertragenen Elektronen; F : Faraday-Konstante, 96500 C)

Das Potential ist somit unter anderem abhängig davon, welche Anteile redoxaktiver Substanzen oxidiert, und welche reduziert vorliegen.

In biologischen Molekülen spielen Redoxprozesse eine herausragende Rolle. Diese haben in vielen Fällen Konformationsänderungen, Umlagerungen oder Bindungsreaktionen zur Folge. Im Falle enzymatisch aktiver Proteine stellen sie somit oft die eigentlichen Teilschritte des katalytischen Zyklus' dar.

Das DdH-Enzym weist mit dem H-Cluster ein zweikerniges eisenhaltiges Zentrum auf, das im Zuge der H_2 -Spaltung verschiedene Redox-Zustände durchläuft. Die bisher bekannten Einzelheiten dieses Prozesses sind in Kapitel 2.4 beschrieben.

Eine große Herausforderung bei der Messung biologischer, redoxaktiver Moleküle mit Hilfe der Elektrochemie besteht darin, den Elektronentransfer zu gewährleisten. Hierzu kann entweder mit Mediatoren gearbeitet werden oder die Proteine werden direkt auf der Oberfläche der Elektroden immobilisiert.

Zyklovoltammetrie in Lösung

In der Zyklovoltammetrie wird an eine Drei-Elektrodenanordnung mittels eines Potentiostaten eine Dreiecksspannung $E(t)$ angelegt (siehe Abbildung 3.8).

Durch diese Anordnung wird es möglich, Strom nicht mehr direkt als Funktion der Zeit, sondern als Funktion der zeitabhängigen Spannungsänderung zu messen [78, 79].

Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass neben Informationen bezüglich der Thermodynamik auch Informationen über die Kinetik eines Redoxvorgangs erhalten werden können.

Der grundsätzliche apparative Aufbau in der Zyklovoltammetrie sieht wie folgt aus:

Die Elektrode, an der die elektrochemische Reaktion abläuft, wird Meß- oder Arbeitselektrode genannt.

Die im elektrochemischen Versuchsteil dieser Arbeit beschriebenen Versuche sind mit einer Graphitelektrode durchgeführt worden. Neben der Verwendung dieses Materials sind auch Platinelektroden und Goldelektroden in Gebrauch.

Eine zweite, Referenzelektrode genannte Elektrode dient als Nullpunkt für die Messungen, da ein Potential nur relativ zu einem Bezugspotential gemessen werden kann. Im verwendeten Versuchsaufbau war dies eine Kalomelektrode. Auch Silber/Silberchloridelektroden finden hierfür Verwendung. Die Referenzelektrode besitzt einen hohen Eingangswiderstand und bleibt deshalb stromlos.

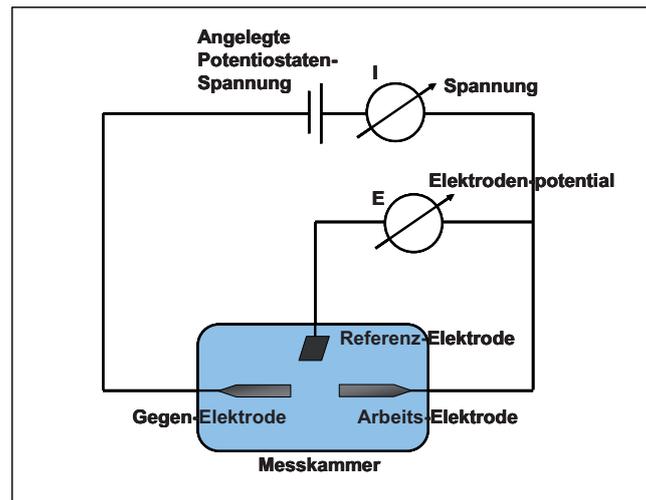


Abbildung 3.8: Schaltdiagramm einer 3-Elektrodenanordnung mit Potentiostaten

Als Gegenelektrode werden oft, wie auch in den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen, Platinelektroden verwendet. Ein wichtiges Kriterium für die Wahl der Gegenelektrode ist, daß die untersuchten elektrochemischen Vorgänge keine Ratenabhängigkeit von den Ladungsübertragungen an der Gegenelektrode zeigen, also die Reaktion stets frei von Auslenkungen durch die Gegenelektrode verläuft.

Zu Beginn des Experiments wird an die Arbeitselektrode ein Startpotential angelegt, welches mit konstanter Rate erhöht wird, bis ein maximaler Spannungswert entsteht, welcher sich im Zyklovoltammogramm als Peak ausdrückt. Das zu diesem Zeitpunkt der Messung erreichte Potential (Umkehrpotential) wird nach Überschreiten des Peaks mit gleicher zeitlicher Rate auf den ursprünglichen Wert zurückgeführt. Die aufgezeichneten Peaks geben die Spannungswerte an, bei denen ein Maximum an oxidiertem (positiver Peak) bzw. reduzierter (negativer Peak) Probe in Elektrodennähe auftritt. In Abbildung 3.9 ist ein typisches Zyklovoltammogramm abgebildet:

Das Potential zu Beginn der Messung liegt unter dem Standardpotential der Redox-Reaktion, so daß lediglich ein kapazitiver Strom fließen kann. Im Laufe der Potentialerhöhung beginnt die Oxidation von Probenmolekülen in direkter Nähe zur Elektrode, was wiederum als Stromfluß gemessen wird. Durch die weitere, fortschreitende Erhöhung des Potentials beschleunigt sich die Oxidation weiter. Nach Übersteigen des Standardpotentialwerts ist kaum noch reduzierte Probe im Bereich der Elektrode vorhanden, so dass die Diffusion reduzierter Probe aus der Lösung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Erreicht der Massetransport reduzierter Probe aus der Lösung sein Maximum, wird der Peak erreicht. Danach tritt ein Verarmungseffekt ein, der im Voltammogramm als Absenkung des

gemessenen Stroms zu sehen ist. Die Potentialumkehr findet zu einem Zeitpunkt statt, bei dem ein Großteil der in der Nähe der Elektrode befindlichen Probe oxidiert vorliegt. Entsprechend der Oxidation tritt nun die Reduktion der Probe ein, sobald das Standardpotential der Reaktion erreicht wird. Auch hier tritt ein Peak auf, bei dem der Stromfluß, nun mit negativem Vorzeichen, maximal wird und durch die Diffusionsrate zur Elektrode begrenzt ist. Vollständig reversible Prozesse weisen zwei Peaks gleicher Höhe mit verschiedenen Vorzeichen auf. Nach Durchlauf des die größtmögliche Reduktion widerspiegelnden zweiten Peaks wird die Stromkurve des Voltammogramms bei Rückführung des Potentials auf seinen Ursprungswert ebenso wieder auf ihren Ausgangswert zurückkehren, so daß ein gesamter Zyklus durchfahren ist.

Die wichtigsten Messgrößen sind die maximalen und minimalen Peakspannungen $E_{\max, \min}$ sowie die bei diesen Peaks auftretenden Ströme ($i_{\max, \min}$).

Die Randles-Ševčík-Gleichung verknüpft die gemessenen Ströme mit der Probenkonzentration C und den Parametern der Messung, wie der Größe der Elektrodenoberfläche A und dem Diffusionskoeffizienten D des zu untersuchenden Proteins:

$$I_p = 0,446nFA \left[\frac{nF}{RT} \right]^{1/2} v^{1/2} D^{1/2} C$$

Weitere in die Formel eingehende Größen sind die Vorschubgeschwindigkeit v , Temperatur T in Kelvin, die allgemeine Gaskonstante R und die Faraday-Konstante F sowie die Anzahl der übertragenen Elektronen n .

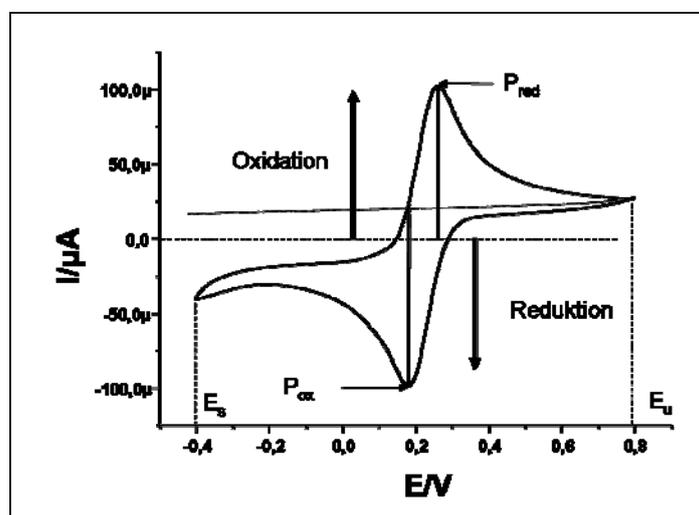


Abbildung 3.9: Idealisiertes Zyklovoltammogramm

Zyklovoltammetrie an immobilisierten redoxaktiven Proteinen

Im Falle von an die Elektrode in Form eines Films gekoppelt gebundenem Probenmaterial, wie dies für die in dieser Arbeit vorgestellten elektrochemischen Ergebnisse erreicht wurde, finden keine Diffusionsprozesse mehr statt. Stattdessen ergeben sich die Peaks direkt aus der vollständigen Oxidation bzw. Reduktion der Probe und in dessen Folge der Abnahme des

Stroms. Aus diesem Grund spricht man auch von direkter Elektrochemie. Das entsprechende Voltammogramm (Abbildung 3.10) zeigt demnach einen im Vergleich zu Voltammogrammen an Proben in Lösung vereinfachten Verlauf. Neben einer geringeren benötigten Probenmenge, welche lediglich ausreichen muß, um auf der Elektrodenoberfläche eine monomere Schicht bilden zu können, vereinfacht sich somit bei diesen Messungen auch die Interpretation der Messwerte, da keine Diffusionskonstanten berücksichtigt werden müssen.

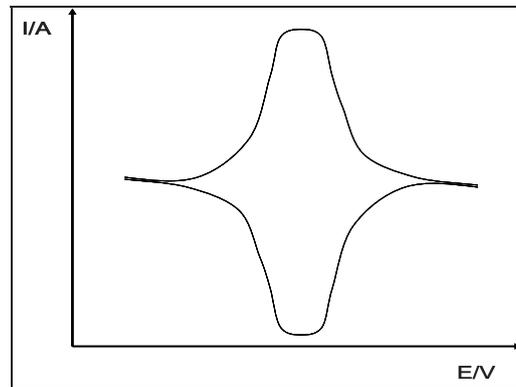


Abbildung 3.10: Zyklovoltammogramm mit an die Elektrode gebundener Probe. Das genaue Aussehen des Voltammogramms hängt von verschiedenen Parametern wie der Art und Größe der Elektrode, der Probenkonzentration, Temperatur und anderen Faktoren ab.

Darüber hinaus ist es vorteilhaft, daß die experimentellen Bedingungen wie pH-Wert und Temperatur problemlos geändert werden können, während bei Messungen in Lösung zuerst umgepuffert werden müßte. Auch kann durch das Messen mehrerer Zyklen nacheinander überprüft werden, ob der jeweils vorausgehende Messzyklus einen Teil der Probe irreversibel geschädigt hat, was bei einer diffusionskontrollierten Interaktion mit der Elektrode nicht möglich ist. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Immobilisierung selbst den kritischen Schritt für eine erfolgreiche Messung darstellt. So müssen die Proteine auf der Oberfläche so ausgerichtet sein, dass die Elektronenübertragung möglich ist. Dafür ist es essentiell, für die Kopplung ein Kopplungsagens auszuwählen, dass den Ladungszuständen auf der Oberfläche des zu untersuchenden Proteins Rechnung trägt. Die elektrochemischen Messungen, welche in Kapitel acht vorgestellt werden, wurden ausnahmslos an einer immobilisierten Proteinschicht durchgeführt, welche mittels 4-Nitro-Benzen-Diazoniumsalz als Kopplungsagens gebildet wurde. Die Kopplungsreaktion ist im Einleitungsteil von Kapitel 8 erläutert. Im Unterschied zur Messung in Lösung oder auch zur Bildung eines Proteinfilms an die Elektrode über Adsorption (engl.: „dipping method“) sind die Proteinmoleküle im Idealfall in identischer Orientierung zur Elektrode ausgerichtet. Die Vorteile liegen in einer optimalen Elektronenübertragung zwischen Protein und Elektrodenoberfläche, was zu höheren Messströmen und damit zu einer höheren Empfindlichkeit der Messung führt. Auch die erhöhte Filmstabilität ist ein entscheidender Vorteil dieser Methode, da dadurch längere Messungen durchgeführt werden können. Speziell für die Messung langsamer Redoxvorgänge bzw. Messungen, welche die Aufnahme vieler Messpunkte erfordern, ist dies essentiell. Für einen tieferen Einblick in die Elektrochemie sei auf die Lehrbücher [61, 63, 134] verwiesen.

3.3 Grundlagen der Proteinkristallisation

Grundvoraussetzung für das Verständnis der Funktionsweise eines Enzyms ist die Kenntnis seiner dreidimensionalen Struktur. Abgesehen von den Techniken der Elektronenmikroskopie und der NMR-Spektroskopie stellt die Röntgenstrukturanalyse die einzige Methode dar, die Struktur eines Proteins aufzulösen. Bei der Röntgenstrukturanalyse wird eine Probe mit Röntgenstrahlung definierter Wellenlänge bestrahlt. Der größte Teil der Röntgenstrahlung passiert dabei die Probe ohne Richtungsänderung. Ein Teil der Strahlung wird jedoch von den Elektronen gebeugt (Röntgenbeugung). Um aus der Beugung eine dreidimensionale molekulare Struktur errechnen zu können, müssen die einzelnen Moleküle einer Probe in einer exakt regelmäßigen Anordnung zueinander ausgerichtet sein. Dies ist der Fall in einer kristallinen Struktur. In einer solchen Anordnung kommt es zur Interferenz der Strahlung, welche wiederum von der Gitterstruktur des Proteinkristalls abhängt, was zu einem charakteristischen Beugungsmuster führt. Über die Anwendung mathematischer Algorithmen wie der Fourier-Transformation ist es dann letztlich möglich, eine Elektronendichtekarte und damit eine dreidimensionale Struktur der Probe zu erhalten [16].

Prinzip der Proteinkristallisation

Ziel der Kristallisation ist es, möglichst große, perfekt aufgebaute einzelne Kristalle (Einkristalle) zu erhalten. Das Grundprinzip, um Biomoleküle zur Kristallisation zu bringen, besteht darin, daß mittels eines Fällungsmittels das Protein aus einer übersättigten Lösung verdrängt wird. Typischerweise verwendete Fällungsmittel sind z.B. Salze wie Ammoniumsulfat und Natriumcitrat, sowie organische Verbindungen wie Polyethylenglycol oder Alkohole. Die Übersättigung tritt z. B. durch die fortschreitende Diffusion von Flüssigkeit aus dem Ansatz über einen längeren Zeitraum ein (Dampfdiffusionsmethode). Grundsätzlich sind die Kristallisationsbedingungen eines Proteins nur in sehr beschränktem Maße voraussagbar und müssen somit für jedes Protein experimentell bestimmt werden. Hierbei kommen sogenannte „Screenings“ zur Anwendung, bei denen ganze Reihen von Ansätzen angelegt werden. In diesen Testreihen werden von Ansatz zu Ansatz einzelne Parameter wie Art und Konzentration der Salze und der pH-Wert sukzessive verändert. Auch die Temperatur stellt einen wichtigen Parameter dar, der „gescreent“ werden kann. Sobald Bedingungen gefunden werden, unter denen die Kristallisation der Probe eintritt, können die Parameter weiter verfeinert werden, bis ein optimales Ergebnis erreicht ist.

Kristallisation im „sitzenden Tropfen“

Die im Versuchsteil von Kapitel 9 beschriebenen Kristalle von DdH wurden durch Ansätze im „sitzenden Tropfen“ erhalten. Hierzu wird die Proben-Lösung, welche möglichst reines Protein in definierter Konzentration in einem definierten Puffer enthält, oberhalb einer Reservoir-Lösung in eine abgeschlossene Kammer pipettiert. Wichtig ist, daß die Kammer vollständig, z.B. mit Schliff-Fett, versiegelt wird, so dass sich ein Konzentrationsgradient zwischen beiden Flüssigkeiten einstellen kann und Flüssigkeit aus der Proben-Lösung in die Gasphase der Kammer diffundiert (Abb.3.11a). Die Diffusion erhöht die Konzentration von Probe und Fällungsmittel im Tropfen, was, bei Wahl der richtigen Bedingungen, zur Bildung von Kristallen führt.

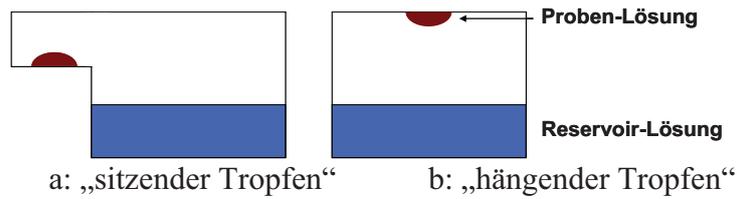


Abbildung 3.11: Kristallisation mittels Dampfdiffusion

Eine ähnliche, ebenfalls oft verwendete Anordnung, bei der die Proteinlösung jedoch auf der Unterseite eines Deckgläschens über der Reservoirlösung hängt, wird „hängender Tropfen“ genannt (Abb.3.11b).

Für eine detailliertere Beschreibung der verschiedenen Techniken zur Proteinkristallisation und der Röntgenstrukturanalyse sei an dieser Stelle auf verschiedene Fachbücher [48, 86-89] verwiesen.

4 VERWENDETE MATERIALIEN

4.1 Pufferlösungen

Puffermedien für die Anzucht von *Desulfovibrio desulfuricans*

Die gelisteten drei Teilpuffer-Lösungen müssen separat autoklaviert werden, um die Ausfällung einiger Komponenten zu verhindern. Nach dem Autoklaviervorgang und dem Abkühlen auf ca. 35 °C können die drei Lösungen steril vereinigt werden. Beim Autoklavieren von Lösung I kann ein weißer Niederschlag am Gefäßboden auftreten. Dieser löst sich beim Zusammengeben aller drei Lösungen.

Vollmedium für *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC-Medium [80]):

Für 1 Liter:

<u>Lösung I</u>	<u>Konzentration</u>		<u>Einwaage</u>
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	8	mM	2,0g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ • 2 H ₂ O	17	mM	5,0g
CaSO ₄ • 2 H ₂ O	5,8	mM	1,0g
NH ₄ Cl	18,7	mM	1,0g
H ₂ O dest.	ad	400 ml	

<u>Lösung II</u>	<u>Konzentration</u>		<u>Einwaage</u>
K ₂ HPO ₄ , wasserfrei	2,8	mM	0,5g
H ₂ O dest.	ad	200 ml	

<u>Lösung III</u>	<u>Konzentration</u>		<u>Einwaage</u>
L-Laktat, Natriumsalz, 50%	---		7,0g
Yeast Extrakt	---		1,0g
H ₂ O dest.	ad	400 ml	

Alle Teilmedien wurden mittels einer 1M oder 2M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Schwefelmangelmedium für *Desulfovibrio desulfuricans*:

(Sulfatmenge eingestellt auf 0,68 g/l Gesamtmedium)

Für 1 Liter:

<u>Lösung I</u>	<u>Konzentration</u>		<u>Einwaage</u>
MgCl ₂	8	mM	1,6g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	17	mM	5,0g
CaCl ₂	5,8	mM	0,66g
NH ₄ Cl	18,7	mM	1,0g
H ₂ O dest.	ad	400 ml	
pH 7,5			

<u>Lösung II</u>	<u>Konzentration</u>		<u>Einwaage</u>
K ₂ HPO ₄	2,8	mM	2,5g
H ₂ O dest.	ad	200 ml	
pH 7,5			

<u>Lösung III</u>	<u>Konzentration</u>		<u>Einwaage</u>
Na-Laktat 100%	---		3,5g
Yeast Extrakt	---		1,0g
H ₂ O dest.	ad	400 ml	
pH 7,5			

Die im Vergleich zum Vollmedium durch Chloridsalze ersetzten Komponenten sind textlich hervorgehoben.

Da dem Medium im letzten Präparations-Schritt Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ hinzugesetzt wird, entspricht die Endkonzentration an Sulfat im Schwefel-reduzierten Medium 0,68g pro Liter.

Medium (500 ml) zur Lagerung

Einwaagen:	<u>500ml</u>	<u>250ml</u>
• KH_2PO_4	0,25g	0,125g
• NH_4Cl	0,25g	0,125g
• $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,65g	0,325g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1g	0,5g
• Na-Lactat 60%	2g	1g
• Yeast	0,5g	0,25g
• Ascorbinsäure Na-Salz	0,05g	0,025g
• $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25g	0,125g
• Thioglyconat	0,05g	0,025g

Durchführung:

Die Chemikalien wurden nacheinander in dieser Reihenfolge eingewogen.

Vor der Zugabe des Thioglyconats wurden die anderen Chemikalien in 400 ml dest. Wasser gelöst. Der pH-Wert liegt bei ca. 5,2.

Danach erfolgte die Zugabe des Thioglyconats, worauf der pH-Wert auf ca. 4,4 absank. Der pH-Wert wurde mit HCl auf ca. 7,5 eingestellt (Medium verfärbte sich dunkel-violett).

Nach 20 Minuten Wartezeit mußte gegebenenfalls nachgestellt werden.

Puffer und Lösungen für die hydrographischen Messungen

Benzylviologen	200	mM	Benzylviologen in H_2O
Natriumdithionit	930	mM	Na-Dithionit in 50 mM Tris, pH 8,0
Elektrodenlösung	3	M	Kaliumchlorid in H_2O
Mess-Puffer	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0

Puffer und Lösungen für die chromatographische Präparation

Laufpuffer Säule I (IEX):

Niedrigsalzpuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 50 mM NaCl
Hochsalzpuffer: 1 M NaCl

Laufpuffer Säule II (SE):

Laufpuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,6

Laufpuffer Säule III (IEX):

Niedrigsalzpuffer: 25 mM K-Phosphat, pH 7,6
Hochsalzpuffer: 300 mM K-Phosphat, pH 7,6

Finaler Probenpuffer: 50 mM Tris, pH 7,6
(Lagerung, Messung)

Puffer für die SDS-Gel-Elektrophorese

Laufpuffer:
10 mM Tris/HCl, pH 8
1 mM Na₂-EDTA
2,5% SDS (w/v)
0,01% Bromphenolblau (w/v)
5% 2-Mercaptoethanol
1M Harnstoff

Färbelösung:
20% Methanol
20% Roti-Blue 5x konz. oder PhastBlue R

Entfärbelösung: 25% Methanol

Konservierungslösung:
10% Glycerin
20% Ethanol

Ad quo H₂O dest.

4.2 Verwendete Laborgeräte

Für die Elektrochemischen Messungen

Potentiostat/Galvanostat	Princeton Applied 283 (USA)
Potentiostat	Princeton Applied Versastat 4 400 (USA)
Kalomel(SCE)-Elektrode	Radiometer Analytical (France)
Arbeits-Elektrode (HOPG), 2mm Ø	Werkstätten MPI BAC, Mülheim
Gegen-Elektrode (Platin)	Werkstätten MPI BAC, Mülheim

Für die EPR-spektroskopischen Messungen

X-Band-Spektrometer Resonator	Bruker ELEXSYS E-500 ER 4116 DM
X-Band-Spektrometer Mikrowellen-Brücke Helium-Fluß-Kryostat Resonator Verstärker	Bruker ELEXSYS E-580 SuperX-FT Oxford CF935 Bruker EN 4118X-MD4, dielektrisch Applied Systems Engineering 1 kW TWT (117x)
Q-Band-Spektrometer Mikrowellen-Brücke Resonator Verstärker Tiefpass-Filter	Bruker ELEXSYS E-580 SuperQ-FT TE ₀₁₁ (Eigenbau, ähnlich [29]) Amplifier Research AR 2500L Trilithic H4LE35-3-AA-R
X/W-Band-Spektrometer	Bruker ELEXSYS E-580

Allgemeine Laborgerätschaften

Anaerob-Box (Glove-Box)	Töpfer, Göppingen
Autoklav	Holzner Prorit 2200, Nußloch
UV/VIS-Spektrometer	ATI Unicam UV 2-30, Cambridge, (UK)
Elektrophorese-Gerät	Pharmacia Phast System, GE Healthcare, Freiburg

4 Verwendete Materialien

Feinanalysewaage	Sartorius MC5, Göttingen
FPLC Äkta Basic	Mettler Toledo XS 205, Greifensee (CH)
Glasfermenter, 10l	Amersham Bioscience, Freiburg
Hydrograph	Scilabware 1515/18D, Stone, Staffordshire (UK)
Kühlzentrifuge Avanti J20XP	Werkstätten MPI BAC, Mülheim
Laborspülmaschine	Beckman, München
Laminiergerät	Miele, Gütersloh
MALDI-TOF-Massenspektrometer	ID/4, Attalus, Athen (GR)
Mikrowellenherd	Voyager DE Pro Workstation,
pH-Meter	Applied Biosystems, Darmstadt
pH-Steuer-Einheit	Siemens HF 22524, München
Schlauchpumpe	Knick pH 766 Calimatic, Berlin
Schlauchpumpe	Hannah Inst.HI 9321, Woonsocket (US)
Thermostat	Werkstätten MPI BAC, Mülheim
Tischautoklav	Pharmacia Biotech Pump P-1, Freiburg
Ultraschallbad	Watson Marlow 505S, Rommerskirchen
Wasseraufbereitungsanlage „MilliQ“	Lauda Königshofen RML6
Wasserbad	Certoclav CV EL 18, Traun (A)
	Bandelin Sonorex RK 106, Berlin
	Millipore, Bedford (US)
	Lauda ecoline 01, Königshofen

Gase

Argon	4.0
Wasserstoff	5.0
Formiergasmischung	(95% N ₂ , 5% H ₂)
Formiergasmischung	(97% N ₂ , 3% H ₂)
Kohlenmonoxid	4.7
Stickstoff	4.0

Alle verwendeten Gase, welche für den Betrieb der Anaerob-Zelte und die Einstellung der Redoxzustände aller gemessenen Proben genutzt wurden sowie die für die elektrochemischen Messungen benötigten Gase wurden von Air Liquide, Krefeld bezogen.

Die für die Kristallisation benutzten Pufferbedingungen, Kits und Materialien sind in Kapitel 9 und in Anhang 1 beschrieben.

Alle anderen, hier nicht gesondert aufgeführten Gerätschaften und Materialien entsprechen dem Standard allgemeiner Laborausrüstung.

5 KULTIVIERUNG VON *DESULFOVIBRIO* *DESULFURICANS* ATCC 7757

Bei dem in dieser Arbeit zur Gewinnung des Hydrogenase-Enzyms herangezogenen Organismus handelt es sich, wie in Kapitel 1.3 ausgeführt, um ein anaerobes Bakterium aus der Ordnung der *Desulfovibrionales*. Bei der Anzucht dieses Bakteriums mussten deshalb eine Reihe von Vorkehrungen getroffen werden, um ein sicheres Arbeiten zu gewährleisten und eine optimale Expression des Enzyms zu erhalten.

Im vorliegenden Kapitel werden die grundlegenden, zur Handhabung von *D. desulfuricans* erforderlichen Arbeitsabläufe geschildert sowie im speziellen die Anzucht des Organismus unter dem Gesichtspunkt einer optimalen Ausbeute an DdH-Enzym beschrieben.

5.1 Herstellung und Lagerung von Gefrierkulturen

Eine lyophilisierte Gefrierkultur von *D. desulfuricans* wurde von der American Type Culture Collection [80] bezogen. Die folgenden Schritte, wie auch das Ansetzen der Vor- und Hauptkulturen, mussten unter anaeroben Bedingungen vollzogen werden, um die schadensfreie Lagerung bzw. später ein einwandfreies Wachstum sicherstellen zu können.

Hierzu kam ein Anaerob-Zelt (engl.: „glove box“, Coy Lab.) zum Einsatz, welches mit einer Atmosphäre von Stickstoff mit einer Beimischung von 1,3 bis 2% Wasserstoff gefüllt war. Über die Umsetzung von eventuell vorhandenen Sauerstoffanteilen in der Zeltatmosphäre mit dem zugesetzten Wasserstoff zu Wasser an einem palladiumbasierten Katalysatorgranulat wurde die Atmosphäre dauerhaft anaerob gehalten. Um sicher zu gehen, dass für die Umsetzungsreaktion genug Wasserstoff vorhanden war, und um die Abwesenheit von Sauerstoff zu kontrollieren, wurden die O₂- und H₂-Konzentrationen mit einem Gas-Analysator überwacht. Um den Sauerstoffeintrag beim Einschleusen von Gütern in das Zelt möglichst gering zu halten, wurde hierbei stets mit drei kompletten Evakuierungs- und Begasungszyklen gearbeitet, wobei die beiden ersten Begasungszyklen mit reinem Stickstoff und der letzte Zyklus mit einer Formiergas-Mischung (95% N₂, 5% H₂) durchgeführt wurden.

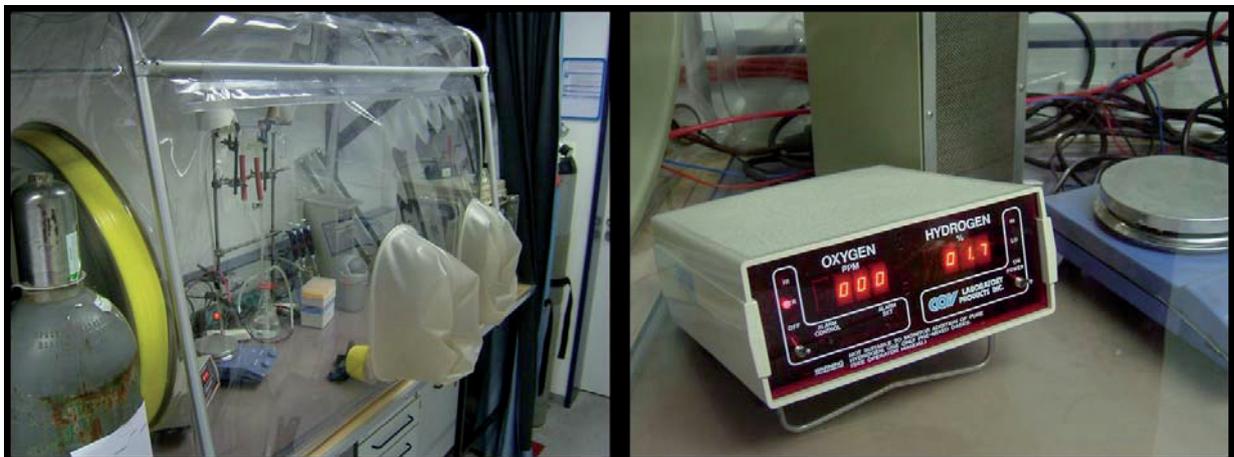


Abbildung 5.1: Anaerob-Zelt (glove box) zum Arbeiten unter Sauerstoff-Ausschluss (links) und Gasanalysator mit Katalysatoreinheit im Hintergrund (rechts)

Zur Herstellung von Gefrierkulturen, welche als „Starterkulturen“ bei der Zellanzucht dienten, wurden drei verschiedene Lagerungsmedien getestet.

Im ersten Fall wurden 300 µl einer 50ml-Vorkultur, welche aus der mit Medium resuspendierten lyophilisierten Kultur herangezogen worden war, in einer frühen Wachstumsphase mit 500 ml 80% Glycerin und 0,1 M Mg₂SO₄ in einem Cryo-Eppendorf-Gefäß gemischt. Zum Vermengen wurde eine sterile Einweg-Impföse verwendet. Die Kultur wurde dann, noch im Anaerob-Zelt, vorsichtig in ein mit Flüssigstickstoff gefülltes Dewar-Gefäß gegeben und eingefroren.

Außerdem wurden Vorkulturen mit einer 5% DMSO-Lösung angesetzt. Hierzu wurde 1ml eiskalte DMSO-Lösung (5%) mit 1ml Kultur in einem sterilen Eppendorfgefäß gemischt. Als Wasch-Schritt zum Austausch des Mediums gegen die DMSO-Lösung wurde bei 6000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde dann erneut mit 1ml DMSO-Lösung überschichtet und gemischt und wie für die Glycerin-Kultur beschrieben eingefroren. Beide Methoden führten zu Gefrierkulturen, welche über lange Zeit gelagert werden konnten und aus denen sich leicht neue Vorkulturen anziehen ließen.

Eine weitere Möglichkeit, Zellen über längere Zeiträume (bis zu 3 Monate) zu lagern, bestand in der Verwendung eines speziellen Lagermediums (PB-Medium, siehe Kapitel 4). Die in diesem Medium angeimpften Zellen wurden in zukrempbare Rollringflaschen (20 ml) zu 10 bis 15 ml gefüllt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

5.2 Ansetzen der Vorkulturen

Bei allen hier beschriebenen Inkulturnahme- und Kultivierungstechniken wurde, wie auch zuvor beim Ansetzen der Gefrierkulturen, entsprechend den allgemeinen Regeln sterilen Arbeitens verfahren [95, 96].

5.2.1 Ansetzen von 10ml-Agar-Röhrchen

Aus den wie im vorigen Abschnitt beschrieben angelegten Gefrierkulturen wurden für jede Anzucht zuerst Vorkulturen angesetzt. Für die Starterkulturen wurde ein 10ml-Maßstab gewählt, um ein Anwachsen gewährleisten zu können. Ein größeres Volumen hätte entweder zu einem zu langsamen oder keinem Wachstum geführt oder ein größeres Inokulum erfordert. Die Glasröhrchen wurden vor jeder Benutzung trocken bei 120 °C für 30 Minuten autoklaviert. Zum Ansetzen der Kultur wurde DdH-Medium (siehe Kapitel 4) angesetzt und mit 1ml AGAR pro 100ml Endvolumen Kultur versetzt. Hierzu wurde der AGAR mit in Teillösung III gegeben. Nach dem Autoklavieren wurden die drei noch heißen Kolben mit den Teilmedien mit Aluminiumfolie umwickelt, um beim Einschleusen in das Anaerobzelt nicht zu sehr abzukühlen. Nach dem Einschleusen in das Zelt konnten die drei Teilmedien vereinigt und auf einem Rührer durchgemischt werden. Danach wurden die vorbereiteten Röhrchen zu ca. zwei Dritteln mit dem Medium gefüllt. Hierbei und den weiteren Schritten musste zügig gearbeitet werden, um ein vorzeitiges Auspolymerisieren zu verhindern. Die in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewar-Gefäß in das Zelt gebrachte Kryokultur wurde mittels einer Pinzette aus diesem herausgenommen und geöffnet. Mit Hilfe einer sterilen Einwegimpföse wurde sodann ein Inokulum der Gefrierkultur in das Anzuchtröhrchen überführt. Es war dabei nicht nötig, die Kryokultur komplett durchtauen zu lassen. Die überführte Kulturmenge wurde hierbei durch schnelle Längsdrehungen der Impföse von dieser gelöst und nicht zu sehr in dem Medium verteilt, um ein schnelles Anwachsen zu ermöglichen. Nach Inokulieren aller Glasröhrchen wurden letztere mit dem restlichen Medium bis knapp unter den Gewinderand aufgefüllt und geschlossen.

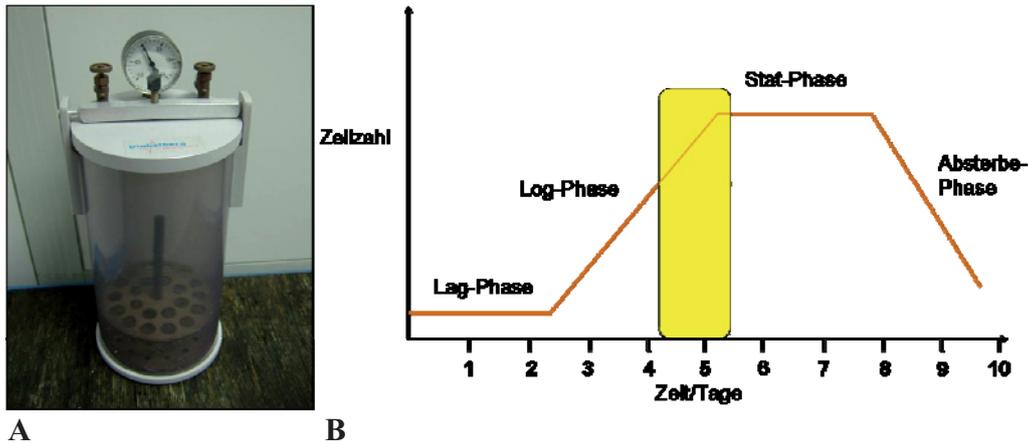


Abbildung. 5.2: Wachstumskurve für Bakterien

A: Anaerobkammer zur sauerstofffreien Anzucht von 10ml-Vorkultur-Röhrchen

B: Typische Wachstumskurve einer Bakterienkultur. Das ideale Zeitfenster zur Zellernte bzw. zum Überimpfen ist gelb gekennzeichnet.

Abbildung 5.2A zeigt den für das Anwachsen unter anaeroben Bedingungen genutzten Zylinderbehälter, in den die Kulturröhrchen nach dem Ausschleusen eingesetzt wurden. Der Behälter wurde über die vorhandenen Gasanschlüsse in mehreren Austauschzyklen evakuiert und mit reinem Stickstoff gefüllt. Nach Erreichen einer sauerstofffreien Atmosphäre im Zylinder wurde dieser für mehrere Tage in einem 37 °C-Raum aufbewahrt, bis die Bakterienkultur das Medium komplett durchwachsen hatte. Sobald das weißlich-gelbe Medium gänzlich schwarz geworden war, was das erfolgreiche Durchwachsen des Mediums mit *Desulfovibrio*-Kultur anzeigte, konnte das entsprechende Röhrchen entweder zur Inokulation der flüssigen Vorkulturen genutzt werden oder im Kühlschrank bei 4 °C für ca. 14 Tage gelagert werden. Das komplette Anwachsen der Kultur in 10ml-Röhrchen nahm in den meisten Fällen zwischen drei und vier Tage in Anspruch.

Bemerkenswerterweise führten die Versuche der Inkulturnahme von *D. desulfuricans* auf mit diesem Medium angefertigten 30ml-Agarplatten in Petrischalen zu keinem positiven Ergebnis, gleich wenn diese ebenfalls unter anaeroben Bedingungen angeimpft wurden und auch wie für die 10ml-Vorkulturen beschrieben in einem mit Stickstoff gefluteten Anzuchtzylinder aufbewahrt worden waren. Dies stellt einen Unterschied zur nahe verwandten Art *Desulfovibrio vulgaris* dar, welche problemlos auf Agarplatten in Kultur gehalten werden kann. Aus diesem Grunde wurde stets auf die Gefrierkulturen als Ausgangsmaterial zur Anzucht zurückgegriffen. Ein weiterer Vorteil dieses Vorgehens bestand darin, dass beim Verwenden einer Gefrierkultur zur Lagerung die Gefahr von Spontanmutationen drastisch verringert ist.

5.2.2 Ansetzen der 50ml-Vorkultur

Nach dem vollständigen Durchwachsen der 10ml-Kultur, welche als Schwarzfärbung in Folge der Schwefelreduktion und der sich daran anschließenden Ausfällung von Fe(II)-Sulfid sichtbar wurde, wurde die Startkultur in 50ml Flüssigkultur überführt. Hierzu wurden die drei Teilmedien wie für die 10ml-Vorkulturen beschrieben angesetzt, jedoch ohne die Zugabe von AGAR. Das Teilmedium I wurde dabei bereits in den für die Vorkultur vorgesehenen 50ml-

Schottflaschen angesetzt. Zusätzlich wurde pro Anzuchtflasche ein Schottflaschendeckel mit Septum separat in Aluminiumfolie eingeschlagen autoklaviert, ebenso wie ein kleiner Metallspatel zur Überführung des Agarkulturmaterials in das Flüssigmedium.

Nach dem Einschleusen aller Materialien und einem ausreichenden Abkühlen der Teilmedien konnten diese im Verhältnis 2:1:2 in die Anzuchtflaschen gegeben werden. Pro Liter Gesamtmedium wurden fünf Milliliter einer sterilfiltrierten $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ -Lösung (20%, w/v) zugesetzt. Die Lösung wechselte durch die Zugabe von einer hellgelben hin zu einer grünlichen Färbung. Das Animpfen erfolgte dann über das Hinzufügen der angewachsenen 10ml-Agarkultur in die 50ml-Flüssigkultur in kleinen Stücken mit dem Spatel.

Nach zwei Tagen waren die Kulturen angewachsen, was sich neben der Schwarzfärbung der Kultur auch an einem Aufwölben des Septendeckels durch die Gasentwicklung in der Kultur zeigte.

5.2.3 Ansetzen der 500ml-Vorkulturen

Nach dem Anwachsen der 50ml-Kulturen wurden diese in 500ml-Mediumflaschen überimpft, wobei je eine 50ml-Kultur für das Animpfen einer 500ml-Kultur verwendet wurde. Die Vorgehensweise war genau entsprechend dem Ansetzen der 50ml-Kultur.

5.3 Betrieb der 10l-Hauptkultur

Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte in zwei Glasfermenterflaschen mit einem Fassungsvermögen von jeweils 10 Litern.

Anders als bei den Vorkulturen mussten für die Hauptkultur aufgrund der längeren Kultivierungszeit die Anzuchtparameter Temperatur und pH-Wert technisch gesteuert werden sowie eine fortwährende Umwälzung der Kultur und eine kontinuierliche Begasung mit Stickstoff zur Aufrechterhaltung eines anaeroben Milieus sichergestellt werden. Außerdem musste die im Medium gelöste Kohlenstoffquelle Natriumlaktat im Laufe der Fermentation täglich neu zugegeben werden, da diese laufend durch die Kultur konsumiert wurde.

5.3.1 Aufbau

Der genaue Aufbau für eine Fermenterflasche ist in Abbildung 5.3 schematisch dargestellt. Bei den beiden Glasfermentern handelte es sich um Pyrex® 1515/18D-Borosilikat-Glas-Flaschen, welche mit einem 60mm-4513-Gewindendeckel mit innen liegenden PTFE-Dichtungsring verschlossen wurden. Zur Aufnahme der Glasrohre für die N_2 -Begasung, die H_2SO_4 -Zugabe, die Abluft sowie zur Montierung der pH-Elektrode wurde der Deckel mit insgesamt vier Bohrungen versehen. Um die Dichtigkeit des Systems zu gewährleisten, wurde unter die PTFE-Dichtung eine zweite Silikondichtung mit entsprechenden Lochstanzungen angebracht.

Die Temperatur wurde während der Anzucht konstant auf 37 °C gehalten, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Hierzu waren die Fermenter in Edelstahlbottiche mit Gitterrost-Einlegeböden gesetzt worden, so daß unterhalb des Rostes ein Rührmagnet das Temperierwasser kontinuierlich durchmischen konnte. Die Bottiche wurden zur Temperierung mit Wasser aufgefüllt und standen auf Heizrührgeräten, welche mit einer Thermostat-Einheit verbunden waren, die wiederum die Temperatur des Temperierwassers

kontrollierte. Das Heizrührgerät versetzte dabei auch den Rührmagneten im Bottich sowie einen zweiten Rührmagneten in der Kultur in Rotation.

Erfahrungsgemäß musste die Temperatur im Bottich über den Thermostaten auf 39 °C eingestellt werden, um in der Kultur 37 °C zu erreichen. Bei Bedarf musste die Temperatur im Verlauf der Anzucht nachgestellt werden. Die Temperatur der Kultur konnte über den in der pH-Elektrode integrierten Wärme-Fühler auf der Anzeige des pH-Meters (in Abbildung 5.3 nicht gezeigt) abgelesen werden.

Die pH-Elektrode war zudem über das pH-Meter mit einer pH-Steuereinheit (Werkstätten MPI BAC) verbunden. Dies war nötig, da die Kultur im Verlauf der Fermentierung einen zunehmend basischeren pH-Wert einnahm, was ohne eine kontinuierliche Anpassung des pH-Wertes zum Absterben der Kultur geführt hätte. Bei Überschreiten des maximalen pH-Sollwerts steuerte das Gerät eine Schlauchpumpe (Pharmacia Biotech P1) über eine externe Datenschnittstelle (RS 232) an, welche über das automatisierte Zupumpen von 2M H₂SO₄-Lösung zur Kultur den pH-Wert in das zuvor eingestellte pH-Wert-Fenster zurückstellte. Der erwünschte pH-Wert zur Anzucht lag bei 7,2, wobei das Optimalfenster mit pH 7 bis pH 7,5 und der Toleranzbereich mit pH 6,5 bis pH 8 angegeben werden können. Eine zuvor eingestellte Pumpleistung von 1,4 ml/Min. (Flußrate 1, Pumpgeschwindigkeit 10) erwies sich als geeignet, um bei der gewählten Konzentration von H₂SO₄ den pH-Wert zu korrigieren, ohne ein „Durchsacken“ in den sauren Bereich unter pH 6,5 und damit ein Absterben der Kultur zu verursachen.

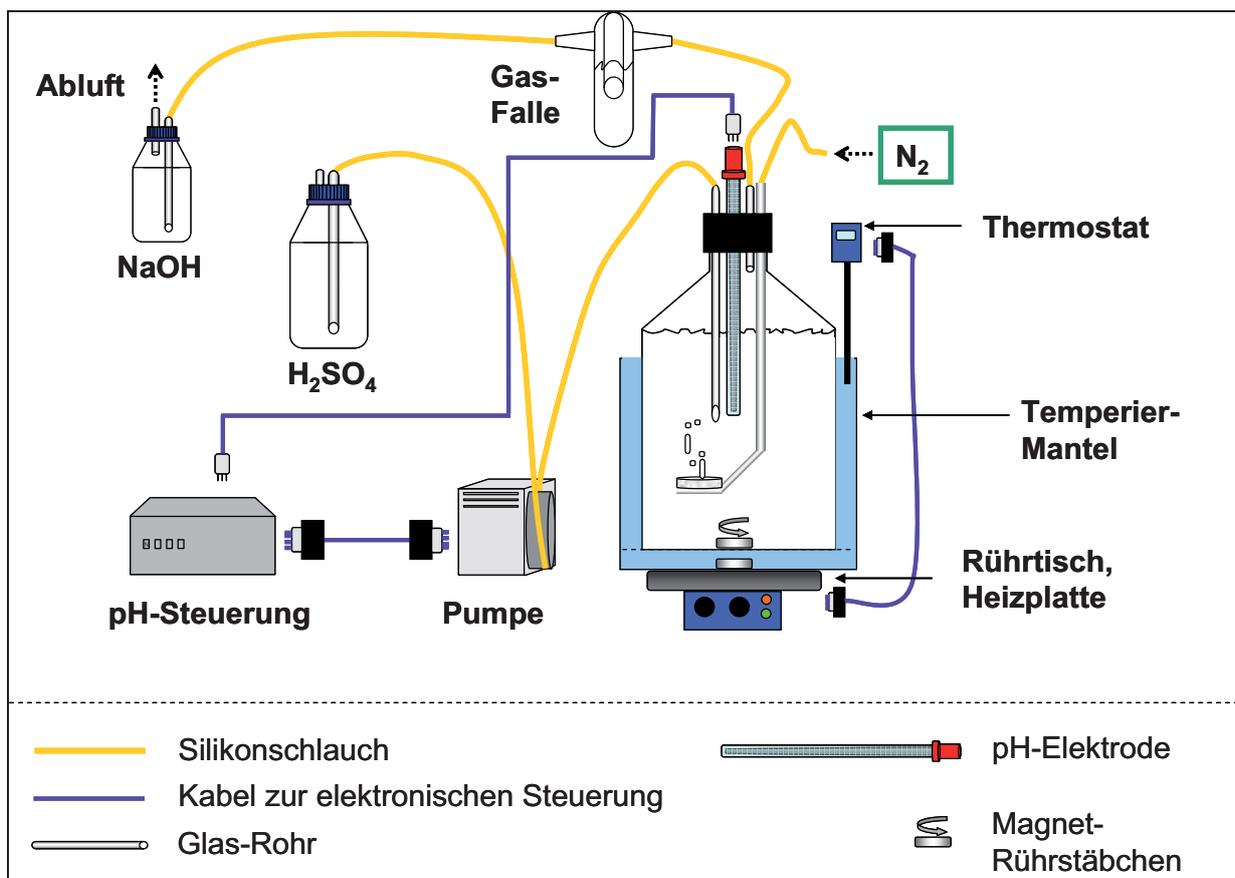


Abbildung. 5.3: Fermenteraufbau
Beschreibung siehe Text.

Die Begasung mit Stickstoff fand kontinuierlich, jedoch mit einer geringen Durchflußrate statt. Sie diente dazu, einen leichten Überdruck in der Kultur aufzubauen und aufrecht zu erhalten, um das Einströmen von Sauerstoff zu verhindern, außerdem trug sie zusammen mit der Rührung zur Durchmischung der Kultur bei. Um eine möglichst gute Verteilung des Stickstoffes in der Kultur zu gewährleisten, wurde das Gas über eine Laborfritte in die Kultur geleitet. Die Abluft wurde über eine mit Wasser gefüllte Gasfalle durch eine weitere Fritte in eine mit 3M Natriumhydroxidlösung gefüllte Laborflasche geführt. Hierdurch wurde ein Teil des sich bildenden Schwefelwasserstoffes zu unlöslichem kolloidalem Schwefel umgesetzt. Die gesamte in Abbildung 5.3 gezeigte Apparatur war zudem in einem Laborabzug installiert worden, um die trotz der Filterung vorhandenen Schwefelwasserstoffdämpfe kontinuierlich absaugen zu können. Der Aufbau stand darüber hinaus in einer Stahlwanne, so dass im Falle eines Flüssigkeitslecks das entweichende Medium oder die entweichende Säure aufgefangen worden wäre.

5.3.2 Anzucht

Die Anzucht der Hauptkultur wurde inklusive des ersten Tages mit der Inbetriebnahme der Apparatur und dem Animpfen der Fermenter sowie inklusive des Erntetages drei Tage lang durchgeführt, die reine Fermentationszeit betrug ca. 50 Stunden.

Die Fermenter wurden entsprechend Abbildung 5.3 zusammengesetzt und mit Teilmedium 1 des in drei Teilmedien separat zu autoklavierenden Mediums befüllt (siehe Abschnitt 5.2.2). Die offenen Enden der drei Silikonschläuche wurden mit 1ml-Automatikpipettenspitzen verschlossen, die zuvor mit feiner Watte gestopft worden waren. Da die pH-Elektrode nicht autoklavierfähig war, wurde in die freie Bohrung ein Silikonstopfen gesetzt. Der Deckel des Fermenters wurde nicht vollständig zugekehrt, um ein Zerplatzen des Gefäßes während des Autoklaviervorgangs zu vermeiden.

Direkt nach dem Ende des Autoklavierprogramms und dem Öffnen des Autoklaven konnte der Fermenterdeckel dann fest angezogen werden. Das Befüllen der Teilmedien zwei und drei musste aus praktikablen Gründen unter halbsterilen Bedingungen ausgeführt werden. Hierzu wurden die Fermenter vor eine Sterilbank positioniert, geöffnet und mit den Medien befüllt, wobei die Kolben- und Flaschenhälse vor und nach dem Befüllen abgeflammt wurden und der Fermenterdeckel in der Sterilbank abgelegt wurde. Nach dem Einfüllen aller Teilmedien (Endvolumen: 8l) und dem Verschließen der Fermenter wurden zuerst die Stickstoffbegasung und die Temperierungskontrolle angeschlossen, um das Medium von Sauerstoff zu befreien und eine für die Zellen akzeptable Temperatur zu erreichen. Erfahrungsgemäß konnten die Fermenter nach einer Stunde Begasungszeit angeimpft werden, wobei zuvor ein der Mediumsmenge entsprechendes Volumen gelöster, sterilfiltrierter Eisensulfatlösung hinzugegeben worden war (siehe Kapitel 4). Die nicht autoklavierbare pH-Elektrode wurde vor dem Einsetzen zuerst mit Ethanol und dann mit autoklaviertem, destilliertem Wasser gespült.

Nach dem Anschluß aller übrigen Zu- und Ableitungen konnte dann pro Fermenter insgesamt ein Liter angewachsene Zellkultur in der späten logarithmischen Wachstumsphase hinzugegeben werden. Hierzu wurde die Stickstoffbegasung kurz unterbrochen und die Zellen über einen autoklavierten Glastrichter durch die Abluftbohrung des Deckels in das Kulturgefäß gegeben. Um die Oberflächenspannung herabzusetzen und dadurch die Bildung von Schaumflocken zu verhindern, wurden des Weiteren 10ml einer 10% Antischaumlösung hinzugegeben. Da die als Kohlenstoffquelle im Medium vorhandene Milchsäure während der Anzucht kontinuierlich verstoffwechselt wird, musste diese im Laufe der Anzucht in Intervallen wieder zugesetzt werden. Hierzu wurde autoklaviertes, 50%iges Natrium-Laktat verwendet. Die genauen Mengen und Zeiten zur Zugabe sind in Kapitel 5.3.3 beschrieben.

Außerdem musste der Temperiermantel jeden Tag neu mit Wasser aufgefüllt werden, um den Verlust durch Verdunstung auszugleichen.

Sowohl der pH-Wert wie auch die Temperatur der Kultur wurden in regelmäßigen Abständen protokolliert, genau so wie die genauen Zugabezeiten und -mengen für Natriumlaktat, so daß Vergleichswerte mit vorherigen und späteren Läufen gewonnen werden konnten.

Zwanzig Minuten vor Beginn der Zellernte wurde die Begasung des Fermenters auf Pressluft umgestellt. Diese Maßnahme diente dazu, das zu diesem Zeitpunkt gebildete DdH-Protein zur Aufreinigung in den stabilen überoxidierten Zustand (siehe Kapitel 2.4) zu überführen [52].

Die eigentliche Zellernte erfolgte über das Auspumpen der Kultur in 1000ml-Zentrifugationsbecher und deren Zentrifugation für jeweils dreißig Minuten bei 6500 Umdrehungen pro Minute in einem JLA 8.100-Rotor (Beckman Coulter, USA).

Alle Arbeiten, außer der eigentlichen Zentrifugation wurden weiterhin unter dem Laborabzug durchgeführt, um die Belastung mit Schwefelwasserstoffdämpfen so gering wie möglich zu halten. So wurden die austarierten Zentrifugationsbecher nur in verschlossenem Zustand aus dem Abzug genommen. Nach der Zentrifugation und der Dekantierung des Überstands wurden die erhaltenen Zellpellets ebenfalls unter einem Abzug in verschließbare 50ml-Kunststoffbecher umgefüllt und diese sofort bei -80°C eingelagert.

Der dekantierte Kulturüberstand wurde mit einer NaOH-Lösung neutralisiert, sterilisiert und vor der Entsorgung möglichst für mehrere Tage im Abzug gelagert, um die H₂S-Konzentration dieser Lösung weiter zu senken. Mit allen verwendeten Glaswaren und Schlauchverbindungen wurde entsprechend verfahren.

Die anschließende Aufreinigung des DdH-Enzyms aus den so gewonnenen Zellpellets ist im folgenden Kapitel 6 (Aufreinigung) beschrieben.

5.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Von der im Hinblick auf eine optimale Hydrogenase-Ausbeute verbesserten Anzucht von *Desulfovibrio vulgaris* ist bekannt, daß die Zugabe einer zu großen Menge Laktats bzw. die Gabe zu falschen Zeiten zu einer verminderten Zellmenge und einer geringeren Proteinausbeute führt [94]. In diesem Fall konnten die optimalen Zugabezeiten für Laktat anhand des Sauerstoffwertes der Kultur bestimmt werden, welcher nicht auf einen Gaseintrag von außen, sondern auf den Metabolismus von *Desulfovibrio* zurückzuführen ist, der in bestimmten Phasen O₂ freisetzt.

Im Falle der vorliegenden Anzucht von *Desulfovibrio desulfuricans* war eine direkte Kontrolle der O₂-Entwicklung in der Kultur nicht möglich. Jedoch wurden die für eine optimale Hydrogenase-Ausbeute besten Zugabemengen und -zeiten empirisch ermittelt.

So war die im Medium gelöste Menge Natriumlaktat so bemessen worden, daß dieses sich bei einem Anzuchtbeginn zwischen 11 und 13 Uhr bis zum Morgen des nächsten Tages verbraucht hatte. Während des zweiten Anzuchtages wurden pro Fermenter 100 ml 50%iges Natriumlaktat zugesetzt, jedoch in kleineren Gaben von 10 bis 15 ml und über einen Zeitraum von ca. 10 Stunden verteilt. Am dritten Tag wurden weitere 50ml der Laktatlösung hinzugegeben. Die Zellernte erfolgte normalerweise zwischen 11 und 12 Uhr des dritten Tages, wobei die Zellen in einer möglichst aktiven Wachstumsphase geerntet wurden, was über die vorherige Zugabe der letzten 15 bis 20 ml Natriumlaktats 45 Minuten vor Beginn der Zellernte induziert wurde.

Ein indirektes Maß für die Vermehrung des Organismus stellte hierbei der Verbrauch an H₂SO₄ aufgrund der pH-Änderung in der Kultur dar, welcher sich nach Zugabe des Natriumlaktats deutlich steigerte. Typische Verbrauchswerte für die 2M H₂SO₄-Lösung lagen zwischen 120 und 150ml pro Anzucht und Fermenter.

Eine weitere einfache Maßnahme zur Optimierung der Zellausbeute war die Vermeidung von starken pH-Sprüngen in der Kultur durch die richtige Dosierung der automatisch zugepumpten Säure. Mit der in Abschnitt 5.3.1 erwähnten Flußrate von 1,4ml/Minute wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Die erwähnte Fermentationsdauer von ca. 50 Stunden stellte ebenfalls einen für die erzielte Zellmenge und Hydrogenase-Ausbeute optimalen Anzuchtparameter dar. Bei geringeren Fermentationszeiten war die gewonnene Zellmenge drastisch verringert. Längere Anzuchtzeiten hingegen führten zu einem erhöhten Anteil toten Zellmaterials und einer geringeren Proteinausbeute. Neben den in diesen Fällen im Verlauf der Aufreinigung augenscheinlich gewordenen Einbußen an Hydrogenaseprotein zeigte sich dies auch bereits anhand der Konsistenz des bei der Zellernte erhaltenen Zentrifugationspellets: Überalterte Zellen waren nach der Zentrifugation von zunehmend krümelig-trockener Konsistenz und sehr dunkel gefärbt, während frisches Zellmaterial zum einen eher gelartig beschaffen war und zum anderen neben schwarzen auch graue oder braune Farbanteile aufwies.

In keiner der durchgeführten Anzuchten von DdH aus *Desulfovibrio desulfuricans* kam es zu einer erkennbaren Kontamination durch andere Bakterien oder Pilze.

5.4 Anzucht unter Schwefelmangelbedingungen und H₂-Zugabe

Aus physiologischen Messungen an sulfatreduzierenden Organismen ist bekannt, daß diese einen flexiblen Metabolismus besitzen, der es ihnen erlaubt, ihren Stoffwechsel auf verschiedene Kohlenstoffquellen umzustellen und ebenso auf die Verfügbarkeit verschiedener Elektronen-Endakzeptoren und -donatoren anzupassen [98]. Die bisher bekannten Details zum Stoffwechsel von *Desulfovibrio desulfuricans* sind in Abschnitt 1.3.3 zusammengefaßt. Unter anderem wurde bei der Gattung *Desulfovibrio* eine verstärkte Bildung von H₂ bei Anzuchten in schwefelfreiem bzw. -reduziertem Medium beobachtet [97]. Da es sich beim DdH-Protein um eine periplasmatisch lokalisierte Hydrogenase handelt, welche unter physiologischen Bedingungen die heterolytische Spaltung von Wasserstoff stark begünstigt (siehe auch Kapitel 8, elektrochemische Messungen), soll in diesem Versuchsteil überprüft werden, ob ein stärkeres Angebot des Substrats Wasserstoff zu einer stärkeren Nutzung dessen als Elektronendonator führt und mit einem erhöhten Expressionsgrad von DdH zusammenfällt. Hierzu soll in einem ersten Schritt überprüft werden, ob die für den Stamm *D. desulfuricans* New Jersey beschriebene Wasserstoffbildung in Schwefelmangelsituationen ebenfalls für den Stamm ATCC 7757 verifiziert werden kann.

Um zu klären, ob dieser Effekt mit einer Induzierung der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase einhergeht und somit für eine Steigerung der Ausbeute an Protein genutzt werden kann, wurde deshalb auf der Basis des Vollmediums ein schwefelreduziertes Medium entwickelt und getestet.

5.4.1 Schwefelmangelmedium

Mit dem in Kapitel 4 beschriebenen Medium wurden Vorversuche im Maßstab von 500 ml-Ansätzen durchgeführt. Die im Standardmedium vorhandenen Sulfatverbindungen wurden weitestgehend durch entsprechende Chloride ersetzt (MgSO₄ gegen MgCl₂, CaSO₄ gegen CaCl₂ usw., siehe Kapitel 4). Da dem ansonsten schwefelfreien Medium im letzten Schritt Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ hinzugesetzt wird, entspricht die Endkonzentration in Sulfat im reduzierten Medium 0,68g pro Liter.

Im ersten Schritt wurde getestet, in wieweit diese verringerte Konzentration geeignet ist, die Kultur mittels des Restgehalts an Schwefelverbindungen anwachsen zu lassen, um dann, zum Zeitpunkt des vollständigen Verbrauchs der Schwefelkomponenten die verstärkte Wasserstoffproduktion zu induzieren (Selbstentschwefelung).

Der Gehalt an Sulfat wurde turbidimetrisch im UV/VIS-Spektrometer bei 820nm anhand der Bildung und der Ausfällung von Bariumsulfat aus Bariumchlorid in saurer Lösung gemessen [99] und über einen Zeitraum von mehreren Tagen verfolgt. Zuvor war eine Eichgerade anhand definierter Konzentrationen an $MgSO_4$ erstellt worden, mittels derer die gemessenen Streuungswerte der entsprechenden Konzentration zugeordnet werden konnten.

Abbildung 5.4 zeigt den Vergleich der zeitabhängigen Sulfatkonzentration einer Vollmedium- und einer Schwefelmangelkultur.

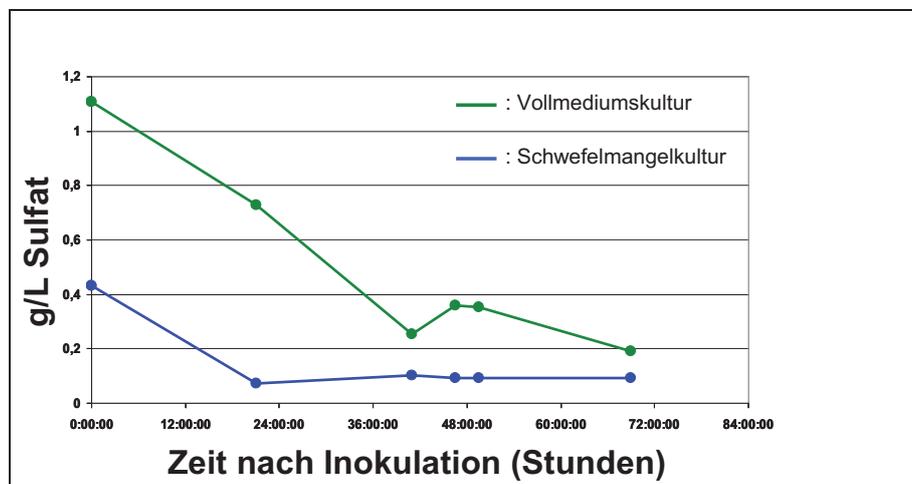


Abbildung 5.4: Abnahme des Schwefelgehalts im Medium während der Zellanzucht

Die Schwefelmangelkultur erreichte ausgehend von einem ursprünglichen Sulfatgehalt von ca. 0,45g/Liter nach 20 Stunden eine Konzentration von 0,075g Sulfat pro Liter Kultur. Die Konzentration blieb im weiteren Verlauf konstant. Hingegen war die Sulfatkonzentration der Vollmediumkultur nach 20 Stunden erst um ca. ein Drittel des Ausgangswertes auf ca. 0,75g/Liter abgesunken. Die Ernte der Schwefelmangelkulturen nach der angegebenen Zeit ergab zudem eine Zellausbeute von ca. 8 bis 9g pro Liter Kultur, was exakt der Zellausbeute einer Vollmediumkultur entspricht. Das gewählte Medium ist somit geeignet für die Anzucht von *D. desulfuricans* und führt nach ca. 20 Stunden zur gewünschten Selbstentschwefelung der Kultur.

Um zu überprüfen, ob die Entschwefelung der Kultur auch die Induktion des Schwefelmangelmetabolismus' und eine erhöhte Wasserstoffbildung bewirkt, musste letztere ebenfalls in der Kultur gemessen werden. Die Wasserstoffentwicklung wurde über einen Gaschromatographen verfolgt. Dabei ist zu beachten, daß es sich bei den gezeigten Kurven um Akkumulationswerte in der Gasphase der Flaschenkultur handelt. Da die Versuche in Vorkulturflaschen durchgeführt wurden, konnten Probenvolumina des Gasraumes über der Kultur zu definierten Zeitabschnitten entnommen werden. Hierzu wurde eine verriegelbare Gasspritze benutzt, welche durch ein gasdichtes Septum im Deckel der Kulturflasche gestochen wurde. Die erhaltenen Werte wurden auf das zur Verfügung stehende Volumen der

Gasphase in der Kulturflasche (50ml) umgerechnet. Eine typische Messung des Wasserstoffgehaltes der Gasphase ist in Abbildung 5.5 gezeigt.

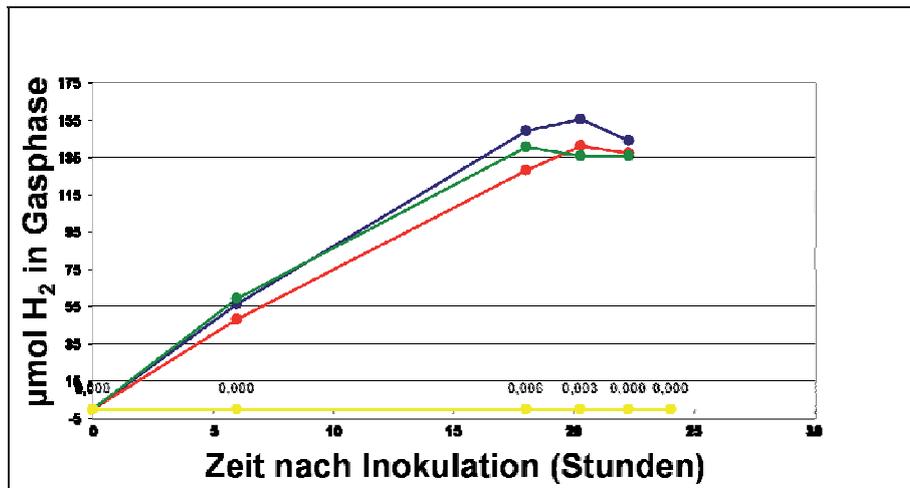


Abbildung 5.5: Akkumulation von H₂ in der Gasphase dreier 500 ml-Schwefelmangelkulturen und einer Vollmediumkulturen (gelb).

Die Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Messergebnisse wiesen sehr ähnliche Kurvenverläufe auf. Die Abnahme an H₂, welche nach 20 Stunden einsetzt, kann entweder durch entweichenden Wasserstoff oder durch Wiederaufnahme mittels der [FeFe]-Hydrogenase DdH erklärt werden, welche als Aufnahme-Hydrogenase im Periplasma lokalisiert ist.

Tabelle 5.1: H₂-Entwicklung dreier S-Mangel- und einer Vollmediumkultur

	Zeit nach Inokulation 0 h	18 h	20 h	22 h
S-Mangel-Kultur 1	0 µl H ₂	149 µl H ₂	155 µl H ₂	143 µl H ₂
S-Mangel-Kultur 2	0 µl H ₂	128 µl H ₂	140 µl H ₂	136 µl H ₂
S-Mangel-Kultur 3	0 µl H ₂	140 µl H ₂	136 µl H ₂	136 µl H ₂
Vollmedium-Kultur	0 µl H ₂	3.9 µl H ₂	1.7 µl H ₂	0 µl H ₂

Die gas-chromatographisch gemessenen Wasserstoffkonzentrationen wurden in Absolutwerte umgerechnet. In Tabelle 5.1 ist zu sehen, dass der akkumulierte Wasserstoffgehalt in der Gasphase für die Schwefelmangelkulturen ca. 50-mal höher liegt als dies für die Vollmediumkultur der Fall ist.

Die Versuche zeigten somit, daß der für andere Stämme von *D. desulfuricans* beschriebene, bei Schwefelmangel einsetzende verstärkte Wasserstoffmetabolismus ebenfalls bei *D. desulfuricans* ATCC 7757 auftritt. Da Sulfat den Elektronenendakzeptor für den Metabolismus sulfatreduzierender Bakterien darstellt, wird angenommen, daß unter schwefelreduzierten Bedingungen, unter denen Sulfat nicht mehr in ausreichendem Maße zur Verfügung steht, über einen gesteigerten Hydrogenasemetabolismus verstärkt Protonen als alternative Elektronenendakzeptoren genutzt werden [97].

5.4.2 Anzucht unter Wasserstoffbegasung

Um zu überprüfen, ob die im vorigen Abschnitt beschriebene Wasserstoffinduktion durch Schwefelmangel zu einer Änderung der Expressionsraten von DdH führt, mussten Anzuchten unter diesen Bedingungen mit anschließender Aufreinigung des Enzyms durchgeführt werden. Zu beachten ist hierbei, daß der zu Anfang dieses Kapitels vorgestellte Fermenteraufbau grundsätzlich weniger gasdicht ist, als eine Vorkulturflasche. Um sicherzustellen, daß in den Fermenteranzuchten eine konstant ausreichende H₂-Konzentration vorhanden war, um eine mögliche Induktion des DdH-Enzyms bewirken zu können, wurden Anzuchten durchgeführt, in denen die normalerweise durchgeführte Stickstoffbegasung der Kultur durch wasserstoffhaltiges Formiergas ersetzt wurde. Die Begasung wurde mit einer Formiergasmischung von 97% Stickstoff und 3% Wasserstoff durchgeführt. Die Explosionsschutzgrenze für Wasserstoff liegt bei 4%, so daß keine weiteren Änderungen zur Gewährleistung der Betriebssicherheit getroffen werden mussten. Hierzu wurde ein Dreiwegeventil angebracht, mit dem die Begasung von Stickstoff auf die Formiergasmischung umgestellt werden konnte. Dadurch wurde sichergestellt, daß immer eine für eine eventuelle Induktion von DdH genügende Menge Wasserstoffs in der Kultur gelöst war. Dies wurde des Weiteren durch die vorher beschriebenen Tests mittels eines Gaschromatographen überprüft.

Tabelle 5.2 stellt die Proteinausbeuten für DdH der unter diesen Bedingungen präparierten Zellkulturen vergleichend Präparationen von unter „Normalbedingungen“ gewonnenem Zellmaterial gegenüber.

Tabelle 5.2: Vergleich der Ausbeuten von DdH unter Normal- und H₂-gesättigten Anzuchtbedingungen. Die Werte sind auf 100g Ausgangszellmasse normalisiert.

Anzuchten unter Normalbedingungen	Anzuchten in H ₂ -gesättigtem Medium
2,65mg/100g Zellen	1mg/100g Zellen
1,83mg/100g Zellen	1,1mg/100g Zellen
0,7mg/100g Zellen	1,6mg/100g Zellen
0,9mg/100g Zellen	2,8mg/100g Zellen
1,59mg/100g Zellen	0,63mg/100g Zellen

Es zeigt sich, daß die Ausbeuten in beiden Fällen in derselben Größenordnung liegen und auch den gleichen statistischen Schwankungen unterliegen. Es ist somit davon auszugehen, daß die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase unter den untersuchten Anzuchtbedingungen in ähnlichem Maße exprimiert wird. Da die beschriebenen Kulturen mit Schwefelmangelmedium eine signifikant höhere Wasserstoffentwicklung aufwiesen, verläßt wahrscheinlich unter diesen Bedingungen ein Großteil des gebildeten Wasserstoffs die Zelle und die von der [FeFe]-Hydrogenase wieder verstoffwechselte Menge an Wasserstoff unter Vollmediums- und Schwefelmangelmediumsbedingungen ist ähnlich hoch.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zellanzucht:

Die Anzucht der Zellen wurde optimiert über die Parameter Fermentationszeit, Laktatmenge und –zugabezeit sowie auch in apparativer Hinsicht. Die Ergebnisse der optimierten Anzuchten sind in Kapitel 6 (Aufreinigung) ausgewertet. Das vorgestellte Anzuchtprotokoll war geeignet, hydrogenasehaltiges Zellmaterial in einer reproduzierbar hohen Menge zu liefern.

Die vorliegende Apparatur wurde durchgehend unter Verzicht von mit der Kultur in Berührung stehenden Stahl-, Eisen- oder sonstigen Metallbestandteilen angelegt. Aus diesem Grund ist es möglich, mit dem beschriebenen Aufbau Markierungen mit dem Isotop ⁵⁷Fe durchzuführen, indem ein entsprechend mit diesem Isotop angereichertes Medium verwendet wird.

Expression und physiologische Stellung von DdH:

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Expression des DdH-Proteins lassen sich sinnvoll in das von Odom und Peck [103, 108] vorgeschlagene und in der Folge [101] präzierte Modell zum Wasserstoffmetabolismus sulfatreduzierender Mikroorganismen einordnen.

Das Modell beschreibt die Bildung von Protonen und Elektronen durch die unvollständige Oxidation des Elektronendonors Laktat zu Azetat und die weitere Reduktion der Protonen zu molekularem Wasserstoff mittels einer cytoplasmatischen Hydrogenase. Für die Gattung *Desulfovibrio* sind mehrere im Cytoplasma lokalisierte oder an die dem Cytoplasma zuweisende Seite der Zellmembran assoziierte [NiFe]-Hydrogenasen sowie eine [NiFeSe]-Hydrogenase identifiziert worden [97]. Der gebildete Wasserstoff kann aufgrund seines hohen Diffusionsvermögens in den periplasmatischen Raum übertreten und dort entsprechend dem Bedarf an Redoxäquivalenten von einer periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase wie dem DdH-Enzym wieder oxidiert werden, wobei die Elektronen zurück in das Cytoplasma transportiert werden, während die Protonen zum Aufbau eines Gradienten zwischen Cyto- und Periplasma und der Bildung von ATP genutzt werden.

Ein zweiter Stoffwechselweg umgeht die Bildung von Wasserstoff als Zwischenprodukt und führt zur unmittelbaren Übertragung der Elektronen auf elektronenübertragende Proteine im Cytoplasma.

In beiden Fällen werden die Elektronen auf Sulfat als Endakzeptor übertragen und dieses über die Bisulfat-Reduktase zu Schwefelwasserstoff und Wasser umgesetzt.

Der Hydrogenasemetabolismus bietet somit die Möglichkeit, in physiologischen Situationen, in denen keine oder wenige Elektronenendakzeptoren zur Verfügung stehen, nicht benötigte Reduktionsäquivalente über die Bildung von Wasserstoff aus der Zelle zu entfernen und somit hohe Reduktionspotentiale abzubauen. Sowohl die Wasserstofferzeugung als auch dessen

Oxidation können dabei als „Ventilstellen“ dienen. Das vorliegende Ergebnis zeigt, daß auch bei höheren Wasserstoffkonzentrationen keine höhere Expression der [FeFe]-Hydrogenase erreicht wird und es somit wahrscheinlich auch zu keiner erhöhten Wiederaufnahme von Wasserstoff kommt. Unter diesen Bedingungen wird somit ein Großteil des gebildeten Wasserstoffs aus der Zelle herausdiffundieren. Der Wasserstoffmetabolismus sulfatreduzierender Bakterien hat somit eine ähnliche regulative Wirkung für den fermentativen Elektronentransport, wie dies für den Wasserstoffmetabolismus photosynthetischer Organismen beschrieben ist, bei denen Hydrogenasen an die photosynthetische Elektronentransportkette gekoppelt sind [102].

6 AUFREINIGUNG DER PERIPLASMATISCHEN [FeFe]-HYDROGENASE DDH

Die in diesem Kapitel beschriebene Aufreinigung ging, wie auch die zuvor erörterte fermentative Anzucht des Organismus', aus dem bei Glick et al. [53] beschriebenen und von Hatchikian et al. [52] verändertem Aufreinigungsprotokoll hervor.

Durch die im Folgenden beschriebenen Änderungen und Vereinfachungen wurde eine Präparation entwickelt, welche bei zeitlicher Verkürzung hochreines Protein liefert. Die hierdurch gewonnenen Proben konnten sowohl mit den Mitteln der EPR-Spektroskopie und Elektrochemie untersucht als auch erfolgreich in Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden.

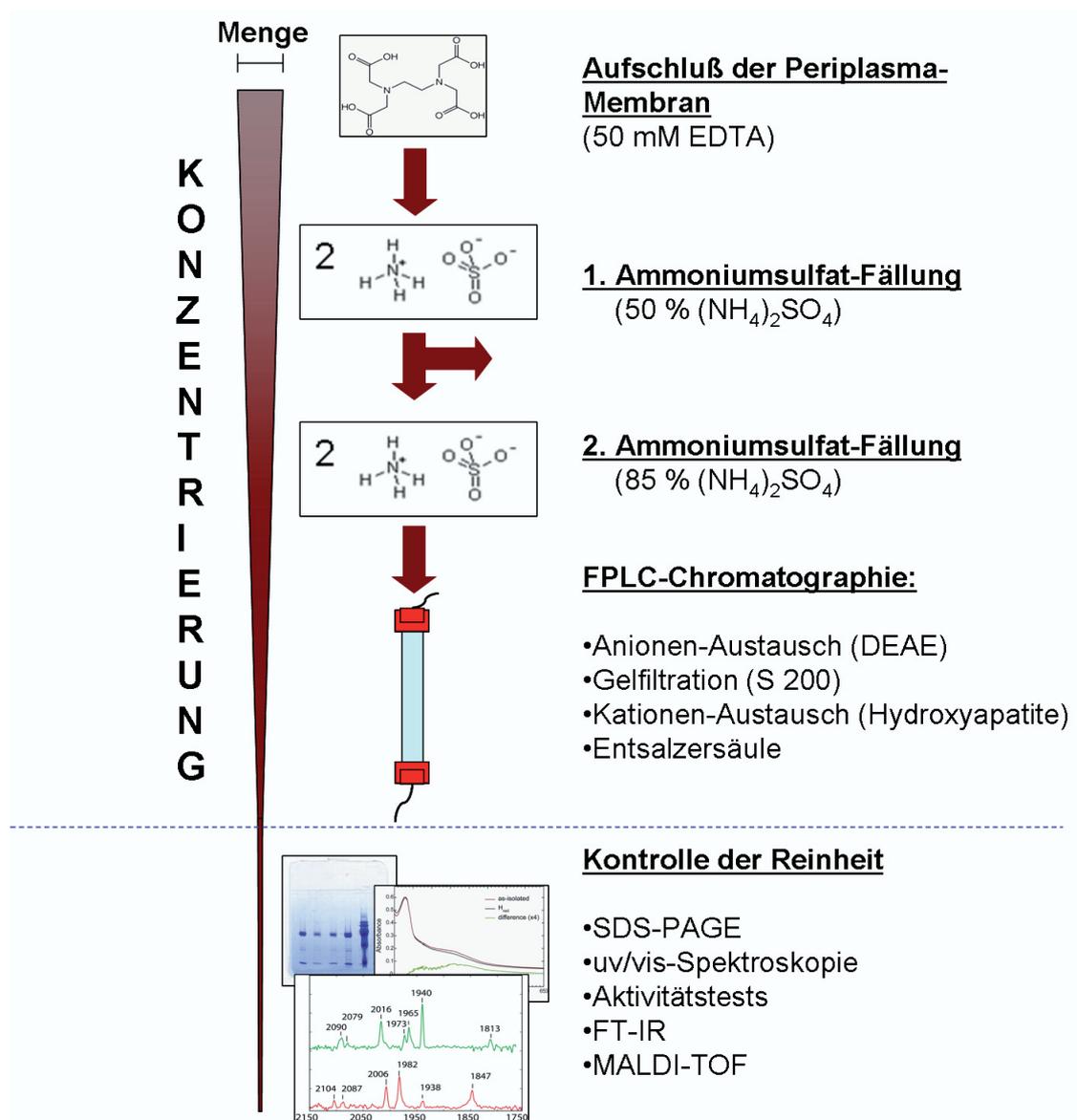


Abbildung 6.1: Aufreinigungs-Schema des Enzyms periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* (DdH)

6.1 Zellaufschluss und Proteinfällung

Die wie im vorherigen Kapitel beschrieben angezogenen Zellen wurden zuerst in einem lauwarmen Wasserbad aufgetaut. Die pro Präparation eingesetzte Zellmenge stellte insofern einen Kompromiß dar, als dass zum einen möglichst viele Zellen eingesetzt werden sollten, um eine maximale Gesamtausbeute pro Aufreinigung zu erzielen. Zum anderen wurde die größtmögliche einzusetzende Zellmenge durch praktische Erwägungen limitiert. So betrug die eingesetzte Zellmenge pro Aufreinigung zwischen 80 und 100 Gramm, also das 1,2 bis 1,5fache der typischen Ausbeute eines 10-Liter-Fermenters (siehe Kapitel 5, Anzucht der Hauptkultur). Eine größere Zellmenge hätte dazu geführt, dass in der nachfolgenden Resuspendierung und Fällung ein zu großes Puffervolumen erreicht worden wäre, welches mit den verwendeten Rotoren nicht mehr gleichzeitig abzuzentrifugieren gewesen wäre.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in EDTA-Puffer (50 mM Tris/HCl; pH 9; 50 mM Na₂-EDTA (Titriplex)) durch Rühren resuspendiert. Hierbei war insbesondere darauf zu achten, dass sich das verwendete EDTA vollständig löste, weshalb dem Natriumsalz, welches die höchste Löslichkeit unter den EDTA-Verbindungen besitzt, der Vorzug gegeben wurde. Das eingesetzte Puffervolumen richtete sich nach der Größe des Zellpellets und betrug 1 Liter pro 50g eingesetztem Naßpellet Zellen. Für 80 oder 100g Zellmasse wurde das Puffervolumen entsprechend angeglichen. Dieses Vorgehen erwies sich als durchaus entscheidend, um eine ausreichende Interaktion des EDTA mit der äußeren Membran der Zellen zu ermöglichen und die Membran durchgängig zu machen für die im Periplasma gelösten Proteine. Nach dem vollständigen Lösen des Zellpellets erfolgte die Inkubation in der EDTA-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren in Bechergläsern. Sowohl eine Verkürzung als auch Verlängerung dieser Zeitspanne wie auch das Abweichen von Raumtemperaturbedingungen (20°C) führten zu einer letztendlichen Abnahme der Proteinausbeute.

Nach dieser Zeit wurde die Lösung in 500ml-Zentrifugenbecher gefüllt, tariert und für 30 Minuten bei 6000 rpm in einem JLA 10.500-Rotor abzentrifugiert, um das Zellmaterial von der herausgewaschenen Periplasmafraktion zu trennen.

Sodann wurde mit diesem, proteinhaltigen Überstand weitergearbeitet, während das zellhaltige Pellet wieder eingefroren wurde. Erfahrungsgemäß verblieb ein Prozentsatz von bis zu 40% des Enzyms bei der EDTA-Behandlung im Periplasma, so dass bei Bedarf das aufbewahrte Zellpellet für eine weitere Präparation wiederverwendet werden konnte.

Im nächsten Schritt wurde das Proteingemisch einer zweistufigen Fällung unterworfen, in welcher ein Teil der unerwünschten Proteine, welche zusammen mit der Hydrogenase aus dem periplasmatischen Raum ausgewaschen wurden, bereits abgetrennt werden konnten. Die Fällung wurde mit (NH₄)₂SO₄ durchgeführt. Es wurden hierfür Sättigungsstufen von 50% und 85% gewählt. Für die erste Stufe (50%) wurde der Lösung 312g Ammoniumsulfat pro Liter Lösung zugesetzt.

Dieses war zuvor so lange gemahlen worden, bis sich die körnig-kristalline Beschaffenheit der Chemikalie zu einer pulverig-mehligen gewandelt hatte. Das gemahlene Ammoniumsulfat wurde unter leichtem Rühren der Lösung in kleinen Gaben zugesetzt. Letzteres war wichtig, damit sich das Ammoniumsulfat schnell und gleichmäßig in der Periplasmalösung löste und sich keine lokalen Konzentrationsmaxima in der Lösung bilden konnten. Nachdem sich das gesamte Ammoniumsulfat gelöst hatte, wurde die Lösung für weitere 30 Minuten gerührt, um die vollständige Fällung der bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration präzipitierenden Proteine zu gewährleisten.

Durch eine Zentrifugation bei 10.000 rpm in einem JLA 10.500-Rotor für 30 Minuten bei 4°C konnten die bei dieser 50%-Sättigungsstufe präzipitierten Proteine dann pelletiert und damit abgetrennt werden.

Für den zweiten Präzipitationsschritt wurde der Überstand mit weiteren 250g/l gemahlene Ammoniumsulfats versetzt, um eine Gesamtsättigung von 85% zu erreichen. Nach einer neuerlichen Fällungszeit von 30 Minuten wurde der Überstand wiederum abzentrifugiert wie nach dem ersten Fällungsschritt.

Das erhaltene, sehr lockere Pellet enthielt unter anderem die [FeFe]-Hydrogenase DdH. Nach vorsichtigem Dekantieren des Überstands wurde das Pellet in 150 ml 4°C kaltem Dialysepuffer (10 mM Tris, pH 7.6, 20mM NaCl) gelöst.

Das gelöste Pellet wurde in einen Dialyseschlauch Visking Typ 27/32 mit einer Ausschlußgrenze (MWCO) von 14000 Da gefüllt und gegen 5 Liter des genannten Puffers über Nacht dialysiert. Der Puffer war zuvor auf 4°C eingekühlt, entgast und für 10 Minuten mit Argon begast worden. Die Dialyse fand in einem 4°C-Raum unter leichtem Rühren und in Dunkelheit oder bei Grünlichtbeleuchtung statt.

6.2 Säulenchromatographische Auftrennung

Die Auftrennung des in Kapitel 5.1 gewonnenen Proteingemisches erfolgte mittels Flüssig-Chromatographie-Säulen und einer automatisierten FPLC-Anlage (Äkta Basic 100, GE Healthcare). Die Aufreinigung bestand in der ursprünglichen Form aus vier, später aus drei Säulen-Chromatographie-Schritten.

Alle chromatographischen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Notwendige Konzentrierungsschritte zwischen den einzelnen Säulenläufen wurden ebenfalls immer gekühlt (Kühlzentrifuge, eisgefülltes Gefäß) ausgeführt. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, die hydrogenasehaltigen Fraktionen nicht zu hohen Lichtintensitäten auszusetzen und die Proben abgedunkelt zu lagern, wo dies möglich war.

Für die Interpretation der erhaltenen Spektren wurden die Elutionsprofile über die Absorption der Probe bei 280 und 400 nm Wellenlänge aufgezeichnet (UV/VIS-Spektroskopie). Hierbei rührt die Absorption bei 280 nm von den Aminosäureresten der in allen Proteinen vorhandenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin her, während die Absorption bei 400 nm bedingt ist durch die Absorptionseigenschaften von Eisen-Schwefel-Clustern. Da DdH über insgesamt drei Cluster dieser Art verfügt, stellt die Absorptionsmessung bei dieser Wellenlänge bereits ein erstes Mittel und Kriterium dar, um Fraktionen, welche das Hydrogenase-Enzym beinhalten, zu identifizieren. Die Methode ist in Kapitel 6.3.1 erläutert. Jedoch kann dieses Kriterium alleine keine eindeutige Aussage über die Verteilung des Enzyms in den einzelnen Fraktionen machen, da auch alle anderen, Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Enzyme in der Proteinmischung des aufgebrochenen Periplasmas eine Absorption bei 400 nm hervorrufen. Die weiteren, zur Detektion der Hydrogenase während eines Aufreinigungslaufes herangezogenen Tests sind im nächsten Abschnitt erläutert. Methoden zur Kontrolle der Probenqualität aufgereinigten Enzyms hingegen wurden in Abschnitt 6.3 zusammengefaßt.

Darüber hinaus wurden während der Chromatographie-Läufe auch standardmäßig die Leitfähigkeitswerte aufgenommen, welche speziell bei den Ionenaustausch-Läufen eine Kontrolle des Auftrennungsvorgangs ermöglichten. Alle verwendeten Chromatographie- und

Resuspensionspuffer wurden vor Benutzung entgast. Eine effektive Art der Pufferbegasung war die Verwendung der Schleuse eines Anaerobzettes (engl.: „glove box“), in die der vorgekühlte Puffer gestellt wurde. Durch das Anlegen des Vakuums konnte ein Großteil des gelösten Sauerstoffs ausgetrieben und über das Spülen der Schleuse mit Stickstoff durch letzteren ersetzt werden. Danach wurde für 30 Minuten Argon über einen Glasstab mit einer Gasfritte durch den Puffer geleitet.

6.2.1 Qualitativer Hydrogenasetest (Wasserstoffspaltungsreaktion)

Der Vorteil dieses Tests lag darin, dass er schnell und mit geringem Aufwand während eines Aufreinigungslaufes durchgeführt werden konnte, um einzelne Fraktionen von Interesse auf Hydrogenase-Aktivität zu überprüfen. Die in den Test einzusetzende Probenmenge konnte nicht zurückgewonnen werden. Sie war indes so gering, dass die End-Ausbeute an Hydrogenaseprotein nicht signifikant heruntersetzt wurde.

Für den Test wurden 2 ml Probenpuffer, bestehend aus 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 und 3 mM Methylviologen in ein über einen Kremp-Stopfen luftdicht verschließbares Glasgefäß pipettiert. Zu dem Ansatz wurden 50-200 µl Probenvolumen einer zu untersuchenden FPLC-Fraktion gegeben. Das genaue Volumen richtete sich nach der Konzentration der Probe. Da im Laufe der Aufreinigung die Probe zunehmend aufkonzentriert wurde, war zu Anfang der Reinigung ein höheres Volumen zu wählen als in den letzten Aufreinigungsteilen. Nach Zugabe des Probenvolumens wurde das Gefäß luftdicht verschlossen und an einer Gasleitung mit reinem Wasserstoff begast. Nach ca. zwei Minuten war der Ansatz anaerob. Falls Hydrogenase-Enzym im Ansatz enthalten war, spaltete dies das vorhandene Substrat Wasserstoff gemäß: $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.



Abbildung 6.2: Qualitativer Hydrogenasenachweis mittels Farbumschlag von Methylviologen. Probe „2“ enthält DdH-Enzym

Das Methylviologen ist im oxidierten Zustand farblos, während es bei seiner Reduktion zu einem Farbumschlag nach blau-lila kommt. Findet die Wasserstoff-Spaltungs-Reaktion statt, werden dabei Elektronen freigesetzt, welche Methylviologen reduzieren und folglich eine sichtbare Färbung des Ansatzes bewirken [54].

Der Test zeigte nach 5 Minuten an, ob eine Fraktion Hydrogenaseprotein enthielt oder nicht und wurde entsprechend standardmäßig zur Beurteilung der Aufreinigungsläufe herangezogen.

6.2.2 Quantifizierbarer Hydrogenasetest

Neben dem rein qualitativen Nachweis der Hydrogenase über einen Farbumschlag konnte die Aktivität des Enzyms und somit die Abnahme des in der Lösung gelösten Substrates Wasserstoffs auch direkt gemessen werden. Dies wurde durch die polarographische Messung mittels eines selbstgebauten Hydrographen durchgeführt [55]. Der grundlegende Aufbau des Gerätes folgte dabei dem einer Clarkschen Sauerstoffelektrode [59]. Die Messanordnung bestand im Einzelnen aus einer Platin-Anode und einer Silber-Kathode mit einer angelegten Potentialdifferenz von +600 mV. Mittels einer Teflon-Membran wurden die mit halbgesättigter KCl-Lösung in Kontakt gehaltenen Elektroden von der Probenlösung getrennt. Eine Abbildung der Meßkammer ist in Kapitel 6.3.5 zu sehen (Abbildung 6.17).

Die verwendeten Lösungen sind im Kapitel 4, „Verwendete Materialien“ beschrieben. Zur Messung wurde 1,2 ml 10 mM Tris-Puffer, pH. 7,2 mit 30 µl Benzylviologen-Lösung gemischt und diese Lösung in die Messkammer gegeben. Benzylviologen diente als Akzeptor für die bei der Reaktion freiwerdenden Elektronen. Durch Zugabe von 5 µl NaDT wurde der Elektronenakzeptor Benzylviologen reduziert.

Ähnlich wie beim zuvor beschriebenen qualitativen Test mit Methylviologen als Indikatorstoff war auch hier die Reduktion anhand eines auftretenden Farbumschlags erkenntlich. Das Substrat Wasserstoff wurde über die Zugabe von 100 µl wasserstoffgesättigtem Tris-Puffer zugesetzt. Die Wasserstoffsättigung war graphisch als zeitlich gleichbleibender Spannungswert („Plateau“) erkennbar. Aufgrund der angelegten Polarisationsspannung wurde an der Anode der Wasserstoff zu Protonen und Elektronen oxidiert, wobei sich der Umsatz mit zeitlich konstanter Rate vollzog.

Bei Zugabe hydrogenasehaltiger Probe trat in Konkurrenz zu dieser Reaktion die Wasserstoffoxidation der Hydrogenase, was zu einem Absinken der aufgezeichneten Spannung führte. Über die graphisch auswertbare Sinkrate konnte die Konzentration aktiven Enzyms näherungsweise bestimmt werden.

Da dieser Test einerseits einen größeren zeitlichen und apparativen Aufwand bedeutete, andererseits die graphisch nachvollzogene Wasserstoffoxidation quantifizierbar war, wurde dieser Test entweder dann herangezogen, wenn der qualitative Test keine eindeutige Aussagen über die Verteilung der Hydrogenase in den Fraktionen zuließ oder die Enzymaktivität mit der anderer Hydrogenasen verglichen werden sollte.

Hervorzuheben ist bei diesem Aufbau des Weiteren, dass eine Wasserstoffevolution auf gleiche Weise gemessen werden kann. In diesem Fall würde es zu einem weiteren Anstieg der Potentialspannung bis zum Erreichen eines neuen Plateauwertes kommen. Die Steigrate dieses Vorgangs kann dann ebenfalls zur quantitativen Auswertung des Umsatzes herangezogen werden. Der Hydrograph ist also ohne apparative Änderungen für alle vorkommenden Hydrogenasen gleich gut geeignet.

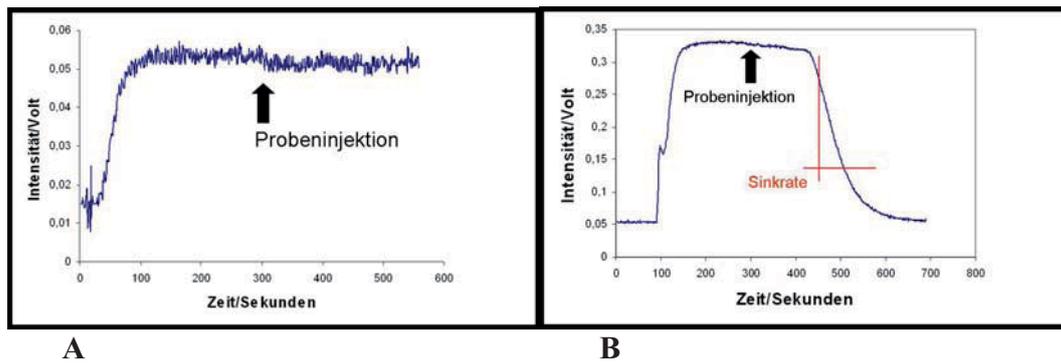


Abbildung 6.3: Hydrograph-Messungen; bei Erreichen eines konstanten Intensitätswertes nach einer ersten Äquilibrierungsphase des Systems wird dem System wasserstoffgesättigter Puffer zugegeben. Die Sättigung des Systems wird als Intensitätsplateau gemessen (a: 0,055, b: 0,34). Die Probeninjektion wird durch ein leichtes Absinken des Plateaus sichtbar. Dies ist auf die Verdünnung der Messlösung durch die Zugabe zurückzuführen. Befindet sich Hydrogenase-Enzym in der Probenlösung (Fall B), wird der gelöste Wasserstoff durch diese gespalten und das Mess-Signal sinkt ab. Die unterschiedlichen Intensitätsbereiche in beiden Messungen sind durch einen unterschiedlich hohen Verstärkungsfaktor des Signals begründet.

Die Enzymaktivitäten wurden berechnet mit:

$$\frac{Y_2}{Y_1} * \frac{40 * 10^{-6} \text{ Mol H}_2}{L} * \frac{1,5 * 10^{-3} L}{\text{Zeit}(\text{H}_2 \text{ Abnahme})} * \frac{60}{\text{Pr obenvolumen}} = \frac{\text{Mol}}{\text{Minute} + \text{mL}}$$

Y_2 bezeichnet die Differenz zwischen tatsächlicher Null-Linie und Sättigungsplateau (Die Differenz der elektrischen Spannung vor und nach Injektion H_2 -gesättigten Puffers). Y_1 ist die Spannungsdifferenz zwischen der maximal erreichbaren Spannungsintensität bei H_2 -Sättigung und dem spannungslosen Zustand. Das Produkt $\frac{Y_2}{Y_1}$ ist somit ein Korrekturfaktor.

$40 * 10^{-6}$ Mol H_2 ist die maximale H_2 -Konzentration (Sättigung in Lösung) pro Liter.

$1,5 * 10^{-3}$ Liter ist das Gesamtvolumen der Meßkammer.

Zeit: Zeitspanne des H_2 -Konzentrations-Abfalls nach Probeninjektion („X“-Wert des Steigungsdreiecks) in Sekunden. 60: Umrechnungsfaktor in Minuten.

6.2.3 1. Säule: Anionen-Austausch-Chromatographie

Als erster chromatographischer Schritt der Aufreinigung wurde eine Anionen-Austausch-Chromatographie durchgeführt. Bei dieser Methode wird eine Auftrennung des Proteingemisches über die Ausnutzung der Eigenladung der Proteine erreicht. Letztere ist

von Protein zu Protein verschieden und setzt sich als Nettoladung aus den Teilladungen der exponierten Aminosäure-Seitenketten zusammen. Während des Laufes binden die Proteine des Probengemisches über ionische Wechselwirkungen an das durch seine funktionellen Gruppen ebenfalls ionische Ladungen bereitstellende Material der Chromatographie-Säule. Neutrale oder positiv geladene Proteine werden nicht gebunden und über einen Waschschrift mit salzfreiem Puffer entfernt. Die ionisch gebundenen Proteine können dann sukzessive über einen Ionengradienten eluiert werden. Bei stetiger Steigerung der Salz-Konzentration werden die gebundenen Proteine kompetitiv verdrängt, wobei schwach gebundene Proteine zuerst und stark gebundene erst bei höheren Salzkonzentrationen eluieren. Zu beachten ist hierbei, dass die Nettoladung und damit die Bindungsstärke des Proteins pH-wertabhängig sind, bei der Ionenaustausch-Chromatographie ist deshalb noch mehr als bei anderen Chromatographie-Arten auf einen konstanten pH-Wert zu achten. Alternativ kann zur Elution gebundenen Proteinmaterials an die Säule somit auch der pH-Wert graduell verändert werden [56]. In diesem Versuchsteil wurde die Auftrennung jedoch über den erwähnten Salz-Gradienten erreicht.

Die Zielsetzung des ersten chromatographischen Schrittes bestand darin, eine erste Trennung des zu diesem Zeitpunkt noch sehr heterogenen Präzipitats zu erreichen.

Wichtig dabei war es, ein Überladen des Säulenmaterials zu verhindern. Dieses hätte zum Verlust eines Teils der Hydrogenase geführt, welche zu einem bestimmten Anteil gleichmäßig in der Probenlösung vorhanden ist. Da die Gesamtproteinmenge im Präzipitat noch sehr hoch war, mussten das Chromatographiematerial und die Größe der Säule entsprechend so gewählt werden, dass alles Protein binden konnte.

Bei Etablierung des Aufreinigungsprozesses wurde eine DEAE 52 Cellulose Chromatographie-Säule von Servacel verwendet. Diethylaminoethyl ist ein schwacher Anionenaustauscher, welcher über einen pH-Bereich von 2 bis 9 Substanzauftrennungen ermöglicht. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um eine XK26/40-Säule (Abmessungen: 2,6*40 cm) mit einem Materialvolumen von ca. 180 ml. Vor dem Auftrag musste die Probe vom ursprünglichen Präzipitatsvolumen (ca. 180 ml) auf etwa 40 bis 50 ml eingeeengt werden, um eine vollständige Bindung der Probe zu gewährleisten.

Es war dabei darauf zu achten, dass die Aufkonzentrierung der Probe zu einer nicht zu viskosen Konsistenz führte, da diese in den vorhandenen Schlauchverbindungen zu Fließbeeinträchtigungen und unerwünschten Überdrücken im System geführt hätte. Bei Auftreten von Präzipitationen wurde die Probe für einige Zeit mit einem Rührfisch gerührt.

War die Probe optisch homogen, konnte der Probenhalter befüllt und der Aufreinigungslauf gestartet werden.

Nach dem Equilibrieren der Säule mit dem zweifachen Säulenvolumen an Nidrigsalzpuffer (siehe Kapitel 4, verwendete Materialien) wurde die Probe aufgetragen. Nicht gebundene Bestandteile des Präzipitats wurden über einen Waschschrift mit dem zweifachen Säulenvolumen an Nidrigsalzpuffer entfernt. Die weiteren Einstellungen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Lauf-Parameter der Anionen-Austausch-Chromatographie (Säule eins)

IEX-Material: DEAE 52 Cellulose	Ladekapazität: > 0.9 meq/g Trockengewicht
Säule: AmershamXK 26/40	Leervolumen: 200 ml
Maximaldruck	0,5 MPa
Menge Probenauftrag	< 50 ml
Auftrennung	Anionen-Austausch-Chromatographie
Dauer des Laufs	1200-1600 Minuten
Flußgeschwindigkeit	1 ml/Minute
Wasch-Schritt	2 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 50 mM NaCl
Gradient	10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl- 1 M NaCl
Gradientenstufe 1	0% -80%, 2 Säulenvolumen
Gradientenstufe 2	80% -100%, 1 Säulenvolumen
Fraktionsvolumen	12 ml

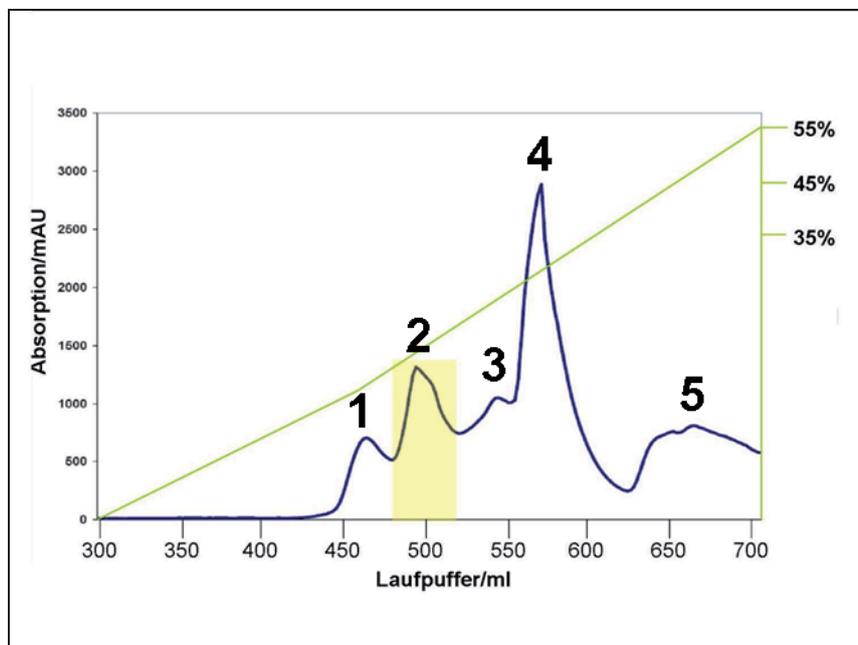


Abbildung 6.4: Aufreinigungs-Chromatogramm der ersten Säule (DEAE52). Die Hydrogenase enthaltenden Fraktionen sind gelb unterlegt. Einzelheiten siehe Text

In Abbildung 6.4 ist ein typischer Chromatographielauf dieser Säule abgebildet.

Dieser Ausschnitt zeigt fünf verschiedene Signale, welche sich auch farblich stark von einander unterscheiden. Von links nach rechts weisen die Peaks folgende Farbverteilung auf: klar, braun, grün, klar. In Abbildung 6.5 sind Fraktionen der Signale zwei und drei zu sehen. Über die anfangs beschriebenen Tests nach Hydrogenaseaktivität konnten die Fraktionen mit bräunlicher Färbung als aktiv charakterisiert werden.



Abbildung 6.5: Farbunterschiede der aufgetrennten Fraktionen

Aus dem Chromatographielauf ist ersichtlich, dass die Hydrogenase zwar in dem zweiten Peak konzentriert wird, jedoch sowohl das vorausgehende wie auch das nachfolgende Signal als Kontamination in diesen hinein laufen. Darüber hinaus gibt es innerhalb des Hydrogenasepeaks eine kleine Schulter an der rechten Flanke, welche ebenfalls eine weitere Proteinspezies darstellt.

Ein weiteres interessantes Charakteristikum dieses Chromatographielaufes stellt der Signalpeak drei dar, welcher sein Maximum bei ca. 570 ml Laufpuffer hat. Dieser Peak weicht in starkem Maße von der idealen chromatographischen Signalform der gaußschen Glockenkurve ab und entspricht in seiner Form einem „vorausilenden“ (fronting) Peak. Ein möglicher Grund für dieses Phänomen ist ein Überladen der Säule bzw. das Erreichen der maximalen Bindekapazität.

Abbildung 6.6 zeigt ein SDS-Gel mit Proben einer typischen Aufreinigung. Das Vorgehen zur SDS-Gel-Elektrophorese ist in Kapitel 3.2 beschrieben.

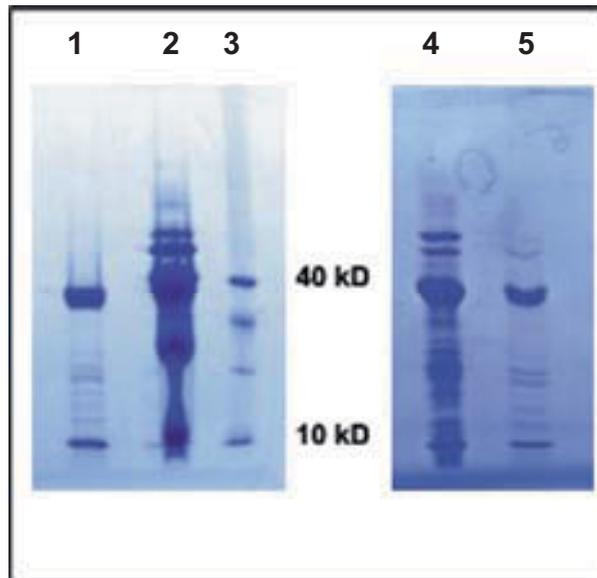


Abbildung 6.6: SDS-Protein-Gelbild:

In den Spuren eins und fünf sind Proben zweier Anionen-Austausch-Läufe zu sehen. Zur Veranschaulichung der Abtrennungsleistung sind in beiden Fällen Proben des Dialysats mit aufgetragen (Spuren zwei und vier). Spur drei zeigt den Proteingrößenstandard.

Mit Hilfe der SDS-Elektrophorese kann die Reinheit einer Probe bzw. die Aufreinigungsleistung eines Präparations-Schrittes abgeschätzt werden. Abbildung 6.6 zeigt in der äußerst rechten Spur die aufgetrennte Probe eines DEAE-52-Laufes.

Anhand des Markers (dritte belegte Spur von links) können die aufgetrennten Proteinbanden größenmäßig zugeordnet werden. Die am stärksten ausgeprägte Bande liegt auf einer Höhe von ca. 40 kDa. Eine weitere prägnante Bande befindet sich auf einer Höhe von ca. 10 kDa. Die Banden sind der großen und kleinen Untereinheit des Hydrogenase-Enzyms zuzuordnen. Die Separierung der beiden Untereinheiten trat in allen durchgeführten Elektrophoreseläufen auf und ist auf die denaturierende Wirkung des Detergens' SDS zurückzuführen.

Im zwischen diesen beiden Größen liegenden Bereich sind sechs weitere Banden zu erkennen. Des Weiteren ist eine definierte Bande im höhermolekularen Bereich (ca. 60 kDa) auszumachen.

Zur Abschätzung der an diesem Punkt erreichten Aufreinigung wurde in der Spur links neben der DEAE-52-Probe eine Probe des Dialysats mit aufgetragen. Das Auftrennungsmuster dieser Probe macht deutlich, dass speziell im Größenbereich zwischen 40 und 10 kDa eine Reihe von Proteinbanden vorhanden ist, welche über den ersten Säulenlauf abgetrennt werden konnten.

Jedoch verbleiben noch mehrere Proteinbanden, welche als Kontamination in die weiteren Aufreinigungsschritte hinein verschleppt werden. Im vorliegenden Chromatogramm wird zudem deutlich, dass durch eine bessere Separation der Peaks der Anteil kontaminierenden Proteinmaterials noch verringert werden kann.

Zu diesem Zweck wurden statt des bisherigen DEAE 52-Cellulose-Säulematerials eine Reihe verschiedener Anionen-Austauschmaterialien, wie z.B. DEAE Toyopearl getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit DEAE Sephacel-Material erzielt.

Außerdem wurde der Säulenkörper gewechselt; Statt einer relativ dünnen Säule mit einem Innendurchmesser von 2,6 cm wurde fortan eine XK-50-Säule von GE Healthcare mit einem Innendurchmesser von 5 cm verwendet. Durch die größere Querschnittsfläche können Binde- und Verdrängungsvorgänge schneller von Statten gehen und die auftretenden Peaks verlaufen schmaler. Auch wies die Säule bei größerer Bindekapazität des Materials ein leicht größeres Volumen auf, so dass Überladungseffekte ausgeschlossen werden konnten.

Mittels der erwähnten Maßnahmen konnte eine bessere Separation des Hydrogenasepeaks und in der Konsequenz eine Verbesserung der Reinheit erzielt werden. Abbildung 6.7 zeigt einen Chromatographielauf nach den vorgenommenen Veränderungen.

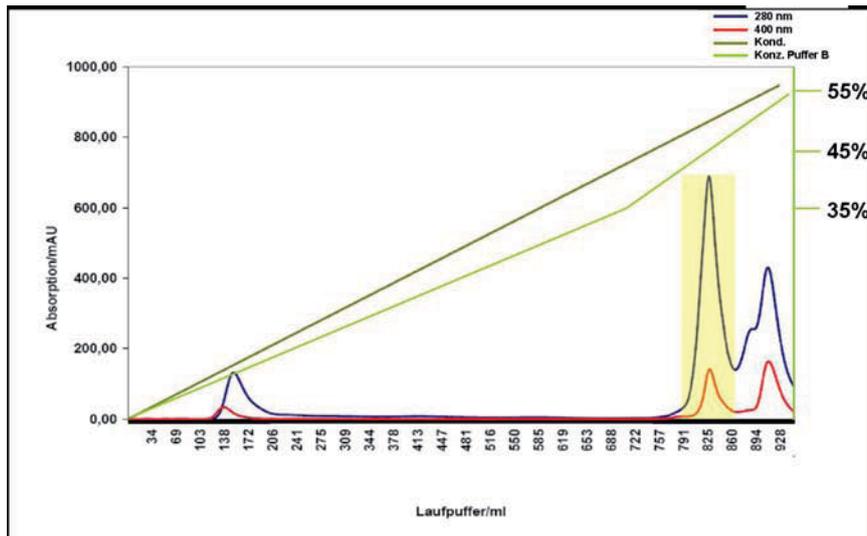


Abbildung 6.7: Aufreinigungs-Chromatogramm der optimierten ersten Säule (DEAE Sephacel, XK50). Die Hydrogenase enthaltenden Fraktionen sind gelb unterlegt. Blau: Absorption bei 280 nm, Rot: Absorption bei 400 nm, Einzelheiten siehe Text

Vor allem weist dieser Peak jedoch auf seiner linken Flanke keine Schulter auf, wie dies im Säulenlauf mit DEAE 52-Material der Fall war.

Noch vorhandene Kontaminationen dieses Peaks rühren vor allem von der deutlich erkennbaren Schulter auf der rechten Flanke des nächsten Signals her. Jedoch ist auch zwischen diesen beiden Peaks ein akzeptabler Abstand erreicht, zumal die linke Flanke des nächsten Signals stark abfällt, während sie bei den Läufen der anderen Säule sehr viel flacher war und somit in den Hydrogenase-Peak in größerem Maße hineinlief.

Im Vergleich zum zuvor gezeigten Chromatographielauf wird ebenfalls deutlich, daß der aktive Peak eine weitaus niedrigere Absorption bei 280 nm Wellenlänge hat (ca. 700 mAU gegenüber ca. 1300). Da jedoch bis zu diesem Schritt das Aufreinigungsprotokoll in beiden Fällen unverändert war und auch eine annähernd gleiche Zellmenge für beide Präparationen eingesetzt worden war, ist dies auf die verbesserte Abtrennung des Hydrogenase-Peaks von anderen Peaks zurückzuführen.

Der Aufreinigungsfortschritt spiegelt sich ebenfalls wider im Vergleich der beiden SDS-Elektrophoresegele (Abb.6.6). Die erste Spur von links zeigt hier die Probe eines repräsentativen Ionenaustauschlaufes nach den Verbesserungen. Rechts davon ist wiederum zum Vergleich eine Probe des Dialysats aufgetragen, welches in diesem Lauf aufgereinigt wurde. Dieses zeigt ein identisches Bandenmuster zum Dialysat des DEAE-52-Laufes (vierte Spur von links). Der direkte Vergleich beider aufgereinigter Proben des ersten Laufs macht

deutlich, dass weiterhin kontaminierende Proteinspezies vor allem im Größenbereich zwischen 10 und 40 kDa auftreten, während die Proteine im höhermolekularen Bereich erfolgreich abgetrennt werden konnten, obwohl diese in beiden Dialysatproben sehr präsent sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorgenommenen Änderungen sowohl zu einer besseren chromatographischen Selektivität (Peakabstände) als auch Effizienz (schmalere Peakform) geführt haben und somit die Separationsleistung dieses Teilschrittes optimiert werden konnte.

Die in den Aktivitätstests positiv getesteten Fraktionen wurden vereinigt und einkonzentriert. Ein Pufferaustausch mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,6) zur Entsalzung der Probe war an dieser Stelle nicht nötig, da es sich bei der nächsten Säule um eine Gelfiltrations-Säule handelte. Weil hierbei keine Bindungen mit dem Säulenmaterial eingegangen werden, sondern stattdessen das Probengemisch anhand der Molekulargröße seiner Bestandteile aufgetrennt wird, lag somit vielmehr die Probe nach dem zweiten Säulenlauf bereits entsalzt vor.

6.2.4 2. Säule: Gelfiltrations-(Größen-Ausschluß)-Chromatographie

Im Unterschied zur Ionenaustauschchromatographie werden bei der Gelfiltration keine Bindungen zwischen Probe und Trägermaterial eingegangen. Vielmehr besteht das Trägermaterial aus einer porösen Gelmatrix mit definierter Partikel- und Porengröße, über die das im Laufpuffer gelöste Probenmaterial mit gleichbleibender Geschwindigkeit gepumpt wird. Proteine mit einer Größe, welche geringer ist als die Porengröße des Matrixmaterials können die Materialpartikel durchfließen und erfahren dadurch eine Verzögerung (Retention), während Probenbestandteile mit einem Durchmesser größer als die Porengröße im Matrixmaterial die Partikel umfließen und schneller eluiert werden. Typische Matrixmaterialien der festen Phase sind Dextrane oder Polystyrol-Partikel. Die Selektivität der Säule wird lediglich durch die Faktoren feste und mobile Phase, pH-Wert sowie Volumen von Säule und Probenmaterial bzw. deren Interaktionszeit miteinander vorgegeben. Grundsätzlich gilt, dass eine längere Elutionszeit, bedingt durch eine geringe Flußrate, zu einer besseren Peakauftrennung führt [56, 57].

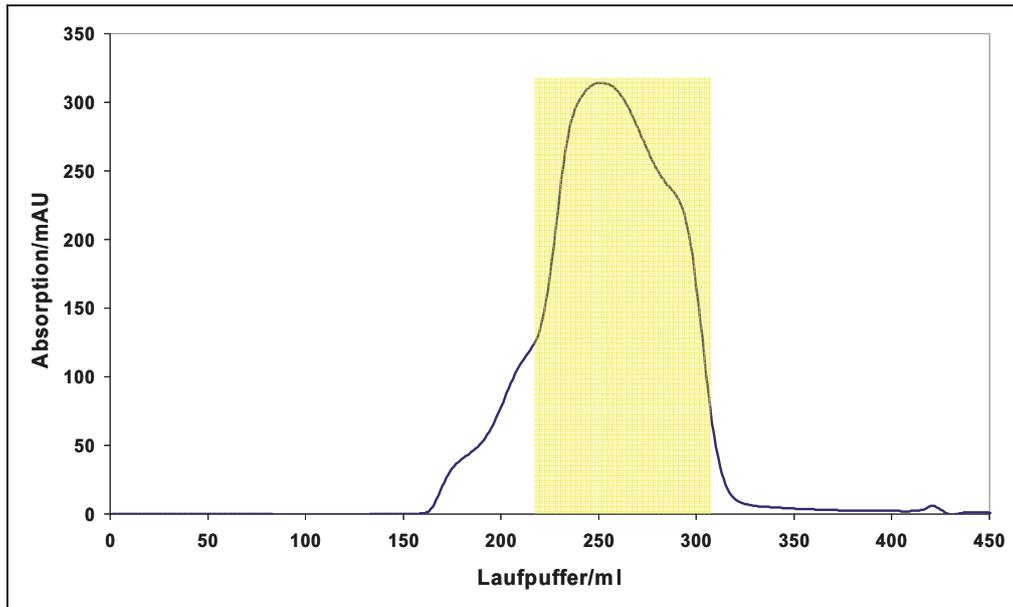


Abbildung 6.8: Chromatographieverlauf der ursprünglich verwendeten Säule Amersham 26/60 in Verbindung mit Sephacryl S200-Material. Enzymatisch aktive Teile des Elutionspeaks sind gelb unterlegt.

Für diesen Lauf wurde ursprünglich eine Amersham-26/60-Säule mit einer Sephacryl S200-Filtrationsmatrix von GE Healthcare verwendet. Dieses Material verfügt über einen idealen Trennbereich von $5 \cdot 10^3$ bis $2,5 \cdot 10^5$ Da. Das Matrixvolumen betrug ca. 320 ml. In Abbildung 6.8 ist ein repräsentativer Aufreinigungslauf dieser Säule dargestellt. Man kann hier insgesamt vier ineinander übergehende Signale unterscheiden. Wie in den vorigen Chromatogrammen sind die Hydrogenaseaktivität aufweisenden Fraktionen gelb unterlegt. Durch diesen Elutionsverlauf ist es somit lediglich möglich, den ersten Peak vollständig und den zweiten Peak teilweise von den aktiven Fraktionen abzutrennen. Das vierte Signal, welches als Schulter auf der linken Flanke des dritten Peaks zu sehen ist, muss ebenso wie der Ausläufer von Signal zwei mit dem dritten vereinigt und auf die nächste Säule aufgetragen werden. Da der dritte und vierte Peak kaum von einander getrennt vorlagen, war es ebenfalls nicht möglich, zu bestimmen, in welchem von beiden DdH eluierte.

Die beste Separierung der einzelnen Signale konnte erreicht werden durch einen Wechsel des Säulenmaterials von Sephacryl S 200 zu einer Superdex 200 Hiload-Matrix. Die Abmessungen der Säule wurden hierbei unverändert gelassen. Der Trennbereich dieses Materials liegt zwischen $1 \cdot 10^4$ und $6 \cdot 10^5$ Da. Ein Chromatogramm mit diesem Material als feste Phase ist in Abbildung 6.9 wiedergegeben. Durch die verbesserte Auftrennung ist es nun möglich, Peak vier als den spezifische Aktivität aufweisenden zu identifizieren.

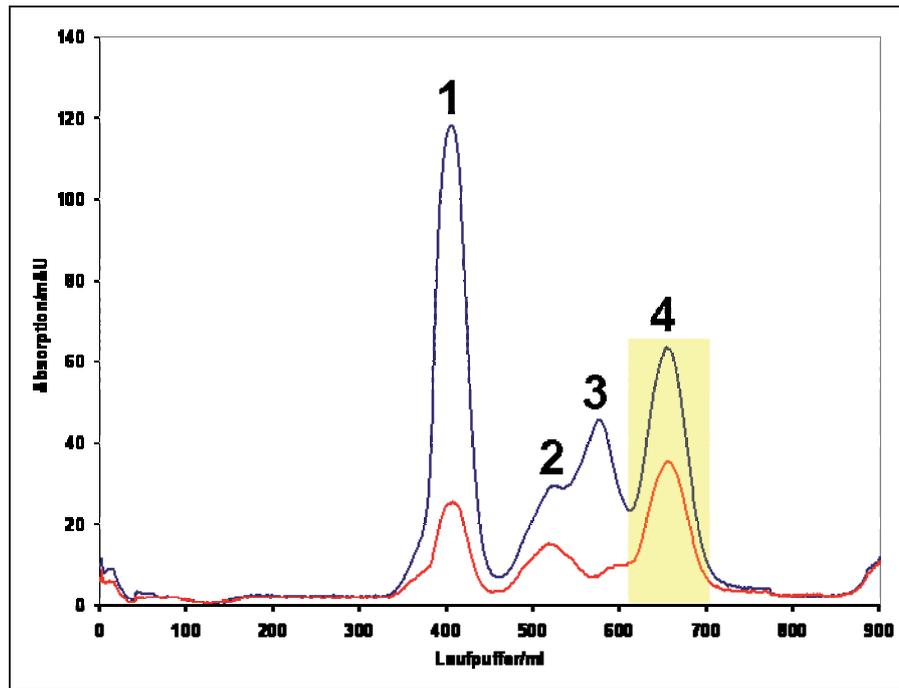


Abbildung 6.9: Gelfiltrations-Chromatographielauf nach Wechsel der Filtrationsmatrix. Der separierte Hydrogenase-Peak ist gelb unterlegt. Blau: Absorption bei 280 nm, Rot: Absorption bei 400 nm

Neben der Auftrennung wird die Probe an diesem Punkt auch entsalzt, da niedermolekulare Salzionen zuerst die Säule durchlaufen und somit abgetrennt werden. Die Probe kann somit ohne ein Umpuffern eingengt und für den letzten Säulenlauf vorbereitet werden.

Zu beachten ist bei diesem Präparationsteil, dass die zeitgleich vorgenommenen Verbesserungen beim ersten Chromatographielauf (Ionen-Austausch-Säule) sich ebenfalls positiv im Chromatogramm dieses Aufreinigungsschrittes niederschlagen, da die Probe beim Auftrag bereits weniger andere Proteinspezies enthält.

6.2.5 3. Säule: Kationen-Austausch-Chromatographie

Analog zur Aufreinigung über die zuvor erwähnte Anionenaustauschersäule findet auch bei der Kationen-Austausch-Chromatographie die ionische Wechselwirkung zwischen Proteinprobe und Trägermaterial Anwendung. Das bedeutet, dass, wie auch bei der Anionen-Austausch-Chromatographie das Proteingemisch anhand der unterschiedlichen Bindungsstärke zum Säulenmaterial aufgetrennt wird. Hier stellt jedoch die Säulenmatrix negativ geladene funktionelle Gruppen wie Carboxymethyl oder Sulfopropyl, zu denen dann entsprechend ionische Bindungen mit positiv geladenen Aminosäureseitenketten eingegangen werden

In allen mit dieser Säule durchgeführten Aufreinigungsläufen war der Hydrogenase-haltige Peak ausreichend weit von anderen vorhandenen Signalen des Chromatogramms entfernt. Dies bedeutete, daß die zu Anfang des Optimierungsprozesses in der aufgereinigten Probe vorhandenen Verunreinigungen in diesem Säulenlauf gleichzeitig mit der Hydrogenase

eluierten und über eine Veränderung des Säulenmaterials nur schwer von dieser zu trennen sein würde. Aus diesem Grund, und da es ein logisches Vorgehen war, die Präparation „von vorne“ zu optimieren (Verbesserungen im ersten Säulenlauf spiegeln sich in den darauf folgenden wider), wurde dieser Lauf während der gesamten Optimierungsphase nicht verändert. Die Fortschritte der beiden ersten Säulen führten zu hochreinem Protein, welches sich in den vorgenommenen Qualitätstests (MALDI-TOF-MS, Proteingel-Elektrophorese, FT-IR-Spektroskopie) als frei von unerwünschten Beimischungen erwies.

Für diesen dritten Säulenlauf kam zur Anwendung eine Biogel HTP-Matrix von Biorad auf Basis von Hydroxyapatit ($[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$). Da zu diesem Zeitpunkt bereits ein Großteil der anderen Proteine entfernt war und sich somit die Gesamtproteinmenge drastisch verringert hatte, war eine XK16-Säule mit einem Volumen von 30 ml und einem Durchmesser von 1,6 cm ausreichend, um eine vollständige Bindung der Probe an die feste Phase zu gewährleisten.

Abbildung 6.10 zeigt einen typischen Lauf nach Optimierung der vorigen Säulen. Das aktive Signal ist wiederum gelb unterlegt.

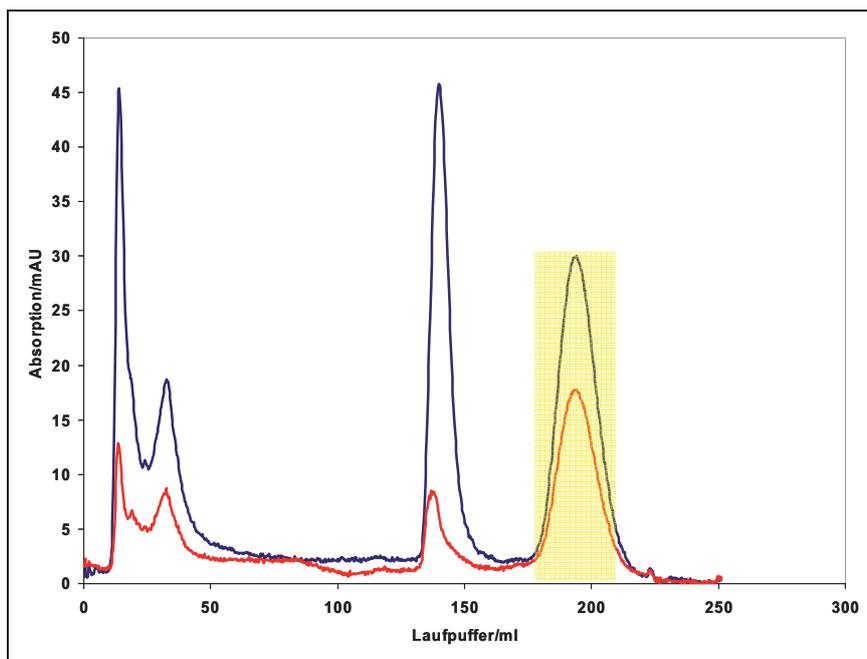


Abbildung 6.10: Chromatographielauf der dritten Säule; Biogel HTP-Kationen-Austausch-Material. Der hydrogenase-haltige Peak ist hinreichend von den übrigen vorhandenen Signalen getrennt.

Blau: Absorption bei 280 nm, Rot: Absorption bei 400 nm

Die entsprechenden Fraktionen wurden eingengt und mittels einer PD-10-Sephadex-Schwerkraft-Säule umgepuffert. Der zur Lagerung der Probe ausgewählte Puffer war in allen Fällen 10 mM Tris/HCl, pH 7,6.

Das Endvolumen betrug standardmäßig 50 μl .

In Tabelle 6.2 sind die Ausbeuten einiger typischer Aufreinigungsläufe nach den vorgenommenen Optimierungen zusammengefasst.

Zum besseren Vergleich sind die Ausbeuten in der äußerst rechten Spalte gegen eine Zellmenge von 100g normalisiert. Die Ausbeuten wurden anhand aufgenommener UV/VIS-Spektren berechnet (siehe 6.3.1, UV/VIS -Spektroskopie).

Tabelle 6.2: Typische Ausbeuten aus optimierten Chromatographieläufen

Aufreinigung Nr.	Zell-Ausgangsmenge	Ausbeute	Ausbeute/100g Zellen
V62	104g	0,8mg	0,7mg
V65	50g	0,9mg	1,8mg
V66	108g	1,72mg	1,59mg
V69	90g	1mg	1,1mg
V70	62g	1mg	1,6mg
V71	64g	1,79mg	2,8mg
V74	99g	2mg	2mg
V75	100g	0,96g	0,96g
V78	87g	1,16mg	1,4mg

Die Schwankungen in den Ausbeuten sind für eine Protein-Präparation aus einem natürlichen Expressions-System geringfügig und lassen sich durch leichte Abweichungen während der Zellanzucht begründen, welche durch die apparativ zugänglichen Parameter nicht erfasst werden konnten.

6.3 Reinheitsbestimmung

6.3.1 UV/VIS-Spektroskopie

Direkt nach dem jeweiligen Aufreinigungslauf wurde ein Zehntel der Probe eingesetzt, um in einem UV/VIS-Spektrometer vermessen zu werden.

Bei der UV/VIS-Spektroskopie werden elektronische Übergänge angeregt, deren Anregungswellenlängen im Bereich von ca. 100 bis 760 nm liegen.

Detektiert wird dabei die Absorption A der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung. Diese ist definiert als die Differenz zwischen einfallender und aus der Meßlösung austretender Strahlung und ist über das Lambert-Beersche Gesetz mit der Konzentration des

absorbierenden Stoffes verknüpft:

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

Hierbei ist I_0 die einfallende und I die austretende Strahlungsintensität, c die Konzentration, d die Durchtrittsbreite der Strahlung durch die Messlösung, in der Praxis die Schichtdicke der verwendeten Probenküvette und ε der molare Absorptionskoeffizient, eine für die Probe spezifische Stoffkonstante.

Für die durchgeführten Messungen wurde standardmäßig ein Zehntel der auf 50 μ l eingengten aufgereinigten Probe in einer 1ml-Probenküvette mit 995 μ l 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,6 gemischt und ein kontinuierliches Spektrum zwischen 250 und 800 nm aufgenommen. Zuvor war mit selbigem Puffer ein Nullabgleich vorgenommen worden. Abbildung 6.11 zeigt ein Spektrum der Präparation V40:

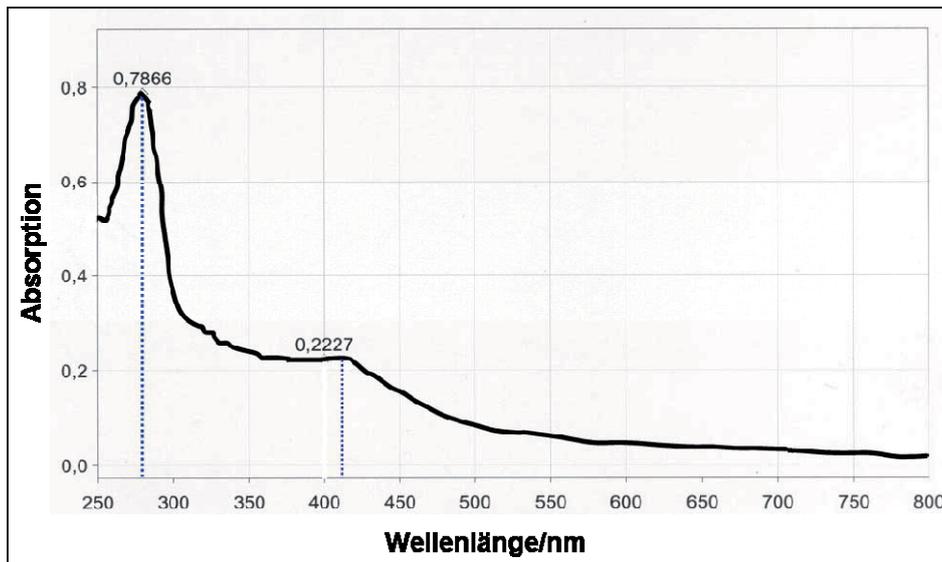


Abbildung 6.11: UV/VIS-Spektrum aufgereinigten Hydrogenase-Enzyms
Die Absorptionen bei 280 nm und 410 nm sind eingetragen

Da der Extinktionskoeffizient ε für das DdH-Protein bestimmt werden konnte [52], war es folglich leicht möglich, die Konzentration der aufgereinigten Proben zu bestimmen; Die Absorption bei 280 nm rührt von den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin her, welche in unterschiedlichen Anteilen in jedem Protein vorkommen. Bei 410 nm absorbieren die [Fe-S]-Cluster, welche als Nicht-Protein-Bestandteil im DdH-Enzym vorhanden sind. Im Folgenden sei die Berechnung der Konzentration anhand des gezeigten Spektrums der Aufreinigung V40 kurz beschrieben:

Bei einer Wellenlänge von 410 nm wird eine Absorption von 0,2227 gemessen.

Da von der ursprünglichen Probe 5 μ l in 995 μ l H_2O gelöst wurden, betrug der Verdünnungsfaktor 1:200. Der Extinktionskoeffizient ε_{410} ist angegeben mit $52,5 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$.

Die Konzentration berechnet sich somit folgendermaßen:

$$c = \frac{0,2227 * 200}{52\,500} = 8,4 * 10^{-4} \text{ M} = 840 \mu\text{M}$$

Daraus kann nach: $n = c * v$ die Stoffmenge berechnet werden mit:

$$n = 840 \mu\text{M} * 50 \mu\text{l} = 4,2 * 10^{-8} \text{ Mol}$$

Die Gesamtmenge an Protein ergibt sich dann nach: $m = n * M$ zu:

$$m = 4,2 * 10^{-8} \text{ Mol} * 53\,000 = 2,18 * 10^{-3} \text{ g} = 2,18 \text{ mg}$$

Neben der Konzentrations- bzw. Mengenbestimmung stellen die standardmäßig nach den Aufreinigungsläufen vorgenommenen UV/VIS-Spektren eine weitere Kontrolle des Reinheitsgrads dar. Um letzteren zahlenmäßig zu erfassen, hat es sich als praktikabel erwiesen, diesen als Quotienten der Absorption bei 280 und 410 nm auszudrücken:

$$A_{410} / A_{280}$$

Hierbei können erfahrungsgemäß Proben mit Werten im Bereich zwischen 0,36 und 0,38 als rein gelten.

Die zur UV/VIS-Messung eingesetzten Probenanteile konnten wieder eingengt und beispielsweise für die hydrographischen Messungen oder FT-IR-Testmessungen eingesetzt werden, da die Messung zerstörungsfrei ist.

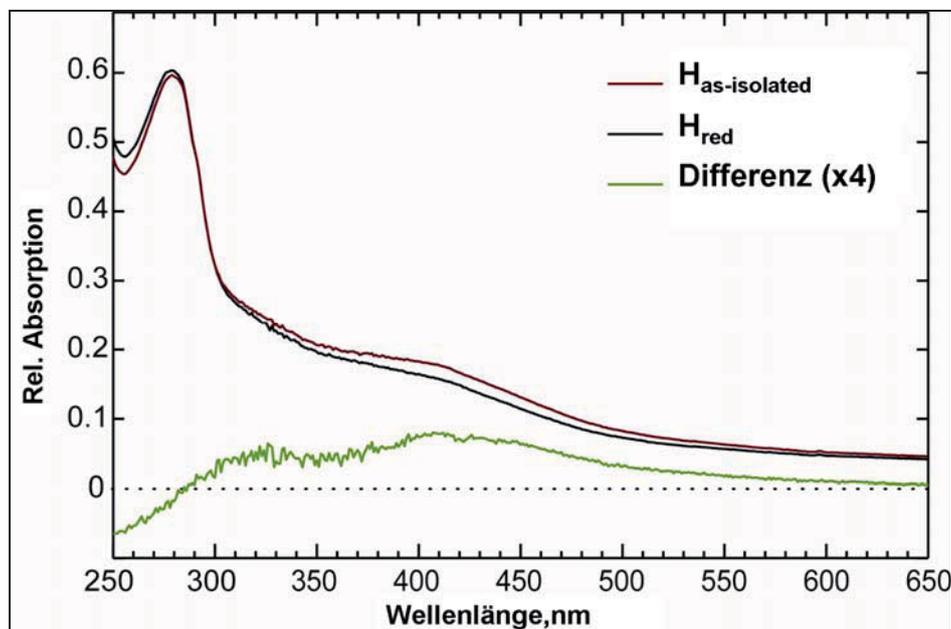


Abbildung 6.12: Vergleich der Absorptionen von reduzierter und „as-isolated“-oxidierte Probe

Wie aus Abbildung 6.12 ersichtlich ist, kann die Aufnahme eines UV/VIS-Spektrums auch zur Kontrolle einer erfolgten Reduktion des Proteins genutzt werden. In Abbildung 6.12 wurde die gleiche Probe zuerst im „as-isolated“-, also einem sauerstoff-oxidierten Zustand und anschließend im reduzierten H_{red} -Zustand vermessen. Der Vergleich beider Spektren zeigt eine Abnahme der Absorption bei 420 nm. Dies ist auf die Reduktion der bei dieser Wellenlänge absorbierenden [FeS]-Cluster zurückzuführen. Das Differenzspektrum offenbart zudem eine weitere Absorptionsabnahme bei ca. 320 nm, welche durch die Reduktion des H-Clusters verursacht wird. Diese Kontrollmöglichkeit des eingestellten Redoxzustands stellt eine Ergänzung zur Kontrolle über die Aufnahme eines FT-IR-Spektrum (Abschnitt 6.3.4) dar.

6.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Page ist ein elektrophoretisches Verfahren, mit dem Proteingemische in einem Trenngel separiert werden. Die Proteine wandern bei Anlegen einer Gleichspannung in einer Gelmatrix, welche aus Polyacrylamid besteht. Der Zusatz des anionischen Detergens' SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) dient hierbei dazu, die Eigenladung der Proteine abzuschirmen. In der Folge tragen dadurch alle Proteine die gleiche negative Ladung pro Masseneinheit, was anstelle eines ladungsabhängigen zu einem größenabhängigen Auftrennungsmuster im Trenngel führt [57, 58].

Mittels eines mitgelaufenen Proteinmarkers ist es dann möglich, die Größen der in einzelnen Banden aufgetrennten Proteine zu bestimmen. Durch die SDS-Gabe werden in vielen Fällen auch heteromere Proteine in ihre Untereinheiten getrennt, was bei der Bandenzuordnung beachtet werden muss.

Die einzusetzende Menge an Probe richtete sich nach dem Aufreinigungsgrad und betrug zwischen 10 μ l für Proben aus den ersten Präparationsschritten und 1 μ l für reines Protein. Diese wurden mit jeweils 8 μ l SDS-haltigem Probenpuffer (siehe Kapitel 4, „Verwendete Materialien“) gemischt und für 10 Minuten in Eppendorfgefäßen aufgeköcht. Von diesem Ansatz wurden ca. 2 μ l mittels eines Spezialkammes auf ein vorgefertigtes Trenngel aufgetragen. In den meisten Fällen war die Auftrennung optimal bei der Wahl von Gelen mit einem 10-15%-Acrylamid-Gradienten. Die Elektrophorese-Einstellungen wurden der Wahl des Gels entsprechend angepaßt. Nach der eigentlichen Elektrophorese konnte das Gel mit Roti-Blue-Färbelösung für mindestens eine Stunde, bei erwarteten Banden schwächerer Intensität auch über Nacht unter leichtem Schütteln angefärbt werden. Danach wurde der überfärbte Gelhintergrund mit Entfärbelösung für mindestens zweimal zehn Minuten wieder aufgeklärt, bis ein möglichst guter Kontrast zwischen Proteinbanden und Gelhintergrund erreicht war.

Das Gel wurde dann über eine 10-minütige Behandlung mit glyzerinhaltiger Konservierungslösung vor der Bildung von Rissen geschützt und konnte danach über Nacht bei 37°C getrocknet, anschließend einlaminiert und elektronisch eingelesen werden.

Ein Beispiel für einen SDS-Lauf mit DdH-Proben zu verschiedenen Aufreinigungszeitpunkten ist im Versuchsteil zum ersten chromatographischen Aufreinigungsschritt (Abbildung 6.6, Abschnitt 6.2.3) abgebildet.

6.3.3 MALDI-TOF-MS

MALDI steht für Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massen-Spektrometrie. Es handelt sich um eine Analysemethode zur Massenbestimmung im Hochvakuum, bei der eine Substanzprobe zuerst ionisiert und anschließend in einem Massenanalysator aufgetrennt wird. Die Auftrennung dabei erfolgt in einer feldfreien Driftstrecke entsprechend dem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z). Nach Ionisierung und Auftrennung der Probenbestandteile werden letztere an einer Detektionseinheit entsprechend ihrer relativen Mengenanteile registriert.

Die Probe wird zuerst in eine geeignete Matrix (z.B. Nicotin- oder Bernsteinsäure) eingebracht. Die Ionisierung von Matrix und Probe wird dann erreicht über den Beschuss mit Photonen (Laserdesorption) und die dadurch erfolgende Verdampfung der Probe. Bei diesem Vorgang werden Protonen von der Matrix auf die Probenmoleküle übertragen, so dass diese dann in kationischer Form vorliegen.

Die entstandenen Ionen werden in einem Messrohr beschleunigt und in der vorliegenden Messmethode nach einer spezifischen Flugzeit (TOF= time of flight), welche abhängig ist vom Masse/Ladungsverhältnis, detektiert. Die im Flugzeitmassenspektrometer gemessenen Zeitverzögerungs- und Intensitätsdaten können dann zusammen mit den bekannten Daten zur Beschleunigungsspannung U und Flugstrecke in ein Massenspektrum umgerechnet werden [56].

Abbildung 6.13 zeigt ein MALDI-Spektrum aufgereinigter DdH-Hydrogenase.

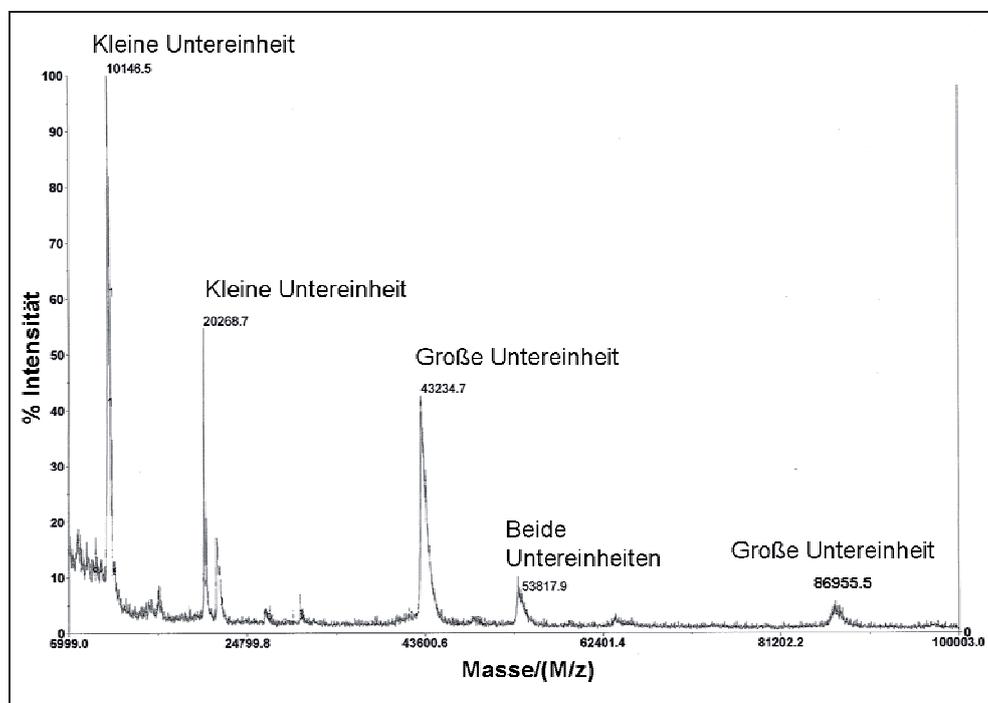


Abbildung 6.13: MALDI-TOF-MS-Spektrum aufgereinigten DdH-Proteins. Die Zuordnung der Banden ist im Text erläutert. Das Auftreten unterschiedlicher Peaks der gleichen Untereinheiten ist auf mehrfach geladene Monomere zurückzuführen. Der apparative Messfehler liegt bei +/- 150 Da.

Neben den einfach geladenen Monomeren bei 10146 Da (kleine Untereinheit) und 43234 Da (große Untereinheit) und einem Peak bei 53817 Da, welcher dem nicht aufgetrennten Heterodimer zuzuordnen ist, sind von beiden Untereinheiten auch doppelt geladene Monomere vorhanden (kleine Untereinheit bei ca. 20 kDa und große Untereinheit bei ca. 90 kDa), was bei MALDI-Spektren größerer Moleküle nicht ungewöhnlich ist. Das Spektrum zeigt, dass keine Kontaminationen anderer Proteine vorhanden sind, da keine anderen außer den genannten Peaks in nennenswerten Intensitäten vorliegen.

Das Spektrum bestätigt somit die in den anderen Versuchsteilen beschriebene hohe Reinheit der aufgereinigten Proben und liegt in guter Näherung zu den aufgrund der Sequenz erwarteten Größen beider Untereinheiten [13].

6.3.4 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)

In der FT-IR-Spektroskopie werden durch Anregung mittels elektromagnetischer Wellen des Infrarotbereiches Molekülgruppen in Schwingung versetzt und letztere anschließend detektiert [15]. Der Bereich infraroter Strahlung schließt sich an den des sichtbaren Lichts an und besitzt Wellenlängen von 760 nm bis 1000 μm .

Der Vorteil gegenüber den anderen Methoden liegt darin, dass erkenntlich wird, in welchen unterschiedlichen Redoxzuständen eine Probe vorliegt. Die für das DdH-Molekül wichtigen CN- und CO-Schwingungen liegen im Bereich zwischen 1800 und 2100 cm^{-1} und können gut nachgewiesen werden. Aufgrund der veränderten Bindungssituation der einzelnen bekannten Redoxzustände kommt es zu charakteristischen Verschiebungen dieser Gruppenschwingungen im Molekül [39]. In dieser Arbeit wurden FT-IR-Spektren darum immer dann aufgenommen, wenn sichergestellt werden musste, dass keine Probenanteile von Proben, welche für weitergehende Messungen ausgewählt wurden, beispielsweise in den H_{ox} -CO-Zustand konvertiert vorlagen. Insbesondere wurde grundsätzlich vor den verschiedenen Isotopenmarkierungen, welche ja stets einhergingen mit der Einstellung der Probe in den EPR-aktiven H_{ox} -Zustand und den sich anschließenden EPR-Messungen, testweise ein FT-IR-Spektrum der jeweils verwendeten Probe aufgenommen. Tabelle 6.3 gibt einen Überblick über die zur Beurteilung der Qualität einer Probe herangezogenen Bandenverschiebungen:

Tabelle 6.3: Bandenpositionen der CO- und CN-Liganden des DdH-Enzyms in verschiedenen Redox-Zuständen

Ligand	Redox-Zustand		
	H_{ox} -Zustand	H_{ox} -CO-Zustand	Überoxidierter Zustand („ $\text{H}_{\text{as-isolated}}$ “)
CO Brücke	1802	1811	1848
CO terminal 1	1965	1963	1983
CO terminal 2	1940	2016 (symm.)	2007
		1972 (asymm.)	
CN terminal 2	2079	2089	2087
CN terminal 1	2093	2096	2106

In der Infrarotspektroskopie ist es üblich, auf der Abszissenachse statt der Wellenlänge λ die Wellenzahl $1/\lambda$ in cm^{-1} anzugeben.

In Abbildung 6.14 sieht man ein Infrarotspektrum einer Probe im überoxidierten „H_{as-isolated}“-Zustand. Zum Vergleich sind außerdem ein Spektrum des H_{ox}-Zustands abgebildet (Abbildung 6.15). Im Vergleich ist die Verschiebung der einzelnen Schwingungsbanden deutlich zu erkennen.

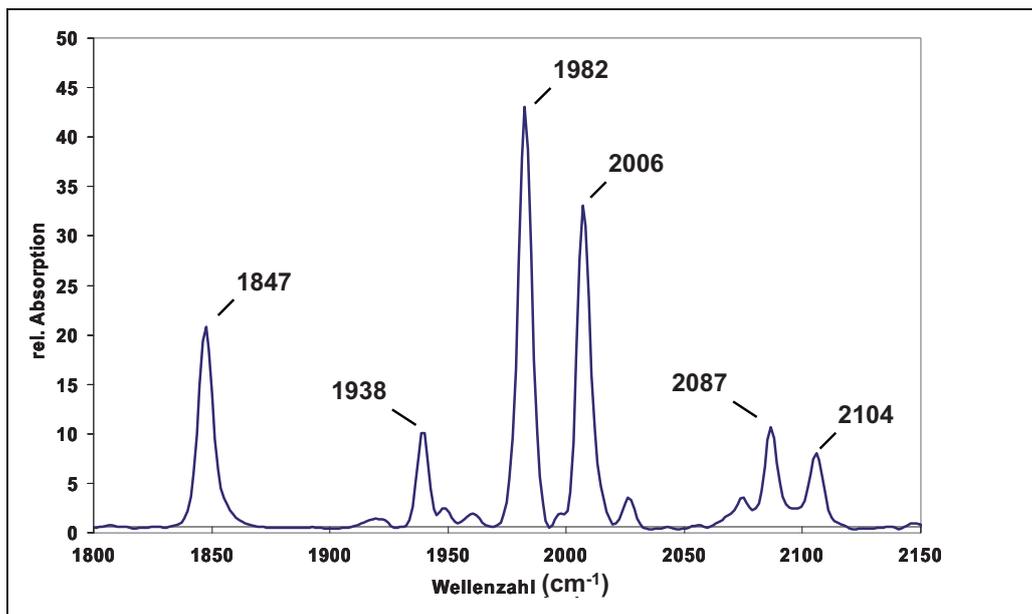


Abbildung 6.14: FT-IR-Spektrum des H_{as-isolated}-Zustandes von DdH

Die Probe wurde vor der Infrarotmessung nicht in einen anderen Redoxzustand überführt und liegt somit im überoxidierten „as-isolated“-Zustand vor. Die aufgenommenen Schwingungen können mit guter Übereinstimmung den Schwingungen dieses Zustands aus der Literatur zugeordnet werden (siehe Tabelle 6.3, rechte Spalte).

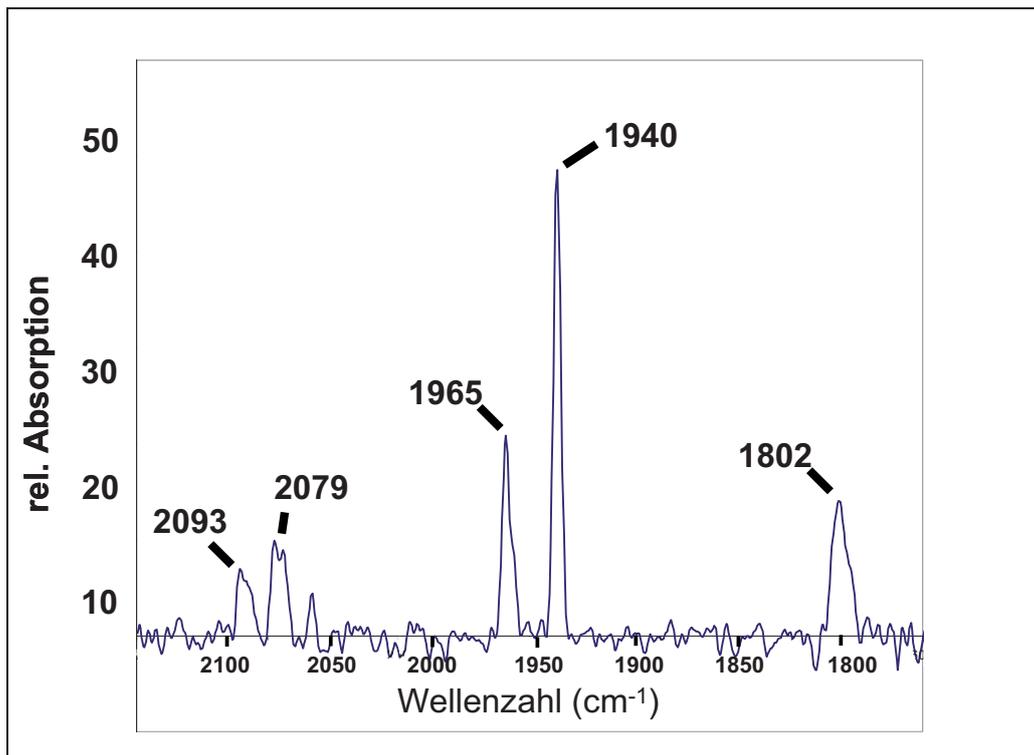


Abbildung 6.15: FT-IR-Spektrum des H_{ox}-Zustandes des DdH-Enzyms.

Die detektierten CN- und CO-Schwingung stimmen in guter Näherung mit den Literaturangaben überein.

6.3.5 Hydrographenmessung: Test der spezifischen Aktivität

Die apparative Anordnung des Hydrographen (Abbildung 6.17) und das Vorgehen zur Messung der spezifischen Aktivität (qualitativer und quantifizierbarer hydrographische Aktivitätstest) sind im Versuchsteil zum ersten Säulenlauf beschrieben und anhand zweier Beispielmessungen erläutert. In allen durchgeführten Messungen zeigte das Enzym Wasserstoffaufnahme-Aktivität.



Abbildung 6.17: Hydrograph: Messkammer mit Elektrode sowie Temperierzuleitung und -ablauf

6.4 Diskussion

Es hat sich gezeigt, dass ein zeitoptimiertes Arbeiten für den Erfolg der Präparation sehr wichtig ist. So wurde bei FPLC-Läufen über Nacht darauf geachtet, die Einstellungen so zu wählen, dass das Enzym möglichst lange auf der Säule verbleibt und sich nach der Elution nur möglichst wenig Zeit bis zum nächsten Aufreinigungsschritt ergibt. Zum einen wird so eine bestmögliche Auftrennung der einzelnen Proteinpeaks erreicht. Vor allem aber liegt das Enzym auf der Säule gebunden geschützt in einer stabilen Matrix vor. Die Veränderungen der ersten beiden Säulenläufe bezüglich der Säulenmaterialien und der Säulenkörper wurden dergestalt gewählt, dass sich die Aufreinigungszeit dieser Schritte nicht verlängerte.

Der letzte Säulenlauf wurde so umgestaltet, dass, über die Wahl einer kleinvolumigen Säule, einer relativ hohen Durchflußgeschwindigkeit sowie eines Gradientenprofils, welches die probenhaltigen Fraktionen möglichst frühzeitig eluieren lässt, dieser nicht mehr als zwei Stunden beanspruchte und die probenhaltigen Fraktionen danach direkt und am selben Tag einkonzentriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren werden konnten.

Darüber hinaus wurde der in der Literatur beschriebene und in den ersten Aufreinigungen aufgegriffene letzte Lauf, eine präparative DEAE-5PW-Ionen-Austausch-Säule durch eine „manuelle“ PD-10-Sephadex-Säule ersetzt. Dieser letzte Lauf diente dazu, das vorhandene Probenvolumen zu entsalzen und in einen zur Gefrier-Lagerung geeigneten Puffer zu überführen. Da dazu kein langwieriger Lauf über eine FPLC-Anlage nötig ist, konnte die Aufreinigung durch Verwendung der erwähnten 10ml-Schwerkraftsäule an dieser Stelle

abgekürzt werden. Die Verwendung dieser kleinvolumigen Säule nahm nicht länger als 15 Minuten in Anspruch.

Des Weiteren wurden Vorkehrungen getroffen, um eine Konversion eines Teils des Probenmaterials in andere Redoxzustände zu unterbinden.

Zum einen sorgte die Evakuierung der vorgekühlten verwendeten Laufpuffer in der Schleuse des Anaerobzertes und eine kurze Begasung an einer Argonleitung dafür, das Laufmittel effektiv von gelöstem Sauerstoff zu befreien und gegen die inerten Gase Stickstoff und Argon auszutauschen.

Ebenso wurden alle Arbeiten bei Grünlicht bzw. im Falle der Aufkonzentrierungsschritte dunkel abgedeckt ausgeführt, um lichtinduzierte Veränderungen auszuschließen.

Es zeigte sich, dass das Arbeiten bei 4 °C das Protein grundsätzlich vor Degradierung schützt, wenn, wie oben erwähnt, zeitoptimiert gearbeitet wird.

Die in den vorigen Unterkapiteln vorgestellten Tests zur Kontrolle der Reinheit waren geeignet, die Qualität einer Probe zu bewerten.

Im Verlauf der Aufreinigungen konnten Erfahrungswerte bezüglich der maximalen Lagerdauer der Zellpellets im Gefrierschrank bei -80°C gewonnen werden. So sollte die Zeitspanne zwischen Zellernte und Präparationsbeginn des Proteins nicht mehr als 3 Wochen betragen. Nach dieser Zeit wurden Einbußen in den Mengen aufgereinigten Proteins deutlich. Hingegen konnte reines Protein in einem Stickstofftank über deutlich längere Zeiträume gelagert werden, ohne dass in nachfolgenden Experimenten Störungen durch Degradation oder Konversionen eingetreten wären. Die Lagerzeit unter diesen Bedingungen kann mit mehreren Monaten bis zu einem halben Jahr angegeben werden.

Hiervon ausgenommen waren Proteinproben, welche für Kristallisations-Experimente verwendet werden sollten, da bereits kleinste Störungen in einem Kristallisationsansatz die Reproduzierbarkeit dieser Ansätze beeinträchtigen. Die Präparationen dieser Proben wurden möglichst so geplant, dass die Probe direkt am der Aufreinigung und der Kontrolle des Reinheitsgrades folgenden Tag in die vorgesehenen Kristallisationsansätze gegeben werden konnte. In keinem Fall wurden Proben, welche länger als eine Woche in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren, verwendet.

Die vorgestellte verbesserte Präparation war somit geeignet, hochreines DdH-Protein in für EPR-Messungen ausreichenden Mengen zu liefern, so dass im sich anschließenden EPR-spektroskopischen Versuchsteil spezifische Fragestellungen zum DdH-Enzym untersucht werden konnten. Das Enzym wurde ebenfalls erfolgreich für elektrochemische Messungen herangezogen. Darüber hinaus erlaubte der hohe erzielte Reinheitsgrad die Untersuchung verschiedener Kristallisationsbedingungen dieses Proteins.

7 EPR-SPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN AN UNMARKIERTER UND ISOTOPENMARKIERTER, NATIV EXPRIMIERTER [FeFe]-HYDROGENASE

7.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Probenvorbereitung

Die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase wurde mit dem in Kapitel 6 (Aufreinigung) beschriebenen Protokoll isoliert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Zeitpunkt der Isolation befand sich die Probe in einem inaktiven, überoxidierten Zustand (wie isoliert). Dieser Zustand ist nicht sauerstoffempfindlich und erlaubt deshalb die aerobe Präparation und Lagerung. Die Probe musste zuerst auf Eis aufgetaut und sodann an einer Gas-Leitung in einem Anaerob-Zelt begast werden, um sie in den EPR-aktiven H_{ox} -Zustand zu überführen. Zuerst wurde die Probe durch Begasung mit reinem Wasserstoff für 20 Minuten reduziert. Dabei wurde der Gasstrom durch eine Oxisorb™-Chromtrioxid-Indikatorsäule geleitet, um im Gas befindliche Restanteile von Sauerstoff chemisch zu binden. Ab diesem Schritt war unter Sauerstoffabschluß zu arbeiten, da nach der Reduktion die Probe extrem sensitiv gegenüber Sauerstoff ist. Die Probe wurde in ein Eppendorf-Gefäß übertragen und dieses in ein 10ml-Glasgefäß (DIN N 20-10) gesetzt. Das Gefäß wurde mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen und über einen den Glasrand umschließenden Aluminiumring versiegelt. Der Gaseintritt wurde über eine Kanüle gewährleistet, welche durch den Stopfen gesteckt wurde, eine zweite Kanüle diente zum Gasaustritt. Um einen schnelleren Gasaustausch innerhalb der Probe zu gewährleisten, wurde diese über einen kleinen Rührfisch auf einem Rühr Tisch für den Zeitraum der Begasung leicht durchmischt. Ein zuvor bei $-20^{\circ}C$ gelagertes Kühlakku zwischen Rühr Tisch und Probengefäß diente zur Kühlung der Probe. Nach 20minütiger Begasung mit Wasserstoff wurde die Begasung für weitere 20 Minuten auf Argon umgestellt, um die Probe in den gewünschten oxidierten Zustand zu versetzen. Das Argon-Gas treibt dabei den zuvor in der Probe gelösten Wasserstoff aus, sodass es zu einer Selbst-Oxidation der Probe kommt. Die für die ^{14}N -HYSCORE-Messungen (siehe Kapitel 7.2) vorgesehenen Proben konnten dann mittels einer Hamilton-Spritze in ein sauerstoff-freies EPR-Probenröhrchen luftblasenfrei überführt, luftdicht verschlossen und nach dem Ausschleusen aus dem Anaerob-Zelt sofort in flüssigem Stickstoff vorsichtig eingefroren werden.

In Kapitel 7.3 werden HYSCORE- und ENDOR-Messungen an mit dem Isotop ^{13}C markierten DdH-Proben im H_{ox} -CO-Zustand (siehe Kapitel 2.4) vorgestellt. Für die Vorbereitung dieser Proben wurde auf die gleiche Weise wie oben beschrieben verfahren. Die Einstellung der jeweiligen Probe in den CO-inhibierten Zustand erfolgte, indem nach der Begasung mit Argon die Probe für weitere 30 Minuten mit CO-Gas begast wurde. Zur gleichzeitigen Markierung der Proben mit dem Isotop ^{13}C wurde hierbei mit ^{13}C -angereichertem Gas gearbeitet (Der Anreicherungsgrad betrug 99%).

Für die Markierung der CO-Liganden wurde des Weiteren ein Effekt ausgenutzt, welcher gegenseitige Vertauschung (engl.: „scrambling“) genannt wird [39]. Hierdurch war es möglich, neben der ^{13}C -Markierung über die Bindung eines „externen“ ^{13}C -CO-Moleküls an die freie Bindestelle des distalen Eisens auch die „internen“ CO-Liganden CO_{br} und CO_d (siehe

Abbildung 7.6) des H-Clusters gegen ^{13}CO -Moleküle auszutauschen. Hierzu wurde die Probe nach der Begasung mit ^{13}CO -Gas über einen Zeitraum von 3 Stunden bei 5°C belichtet.

Für die in Kapitel 7.4 beschriebenen Messungen wurden Proben mit H_2^{17}O und D_2O markiert. Diese Markierungen fanden vor Einstellen des für die Messungen vorgesehenen Redoxzustandes H_{ox} statt. Die H_2^{17}O -Markierung erfolgte über den Austausch des zur Probenlagerung verwendeten Puffers Tris/HCl, pH 7,4 in der Probe gegen einen isotop-haltigen Puffer in mehreren Austauschzyklen. 50 μl aufgereinigten Enzyms wurden mit mittels H_2^{17}O (90%) angesetztem Probenpuffer auf ein Volumen von 200 μl verdünnt und sodann durch Zentrifugation bei 8000 rpm in Vivaspin 500-Konzentratoren (Ausschlußgröße: 30 kDa) wieder auf 50 μl eingengt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Hierdurch wurde eine Anreicherung von 80% an H_2^{17}O erreicht.

Vor und nach der Anreicherung wurden standardmäßig FT-IR-Spektren aufgenommen, um die Qualität und den Redoxzustand der Probe zu kontrollieren (siehe Kapitel 6.3.4). Die Kontrolle ergab, daß der Austausch keinen negativen Einfluß auf die Probe genommen hatte. Degradationseffekte wären beispielsweise anhand des Auftretens des $\text{H}_{\text{ox}}\text{-CO}$ -Zustands sichtbar geworden.

Die Markierung mit D_2O verlief genau entsprechend der mit H_2^{17}O , wobei zuvor ein D_2O -haltiger Probenpuffer hergestellt worden war. Der Anreicherungsgrad des verwendeten Deuteriumoxids betrug 99,9%. Durch die oben beschriebenen Zyklen von Verdünnung und Konzentrierung wurde eine End-Anreicherung in der Probe von 90% D_2O erzielt.

Alle Markierungen wurden unmittelbar vor dem Einstellen des Redoxzustandes durchgeführt.

Die Überführung der mit H_2^{17}O und D_2O markierten Proben in den Redoxzustand H_{ox} erfolgte über Thionin-Azetat als Oxidationsmittel:

Nach der Reduktion über die Begasung mit Wasserstoff unter anaeroben Bedingungen, welche zur Enzymaktivierung nötig war, wurde die Probe chemisch in den EPR-aktiven H_{ox} -Zustand gebracht. Hierzu wurde zuerst eine 8 mM Lösung von Thionin-Azetat in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 hergestellt, welche eine intensive blaue Färbung aufwies. Von dieser Lösung gab man im Anaerobzelt 5 μl zur Wasserstoff-reduzierten Hydrogenase-Probe hinzu. Die auftretende Blaufärbung der Probe wurde über 30 Sekunden beobachtet. Wenn die Probe ihre blaue Farbe behielt, wurde sie mittels einer Hamilton-Spritze anaerob in ein EPR-Mess-Röhrchen überführt. In den Fällen, in denen die Blaufärbung innerhalb von 30 Sekunden verschwand, wurden zuerst weitere 5 μl der Thionin-Lösung hinzugegeben. Die luftblasenfrei in das Mess-Röhrchen überführte Probe wurde gasdicht verschlossen, aus dem Anaerobzelt ausgeschleust und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung eingelagert.

Durchführung

Alle gemessenen Proben waren auf ein Volumen zwischen 30 und 50 μl eingestellt worden. Die Probenkonzentration lag bei allen durchgeführten Messungen zwischen 250 und 600 μM . Das in den Messungen verwendete Meß-Instrumentarium ist in Kapitel 4 aufgelistet.

Die Länge des Mikrowellenimpulses $\pi/2$ in den Q-Band-HYSCORE- und ENDOR-Messungen wurde auf 36 ns eingestellt. Der Tiefpass-Filter H4LE35-3-AA-R von Trilithic diente zur Unterdrückung der harmonischen Anteile des ^1H ENDOR-Signals (im Bereich von 51 MHz bei 1,2T).

Datenanalyse und Simulation

Die Energiewerte und Wellenfunktionen des Spin-Hamilton-Operators wurden entsprechend folgender Gleichung berechnet, die auch zur Simulation der Spektren benutzt wurde:

$$\hat{H}_0 = \mu_e \vec{B} g \hat{S} + \sum_{i=1}^n (-\mu_n g_n^i \vec{B} \hat{I}_i + \hat{S} A \hat{I}_i + \hat{I}_i P \hat{I}_i)$$

Hierbei ist μ_e das Bohrsche Magneton, μ_n das Kern-Magneton, g_n^i ist der g-Faktor des iten Kerns und g entspricht dem g-Tensor des Elektrons. Der erste und zweite Term beschreiben die Zeeman-Interaktionen von Elektron und Kern mit dem angelegten Magnetfeld \vec{B} . Der dritte Term bezieht sich auf die Hyperfein-Wechselwirkungen, welche durch den Tensor A definiert werden. Neben der Analyse von Hyperfeinwechselwirkungen wurden auch Messungen von Quadrupolwechselwirkungen vorgenommen. Kerne mit Kernspins $I > 1/2$ weisen ein elektrisches Quadrupolmoment auf, welches mit dem elektrischen Feldgradienten am Kernort wechselwirkt. Mit der Messung dieses Effekts wird somit die Ladungsverteilung in Kernnähe untersucht. Die Quadrupol-Kopplungen, welche über den Tensor P definiert sind, werden über den letzten Ausdruck des Hamilton-Operators beschrieben.

Der auf Hauptachsen transformierte Quadrupol-Tensor P wird beschrieben durch die Komponenten (in Frequenzeinheiten):

$$[P_x, P_y, P_z] = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)h} [-(1-\eta), -(1+\eta), 2]$$

Der Tensor P ist spurlos (hat keinen isotropen Wert).

Die Quadrupol-Kopplung K und der Asymmetrieparameter η sind dabei definiert als:

$$K = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)h} \quad \text{und} \quad \eta = \frac{P_x - P_y}{P_z}$$

mit $|P_z| > |P_y| \geq |P_x|$.

In allen Berechnungen wurde die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung als übergeordnete Wechselwirkung betrachtet. Alle anderen Wechselwirkungen wurden als Störungen behandelt. Die Orientierungen der Hyperfein- und Quadrupolwechselwirkungen wurde über die Hauptachsen des elektronischen g-Tensors festgelegt. Für die Beschreibung der Eulerwinkel wurde die „y“-Konvention verwendet [34].

Die Simulation der CW-Spektren wurde mit Hilfe des „Pepper“-Programms von Easyspin [64] in Kombination mit der Grafikoberfläche Kazan Viewer [65] des Programmpakets Matlab 7.2 [66] durchgeführt. Für die Datenauswertung der gepulsten EPR-Experimente wurde ebenfalls das Programmpaket Matlab herangezogen.

Die HYSORE-Simulationen wurden wie bei Shane beschrieben vorgenommen [35].

Zur Berechnung der EPR-Parameter mittels der Dichte-Funktional-Theorie wurde das ORCA 2.7 Programm-Paket mit dem Funktional B3LYP [67-69] und dem von Ahlrichs [70]

berechneten Basissatz herangezogen. Für Fe und S wurden unterschiedliche Polarisationsfunktionen angewandt.

Das für die DFT-Kalkulationen verwendete geometrische Modell war dabei in allen durchgeführten Berechnungen das gleiche.

Die in Kapitel 7.4 vorgenommenen Molekular-Dynamik-Simulationen wurden mittels des Programms Chimera mit dem Algorithmus NAMD der Theoretical and Computational Biophysics Group der Universität von Illinois (USA) durchgeführt [81]. Ausgangspunkt der Studie war die Kristallstruktur von *D. desulfuricans* (pdb-Eintrag 1HFE) [13]. Da diese als Tetramer vorliegt, wurde die Struktur zuerst auf das physiologische Dimer beschränkt.

In die Simulationen wurde des Weiteren eine Wassersphäre als Lösungsmittel eingefügt. In den ersten 100 Zeitschritten jeder Simulation wurden die Strukturen zuerst energieminiert. Die Simulationen wurden bei 300 K durchgeführt.

7.2 Auflösung des Zentralatoms in der Dithiolbrücke: ¹⁴N-HYSCORE Messungen im H_{ox}-Zustand

Die Kristallstruktur der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* wurde im Jahre 1999 mit einer Auflösung von 1,6 Å bestimmt [13]. Das distale und das proximale Eisenatom des [2Fe]_H-Clusters sind über zwei Thiolgruppen, welche wiederum mit einem weiteren Atom miteinander verbrückt sind, miteinander verbunden. Der Brückenligand wurde ursprünglich als 1,3-Propandithiol in die Elektronendichtekarte eingefügt. In der Folge wurden jedoch von verschiedenen Arbeitsgruppen Hinweise für eine andere Zusammensetzung der Molekülbrücke mit Sauerstoff oder Stickstoff als zentralem Atom der Brücke entdeckt, wobei zum Teil mit Hilfe von Computeranalysen gearbeitet wurde [23-25]. Die genaue Zusammensetzung dieser Brücke hat große Bedeutung für den Bindungsort des Substrats Wasserstoff und den folgenden Reaktionsmechanismus (siehe Kapitel 2.1).

Bei Bindung des Wasserstoffmoleküls an die freie Bindungsstelle des distalen Eisens kann ein Stickstoffatom in der Dithiolbrücke als Akzeptor für ein freies Proton dienen. Wenn ein Kohlenstoffatom in der in Abbildung 7.1 mit X gekennzeichneten Position vorhanden ist, ist dies nicht möglich. Für eine EPR-spektroskopische Analyse der Zusammensetzung der Brückenliganden wurden ESEEM- und HYSCORE-Messungen durchgeführt.

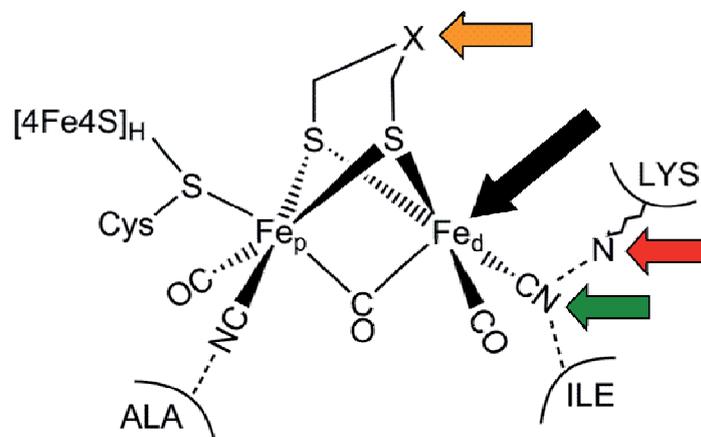


Abbildung 7.1: Übersicht des H-Clusters der [FeFe]-Hydrogenase DdH. Das Zentralatom in der Brücke ist mit X markiert. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die freie Bindestelle am distalen Eisenatom

Die zur Messung verwendeten Proben wurden wie in Kapitel 7.1 (Probenvorbereitung) beschrieben in den Redoxzustand H_{ox} gebracht. Zuerst wurde ein CW (continuous wave)-Spektrum der wie oben beschrieben präparierten Probe aufgenommen.

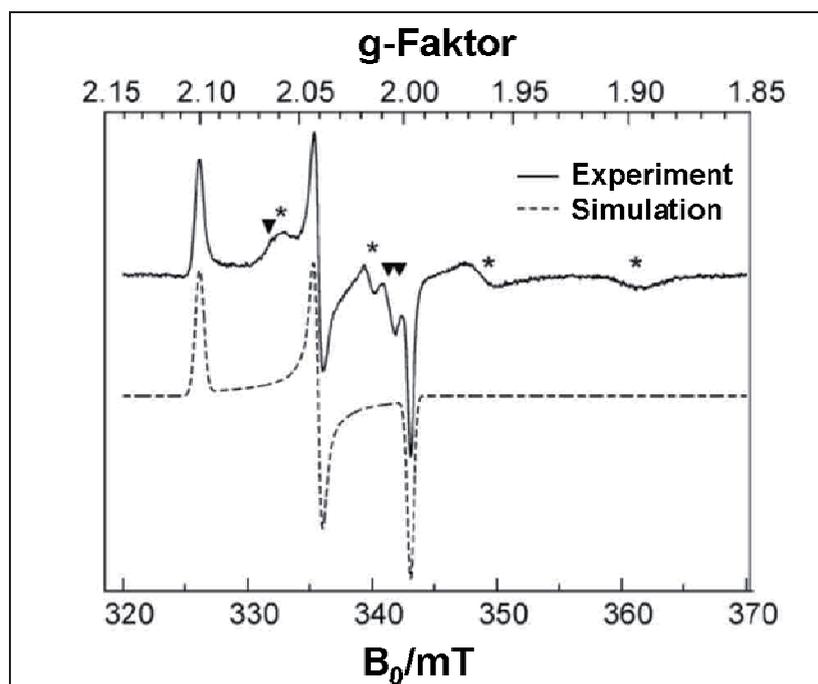


Abbildung 7.2: CW-EPR-Messung der Hydrogenase-Probe im H_{ox} -Zustand
 $T = 50$ K, Mikrowellenstärke: $20 \mu W$, $\nu_{mw} = 9,597$ GHz,
 Konversionszeit: $40,96$ ms

Das Spektrum zeigt ein charakteristisches rhombisches Signal. Die Simulation ergibt die g -Tensorwerte: $g_x = 2,100$; $g_y = 2,040$; $g_z = 1,997$. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit den g -Werten für den H_{ox} -Zustand aus früheren Messungen [36]. Darüber hinaus lassen sich Signale, welche in der Abbildung mit einem Sternchen markiert sind, den Kopplungen der beiden [4Fe4S]-Cluster zuordnen. Diese Zuordnung stimmt ebenfalls mit früheren experimentellen Untersuchungen überein [37].

Die ermittelten g -Werte sind: $2,061$; $1,966$; $2,015$; $1,895$.

Außerdem sind drei zusätzliche Signale des Spektrums mit Dreiecken gekennzeichnet.

Die g -Werte $2,065$; $2,007$ und $2,001$ sind charakteristisch für den H_{ox} -CO-Zustand [36].

Das Vorhandensein dieser Signale erklärt sich dadurch, dass ein geringer Teil der Probe degradiert ist. Die Degradation bewirkt die Freisetzung der CO-Liganden, welche wiederum einen Teil der intakten H-Cluster in den H_{ox} -CO-Zustand versetzen [38, 39].

Die X-Band-Messung zeigt somit, dass über die beschriebene Begasung der Probe mit Wasserstoff und Argon diese zum überwiegenden Teil in den gewünschten H_{ox} -Zustand gebracht wurde.

Zur Bestimmung der Kopplungen des Elektronenspins mit dem Kernspin der Stickstoffatome des H-Clusters wurde eine X-Band-ESEEM (electron spin echo envelope modulation)-Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 3.1). Abbildung 7.3 zeigt das erhaltene Spektrum.

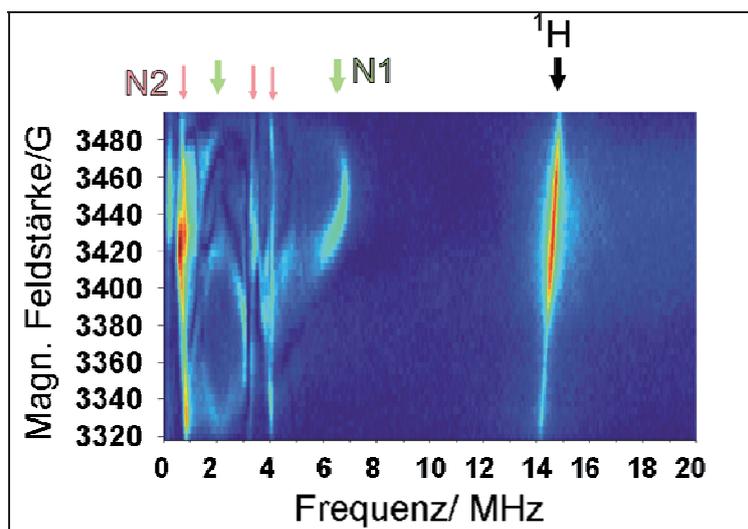


Abbildung 7.3: X-Band 3-Puls-ESEEM-Spektrum der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* im H_{ox} -Zustand. Versuchsbedingungen: $T=15$ K, Mikrowellenfrequenz: 9,7775 GHz, Länge des $[\pi/2]$ -Pulses: 8 ns, Verzögerungszeit zwischen Puls eins und zwei (τ): 180 ns

Die Pfeile zeigen die Zuordnungen der Signale zu den in der Struktur vorhandenen Stickstoffatomen (siehe Text)

Im Spektrum können zwei Arten von Signalen identifiziert werden: Die mit grünen Pfeilen markierten Signale weisen eine starke Abhängigkeit von der Stärke des magnetischen Feldes auf, während die mit roten Pfeilen markierten Signale nur geringfügig feldabhängig sind.

Unter der Annahme, dass die Hyperfein-Kopplung isotrop ist und die zweifache Größe der Larmor-Frequenz des ^{14}N -Kerns aufweist ($2\nu_n = |A|$, exakte Auslöschung [50]), wird die Position der Linien im ESEEM-Spektrum durch die Stärke der Quadrupol-Wechselwirkung festgelegt. In diesem Fall können die Positionen der ESEEM-Linien analysiert werden über die Beziehungen:

$$\nu_{\pm} = K(3 \pm \eta) \quad \text{und} \quad \nu_0 = 2\eta K \quad [41]$$

Die Komplexität des vorliegenden Spektrums legt nahe, dass sich dieses aus mehreren ^{14}N -Signalen zusammensetzt. Um die Kopplungen mit den vorhandenen Stickstoffatomen detaillierter bestimmen zu können wurden HYSCORE-Messungen (siehe Kapitel 3.1) durchgeführt, welche es erlauben, die Hyperfein- und Quadrupolparameter aller Signale aufzulösen.

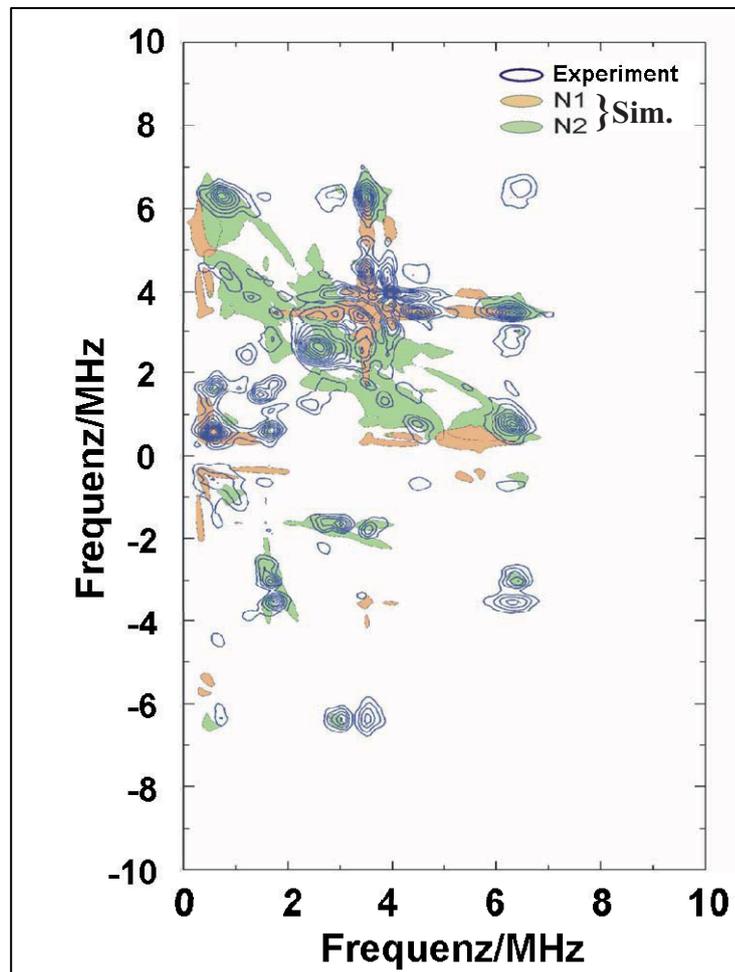


Abbildung 7.4: X-Band-HYSCORE-Spektrum der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* im H_{ox} -Zustand. Versuchsbedingungen: $T = 20$ K, $B_0 = 334,4$ mT, $\nu_{mw} = 9,549$ GHz, $\tau = 180$ ns, Länge des $[\pi/2]$ -Pulses: 8 ns

Die magnetische Feldstärke wurde so gewählt, dass sie dem g-Wert $g = 2,04$ entsprach. Insgesamt sind Simulation und experimentelle Daten in guter Übereinstimmung. Jedoch finden sich speziell entlang der Diagonallinie des Spektrums einige Abweichungen zwischen Simulation und experimentellen Daten, was einen Hinweis darstellt auf ein weiteres, zum Spektrum besteuerndes ^{14}N -Signal. Um diese zusätzlichen Signale eindeutig auflösen zu können, wurden weitere HYSCORE-Messungen im Q-Band durchgeführt.

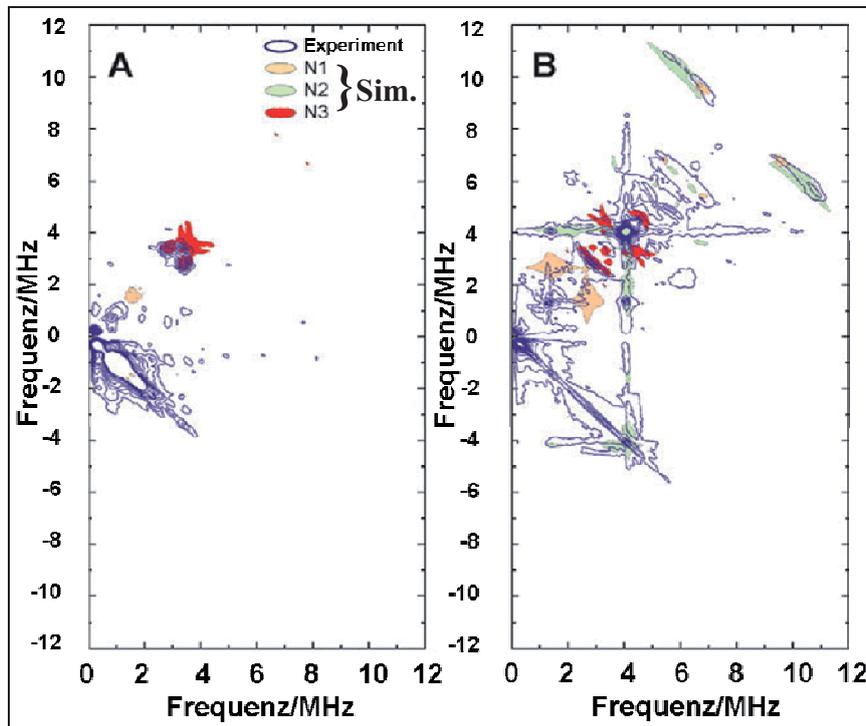


Abbildung 7.5: Q-Band-HYSCORE-Spektren der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* im H_{ox} -Zustand. Versuchsbedingungen.
 A: $T = 20$ K, $B_0 = 1156,0$ mT, $\nu_{mw} = 33,865$ GHz, $\tau = 220$ ns,
 Länge des $[\pi/2]$ -Pulses: 36 ns
 B: $T = 20$ K, $B_0 = 1186,305$ mT, $\nu_{mw} = 33,865$ GHz, $\tau = 268$ ns,
 Länge des $[\pi/2]$ -Pulses: 36 ns

Abbildung 7.5 zeigt zwei Spektren, welche bei Feldstärken aufgenommen wurden, die mit den g -Werten $g = 2,10$ (A) und $g = 2,04$ (B) korrespondieren. Aufgrund der höheren magnetischen Feldstärke werden die Kern-Zeeman-Kopplungen dominant im Vergleich zu den Hyperfein- und Quadrupol-Kopplungen. Die bereits in der X-Bandmessung gefundenen Signale, welche sich nicht den ersten beiden detektierten Stickstoffatomen zuordnen lassen, sind hier rot dargestellt. Diese Signale treten bei allen Feldpositionen des magnetischen Feldes im H_{ox} -Spektrum auf. Die aus der Simulation dieser Korrelationen erhaltenen Hyperfein- und Quadrupol-Kopplungsparameter sind in Tabelle 7.1 zusammen mit den Parametern für die gefundenen Stickstoffkopplungen der ersten beiden Stickstoffatome aus den X- und Q-Band-Messungen zusammengefasst:

Tabelle 7.1: Parameter der ^{14}N Hyperfein- und Quadrupol-Kopplungen
Angaben von A und K in MHz, die Euler-Winkel α , β und γ in Grad (definiert wie in [34])

	Hyperfein-Kopplung ^a						Quadrupol-Kopplung ^a					Zuordnung	
	A_1	A_2	A_3	α	β	γ	A_{iso}^b	K	η	α	β		γ
N1	1,0(3)	1,9(2)	1,4(2)	40(20)	25(20)	0(20)	1,43	1,23(3)	0,13(1)	10(10)	0(10)	0(10)	DTMA
N2	1,5(4)	3,8(2)	-0,4(2)	41(10)	24(10)	0(20)	1,53	0,95(3)	0,34(2)	-26(10)	24(10)	0(10)	CN_d
N3	-2,4(2)	1,4(2)	-0,7(2)	0(10)	4(10)	20(10)	0,57	0,36(1)	0,80(5)	147(5)	56(5)	0(10)	Lys

^a Werte in Klammern sind die Messungengenauigkeit in Einheiten der letzten signifikanten Stelle ^b A_{iso} wurde bestimmt als der Mittelwert aus A_1 , A_2 und A_3

Mit den vorgenommenen Messungen konnten Signale von insgesamt drei unterschiedlichen ^{14}N -Kernen detektiert werden. Um diese den in der Struktur vorhandenen Stickstoffkernen zuordnen zu können, wurden die Quadrupolwechselwirkungen mit aus der Literatur vorhandenen Kopplungswerten verglichen, wie sie für die vorliegenden, Stickstoffkerne tragenden Strukturen typisch sind. Abbildung 7.1 zeigt die ^{14}N -Kerne, welche an Kopplungen beteiligt sein können. Mit einem grünen Pfeil ist der ^{14}N -Kern der Cyanidgruppe am distalen Eisenatom gekennzeichnet.

Typische Werte für die Quadrupol-Kopplung eines ^{14}N -Kernes in einem CN-Liganden liegen, in Abhängigkeit von der Umgebung, zwischen 0,7 bis 1 MHz [42]. Es gibt nur eine aufgelöste Kopplung, welche in diesem Bereich liegt, nämlich K (N2). Da die Kopplungen für K (N1) deutlich zu groß ist und die Kopplung K (N3) zu klein, kann diese Kopplung somit leicht dem ^{14}N -Kern in der CN-Gruppe am distalen Eisen zugeordnet werden.

Interessanterweise ist die starke Quadrupol-Kopplung, welche für N1 gefunden wurde, typisch für Verbindungen mit einem sekundären Amin (R-NH-R). Entsprechende Quadrupolkopplungswerte können nachgeschlagen werden [42, 43]. Die gefundenen Werte stellen somit einen Hinweis auf das Vorhandensein eines ^{14}N -Kernes in der Brücke zwischen den Eisenatomen dar (in Abbildung 7.1 als „X“ dargestellt, orangefarbener Pfeil).

Um die Zuordnung dieser beiden Kopplungen weiter zu bestätigen und auch die dritte Kopplung zuordnen zu können, wurden DFT-Berechnungen mittels des Programms ORCA 2.6 durchgeführt. In diesen Berechnungen wurden das zweikernige Subcluster und die nächsten Aminosäurereste der Proteinumgebung mit einbezogen, so daß möglicherweise auftretende Wasserstoffbrückenbindungen berücksichtigt werden konnten. Zum Vergleich wurde in einer weiteren Berechnung lediglich das H-Cluster berücksichtigt („Naked $\text{H}_{\text{ox}}^{(\text{NH})}$ “). Um die Annahme eines ^{14}N -Kernes in der Brückengruppe zwischen distalem und proximalem Eisen zu überprüfen, wurde auch eine Modellrechnung mit ^{14}N -Kern in dieser Position durchgeführt. Da das Stickstoffatom protoniert vorliegen kann, wurde diesem Umstand ebenfalls entsprechend Rechnung getragen ($\text{H}_{\text{ox}}^{(\text{NH})}$ und $\text{H}_{\text{ox}}^{(\text{NH}_2)}$). Für die veröffentlichte Kristallstruktur der [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* im oxidierten Zustand wurde das Vorhandensein eines Wassermoleküls an der Bindestelle des distalen Eisens postuliert. Darum wurde des Weiteren eine Berechnung ausgeführt, welche dieses gebundene Wassermolekül beinhaltet (bezeichnet mit $\text{H}_{\text{ox}}^{(\text{NH}_2)}\text{-H}_2\text{O}$).

Die über die DFT-Berechnungen erhaltenen Kopplungen sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst und den experimentell ermittelten gegenübergestellt.

Tab. 7.2: Vergleich der experimentell und über DFT-Berechnungen erhaltenen Quadrupol-Kopplungs-Parameter. Angaben von K in MHz

	DFT-Berechnung				Experiment
	Naked Hox ^[NH]	Hox ^[NH]	Hox ^[NH] -H ₂ O	Hox ^[NH2]	
K (CN_p)	-1,020	-0,924	-0,909	-0,966	n.d.
η (CN_p)	0,069	0,078	0,069	0,065	n.d.
K (CN_d)	-1,074	-0,851	-0,819	-0,878	0,95
η (CN_d)	0,282	0,209	0,135	0,211	0,34
K (Lys)	----	-0,322	-0,321	-0,292	0,36
η (Lys)	----	0,928	0,879	0,900	0,80
K (DTMA)	-1,260	-1,208	-1,126	-0,095	1,23
η (DTMA)	0,088	0,069	0,107	0,861	0,13

Über den Vergleich der experimentell erhaltenen mit den über die DFT-Analyse berechneten Kopplungen können die experimentellen Kopplungen eindeutig zugeordnet werden.

Der experimentell gefundene K-Wert der ersten Kopplung (N1) von 1,23 MHz kann sinnvoll nur der ¹⁴N-Kopplung der Dithiomethyl-Amin-Gruppe (DTMA) zugeordnet werden.

In allen untersuchten Modellen liegt die Quadrupol-Kopplung zwischen 1,12 und 1,26 MHz, was in guter Übereinstimmung mit dem gemessenen Wert liegt.

Die zweite gemessene Kopplung (N2) von 0,95 MHz kann einem ¹⁴N-Kern in einer der beiden vorhandenen Cyanidgruppen zugeordnet werden. Die über die DFT-Berechnung gefundenen K-Werte sind allerdings sehr ähnlich, so daß über diese nicht entschieden werden kann, ob die Kopplung dem distalen oder proximalen ¹⁴N des CN-Liganden zuzurechnen ist. Es fällt jedoch die unterschiedliche Ausprägung der Asymmetrie-Parameter η in der DFT-Berechnung auf. Während η für den Liganden CN_p immer unter 0,08 liegt, ist er für die distale CN-Gruppe in allen Modellrechnungen mindestens doppelt so hoch. Aufgrund des relativ großen experimentell gemessenen Asymmetrie-Parameters von 0,34 kann die Kopplung N2 somit dem CN-Liganden am distalen Eisen zugeordnet werden.

Der niedrige K-Wert der dritten Kopplung von 0,36 ist ein Hinweis darauf, dass der Kern sich in einer relativ symmetrischen Umgebung befindet. Der einzige ¹⁴N-Kern, für den dieses zutrifft und welcher zudem einen Kopplungswert besitzt, welcher in guter Näherung dem gemessenen entspricht, ist der des Stickstoffs in der Seitenkette des Lysins in direkter Nachbarschaft zur Cyanidgruppe des distalen Eisens (siehe Abbildung 7.1, roter Pfeil). Dieser Stickstoff muß aufgrund des pK_s-Wertes von Lysin von 10,8 [16] protoniert (-NH₃⁺) vorliegen. Die vorgefundene Spindichteverteilung erlaubt die Schlußfolgerung, daß sich eine

Wasserstoffbrücke zum CN-Liganden des distalen Eisenatoms ausbildet und damit eine Messung des ^{14}N im Spektrum möglich wird.

Es ist beachtenswert, dass von den ^{14}N -Kernen der beiden CN-Gruppen lediglich der am distalen Eisenatom befindliche eine größere Hyperfeinkopplung zeigt. Zusammen mit der relativ großen Hyperfeinkopplung des Stickstoffs am Lysin ergibt sich somit das Bild einer substantiellen Spindichtedelokalisation im Bereich des distalen Eisenatoms, während dies für das proximale Eisen nicht der Fall zu sein scheint. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen, welche in unserer Arbeitsgruppe für den $\text{H}_{\text{ox}}\text{-CO}$ -Zustand gefunden wurden [31].

Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung ist die große Hyperfeinkopplung des Stickstoffs in der Dithiolgruppe. Dies deckt sich ebenfalls mit DFT-Rechnungen, welche von Fiedler und Brunold durchgeführt wurden [44]. Diese Beobachtung stellt einen ersten Hinweis auf eine mögliche katalytische Bedeutung der Dithiolgruppe dar und stützt ein Modell, welches die Protonierung und Deprotonierung des Stickstoffatoms in der Dithiolgruppe im Verlauf des katalytischen Zyklus' beinhaltet.

Die Spinverteilung am Stickstoffatom der Lysingruppe schließlich ist ein Hinweis auf eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung dieses Lysinrestes zum CN-Liganden CN_d , welche einen stabilisierenden Effekt auf den CN-Liganden hat und somit von struktureller Bedeutung für das H-Cluster ist.

7.3 Die Spindichteverteilung des H-Clusters: ^{13}C -HYSCORE- und ENDOR-Messungen im $\text{H}_{\text{ox}}\text{-CO}$ -Zustand

Im folgenden Kapitel soll die Spindichteverteilung des H-Clusters der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* analysiert werden. Grundlegende Informationen über die Spindichteverteilung im H-Cluster wurden in einer Analyse mit ^{57}Fe -markierter Probe erhalten [36]. Mit der hier durchgeführten ^{13}C -Analyse konnten detailliertere Daten erhalten werden.

Da für das zweite Modellenzym der [FeFe]-Hydrogenasen, die [FeFe]-Hydrogenase CpI aus *Clostridium pasteurianum* bereits Daten aus einer ^{13}C -Analyse vorliegen [47], war die Möglichkeit gegeben, einen Vergleich beider Analysen vorzunehmen. Durch die Ausnutzung des im Kapitel Probenvorbereitung erwähnten Austauscheffekts wurden zudem zum ersten Mal Informationen zur Spindichteverteilung über den Liganden CO_{br} und CO_d gewonnen.

Nicht zuletzt können mit gewonnenen bzw. verfeinerten Daten zur Spindichteverteilung bestehende DFT-Berechnungen zum katalytischen Reaktionsmechanismus überprüft bzw. neue DFT-Berechnungen durchgeführt werden.

Zur Untersuchung der Spindichteverteilung des H-Clusters wurde das Protein zuerst in den $\text{H}_{\text{ox}}\text{-CO}$ -Zustand überführt, wie im Abschnitt zur Probenvorbereitung beschrieben. In diesem Zustand ist die offene Bindungsstelle des distalen Eisenatoms mit einem weiteren, „externen“ CO-Molekül besetzt (siehe Abbildung 7.6). Der Zustand weist einen EPR-aktiven Elektronenspin von $S = \frac{1}{2}$ auf.

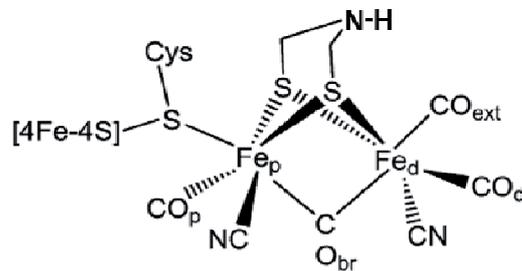


Abbildung 7.6: H-Cluster der [FeFe]-Hydrogenase im H_{ox} -CO-Zustand. Das an die freie Bindestelle des distalen Eisens gebundene CO ist mit CO_{ext} bezeichnet.

Das Eingehen dieser Bindung zwischen Fe_d und CO_{ext} führt zum vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms. Aufgrund seiner Stabilität und der Möglichkeit, Isotopen-Markierungen vorzunehmen, ist dieser nicht physiologische Zustand jedoch von großer experimenteller Bedeutung. Bedingt durch die hohe Affinität des Kohlenstoff-Monoxids zur Bindestelle ist dieser Zustand leicht und praktisch vollständig, also ohne „Kontamination“ anderer Zustände einzustellen. Die Markierung wurde wie in Kapitel 7.1 (Probenvorbereitung) beschrieben durchgeführt.

Zuerst wurden CW (continuous wave)-Messungen im X- und Q-Band-Bereich durchgeführt. Die Spektren sind charakteristisch für [FeFe]-Hydrogenasen. Mit den Werten: $g_1 = 2,065$; $g_2 = 2,007$; $g_3 = 2,001$ konnte das Spektrum simuliert werden (siehe Abbildungen 7.7a und 7.7b).

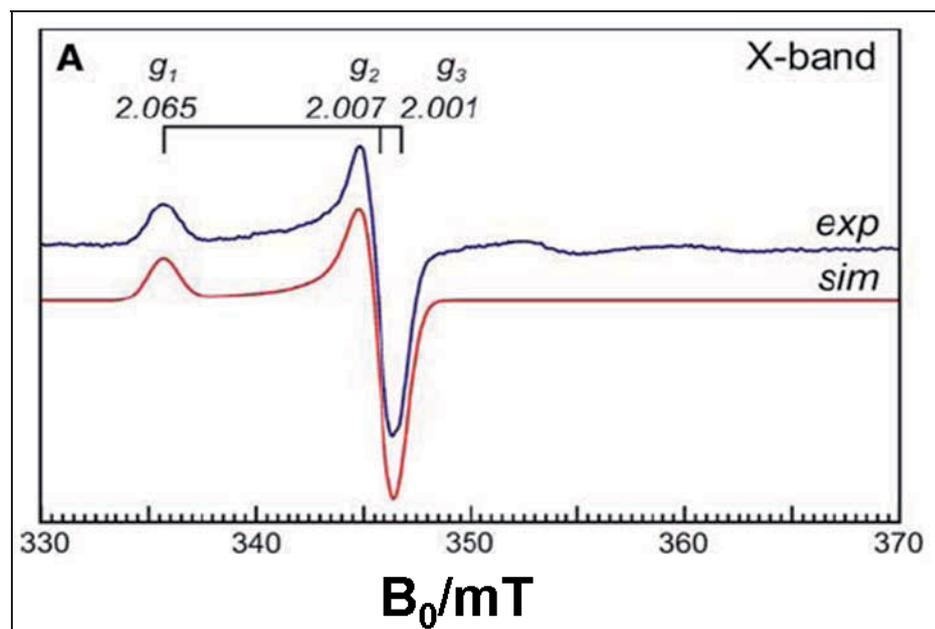


Abbildung 7.7a: CW-Messungen ^{13}C -markierter Probe (X-Band)

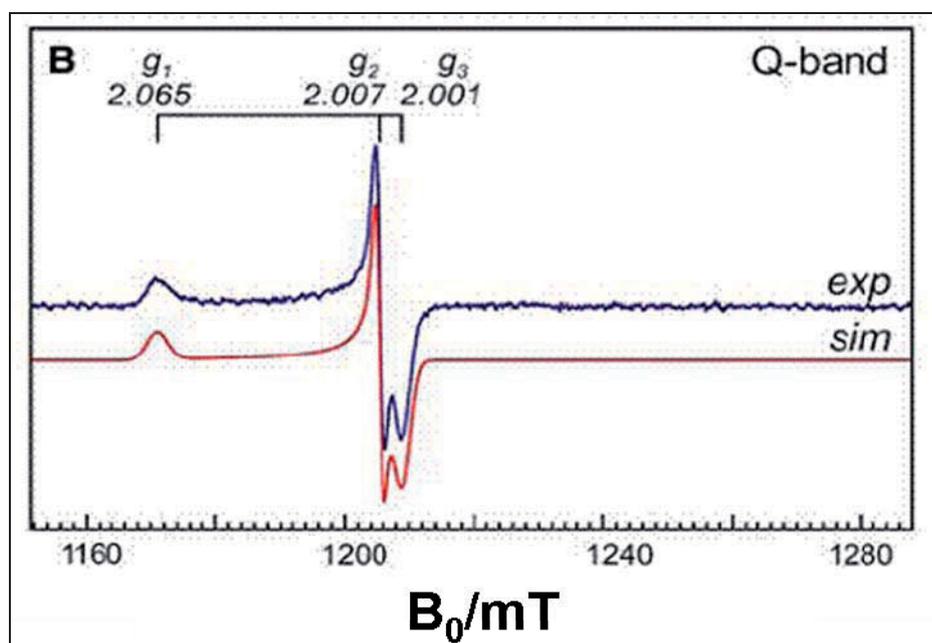


Abbildung 7.7b: CW-Messungen ^{13}C -markierter Probe (Q-Band)

Die leichte Rhombizität des g-Tensors ist bereits zuvor beschrieben worden [36, 38]. Die rhombische Verzerrung scheint typisch zu sein für das Enzym aus *D. desulfuricans*, da diese nicht gefunden wurde in den Spektren der [FeFe]-Hydrogenasen aus *C. pasteurianum* [47, 48], *C. reinhardtii*, *C. submarinum* und *C. moewusii* [49]. Da die Verteilungsdichte der ungepaarten Spins stark abhängig ist von der Molekülgeometrie, ist die Ursache für die unterschiedliche Rhombizität in den Unterschieden der Proteinumgebung des H-Clusters in den verschiedenen Spezies zu suchen.

Im Folgenden sollen Spin-Kopplungen der ^{13}C -Kerne der CO-Liganden detektiert werden.

Hierzu wurden zunächst Messungen an einer ^{13}C -markierten Probe durchgeführt, welche nach der ^{13}CO -Begasung nicht auf die in Kapitel 7.1 beschriebene Weise dem „Austauscheffekt“ der CO-Liganden unterworfen wurde. In dieser Probe war somit lediglich das „externe“ CO an der freien Bindestelle des distalen Eisens markiert. Die so markierte Enzymprobe wurde zuerst spektroskopisch mit einer unmarkierten Probe verglichen. Abbildung 7.8 zeigt die beiden überlagerten CW-Spektren. In der Detailansicht wird eine mäßige Verbreiterung des Signals der ^{13}C -Probe im Vergleich mit der unmarkierten Probe sichtbar. Diese Verbreiterung des Spektrums kann mittels einer isotropen ^{13}C -Hyperfeinkopplung von 0,60 mT (16,8 MHz) simuliert werden. Da die Parameter des Hyperfeintensors jedoch mittels EPR nicht aufgelöst werden können, wurden in der Folge an ^{13}C -markiertem Hydrogenase-Enzym gepulste EPR- und ENDOR-Messungen durchgeführt.

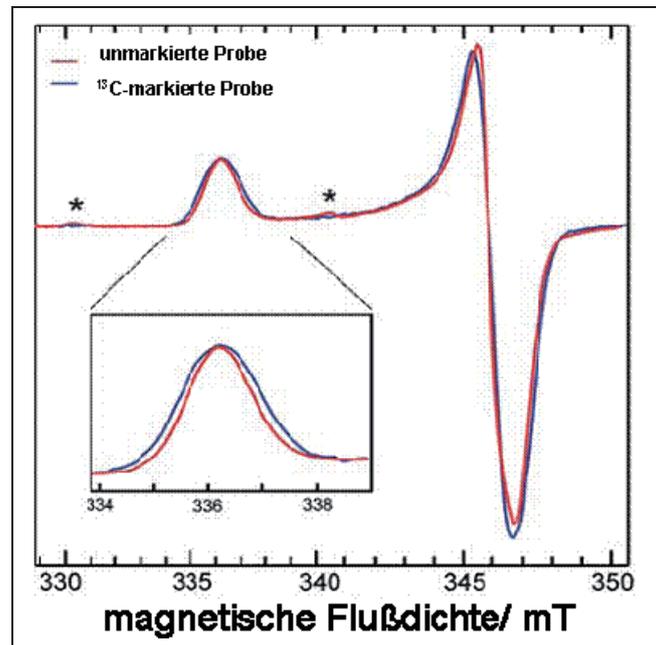


Abbildung 7.8: Vergleich der X-Band-CW-EPR-Spektren im H_{ox} -CO-Zustand. Die experimentellen Bedingungen sind dieselben wie in Abbildung 7.7. Die beiden Sterne zeigen geringfügige Einflüsse des H_{ox} -Zustands aufgrund unvollständiger Inhibierung des H-Clusters mit CO

Abbildung 7.9 zeigt ein HYSORE-Spektrum, in welchem neben einem ^{14}N -Signal, wie es in Versuchsteil 7.2 gefunden wurde, und einem ^1H -Signal (beide im $(++)$ -Quadranten) ein weiteres Paar Kreuzsignale im $(+-)$ -Quadranten auftritt. Das Spektrum wurde an der Position mit der höchsten EPR-Intensität aufgenommen. Da dieses Signalpaar nur in ^{13}C -markierten Proben erscheint und nicht in unmarkierten Proben zu finden ist, muß es einem koppelndem ^{13}C -Kern zugeordnet werden. Darüber hinaus entspricht der Abstand der beiden Kreuzsignale der doppelten Larmor-Frequenz für ^{13}C -Kerne, welche bei 350 mT 3,75 MHz beträgt.

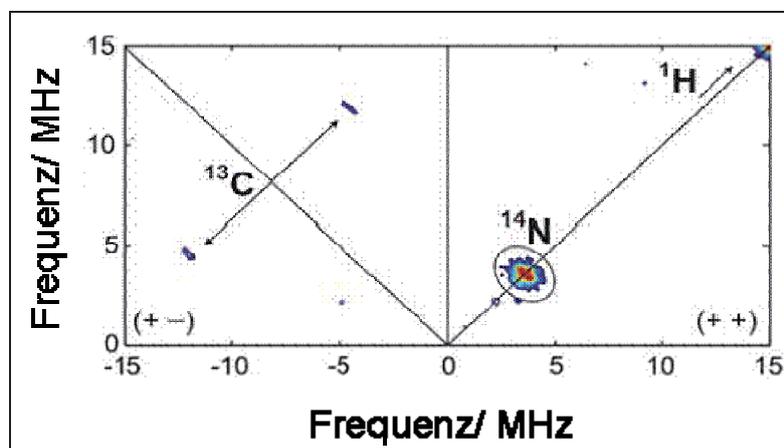


Abbildung 7.9: X-Band-HYSORE-Messung mit ^{13}C -Signalen

Die Feldabhängigkeit des Signals zeigt eine leichte Anisotropie der korrespondierenden Hyperfein-Wechselwirkung.

Eine komplette Analyse der Hyperfein-Interaktionen und ihrer Feldabhängigkeit ist jedoch über HSCORE-Messungen nicht möglich, da bei niedrigeren magnetischen Feldstärken die Signale nicht mehr detektierbar sind. Wenn die Hyperfeinkopplung A sich der Larmor-Frequenz $2\nu_n$ nähert, tritt der Fall der exakten Auslöschung ein [50]. Signale stark gekoppelter Kerne sind in diesem Fall mit steigender Hyperfein-Kopplungskonstante zunehmend schlechter zu detektieren.

Um alle Parameter der vorliegenden ^{13}C -Hyperfeinkopplung auflösen zu können, wurden deshalb ENDOR-Messungen im Q-Band-Bereich durchgeführt (Abbildung 7.10). Bei dieser Mikrowellenfrequenz von ca. 34 GHz sind die Kopplungen der ^{13}C -Kerne gut von denen der ^1H -Kerne und noch ausreichend von denen der ^{14}N -Kerne getrennt. Letztere sind zudem bei diesen Messparametern schwer zu detektieren.

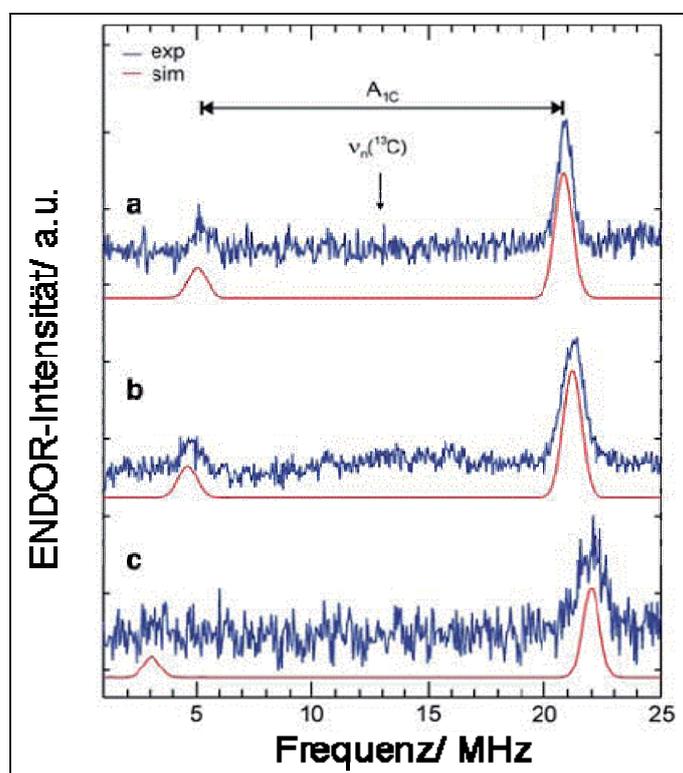


Abbildung 7.10: Q-Band-Davies-ENDOR-Spektrum des $\text{H}_{\text{ox}}\text{-CO}$ -Zustands, gemessen an verschiedenen Positionen des EPR-Spektrums. Messbedingungen: 15 K, ν_{mw} : 33,8505 GHz, Repetitions-Zeit: 2 ms, Länge des Radiofrequenzpulses: 25 μs , B_0 a: 1,207.8 mT, B_0 b: 1,204.7 mT, B_0 c: 1,170.7 mT. Die Simulationen wurden mit Hilfe der $A_{1\text{C}}$ -Hyperfeinkopplungen durchgeführt (siehe Tabelle 7.3).

Die hierdurch gefundenen Hyperfeinkopplungswerte sind in Tabelle 7.3 aufgeführt.

Tab. 7.3: experimentelle Hyperfeinkopplungswerte

Hyperfein-Kopplung								Zuordnung
A_x (MHz)	A_y (MHz)	A_z (MHz)	A_{iso} (MHz)	α (°)	β (°)	γ (°)		
A_{1C}	15,6 (2)	16,6 (2)	19,2 (2)	17,1	0 (10)	0 (10)	0 (10)	CO_{ext}

Aus Röntgenstrukturanalysen an Kristallen der [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* (CpI) ist bekannt, dass die Bindung des externen CO-Moleküls an die offene Bindestelle des distalen Eisens erfolgt. Da die FT-IR-Spektren des CO-inhibierten Zustands sowohl für CpI als auch für DdH ähnlich sind, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Bindungsorte des CO-Moleküls in beiden Enzymen nicht unterscheiden.

Somit konnte der erhaltene ^{13}C -Hyperfeintensor dem externen CO-Liganden des distalen Eisenkerns zugeordnet werden.

Die ermittelte ^{13}C -Hyperfeinkopplung des „externen“ CO-Moleküls hat einen stark dipolaren Charakter. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Studie an ^{57}Fe -markierter DdH-Probe im H_{ox} - und H_{ox} -CO-Zustand [36].

Interessanterweise unterscheiden sich diese Kopplungen von denen, welche durch Untersuchungen an CpI, der [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum*, gefunden wurden [47]. Die entsprechenden Kopplungen in diesem System waren deutlich isotroper, mit einer dipolaren Verteilung von weniger als 2 MHz.

Um auch die ^{13}CO -Kopplungen für die intrinsischen CO-Liganden zu erhalten, wurde das in Kapitel 7.1 beschriebene Protokoll der Belichtung der Probe angewandt [39].

Hierdurch bot sich die Möglichkeit, detailliertere Informationen über die Spindichteverteilung des „Brücken-CO“ CO_{br} und des terminalen CO des distalen Eisens (CO_d) zu erhalten (siehe auch Abbildung 7.6). Für die Probe der durch ^{13}CO ausgetauschten CO-Liganden wurde einer X-Band-HYSCORE-Analyse mit den gleichen Einstellungen wie in den vorherigen Messungen durchgeführt, um einen direkten Vergleich beider Spektren zu ermöglichen.

Die gemessenen Spektren sind in Abbildung 7.11 zu sehen.

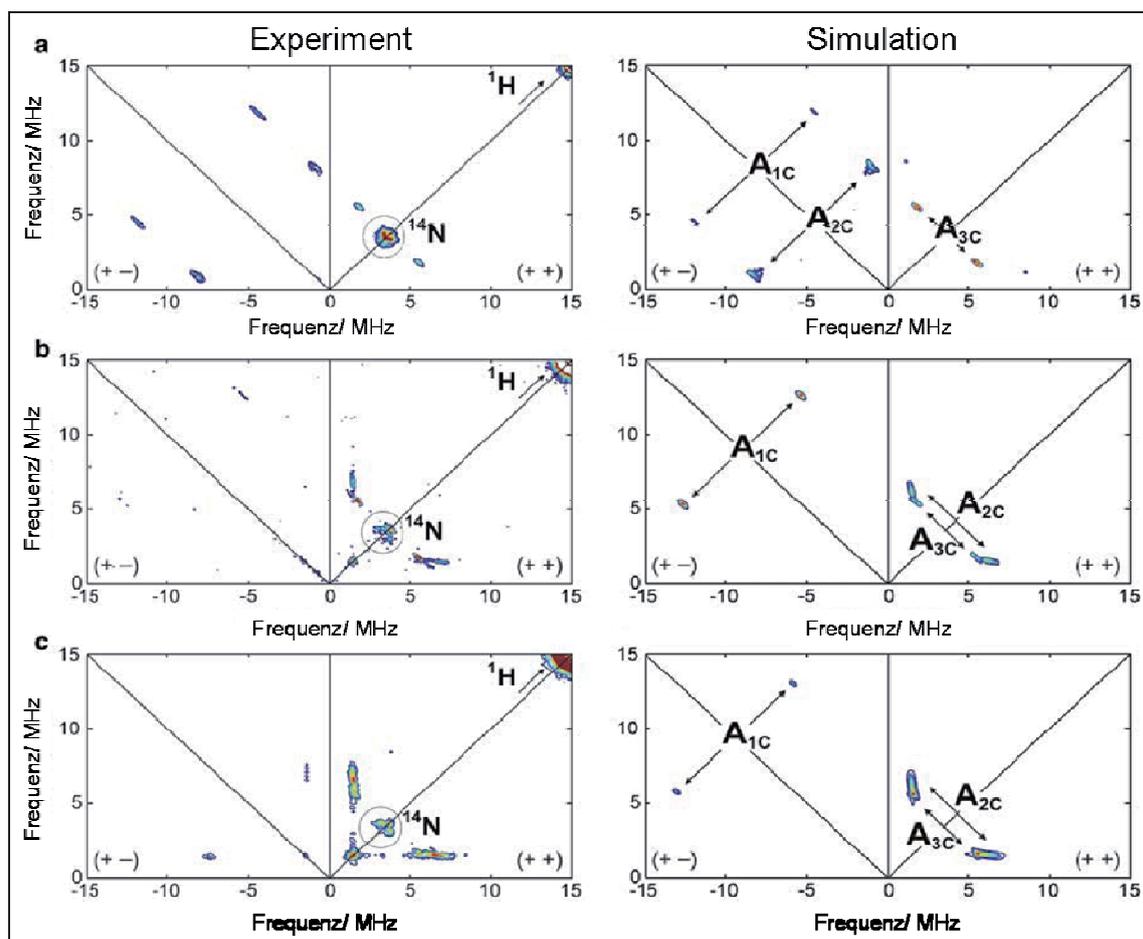


Abbildung 7.11: X-Band-HYSCORE-Spektrum des belichteten H_{ox} -CO-Zustands, gemessen an verschiedenen Feldpositionen; Experiment (links) und Simulation (rechts); insgesamt können Kopplungen dreier ^{13}C -Kerne aufgelöst werden (A_{1C} - A_{3C}). Versuchsbedingungen: t_1 und t_2 : 16 ns, Pulswiederholungszeit: 2 ms, B_0 : a = 346,2 mT (g_2), b = 341,5 mT, c = 337,0 mT (g_3), ν_{mw} : a = 9,7328 GHz, b = 9,7469 GHz, c = 9,7576 GHz, τ : a = 136 ns, b und c = 120 ns

Die HYSCORE-Analyse zeigt erwartungsgemäß zwei zusätzliche Kopplungen, welche in dem nicht markierten Referenzspektrum ebenso wenig auftauchen wie in dem Spektrum der markierten, jedoch nicht belichteten Probe: Ein Signalpaar bleibt in allen Spektren im (++)-Quadranten, was ein Hinweis für eine schwache und relativ isotrope Hyperfeinkopplung ist. Ein weiteres Signalpaar befindet sich bei höheren magnetischen Feldstärken im (+-)-Quadranten, während es bei geringeren Feldstärken in den (++)-Quadranten wandert. Diese Hyperfeinkopplung weist somit eine größere Anisotropie auf.

Da bekannt ist, dass der lichtinduzierte Austausch der CO-Liganden nicht das terminale CO des proximalen Eisenkerns (CO_p) betrifft [39], müssen die beiden auftretenden Kopplungssignale den Liganden CO_{br} und CO_d zugeordnet werden.

Die Hyperfeinkopplungswerte aller gefundenen Kopplungen sind in Tabelle 7.4 zusammengefasst.

Tab. 7.4: Hyperfeinkopplungen und Zuordnungen

Hyperfein-Kopplung								Zuordnung
A_x (MHz)	A_y (MHz)	A_z (MHz)	A_{iso} (MHz)	α (°)	β (°)	γ (°)		
A_{1C}	15,6 (2)	16,6 (2)	19,2 (2)	17,1	0 (10)	0 (10)	0 (10)	CO_{ext}
A_{2C}	8,5 (3)	9,8 (3)	3,9 (2)	7,4	50 (20)	20 (10)	50 (20)	CO_{br}
A_{3C}	3,2 (2)	3,7 (2)	4,4 (1)	3,8	0 (20)	40 (10)	0 (10)	CO_d

Aus der Messung alleine ist es nicht möglich, eine direkte Zuordnung durchzuführen. Jedoch kann diese mithilfe der Ergebnisse einer zuvor durchgeführten ^{57}Fe -Studie vorgenommen werden [36]. In dieser wurde gezeigt, dass es für den H_{ox} -Zustand des Enzyms eine gleichmäßige Verteilung des ungepaarten Spins im zweikernigen Zentrum des H-Clusters gibt, während die Bindung des externen CO-Liganden im H_{ox} -CO-Zustand zu einer Verschiebung des ungepaarten Spins hin zum proximalen Eisenatom führt. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch theoretische Berechnungen belegt [44]. Ein weiterer, in der vorliegenden Messung gefundener Hinweis für die Richtigkeit dieser Analyse ist die relativ große ^{13}C -Hyperfeinkopplung des externen CO-Liganden (Kopplung A_{1C} in Tabelle 7.4).

Aufgrund dieser Analyse ist zu erwarten, dass der ^{13}C -Kern von CO_{br} eine relativ große Hyperfeinkopplung mit einem rhombischen Hyperfeintensor erzeugt.

Somit kann dem Liganden CO_{br} der Hyperfeintensor A_{2C} zugewiesen werden.

Da der Hyperfeintensor A_{3C} eine schwache Kopplung hat und dies aufgrund der ^{57}Fe -Studie und der theoretischen Analyse für die Hyperfeinkopplung des CO-Liganden am distalen Eisen zu erwarten ist, kann CO_d dem Hyperfeintensor A_{3C} zugeordnet werden.

Alle gemessenen Hyperfeinkopplungen der ^{13}C -Kerne konnten somit erfolgreich zugeordnet werden und stützen vorhergehende Untersuchungen zur Spindichteverteilung, die eine ungleiche Verteilung der Spindichte über den Eisenkernen des binuklearen Clusters im H_{ox} -CO-Zustand aufzeigen.

Im Detail konnten die berechneten Hyperfeinkopplungen durch die experimentell erhaltenen präzisiert bzw. korrigiert werden. So waren in der DFT-Analyse von Telser et al. [44] Berechnungen anhand zweier 2Fe-Modelle (mit einer protonierten und einer unprotonierten Schwefelgruppe des Cysteins zwischen binuklearem und [4Fe-4S]-Subcluster) durchgeführt worden. Die berechneten ^{13}C -Hyperfeinkopplungen waren mit 29 MHz für die protonierte und 53 MHz für die unprotonierte Modellstruktur angegeben, was einer Spindichteverteilung zwischen Fe_p und Fe_d von 3,7:1 bzw. 1,2:1 entspricht. Die in diesem Versuchsteil ermittelte Kopplung A_{iso} (A_{1C}) von 17,1 MHz (siehe Tabelle 7.4) für den Liganden CO_{ext} spricht jedoch für eine größere Spindichte auf dem proximalen Eisenkern.

7.4 Puls- und CW-EPR-Messungen an D₂O- und H₂¹⁷O-markierter Probe im H_{ox}-Zustand: Besetzungszustand des distalen Eisens des H-Clusters

In diesem Kapitel soll der Besetzungszustand der putativen Substratbindestelle des DdH-Enzyms, des distalen Eisenatoms des H-Clusters, mit den Mitteln der EPR-Spektroskopie im Redoxzustand H_{ox} untersucht werden. Darüber hinaus wird die Durchgängigkeit des von der Proteinoberfläche zum aktiven Zentrum führenden Gaskanals für H₂O und O₂ und somit die Erreichbarkeit des H-Clusters für diese Moleküle experimentell und über MD-Simulationen überprüft. Abbildung 7.12 A zeigt das H-Cluster als Kugel-Stab-Modell.

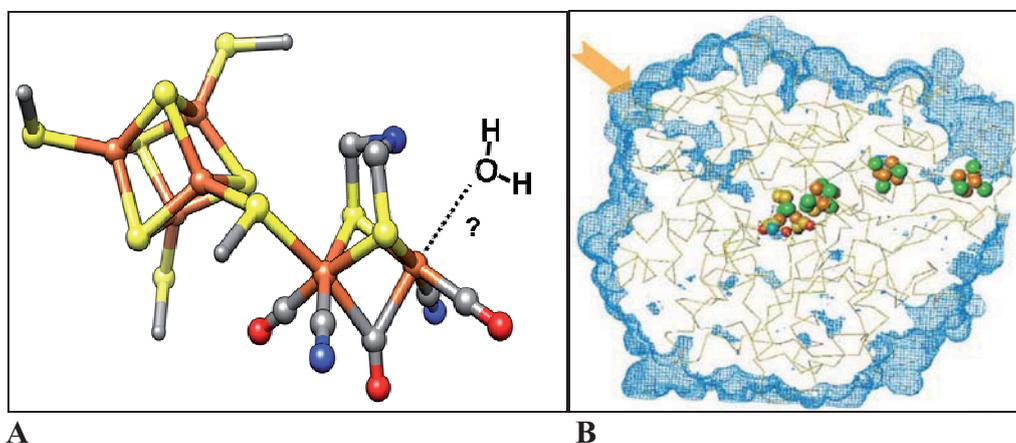


Abbildung 7.12: A: Das H-Cluster des DdH-Moleküls in „Kugel-Stab“-Ansicht. Kohlenstoff: grau, Eisen: orange, Schwefel: gelb, Sauerstoff: rot, Stickstoff: blau
B: Gaskanal, simuliert über Molekül-Modellrechnungen des Programms Turbo-Frodo, der Kanal führt von der Oberfläche des Moleküls bis zur freien Koordinationsstelle des distalen Eisenatoms (verändert nach [13])

Während das proximale Eisenatom zwei Bindungen mit CO-Liganden und eine Bindung mit einem CN-Liganden sowie insgesamt drei Bindungen zu Schwefelatomen eingeht, weist das distale Eisenatom aufgrund seiner fehlenden Bindung zu einem [FeS]-Cluster lediglich die CO- und CN-Bindungen und zwei Bindungen zu Schwefelatomen auf, welche die Verbindung zum Dithiomethylamin darstellen. Die sechste Bindestelle des distalen Eisenatoms ist somit nicht durch eine Schwefelbindung besetzt und wird als Bindestelle des Substrates Wasserstoff und Ort der Katalyse angesehen.

So wurde für den nicht physiologischen H_{ox}-CO-Zustand durch Röntgenstrukturanalysen nachgewiesen, daß das externe CO-Molekül an die sechste Bindestelle des distalen Eisenatoms bindet [60]. Da im H_{ox}-CO-Zustand das Enzym vollständig inhibiert vorliegt, ist es somit wahrscheinlich, daß die Bindestelle am distalen Eisenatom ebenfalls während der H⁺-Reduktion zumindest zeitweilig besetzt wird.

Lange Zeit bestand Uneinigkeit über die Bindungssituation des aktiven Zentrums der [FeFe]-Hydrogenasen im H_{ox} -Zustand, da die Untersuchung der beiden „Modellenzyme“ DdH und CpI kein einheitliches Bild lieferte.

In der Kristallstruktur der [FeFe]-Hydrogenase CpI aus *Clostridium pasteurianum* wurde an dieser Position Elektronendichte aufgelöst, welche einer Sauerstoffspezies (H_2O oder OH^-) zugeordnet wurde [26].

Für den Fall des DdH-Enzyms konnte diese Beobachtung bisher nicht bestätigt werden, eine entsprechende Spindichte an der freien Bindestelle in der Röntgenstruktur des DdH-Enzyms wurde nicht gefunden [27].

Andererseits scheint diese Diskrepanz in der Bindungssituation des distalen Eisenatoms verschiedener Hydrogenasen im Widerspruch zu stehen zu den bisher an beiden Enzymen vorgenommenen EPR-Analysen, so weisen die Enzyme DdH und CpI wie auch alle anderen bisher untersuchten [FeFe]-Hydrogenasen sehr ähnliche EPR-Spektren mit den g -Werten: $g_x = 2,00$; $g_y = 2,04$; $g_z = 2,10$ auf [49, 131], was einen Hinweis auf eine ähnliche Elektronenverteilung des aktiven Zentrums darstellt. Diese Beobachtung wurde ebenfalls in der Untersuchung von ^{57}Fe - und 1H -Hyperfein-Kopplungs-Konstanten bestätigt [62, 63].

Um aufzuklären, ob im Redoxzustand H_{ox} ein Wassermolekül an das distale Eisen des H-Cluster gebunden ist, wurden Proben der [FeFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans* mit $H_2^{17}O$ und D_2O markiert.

Diese Isotope erzeugen starke Hyperfein-Kopplungen im System, welche im Falle der Präsenz eines Wassermoleküls in direkter Nähe zum katalytischen Zentrum großen und damit gut detektierbaren Einfluß auf die Elektronenstruktur haben sollten.

In Abbildung 7.12 B ist außerdem ein anhand von Molekül-Modell-Berechnungen gefundener Gaskanal im DdH-Molekül zu sehen (siehe Pfeil). Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse der $H_2^{17}O$ -Markierung ließen eine Überprüfung dieses Kanals im Hinblick auf die Durchgängigkeit für H_2O und O_2 interessant erscheinen. Die Analyse wurde über Molekulardynamik (MD-) Simulationen vorgenommen.

Bei den bisherigen Untersuchungen der Kristallstrukturen bestand eine Schwierigkeit darin, die Proben in einen definierten Redox-Zustand zu bringen. Während bei den Messungen des CpI-Enzyms dieses im „as-isolated“-Zustand vorlag, was einer größtenteils oxidierten Probe entspricht, waren die Kristalle des DdH-Enzyms unter mehr reduktiven Bedingungen angezogen worden, so daß man in diesem Fall von einer Mischung von (hauptsächlich) reduziertem und oxidiertem Enzym ausgehen muß.

Durch das bereits bei den vorhergehenden EPR-Messungen angewendete Protokoll zur Probenvorbereitung (siehe Kapitel 7.1) konnte ein definierter Zustand ohne Beimischungen eingestellt werden.

Das Protokoll zur Markierung der Proben ist ebenfalls in Kapitel 7.1 wiedergegeben.

Zuerst wurde ein CW-EPR-Spektrum der mit $H_2^{17}O$ markierten Probe aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.17 mit den Ergebnissen der D_2O -CW-EPR-Messungen zusammengefaßt.

Der Spektrenverlauf bei $g = 2,10$ wurde vergrößert, da in diesem Bereich keine Signale der ebenfalls zu sehenden [4Fe4S]-Cluster auftreten und somit die Spektren der unterschiedlichen Proben in diesem Bereich am besten zu vergleichen sind. Der Vergleich von H_2O - und $H_2^{17}O$ -markierten Proben (siehe Bildunterschrift) zeigt einen exakt identischen Verlauf.

Im nächsten Schritt wurde eine HYSORE-Studie durchgeführt. Dabei wurde im W-Bandbereich (94 GHz) gemessen, um Überlagerungen von ^{14}N -Signalen weitest möglich zu unterdrücken [30]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.13 dargestellt.

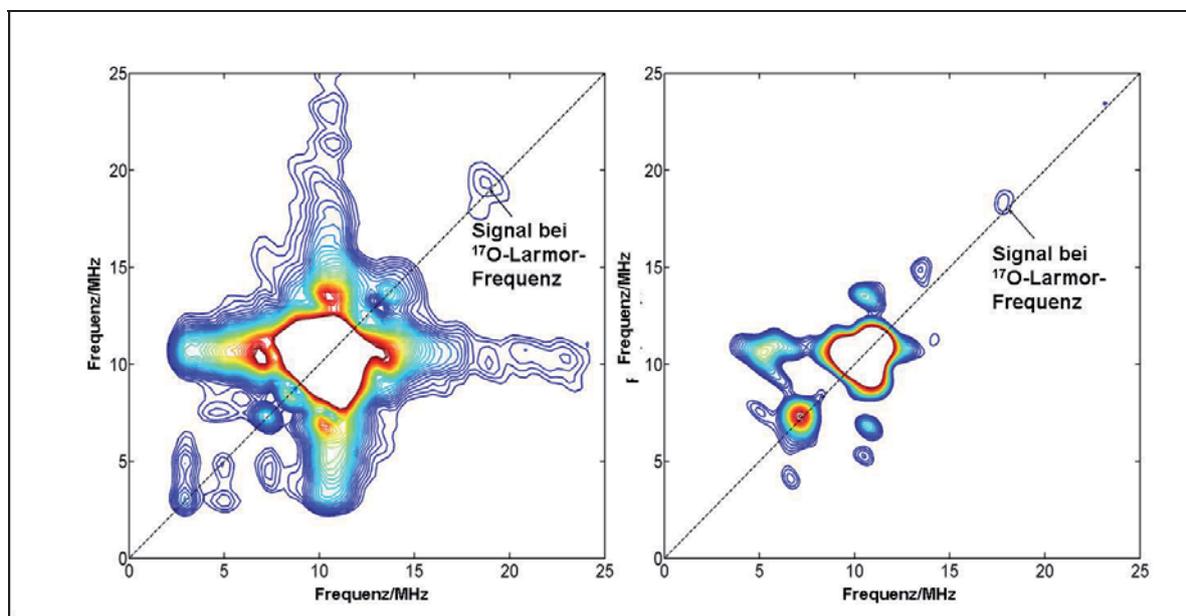


Abbildung 7.13: A: W-Band-HYSORE-Messung des DdH-H-Clusters im H_{ox} -Zustand, die Probe wurde mit H_2^{17}O angereichert. Die Messungen wurden bei der maximalen Absorption des EPR-Spektrums durchgeführt ($g = 2,04$). Da das HYSORE-Spektrum bei 10,7 MHz von ^{14}N -Signalen beherrscht wird, wurde der maximale Konturgrad auf 30% der Signalintensität herabgesetzt. B: W-Band-HYSORE-Messung nicht markierter Probe. Beide Messungen wurden mit exakt gleichen Einstellungen vorgenommen. Die schwächere Signalintensität der rechten Messung beruht auf einer geringeren Probenkonzentration.

Im Spektrum der ^{17}O -markierten Probe ist neben den zu erwartenden Signalen der ^{14}N -Kerne ein Signal zu sehen, welches bei der Larmor-Frequenz von ^{17}O auftritt (siehe Pfeil). Jedoch zeigt das Vergleichsspektrum der unmarkierten Probe rechts ein Signal an exakt der gleichen Position, so dass es sich hierbei nicht um ein ^{17}O -Signal handeln kann. Es wurde somit in beiden Messungen kein Hinweis für die Kopplung eines mit ^{17}O markierten Wassermoleküls in der Nähe des aktiven Zentrums gefunden.

Um abschätzen zu können, in welcher Größenordnung Hyperfeinkopplungs-Konstanten möglicher ^{17}O -Kopplungen liegen müssen, wurden diese mittels DFT-Berechnungen ermittelt (Parameter siehe Kapitel 7.1). Der ^{17}O -Kern besitzt einen Spin von $5/2$. Darum sollte selbst eine kleine Hyperfein-Kopplungskonstante eine deutliche Linienverbreiterung im Spektrum hervorrufen.

Um das Ausmaß einer erwarteten Linienverbreiterung abschätzen zu können, wurde der Effekt mit ^{17}O -Hyperfein-Wechselwirkungen verschiedener Stärke simuliert (Abbildung 7.14).

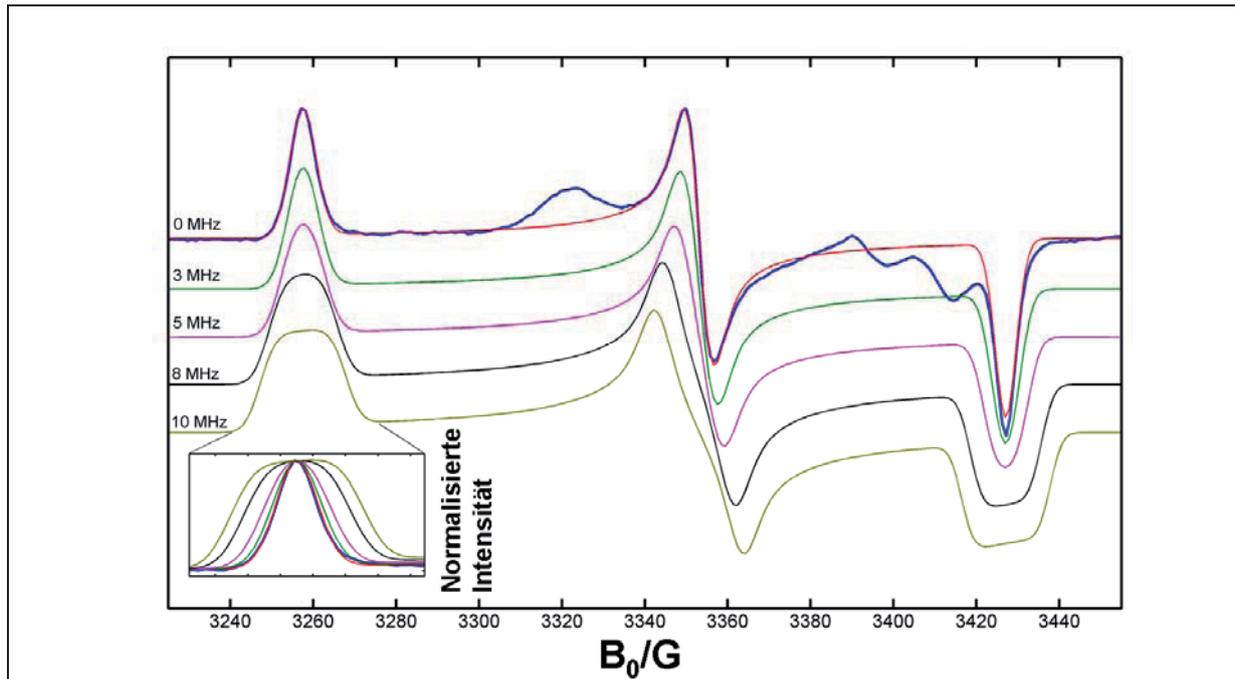


Abbildung 7.14: CW-EPR-Spektrum (blau) des H-Clusters ohne Isotopenmarkierung; Vergleich mit den simulierten Linienverbreiterungen aufgrund von ^{17}O -Hyperfein-Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Hyperfeinkopplungen

Die Simulationen zeigen, dass selbst eine isotrope Kopplung von 5 MHz zu einer deutlichen Linienverbreiterung führen sollte, welche weit größer ist als die aufgrund der Austauschprozedur anzunehmende Messunsicherheit. Im Präparationsteil wurde 90%iges H_2^{17}O verwendet, was zu einer Endkonzentration von 80% geführt hat (wobei die unvermeidliche Verdünnung der Probe aufgrund der Thionin-Zugabe berücksichtigt wurde). Der dadurch entstandene Anteil nicht ausgetauschter H_2O -Moleküle bewirkt in der Konsequenz eine leichte Verringerung in der Linienverbreiterung.

Durch die vorgenommenen Simulationen konnte somit eine Abschätzung getroffen werden, welche ^{17}O -Kopplungen gemessen werden können und welche zu schwach sind, um einer Messung zugänglich zu sein. Grundsätzlich sollten Kopplungen von mehr als 3 MHz sowohl in den EPR- wie auch den HYSORE-Messungen dieses Versuchsteils detektierbar sein.

Die HYSORE-Messung in Kombination mit den vorgenommenen EPR-Simulationen belegt somit, daß keine Kopplungen von ^{17}O -markierten Molekülen im Bereich des aktiven Zentrums aufgelöst werden können.

Neben der Möglichkeit, daß sich kein Wassermolekül nahe des aktiven Zentrums befindet, kann ein weiterer Grund für das Fehlen von ^{17}O -Signalen darin zu suchen sein, daß das aktive Zentrum des Enzyms für Wasser nicht frei zugänglich ist und die Bindung eines Wassermoleküls im Zuge des Reaktionsmechanismus' in Form von Umlagerungen definierter, in der Nähe des aktiven Zentrums „gefangener“ Wassermoleküle vor sich geht. Das aktive Zentrum ist über einen Kanal mit der Oberfläche des Moleküls verbunden, welcher in Abbildung 7.12 B zu sehen ist.

Diese Vermutung kann mittels MD (Moleküldynamik)-Simulationen überprüft werden. Hierbei werden die Interaktionen zweier Moleküle simuliert, wobei das Protein als dynamisches System betrachtet wird, das Eigenbewegungen ausführt. Wichtige, in die

Simulation einfließende Faktoren sind seine Faltung, das Lösungsmittel, in dem es sich befindet sowie die Temperatur. Die Simulation wurde mit den in Kapitel 7.1 genannten Parametern ausgeführt. Wichtige Parameter sind die Hydrophobizität des Kanals sowie dessen Durchmesser, welche als Bestandteile der angelegten Kraftfelder in die Simulation mit einfließen.

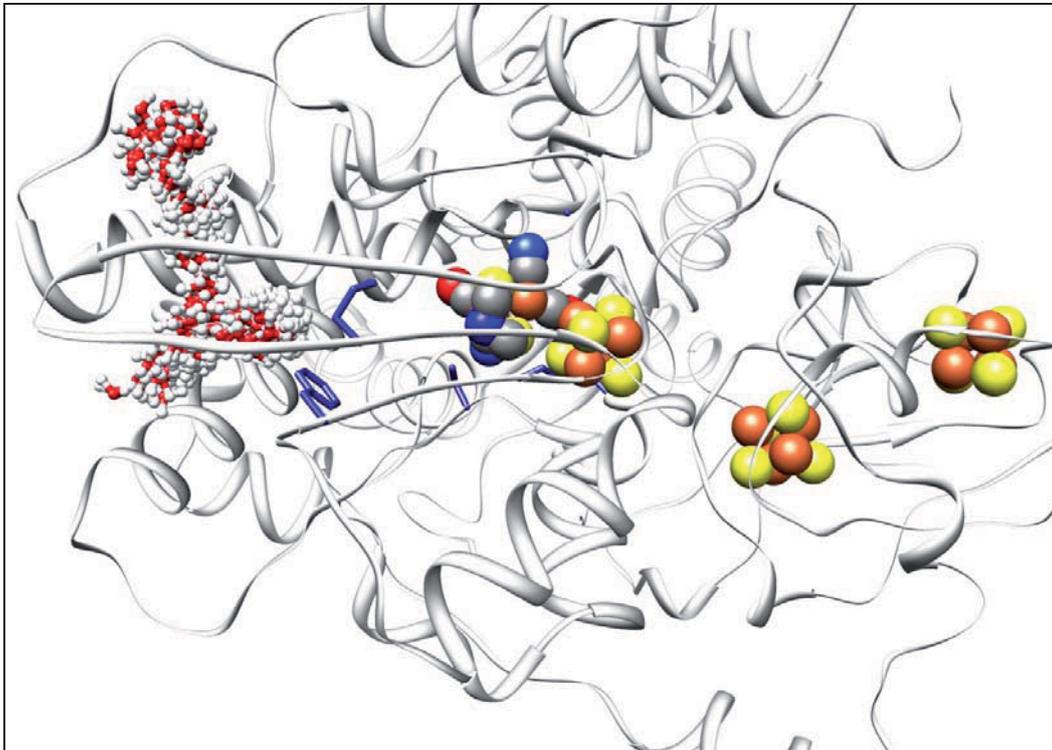


Abbildung 7.15: MD-Simulation zur Passierbarkeit des Kanals für Wasser. Die Seitenketten von Methionin 303 und Phenylalanin 372 (beide große Untereinheit) sind blau hervorgehoben. Temperatur: 300K (konstant), Zeitschritte: 2fs, Anzahl Schritte: 50.000

In Abbildung 7.15 sind die Bewegungen eines einzigen Wassermoleküls (rot/weiß) zu verschiedenen Zeitpunkten der Simulation festgehalten. Die Simulationen wurden so lange fortgeführt, bis das Wassermolekül den Kanal verlassen hatte, was bei allen Simulationen nach spätestens 100 ps Simulationszeit der Fall war. Die abgebildete Simulation macht deutlich, daß Wasser bis zu den Aminosäuren Methionin 303 und Phenylalanin 372 in den Kanal vordringen kann und dann von den Seitenketten dieser beiden Aminosäuren blockiert wird.

Da die MD-Simulation nahelegt, daß die Isotopenmarkierung mit H_2^{17}O nicht erfolgreich sein könnte, wurde im folgenden eine andere Methode erprobt, um Wassermoleküle in der Nähe des aktiven Zentrums gegen isotopenmarkierte Moleküle auszutauschen. Hierzu fiel die Wahl auf D_2O , wobei die Eigendissoziation von H_2O bzw. D_2O ausgenutzt werden sollte. Dissoziiertes D^+ kann aufgrund seiner geringen Größe über Diffusionsprozesse zum aktiven Zentrum des DdH-Enzyms gelangen. Darüber hinaus wurde in dem Enzym ein putativer Protonenpfad gefunden, welcher vom aktiven Zentrum über die Aminosäuren Lysin 237, Glutaminsäure 240, drei Wassermoleküle und Glutaminsäure 245 zur Oberfläche führt (Abbildung 7.16 [13]).

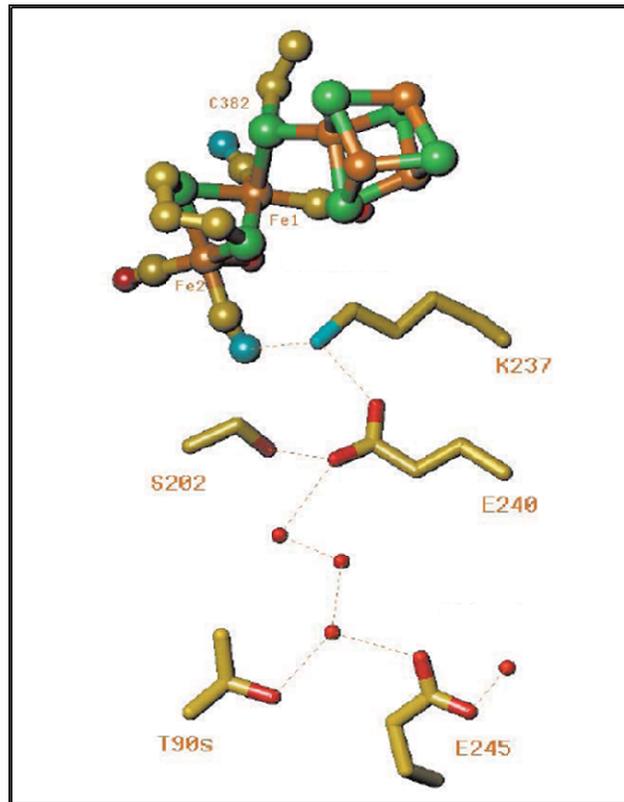


Abbildung 7.16: putativer Protonenpfad in DdH.
Beschreibung siehe Text

Die Markierung wurde genau entsprechend der Markierung mit H_2^{17}O durchgeführt (siehe auch Kapitel 7.1).

Zuerst wurde wiederum ein CW-EPR-Spektrum aufgenommen. Abbildung 7.17 faßt die Ergebnisse aller CW-Messungen zusammen:

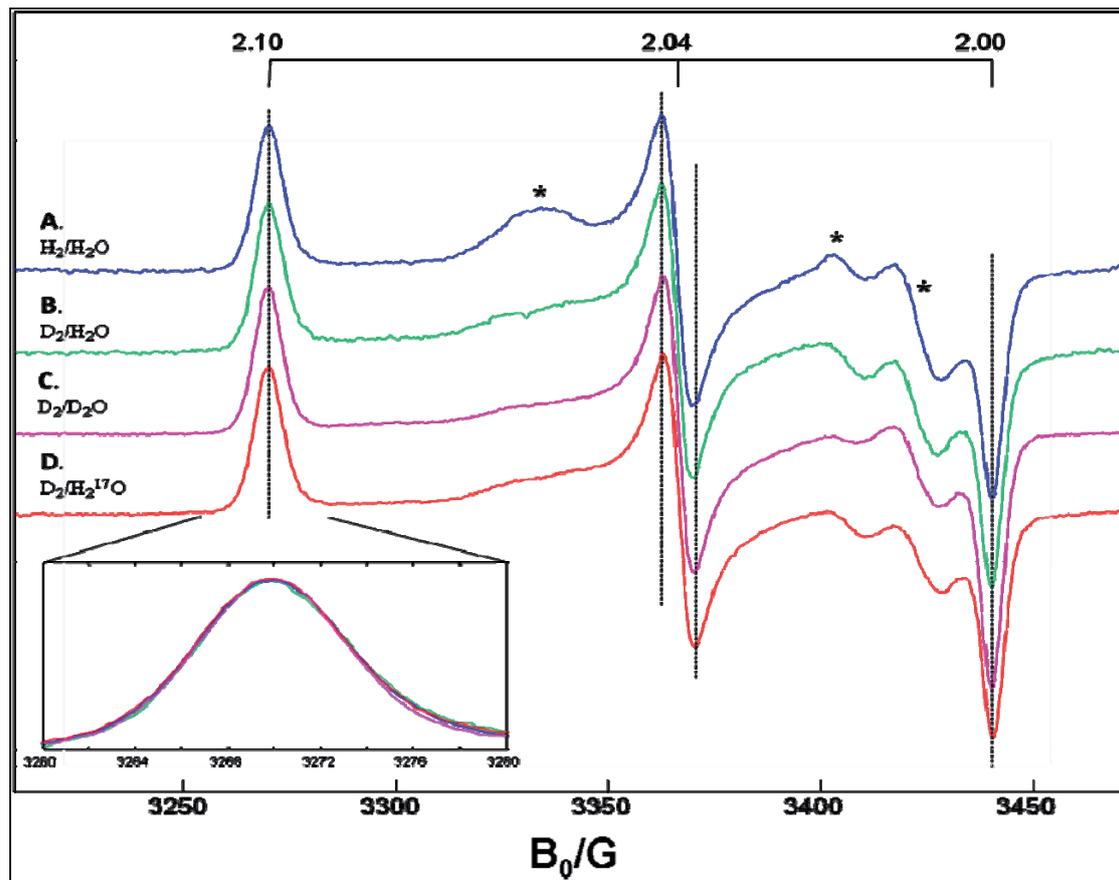


Abbildung 7.17: CW EPR-Messungen verschieden markierter DdH-Proben im H_{OX} Zustand. A: unmarkierte Probe B: D_2 -aktivierte Probe C: D_2 -aktivierte D_2O -markierte Probe D: D_2 aktivierte $H_2^{17}O$ -markierte Probe. Die Hauptwerte des g-Tensors sind über den Spektren angegeben. In den mit Sternchen markierten Spektrenbereichen (hauptsächlich Messung A) sind Signale der $[4Fe4S]$ -Cluster und des H_{OX} -CO Zustands zu sehen. Im Fenster unterhalb der Spektren sind die Spektrenverläufe bei der Position $g = 2,10$ übereinander gelegt.

Der vergrößerte Bereich des Spektrums beim g-Wert $g = 2,10$ zeigt, daß die Linienbreite der D_2O -markierten Probe etwas geringer ist im Vergleich mit den unmarkierten und der mit $H_2^{17}O$ markierten Probe.

Zur besseren Analyse der D_2O -Kopplungen wurden Davies-ENDOR-Spektren im Q-Band anhand einer auf gleiche Weise wie zuvor mit D_2O markierten Probe aufgenommen. Um ein Differenzspektrum aufnehmen zu können, wurde die gleiche Messung mit einer unmarkierten Probe wiederholt. Abbildung 7.18 zeigt die erhaltenen Spektren.

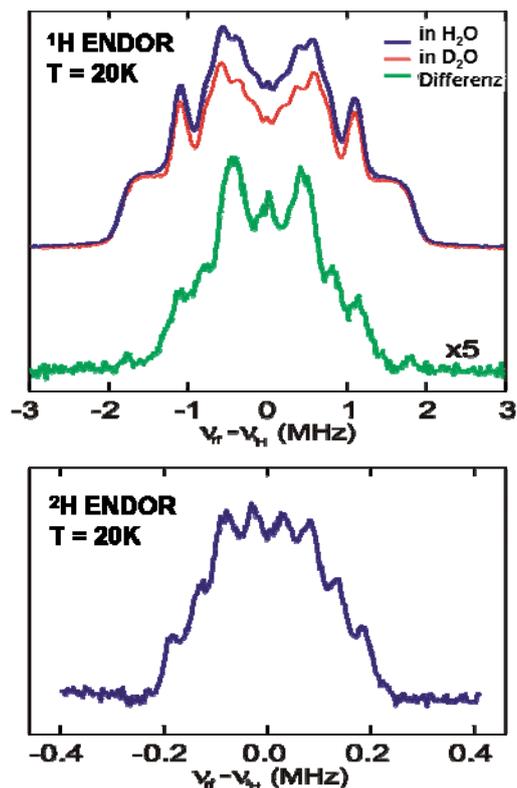


Abbildung 7.18: Q-Band ^1H -Davies-ENDOR-Messungen (oberer Teil) und ^2H -Mims-ENDOR-Spektrum (unterer Teil) des H-Cluster von DdH im H_{ox} -Zustand. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Spektrenbreiten aneinander angepasst.

^1H -Davies-ENDOR: ν_{MW} : 33,869 GHz, $t(\pi/2)$: 36 ns, $t_{\text{inv.}}$: 200 ns,

T_{RF} : 7 μs , $B_0 = 11535$ G

^2H -Mims-ENDOR: ν_{MW} : 33,869 GHz, τ : 32ns, T_{RF} : 36 μs ,

$t(\pi/2)$: 36 ns, $B_0 = 11535$ G

Der Vergleich des H_2O - und D_2O -Spektrums lässt substantielle Unterschiede im Linienmuster erkennen, welche auf die Spektrveränderung durch die Kopplung von ^2H -Kernen zurückzuführen sind. Die gewonnenen Daten bestätigen somit, daß die gewählte Methode der Isotopenmarkierung für diese Probe erfolgreich war und des weiteren, daß Protonen in der unmittelbaren Umgebung des aktiven Zentrums austauschbar sind. Das Linienspektrum zeigt Kopplungen von mehreren Protonen, welche durch die Isotopenmarkierung ausgetauscht wurden. Dies ist nicht verwunderlich, da auch bei einer früheren ^1H -ENDOR-Analyse an CpI Kopplungen mehrerer Protonen gefunden wurden [82]. Jedoch kann durch den Spektrverlauf alleine nicht entschieden werden, ob eine der Kopplungen von einem gebundenem Wassermolekül an der freien Bindestelle des aktiven Zentrums herrührt, da sich die vorhandenen Kopplungen mit anderen Signalen überlagern. Außerdem zeigen die aufgenommenen Spektren, daß der größte Teil des Spektrums keine Veränderungen durch die Isotopenmarkierung erfährt. Dies steht ebenfalls im Einklang mit vorherigen Studien an CpI, bei denen gezeigt wurde, daß der Großteil der aufgelösten Signale von nicht austauschbaren β -Protonen der Cysteine stammt.

Darüber hinaus wurde ein ^2H Mims ENDOR-Spektrum im Bereich der Larmor-Frequenz von Deuterium aufgenommen (bei 1186 mT um 7,75MHz).

Dieses zeigt bemerkenswerter Weise einen dem Differenzspektrum der Davies-ENDOR-Messungen sehr ähnlichen Spektrverlauf. Die Tatsache, daß mit verschiedenen

Messmethoden ähnliche spektrale Muster erhalten wurden, spricht für die Qualität des Differenzspektrums.

Um einen Eindruck davon zu gewinnen, in welcher Größenordnung Kopplungen eines an Fe₂ gebundenen Wassermoleküls liegen, wurden diese ebenfalls wie im Falle für ¹⁷O-Kopplungen mittels DFT simuliert. Außerdem wurden ⁵⁷Fe-Kopplungen berechnet, welche leicht mit experimentellen Daten verglichen werden können (siehe Tabelle 7.5).

Tabelle 7.5: DFT-Berechnungen des isotropen Anteils der Hyperfein-Interaktionen (in MHz) im Vergleich mit experimentell gewonnenen Daten

Kern	„H ₂ O-freies“ Modell	„H ₂ O-gebundenes“ Modell*	experimentelle Daten
⁵⁷ Fe (Fe _p)	0.95	21.59 (13.3)	12.4 (±0.2)
⁵⁷ Fe (Fe _d)	31.4	18.46 (11.4)	12.4 (±0.2)
¹ H ₁ (H ₂ O)	-	0.16 (0.09)	0 – 2**
¹ H ₂ (H ₂ O)	-	2.26 (1.4)	0 – 2**
¹⁷ O (H ₂ O)	-	26.40 (16.3)	-

*: Die Werte in Klammern sind die Werte nach der Korrektur um den Skalierungsfaktor 0,617 (siehe Text)

** : Auf den Daten der ¹H/²H-ENDOR-Analyse beruhender Schätzwertbereich möglicher Kopplungen

Die geometrische Orientierung von 1H₁ und 1H₂ des Wassermoleküls an der freien Bindestelle wird aus Abbildung 7.19 deutlich.

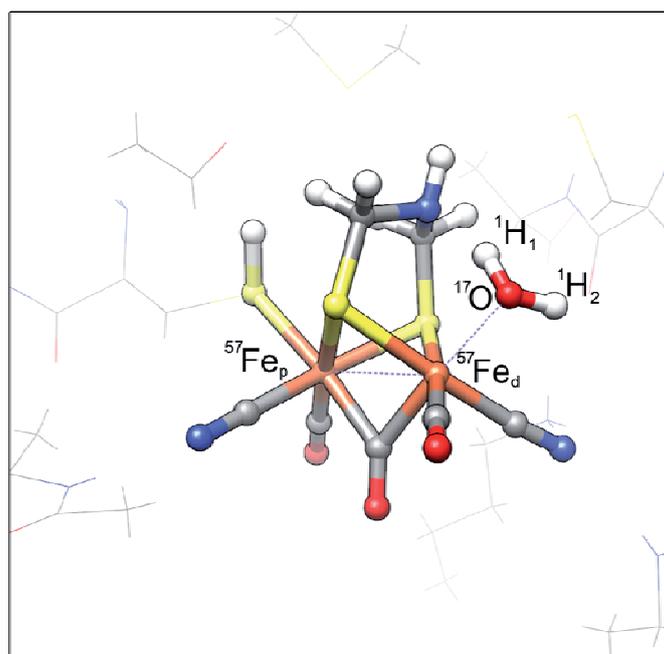


Abbildung 7.19: H-Cluster mit einem Wassermolekül an der freien Bindestelle. Die Bezeichnung der Kerne entspricht der Bezeichnung in Tabelle 7.5

Zu beachten ist hierbei, daß das zur Berechnung herangezogene Modell lediglich das zweikernige Subcluster einschließt. So werden bei diesem vereinfachten Modell keine Austausch-Interaktionen mit dem [4Fe4S]-Cluster mit einbezogen. Daher stellen die errechneten Hyperfeinkopplungskonstanten intrinsische Werte da, welche um einen Skalierungsfaktor korrigiert werden müssen. Für die vorliegenden Berechnungen wurde ein Skalierungsfaktor von 0,617 ausgewählt, da dieser in der Analyse zu ^{57}Fe -Hyperfeinkopplungen des DdH-Enzyms erhalten wurde [36]. Die korrigierten Kopplungskonstanten sind in Tabelle 7.5 in Klammern gesetzt.

Die über die Simulation berechnete ^1H -Kopplung des H_2O -gebundenen Modells liegt bei 1,4 MHz. Der Vergleich mit den experimentellen Daten zeigt genau in diesem Bereich (jeweils 0,7 MHz vom Nullpunkt entfernt) eine Kopplung (Abbildung 7.18).

Aus DFT-Modell-Rechnungen wurde ermittelt [30], daß die Bindung eines H_2O - oder OH^- Liganden an die freie Bindestelle des distalen Eisens zu einer kompletten Neuordnung der Spindichte-Verteilung führt. Die Ergebnisse einer entsprechenden DFT-Berechnung sind in Abbildung 7.20 zu sehen.

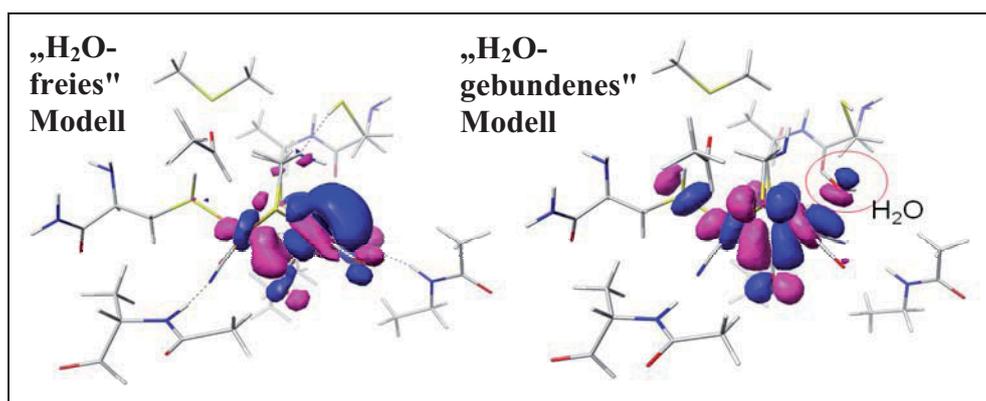


Abbildung 7.20: Anhand von DFT-Berechnungen bestimmte SOMO eines vereinfachten DdH-Modells im H_{ox} -Zustand mit dem H-Cluster und einigen benachbarten Aminosäuren. Links die Elektronendichteverteilung eines Modells ohne schwach gebundenes Wassermolekül an der offenen Bindestelle. Rechts wurde in den DFT-Berechnungen ein Wassermolekül an der offenen Bindestelle berücksichtigt.

In Abbildung 7.20 ist Kohlenstoff grau gekennzeichnet, Stickstoff blau, Sauerstoff rot und Schwefel gelb. Gezeigt sind die einfach besetzten Molekül-Orbitale (SOMO).

Während beim „ H_2O -freien“ Modell ein Großteil der Spindichte im Bereich des distalen Eisenatoms lokalisiert ist, zeigt das „ H_2O -gebundene“ Modell eine sehr viel gleichmäßigere Verteilung der Spindichte über beide Eisenionen.

Die Ergebnisse der Modell-Rechnung zum „ H_2O -gebundenen“ Modell passen in guter Übereinstimmung zu vorherigen Analysen an einer mit ^{57}Fe markierten Probe [36], während die Berechnungen für das „ H_2O -freie Modell“ zu einer Spindichteverteilung führen, die keine Übereinstimmung mit diesen Messungen zeigt.

Die bisherigen Analysen zur möglichen Bindung eines Wassermoleküls waren anhand von Kristallstrukturdaten durchgeführt worden. Die Natur des Redoxzustandes dieser Kristalle

konnte dabei lediglich abgeschätzt werden. So befand sich in den CpI-Kristall-Ansätzen eine geringe Menge Natrium-Dihionit, was bedeuten kann, daß diese Proben teilweise im reduzierten Zustand vorlagen. Jedoch wird davon ausgegangen, daß aufgrund der Lagerung der Kristalle unter einer wasserstoffhaltigen Atmosphäre durch Auto-Oxidation ein größtenteils oxidiertes Endzustand erhalten worden ist [26].

Die Strukturanalyse des DdH-Proteins war mit Probenansätzen unter mehr reduzierenden Bedingungen durchgeführt worden [13]. In beiden Fällen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um Mischzustände handelt.

Die in diesem Versuchsteil vorgestellten Markierungsexperimente ergaben das zunächst überraschende Ergebnis, daß die Probe erfolgreich mit D₂O markiert werden konnte, nicht jedoch Kopplungen mit einem ¹⁷O-Kern detektiert wurden.

Durch die MD-Simulationen konnte nachgewiesen werden, daß der über Untersuchungen der Kristallstruktur gefundene Kanal nicht zugänglich für Wassermoleküle ist. In Kombination mit den experimentellen Ergebnissen wird deutlich, daß auch keine anderen Strukturen im Protein existieren, welche das aktive Zentrum für Wasser zugänglich machen würden. Dies ist ein grundlegender Unterschied zu [NiFe]-Hydrogenasen, an denen Isotopenmarkierungen mit H₂¹⁷O erfolgreich durchgeführt wurden [83, 84]. Der Isotopenaustausch von D₂O beruht demnach auf der Dissoziation von D₂O und der Diffusion von D⁺-Ionen zum aktiven Zentrum. Die Ionen können entweder frei in dem Protein diffundieren oder erreichen das aktive Zentrum über den in der Literatur beschriebenen Protonenpfad [13].

Der Vergleich der ¹H- und ²H-Davies-ENDOR-Messungen zeigte, daß mehrere Protonen ausgetauscht werden konnten. Insgesamt konnten mindestens sechs Kopplungen aufgelöst werden, wobei bei einer ¹H-ENDOR-Studie an CpI acht Kopplungen gefunden worden waren [82]. Diese Diskrepanz kann auf einem diesbezüglichen Unterschied der beiden Enzyme beruhen oder darauf zurückzuführen sein, daß schwache Kopplungen aufgrund der in diesem Fall schwierigen Markierungsprozedur nicht aufgelöst wurden.

Die vorgenommenen DFT-Berechnungen belegen, daß die Kopplung, die ein ausgetauschtes D₂O-Molekül am Fe₂ verursacht, zu einer Hyperfeinaufspaltung führt, welche in der Größenordnung liegt, die gemessen wurde.

In Verbindung mit einer vorherigen ⁵⁷Fe-Studie unserer Gruppe kann somit mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß das Enzym im H_{ox}-Zustand an der freien Bindestelle des distalen Eisenatoms eine Bindung zu einem Wassermolekül aufweist, so wie dies auch für das CpI-Enzym beschrieben wurde. Es handelt sich jedoch um eine schwache Bindung.

Die Bedeutung, welche die Präsenz eines Wassermoleküls in der Nähe des aktiven Zentrums eines wasserstoffspaltenden Komplexes hat, wurde außerdem bereits für einen dem aktiven Zentrum der Hydrogenasen nachempfundenen Nickel-Ruthenium-Komplex nachgewiesen, welcher Aktivität zeigt, wenn ein Wassermolekül an das Rutheniumatom gebunden vorliegt [92]. Ein katalytischer Zyklus, welcher ein Wassermolekül in die heterolytische H₂-Spaltung mit einbezieht, wurde vorgeschlagen [93]. Es ist somit möglich, daß grundsätzlich bei allen Hydrogenasen ein Wassermolekül eine wichtige Rolle während der Katalyse spielt.

Aufgrund der Abgeschlossenheit des aktiven Zentrums für Wasser erfolgt die Bindung eines Wassermoleküls im Verlauf des katalytischen Zyklus' wahrscheinlich durch eine spezifische Umlagerung eines Wassermoleküls (oder mehrerer Wassermoleküle) innerhalb des aktiven Zentrums. Das Fehlen einer einem Wassermolekül zuzuordnenden Elektronendichte in der Kristallstruktur von DdH läßt somit den Schluß zu, daß die Kristalle zum Zeitpunkt der Messung in einem reduzierten Zustand vorlagen.

7.5 Ausblick

Für die Hydrogenase CpI aus *Clostridium pasteurianum* wurde eine andere Gaskanalstruktur gefunden, welche einen wesentlich weniger hydrophoben Kanal einschließt [85]. Eine Markierung mit H_2^{17}O kann aufklären, ob in diesem Fall das aktive Zentrum zugänglich für Wasser ist.

Eine weitere Möglichkeit, ^{17}O -Kopplungen am aktiven Zentrum aufzulösen, besteht im Einsatz von $^{17}\text{O}_2$ -Gas zur Markierung, welches für beide Enzyme durchgeführt werden könnte.

Eine weitere Studie zur Austauschbarkeit von Protonen am aktiven Zentrum des CpI-Enzyms ergab keine messbaren Unterschiede im Vergleich der H_2O - und D_2O -Spektren [82]. Eine Wiederholung der D_2O -Markierung an diesem Enzym auf die exakt gleiche Weise wie in diesem Versuchsteil beschrieben kann klären, ob im Falle des CpI-Enzyms die nahe am aktiven Zentrum vorhandenen Wassermoleküle stärker gebunden sind als im DdH-Enzym.

Über eine solche Analyse kann ebenfalls aufgeklärt werden, ob das an der Bindestelle vorgefundene gebundene Wassermolekül zu einem H_{ox} -Zustand des aktivierten Enzyms oder einem „as-isolated“-Zustand gehört.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind außerdem hilfreich für zukünftige DFT-Rechnungen, welche durch die korrekte Einbindung des Liganden Wasser im oxidierten Zustand zu größerer Genauigkeit führen.

Nicht zuletzt stellen die Aminosäuren Methionin 303 und Phenylalanin 372 der großen Untereinheit, deren Seitenketten die Durchlässigkeit des Kanals entscheidend bestimmen, mögliche Ziele für Punktmutationen dar. Anhand des Austausches dieser Aminosäuren zu solchen mit größeren oder kleineren Seitenketten können die Charakteristika des Enzyms wie dessen Sauerstoffsensitivität, spezifische Aktivität und CO-Inhibierung besser verstanden werden.

8 ELEKTROCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER [FeFe]-HYDROGENASE

In diesem Versuchsteil wird die Immobilisierung und kovalente Bindung des DdH-Proteins an die Oberfläche einer elektrochemischen Mess-Elektrode beschrieben. Durch eine gerichtete Bindung kann ein direkter Elektronenfluß zwischen Elektrode und Protein ermöglicht werden. Mittels einer solchen Anordnung ist es möglich, das elektrochemische Verhalten des Enzyms ohne den Einsatz von Redoxmediatoren zu untersuchen, wodurch die gemessenen Ströme über einen weiten Bereich der Messung in direkter Abhängigkeit die katalytische Aktivität der Hydrogenase widerspiegeln. Die hier vorgestellten Messungen erlauben somit einen Blick auf die inhärenten katalytischen Eigenschaften des Enzyms.

Dabei kann über das Anlegen verschiedener elektrochemischer Potentiale sowohl die Oxidation des Wasserstoffs als auch die Reduktion von Protonen als Teilreaktionen der katalysierten Redoxreaktion untersucht werden.

Die Kopplungsprozedur wurde dabei ausgehend von dem in [132] beschriebenen Protokoll entwickelt. In diesem Protokoll konnte die [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* als erstes Hydrogenase-Enzym mittels einer kovalenten Bindung an eine Elektrode gebunden und elektrochemisch charakterisiert werden.

8.1 Elektrodenvorbereitung und Immobilisierung der Probe

In allen folgenden Messungen wurden die Proben an die Oberfläche einer hochorientiert pyrolytischen Graphitelektrode (HOPGE) kovalent gebunden, deren Aufbauschichten senkrecht zur Elektrodenoberfläche verliefen [61]. Zur kovalenten, elektrochemisch aktiven Immobilisierung des Hydrogenaseproteins wurde die Elektrode zuerst mit angefeuchtetem Schleifpapier (500er Körnung) für einige Sekunden poliert. Danach wurde mit einer 1000er Körnung nachgeschliffen. Dieser erste Abschleifprozess diente vor allem dazu, Kopplungsschichten der jeweils vorherigen Messung zu entfernen. Nach dieser ersten groben Politur wurde die Elektrode mit aufgeschlämmtem Aluminiumoxid (Alumina, Buehler) noch zweimal (Körnungen 1µm und 0,5µm) für einige Minuten feinpoliert. Danach wurde die Elektrode kurz mit destilliertem Wasser abgespült und in ein mit Wasser gefülltes Gläschen gestellt, so daß die restlichen Schleifpartikel in einem Ultraschallbad von der Oberfläche entfernt werden konnten.

Zur Kopplung des Proteins an die Elektrodenoberfläche musste dies mit einem Kopplungsagens interagieren, welches eine gerichtete Bindung mit der Elektrode gewährleistete, die die Weitergabe von Elektronen ermöglicht.

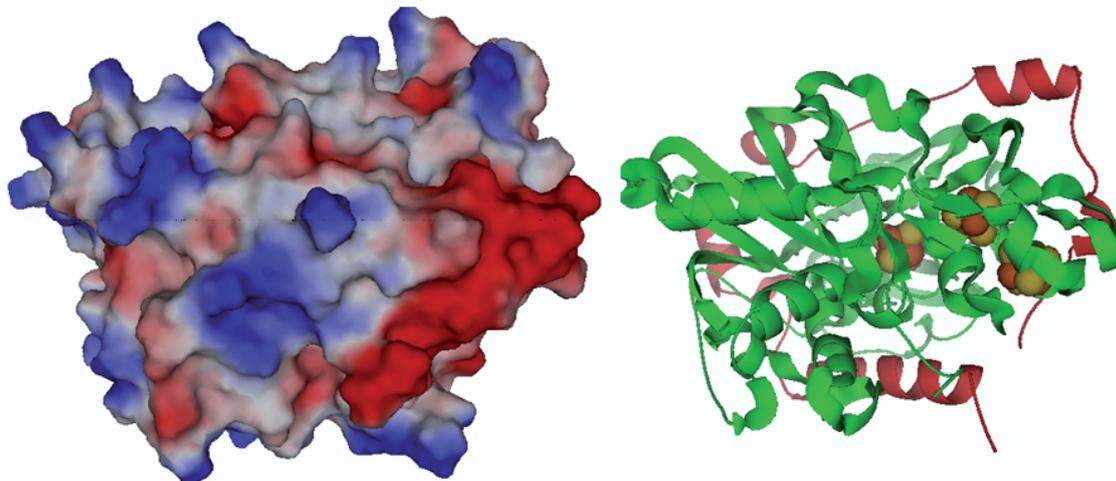
***D. desulfuricans* [FeFe]-Hydrogenase Oberflächenladungsverteilung**

Abbildung 8.1: Ladungsverteilung auf der Oberfläche von DdH (links) und Bändermodell (rechts), welches die [4Fe-4S]-Cluster sichtbar macht.

Aufgrund der Ladungsverteilung auf der Oberfläche des Enzyms, wie sie in Abbildung 8.1 dargestellt ist, wurde entschieden, die Kopplung im Bereich der höchsten negativen Ladungskonzentration (rot gekennzeichnet) vorzunehmen. Wie beim Vergleich mit dem identisch orientierten Bändermodell zu sehen ist, bilden das H-Cluster zusammen mit den beiden weiteren [4Fe-4S]-Clustern eine Kette, welche vom Inneren des Enzyms bis nahe der Enzymoberfläche an dieser Stelle reicht.

Mit einer Kopplung über ein positiv geladenes Kopplungsagens in diesem Bereich konnten somit die bestmöglichen Bedingungen für eine effiziente Elektronenübertragung geschaffen werden.

Die reine und wie zuvor beschrieben vorbereitete Elektrode wurde dazu für 5 Minuten 10 mM 4-Nitro-Benzen-Diazoniumsalz (NBD, ABCR GmbH & Co.) als Kopplungsagens in 10 ml reinem Azetonitril ausgesetzt. Nach Herausnahme der Elektrode aus der Lösung wurde die Oberfläche der Elektrode mit CH_3CN und anschließend einer Wasser-/Ethanolmischung kurz gespült, um überschüssiges NBD zu entfernen. Sodann wurde die Elektrode in 0,1 M H_2SO_4 -Lösung getaucht, und das NBD mittels der Aufnahme eines Zyklovoltammogramms an einem Potentiostaten reduziert. Die Reduktion bewirkt die Abspaltung der Azogruppe und die Bildung eines Radikals, welches mit der Elektrodenoberfläche eine Bindung eingeht.

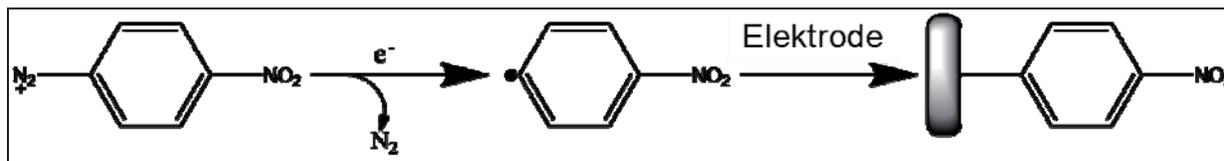


Abbildung 8.2: Bindung radikalischen NBDs an die Oberfläche einer Graphitelektrode

Darüber hinaus wird in einer Nebenreaktion die endständige NO_2 -Gruppe des Agens über das Zyklovoltammogramm zu NHOH reduziert.

Die Reduktion mittels des Potentiostaten konnte im Zyklovoltammogramm nachverfolgt werden. Das Zyklovoltammogramm wurde aufgenommen im Bereich von -1 bis +0,6 Volt bei 0,2 V/s.

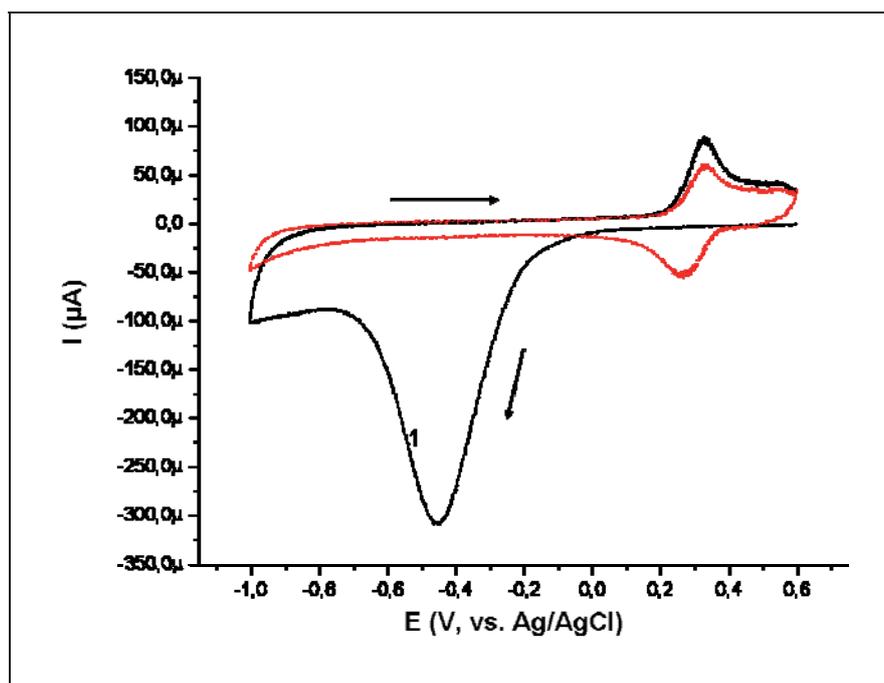


Abbildung 8.3: Reduktion des Primärlayers von 4-Nitro-Benzen-Diazoniumsalz im ersten Zyklovoltammogramm

In Abbildung 8.3 ist die Reduktion zu sehen. Die Pfeile geben die „Aufnahmerichtung“ des Zyklovoltammogramms wider. Das erste Zyklovoltammogramm ist schwarz eingezeichnet und mit „1“ markiert. Das zweite Zyklovoltammogramm ist rot. Die Reduktion des Layers ist bei einem Potential bei ca. -0,45 V zu sehen. Da der Prozess irreversibel ist, tritt er nur im ersten Potentialdurchlauf auf. Neben der irreversiblen, nur im ersten Zyklovoltammogramm zu sehenden Reduktion des Layers ist in den folgenden Zyklovoltammogrammen (rot gekennzeichnet) auch ein reversibler Redoxvorgang zu erkennen. Hierbei handelt es sich um die Oxidation der NHOH -Gruppe zu NO und deren Umkehrreaktion [51]. Zur Kopplung des Hydrogenase-Moleküls an diese Gruppe wurde das Enzym mit den Verbindungen N -Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) behandelt.

Hierzu wurden zuerst 3 μl des auch für die Messung verwendeten Puffers auf die Elektrodenoberfläche pipettiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit und dem darauffolgenden Entfernen des Puffers von der Elektrodenoberfläche mittels Pressluft wurden 3 μl Hydrogenaseproteins in einer Konzentration zwischen 30 und 40 μM in 10 mM MES-Puffer, pH 6,5 nach vorsichtigem Auftauen im Grünlichtraum bei 4°C auf die Elektrode gegeben und 20 Minuten inkubiert. Die Inkubation musste bei diesem pH-Wert durchgeführt werden, um

die Bildung der Proteinschicht gewährleisten zu können. Danach wurde die Probe mit 2,5 μl NHS (5mg in 500 μl MES, pH 6,5) und 2,5 μl EDC (2,4 mg in 230 μl MES, pH 6,5) versetzt und ebenfalls im Grünlichraum für 120 Minuten inkubiert, um eine ausreichende Zeitspanne für die Kopplungsreaktion zu gewährleisten.

Zuerst geht hierbei EDC ein instabiles Intermediat mit den Seitenketten der im Protein vorliegenden Glutaminsäuren ein. In einem zweiten Schritt wird ersteres durch NHS aus der Verbindung verdrängt, wie in Abbildung 8.4 gezeigt:

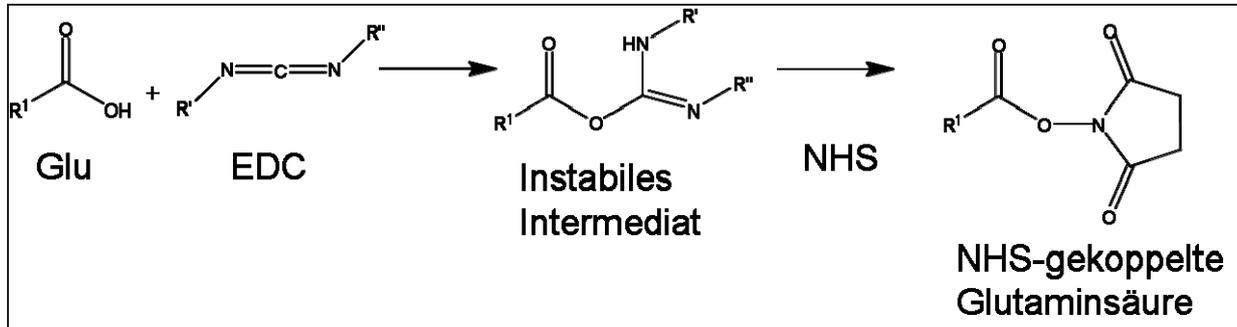


Abbildung 8.4: Bindung von EDC an die Glutaminsäure-Seitenketten des Enzyms und Verdrängung des EDC durch NHS

Im letzten Schritt findet die Übertragung des Probenmoleküls von NHS auf das an die Elektrode gebundene NBD statt.

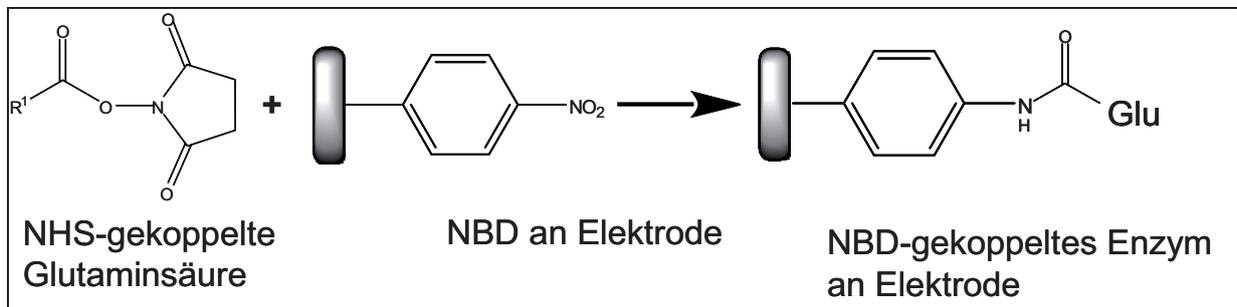


Abbildung 8.5: Kopplung von NBD an das Protein

Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte die Elektrode an den Meßaufbau montiert werden. Zur Messung diente ein 3-Elektrodenaufbau wie in Kapitel 3 beschrieben, mit einer Gegen- und Referenz-Elektrode sowie der probenbeschichteten Mess-Elektrode.

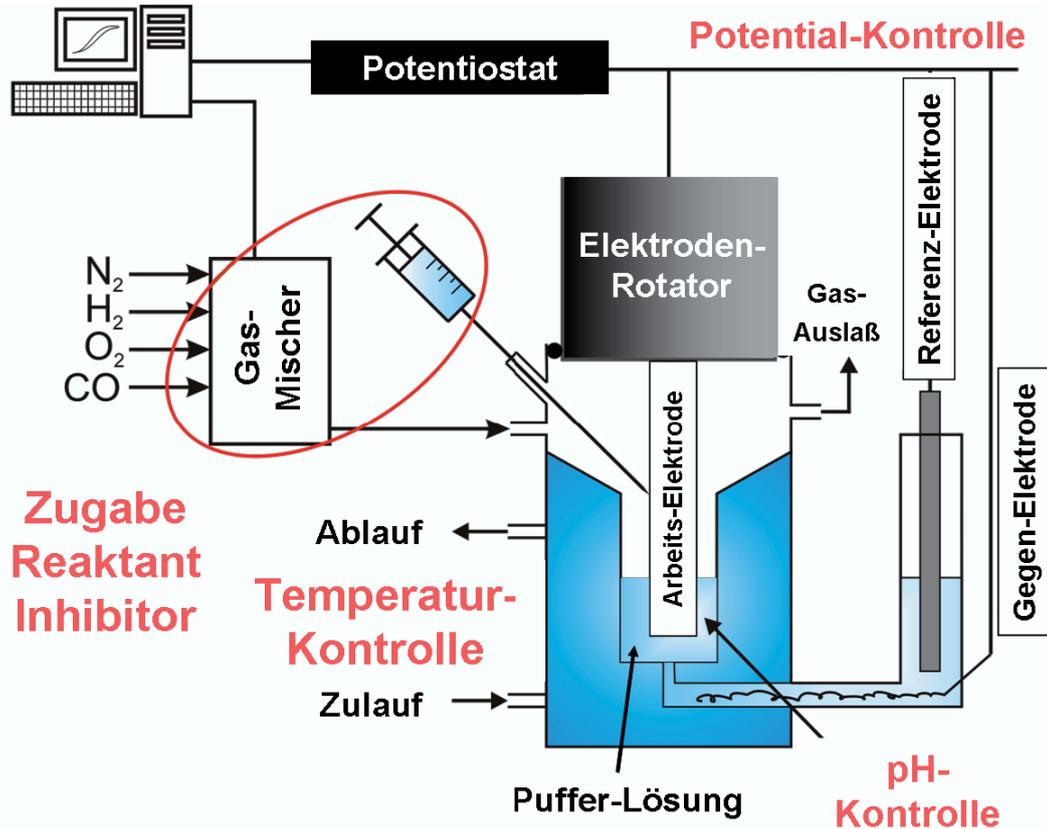


Abbildung 8.6: Elektrostat und Messaufbau

Der in Abbildung 8.6 schematisch gezeigte Aufbau war in einem Anaerob-Zelt (engl.: „glove box“, siehe Abbildung 5.1) untergebracht.

Um sicher zu gehen, daß keine Sauerstoffreste in der Meßlösung gelöst vorlagen, wurde diese mit 10 mM Glukose, 5mg reiner Glukose-Oxidase und 30 μl Katalase-Lösung versetzt, so daß eventuell vorhandener Restsauerstoff bei der Oxidation von Glukose umgesetzt worden wäre. Neben dem Grundaufbau aus Arbeits-, Gegen- und Referenz-Elektrode und einer Messkammer aus Glas, wie er aus Abbildung 3.5 ersichtlich ist, bestand die Anordnung aus einer Kammertemperaturierung, einem Zugang für die Zugabe von Inhibitoren oder Reaktanten, sowie einem aus der Messkammer hinausführenden Gas-Auslaß. Weiterhin bestand der Aufbau aus einem Potentiostaten und einem diesen steuernden Rechner mit einer Mess-Software, einer angetriebenen Rotationswelle, welche die Messelektrode in eine Längsrotation von 2500 rpm versetzte (engl.: rotating disc electrode [134]) sowie einer pH-Wert-Kontrolle. Die Modell- Bezeichnungen und Hersteller der einzelnen Bauteile sind in Kapitel 4 aufgelistet. Die eigentliche Messkammer, in welche die Elektrode getaucht wurde, wurde weitestgehend gasdicht gestaltet, so daß während der Messung ein H_2 -Strom durch sie hindurchgeleitet werden konnte. Zur Messung wurde die Messkammer mit 10 mM MES-Puffer gefüllt, wobei sich der pH-Wert der Lösung nach der Fragestellung des jeweiligen Experiments richtete und der Rotator mit der Elektrode bündig auf die Kammer gesetzt.

Bei diesem Aufbau wurde die gesättigte Kalomel-Referenz-Elektrode (SCE) bei Raum-Temperatur betrieben. Die gemessenen Potentiale konnten über einen Korrekturfaktor auf das einer Normal-Wasserstoff-Elektrode (NHE) umgerechnet werden:

$$E(\text{NHE}) = E(\text{SCE}) + 0,241 \text{ V}$$

Um den unvermeidlichen ohmschen Spannungsabfall zwischen Mess- und Referenzelektrode möglichst gering zu halten, wurde die Referenzelektrode nicht direkt in die Meßlösung, sondern in eine sog. Luggin-Kapillare [61] eingesetzt, welche in einem Seitenarm der Meßkammer untergebracht war. Hierdurch wurde der effektive Abstand zwischen Mess- und Referenzelektrode minimiert.

Die Messungen wurden in Form von Zyklovoltammogrammen und Chronoamperogrammen durchgeführt.

Während der zykovoltammetrischen Messungen wird ein vorher festgelegter Bereich an Potentialen durchgehend durchfahren. Die registrierten Ströme und deren zeitliche, potentialbedingte Änderungen ergeben ein geschlossenes (zyklisches) Voltammogramm, dessen Form und Lage im Strom-Potential-Diagramm die Probenaktivität und das Auftreten verschiedener Redoxzustände reflektieren. Die zeitliche Dimension der Messung kann dabei sowohl über die Schnelligkeit, mit der ein Zyklovoltammogramm aufgenommen wird, als auch über die Anzahl der zu messenden Voltammogramme variiert werden.

In den chronoamperometrischen Messungen werden die Potentiale über festgelegte Zeitintervalle konstant gehalten und anschließend, entsprechend der zugrunde liegenden Fragestellungen, sprunghaft verändert. Das Redoxverhalten der Probe wird dann über die Messung der aktivitätsabhängigen Ströme verfolgt und in Strom-Zeit-Diagrammen sichtbar gemacht.

Die maximale Messzeit ist in beiden Fällen abhängig von der Stabilität des Proteinlayers.

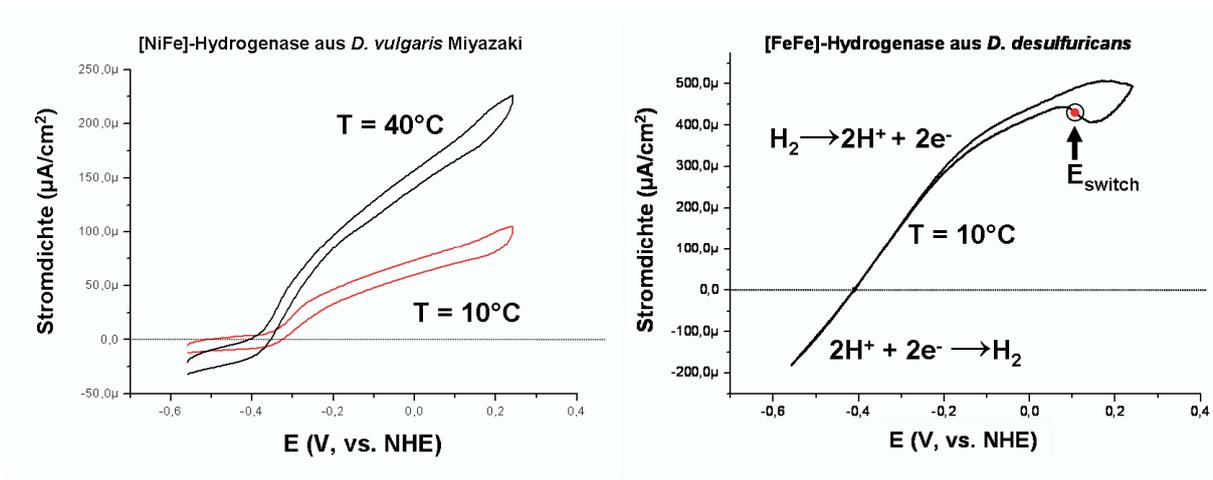


Abbildung 8.7: Vergleich der Zyklovoltammogramme der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki und der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* Meßbedingungen: pH: 6,0, H₂-Begasungsdruck: 1bar, Aufnahmezeit: 20 mV/s, 10°C-Messung der [NiFe]-Hydrogenase in rot

In Abbildung 8.7 sind die Zyklovoltammogramme der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* Miyazaki und der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* vergleichend gegenüber gestellt.

Aufgrund des in beiden Fällen identischen Kopplungsmechanismus' und einer vergleichbaren Größe beider Proteine ist von einer ähnlichen Bedeckung der Elektrodenoberfläche bzw. einer ähnlich hohen Molekülkonzentration pro Flächeneinheit auszugehen. Das Zyklovoltammogramm der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* wurde bei 10°C aufgenommen, während die Messung der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* bei 40°C durchgeführt wurde (schwarzes Zyklovoltammogramm). Ein Grund dafür ist, daß die Aktivität der [NiFe]-Hydrogenase wesentlich geringer ist. Da enzymatische Prozesse temperaturabhängig sind, wird aufgrund gesteigerter temperaturbedingter Enzym-Aktivität eine grundsätzlich höhere Stromdichte erhalten, so dass über die Messung der [NiFe]-Hydrogenase bei 40°C Ströme in der selben Größenordnung wie in den Messungen der [FeFe]-Hydrogenase erhalten werden konnten. Zum Vergleich ist in Abbildung 8.7 auch eine Messung der [NiFe]-Hydrogenase bei 10°C abgebildet (rotes Zyklovoltammogramm). Speziell die Reduktion ist bei diesen Messbedingungen schwer zu messen. Auch für die Messung der Oxidation mussten bereits höhere Potentiale (Überpotentiale) angelegt werden. Für die [FeFe]-Hydrogenase hingegen waren die Ströme so hoch, daß die Messungen bei 10°C durchgeführt werden konnten. Tiefere Temperaturen erhöhen grundsätzlich die Enzymstabilität. Trotz der bei niedrigerer Temperatur durchgeführten Messung wurde in der Zyklovoltammetrie-Messung der [FeFe]-Hydrogenase eine deutlich höhere, im Vergleich zum Voltammogramm der [NiFe]-Hydrogenase ca. um den Faktor zwei gesteigerte Stromdichte gemessen. Dies ist auf die höhere spezifische Aktivität des Enzyms zurückzuführen. Grundsätzlich können in beiden Fällen sowohl die Wasserstoffbildungsreaktion als auch die Wasserstoffspaltung verfolgt werden. Die Oxidation des Wasserstoffs führt zu einem Elektronenfluß vom Enzym zur Elektrode, was in Form einer positiven Stromdichte gemessen wird. Bei Erhöhung des angelegten Potentials wird diese Reaktion begünstigt. Wird eine negative Stromdichte gemessen, katalysiert das Enzym die Reduktion von H^+ . Hierbei fließen Elektronen von der Elektrode zum Enzym, was zu einem negativen Stromfluß führt.

Zu beachten ist hierbei, daß über die Rotation der Elektrode in der Pufferlösung die Reaktion zeitunabhängig vom Massentransport des Substrats zum Enzym verläuft. Somit korrelieren die gemessenen Ströme direkt mit der inhärenten enzymatischen Aktivität.

Für die [NiFe]-Hydrogenase ist bei zunehmend positiven Potentialen eine näherungsweise linear verlaufende Stromdichteerhöhung zu beobachten. Dies stellt einen Unterschied zum Stromdichteverlauf der [FeFe]-Hydrogenase dar, bei dem ein linearer Verlauf auf den positiven Bereich von 0,0 V bis 0,1 V und einen negativen Potentialbereich von ca. -0,2 bis -0,4 V beschränkt ist. Die Verlangsamung der Stromdichtezunahme bei höheren Potentialen als 0,1 V ist auf einen oxidativen Inaktivierungsprozeß des Enzyms zurückzuführen, welcher für [FeFe]-Hydrogenasen bekannt ist. Der Prozess wird bei Rückführung des Potentials wieder rückgängig gemacht. Im Falle der [NiFe]-Hydrogenase ist die Inaktivierung bei höheren Potentialen nicht sichtbar, da der Vorgang langsamer verläuft und bei den gewählten Zeitparametern nicht aufgelöst wird.

Für die [FeFe]-Hydrogenase, nicht jedoch für die [NiFe]-Hydrogenase ist somit das sogenannte Umkehrpotential (engl.: switch potential, E_{switch}) bestimmbar. Dieses bezeichnet das Potential, bei dem im Zuge der Reaktivierung des Enzyms der gemessene Stromverlauf die größte Steilheit aufweist [130].

Ein weiteres Charakteristikum der [FeFe]-Hydrogenase zeigt sich bei Betrachtung des Zyklovoltammogramms an der Schnittstelle mit der in Abbildung 8.7 eingezeichneten Nullstromlinie. An dieser Position verläuft die Strom-Potential-Kurve sehr steil.

Dies bedeutet, daß keine hohen Überpotentiale angelegt werden müssen, um die Reaktion in die eine oder andere Richtung zu „zwingen“, was für einen guten Elektronen-Transfer

zwischen Enzym und Elektrode spricht aber auch bedeutet, daß das Enzym Reversibilität in beiden Richtungen der Reaktion zeigt und hohe katalytische Aktivität aufweist.

8.2 Zyklovoltammetrie an immobilisiertem DdH-Protein: pH-Wert-Abhängigkeit der katalytischen Eigenschaften

Über die vorherigen Messungen konnte nachgewiesen werden, daß anhand der vorgenommenen Kopplungsreaktion eine stabile Proteinschicht auf der Elektrodenoberfläche etabliert worden war und der richtige Potentialbereich zur Aufnahme der Voltammogramme gefunden wurde, so daß ein für [FeFe]-Hydrogenasen typisches Strom-Potential-Diagramm aufgenommen werden konnte. Im Folgenden sollte zuerst die pH-Wert-Abhängigkeit des Redoxzyklus' untersucht werden. Hierzu wurden Messungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt und diese miteinander verglichen. Während der Probenvorbereitung wurde der pH-Wert der Messlösung in der Glaszelle entsprechend angepaßt. Alle anderen Messbedingungen waren in den vorgenommenen Messungen gleich.

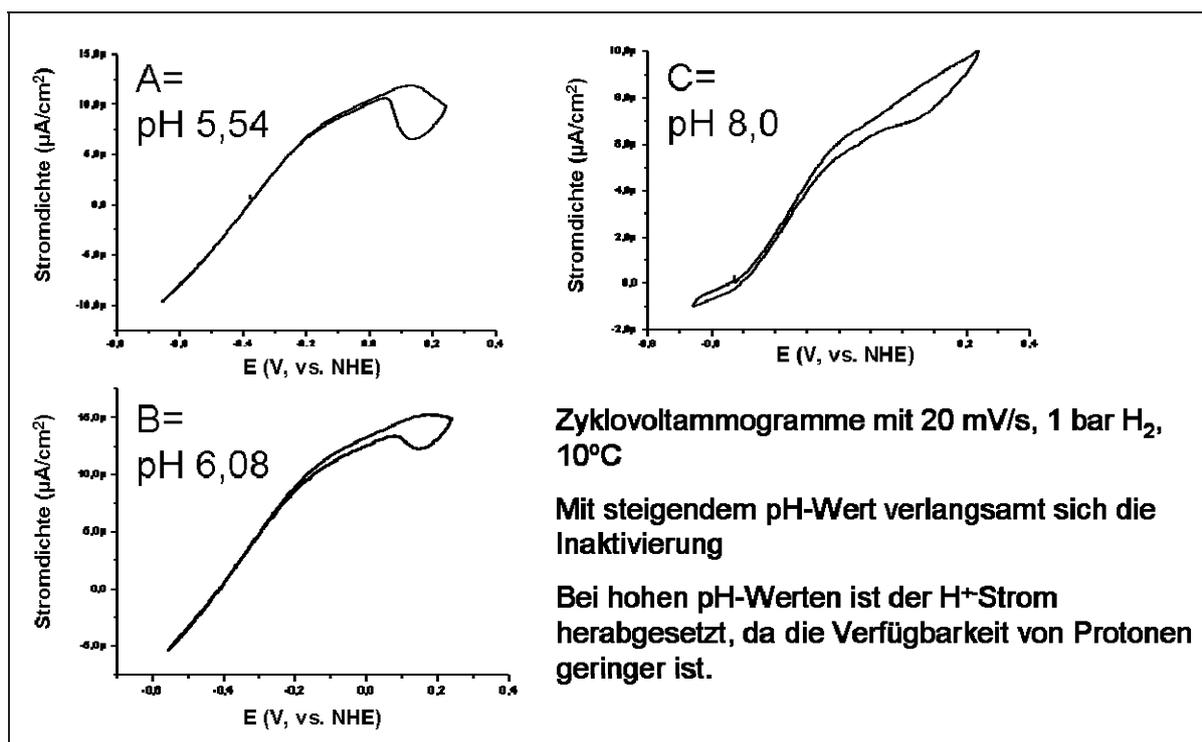


Abbildung 8.8: Zyklovoltammogramme der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* bei drei verschiedenen pH-Werten.

Die auffälligsten Veränderungen bei Anhebung des pH-Wertes betreffen den Inaktivierungsprozess. Der durch die Inaktivierung bedingte Rückgang der Stromdichte verlangsamt sich mit steigendem pH-Wert. Das bei einem pH-Wert von acht erhaltene Zyklovoltammogramm ähnelt den für [NiFe]-Hydrogenasen typischen Strom-Potential-

Diagrammen, da in beiden Fällen der Prozess der Inaktivierung über positive Potentiale so weit verlangsamt ist, daß er in den Messungen nicht mehr aufgelöst wird. Ebenso ist zu erkennen, daß mit steigendem pH-Wert zunehmend geringere negative Ströme für die Reduktions-Teilreaktion erhalten werden. Dies kann zum einen damit erklärt werden, daß bei höheren pH-Werten das Angebot an Protonen geringer ist. Das Potential, bei dem kein Stromfluß detektiert werden kann („open circuit potential“), ist ebenfalls pH-wertabhängig. Bei Messungen mit niedrigeren pH-Werten wandert dies in einen zunehmend positiveren Potentialbereich. Das an diesem Punkt angelegte Potential kann als Kontrollparameter für den pH-Wert der Meßlösung dienen.

8.3 Inhibierung und Reaktivierung des DdH-Enzyms: CO-Zugabe

Die Inhibierung mit CO wurde anhand von Chronoamperogrammen verfolgt.

Hierzu wurde zuerst ein konstantes Potential innerhalb des Potentialsbereichs, in dem das Enzym H_2 -Aktivität zeigt, vorgegeben. Der resultierende gleichbleibende Stromfluß diente auch als Kontrolle für die Stabilität der Proteinschicht. Nach einer Viertelstunde wurde gesättigte CO-Lösung in die elektrochemische Zelle injiziert. Die Endkonzentration von CO in der Zelle betrug $5 \mu M$.

Die Inhibierung und die darauffolgende Reaktivierung wurden verfolgt, bis sich wiederum ein konstanter Stromwert einstellte.

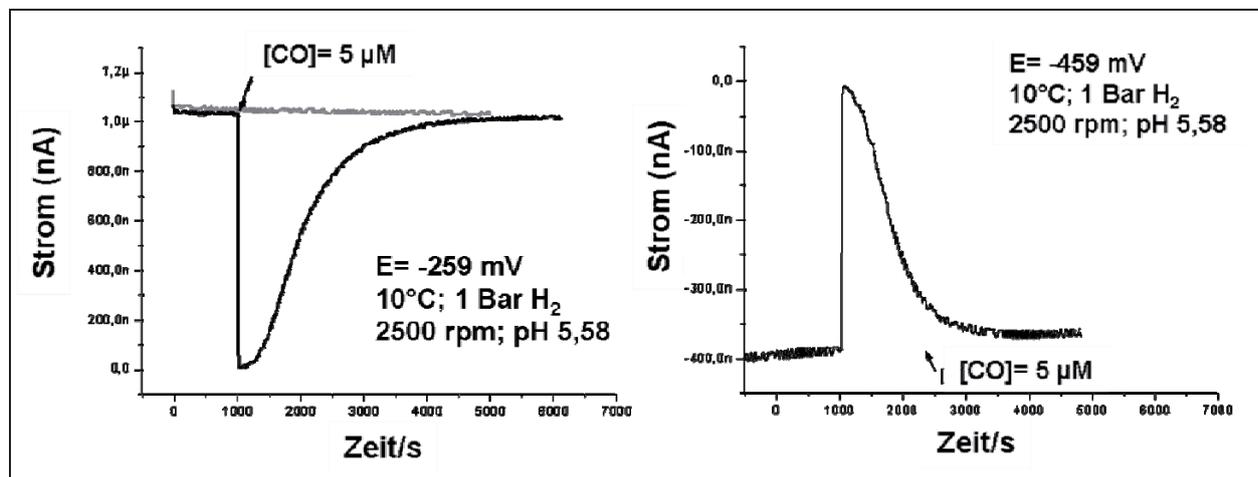


Abbildung 8.9: CO-Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* während der H_2 -Oxidation und H^+ -Reduktion

Die Chronoamperogramme in Abbildung 8.9 zeigen die Inhibierung des Enzyms sowohl von einem Potential ausgehend, bei dem das Enzym die H^+ -Reduktion katalysiert (-259 mV , linkes Diagramm), als auch ausgehend von einem Potential, bei dem das Enzym Wasserstoff heterolytisch spaltet (-459 mV , rechtes Diagramm). In beiden Fällen führt die Zugabe von CO

zu einer vollständigen und schnellen Inaktivierung des Enzyms. Nach dem völligen Verschwinden der Aktivität setzt binnen einiger Sekunden eine Regeneration des Stroms ein. In Abbildung 8.10 sind beide Vorgänge überlagert dargestellt. Im direkten Vergleich wird sichtbar, daß die Regeneration der Wasserstoffbildungsreaktion etwas schneller erzielt wird. In beiden Fällen zeigt die Inhibierung mit CO eine vollständige Reversibilität. Die graue Linie in Abbildung 8.9 gibt eine Kontrollmessung ohne Zugabe des Inhibitors wieder.

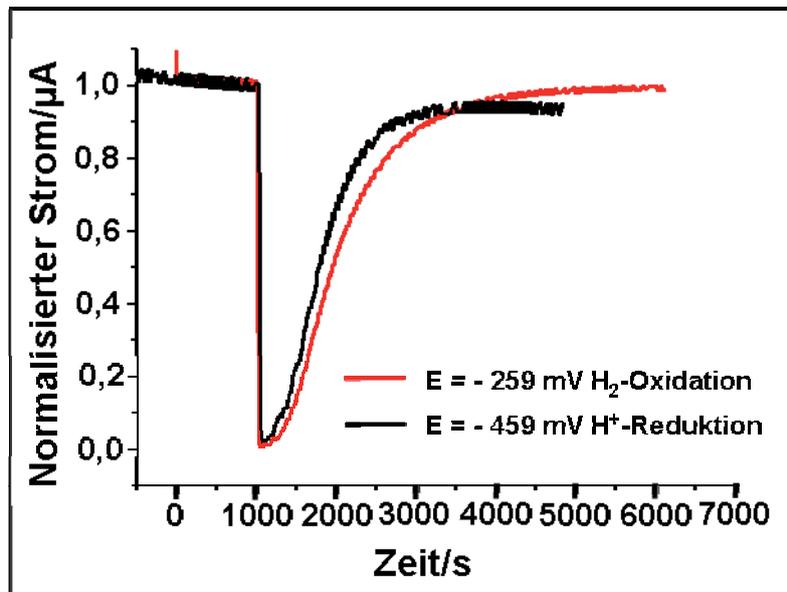


Abbildung 8.10: Vergleich der CO-Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* während der H₂-Oxidation und H⁺-Reduktion

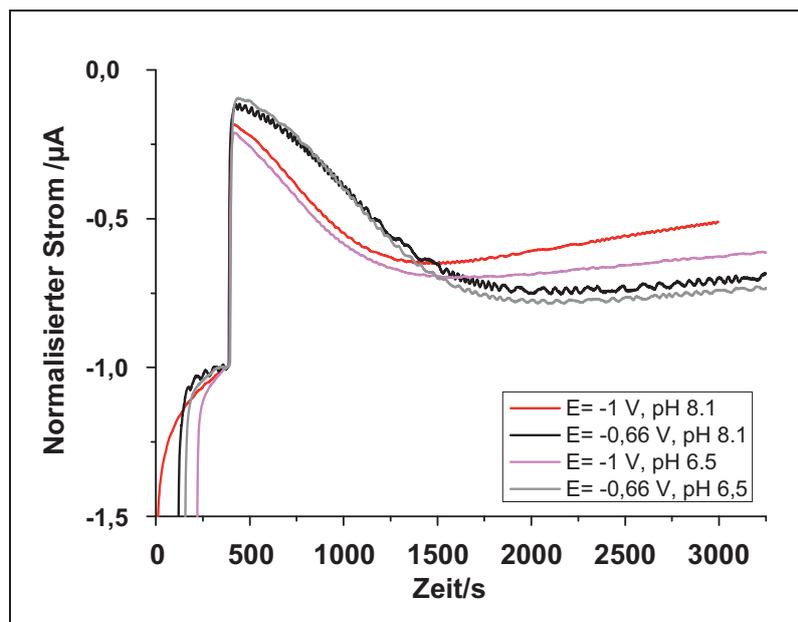


Abbildung 8.11: Vergleich der CO-Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* bei unterschiedlichen pH-Werten und Ausgangspotentialen

Die Reversibilität der CO-Inhibierung wurde auch im Hinblick auf eine mögliche Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht (Abbildung 8.11). Hierzu wurden Chronoamperogramme bei den pH-Werten 6,5 und 8,1 aufgenommen. Die Messungen entsprachen den in Abbildung 8.9 gezeigten Chronoamperogrammen, wobei als Ausgangspotentiale -0,66 Volt bzw. -1 Volt gewählt wurden (siehe Legende Abbildung 8.11). Die durchgeführten Messungen zeigen, daß die Reaktivierung unabhängig vom pH-Wert erfolgt, jedoch beim tieferen Potential (-1V) etwas schneller verläuft als bei einem Potential von -0,66 V.

8.4 Inhibierung und Reaktivierung des DdH-Enzyms: O₂-Zugabe

Die Inhibierung der Hydrogenasen mit O₂ ist eine der herausstechendsten Merkmale dieser Enzymklasse.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der oxidative Schaden, welcher zur Inhibierung des Enzyms führt, experimentell untersucht, indem Chronoamperogramme aufgenommen wurden, in denen die Probe nach definierten Zeitintervallen einem stark positiven Potential ausgesetzt wurde. Die Ergebnisse dieser potentialinduzierten Inhibierung des Enzyms sind in den Abbildungen 8.12 und 8.13 zusammengefaßt.

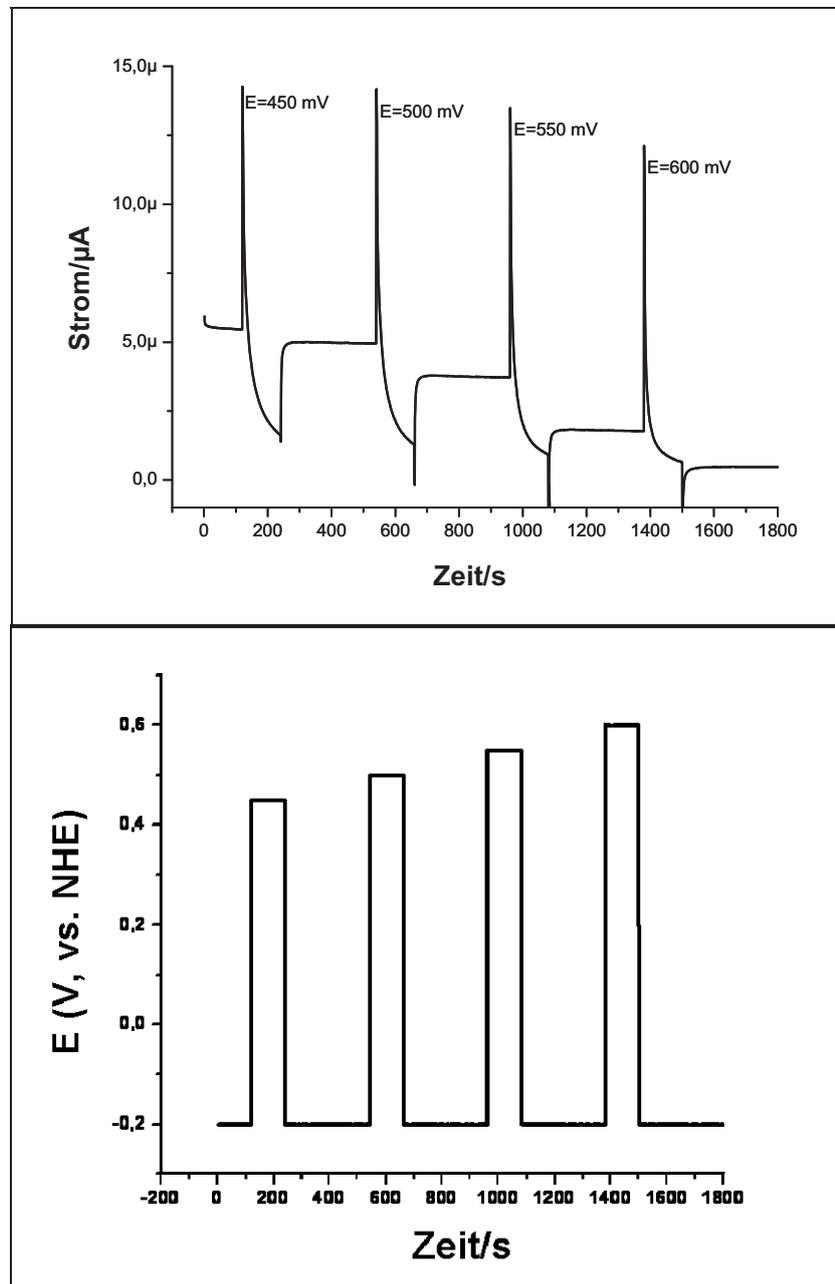


Abbildung 8.12: Oxidative Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* mittels positiver Potentiale und korrespondierendes Potential-Schema

In dem entsprechenden Chronoamperogramm (Abbildung 8.12) ist der Stromverlauf bei Gabe von „Potentialpulsen“ mit zunehmend positivem Charakter zu sehen (siehe unterer Bereich der Abbildung). Ausgehend von einem Initialpotential von -170 mV steigt der Strom zuerst sprunghaft an, da durch die Erhöhung des Potentials die Wasserstoffoxidation des Enzyms

aktiviert wird und so mehr Elektronen zur Elektrode fließen. Es setzt jedoch augenblicklich die oxidative Inaktivierung ein, so daß der resultierende Strom absinkt. Das Potential wird für zwei Minuten aufrecht erhalten und dann sprunghaft auf das Anfangspotential zurückgeführt. Nach dem potentialbedingten Absinken des Stroms und der durch das oxidative Potential verursachten Inhibierung steigt die Stromkurve danach sprunghaft und erreicht schnell einen konstanten Wert, welcher jedoch niedriger liegt als der vor der Pulsgabe gemessene Strom. Darüber hinaus ist beim erneuten Anlegen des Anfangspotentials von -170 mV ein kurzes „Durchsacken“ des Stromverlaufs zu beobachten. Dies ist auf unter diesen Umständen auftretende Wechselwirkungen der Elektrodenoberfläche mit der Lösung zurückzuführen. Das Anlegen eines Potentialpulses führt zu Umorientierungsvorgängen von Gegenionen der Lösung in direkter Nähe zur Elektrodenoberfläche und zum Auftreten eines Ladestroms. Dieser Effekt ist somit experimentell bedingt und sehr kurzlebig. Der Vergleich der konstanten Ströme vor und nach der Gabe positiver Potentiale zeigt, daß die Ströme nach der Pulsgabe niedriger sind als zuvor. Die Differenz dieser beiden katalytischen Ströme ist auf die irreversible Schädigung eines Teils der Probe zurückzuführen. Mit zunehmender positiver Potentialstärke nimmt der Anteil irreversibel inhibierter Hydrogenasemoleküle zu.

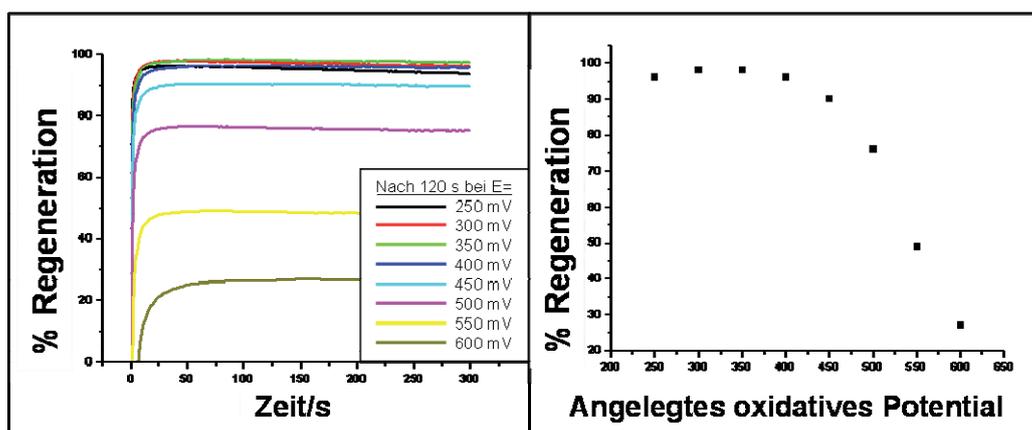


Abbildung 8.13: Oxidative Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* mittels positiver Potentiale, Regeneration gegen Zeit und Regeneration gegen angelegtes Potential

In Abbildung 8.13 ist der Anteil reaktivierter Probe prozentual gegen die zur Reaktivierung nötige Zeit aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß bei Pulsgaben im Bereich zwischen 250 mV und 400 mV eine Regeneration von über 95% erreicht wird und diese darüber hinaus bereits innerhalb weniger Sekunden eintritt. Bei noch positiveren Potentialen nimmt der Anteil regenerierter Probe rapide ab. Darüber hinaus nimmt der Regenerationsvorgang bei höheren Potentialen etwas längere Zeiten in Anspruch. Der rechte Teil in Abbildung 8.13 zeigt den prozentualen Anteil regenerierter Probe aufgetragen gegen die angelegten „Inaktivierungspotentiale“. Auch in dieser Ansicht ist gut zu sehen, daß die Kurve bei Potentialen über 400 mV steil abfällt. Aus dieser Darstellung kann das Grenzpotential, bei dem keinerlei Regeneration der Probe mehr zu erwarten ist, extrapolativ ermittelt werden. Es liegt bei ca. +620 mV.

Ferner wurde die Inhibierung des Enzyms mittels des „physiologischen“ Inhibitors O_2 untersucht (siehe Abbildung 8.14).

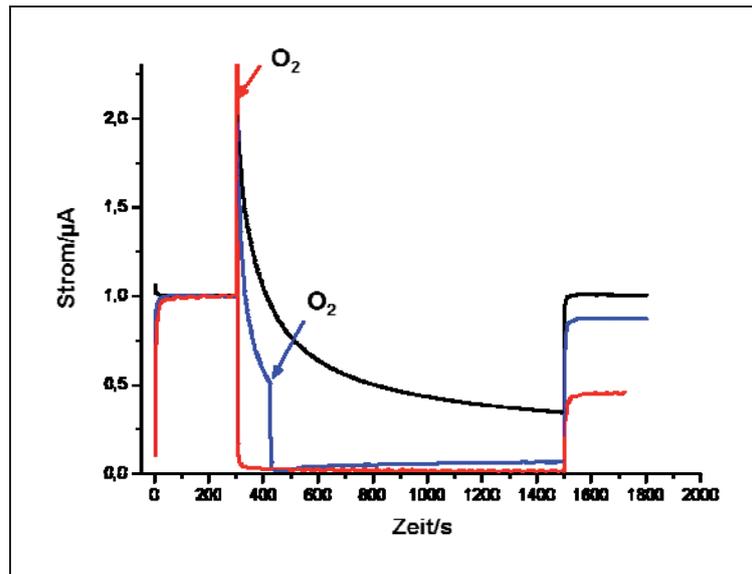


Abbildung 8.14: O₂-Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans*

Bei diesen Messungen lag das Ausgangs- und Endpotential bei -209 mV.

Vor Zugabe des O₂-gesättigten Puffers wurde das Potential auf +191 mV angehoben, um eine direkte Reaktion des Sauerstoffs mit der Elektrode selbst zu unterdrücken.

Abgebildet sind drei Messungen: In Messung 1 (schwarze Kurve) wurde lediglich die Potentialerhöhung auf +191 mV durchgeführt. Der Versuch entspricht somit den Versuchen zur potentialgelenkten Inaktivierung und dient als Vergleich. Beim angelegten Potential wird letztlich die Probe zu 100% reaktiviert, was daran zu sehen ist, daß sich vor und nach der Potentialänderung wieder dieselbe katalytische Stromintensität einstellt (schwarze Kurve).

In Messung 2 (rote Kurve) wurde direkt nach Anlegen des positiven Potentials (+ 191 mV) Sauerstoff in die elektrochemische Zelle injiziert. Die Sauerstoffzugabe war so bemessen, daß die Endkonzentration an Sauerstoff in der Messzelle 78 µM betrug. Das Protein wird dadurch augenblicklich inhibiert. Nach der Rückführung des Potentials auf den Ausgangswert konnten lediglich 46% des ursprünglichen Stroms gemessen werden, was auf die irreversible Schädigung durch die O₂-Gabe zurückzuführen ist.

Bei Messung 3 (blaue Kurve) wurde die gleiche Menge Sauerstoff in die Messkammer gegeben. In diesem Fall erfolgte die O₂-Gabe jedoch nicht direkt nach Auslenken des Potentials sondern erst nach einer Wartezeit von zwei Minuten. Die prozentuale Reaktivierung des Stroms beträgt dann 87%. Dies bedeutet, daß die längere Zeitspanne zur anaeroben Oxidation das Enzym zu einem größeren Anteil in einen inaktiven Zustand gebracht hat, welcher zu einem erhöhten Schutz vor Sauerstoff geführt hat.

8.5 Diskussion

Die Messungen zeigen, daß das gewählte Verfahren zur kovalenten Bindung des DdH-Proteins an die Oberfläche einer Graphit-Elektrode erfolgreich war.

Die kovalente Bindung erlaubt einen schnellen und stabilen Elektronenfluss zwischen Probe und Elektrode.

Diese Tatsache stellt einen Fortschritt zu Methoden dar, bei denen ein Probenfilm über Adsorption auf eine Elektrode aufgebracht wird. Die erhaltenen, aktivitätsabhängigen Ströme sind signifikant höher als dies für bisherige Messungen mit der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* beobachtet werden konnte [129]. Neben der verbesserten Sensitivität der Messung stellt auch die zeitliche Stabilität des Proteinfilms einen limitierenden Faktor für elektrochemische Messungen dar, welcher insbesondere bei der Untersuchung langsamer Reaktionsprozesse zum Tragen kommt.

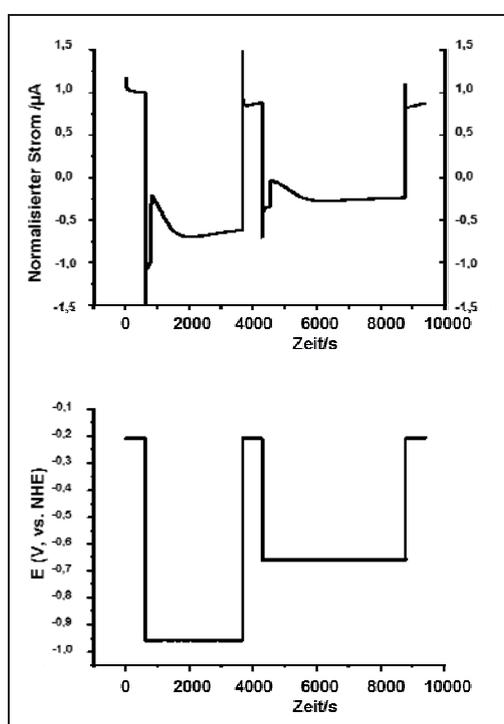


Abbildung 8.15: Chronoamperogramm, Messung der [FeFe]-Hydrogenase aus *D. desulfuricans* über mehrere Stunden mit korrespondierendem Potential-Diagramm

Die Messungen ergaben, wie in Abbildung 8.15 beispielhaft zu sehen, eine hohe Stabilität des Films über lange Zeiträume. So war es grundsätzlich möglich, kontinuierliche Messungen über mehrere Stunden durchzuführen. Auch konnte bei Unterbrechung der Messung eine Elektrode über 12 Stunden bei 4°C gelagert und das Experiment nach dieser Zeit weiter geführt werden, ohne daß die aktivitätsabhängige Stromintensität durch die Unterbrechung um mehr als 10% des Ausgangswertes abgesunken wäre.

Die Messungen zur pH-Wert-Abhängigkeit der Wasserstoffreaktion zeigten, daß die Wasserstoffbildung sich mit steigendem pH-Wert verlangsamt. Neben der geringeren Verfügbarkeit von Protonen bei höheren pH-Werten, welche eine mögliche Erklärung für

diesen Effekt ist, kann die Beobachtung auch einen Hinweis darstellen auf eine mechanistische Störung der enzymatischen Reaktion bei höheren pH-Werten.

Im vorigen Kapitel 7.2 wurde gezeigt, das es sich beim Zentralatom der Brücke zwischen distalem und proximalem Eisen (siehe auch Abbildung 2.1) um ein Stickstoffatom handelt.

Der durch Computerberechnungen gestützte [24] postulierte katalytische Zyklus sieht vor, daß dieses Stickstoffatom im Zuge der Wasserstoffbildungsreaktion sukzessive zwei Protonen aufnimmt und diese an das distale Eisenatom weitergibt (siehe auch Kapitel 2.1.a).

Da, ausgehend von typischen pK_s -Werten sekundärer Amine in wässriger Lösung, davon auszugehen ist, daß die Erhöhung des pH-Wertes zu einer Deprotonierung des Stickstoffatoms führt, kann dieser Umstand die Übertragung der Protonen auf das distale Eisen stören und damit die Wasserstoffsynthese mechanistisch unterbinden.

Die Messungen des CO- und O₂-Inhibierungsverhaltens ergaben, daß die Überführung des Enzyms in den CO-Zustand vollkommen reversibel ist und die Reaktivierung nicht vom pH-Wert abhängt. Sie zeigt jedoch eine Abhängigkeit vom zum Zeitpunkt der Inhibierung angelegten Potential. Bei tieferen Potentialen verläuft die Inaktivierung schneller. Dies kann als Hinweis gesehen werden für einen reduzierten CO-inhibierten Zustand, welcher CO weniger fest bindet als der Zustand H_{ox}-CO.

Außerdem ist die Regeneration der Wasserstoffbildungsreaktion bei gleichbleibendem Potential etwas schneller als die Regeneration der Wasserstoffspaltung. Die Unterschiede beider Raten sind jedoch nicht so groß wie dies bei Untersuchungen an elektrodenadsorbierter DdH-Probe gefunden wurde [105].

Im Unterschied dazu ist die Inhibierung mit O₂ lediglich teilweise reversibel. Der Anteil regenerierbaren Enzyms ist abhängig vom angelegten Potential, welchem das Enzym zum Zeitpunkt der Sauerstoffexposition ausgesetzt ist. Bei hohen Potentialen kann ein größerer Anteil der Probe reaktiviert werden. Das bedeutet, dass der bei Anlegen eines oxidativen Potentials erreichte Redoxzustand tatsächlich einen Schutz vor irreversibler aerober Inaktivierung darstellt.

Es fällt jedoch auf, dass auch bei sofortiger Zugabe von O₂ nach Erhöhung des Potentials auf +191 mV ein Teil der Probe wieder zu katalytisch aktivem Protein reaktiviert werden konnte. Bei den für die EPR-Messungen eingesetzten Proben in Lösung führte die Exposition von auch geringen Sauerstoffmengen einer einmal katalytisch aktiven Probe zu einer vollständigen und irreversiblen Inaktivierung. Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Beobachtungen kann damit zusammenhängen, daß die Verfügbarkeit von Elektronen für an die Oberfläche einer Elektrode gekoppelte Hydrogenasemoleküle größer ist als für Moleküle in Lösung. Wird an die Elektrode gekoppeltes Enzym bei ausgeschaltetem Potentiostaten O₂ ausgesetzt, ist die Inhibierung komplett irreversibel. Eine Möglichkeit, in Zukunft detailliertere Informationen über die Sauerstoffsensitivität der Hydrogenase zu erhalten, besteht in der Messung mittels eines SEIRA (engl.: „surface enhanced infrared absorption spectroscopy“)-Experiments. Diese Methode stellt eine Kombination der Elektrochemie mit der Infrarot-Spektroskopie dar. Hierdurch wird es vor allem möglich, den gemessenen Phänomenen, wie der anaeroben oxidativen Inaktivierung, einzelne Redoxzustände zuzuordnen. Für die O₂-Inaktivierung kann so der genaue Mechanismus der Schädigung detaillierter untersucht werden.

Das „letale“ positive Potential, bei dem das Enzym irreversibel geschädigt wird und keine partielle Regeneration der katalytischen Aktivität stattfindet, konnte mit den durchgeführten Messungen extrapolativ bestimmt werden (ca. +620 mV).

9 KRISTALLISATION DER [FE₂]-HYDROGENASE DdH

Die in Kapitel 6 (Aufreinigung der Hydrogenase) beschriebene Präparation führte zu hochreinem Protein, was durch die in Unterkapitel 6.3 beschriebenen Methoden zur Reinheitskontrolle überprüft wurde. Die hohe Homogenität wurde ebenfalls über die EPR-spektroskopischen Messungen bestätigt. Damit war die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation des Enzyms erfüllt.

Nach einem ersten Screening, mit welchem die Bedingungen, unter denen das Protein kristallisiert, zuerst eingengt werden konnten, war es möglich, über weitere Ansätze, in denen die präparativen Bedingungen verfeinert wurden, zwei unterschiedliche Kristallisationsbedingungen zu ermitteln. Diese ergaben Proteinkristalle von morphologisch unterschiedlicher Form. Die beschriebenen Experimente wurden komplett anaerob ausgeführt, um Kristalle in einem definierten Redoxzustand (vgl. Kapitel 2.4) zu erhalten.

9.1 Probenvorbereitung

Nach der Überprüfung der Reinheit wurden die Proben auf eine Konzentration von 30 µg/µl eingestellt. Zum Ansetzen der Kristallisationsansätze wurden die verdünnten Proben dann zusammen mit den vorbereiteten Kristallisationsplatten in ein Anaerob-Zelt eingeschleust. Nach dem Einpipettieren der Proben in die einzelnen Vertiefungen der Platte wurde letztere mit transparenter Klebefolie verschlossen und zusätzlich in einen luftdicht verschließbaren Plexiglas-Kasten (Eigenbau) gesetzt und dieser verschraubt. Die fertigen Ansätze konnten danach aus dem Anaerob-Zelt ausgeschleust werden und wurden daraufhin in einem vibrationsarmen Spezial-Kühlschrank bei 4°C für mehrere Wochen inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf Kristallbildung überprüft. Ein typischer Screeningansatz bestand aus 2 µl Probe und 100 µl Reservoirlösung.

9.2 Ammoniumsulfat- und PEG-6000-Ansätze

Ausgehend von den aus [13] bekannten Kristallisationsbedingungen wurden zuerst Testreihen mit Ammoniumsulfat als Fällungsreagenz und verschiedenen pH-Werten sowie Reihen mit Polyethylenglykol und verschiedenen pH-Werten angesetzt. In beiden Reihen wurden zudem die benutzten Puffer variiert. Die genauen Kristallisationsbedingungen sind in Anhang 1 aufgelistet (Tabellen A1.1 und A1.2). Neben einigen Fällen, in denen lediglich Präzipitation eintrat (nicht gezeigt), konnten unter diesen Bedingungen auch kleine Kristalle erzeugt werden, welche grundsätzlich nadelförmig waren und zumeist zusammengelagert vorlagen. In Abbildung 9.1 ist einer dieser Ansätze zusammen mit den Kristallisationsbedingungen zu sehen.

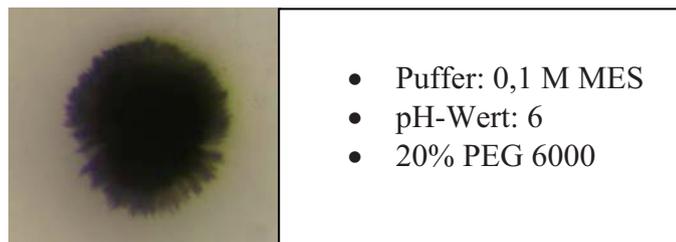


Abbildung 9.1: Kristallnadeln des ersten Screenings mit Polyethylenglykol
Die Kristallisationsbedingungen sind rechts angegeben

9.3 Kristallisationsbedingung A

Nach den ersten Screenings, welche einige vielversprechende Resultate für die Ansätze mit Polyethylenglykol erbrachten, wurden Kristallisationsansätze mit PEG 6000 und PEG 12 000 im pH-Bereich von 6 bis 8 und mit variierenden $MgCl_2$ -Konzentrationen angesetzt. Dadurch sollten die Parameter für die Kristallisation verfeinert werden, um nach Möglichkeit Einkristalle in ausreichender Größe für weitere Untersuchungen zu erhalten. Tabelle 9.1 gibt die Ansätze für den pH-Wert von 6 wider. Die Ansätze, welche die anderen pH-Werte abdeckten, waren auf gleiche Weise erstellt worden. Wie bei den ersten Screenings zur Auffindung der grundsätzlichen Kristallisationsbedingungen wurde auch hier das Verfahren des „sitzenden Tropfens“ in Kristallisationsplatten angewandt.

Tabelle 9.1: Schema der Kristallisations-Ansätze mit $MgCl_2$ bei einem pH-Wert von 6. Testreihen mit einem pH-Wert von 7 und 8 wurden auf exakt gleiche Weise angesetzt. Die Ansätze, in denen es zur Bildung von Kristallen kam, sind rot unterlegt.

A	PEG 6000	%	20	25	30	A	PEG 12000	%	20	25	30
	$MgCl_2$	M	0,1	0,1	0,1		$MgCl_2$	M	0,1	0,1	0,1
	BisTrisHCl	M	0,1	0,1	0,1		BisTrisHCl	M	0,1	0,1	0,1
		M	0	0	0			M	0	0	0
B	PEG 6000	%	20	25	30	B	PEG 12000	%	20	25	30
	$MgCl_2$	M	0,2	0,2	0,2		$MgCl_2$	M	0,2	0,2	0,2
	BisTrisHCl	M	0,1	0,1	0,1		BisTrisHCl	M	0,1	0,1	0,1
		M	0	0	0			M	0	0	0

Innerhalb von zwei Wochen bildeten sich Kristalle in den im Schema rot markierten Vertiefungen. Die Kristallisationsbedingungen sind in Abbildung 9.2 genannt.

Im ersten Fall (PEG 6000) zeigten sich dünne, lang gezogene Plättchen, welche sich aneinander gelagert hatten. Im zweiten Fall (PEG 12.000) bildeten sich einzelne, nadelförmige Kristalle. Vereinzelt Kristalle sind für nachfolgende Experimente leichter zu handhaben. Dies ist wichtig, da Proteinkristalle aufgrund des hohen Lösemittelanteils von bis zu 60% sehr empfindlich gegenüber mechanischer Belastung sind und leicht zerbrechen. Die in beiden Fällen erreichte Größe von ca. 0,1 bis 0,2 mm Kantenlänge war für nachfolgende Messungen ausreichend und die Kristalle waren gut handhabbar.

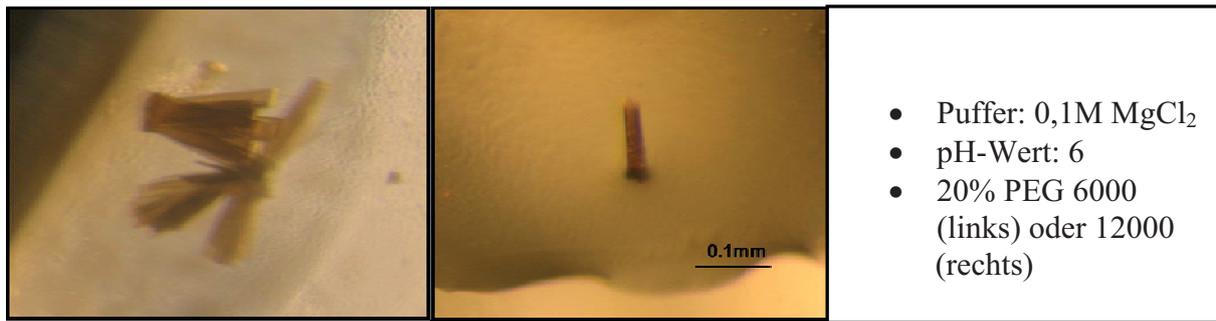


Abbildung 9.2: Nadel- und plättchenförmige DdH-Kristalle mit den zugrundeliegenden Kristallisationsbedingungen

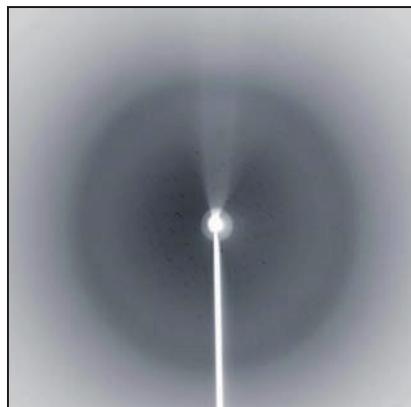


Abbildung 9.3: Reflexmuster eines Kristalls aus 9.2 (rechte Seite)

9.4 Kristallisationsbedingung B

Zusätzlich wurden Ansätze dreier weiterer Kristallisations-Kits angefertigt: Getestet wurden die Kristallisations-Kits „PEG Ion“, „PEG Ion 2“ und „Wizard3“ der Firma Hampton Research®. Die einzelnen getesteten Parameter sind ebenfalls in Anhang 1 zusammengefaßt (Tabellen A1.3-A1.5).

Anhand dieser Ansätze konnte eine weitere Bedingung ermittelt werden, welche zur Kristallisation des Proteins führt. Der dort gelb markierte Ansatz führte zu einer neuen, bisher nicht für das DdH-Protein beschriebenen Kristallform.

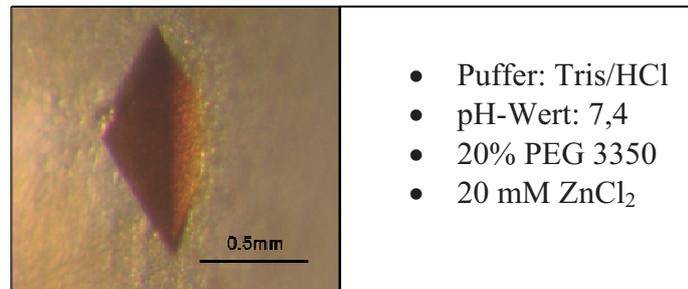


Abbildung 9.4: Unter Zugabe von Zinkchlorid gewachsener rhombischer Kristall

Wie in Abbildung 9.4 zu sehen, weist dieser Kristall die Form einer rhombischen Pyramide auf. Darüber hinaus ist der Kristall mit einer Kantenlänge von 0,5 mm deutlich größer als die anderen erhaltenen Kristalle.

Während sich, wie oben erwähnt, die kleineren, unter Bedingung A erhaltenen Kristalle bereits binnen zwei Wochen bildeten, benötigte das Wachstum dieses Kristalls sechs bis acht Wochen.

9.5 Diskussion und Ausblick

Die durchgeführten Kristallisationsexperimente an reinem Hydrogenaseprotein führten zur Identifizierung zweier neuer Bedingungen, unter denen das DdH-Protein in Form von Einkristallen kristallisiert. Ein erster Unterschied zu den aus der Literatur bekannten Angaben besteht darin, daß die zuerst angelegten Ammoniumsulfatreihen nicht zur Kristallisation der Probe führten. Die parallel dazu angesetzten Reihen mit Polyethylenglykol führten zwar zur Kristallisation des Proteins, aber nicht in Ansätzen, welche Natriumazetat enthielten, wie dies für die erste Kristallisation des Enzyms beschrieben worden war [13]. Vom DdH-Protein waren bisher Kristalle mit insgesamt drei verschiedenen Raumgruppenanordnungen gefunden worden, welche sich zudem zum Teil durch unterschiedliche Raumgruppenparameter weiter voneinander unterschieden. Die unter Bedingung A erhaltenen untersuchten Kristalle hatten eine Raumgruppe von $P2_1$ mit einer Anzahl von sechs Molekülen pro Einheitszelle. Diese Kristalle sind am ehesten mit dem in [90] an siebter Stelle aufgelisteten Kristall vergleichbar. Jedoch war dieser Kristall mit einem ammoniumsulfathaltigen Ansatz gewonnen worden und unterschied sich auch in den Raumgruppenparametern von den hier beschriebenen Kristallen. Weitergehende Vergleiche sind jedoch nicht möglich, da genauere Angaben zur ersten Kristallisation, vor allem die genauen Kristallisationsbedingungen, nicht angegeben wurden [13].

Mit der vorliegenden Prozedur können Kristalle in definierten Redoxzuständen hergestellt werden. So ist es grundsätzlich auch möglich, mit den in Kapitel 7.1 beschriebenen Prozeduren andere als den hier erzeugten reduzierten Redoxzustand einzustellen und eine Röntgenstrukturanalyse beispielsweise des oxidierten CO-besetzten Zustands durchzuführen. Darüber hinaus weist der mit der Zugabe von ZnCl₂ hergestellte Kristall eine ausreichende Größe auf, um an diesem EPR-Messungen im W-Band-Bereich (94 GHz) durchzuführen. Durch die einheitliche räumliche Anordnung im Kristall weisen die Proteine, anders als im Pulverspektrum einer Probe in Lösung, eine einheitliche Ausrichtung ihres g-Tensors auf, was die Orientierung der Tensorhauptachsen experimentell zugänglich macht.

Interessanterweise wurden in der veröffentlichten Kristallstruktur von DdH, welche als Dimer zweier Proteine erhalten wurde, an den Kontaktstellen beider Moleküle Elektronendichte

gefunden, welche Zinkatomen zugeordnet wurde [90]. Die Tatsache, daß die mit Abstand größten erhaltenen Kristalle im einzigen mit Zinkchlorid versehenen Ansatz entstanden, legt die Vermutung nahe, daß die Zinkatome während der Kristallisation eine stabilisierende, die Ordnung begünstigende Wirkung haben.

Außerdem bestätigen die neu gewonnenen Kristalle, daß DdH unter vielen verschiedenen Formen kristallisiert, was für Proteinkristalle eher ungewöhnlich ist.

10 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde die periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase DdH des sulfatreduzierenden Bakteriums *Desulfovibrio desulfuricans* isoliert und mittels spektroskopischer und elektrochemischer Methoden untersucht. Die Enzymklasse der Hydrogenasen ist von besonderem wissenschaftlichem Interesse, da sie sowohl die heterolytische Spaltung molekularen Wasserstoffs als auch die Reduktion von Protonen und somit die Synthese molekularen Wasserstoffs katalysieren. Aufgrund der zunehmenden Verknappung fossiler Brennstoffe und der weit reichenden ökologischen Folgeschäden, welche durch die Nutzung fossiler Energieträger entstehen, erhofft man sich, aus der Erforschung der genauen Funktionsweise der biologischen Wasserstoffsynthese Impulse für eine zukünftige biotechnologische Erzeugung von Wasserstoff zu gewinnen.

Von besonderer Bedeutung ist dabei das katalytische Zentrum des Enzyms, welches als H-Cluster bezeichnet wird. Das H-Cluster setzt sich zusammen aus zwei Eisenatomen, welche CO- und CN-Liganden tragen und mit einem Eisen-Schwefel-Cluster verbunden sind. Die in dieser Arbeit vorgestellten spektroskopischen und elektrochemischen Untersuchungen leisten einen Beitrag zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus' am H-Cluster von [FeFe]-Hydrogenasen.

Zellanzucht von *Desulfovibrio desulfuricans*

Im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit wurde die Kultivierung des Bakteriums *Desulfovibrio desulfuricans* unter dem Gesichtspunkt einer optimalen Expression der [FeFe]-Hydrogenase untersucht. Da biologische Organismen flexibel auf veränderte Umweltbedingungen, insbesondere das Angebot an Nährstoffen reagieren, war es wichtig, die optimalen Bedingungen für die sich an die Zellanzucht anschließende Gewinnung des Enzyms zu bestimmen. So wurden in den durchgeführten Versuchen die Kultivierungszeiten variiert und angepaßt. Darüber hinaus zeigte es sich, dass die Zugabemengen und -zeiten des physiologischen Elektronendonors Laktat Einfluß auf die Expression des Hydrogenase-Enzyms nimmt.

Außerdem wurde die Expressionsrate des Enzyms unter Schwefelmangelbedingungen untersucht.

Unter diesen Bedingungen war für einige Arten von *Desulfovibrio* eine im Vergleich zu Normalbedingungen weit höhere Wasserstoffsyntheserate gefunden worden.

Diese Beobachtung konnte für den in dieser Arbeit genutzten Stamm *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757 bestätigt werden. In der sich anschließenden Isolierung wurde gezeigt, dass die Expressionsrate der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase von dieser physiologischen Umstellung nicht beeinflusst wird.

Isolierung der periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase DdH

Das für diese Arbeit verwendete Isolierungsprotokoll stellt eine Vereinfachung bestehender Protokolle dar und führte zu homogenen Proben an DdH-Protein. Die Reinigung erfolgte über eine dreistufige säulenchromatographische Trennung an einer FPLC-Anlage. Die Reinigungs-

Strategie zusammen mit den für die Reinheitskontrolle angewandten Verfahren ist in Kapitel 6 beschrieben. Mit den gewonnenen, reinen Proteinproben konnten sowohl die in Kapitel 7 und 8 beschriebenen spektroskopischen und elektrochemischen Messungen als auch Kristallisationsexperimente des Enzyms durchgeführt werden.

EPR-spektroskopische Messungen

Über die durchgeführten EPR-spektroskopischen Messungen konnten Details über die Struktur und den Reaktionsmechanismus des H-Clusters aufgeklärt werden. Hierzu war es wichtig, dieses zuvor in einen definierten, EPR-aktiven Redoxzustand zu bringen. Im ersten spektroskopischen Teilkapitel werden Verfahren beschrieben, mit denen die Probe in die Zustände H_{ox} und $H_{ox}-CO$ eingestellt wurden.

Über die in Kapitel 7.2 durchgeführten gepulsten EPR-Verfahren konnte die Natur des Zentralatoms des Brückenliganden zwischen den beiden Eisenkernen aufgeklärt und dieses als Stickstoffatom identifiziert werden. Dies hat weit reichende Folgen für den postulierten Reaktionsmechanismus, da das Stickstoffatom protoniert vorliegen kann und der postulierte, durch Computeranalysen gestützte Reaktionsmechanismus die Weitergabe von insgesamt zwei Protonen vom Stickstoffatom an einen der Eisenkerne vorsieht.

Mittels einer Markierung der Probe mit ^{13}CO -Gas und sich daran anschließende HYSCORE- und ENDOR-Messungen konnten detaillierte Daten über die Verteilung der Elektronenspindichte im Bereich des H-Clusters gewonnen werden, welche bereits früher durchgeführte Untersuchungen ergänzen. Die Markierung erfolgte durch den Austausch der im H-Cluster vorhandenen CO-Liganden mit dem erwähnten ^{13}CO . Hierbei machte man sich einen „internen Austausch“ benannten, lichtinduzierten Effekt des DdH-Enzyms experimentell zu Nutze, durch welchen drei der vier vorhandenen CO-Gruppen durch das isotophaltige Molekül ersetzt werden konnten. Mit den gewonnenen Daten können nicht zuletzt DFT-Rechnungen zum Reaktionsmechanismus auf ihre Konsistenz überprüft bzw. neue Berechnungen durchgeführt werden.

Im letzten spektroskopischen Abschnitt dieser Arbeit wurde der Besetzungszustand der „freien“ Bindestelle des distalen Eisenions im H-Cluster untersucht. Hierzu wurden Isotopenmarkierungen mit $H_2^{17}O$ und D_2O durchgeführt.

Mittels der in Kapitel 7.4 durchgeführten ENDOR-Messungen wurden mehrere 1H - und 2H -Kopplungen im Bereich des aktiven Zentrums gefunden. In Kombination mit DFT-Berechnungen wurde ein Hinweis auf ein schwach gebundenes H_2O - oder OH -Molekül an der freien Bindestelle gefunden.

Elektrochemische Messungen

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Möglichkeit aufgezeigt, die [FeFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans* chemisch an die Oberfläche einer Graphit-Elektrode zu koppeln. Die Immobilisierung eines Enzyms an eine Elektrode erlaubt es, katalytische Aktivität unabhängig von Massentransport- und Diffusionsphänomenen und ohne die Zugabe von Redoxmediatoren in Form eines elektrischen Stroms zu messen. Über die gerichtete Immobilisierung des Enzyms konnten hohe Ströme gemessen werden, was beweist, dass mit

der verwendeten Kopplungsmethode ein sehr guter Elektronentransport zwischen Protein und Elektrode erreicht wurde. Die vorgenommene kovalente Bindung erwies sich darüber hinaus als sehr stabil, was zum ersten Mal elektrochemische Langzeitmessungen an diesem Enzym erlaubte. Dadurch war es möglich, die Inaktivierung der katalytischen Aktivität über das Anlegen stark positiver Potentiale ebenso zu messen wie auch die Inhibierung des Enzyms durch Kohlenmonoxid und Sauerstoff zu untersuchen und die Reaktivierung des Enzyms zu studieren.

Die elektrochemischen Messungen geben darüber hinaus einen Hinweis auf einen weiteren, vom bekannten oxidierten Zustand H_{ox} -CO verschiedenen CO-gebundenen Zustand.

In Zukunft können die gewonnenen Erkenntnisse zur Inhibierung und Reaktivierung mit der Methode SEIRA (engl.: „surface enhanced infrared absorption spectroscopy“) vertieft werden. Hierbei handelt es sich um eine Kombination der Elektrochemie mit der Infrarot-Spektroskopie. Über die Verknüpfung beider Techniken können den gemessenen Phänomenen die entsprechenden Redoxzustände des Enzyms zugeordnet werden.

Kristallisation periplasmatischen [FeFe]-Hydrogenase DdH

Die [FeFe]-Hydrogenase DdH konnte unter zwei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zur Kristallisation gebracht werden. Unter anderem wurde hierbei in einem Ansatz, in dem sich Zinkchlorid befand, ein Kristall von 0,5 mm Kantenlänge erhalten.

Neben der Möglichkeit, die erhaltenen Hydrogenase-Kristalle mit den Mitteln der Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen, können Kristalle von einer Größe und Form, wie sie in diesen Experimenten erhalten wurden, auch für EPR-Messungen im W-Band-Bereich (94 GHz) eingesetzt werden. Durch die einheitliche räumliche Anordnung im Kristall weisen die Proteine, anders als im Pulverspektrum einer Probe in Lösung, eine einheitliche Ausrichtung ihres g -Tensors auf, wodurch die Orientierung der Tensorhauptachsen experimentell zugänglich wird.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Jahresbericht des Gesamtverbands des deutschen Steinkohlebergbaus e.V.
www.gvst.de
- [2] P.M. Vignais, B. Billoud, J. Meyer:
Classification and phylogeny of hydrogenases.
FEMS Microbiol. Rev., 25(4): 455-501, 2001
- [3] Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
www.bmu.de
- [4] S. Geitmann:
Mit neuer Energie in die Zukunft
Hydrogeit Verlag, 2004
- [5] A. Silakov, C. Kamp, E. Reijerse, T. Happe, W. Lubitz:
Spectroelectrochemical Characterization of the Active Site of the
[FeFe] Hydrogenase HydA1 from *Chlamydomonas reinhardtii*.
Biochemistry, 25; 48 (33): 7780-6, 2009
- [6] A. Parkin, G. Goldet, C. Cavazza, J.C. Fontecilla-Camps, F.A. Armstrong:
The difference a Se makes? Oxygen-tolerant hydrogen production
by the [NiFeSe]-hydrogenase from *Desulfomicrobium baculatum*.
J. Am. Chem. Soc. 130 (40): 13410-6, 2008
- [7] M.C. Marques, R. Coelho, A.L. de Lacey, I.A. Pereira, P.M. Matias:
The three-dimensional structure of [NiFeSe] hydrogenase from
Desulfovibrio vulgaris Hildenborough: a hydrogenase without a
bridging ligand in the active site in its oxidised, "as-isolated" state.
J. Mol. Biol. 396 (4): 893-907, 2009
- [8] O. Pilak, B. Mamat, S. Vogt, C. H. Hagemeyer,
R. K. Thauer, S. Shima, C. Vornrhein, E. Warkentin, U. Ermler:
The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase.
J. Mol. Biol. 358 (3): 798-809, 2006
- [9] M. E. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand,
C. Leger, M. T. Giudici-Ortoni und W. Lubitz:
Membrane-Bound Hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex*
aeolicus: Enzyme Activation, Redox Intermediates and Oxygen Tolerance
J. Am. Chem. Soc., 132 (20), 6991–7004, 2010
- [10] P.M. Vignais, B. Billoud:
Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview.
Chem. Rev., 107 (10): 4206-72, 2007

- [11] M. F. Verhagen, T. O'Rourke, M. W. Adams:
The hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*,
contains an unusually complex iron-hydrogenase: amino acid
sequence analyses versus biochemical characterization.
Biochim. Biophys. Acta, 1412 (3): 212-29, 1999
- [12] E. C. Hatchikian, V. Magro, N. Forget, Y. Nicolet, J. C. Fontecilla-Camps:
Carboxy-terminal processing of the large subunit of [Fe] hydrogenase
from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757.
J. Bacteriol., 181 (9): 2947-52, 1999
- [13] Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, C. E. Hatchikian, J. C. Fontecilla-Camps:
Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase: the structure shows
unusual coordination to an active site Fe binuclear center.
Structure, 7 (1): 13-23, 1999
- [14] A. Hemschemeier, A. Melis, T. Happe:
Analytical approaches to photobiological hydrogen
production in unicellular green algae.
Photosynthesis Research, 102, 2-3, 523-540, 2009
- [15] P. Atkins, J. de Paula:
Physical Chemistry
Oxford University Press, 2006
- [16] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer:
Biochemie
Spektrum Verlag, 2003
- [17] J. M. Odom und H. D. Peck:
Hydrogenase, Electron-Transfer Proteins, and Energy Coupling in
the Sulfate-Reducing Bacteria *Desulfovibrio*.
Annual Review of Microbiology, 38, 551-592, 1984
- [18] P. W. King, M. C. Posewitz, M. L. Ghirardi, und M. Seibert:
Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an
Escherichia coli Biosynthetic System.
Journal of Bacteriology, 188 (6), 2163-2172, 2006
- [19] I. Czech, A. Silakov, W. Lubitz und T. Happe:
The [FeFe]-hydrogenase maturase HydF from *Clostridium acetobutylicum*
contains a CO and CN⁻ ligated iron cofactor.
FEBS Letters, 584 (3), 638-642, 2010
- [20] X. Brazzolotto, J. K. Rubach, J. Gaillard, S. Gambarelli, M. Atta und M. Fontecave:
The [Fe-Fe]-Hydrogenase Maturation Protein HydF from
Thermotoga maritima is a GTPase with an Iron-Sulfur-Cluster.
Journal of biological Chemistry, 281 (2), 769-774, 2006

- [21] A. Böck, P. W. King, M. Blokesch und M.C. Posewitz:
Maturation of hydrogenases.
Adv. Microb. Physiol., 51, 1-71, 2006
- [22] S. E. McGlynn, E. M. Shepard, M. A. Winslow, A. V. Naumov, K. S. Duschene,
M. C. Posewitz, W. E. Broderick, J. B. Broderick und J. W. Peters:
HydF as a scaffold protein in [FeFe] hydrogenase H-cluster biosynthesis.
FEBS Letters, 582 (12), 2183-2187, 2008
- [23] A. S. Pandey, T. V. Harris, L. J. Giles, J. W. Peters, und R. K. Szilagyí:
Dithiomethylether as a Ligand in the Hydrogenase H-Cluster.
J. Am. Chem. Soc., 130 (13), 4533–4540, 2008
- [24] P. E. M. Siegbahn, J. W. Tye, M. B. Hall:
Computational Studies of [NiFe] and [FeFe] Hydrogenases.
Chem. Rev., 107 (10): 4414-4435, 2007
- [25] Y. Nicolet, C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps:
Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution.
J. Inorg. Biochem., 91(1):1-8, 2002
- [26] J. W. Peters, W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, L. C. Seefeldt:
X-ray Crystal Structure of the Fe-Only Hydrogenase (CpI) from
Clostridium pasteurianum to 1.8 Angstrom Resolution.
Science, 282 (5395), 1853 – 1858, 1998
- [27] Y. Nicolet, A.L. De Lacey, X. Vernede, V. M. Fernandez,
E. C. Hatchikian und J. C. Fontecilla-Camps:
Crystallographic and FTIR spectroscopic evidence of
changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the
Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*.
J. Am. Chem. Soc., 123 (8):1596-601, 2001
- [28] L. Girbal, G. von Abendroth, M. Winkler, P. M. C. Benton, I. Meynial-Salles, C.
Croux, J. W. Peters, T. Happe und P. Soucaille:
Homologous and Heterologous Overexpression in
Clostridium acetobutylicum and Characterization of Purified Clostridial
and Algal Fe-Only Hydrogenases with High Specific Activities.
Applied and Environmental Microbiology, 71 (5), 2777-2781, 2005
- [29] S. Sinnecker, E. Rejse, F. Neese, W. Lubitz:
Hydrogen bond geometries from electron paramagnetic resonance
and electron-nuclear double resonance parameters: density
functional study of quinone radical anion-solvent interactions.
J. Am. Chem. Soc., 126 (10): 3280-90, 2004
- [30] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijse und W. Lubitz:
¹⁴N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase:
evidence for a nitrogen in the dithiol bridge.
Phys. Chem. Chem. Phys., 11, 6592 - 6599, 2009

- [31] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, S. P. Albracht, W. Lubitz:
Spin distribution of the H-cluster in the H_{ox}-CO state of the
[FeFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*: HYSCORE and
ENDOR study of ¹⁴N and ¹³C nuclear interactions.
J. Biol. Inorg. Chem., 14, 301-313, 2009.
- [32] M. E. Pandelia, P. Infossi, M. T. Giudici-Ortoni, W. Lubitz:
The oxygen-tolerant Hydrogenase I from *Aquifex aeolicus* weakly interacts
with carbon monoxide: An electrochemical and time resolved FTIR study.
Biochemistry, 19, 49(41), 8873-8881, 2010
- [33] Neese, F.:
ORCA - an ab initio, Density Functional and
Semi-empirical Program Package, Version 2.2.
Orca Manual, Lehrstuhl für Theoretische Chemie, Universität Bonn
- [34] A. Schweiger, G. Jeschke:
Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance.
Oxford University Press, 2001
- [35] J. J. Shane, P. Hofer, E. J. Reijerse und E. De Boer:
Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy (HYSCORE) of Disordered Solids.
Journal of Magnetic Resonance, 99, 596-604, 1992
- [36] A. Silakov, E. Reijerse, S. P. Albracht, E. C. Hatchikian, W. Lubitz:
The electronic structure of the H-cluster in the [FeFe]-hydrogenase from
Desulfovibrio desulfuricans: a Q-band 57Fe-ENDOR and HYSCORE study.
J. Am. Chem. Soc., 129 (37): 11447-58, 2007
- [37] D. Patil, J. J. G. Moura, S. H. He, M. Teixeira, B. C. Prickril,
D. V. der Vartanian, H. D. Peck junior, J. LeGall, B. Hyunh:
EPR-detectable Redox Centers of the Periplasmic Hydrogenase
from *Desulfovibrio vulgaris*.
J. Biol. Chem., 263 (35), 18732-18738, 1988
- [38] S. P. Albracht, W. Rooseboom, E. C. Hatchikian:
The active site of the [FeFe]-hydrogenase from
Desulfovibrio desulfuricans. I: Light sensitivity and magnetic
hyperfine interactions as observed by electron paramagnetic resonance.
J. Biol. Inorg. Chem. 11 (1):88-101, 2006
- [39] W. Rooseboom, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, S. P. Albracht:
The active site of the [FeFe]-hydrogenase from
Desulfovibrio desulfuricans. II: Redox properties, light sensitivity
and CO-ligand exchange as observed by infrared spectroscopy.
J. Biol. Inorg. Chem. 11 (1):102-18, 2006
- [40] S. A. L. Lobo, A. M. P. Melo, J. N. Carita, M. Teixeira, L. M. Saraiva:
The anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 grows at
nearly atmospheric oxygen levels.
FEBS Letters, 581, 433-436, 2007

- [41] P. J. van Dam, E. J. Reijerse, W. R. Hagen:
Identification of a putative histidine base and of a non-protein nitrogen ligand in the active site of Fe-hydrogenases by one-dimensional and two-dimensional electron spin-echo envelope-modulation spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, 248 (2): 355-61, 1997
- [42] E. A. C. Lucken:
Nuclear quadrupole coupling constants.
Academic Press, London, New York, 1969
- [43] A. Colligiani, R. Angelone und R. Ambrosetti:
¹⁴N nuclear-quadrupole-resonance study of solitons and charge-density waves during the Peierls transition in potassium tetracyanoquinodimethane. *Phys. Rev. B* 39, 6765–6774, 1989
- [44] A. T. Fiedler und T. C. Brunold:
Computational studies of the H-cluster of Fe-only hydrogenases: geometric, electronic, and magnetic properties and their dependence on the [Fe₄S₄] cubane. *Inorg. Chem.* 44 (25): 9322-34, 2005
- [45] W. Lubitz, E. Reijerse und M. van Gastel:
[NiFe] and [FeFe] Hydrogenases Studied by Advanced Magnetic Resonance Techniques. *Chem. Rev.*, 107 (10), 4331–4365, 2007
- [46] Y. Nicolet, B. J. Lemon, J. C. Fontecilla-Camps, J. W. Peters:
A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends Biochem. Sci.*, 25 (3): 138-43, 2000
- [47] J. Telser, M.J. Benceky, M. W. Adams, L. E. Mortenson und B M Hoffman:
EPR and electron nuclear double resonance investigation of oxidized hydrogenase II (uptake) from *Clostridium pasteurianum* W5. Effects of carbon monoxide binding. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 6589-6594, 1987
- [48] J. Drenth:
Principles of Protein X-Ray Crystallography
Springer Verlag, 1999
- [49] C. Kamp, A. Silakov, M. Winkler, E. J. Reijerse, W. Lubitz, T. Happe:
Isolation and first EPR characterization of the [FeFe]-hydrogenases from green algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777 (5): 410-6, 2008
- [50] S. A. Dikanov, A. M. Tyryshkin und M. K. Bowman:
Intensity of Cross-Peaks in Hyscore Spectra of $S = 1/2$, $I = 1/2$ Spin Systems. *Journal of Magnetic Resonance*: 144 (2), 228-242, 2000
- [51] P. A. Brooksby und A. J. Downard:
Electrochemical and atomic force microscopy study of carbon surface modification via diazonium reduction in aqueous and acetonitrile solutions. *Langmuir*, 12, 5038-5045, 2004

- [52] E. C. Hatchikian, N. Forget, V. M. Fernandez, R. Williams, R. Cammack:
Further Characterization of the [Fe]-hydrogenase
from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757.
European Journal of Biochemistry 209 (1), 357-365, 1992
- [53] B. R. Glick, W. G. Martin, S. M. Martin:
Purification and properties of the periplasmic hydrogenase
from *Desulfovibrio desulfuricans*.
Can. J. Microbiol., (10): 1214-23, 1980
- [54] B. Wenk:
Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression der
[Fe]-Hydrogenase in *Chlamydomonas reinhardtii*
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, 2006
- [55] P. Kellers:
Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der
[NiFe]-Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum*.
Dissertation, Max-Planck-Institut für bioanorganische Chemie, 2008
- [56] F. Lottspeich, J. W. Engels, A. Simeon:
Bioanalytik.
Spektrum Akademischer Verlag, 2006
- [57] M. R. Wenk, A. Z. Fernandis:
A Manual for Biochemistry Protocols.
World Scientific Publishing Company, 2007
- [58] A. Sendlinger:
Handbuch Biologie.
Compactverlag, 2008
- [59] G. Renger, B. Hanssum:
Oxygen detection in biological systems.
Photosynthesis Research, 102 (2-3), 487-498, 2009
- [60] B. J. Lemon, J. W. Peters:
Binding of exogenously added carbon monoxide at the active site of the
iron-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum*.
Biochemistry., 38 (40): 12969-73, 1999
- [61] F. Scholz:
Electroanalytical Methods
Springer Verlag, 2002
- [62] C. Kamp:
Spektroskopische Untersuchung des H-Clusters von photosynthetischen [FeFe]-
Hydrogenasen am Beispiel von HydA1 aus *Chlamydomonas reinhardtii*.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum, 2008

- [63] H. B. Oldham, J. C. Myland:
Fundamentals of electrochemical science
Academic Press, 1994
- [64] S. Stoll und R. D. Britt:
General and efficient simulation of pulse EPR spectra.
Phys. Chem. Chem. Phys., 11, 6614 - 6625, 2009
- [65] B. Epel, A. Silakov:
Kazan Viewer for Matlab
http://www.boep.specman4epr.com/kv_intro.html
- [66] Matlab 7
<http://www.mathworks.com/products/matlab>
- [67] J. P. Perdew:
Erratum: Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas.
Phys. Rev. B: 34, 7406–7406, 1986
- [68] J. P. Perdew:
Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas.
Phys. Rev. B 33, 8822–8824, 1986
- [69] A. D. Becke:
Density-functional thermochemistry: III. The role of exact exchange.
J. Chem. Phys. **98**, 5648, 1993
- [70] A. Schäfer, C. Huber und R. Ahlrichs:
Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr.
The Journal of Chemical Physics, 100 (8), 5829-5835, 1994
- [71] J. Meyer, J. Gagnon:
Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*.
Biochemistry, 30 (40): 9697-704, 1991
- [72] A. Schweiger:
Pulsed electron spin resonance spectroscopy. basic principles, techniques and examples of applications.
Angewandte Chemie, 30 (3): 265-292, 1991
- [73] F. Gerson und W. Huber:
Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals.
Wiley-VCH, 2003
- [74] J. Lindon, G.E. Tranter und D. Koppenaal:
Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry prt1.
Academic Press, 2000

- [75] R. Winter und F. Noll:
Methoden der Biophysikalischen Chemie.
Teubner Verlag, 1998
- [76] I. D. Campbell und R. A. Dwek:
Biological Spectroscopy.
Benjamin-Cummings Publishing Company, 1984
- [77] A. Carrington und A. D. McLachlan:
Introduction to magnetic resonance: with applications to chemistry and chemical physics.
J. Chem. Educ., 44 (12), 772, 1967
- [78] A. J. Bard und L. R. Faulkner:
Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.
Wiley, 2000
- [79] J. Heinze:
Cyclovoltammetrie - die „Spektroskopie“ des Elektrochemikers.
Angewandte Chemie, 96 (11), 823-916, 1984
- [80] American Type Culture Collection
www.atcc.org
- [81] NAMD Scalable Molecular Dynamics
Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois.
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd>
- [82] J. Telser, M. J. Benecky, M. W. Adams, L. E. Mortenson und B. M. Hoffman:
An EPR and electron nuclear double resonance investigation of carbon monoxide binding to hydrogenase I (bidirectional) from *Clostridium pasteurianum* W5.
J. Biol. Chem., 261 (29): 13536-41, 1986
- [83] M. Carepo, D. L. Tierney, C. D. Brondino, T. C. Yang, A. Pamplona, J. Telser, I. Moura, J. J. 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., 4 (2): 281-6, 2002
- [84] J.W. van der Zwaan, M.C.C. Coremans, M. Bouwens and S.P.J. Albracht:
Effect of ¹⁷O₂ and ¹³CO on EPR spectra of nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*.
Biochimica et Biophysica Acta, 1041 (2), 101-110, 1990
- [85] J. Cohen, K. Kim, M. Posewitz, M.L. Ghirardi, K. Schulten, M. Seibert and P. King:
Molecular dynamics and experimental investigation of H₂ and O₂ diffusion in [Fe]-hydrogenase.
Biochemical Society Transactions, 33 (1), 80–82, 2005

- [86] C. Giacovazzo H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti, M. Catti:
Fundamentals of Crystallography.
Oxford University Press, 1992
- [87] D. E. Sands:
Introduction to Crystallography.
Dover Publications, 1994
- [88] A. Guinier:
X-Ray Diffraction: In Crystals, Imperfect Crystals, and Amorphous Bodies.
Dover Publications, 1994
- [89] B. E. Warren:
X-Ray Diffraction.
Dover Publications, 1990
- [90] Y. Nicolet:
Etude cristallographique de l'hydrogenase a fer de la bacterie sulfato-reductrice
Desulfovibrio desulfuricans.
Dissertation, Université Joseph Fourier-Grenoble I, 1999
- [91] E. M. Shepard, B. R. Duffus, S. J. George, S. E. McGlynn, M. R. Challand, K. D.
Swanson, P. L. Roach, S. P. Cramer, J. W. Peters und J. B. Broderick:
[FeFe]-Hydrogenase Maturation: HydG-Catalyzed Synthesis of Carbon Monoxide.
J. Am. Chem. Soc., 132 (27), 9247–9249, 2010
- [92] C. Zheng, K. Kim, T. Matsumoto, S. Ogo:
The useful properties of H₂O as a ligand of a hydrogenase mimic.
Dalton Trans., 39 (9): 2218-25, 2010
- [93] S. Ogo, R. Kabe, K. Uehara, B. Kure, T. Nishimura, S. C. Menon, R. Harada, S.
Fukuzumi, Y. Higuchi, T. Ohhara, T. Tamada, R. Kuroki:
A Dinuclear Ni(μ -H)Ru Complex Derived from H₂.
Science, 316 (5824), 585 – 587, 2001
- [94] C. Fichtner:
Spektroskopische und elektrochemische Untersuchung der [NiFe]-Hydrogenase
aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F.
Dissertation, Max-Planck-Institut für bioanorganische Chemie, 2005
- [95] K. Munk:
Grundstudium Biologie – Mikrobiologie.
Spektrum Verlag, 2000
- [96] H. G. Schlegel und C. Zaborosch:
Allgemeine Mikrobiologie.
Thieme Verlag, 1992

- [97] M. Carepo, J. F. Baptista, A. Pamplona, G. Fauque, J. J. Moura, M. A. Reis: Hydrogen metabolism in *Desulfovibrio desulfuricans* strain New Jersey – a comparison study with *D. vulgaris* and *D. gigas* species. *Anaerobe*, 8 (6): 325-32, 2002
- [98] A. S. Traore, C. E. Hatchikian, J. Le Gall, and J. P. Belaich: Microcalorimetric studies of the growth of sulfate-reducing bacteria: comparison of the growth parameters of some *Desulfovibrio* species. *J. Bacteriol.* 149 (2): 606–611, 1982
- [99] L. A. Hütter: Wasser und Wasseruntersuchung - Methodik, Theorie u. Praxis chemischer, chemisch-physikalischer, biologischer u. bakteriologischer Untersuchungsverfahren. Otto Salle Verlag, Verlag Sauerländer, 1994
- [100] B. K. J. Pohorelic, J. K. Voordouw, E. Lojou, A. Dolla, J. Harder, und G. Voordouw: Effects of deletion of genes encoding Fe-only hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough on hydrogen and lactate metabolism. *Journal of Bacteriology*, 184 (3), 679-686, 2002
- [101] D. R. Noguera, G. A. Brusseau, B. E. Rittmann, D. A. Stahl: A unified model describing the role of hydrogen in the growth of *Desulfovibrio vulgaris* under different environmental conditions. *Biotechnol Bioeng.*, 59 (6): 732-46, 1998
- [102] E. Greenbaum und J. W. Lee: Photosynthetic hydrogen and oxygen production by green algae. *BioHydrogen*, 5, 235-241, 1999
- [103] J. M. Odom und H. D. Peck jr.: Hydrogen cycling as a general mechanism for energy coupling in the sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 12 (1), 47–50, 1981
- [104] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Enzyme Nomenclature
- [105] C. Goldet, C. Brandmayr, S. Stripp, T. Happe, C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps, F. Armstrong: Electrochemical kinetic investigations of the reactions of [FeFe]-hydrogenases with carbon monoxide and oxygen: comparing the importance of gas tunnels and active-site electronic/redox effects. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (41), 14979-89, 2009
- [106] M. Frey: Hydrogenases, hydrogen-activating enzymes. *Chembiochem.*, 1; 3(2-3): 153-60, 2002

- [107] M. Stephenson und L. H. Stickland:
Hydrogenase: A bacterial enzyme activating molecular hydrogen.
Biochem. J., 25 (1): 205–214, 1931
- [108] R. Cammack et al.:
Hydrogen as a Fuel - Learning from Nature.
Taylor and Francis, 2001
- [109] Bayerisches Landesamt für Umwelt:
Biogas Handbuch Bayern.
www.lfu.bayern.de, 2009
- [110] C. Li, H. H. P. Fang:
Fermentative Hydrogen Production from Wastewater and Solid Wastes
by Mixed Cultures.
Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 37 (1), 1–39, 2007
- [111] H. Gaffron, J. Rubin:
Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae.
JPG, 26 (2): 219-240, 1942
- [112] R. P. Gfeller, M. Gibbs:
Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*.
Plant Physiol., 77 (2): 509–511, 1985
- [113] H. Liu, S. Grot, B. E. Logan :
Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate.
Environ Sci Technol., 39 (11): 4317-20, 2005
- [114] H. S. Lee, W. F. Vermaas, B. E. Rittmann:
Biological hydrogen production: prospect and challenges.
Trends Biotechnol., 28 (5): 262-71, 2010
- [115] A. Badura, B. Esper, K. Ataka, C. Grunwald, C. Wöll,
J. Kuhlmann, J. Heberle, M. Rögner:
Light-driven water splitting for (bio-)hydrogen production: Photosystem 2
as the Central Part of a Bioelectrochemical Device.
Photochem. Photobiol., 82 (5): 1385-90, 2006
- [116] B. Esper, A. Badura, M. Rögner:
Photosynthesis as a power supply for (bio-)hydrogen production.
Trends in Plant Science, 11 (11), 543-549, 2006
- [117] M. Grätzel:
Photoelectrochemical cells.
Nature, 414, 338-344, 2001
- [118] H. Cypionka:
Grundlagen der Mikrobiologie.
Springer Verlag, Berlin, 2010

- [119] H. Brill:
Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz –
Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen.
Gustav Fischer Verlag, 1995
- [120] T. A. Hansen:
Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes.
Antonie Van Leeuwenhoek, 66 (1-3): 165-85, 1994
- [121] T. D. Brock:
Mikrobiologie.
Spektrum Akademischer Verlag, 2000
- [122] C. Boothman, S. Hockin, D. E. Holmes, G. M. Gadd und J. R. Lloyd:
Molecular analysis of a sulphate-reducing consortium used
to treat metal-containing effluents.
Biometals, 19 (6): 601-9, 2006
- [123] P. M. Matias, C. M. Soares, L. M. Saraiva, R. Coelho,
J. Morais, J. Le Gall und M. A. Carrondo :
[NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774:
gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at
1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3.
J. Biol. Inorg. Chem., 6 (1): 63-81, 2001
- [124] 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, 5 (12), 1671-1680, 1997
- [125] G. Voordouw, V. Niviere, F. G. Ferris, P. M. Fedorak und D. W. S. Westlake:
Distribution of Hydrogenase Genes in *Desulfovibrio* spp. and their Use in
Identification of Species from the Oil Field Environment.
Appl. Environ. Microbiol., 56 (12), 3748–3754, 1990
- [126] N K Menon, H D Peck, Jr, J L Gall, and A E Przybyla:
Cloning and sequencing of the genes encoding the large and small subunits
of the periplasmic (NiFeSe) hydrogenase of *Desulfovibrio baculatus*.
J. Bacteriol., 169 (12): 5401–5407, 1987
- [127] L. M. Prescott, J. P. Harley und D. A. Klein:
Microbiology.
McGraw-Hill Higher Education, 2004
- [128] R. Süßmuth, J. Eberspächer, R. Haag und W. Springer:
Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum.
Thieme Verlag, 1998

- [129] A. Parkin, C. Cavazza, J. Fontecilla-Camps und F. Armstrong:
Electrochemical investigations of the Interconversions between Catalytic and Inhibited States of the [FeFe]-Hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*.
J. Am. Chem. Soc., 128 (51): 16808-15, 2006
- [130] K. A. Vincent, A. Parkin, O. Lenz, S. P. Albracht, J. C. Fontecilla-Camps, R. Cammack, B. Friedrich und F. A. Armstrong:
Electrochemical Definitions of O₂ Sensitivity and Oxidative Inactivation in Hydrogenases.
J. Am. Chem. Soc., 127 (51): 18179-89, 2005
- [131] W. Lubitz und B. Tumas:
Hydrogen: An Overview.
Chem. Rev., 107, 3900-3903, 2007
- [132] O. Rüdiger:
Preparacion y Caracterizacion de Electroodos para la Oxidacion-Redccion de Hidrogeno Basados en la Actividad de las Hidrogenasas.
Dissertation, Universidad Autonoma de Madrid, 2009
- [133] O. Rüdiger, J. M. Abad, C. Hatchikian, V. M. Fernandez und A. L. de Lacey:
Oriented immobilization of *Desulfovibrio gigas* Hydrogenase onto Carbon Electrodes by Covalent Bonds for Nonmediated Oxidation of H₂.
J. Am. Chem. Soc., 127, 16008-16009, 2005
- [134] V. S. Bagotsky:
Fundamentals of Electrochemistry.
Wiley, 2006
- [135] J. Appel, R. Schulz:
Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I).
Biochim. Biophys. Acta, 1298 (2): 141-7, 1996
- [136] M. W. Adams, E. I. Stiefel:
Organometallic iron: the key to biological hydrogen metabolism.
Current Opinion in Chemical Biology, 4 (2), 214-220, 2000
- [137] O. Meyer, H. G. Schlegel:
Reisolation of the carbon monoxide utilizing hydrogen bacterium *Pseudomonas carboxydovorans* (Kistner) comb. nov.
Arch. Microbiol., 118 (1): 35-43, 1978
- [138] P. M. Vignais, A. Colbeau, J. C. Willison, Y. Jouanneau:
Hydrogenase, nitrogenase, and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria.
Adv. Microb. Physiol., 26: 155-234, 1985
- [139] M. W. Adams, L. E. Mortenson und J. S. Chen :
Hydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta., 594 (2-3), 105-76, 1980

- [140] H. Masukawa, K. Inoue, H. Sakurai, C. P. Wolk, R. P. Hausinger:
Site-Directed Mutagenesis of *Anabaena* sp. PCC 7120 Nitrogenase
Active Site to Increase Photobiological Hydrogen Production.
Appl. Environ. Microbiol., 2010
- [141] T. M. Embley, W. Martin:
A hydrogen-producing mitochondrion.
Nature, 396 (6711): 517-9, 1998
- [142] D. G. Lindmark, M. Müller und H. Shio:
Hydrogenosomes in *Trichomonas vaginalis*.
The Journal of Parasitology, 61 (3): 552-554, 1975
- [143] F. G. Voncken, B. Boxma, A. H. van Hoek, A. S. Akhmanova,
G. D. Vogels, M. Huynen, M. Veenhuis, J. H. Hackstein:
A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic
chytrid *Neocallimastix* sp. L2.
Gene, 284 (1-2): 103-12, 2002
- [144] M. Winkler, B. Heil, T. Happe:
Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase
from the unicellular green alga *Chlorella fusca*.
Biochim. Biophys. Acta., 1576 (3): 330-4, 2002
- [145] L. Florin, A. Tsokoglou, T. Happe:
A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus*
is linked to the photosynthetic electron transport chain.
J Biol Chem., 276 (9): 6125-32, 2001
- [146] A. Akhmanova, F. G. Voncken, T. Van Alen, A. van Hoek,
B. Boxma, G. Vogels, M. Veenhuis und J. H. Hackstein:
A hydrogenosome with a genome.
Nature, 396, 527-528, 1998
- [147] J. H. Hackstein, A. Akhmanova, B. Boxma, H. R. Harhangi, F. G. Voncken:
Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments.
Trends Microbiol., 7 (11): 441-7, 1999
- [148] H. J. Galla und H. J. Müller:
Spektroskopische Methoden in der Biochemie.
Thieme Verlag, 1988
- [149] G. Palmer, L. Que:
Physical Methods in BioInorganic Chemistry, Ch. 3, EPR of Metalloproteins.
University Press, 2000
- [150] A. Melis:
Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*
(unicellular green algae)
Planta 226: 1075-1086, 2007

- [151] M. A. F. Valente, A. S. F. Oliveira, N. Gnad, I. Pacheco, A. V. Coelho, A. V. Xavier, M. Teixeira, C. M. Soares, I. A. C. Pereira: Hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase J. Biol. Inorg. Chem. 10: 667-682, 2005
- [152] C.L. Drennan, J. W. Peters: Surprising cofactors in metalloenzymes Current opinion in Structural Biology, 13: 220-226, 2003

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	ausführliche Form
Abb.	Abbildung
ad	auf, bis (hinzufügen)
a.dest.	destilliertes Wasser
Å	Ångström = 10^{-10} m
APS	Adenosinmonophosphat-Sulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
D	Diffusionskoeffizient
dest.	destilliert
<i>D. desulfuricans</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>D. vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
DdH	periplasmatische [FeFe]- H ydrogenase aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
DFT	D ichte- F unktional- T heorie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid
e-	Elektron
EPR	E lektronen P aramagnetische R esonanz-Spektroskopie
ε	Extinktionskoeffizient

Abkürzung	ausführliche Form
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Faraday-Konstante ($9,6485 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$)
fs	Femtosekunde(n)
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
H ⁺	Proton
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K	Grad Kelvin
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
MALDI ToF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectroscopy
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
meq	Millimol-Äquivalent
MPa	MegaPascal = N/mm^2
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaDT	Natrium-Di-Thionit
NBD	4-Nitro-Benzen-Diazoniumsalz
NHS	N-Hydroxysuccinimid
p.A.	per Analysis
Pa	Pascal = N/m^2
P _a	anorganisches Phosphat
PP _a	anorganisches Pyrophosphat
rpm	rounds (rotations) per minute

Abkürzung	ausführliche Form
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium d odecyl sulphate)
SOMO	s ingly o ccupied m olecular o rbital
Tab.	Tabelle
Tris	Tris -(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit, Enzymmenge, die 1 μmol Substrat in 1 min umsetzt
Vol.	Volumen
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume
CN-Ligand	Cyanid-Ligand
CO-Ligand	Carbonyl-Ligand
DFT	Dichtefunktionaltheorie
FPLC	fast phase liquid chromatography

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung Nr.	Titel	Seite
Abb.1.1 Quelle	Photosynthetische Elektronentransportkette und Kopplung an den Hydrogenase-Stoffwechsel in <i>C. reinhardtii</i> verändert nach A. Melis, 2007 [150]	5
Abb.1.2 Quelle	Semiartifizielle bioelektrochemische Zellen verändert nach [113] und [115]	6
Abb.1.3 Quelle	Habitats verschiedener Organismenklassen mit H ₂ -Metabolismus verändert nach Cammack et al., 2001 [108]	7
Abb.1.4 Quelle	Grundzüge des Stoffwechsels von <i>D. desulfuricans</i> verändert nach Brock et al., 2001 [121]	9
Abb.1.5 Quelle	Biotischer Schwefelkreislauf verändert nach Schlegel et al., 2006 [96]	10
Abb.2.1 Quelle	Das katalytische Zentrum der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> verändert nach Albracht et al. [39]	14
Abb.2.2 Quelle	Das katalytische Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen sowie die Gesamtstruktur der [NiFe]-Hydrogenase aus <i>D. vulgaris</i> Miyazaki in Bänder-Darstellung H. Ogata, MPI BAC	16
Abb.2.3 Quelle	[FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> RCSB Protein Data Bank, Satz 1HFE, nach [13]	20
Abb.2.4 Quelle	Die Redox-Zustände der [FeFe]-Hydrogenase verändert nach Lubitz et al., 2007 [45]	21
Abb.3.1 Quelle	Zeeman-Aufspaltung im homogenen Magnetfeld verändert nach Winter Noll: Methoden der Biophysikalischen Chemie [75]	26
Abb.3.2 Quelle	mögliche EPR-Spektrenformen eines Spin ½-Systems verändert nach Schweiger und Jeschke [34]	28
Abb.3.3 Quelle	4-Energieniveau-Schema eines Systems mit S = ½ und I = ½ verändert nach A. Carrington, A. D. McLachlan [77]	29
Abb.3.4 Quelle	Puls-Schema eines 2-Puls-ESE (Hahn-Echo)-Experiments verändert nach Schweiger und Jeschke [34]	31
Abb.3.5 Quelle	Auslenkung der Magnetisierung während einer 2-Puls-ESE-Sequenz verändert nach Schweiger und Jeschke [34]	32
Abb.3.6 Quelle	Pulsschema bei Davies-ENDOR-Messungen verändert nach Schweiger und Jeschke [34]	32
Abb.3.7 Quelle	Pulsschema bei 3-Puls-ESEEM- und HYSORE-Messungen verändert nach Schweiger und Jeschke [34]	33

Abbildung Nr.	Titel	Seite
Abb.3.8 Quelle	Schaltdiagramm einer 3-Elektrodenanordnung mit Potentiostaten verändert nach V. S. Bagotsky [134]	35
Abb.3.9 Quelle	Idealisiertes Zyklovoltammogramm verändert nach Scholz, <i>Electroanalytical Methods</i> [61]	36
Abb.3.10 Quelle	Zyklovoltammogramm mit an die Elektrode gebundener Probe nach [94]	37
Abb.3.11 Quelle	Kristallisation mittels Dampfdiffusion verändert nach Hampton Research, Laguna Niguel	39
Abb.5.1 Quelle	Anaerob-Zelt, Arbeiten unter O ₂ -Ausschluß diese Arbeit	47
Abb.5.2 Quelle	Wachstumskurve für Bakterien verändert nach Süßmuth et al., 1998 [128]	49
Abb.5.3 Quelle	Fermenteraufbau diese Arbeit	51
Abb.5.4 Quelle	Abnahme des Schwefelgehalts im Medium während der Zellanzucht diese Arbeit	55
Abb.5.5 Quelle	Akkumulation von H ₂ in der Gasphase diese Arbeit	56
Abb. 6.1 Quelle	Aufreinigungs-Schema des Enzyms periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> (DdH) diese Arbeit	61
Abb.6.2 Quelle	Qualitativer Hydrogenasenachweis mittels Farbumschlag von Methylviologen diese Arbeit	64
Abb.6.3 Quelle	Hydrograph-Messungen diese Arbeit	66
Abb.6.4 Quelle	Aufreinigungschromatogramm der ersten Säule (DEAE52) diese Arbeit	68
Abb.6.5 Quelle	Farbunterschiede der aufgetrennten Fraktionen diese Arbeit	69
Abb.6.6 Quelle	SDS-Protein-Gelbild diese Arbeit	70
Abb.6.7 Quelle	Aufreinigungschromatogramm der optimierten ersten Säule diese Arbeit	71
Abb.6.8 Quelle	Chromatographieverlauf der ursprünglich verwendeten Säule diese Arbeit	73
Abb.6.9 Quelle	Gelfiltrations-Chromatographieverlauf nach Wechsel der Filtrationsmatrix diese Arbeit	74

Abbildung Nr.	Titel	Seite
Abb.6.10 Quelle	Chromatographielauf der dritten Säule diese Arbeit	75
Abb.6.11 Quelle	UV/VIS-Spektrum aufgereinigten Hydrogenase-Enzyms diese Arbeit	77
Abb.6.12 Quelle	Vergleich der Absorptionen von reduzierter und „as- isolated“-oxidierte Probe diese Arbeit	78
Abb.6.13 Quelle	MALDI-TOF-MS-Spektrum aufgereinigten DdH-Proteins diese Arbeit	80
Abb.6.14 Quelle	FT-IR-Spektrum des $H_{as-isolated}$ -Zustandes von DdH diese Arbeit	82
Abb.6.15 Quelle	FT-IR-Spektrum des H_{ox} -Zustandes des DdH-Enzyms diese Arbeit	83
Abb. 6.16 Quelle	FT-IR-Spektrum des H_{ox^-} / H_{ox-CO} -Misch-Zustandes des DdH-Enzyms diese Arbeit	83
Abb. 6.17 Quelle	Hydrograph: Messkammer mit Elektrode sowie Temperierzu- und Ablauf diese Arbeit	84
Abb.7.1 Quelle	Übersicht des H-Clusters verändert nach Albracht et al. [39]	91
Abb.7.2 Quelle	CW-EPR-Messung der Hydrogenase-Probe im H_{ox} -Zustand verändert nach [30]	92
Abb.7.3 Quelle	X-Band 3-Puls-ESEEM-Spektrum der [FeFe]-Hydrogenase verändert nach [30]	93
Abb.7.4 Quelle	X-Band-HYSCORE-Spektrum verändert nach [30]	94
Abb.7.5 Quelle	Q-Band-HYSCORE-Spektren verändert nach [30]	95
Abb.7.6 Quelle	H-Cluster der [FeFe]-Hydrogenasen im H_{ox-CO} -Zustand verändert nach Albracht et al. [39]	99
Abb.7.7a+b Quelle	CW-Messungen ^{13}C -markierter Probe verändert nach [31]	99 und 100
Abb.7.8 Quelle	Vergleich der X-Band-CW-EPR-Spektren im H_{ox-CO} -Zustand verändert nach [31]	101
Abb.7.9 Quelle	X-Band-HYSCORE-Messung mit ^{13}C -Signalen verändert nach [31]	101

Abbildung Nr.	Titel	Seite
Abb.7.10 Quelle	Q-Band-Davies-ENDOR-Spektrum verändert nach [31]	102
Abb.7.11 Quelle	X-Band-HYSCORE-Spektrum des belichteten H _{ox} -CO-Zustands verändert nach [31]	104
Abb.7.12 Quelle	Das H-Cluster des DdH-Moleküls in „Kugel-Stab“-Ansicht, Gaskanal verändert nach [13]	106
Abb.7.13 Quelle	W-Band-HYSCORE-Messung des DdH-H-Clusters im H _{ox} -Zustand diese Arbeit	108
Abb.7.14 Quelle	CW-EPR-Spektrum des H-Clusters ohne Isotopenmarkierung diese Arbeit	109
Abb.7.15 Quelle	MD-Simulation zur Passierbarkeit des Kanals für Wasser diese Arbeit	110
Abb.7.16 Quelle	Putativer Protonenpfad in DdH verändert nach [13]	111
Abb.7.17 Quelle	CW EPR-Messungen verschieden markierter DdH-Proben im H _{ox} -Zustand diese Arbeit	112
Abb.7.18 Quelle	Q-Band ¹ H-Davies-ENDOR-Messungen diese Arbeit	113
Abb.7.19 Quelle	H-Cluster mit einem Wassermolekül an der freien Bindestelle diese Arbeit	114
Abb.7.20 Quelle	Anhand von DFT-Berechnungen bestimmte SOMO eines vereinfachten DdH-Modells diese Arbeit	115
Abb.8.1 Quelle	Ladungsverteilung auf der Oberfläche von DdH diese Arbeit, Datensatz aus RCSB Protein Data Bank, Satz 1HFE, nach [13]	120
Abb.8.2 Quelle	Bindung radikalischen NBDs an die Oberfläche einer Graphitelektrode verändert nach P. A. Brooksby und A. J. Downard [51]	120
Abb.8.3 Quelle	Reduktion des Primärlayers von 4-Nitro-Benzen-Diazoniumsalz verändert nach P. A. Brooksby und A. J. Downard [51]	121
Abb.8.4 Quelle	Bindung von EDC an die Glutaminsäure-Seitenketten des Enzyms und Verdrängung des EDC durch NHS verändert nach P. A. Brooksby und A. J. Downard [51]	122
Abb.8.5 Quelle	Kopplung von NBD an das Protein verändert nach P. A. Brooksby und A. J. Downard [51]	122
Abb.8.6 Quelle	Elektrostat und Meßaufbau verändert nach O. Rüdiger [132]	123
Abb.8.7 Quelle	Vergleich der Zyklovoltammogramme der [NiFe]-Hydrogenase aus <i>D. vulgaris</i> Miyazaki und der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> diese Arbeit	124

Abbildung Nr.	Titel	Seite
Abb.8.8 Quelle	Zyklovoltammogramme der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> bei drei verschiedenen pH-Werten diese Arbeit	126
Abb.8.9 Quelle	CO-Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> diese Arbeit	127
Abb.8.10 Quelle	Vergleich der CO-Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> während der H ₂ -Oxidation und H ⁺ -Reduktion diese Arbeit	128
Abb.8.11	Vergleich der CO-Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> bei unterschiedlichen pH-Werten und Ausgangspotentialen	128
Abb.8.12 Quelle	Oxidative Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> mittels positiver Potentiale diese Arbeit	130
Abb.8.13 Quelle	Oxidative Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> mittels positiver Potentiale, Regeneration gegen Zeit und Regeneration gegen angelegtes Potential diese Arbeit	131
Abb.8.14 Quelle	O ₂ -Inhibierung der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> diese Arbeit	132
Abb.8.15 Quelle	Chronoamperogramm, Messung der [FeFe]-Hydrogenase aus <i>D. desulfuricans</i> über mehrere Stunden diese Arbeit	133
Abb.9.1 Quelle	Kristallnadeln des ersten Screenings mit Polyethylenglykol diese Arbeit	136
Abb.9.2 Quelle	Nadel- und plättchenförmige DdH-Kristalle diese Arbeit	137
Abb.9.3 Quelle	Reflexmuster eines Kristalls diese Arbeit	137
Abb.9.4 Quelle	Unter Zugabe von Zinkchlorid gewachsener rhombischer Kristall diese Arbeit	138

Abbildungen, welche für diese Arbeit angefertigt wurden, wurden mit den Programmen MS Powerpoint, MS Excel, Corel Draw 12, Photoshop 13, PyMol und Swiss PDB Viewer erstellt.

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle Nr.	Titel	Seite
Tab. 2.1 Quelle:	Vergleich der spezifischen Aktivitäten von [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen verändert nach M. Frey [3]	15
Tab. 2.2 Quelle:	Vergleich der spezifischen Aktivitäten verschiedener [NiFeSe]- Hydrogenasen mit [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen verändert nach [151]	17
Tab. 3.1 Quelle:	Frequenzbereiche der verschiedenen Messfenster („Bänder“) in der EPR-Spektroskopie nach Lottspeich [56] und Carrington [77]	30
Tab. 5.1 Quelle:	H ₂ -Entwicklung dreier S-Mangel- und einer Vollmediumskultur diese Arbeit	56
Tab. 5.2 Quelle:	Vergleich der Ausbeuten von DdH unter Normal- und H ₂ -gesättigten Anzuchtbedingungen. diese Arbeit	57
Tab. 6.1 Quelle:	Lauf-Parameter der Anionen-Austausch-Chromatographie diese Arbeit	68
Tab. 6.2 Quelle:	Typische Ausbeuten aus optimierten Chromatographieläufen diese Arbeit	76
Tab. 6.3 Quelle:	Bandenpositionen der CO- und CN-Liganden des DdH-Enzyms in verschiedenen Redox-Zuständen nach [39]	81
Tab. 7.1 Quelle:	Parameter der ¹⁴ N Hyperfein- und Quadrupol-Kopplungen nach [30]	96
Tab. 7.2 Quelle:	Vergleich der experimentell und über DFT-Berechnungen erhaltenen Quadrupol-Kopplungs-Parameter nach [30]	97
Tab. 7.3 Quelle:	experimentelle Hyperfeinkopplungswerte nach [31]	103
Tab. 7.4 Quelle:	Hyperfeinkopplungen und Zuordnungen nach [31]	105
Tab. 7.5 Quelle:	DFT-Berechnungen des isotropischen Anteils der Hyperfein-Interaktionen (in MHz) im Vergleich mit experimentell gewonnenen Daten diese Arbeit	114

Tabelle Nr.	Titel	Seite
9.1 Quelle:	Schema der Kristallisations-Ansätze mit MgCl ₂ bei pH-Wert 6 diese Arbeit	136
A1.1 Quelle:	Ansätze des Ammonium-Sulfat-Kits verändert nach Hampton Research®	
A1.2 Quelle:	Ansätze des „PEG 6000“-Kits verändert nach Hampton Research®	
A1.3 Quelle:	Ansätze des „PEG Ion“-Kits verändert nach Hampton Research®	
A1.4 Quelle:	Ansätze des „PEG Ion2“-Kits verändert nach Hampton Research®	
A1.5 Quelle:	Ansätze des „Wizard3“-Kits verändert nach Emerald Biosystems®.	

ERKLÄRUNG

Ich erkläre, daß Ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und diese in der vorgelegten oder in ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht habe.
Ich versichere des Weiteren, daß Ich keine vorherigen erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

(Brian Wenk)

DÜSSELDORF, DEN 21.10.2010

BRIAN WENK

Ernst-Moritz-Arndt-Straße 64
46240 Bottrop i.W.
02041 – 94645
01577 – 36 90 212
b.wenk@web.de



Persönliche Daten

Staatsangehörigkeit deutsch
Geboren am 27. Dezember 1978 in Bottrop in Westfalen, ledig.

Ausbildung

- Seit 2006 **Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr**
Promotion: Die periplasmatische [FeFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757: Aufreinigung, Kristallisation, spektroskopische und elektrochemische Charakterisierung
- 2004 – 2005 **Ruhr-Universität, Bochum, Lehrstuhl Photobiotechnologie**
Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Mikrobiologie, Biotechnologie
- 2002 – 2003 **Ruhr-Universität, Bochum, Lehrstuhl Photobiotechnologie, Prof. Dr. T. Happe**
Diplomarbeit: “Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression der [FeFe]-Hydrogenase aus *Chlamydomonas reinhardtii*“
- 1998 – 2002 **Ruhr-Universität, Bochum**
Grund- und Hauptstudium der Biologie (Diplom: 1,8) mit Schwerpunkten in Biochemie, Biophysik, Pharmakologie und Toxikologie
- 1998 – 1999 **Marienhospital, Bottrop**
Zivildienst im Analyselabor: Blut- und Gewebeprobeanalyse, Hygienekontrolle, Datenpflege
- 1994 – 1996 **Heinrich-Heine-Gymnasium, Bottrop**
Abitur (2,5), Leistungskurse: Französisch, Geschichte

Publikationen

- 2008 “Spin distribution of the H-cluster in the H_{ox}-CO state of the [FeFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*: HYSCORE and ENDOR study of ¹⁴Fe and ¹³C nuclear interactions,” Alexey Silakov, Brian Wenk, Eduard Reijerse, Simon P. J. Albracht, Wolfgang Lubitz J Biol Inorg Chem 2009.
- 2008 “¹⁴N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: Evidence for a nitrogen in the dithiol bridge,” Alexey Silakov, Brian Wenk, Eduard Reijerse, Wolfgang Lubitz, PCCP 2009
- 2006-2008 Posterpräsentationen für „Solar H“ in Gelsenkirchen und Uppsala, Schweden

Anhang 1: Getestete Kristallisationsbedingungen der [FeFe]-Hydrogenase DdH

Tab. A1.1: Ansätze des Ammonium-Sulfat-Kits von Hampton Research®.

Ansatz	[Puffer]	[Puffer]	Puffer	pH	[Ppt]	[Ppt]	Präzipitantz
#		Einheit				Einheit	
A1	0,1	M	Zitronensäure	4,0	0,8	M	Ammonium-Sulfat
A2	0,1	M	Zitronensäure	5,0	0,8	M	Ammonium-Sulfat
A3	0,1	M	MES Monohydrat	6,0	0,8	M	Ammonium-Sulfat
A4	0,1	M	HEPES	7,0	0,8	M	Ammonium-Sulfat
A5	0,1	M	Tris	8,0	0,8	M	Ammonium-Sulfat
A6	0,1	M	BICINE	9,0	0,8	M	Ammonium-Sulfat
B1	0,1	M	Zitronensäure	4,0	1,6	M	Ammonium-Sulfat
B2	0,1	M	Zitronensäure	5,0	1,6	M	Ammonium-Sulfat
B3	0,1	M	MES Monohydrat	6,0	1,6	M	Ammonium-Sulfat
B4	0,1	M	HEPES	7,0	1,6	M	Ammonium-Sulfat
B5	0,1	M	Tris	8,0	1,6	M	Ammonium-Sulfat
B6	0,1	M	BICINE	9,0	1,6	M	Ammonium-Sulfat
C1	0,1	M	Zitronensäure	4,0	2,4	M	Ammonium-Sulfat
C2	0,1	M	Zitronensäure	5,0	2,4	M	Ammonium-Sulfat
C3	0,1	M	MES Monohydrat	6,0	2,4	M	Ammonium-Sulfat
C4	0,1	M	HEPES	7,0	2,4	M	Ammonium-Sulfat
C5	0,1	M	Tris	8,0	2,4	M	Ammonium-Sulfat
C6	0,1	M	BICINE	9,0	2,4	M	Ammonium-Sulfat
D1	0,1	M	Zitronensäure	4,0	3,0	M	Ammonium-Sulfat
D2	0,1	M	Zitronensäure	5,0	3,0	M	Ammonium-Sulfat
D3	0,1	M	MES Monohydrat	6,0	3,0	M	Ammonium-Sulfat
D4	0,1	M	HEPES	7,0	3,0	M	Ammonium-Sulfat
D5	0,1	M	Tris	8,0	3,0	M	Ammonium-Sulfat
D6	0,1	M	BICINE	9,0	3,0	M	Ammonium-Sulfat

Tab. A1.2: Ansätze des „PEG 6000“-Kits von Hampton Research®. Der erfolgreiche Ansatz 44 wurde gelb unterlegt.

Ansatz	[Puffer]	[Puffer]	Puffer	pH	[Ppt]	[Ppt]	Präzipitanz
#		Einheit				Einheit	
A1	0,1	M	Zitronensäure	4.0	5	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
A2	0,1	M	Zitronensäure	5.0	5	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
A3	0,1	M	MES Monohydrat	6.0	5	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
A4	0,1	M	HEPES	7.0	5	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
A5	0,1	M	Tris	8.0	5	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
A6	0,1	M	BICINE	9.0	5	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
B1	0,1	M	Zitronensäure	4.0	10	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
B2	0,1	M	Zitronensäure	5.0	10	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
B3	0,1	M	MES Monohydrat	6.0	10	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
B4	0,1	M	HEPES	7.0	10	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
B5	0,1	M	Tris	8.0	10	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
B6	0,1	M	BICINE	9.0	10	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
C1	0,1	M	Zitronensäure	4.0	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
C2	0,1	M	Zitronensäure	5.0	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
C3	0,1	M	MES Monohydrat	6.0	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
C4	0,1	M	HEPES	7.0	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
C5	0,1	M	Tris	8.0	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
C6	0,1	M	BICINE	9.0	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
D1	0,1	M	Zitronensäure	4.0	30	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
D2	0,1	M	Zitronensäure	5.0	30	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
D3	0,1	M	MES Monohydrat	6.0	30	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
D4	0,1	M	HEPES	7.0	30	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
D5	0,1	M	Tris	8.0	30	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000
D6	0,1	M	BICINE	9.0	30	% w/v	Polyethylen-Glykol 6,000

Tab. A1.3: Ansätze des „PEG Ion“-Kits von Hampton Research®.

Ansatz	[Salz]	[Salz]	Salz	[Ppt]	[Ppt]	Präzipitantz
#		Einheiten			Einheiten	
1	0,2	M	Natriumfluorid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
2	0,2	M	Kaliumfluorid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
3	0,2	M	Ammoniumfluorid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
4	0,2	M	Lithiumchlorid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
5	0,2	M	Magnesiumchlorid Hexahydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
6	0,2	M	Natriumchlorid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
7	0,2	M	Calciumchlorid Dihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
8	0,2	M	Kaliumchlorid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
9	0,2	M	Ammonium chloride	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
10	0,2	M	Natriumiodid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
11	0,2	M	Kaliumiodid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
12	0,2	M	Ammoniumiodid	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
13	0,2	M	Natriumthiocyanat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
14	0,2	M	Kaliumthiocyanat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
15	0,2	M	Lithiumnitrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
16	0,2	M	Magnesiumnitrat Hexahydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
17	0,2	M	Natriumnitrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
18	0,2	M	Kaliumnitrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
19	0,2	M	Ammoniumnitrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
20	0,2	M	Magnesiumformat Dihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
21	0,2	M	Natriumformat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
22	0,2	M	Kaliumformat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
23	0,2	M	Ammoniumformat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
24	0,2	M	Lithiumazetat Dihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
25	0,2	M	Magnesiumazetat Tetrahydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
26	0,2	M	Zinkazetat Dihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
27	0,2	M	Natriumazetat Trihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
28	0,2	M	Calciumazetat Hydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
29	0,2	M	Kaliumazetat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
30	0,2	M	Ammoniumazetat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
31	0,2	M	Lithiumsulfat Monohydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
32	0,2	M	Magnesiumsulfat Heptahydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
33	0,2	M	Natriumsulfat Decahydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
34	0,2	M	Kaliumsulfat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
35	0,2	M	Ammoniumsulfat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
36	0,2	M	Natriumtartrat, Dibasisches Dihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
37	0,2	M	Kaliumtartrat Tetrahydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
38	0,2	M	Ammoniumtartrate, dibasisch	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
39	0,2	M	Natriumphosphat, monobasisch, Monohydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
40	0,2	M	Natriumphosphat, Dibasisch, Dihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
41	0,2	M	Kaliumphosphat, monobasisch	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
42	0,2	M	Kaliumphosphat, dibasisch	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
43	0,2	M	Ammoniumphosphat, monobasisch	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
44	0,2	M	Ammoniumphosphat, dibasisch	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
45	0,2	M	Lithiumzitat, tribasisch, Tetrahydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
46	0,2	M	Natriumzitat, tribasisch, Dihydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
47	0,2	M	Kaliumzitat, tribasisch, Monohydrat	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350
48	0,2	M	Ammoniumzitat, dibasisch	20	% w/v	Polyethylen-Glykol 3,350

Tab. A1.4: Ansätze des „PEG Ion2“-Kits von Hampton Research®. Der erfolgreiche Ansatz 44 wurde gelb unterlegt.

Tube #	Salt	Tube #	Buffer °	Tube #	Polymer
1.	0.1 M Sodium malonate pH 4.0	1.	None	1.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
2.	0.2 M Sodium malonate pH 4.0	2.	None	2.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
3.	0.1 M Sodium malonate pH 5.0	3.	None	3.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
4.	0.2 M Sodium malonate pH 5.0	4.	None	4.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
5.	0.1 M Sodium malonate pH 6.0	5.	None	5.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
6.	0.2 M Sodium malonate pH 6.0	6.	None	6.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
7.	0.1 M Sodium malonate pH 7.0	7.	None	7.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
8.	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	8.	None	8.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
9.	4% v/v Tacsimate pH 4.0	9.	None	9.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
10.	8% v/v Tacsimate pH 4.0	10.	None	10.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
11.	4% v/v Tacsimate pH 5.0	11.	None	11.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
12.	8% v/v Tacsimate pH 5.0	12.	None	12.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
13.	4% v/v Tacsimate pH 6.0	13.	None	13.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
14.	8% v/v Tacsimate pH 6.0	14.	None	14.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
15.	4% v/v Tacsimate pH 7.0	15.	None	15.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
16.	8% v/v Tacsimate pH 7.0	16.	None	16.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
17.	4% v/v Tacsimate pH 8.0	17.	None	17.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
18.	8% v/v Tacsimate pH 8.0	18.	None	18.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
19.	0.1 M Succinic acid pH 7.0	19.	None	19.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
20.	0.2 M Succinic acid pH 7.0	20.	None	20.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
21.	0.1 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	21.	None	21.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
22.	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	22.	None	22.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
23.	0.1 M DL-Malic acid pH 7.0	23.	None	23.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
24.	0.2 M DL-Malic acid pH 7.0	24.	None	24.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
25.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	25.	None	25.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
26.	0.2 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	26.	None	26.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
27.	0.1 M Sodium formate pH 7.0	27.	None	27.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
28.	0.2 M Sodium formate pH 7.0	28.	None	28.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
29.	0.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	29.	None	29.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
30.	0.2 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	30.	None	30.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
31.	2% v/v Tacsimate pH 4.0	31.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	31.	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
32.	2% v/v Tacsimate pH 5.0	32.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	32.	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
33.	2% v/v Tacsimate pH 6.0	33.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	33.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
34.	2% v/v Tacsimate pH 7.0	34.	0.1 M HEPES pH 7.5	34.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
35.	2% v/v Tacsimate pH 8.0	35.	0.1 M Tris pH 8.5	35.	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
36.	None	36.	0.07 M Citric acid, 0.03 M BIS-TRIS propane / pH 3.4	36.	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
37.	None	37.	0.06 M Citric acid, 0.04 M BIS-TRIS propane / pH 4.1	37.	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
38.	None	38.	0.05 M Citric acid, 0.05 M BIS-TRIS propane / pH 5.0	38.	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
39.	None	39.	0.04 M Citric acid, 0.06 M BIS-TRIS propane / pH 6.4	39.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
40.	None	40.	0.03 M Citric acid, 0.07 M BIS-TRIS propane / pH 7.6	40.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
41.	None	41.	0.02 M Citric acid, 0.08 M BIS-TRIS propane / pH 8.8	41.	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
42.	0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate, 0.02 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	42.	None	42.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
43.	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate 0.02 M Nickel(II) chloride hexahydrate	43.	0.1 M HEPES sodium pH 7.0	43.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
44.	0.02 M Zinc chloride	44.	None	44.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
45.	0.15 M Cesium chloride	45.	None	45.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
46.	0.2 M Sodium bromide	46.	None	46.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
47.	1% w/v Tryptone	47.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	47.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
48.	1% w/v Tryptone	48.	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	48.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350

Tab. A1.5: Ansätze des „Wizard3“-Kits von Emerald Biosystems®.

	crystallant	buffer	pH	salt/additive #1	additive #2
1	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium citrate (dibasic)	
2	30%(v/v) MPD	.1M sodium acetate	4.6	.02M calcium chloride	
3	20%(w/v) PEG 3350			.2M magnesium formate	
4	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium formate	
5	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium chloride	
6	20%(w/v) PEG 3350			.2M potassium formate	
7	50%(w/v) MPD	.1M Tris	8.5	.2M ammonium phosphate (monobasic)	
8	20%(w/v) PEG 3350			.2M potassium nitrate	
9	0.8M ammonium sulfate	.1M citric acid	4.0		
10	20%(w/v) PEG 3350			.2M sodium thiocyanate	
11	20%(w/v) PEG 6000	.1M bicine	9.0		
12	10%(w/v) PEG 8000	.1M HEPES	7.5	8%(v/v) ethylene glycol	
13	8%(w/v) PEG 4000	.1M sodium acetate	4.6		
14	20%(w/v) PEG 6000	.1M citric acid	5.0		
15	1.6M Sodium citrate				
16	20%(w/v) PEG 3350			.2M potassium citrate tribasic	
17	20%(w/v) PEG 4000	.1M citrate	5.5	10%(v/v) 2-propanol	
18	20%(w/v) PEG 6000	.1M citric acid	4.0	1M lithium chloride	
19	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium nitrate	
20	10%(w/v) PEG 6000	.1M HEPES	7.0		
21	1.6M Na/K phosphate	.1M HEPES	7.5		
22	20%(v/v) ethanol	.1M Tris	8.5		
23	10%(w/v) PEG 20,000	.1M bicine	9.0	2%(v/v) dioxane	
24	2M ammonium sulfate	.1M sodium acetate	4.6		
25	10%(w/v) PEG 1000			10%(w/v) PEG 8000	
26	24%(w/v) PEG 1500			20%(v/v) glycerol	
27	30%(v/v) PEG 400	.1M HEPES	7.5	.2M magnesium chloride	
28	70%(v/v) MPD	.1M HEPES	7.5		
29	40%(v/v) MPD	.1M Tris	8.0		
30	5.5%(w/v) PEG 4000			.17M ammonium sulfate	15%(v/v) glycerol
31	14%(v/v) 2-propanol	.07M sodium acetate	4.6	.14M calcium chloride	30%(v/v) glycerol
32	16%(w/v) PEG 8000			.04M potassium phosphate (monobasic)	20%(v/v) glycerol
33	1.6M magnesium sulfate	.1M MES	6.5		
34	10%(w/v) PEG 6000	.1M bicine	9.0		
35	4.4%(w/v) PEG 8000	.08M cacodylate	6.5	.16M calcium acetate	20%(v/v) glycerol
36	30%(v/v) Jeffamine M-600	.1M MES	6.5	.05M cesium chloride	
37	3.2M ammonium sulfate	.1M citric acid	5.0		
38	15%(w/v) PEG 10,000	.1M citrate	5.5	2%(v/v) dioxane	
39	20%(v/v) Jeffamine M-600	.1M HEPES	7.5		
40	10%(v/v) MPD	.1M bicine	9.0		
41	28%(v/v) PEG 400	.1M HEPES	7.5	.2M calcium chloride	
42	30%(w/v) PEG 4000	.1M Tris	8.5	.2M lithium sulfate	
43	30%(w/v) PEG 8000			.2M ammonium sulfate	
44	30%(w/v) PEG 5000 MME	.1M Tris	8.0	.2M lithium sulfate	
45	1.5M ammonium sulfate	.1M Tris	8.5		12%(v/v) glycerol
46	50%(v/v) MPD	.1M Tris	8.5	.2M ammonium phosphate (monobasic)	
47	30%(w/v) PEG 5000 MME	.1M MES	6.5	.2M ammonium sulfate	
48	20%(w/v) PEG 10,000	.1M HEPES	7.5		

DANKSAGUNG

Prof. Dr. W. Lubitz und Dr. Ed Reijerse danke ich für die Überlassung des interessanten Projektes, ihre Unterstützung und ihren Rat, den Sie mir über die Dauer dieser Promotion zukommen ließen.

Prof. Dr. K.-E. Jäger bin ich darüber hinaus dankbar für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Dr. Alexey Silakov war für die EPR-Messungen und die „in-silico“-Berechnungen verantwortlich und hat durch seine profunde Kenntnis und seinen Fleiß zum Gelingen dieser Arbeit in großem Maße beigetragen. Ich bedanke mich für den tiefgreifenden Einblick in diese faszinierende Art der Spektroskopie. Auch bei der eigentlichen Probenvorbereitung war er mir ein sehr wertvoller und angenehmer Arbeitskollege.

Des Weiteren möchte ich mich bei Professor Dr. Thomas Happe (Ruhr-Universität Bochum) und seiner gesamten Arbeitsgruppe bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an der heterologen Überexpression des DdH-Enzyms in *Clostridium acetobutylicum* zu arbeiten. Durch viele wertvolle Tipps seitens seiner Mitarbeiter konnte dieses Projekt weit vorangebracht werden, so daß diese „Modell-Hydrogenase“ hoffentlich bald in überexprimierter Form vorliegt.

Die elektrochemischen Messungen inklusive der Immobilisierung der Probe an die Elektrode wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Olaf Rüdiger ausgeführt.

Dabei konnte ich von seiner langjährigen Erfahrung mit der Elektrochemie profitieren, was die Probenkopplung und die elektrochemischen Messungen erst möglich gemacht hat.

Ich hatte das große Glück, mit Dr. Hideaki Ogata im Hause einen versierten Kristallographen zu finden, der die Kristallisationsexperimente mit viel Fachwissen und Engagement zum Erfolg geführt hat. Dafür und für sein freundliches Wesen möchte ich mich an dieser Stelle bei Ihm bedanken.

Bei Dr. Caroline Fichtner bedanke ich mich für die Einarbeitung in die DdH-Proteinaufreinigung und allgemeine „Starthilfe“. Dr. Petra Kellers hat ebenfalls durch viele wertvolle Tipps und Diskussionen geholfen, die Proteinaufreinigung zu verbessern und mir in mancherlei mehr Hinsicht beratend zur Seite gestanden. Meinen „Fachkolleginnen“ gebührt somit ebenfalls ein dickes Dankeschön.

Frau Tanja Berndsen und Frau Patricia Malkowski haben dafür gesorgt, ein Umfeld zu schaffen und aufrecht zu erhalten, in dem wissenschaftliches Arbeiten überhaupt erst möglich war und haben mich auf vielerlei mehr Arten unterstützt. Auch die Tatsache, daß Sie ihr Büro mit mir geteilt haben, hat am Gelingen dieser Arbeit Anteil gehabt, da ich so konzentriert arbeiten konnte. Dafür möchte ich an dieser Stelle danke sagen.

Nicht unerwähnt bleiben sollen meine beiden ehemaligen Auszubildenden Diana Obrez und Benjamin Swoboda, welche ich für jeweils ein Jahr begleiten durfte. Ihr freundliches Wesen, ihr Interesse, ihre schnelle Auffassungsgabe und ihr Fleiß haben erheblich dazu beigetragen, die Zellanzucht voranzubringen und den Probennachschub nicht abreißen zu lassen. Beide haben sich weit über das zu erwartende Maß in dieses Projekt eingebracht.

Meinen letzten Dank möchte ich richten an das Institut als Ganzem. Damit meine ich, ohne die Wichtigkeit der perfekten technischen Ausstattung schmälern zu wollen, in erster Linie die Menschen, die dort arbeiten, wissenschaftliche Mitarbeiter wie technisches Personal. Ausnahmslos jeder und jede, an den oder die ich mich mit der Bitte gewandt habe, unvermeidliche Schwierigkeiten, welche sich im Laufe eines solchen Projektes einzustellen pflegen, zu beseitigen, hat sich für mich Zeit genommen und mir hilfreich zur Seite gestanden.

Diese Tatsache wird mir an erster Stelle in Erinnerung bleiben.