

**Strukturelle und funktionelle
Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase
aus
*Allochromatium vinosum***

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Petra Kellers
aus Borken

Februar 2008

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

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

Referent: Prof. Dr. W. Lubitz
Korreferent: Prof. Dr. K.-E. Jaeger
Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2008

MEINER FAMILIE

Das Gras wächst nicht schneller, wenn man daran zieht.

Afrikanisches Sprichwort

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die membranassoziierte [NiFe]-Hydrogenase des Schwefel-Purpurbakteriums *Allochromatium vinosum*. Es ist in der Lage molekularen Wasserstoff heterolytisch zu spalten oder diesen aus Protonen und Elektronen zu generieren. Das Verständnis von Funktion und Struktur der Hydrogenasen ist Voraussetzung für die Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur alternativen Energiegewinnung auf Wasserstoffbasis. Das isolierte und gereinigte Enzym wurde spektroskopisch charakterisiert und anschließend kristallisiert.

Um ausreichende Mengen kristallisationsfähigen Proteins isolieren zu können, wurde der bakterielle Organismus erstmals in einem 1100 L Fermenter kultiviert. Durch die Verwendung einer neu entwickelten Kombination aus Soxhlet-Extraktions- und Destillationsapparatur konnte der Zellaufschluss und die Entfernung photosynthetischer Pigmente effizient gestaltet werden. Der hohe Reinheitsgrad der Hydrogenase wurde durch Optimierung der säulenchromatographischen Trennparameter erreicht und mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Während der Präparation kam eine verbesserte Methode zur qualitativen Ermittlung der spezifischen Wasserstoffspaltungsaktivität zum Einsatz. Ergebnisse EPR- und FT-IR-spektroskopischer Charakterisierungen bestätigten die Funktionalität des Enzyms und damit die Anwendbarkeit der modifizierten Reinigungsmethode.

Die Analyse der Diffraktionsmuster durchgeführter Röntgenbeugungsexperimente lässt auf eine orthorhombische Einheitszelle der Raumgruppe $P2_12_12$ schließen. In die errechnete Elektronendichtekarte konnte das erste, bisher vorläufige Molekülmodell der [NiFe]-Hydrogenase eines photosynthetischen Bakteriums mit einer Auflösung von 2,50 Å eingepasst werden. Die vorliegende Struktur weist im ersten Vergleich eine hohe Ähnlichkeit zu der aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F isolierten [NiFe]-Hydrogenase auf.

Summary

This thesis focuses on the investigation of [NiFe]-hydrogenase from the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. This enzyme is able to split molecular hydrogen heterolytically or, conversely, generates H₂ from protons and electrons. Hence, it plays an essential role in hydrogen metabolism of many microorganisms, which are of great biotechnological interest. A detailed understanding of the function and structure is necessary to develop new biotechnological methods to use hydrogen as an alternative energy source. The isolated and purified protein was characterized with spectroscopic methods and subsequently crystallized.

Due to the low expression of hydrogenase, the bacterial organism was grown in a 1100 L fermenter to harvest a large mass of cells in order to isolate sufficient amounts of the enzyme. The efficiency of the procedures for cell disruption and removal of photosynthetic pigments were improved with the development of a special Soxhlet extraction-distillation procedure. Improvement of the purification procedure and the use of a revised method to evaluate the specific hydrogen splitting activity led to the isolation of very pure protein, supported by SDS-PAGE and MALDI-TOF MS. The results of EPR and FT-IR spectroscopic characterization confirmed the functionality of the protein and, therefore, the applicability of the modified preparation protocol.

Analysis of the diffraction pattern received from recent X-ray crystallographic experiments indicated an orthorhombic space group $P2_12_12$ with the following dimensions and angles: $a=205.00 \text{ \AA}$, $b=217.42 \text{ \AA}$, $c=120.44 \text{ \AA}$ and α , β and $\gamma=90^\circ$, respectively. The calculated electron density map provided the first, still preliminary, molecular model of the membrane associated [NiFe]-hydrogenase isolated from a photosynthetic bacterium with a resolution of 2.50 \AA . At first glance it shows a high similarity to the [NiFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation und Zielsetzung	1
2	Erneuerbare Energien	3
2.1	Wasserstoff als Alternative	3
2.2	Brennstoffzellentechnik	4
2.3	Wasserstoffgewinnung und -speicherung	6
2.4	Biologische Wasserstoffproduktion	7
3	Der bakterielle Organismus <i>Allochromatium vinosum</i>	13
3.1	Lebensraum	13
3.2	Bakterielle Photosynthese	15
3.3	Kultivierung	17
4	Hydrogenasen	21
4.1	Klassifizierung der Hydrogenasen	21
4.2	Struktureller Aufbau	24
4.3	Die Redoxzustände	26
4.4	Genetische Kodierung	31
5	Spektroskopische Methoden	33
5.1	Optische Spektroskopie	33
5.2	FT-IR-Spektroskopie	34
5.2.1	FT-IR-Spektroskopie an [NiFe]-Hydrogenasen	35

5.2.2	Messtechnik	36
5.3	EPR-Spektroskopie	38
5.3.1	Untersuchung eines Übergangsmetallkomplexes	42
5.3.2	Messtechnik	44
6	Röntgenstrukturanalyse	47
6.1	Kristallisation	47
6.2	Kristallgitter	50
6.3	Röntgenbeugung	51
6.4	Methoden zur Phasenbestimmung	55
6.5	Interpretation der Elektronendichtekarte	57
7	Material und Methoden	59
7.1	Material	59
7.2	Laborgeräte	61
7.2.1	Puffer und Lösungen	62
7.2.2	Medien	63
7.3	Methoden	64
7.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	64
7.3.2	SDS-PAGE	65
7.3.3	Herstellung von Gefrierkulturen	66
7.3.4	Indirekte Gesamtzellzahlbestimmung	66
7.3.5	Herstellung von Proteinproben für die Spektroskopie	66
7.3.6	Messparameter cw-EPR	69
7.3.7	Messparameter FT-IR	70
8	Kultivierung von <i>Allochromatium vinosum</i>	73
8.1	1 L und 60 L Vorkulturen	73
8.2	1100 L Hauptkultur	75
8.2.1	Konstruktion des 1100 L Fermenters	76
8.2.2	Ansetzen des Mediums und Animpfen	78
8.2.3	Zellernte	80

8.3	Wachstumskurven	82
8.3.1	60 L Vorkultur	82
8.3.2	1100 L Hauptkultur	83
8.4	Diskussion	84
8.5	Zusammenfassung	87
9	Isolierung und Reinigung der [NiFe]-Hydrogenase	89
9.1	Zellaufbruch	91
9.2	Solubilisierung	93
9.3	Säulenchromatographie	94
9.3.1	Qualitativer Aktivitätstest (H ₂ -Spaltung)	95
9.3.2	Erste Ionen-Austausch-Chromatographie	98
9.3.3	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	100
9.3.4	Erste Gelfiltration	102
9.3.5	Zweite Anionen-Austausch-Chromatographie	103
9.3.6	Zweite Gelfiltration	105
9.4	Bestimmung der Reinheit	106
9.4.1	SDS-PAGE	106
9.4.2	MALDI-TOF-MS	108
9.5	Zusammenfassung	110
10	Spektroskopische Charakterisierung	113
10.1	cw-EPR	114
10.1.1	Ergebnisse	115
10.1.2	Diskussion	117
10.2	FT-IR	122
10.2.1	Ergebnisse und Diskussion	122
10.3	Zusammenfassung	131
11	Röntgenkristallographische Analyse	133
11.1	Kristallisation	135
11.1.1	Ergebnisse	135

11.1.2 Diskussion	141
11.2 Diffraktion	142
11.2.1 Ergebnisse und Diskussion	142
11.3 Prozessierung der nativen Datensätze	144
11.3.1 Ergebnisse	144
11.3.2 Diskussion	151
11.4 Zusammenfassung	155
12 Zusammenfassung und Ausblick	157
13 Abkürzungen	163
Literaturverzeichnis	165

1 Motivation und Zielsetzung

Langfristig gesehen stellt die Verwendung von Wasserstoff als Energiequelle eine nachhaltige Alternative zur Energiegewinnung aus fossilen Brennstoffen dar. Um eine effiziente Nutzung sicherzustellen, müssen jedoch die bestehenden Probleme bei der Herstellung ausreichender Mengen H_2 und bei der Speicherung des produzierten Wasserstoffs gelöst werden. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis von Funktion und strukturellem Aufbau von [NiFe]-Hydrogenasen leisten, um auf Ebene der Grundlagenforschung die Entwicklung der biologischen Wasserstoffproduktion zu unterstützen.

Hydrogenasen können aus phylogenetisch verschiedenen Organismen isoliert werden. Sie gliedern sich aufgrund der Zusammensetzung ihres aktiven Zentrums in unterschiedliche Gruppen: [NiFe]-, [FeFe]- und [Fe]-Hydrogenasen. Allen Enzymen ist die Fähigkeit zur Wasserstoffspaltung bzw. zur Generierung von H_2 aus Protonen und Elektronen gemein. Die Motivation zur Untersuchung wasserstoffumsetzender Proteine aller Spezies beruht darauf, das Grundprinzip dieses Mechanismus zu verstehen und daraus Konstruktionsprinzipien abzuleiten.

Die aus dem Schwefel-Purpurbakterium *Allochromatium vinosum* isolierte Hydrogenase gehört zur Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen. Dieses membrangebundene Enzym ist EPR- und FT-IR-spektroskopisch bereits gut charakterisiert. Es ist den übrigen, in verschiedener Hinsicht gut untersuchten Standardhydrogenasen beispielsweise aus *Ralstonia eutropha*,

Desulfovibrio vulgaris, *Desulfovibrio gigas* oder *Thiocapsa roseopersicina*, funktionell sehr ähnlich.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch röntgenkristallographische Analyse der aus hochreinem Protein gewonnenen Kristalle die erste molekulare Struktur einer [NiFe]-Hydrogenase, isoliert aus einem photosynthetischen Bakterium, zu lösen. Diese Ergebnisse sollen die bisherige funktionelle Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum* auf struktureller Basis ergänzen und mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zu bereits bekannten Kristallstrukturen anderer Hydrogenasen aufzeigen.

Bisher beschränkt sich die röntgenkristallographische Strukturaufklärung auf [NiFe]-Hydrogenasen, welche aus Sulfatreduzierern der Gattung *Desulfovibrio* isoliert wurden. Die Analyse einer Hydrogenase anderen Ursprungs könnte über spezifische Übereinstimmungen oder Abweichungen, insbesondere unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Energiemetabolismus Aufschluss geben. Aus diesem Vergleich ergeben sich möglicherweise generell zu verstehende, organismusunabhängige Konstruktions- oder Funktionsprinzipien.

Um für die Kristallisation bzw. röntgenkristallographische Analyse der [NiFe]-Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum* ausreichende Mengen hochwertigen Materials bereit zu stellen, musste zuvor die Anzucht des bakteriellen Organismus im 1100 L Glasfermenter und die Isolierung und Aufreinigung von kristallisationsfähigem Protein im großen Maßstab etabliert werden.

2 Erneuerbare Energien

Die absehbare Erschöpfung der auf der Erde vorkommenden fossilen Brennstoffe und der weltweit steigende Energiebedarf treiben die Entwicklung alternativer regenerativer und wasserstoffbasierter Technologien zur umweltschonenden Energiegewinnung voran. Die bisherige intensive Nutzung der natürlichen Primärquellen (z. B. Erdöl, Erdgas oder Kohle) führt u. a. zur Anreicherung von Kohlendioxid (CO_2) in der Atmosphäre und zu den Problemen der globalen Erwärmung. Aus Gründen des Klimaschutzes und zur Verzögerung des Treibhauseffekts sollen zukünftig die CO_2 -Emissionen weiter gesenkt werden (Kyoto-Protokoll [1, 2]), was langfristig zu einer Steigerung des Anteils der erneuerbaren Energien in der Energiewirtschaft führen wird. Verknappung und die damit verbundene Verteuerung der limitierten Primärenergiequellen sowie der verstärkte Einsatz von Brennstoffzellen führen grundsätzlich zu einem erhöhten Einsatz regenerativer Energien, darunter auch die Verwendung von Wasserstoff.

2.1 Wasserstoff als Alternative

Molekularer Wasserstoff besitzt das Potential einer nachhaltigen Quelle sauberer Energie, wenn einfache und effiziente Methoden der Produktion, Nutzung und Speicherung entwickelt werden können. Wasserstoff (H_2) besitzt eine hohe massenbezogene Energiedichte, lässt sich prinzipiell speichern, transportieren und lagern. Dadurch kann die Energiegewinnung zeitlich wie räumlich von deren Verbrauch entkoppelt werden. Entspre-

chend einer 2001 im Auftrag der Gesellschaft für Energie und Ökologie durchgeführten Studie kommen drei Märkte für die Nutzung des Wasserstoffs in Frage [3]:

- Kraftstoffmarkt (z. B. Raketentreibstoff in der Raumfahrt, direkter Antrieb von Fahrzeugen im konventionellen Ottomotor)
- Industrierohstoff Wasserstoff (z. B. Ammoniaksynthese, Lebensmittelindustrie, Methanolproduktion)
- Strommarkt durch Verwendung des Wasserstoffs in Brennstoffzellen

Auch der deutsche H₂- und Brennstoffzellen-Verband beschreibt in seiner fachlichen Einführung drei Wirtschaftssparten, die die Bedeutung des Energieträgers Wasserstoff für ihre Zukunft begriffen haben und in diesem Bereich investieren:

- Automobilindustrie
- Stromversorgungsunternehmen
- Heizungsfirmen

Weiterhin werden der sogenannte „4C-Markt“ (Computer, Camcorder, Cordless Phones and Tools) sowie der Freizeitbereich (Camping und Boote) mit Klein- und Kleinstanwendungen aufgeführt [4].

2.2 Brennstoffzellentechnik

Bei der Verwendung von Wasserstoff in einer Brennstoffzelle (BZ) wird durch die Umsetzung von H₂ mit Sauerstoff (O₂) Elektrizität und Wärme erzeugt. Bei dieser Reaktion entsteht Wasser (H₂O) als Endprodukt. Die Grundelemente jeder Brennstoffzelle sind zwei Elektroden, die an einen äußeren Stromkreis angeschlossen und durch einen Elektrolyten verbunden sind. Durch den Elektronenfluss kann die BZ als Stromquelle genutzt werden. An der Anode wird das Brenngas (z. B. Wasserstoff) gespalten.

Die dabei entstehenden Kationen (H^+) wandern durch das Elektrolyt zur Kathode und reagieren mit den dort entstandenen Anionen unter Freisetzung von Wärme zu Wasser. Als Elektrolyt kommen z. B. Polymermembranen, Kalilauge, Schwefelsäure oder feste Keramikmaterialien in Frage. Bei der PEM-Zelle wird eine Folie als Elektrolyt verwendet, die selektiv durchlässig für Protonen ist. Um höhere Spannungen im Vergleich zum Betrieb einer einzelnen BZ zu erreichen, müssen mehrere Zellen in Serie zu „Stacks“ hintereinander geschaltet werden. Der Gesamtwirkungsgrad einer BZ erhöht sich, wenn der Strom und die entstehende Wärme gleichzeitig genutzt werden können. Abbildung 2.1 gibt eine nach Arbeitstemperatur geordnete Übersicht der verschiedenen Brennstoffzelltypen wieder.

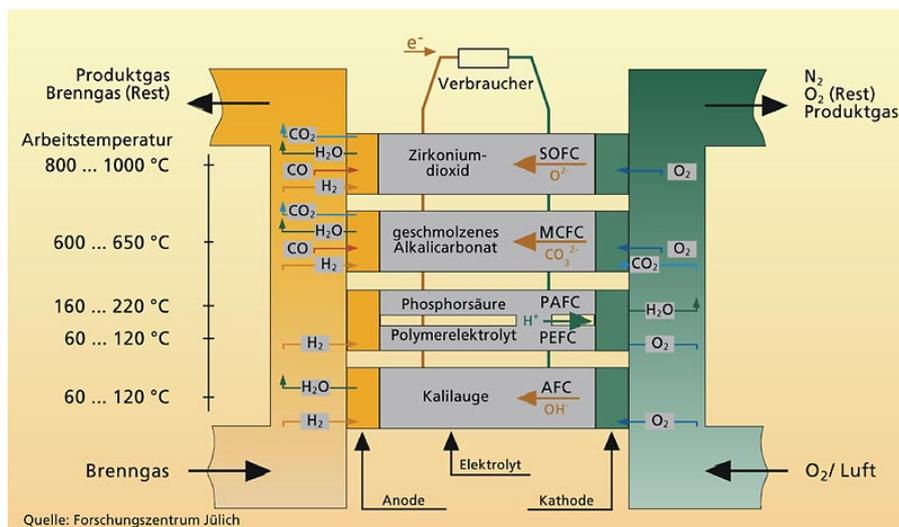


Abbildung 2.1: In Abhängigkeit vom Elektrolyt werden verschiedene Brennstoffzelltypen unterschieden: SOFC = Solid Oxide Fuel Cell, MCFC = Molten Carbonate Fuel Cell, PAFC = Phosphoric Acid Fuel Cell, PEMFC = Proton Exchange Membrane Fuel Cell, AFC = Alkaline Fuel Cell. Als Brenngase können Wasserstoff, reformiertes Erdgas oder reformierte flüssige Kraftstoffe verwendet werden. Als Oxidationsgas dient reiner Sauerstoff oder Luft.

Im BZ-Auto eingebaut, betreibt die Brennstoffzelle einen Elektromotor (Prototypen von Daimler AG, Fiat AG). BMW setzt seit den 70er Jahren auch direkt mit Flüssigwasserstoff betankte Fahrzeuge, bzw. PKWs mit wasserstoffbetriebenen Ottomotoren, ein. Der Einsatz solcher Autos kann

zur Verbesserung der Luftqualität und zu einer Verringerung der Lärmbelastigung durch den Verkehr beitragen. BZ-Omnibusse werden bereits regional im ÖPNV eingesetzt [5]. Prototypen für den Ersatz herkömmlicher Akkus in Mobiltelefonen (z. B. Modell XX25 von UltraCell) oder Laptops (IBM/Sanyo für Thinkpad Notebooks, Casio, NEC) mit portablen Brennstoffzellen mit längerer Betriebsdauer wurden bereits entwickelt. Sie sind aufgrund ihrer hohen Wärmeentwicklung jedoch nicht integriert, sondern nur extern angebracht zu verwenden und sind noch nicht kommerziell erhältlich. Stationäre BZ-Systeme zur Wärme- und Stromversorgung von Wohnhäusern werden getestet (RWE, Siemens, Vaillant). Bereits kommerziell erhältlich sind tragbare DMFC-Brennstoffzellen, die als Ladegeräte in unterschiedlichsten Bereichen zur Anwendung kommen (EFFOY-Modelle der SmartFuelCell AG).

2.3 Wasserstoffgewinnung und -speicherung

Nach heutigem Stand der Technik ist das Problem der Wasserstoffnutzung dessen Produktion und Speicherung. Da er nicht als natürliche Ressource vorkommt, muss er künstlich hergestellt werden. Die Umweltfreundlichkeit, gemessen anhand der CO₂-Entstehung, von Wasserstoff hängt maßgeblich vom Einsatz des zu seiner Herstellung verwendeten Primärenergie-trägers ab. Eine Vielzahl konventioneller (z. B. Erdöl, Erdgas, Kernspaltung) und erneuerbarer Energiequellen (z. B. Windkraft, Biogas, Photovoltaik) können zu seiner Herstellung verwendet werden. Diese Vielfalt erhöht die Energieversorgungssicherheit. Die technische Herstellung des Wasserstoffs erfordert derzeit mehr Energie, als später aus ihm gewonnen werden kann, und ist ineffizient, wenn Primärenergie verwendet wird. Wasserstoff entsteht größtenteils als Neben- oder Koppelprodukt in Prozessen der chemischen Industrie und wird auch von dieser selbst in anderen Prozessen wieder verbraucht (z. B. Petrochemie). Im industriellen Maßstab wird H₂ gegenwärtig durch Reformierung wasserstoffhaltiger Gase, z. B. Erdgas,

also unter Verbrauch fossiler Rohstoffe bei zusätzlicher CO₂-Emission, gewonnen.

Das Verfahren zur Wasserstoffgewinnung, welches heute z. B. in Verbindung mit Windkraft praktische Bedeutung hat, ist die alkalische Elektrolyse von reinem Wasser. Dabei wird unter Stromverbrauch H₂O in H₂ und O₂ gespalten. Allerdings ist auch der Energieverbrauch zur Aufbereitung des verwendeten Wassers (Meerwasserentsalzung), zur Nachreinigung und Verflüssigung des erzeugten Gases zu berücksichtigen.

Soll Wasserstoff als Kraftstoff eingesetzt werden, ist das Problem seiner geringen volumenbezogenen Energiedichte (Energiegehalt pro Volumeneinheit) zu lösen. Um mit den Energiedichten z. B. von Dieselmotoren zu konkurrieren, ist man bestrebt, die volumetrische Energiedichte zu erhöhen. Eine längerfristige Lagerung ist aufgrund des hohen Diffusionskoeffizienten nur im flüssigen Zustand bei -253 °C in speziellen wärmeisolierten Kryobehältern oder komprimiert bei 250-700 bar in Hochdruckbehältern möglich. Als weitere Speichermethode kommen Metallhydride in Frage. Diese gelten als außerordentlich sicher, besitzen allerdings ein sehr hohes Gewicht. Speicherart und Verwendungszweck müssen entsprechend aufeinander abgestimmt sein, um Wasserstoff sinnvoll und effektiv als Kraftstoff zu verwenden.

2.4 **Biologische Wasserstoffproduktion**

Eine mögliche Alternative zu den oben genannten Verfahren der Wasserstoffgewinnung ist die biologische Wasserstoffproduktion. Mit Hilfe des Sonnenlichts als Energiequelle und des in großen Mengen vorkommenden Rohstoffs Wasser in Kombination mit den katalytischen Eigenschaften bestimmter Enzymkomplexe, der Hydrogenase und des Photosystems II, kann Wasserstoff, unter Vermeidung der Entstehung problematischer Nebenprodukte, hergestellt werden. Abbildung 2.2 verdeutlicht diesen Zusammenhang, die Biophotolyse von Wasser, schematisch.

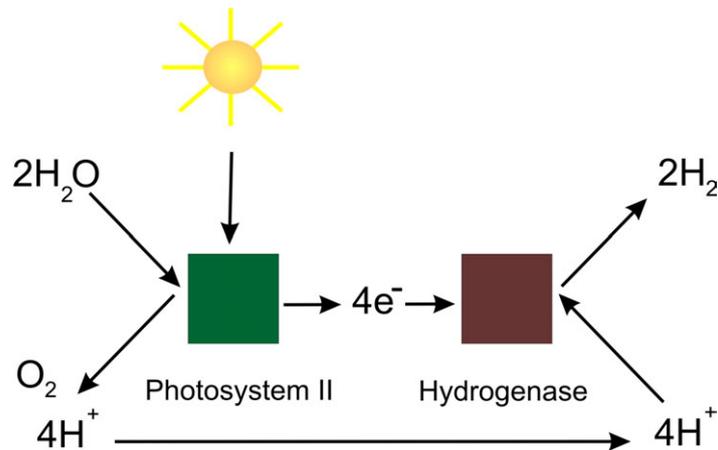


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Biophotolyse von Wasser. Die vom Photosystem II gelieferten Protonen und Elektronen werden von Hydrogenasen zu Wasserstoff umgesetzt (Abbildung nach [6]).

Hydrogenasen (H_2 asen) sind in der Lage sowohl die Oxidation von Wasserstoff als auch die Reduktion von Protonen (H^+) zu molekularem H_2 zu katalysieren. Bei der Photosynthese liefert das Photosystem II (PSII), durch Oxidation von Wasser unter Nutzung der Sonnenenergie Protonen, Elektronen (e^-) und Sauerstoff. Die vom PSII produzierten Protonen und Elektronen können von der Hydrogenase wiederum zu molekularem Wasserstoff umgesetzt werden. H_2 asen können aus einer Vielzahl verschiedener Bakterien, z. B. dem photosynthetischen Schwefel-Purpurbakterium *Allochromatium vinosum* oder dem sulfatreduzierenden Bakterium *Desulfovibrio vulgaris*, isoliert werden. PSII kann aus Algen (z. B. *Chlamydomonas reinhardtii*) oder höheren Pflanzen, z. B. Spinat (*Spinacia oleracea*), gewonnen werden.

Beide Proteine kommen allerdings in keinem bekannten Organismus auf die oben beschriebene Weise miteinander gekoppelt vor. Sie stellen unabhängige Systeme zur Energiegewinnung innerhalb der Zellen dar. Die molekularbiologische Herstellung einer Alge oder eines Bakteriums (z. B. der Gattung *Synechocystis*), die ein wasserspaltendes und gleichzeitig wasserstoffproduzierendes System aus PSII und H_2 asen beinhaltet, ist erforder-

derlich. Allerdings ist eine simple Kombination beider Enzymkomplexe innerhalb eines Kompartiments der Prokaryoten nicht möglich, da alle bisher bekannten Hydrogenasen sauerstoffempfindlich sind und dadurch in ihrer Funktion blockiert werden. Geringere Sauerstoffempfindlichkeit geht mit einer verminderten Aktivität oder Effizienz der H₂asen einher.

Weitere Ansätze zur Gewinnung von „Biowasserstoff“ befassen sich mit der in verschiedenen Mikroorganismen vorkommenden *in vivo* Wasserstoffentstehung bei bestimmten Stoffwechselprozessen. Hierbei wird zwischen direkter Photolyse, indirekter Biophotolyse, Fermentation in Dunkelheit und Photofermentation unterschieden [7, 8].

Bei der direkten Photolyse wird die Fähigkeit der Grünalgen oder Cyanobakterien, photosynthetisch Wasser zu spalten, und die daran gekoppelte H₂-Produktion über Hydrogenasen oder Nitrogenasen ausgenutzt. Um ausreichend Energie zu gewinnen, ist die Anwendung großer Bioreaktoren notwendig. Niedrige Lichtintensitäten und ein geringer Sauerstoffpartialdruck haben sich hierbei als optimale Bedingungen herausgestellt [9]. Der geringe O₂-Partialdruck ist deshalb von Vorteil, da die durch H₂asen oder Nitrogenasen katalysierten Reaktionen durch Sauerstoff inhibiert werden. Um diesem Problem der Blockierung durch O₂ zu begegnen, werden Möglichkeiten zur Steigerung von Respirationsrate und Sauerstofftoleranz der relevanten Metalloenzyme untersucht [10, 11].

Bei der indirekten Biophotolyse [8] sind Sauerstoff- und Wasserstoffproduktion zeitlich getrennt. Zunächst erfolgt ein photosynthetischer Schritt, indem Biomasse erzeugt wird. Die entstandene Biomasse wird in einem weiteren anaerob und in Dunkelheit stattfindenden Schritt, einem fermentativen Prozess, zur H₂-Erzeugung genutzt. Auf diese Weise kann die Inhibierung der durch sauerstoffempfindliche Hydrogenasen bzw. Nitrogenasen katalysierten Reaktionen umgangen werden. In den meisten Fällen werden Grünalgen, z. B. *Chlamydomonas reinhardtii* (*Ch. reinhardtii*), verwendet, die photoautotroph große Mengen Kohlenhydrate herstellen und einla-

gern können. Zudem hat sich gezeigt, dass bei *Ch. reinhardtii* eine Trennung von photosynthetischer O₂-Entwicklung und Wasserstoffproduktion erreicht werden kann, indem die Zellen unter Schwefelmangel-Bedingungen angezogen werden [12, 13].

Bei lichtunabhängigen, mikrobiellen fermentativen Prozessen [14] kann nicht nur Biomasse verwendet werden, die bei photoautotrophen Prozessen in Algen oder höheren Pflanzen entstanden ist, sondern auch Biomasse, die aus anderen fermentierbaren Substraten erzeugt wurde. In den meisten Fällen wird der Wasserstoff hauptsächlich beim anaeroben Metabolismus des Pyruvats frei, welches wiederum bei katabolischen Prozessen verschiedener Substrate entsteht. Von Vorteil ist die Möglichkeit der Verwendung von organischem Abfall als Substrat der fermentativen Mikroorganismen, allerdings ist die Menge des produzierten Wasserstoffs gering und CO₂ entsteht als Co-Produkt.

Für die Gewinnung von Wasserstoff durch Photofermentation werden photosynthetische Bakterien verwendet. Diese betreiben anaerobe Photosynthese, wodurch automatisch die Schwierigkeiten durch Inhibierung der H₂-produzierenden Enzyme durch O₂ entfallen. Allerdings nutzen diese Bakterien bevorzugt Nitrogenasen als H₂-Katalysatoren, welche langsam arbeiten und einen hohen Energieaufwand erfordern. Der Ersatz der Nitrogenase beispielsweise durch eine bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase in einem genetisch modifizierten Organismus macht die biologische Wasserstoffgewinnung durch Photofermentation interessant. Auch die Kombination von Fermentation organischer Abfälle und die gleichzeitige Wasserstoffproduktion sind vorteilhaft. Allerdings schränken die geringe Effizienz bei der Nutzung der Sonnenenergie (Anpassung der Bakterien an Schwachlichtbedingungen durch natürlichen Lebensraum bedingt) und die Notwendigkeit von aufwändigen, großflächigen anaeroben Photobioreaktoren deren Verwendung ein.

Um effizient auf eine der oben beschriebenen Weisen biologisch Was-

serstoff zu gewinnen, ist ein detailliertes Verständnis von Funktion, Inaktivierungsmechanismen und die Kenntnis der Struktur der Schlüsselenzymkomplexe, der Hydrogenasen, Voraussetzung. Zusätzlich ist das Wissen über deren genetische Kodierung und Maturierungsprozesse notwendig, um molekularbiologisch z.B. sauerstoffinsensitive Mutanten herzustellen oder um das Protein zur Überexpression zu bringen.

3 Der bakterielle Organismus

Allochromatium vinosum

3.1 Lebensraum

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Organismus *Allochromatium vinosum* (*A. vinosum*) handelt es sich um einen photosynthetischen, obligat anaerob lebenden Prokaryoten [15], dessen natürlicher Lebensraum die untere, sauerstoffarme aber noch ausreichend belichtete Zone eines Gewässers darstellt. Es handelt sich um teilweise gewundene, stäbchenförmige Zellen von etwa 2-3 μm Größe mit monopolarer, polytricher Begeißelung. Bereits 1919 wurde das massenhafte Vorkommen der Bakterien in den schwefelwasserstoffführenden Schichten des Rotsees bei Luzern beschrieben [16]. Die Bakterien färbten das Wasser in einem hellroten Ton. Die festgestellte Ähnlichkeit mit rotem Wein wurde in der Namensgebung aufgegriffen. Er bedeutet soviel wie „Die Farbe des Weines“.

Das in Abbildung 3.1 dargestellte Ökosystem „See“ kann jahreszeitenabhängig in unterschiedliche Bereiche gegliedert werden. In der oberen mit ausreichend Licht versorgten Schicht (Epilimnion) leben hauptsächlich Primärproduzenten wie z.B. aerobe Bakterien, Algen (z.B. Gattung *Chlorella*) oder Cyanobakterien (z.B. Gattung *Anabaena*), die oxigene Photosynthese betreiben. Durch die fehlende Durchmischung im Sommer herrscht unterhalb der Sprungschicht (Metalimnion) Sauerstoffmangel. Dieser Zustand wird als Sommerstagnation bezeichnet. Dort wird

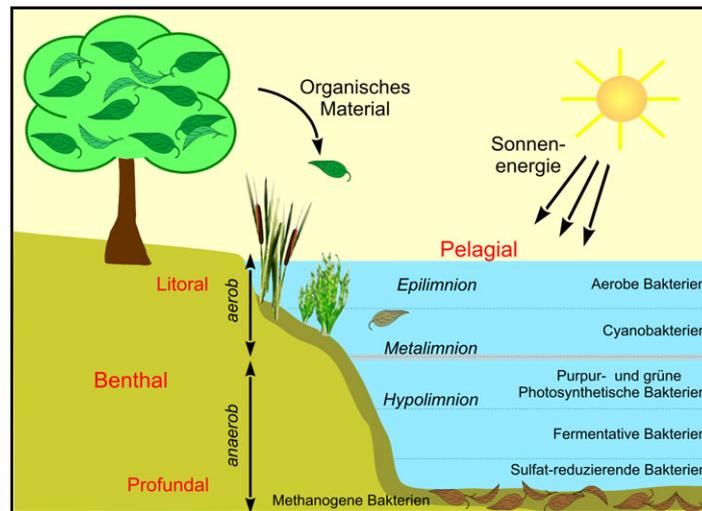


Abbildung 3.1: Topographisch wird das Ökosystem „See“ in Pelagial (Freiwasserzone) und Benthal (Bodenzone) gegliedert, wobei die Bodenzone weiterhin in Litoral (Uferzone) und Profundal (Tiefenzone) aufgeteilt wird. Während der Sommerstagnation tritt aufgrund abiotischer Faktoren eine Schichtung innerhalb des Sees auf, wobei zwischen Epilimnion (durchmischte, lichtgesättigte Deckschicht), Metalimnion (Sprungschicht) und Hypolimnion (sauerstoffarme, dunkle Tiefenschicht) unterschieden wird. Während der Zirkulationsphasen im Frühjahr und Herbst ist diese Schichtung aufgehoben. Aufgrund biotischer Faktoren wird das Epilimnion auch als trophogene Zone (O_2 -Produktion durch Photosynthese überwiegt gegenüber dem O_2 -Verbrauch durch Atmung) und das Hypolimnion als tropholytische Zone (keine O_2 -Produktion, hauptsächlich anaerobe Organismen) bezeichnet (Abbildung verändert nach [17]).

organische Materie, z. B. abgestorbene Primärproduzenten, von extern eingebrachtes organisches Material wie Blätter oder Aas, abgebaut, wobei Wasserstoff (H_2), Schwefelwasserstoff (H_2S), Kohlenstoffdioxid (CO_2) und andere Produkte entstehen. Beispielsweise erzeugen sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* Schwefelwasserstoff. Methanogene Bakterien (z. B. Gattung *Methanococcus*) reduzieren u. a. CO_2 mit H_2 zu Methan. Anaerobe photosynthetische Bakterien wie das Schwefel-Purpurbakterium *A. vinosum* oder das grüne Bakterium *Chlorobium tepidum* sind hauptsächlich an der Sprungschicht zu finden, dort wo H_2S , CO_2 und ausreichend Licht zur Verfügung stehen. Phototrophe Bakterien können mit CO_2 als einziger Kohlenstoffquelle, also autotroph, wachsen

(Photoautotrophie). Alternativ sind einige dieser Bakterien dazu in der Lage, statt CO₂ organische Substrate als Kohlenstoffquelle zu verwerten und einen heterotrophen Stoffwechsel (photoheterotrophe Lebensweise) zu betreiben.

3.2 Bakterielle Photosynthese

Bei der bakteriellen anoxygenen Photosynthese findet im Gegensatz zur oxigenen Photosynthese keine Wasserspaltung statt und es entsteht kein Sauerstoff als Nebenprodukt. Die unterschiedlichen Photosynthese betreibenden, bakteriellen Organismen werden aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften, z. B. der Organisation des Photosyntheseapparates, Verwertbarkeit reduzierter Schwefelverbindungen oder des Homologiegrads der 16S rRNA, unterteilt in:

- Schwefel-Purpurbakterien (Chromatiaceae)
- Nicht-Schwefel-Purpurbakterien (Rhodospirillaceae)
- Grüne Schwefelbakterien (Chlorobiaceae)
- Grüne Bakterien (Chloroflexaceae)

1998 wurde von Imhoff *et al.* eine Reklassifizierung innerhalb der Familie der Chromatiaceae vorgenommen, welche unter anderem zu einer Umbenennung der Art *Chromatium vinosum* zu *Allochromatium vinosum* führte [18]. Im Folgenden ist die Systematik des Bakteriums dargestellt:

Domäne	Bacteria
Stamm	Proteobacteria
Klasse	γ -Proteobacteria
Ordnung	Chromatiales
Familie	Chromatiaceae
Gattung	<i>Allochromatium</i>
Art	<i>Allochromatium vinosum</i>

Alle oben genannten Familien gehören dem gramnegativen Typ an, die, im Gegensatz zu den grampositiven Bakterien, eine einschichtige Zellwand aus Peptidoglycan (Murein) und eine zusätzliche äußere Membran besitzen. Deren intracytoplasmatische Membranen, die Chromatophore, stehen mit der inneren Cytoplasmamembran in Verbindung.

Der membrangebundene Photosyntheseapparat ist in den Chromatophoren lokalisiert, besitzt im Gegensatz zu höheren Pflanzen, Algen oder Cyanobakterien nur ein Photosystem und dient ausschließlich der Energietransformation. Er ist an die Niedriglichtbedingungen, die an der Sprungschicht vorliegen, optimal angepasst. Der Komplex setzt sich aus Lichtsammel- oder Antennensystemen, dem photochemischen Reaktionszentrum (bakterielles Reaktionszentrum), der Chinon-Cytochrom *b/c*-Oxidoreduktase, den in der Membran beweglichen Elektronenüberträgern und der ATPase zusammen. Das Antennensystem der Schwefel- und Nicht-Schwefel-Purpurbakterien besteht aus membrangebundenen Protein-Pigmentkomplexen, die hauptsächlich Bakteriochlorophyll (BChl) und Carotinoide enthalten. Bis auf wenige Ausnahmen ist BChl_a das typische Chlorophyll dieser Bakteriengruppe. *A. vinosum* besitzt ausschließlich BChl_a. Durch die Energie eines Excitons wird ein Elektron im Reaktionszentrum angeregt, d. h. auf ein höheres Niveau gehoben. Über eine Elektronentransportkette gelangt das Elektron wieder zum primären Elektronendonator zurück. An diesen cyclischen Elektronenfluss ist der Transport von Protonen aus dem intrazellulären Raum durch den Cytochrom *b/c*-Komplex in den Extrazellularraum gekoppelt. So wird ein elektrochemisches Potential in Form eines Protonengradienten aufgebaut, welches für die ATP-Synthese genutzt wird (cyclische Photophosphorylierung).

Anstelle des Wassers können von phototrophen Bakterien verschiedene reduzierte anorganische Verbindungen wie Sulfide, Schwefel oder Wasserstoff als primäre Elektronendonoren zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten verwendet werden. Schwefel-Purpurbakterien oxidieren

z. B. Schwefelwasserstoff (H_2S), Wasserstoff oder Thiosulfat zur Regenerierung von Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamidadenindinukleotid (NADH). Der bei der Photosynthese gebildete molekulare Schwefel wird in globulärer Form innerhalb der Zellen gespeichert, weiter über Sulfit zu Sulfat oxidiert oder ausgeschieden. Die an der cytoplasmatischen Membran assoziierte [NiFe]-Hydrogenase (H_2 ase) aus *A. vinosum* dient einerseits zur Fixierung überschüssiger Elektronen bzw. Protonen z. B. in Form von H_2 oder ermöglicht andererseits durch die Oxidation von Wasserstoff die Herstellung von Reduktionsäquivalenten oder ist am Aufbau eines Protonengradienten beteiligt. H_2 asen spielen somit eine wesentliche Rolle im Energiemetabolismus bakterieller Organismen.

Um Grundlagen der Funktion und Struktur bestimmter Proteine zu untersuchen, in diesem Fall der [NiFe]-Hydrogenase, werden diese in ausreichender Menge benötigt. Am einfachsten ist es, sie aus Bakterien zu gewinnen, die mit geringem Aufwand zu kultivieren sind und viel Material liefern. Dazu werden die Organismen, häufig Bakterien, Algen oder Cyanobakterien im Labor unter definierten Bedingungen gezüchtet.

3.3 Kultivierung

Die Arbeit mit Wildtyp-Bakterien (genetisch unverändert) oder molekularbiologisch veränderten bakteriellen Organismen ist u. a. deshalb vorteilhaft, da Bakterien mit vergleichsweise kurzen Generationszeiten schnell zu einer ausreichend großen Menge homogenen Ausgangsmaterials führen. Besitzt das zu isolierende Protein einen geringen Expressionsgrad, ist viel Zellmasse notwendig, um einige Mikro- bis Milligramm hochreines Protein zu erhalten.

Eine Bakterienkultur wächst, wenn eine Zunahme von Anzahl und Masse der Zellen zu beobachten ist. Es gibt verschiedene Methoden zur Zellzahlbestimmung. Bei der Ermittlung der Gesamtzellzahl werden alle Organismen, inklusive toter und geschädigter Zellen, berücksichtigt. Die

hier angewendete einfache und praktikable, allerdings indirekte Methode der Zellzahlbestimmung ist die spektroskopische Messung der Extinktion bzw. der Streuung einer Zellsuspension. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Messwert, der optischen Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge (600 nm), und der Zellmasse. Die graphische Darstellung der Entwicklung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit wird Wachstumskurve genannt. Während ihres Wachstums durchlaufen Bakterien verschiedene Stadien. Abbildung 3.2 stellt eine idealisierte Wachstumskurve dar, in der die ermittelte Zellzahl gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die unterschiedlichen Wachstumsphasen sind entsprechend markiert und werden im Folgenden erläutert.

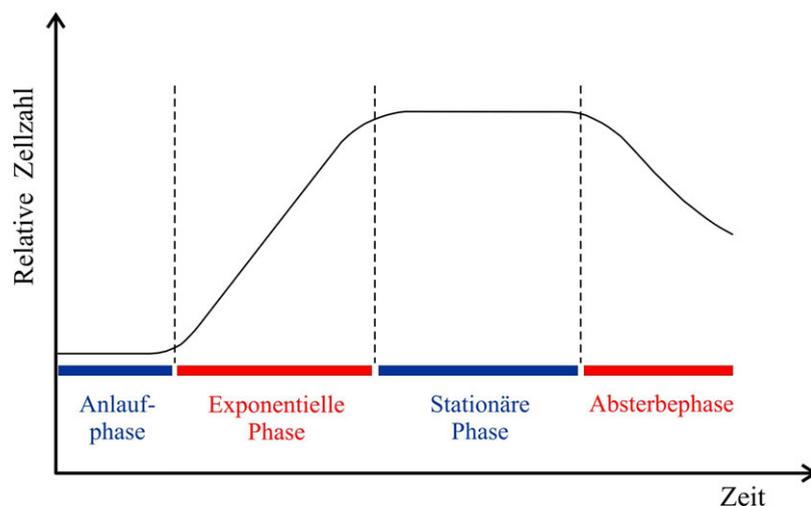


Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der unterschiedlichen Phasen des bakteriellen Wachstums in einer idealen Wachstumskurve (Abbildung verändert nach [19]).

- **Anlaufphase:** Zeitintervall zwischen Inokulation des Ansatzes und maximaler Teilungsrate, Anpassung an neue Stoffwechselsituation. Die Dauer der Anlaufphase ist vom Alter der Vorkultur und von der Nährlösung abhängig. Die Anpassung an das neue Medium erfordert beispielsweise die Neusynthese von Enzymen, die in der Vorkultur nicht benötigt wurden. Befindet sich die Kultur, mit der angeimpft

wird, bereits in der stationären Phase, erfolgt zunächst die RNA-, Ribosom- bzw. Enzymsynthese.

- **Exponentielle Phase:** Die Zellen besitzen eine konstante minimale Generationszeit, die für jede Art spezifisch ist. Die Entstehung neuer Zellen erfolgt deutlich schneller als das Absterben. Die Generationszeit kann während der exponentiellen Wachstumsphase variieren, wenn sich das umgebende Milieu verändert. Sich verändernde Faktoren sind z. B. die abnehmende Substratkonzentration, die Zunahme der Zelldichte oder die Anreicherung von Stoffwechselprodukten.
- **Stationäre Phase:** In dieser Phase findet kein Zellwachstum statt. Die maximale Populationsdichte ist erreicht. Es besteht Substratbegrenzung, sobald sich ein Faktor der Nährlösung im Minimum befindet. Hemmende oder toxische Stoffwechselprodukte sammeln sich an. Die Wachstumsrate der Zellen ist herabgesetzt. Absterben und Entstehung neuer Zellen halten die Waage.
- **Absterbephase:** In dieser Phase kommt es zur Auflösung (Lyse) der Zellen. Das Absterben überwiegt gegenüber der Entstehung neuer Zellen.

Die Bakterienkultur wird gegen Ende der exponentiellen Phase geerntet, wenn die maximale Populationsdichte lebender Zellen erreicht ist. Weitere mikrobiologische Grundlagen sind in entsprechenden Lehrbüchern nachzulesen [19, 20].

Im Labor wird *A. vinosum* in einem Glasfermenter als statische Kultur angezogen. Das Medium, in dem die Zellen wachsen, setzt sich aus einer Vielzahl gelöster Salze, insbesondere Natriumcarbonat (Na_2CO_3) und Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) zusammen. Es findet keine Zufuhr von Nährstoffen oder Abfuhr von Stoffwechselprodukten während der Dauer einer Zellkultur statt. Durch in Intervallen erfolgende flüssig-flüssig Überimpfungen in frisches Medium wird dem Wachstum von Begleitorganismen

vorgebeugt und der Ansatz schrittweise vergrößert. Es ist davon auszugehen, dass bei einer homogenen Bakteriensuspension alle Zellen identisch sind.

4 Hydrogenasen

4.1 Klassifizierung der Hydrogenasen

Gegenstand dieser Arbeit ist das hoch spezialisierte globuläre Metalloprotein, die [NiFe]-Hydrogenase. Es ist ein Enzym, dem eine zentrale Rolle im Wasserstoffmetabolismus vieler prokaryotischer Mikroorganismen zukommt. Hydrogenasen katalysieren sowohl die heterolytische Spaltung von molekularem Wasserstoff als auch im umgekehrten Prozess dessen Generierung aus Elektronen und Protonen entsprechend der Gleichung:



Die Oxidation des Wasserstoffs ermöglicht die Herstellung starker Reduktionsäquivalente wie NADH, NADPH oder FADH₂, baut einen Protonengradienten auf oder dient zur Fixierung überschüssiger Elektronen. Das Protein ist somit direkt am Energiestoffwechsel des Organismus beteiligt.

Enzyme werden aufgrund der von ihnen katalysierten Reaktionen klassifiziert. Die in dieser Arbeit untersuchte Hydrogenase gehört auf Empfehlung der Enzyme Commission [21] zur Enzymklasse EC 1, der Oxidoreduktasen, bzw. EC 1.12, der Oxidoreduktasen, die Wasserstoff umsetzen. Sie können aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronenakzeptoren, beispielsweise NAD/NADP (EC 1.12.1), Cytochrom (EC 1.12.2) oder Coenzym F₄₂₀ (EC 1.12.98.1), in weitere Gruppen gegliedert werden. Hydrogenasen der *Desulfovibrio* Arten interagieren *in vivo* mit Cytochrom c₃

(EC 1.12.2.1). Im Falle der Gattung *Allochromatium* ist der Elektronenakzeptor bisher nicht bekannt.

Die jeweilige Zusammensetzung des aktiven Zentrums der Hydrogenasen (H_2 asen) ergibt weitere Klassifizierungsmöglichkeiten. Üblicherweise werden [NiFe]-, [FeFe]- und [Fe]-Hydrogenasen unterschieden. Diese drei Enzymtypen sind phylogenetisch nicht verwandt, weisen jedoch eine Gemeinsamkeit auf: Das Eisenatom im aktiven Zentrum besitzt immer Cyanid und CO oder nur CO als natürliche Liganden, vermutlich aufgrund konvergenter Evolution. Das zeigt, dass der katalytische Mechanismus der Wasserstoffumsetzung der verschiedenen Hydrogenaseklassen ähnlich sein muss und die Erkenntnisse aus der Untersuchung einer bestimmten Hydrogenase auf andere übertragbar ist.

Die Hydrogenase aus *A. vinosum* ist der zahlenmäßig größten Klasse den [NiFe]- H_2 asen zuzuordnen. Diese Enzyme besitzen ein aktives Zentrum bestehend aus einem Ni- und einem Fe-Atom und drei [FeS]-Cluster. Die [NiFeSe]- H_2 asen sind als Untergruppe dieser Klasse zu verstehen, bei denen ein das katalytische Zentrum koordinierendes Cystein durch ein Selenocystein ersetzt ist [22, 23, 24]. Bei den zweiatomigen Liganden des Eisens handelt es sich um ein CO- und ein Cyanidmolekül. Der strukturelle Aufbau wird in Abschnitt 4.2 ausführlich behandelt.

Das aktive Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen (H-Cluster) besteht aus einem binuklearen [FeFe]-Zentrum welches über Cysteine an einen [4Fe4S]-Cluster gebunden, und an das Protein assoziiert ist [25]. Jedes Eisenatom besitzt jeweils einen Cyanid- und einen CO-Liganden. Ein weiterer CO-Ligand verbindet beide Fe-Atome. [FeFe]-Hydrogenasen sind meist Monomere, die stark in ihrer Größe variieren.

Die [Fe]-Hydrogenasen besitzen keine Eisen-Schwefelcluster und kein Nickel. Allerdings hängt dessen Aktivität von einem eisenhaltigen Kofaktor ab [26, 27, 28, 29]. [Fe]- bzw. Eisen-Schwefelclusterfreie Hydrogenasen katalysieren in methanogenen Bakterien die reversible Redukti-

on von methenyl- H_4MPT^+ mit H_2 zu methylen- H_4MPT . Aufgrund dessen werden sie auch als H_2 -bildende Methylen-tetrahydromethanopterin-dehydrogenase, abgekürzt Hmd, bezeichnet. FT-IR-spektroskopische Messungen haben gezeigt, dass das Eisenatom des Kofaktors zwei CO-Liganden koordiniert [30]. Anhand der 2006 veröffentlichten Struktur des heterolog exprimierten [Fe]- H_2 -ase-Apoenzym aus *Methanocaldococcus jannaschii* (Auflösung 1,75 Å) und *Methanopyrus kandleri* (Auflösung 2,4 Å) [26, 28] konnte sowohl die mögliche Bindestelle des Substrats methenyl- H_4MPT^+ als auch der mögliche Ligand des eisenhaltigen Kofaktors (Cystein176, *M. jannaschii* Nummerierung) identifiziert werden.

Häufig wird auch aufgrund des Vorkommens im Organismus, bzw. der physiologischen Funktion in membrangebundene Hydrogenasen (MBH), in lösliche Hydrogenasen (SH) oder regulatorische Hydrogenasen (RH) unterschieden. Es ist beispielsweise eine sauerstofftolerante [NiFe]-Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* identifiziert worden [31], die physiologisch als „ H_2 -Sensor“ dient und bei Anwesenheit von Wasserstoff die Biosynthese der hauptsächlich wasserstoffoxidierenden Hydrogenasen vermittelt. Die verschiedenen Hydrogenasen sind sowohl im Periplasma als auch im Cytoplasma in gelöster oder membrangebundener Form zu finden.

Die membrangebundene [NiFe]- H_2 -ase des photosynthetischen Schwefel-Purpurbakteriums *A. vinosum* gehört, wie eine Vielzahl anderer gut untersuchter Hydrogenasen, zu den sogenannten Standardhydrogenasen, die sowohl aus biochemischer und spektroskopischer Sicht deutliche Übereinstimmungen aufweisen als auch strukturell vergleichbar sind. Ähnlichkeiten der Gen- bzw. Aminosäuresequenzen der einzelnen Proteine bestätigen auf molekularbiologischer Ebene die funktionelle, bzw. strukturelle Klassifizierung. Zu den Standardhydrogenasen gehören z.B. die [NiFe]-Hydrogenasen der anaeroben, sulfatreduzierenden Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* (*Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas*), der

aeroben „Knallgasbakterien“ (*Ralstonia eutropha*) oder aus photosynthetischen Bakterien (*Thiocapsa roseopersicina*).

4.2 Struktureller Aufbau

Mit Hilfe der bisher bekannten Röntgenstrukturen und nicht zuletzt mit den Erkenntnissen aus den aktuell veröffentlichten hochaufgelösten Kristallstrukturen der [NiFe]-Hydrogenase im oxidierten Zustand Ni-A (PDB-Eintrag: 1WUI; Auflösung 1,04 Å) bzw. Ni-B (PDB-Eintrag 1WUJ; Auflösung 1,40 Å) aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (*D. vulgaris* MF) [32] sind aufgrund funktioneller und spektroskopischer Übereinstimmungen mit den Standardhydrogenasen detaillierte, generell zu verstehende Aussagen zur Struktur der [NiFe]-Hydrogenasen möglich.

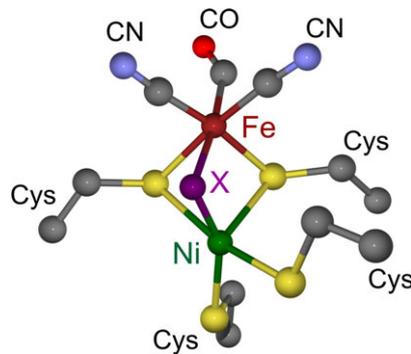


Abbildung 4.1: Darstellung des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase. Das Nickelatom ist über vier Cysteine an das Protein gebunden. Zwei der Cystein-Schwefelbindungen koordinieren ebenfalls das Eisenatom und bilden auf diese Weise eine Brücke zwischen beiden Atomen. Ein dritter möglicher Brückenligand ist mit einem X gekennzeichnet. Das Eisenatom besitzt seinerseits drei weitere Liganden, ein CO- und zwei CN^- -Moleküle.

Die [NiFe]-Hydrogenase ist ein Heterodimer und besteht mit einem Molekulargewicht von insgesamt ca. 90000 Dalton (Da) aus einer großen α - (ca. 45-70 kDa) und einer kleinen β -Untereinheit (ca. 30-35 kDa). Das katalytische Zentrum ist in der großen Untereinheit lokalisiert und wird von einem heterobimetallischen Komplex aus Nickel und Eisen gebildet.

Das Ni-Atom wird von vier Cystein-Schwefelatomen koordiniert und ist dadurch an das Protein gekoppelt. Zwei dieser Bindungen koordinieren ebenfalls das Fe-Atom und formen auf diese Weise eine Brücke zwischen beiden Atomen. Chemische und Infrarot-spektroskopische Analysen zeigen, dass das Fe-Atom weiterhin drei anorganische Liganden, ein CO- und zwei CN^- -Moleküle, besitzt [33, 34, 35]. Zusätzlich hat das Protein im oxidierten Zustand einen weiteren Liganden zwischen beiden Metallen, den sogenannten Brückenliganden. Dieser wird bei Reduktion des Enzyms mit H_2 freigesetzt und unterscheidet sich je nach Redoxzustand. Die Frage nach der Natur der Brückenliganden jedes einzelnen Redoxzustandes konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Abbildung 4.1 verdeutlicht den strukturellen Aufbau des aktiven Zentrums stark schematisiert.

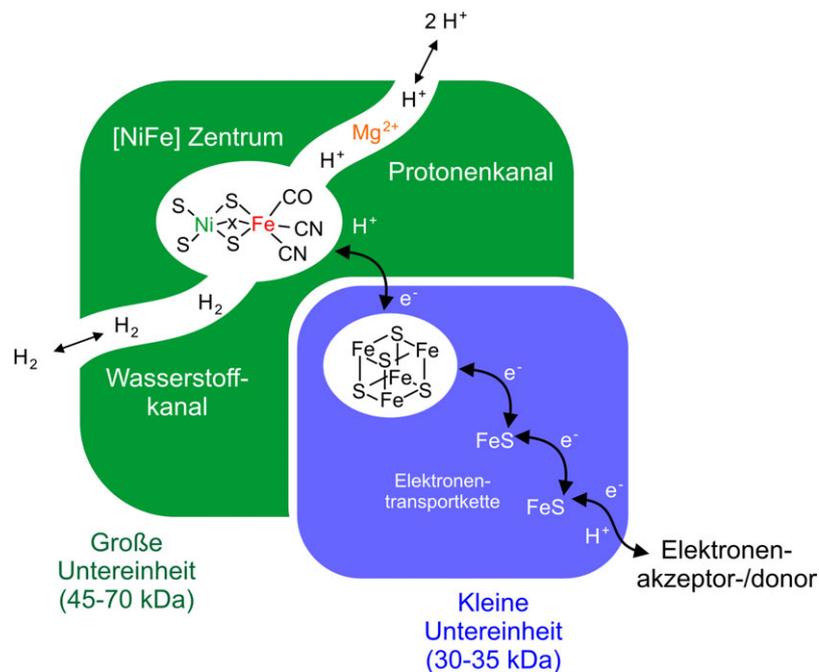


Abbildung 4.2: Vereinfachte schematische Darstellung beider Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenase. Der Protonenkanal in der großen Untereinheit und der in der kleinen Untereinheit lokalisierte Elektronentransportweg über die [FeS]-Zentren sind angedeutet (Abbildung verändert nach [36]).

Die kleine Untereinheit beinhaltet drei Eisen-Schwefelcluster, die den Elektronentransfer vom und zum aktiven Zentrum durch das Protein vom

bzw. zum nativen Elektronenakzeptor bzw. -donor ermöglichen. Der proximale Cluster ist dem aktiven Zentrum zugewandt, während der distale Cluster nah an der Proteinoberfläche liegt. Bei beiden handelt es sich um ein [4Fe4S]-Zentrum. Der mittig dazwischen liegende Komplex ist häufig ein [3Fe4S]-Zentrum. Die bei der Spaltungsreaktion entstehenden Protonen werden über H^+ -Kanäle durch die Proteinmatrix an die Umgebung abgegeben. Resultiert daraus ein Protonengradient, kann dieser beispielsweise von einer ATP-Synthase direkt zur Energiegewinnung genutzt werden. Neben dem Ni und dem Fe ist ein weiteres Metallion identifiziert worden, welches in der großen Untereinheit lokalisiert ist. Es handelt sich um ein Magnesium (Mg^{2+}), welches ebenfalls am Protonentransport durch das Protein beteiligt ist [37, 38]. Abbildung 4.2 stellt vereinfacht den Aufbau beider [NiFe]-Hydrogenase Untereinheiten mit dem aktiven Zentrum bzw. den Eisen-Schwefelclustern dar. Protonen- und Elektronentransportkanäle sind ebenfalls eingezeichnet.

4.3 Die Redoxzustände

Im Laufe des katalytischen Zyklus nimmt die Hydrogenase in ihrer Funktion als Oxidoreduktase unterschiedliche Redoxzustände ein, die jeweils charakteristische spektroskopische Eigenschaften besitzen. Das Protein oxidiert das Substrat Wasserstoff und reduziert einen gekoppelten Elektronenakzeptor. Auch die Reduktion von Protonen erfordert eine Reihe verschiedener Redoxreaktionen. Abbildung 4.3 zeigt eine schematische Übersicht der unterschiedlichen Redoxzustände, welche im folgenden Text erläutert werden. Viele Fragen hinsichtlich des eigentlichen Reaktionsablaufs sind noch ungeklärt oder werden kontrovers diskutiert. Kürzlich veröffentlichte Übersichtsartikel behandeln die bisherigen Ergebnisse und Schlussfolgerungen ausführlich und fassen diese zusammen [36, 39, 40, 41, 42].

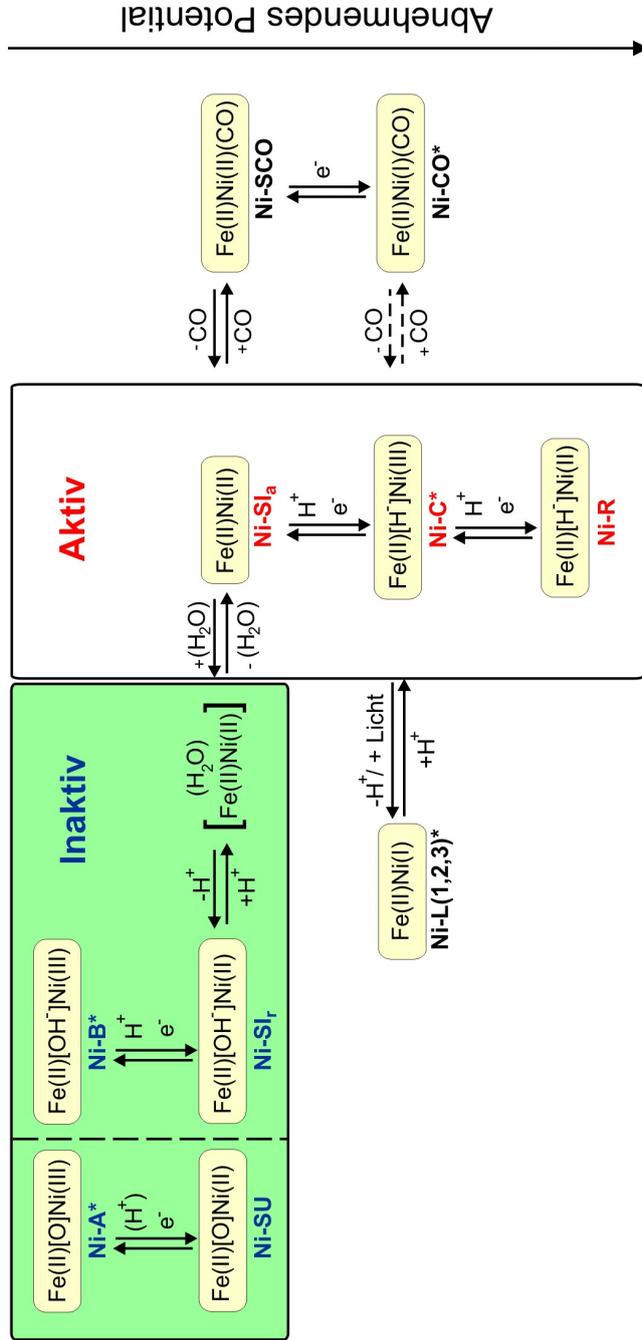


Abbildung 4.3: Schematische Übersicht der verschiedenen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase. Die paramagnetischen Zustände sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die inaktiven Zustände sind blau unterlegt. Der jeweilige Oxidationszustand des Nickel- und des Eisenatoms ist in runden Klammern angegeben, der jeweilige Brückenligand steht in eckigen Klammern. Die einzelnen Zustände werden im Text detailliert erläutert (Abbildung verändert nach [39]).

In seiner inaktiven, oxidierten Form treten zwei EPR-aktive, d. h. paramagnetische, Zustände Ni-A („unready“) und Ni-B („ready“) auf, die sich in ihrer Aktivierungsgeschwindigkeit unterscheiden. Ni-B ist sofort durch H_2 reduzierbar, während die Reduktion des stabilen Ruhezustandes Ni-A Stunden dauern kann [43]. Das Nickelatom ist in beiden Fällen paramagnetisch und besitzt die formale Oxidationsstufe +III, das diamagnetische Eisenatom +II. EPR-spektroskopische Untersuchungen und Messungen mit ^{17}O -markiertem Material lassen vermuten, dass es sich bei dem Brückenliganden in den Zuständen Ni-A und Ni-B um eine Sauerstoffspezies handelt [44, 45, 46]. Im Falle des Ni-B Zustandes konnte gezeigt werden, dass an dieser Stelle ein Hydroxid-Anion (OH^-) gebunden ist [47, 48, 49]. Obwohl die Oxidationsstufen in beiden Zuständen identisch sind, unterscheiden sich die g -Werte ihrer jeweiligen EPR-Spektren. Diese Tatsache ist auf unterschiedliche Brückenliganden in beiden Zuständen zurückzuführen. Die Natur des Brückenliganden im Ni-A Zustand ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Ein Ligand der Form OOH^- [46, 45, 50] oder OH^- [51, 52, 53] wird postuliert, konnte jedoch noch nicht experimentell verifiziert werden. Weitere Erklärungsansätze befassen sich mit der Veränderung der räumlichen Umgebung des aktiven Zentrums, beispielsweise durch Protonierung oder Deprotonierung umliegender Aminosäuren [54, 55, 51] oder Konformationsänderungen des Proteins bzw. des bimetallichen Zentrums [53]. Befände sich in beiden Zuständen der gleiche Brückenligand im aktiven Zentrum könnte dieser z. B. durch eine Positionsänderung Unterschiede in der Elektronendichteverteilung um das Eisen- bzw. Nickelatom bewirken, womit die spektroskopisch detektierten Unterschiede begründet werden könnten [53].

Die durch Aufnahme jeweils eines Elektrons aus Ni-A bzw. Ni-B entstehenden Zustände Ni-SU und Ni-SI_r sind EPR-inaktiv und bilden nach einer Konformationsänderung den ersten aktiven Zustand, der direkt am H_2 -Spaltungsprozess beteiligt ist, den Ni-SI_a Zustand. Die Indizes r und

a bedeuten in diesem Fall „ready“ und „active“. In anderen Publikationen werden gleichbedeutend die Bezeichnungen Ni-SI_r und Ni-SI_{II} verwendet. Der [3Fe4S]-Cluster liegt reduziert vor und ist, wie auch der Ni-SI_a Zustand diamagnetisch. Das Nickelatom im aktiven Zentrum besitzt die Oxidationsstufe +II, die des Eisens bleibt unverändert +II.

Die beiden Subformen des Ni-SI Zustandes Ni-SI_r und Ni-SI_a liegen in einem Säure-Base-Gleichgewicht vor. Der pK_a-Wert beträgt für die [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* MF pK_a=7,8 ± 0,1 [51]. Für die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* wurde ein pK_a-Wert von 8,0 ± 0,1 bestimmt [56]. Bei dem Brückenliganden des Ni-SI_r Zustandes könnte es sich um ein Hydroxid-Anion handeln. Dieses liegt bei hohen pH-Werten (pH-Wert 9,0) vor. Der Ni-SI_a Zustand hingegen entsteht bei niedrigen pH-Werten (pH-Wert 6,0) indem der Brückenligand des Ni-SI_r Zustandes, das OH⁻, protoniert wird. Verlässt das nun nicht mehr an den bimetallichen Cluster koordinierte Wassermolekül bei Temperaturen ≥ 20° C das aktive Zentrum, wird das Enzym aktiv. Die Brückenposition zwischen dem Ni- und dem Fe-Atom im aktiven Zentrum des Ni-SI_a Zustandes ist frei [56].

Durch eine weitere Elektronenaufnahme gelangt der [NiFe]-Cluster in den aktiven, paramagnetischen Zustand Ni-C („active“). Das Nickelatom besitzt in diesem Fall die Oxidationsstufe +III. Neben dem [3Fe4S]-Cluster sind auch beide [4Fe4S]-Cluster reduziert. Beim Brückenliganden handelt es sich um ein Hydrid (H⁻) [57, 49, 58]. Ni-C ist lichtempfindlich und führt unter Belichtung bei niedrigen Temperaturen zu weiteren paramagnetischen Signalen, den Ni-L Zuständen [59, 60]. Es wurde gezeigt, dass der Konversionsprozess vom Ni-C in den Ni-L Zustand mit einer Dissoziation der Ni-H-Bindung einhergeht. Im Ni-L Zustand bleibt die Brückenposition zwischen dem Nickel- und dem Eisenatom unbesetzt und eine umliegende Aminosäure wird protoniert [51, 54].

Nach einer letzten Elektronenaufnahme liegt das Enzym im vollständig reduzierten, nicht EPR-aktiven Zustand Ni-R vor. Das Nickelatom be-

sitzt die formale Oxidationsstufe +II. Alle [FeS]-Cluster sind, wie schon im Ni-C Zustand, reduziert. Für eine Aussage in Bezug auf die Identität des Brückenliganden dieses Zustandes fehlen bisher direkte spektroskopische Beweise. Es wird angenommen, dass ebenfalls ein H⁻ an der Position des Brückenliganden gebunden ist [61]. Vom Ni-R Zustand der [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. gigas*, *D. fructosovorans*, *D. vulgaris* MF und *A. vinosum* sind verschiedene Subformen Ni-R_I, Ni-R_{II} und Ni-R_{III} bekannt [62, 63, 35, 56]. Diese treten abhängig vom pH-Wert der Proteinlösung auf [56] und sind aufgrund ihrer charakteristischen Bandenlagen im FT-IR-Spektrum zu identifizieren. Es handelt sich um unterschiedliche Protonierungszustände des reduzierten aktiven Zentrums. Allerdings konnte im Falle der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. vulgaris* MF bisher keine pH-Abhängigkeit nachgewiesen werden [51].

Kohlenstoffmonoxid (CO) ist ein kompetitiver Inhibitor nahezu aller Hydrogenasen. EPR-Messungen haben gezeigt, dass CO direkt an das Nickel bindet, wenn das zuvor mit Wasserstoff reduzierte Enzym mit CO-Gas behandelt wird [64, 44]. Es existieren zwei verschiedene CO-Zustände, ein EPR inaktiver Zustand, in dem das Nickelatom in Oxidationsstufe +II vorliegt (Ni-SCO) und ein EPR aktiver Zustand, in dem das Nickel wahrscheinlich die Oxidationsstufe +I besitzt (Ni-CO*).

FT-IR-spektroskopische Messungen an Hydrogenasen haben gezeigt, dass diese im Spektralbereich von 1800-2100 cm⁻¹ Banden aufweisen, die den Schwingungen der CN⁻- bzw. CO-Liganden zuzuordnen sind und je nach Redoxzustand des Enzyms charakteristisch verschoben [43, 65, 66, 56]. Während mit EPR die spektroskopische Untersuchung auf die paramagnetischen Zustände beschränkt ist (Detektion der Änderung des elektronischen Zustandes des Nickelatoms im aktiven Zentrum), ist mit Hilfe FT-IR-spektroskopischer Methoden anhand der Änderung der C=O- und C≡N-Schwingungsfrequenzen der Eisenliganden, bedingt durch die Änderung der Elektronendichte um das Eisenatom des akti-

ven Zentrums, die Analyse aller Redoxzustände möglich. Ni-SI_a, Ni-C und Ni-R sind hinsichtlich der Wasserstoffumsetzung relevante Zustände. Die Ergebnisse aus Untersuchungen der übrigen Redoxzustände tragen allerdings wesentlich zum Verständnis des gesamten Katalysemechanismus und der Inaktivierung durch Sauerstoff oder CO bei.

4.4 Genetische Kodierung

Die für die große bzw. kleine Untereinheit der Hydrogenasen kodierenden Gene sind bei Prokaryoten in Operons, einer Funktionseinheit aus Promotor, Operator und Strukturgenen, organisiert. Neben der Transkription und Translation der Strukturgene ist auch die Anwesenheit der für die Maturierung und Faltung wichtigen Helferproteine und der regulatorischen Proteine zur Biosynthese funktionsfähiger H₂asen notwendig. Dessen Gene können im Operon der Strukturgene zu finden sein oder auch verstreut, in separaten Genclustern organisiert im Genom vorkommen. In molekularbiologischer Hinsicht gut untersuchte Organismen sind u. a. *Escherichia coli* [67, 68], die *Desulfovibrio* Arten [69] und *Thiocapsa roseopersicina* [70].

Zu den Helferproteinen gehören z. B. Enzyme, welche die drei anorganischen Eisenliganden – zwei CN⁻ bzw. ein CO – synthetisieren, als auch die für die Integration des Eisens und des Nickels zuständigen Metallochaperone. Carbamoylphosphat wurde als Vorstufe der CN⁻-Liganden identifiziert [71]. Für die Liganden CO bzw. CN⁻ der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* wurde gezeigt, dass diese unterschiedlichen metabolischen Ursprungs sind [71]. Wie die Versuche mit markiertem ¹³C-Natriumhydrogencarbonat und ¹³C-Acetat zeigen, stammt das CO in diesem Falle vom Carboxylatkohlenstoff des Acetats. Die Frage, welche Proteine genau beteiligt sind und die Herkunft des Carbonylliganden der Hydrogenasen anderer Organismen, bleibt weiter offen.

Bisher ist die unprozessierte, aus der Gensequenz übersetzte, Amino-

säuresequenz für beide Untereinheiten (UE) der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* bekannt (NCBI-Datenbank: AY89334 bzw. AY93828 [72]). Zu beachten ist, dass die Aminosäuresequenz aus den Ergebnissen der Gensequenzierung abgeleitet wurde, d. h. posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen unberücksichtigt bleiben. Demnach besteht die große UE aus 576 und die kleine UE aus 314 Aminosäuren. Weiterhin wurden zwei Gene identifiziert (*isp1* und *isp2*), welche im gleichen Operon zu finden sind und für „intergenic sequence proteins“ kodieren. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Proteinkomplexe die am transmembranen Elektronentransfer beteiligt sind und ebenfalls in anderen Organismen wie z. B. *T. roseopersicina* BBS oder *D. vulgaris* identifiziert wurden [73].

Die Arbeit mit molekularbiologisch hergestellten Mutanten anderer Arten, vornehmlich *Escherichia coli* [74, 75], *Ralstonia eutropha* [76, 77, 78] oder *D. vulgaris* [79, 80], hat die Identifizierung einiger am Maturierungsprozess beteiligter Gene und Proteine und die Bestimmung der entsprechenden Funktionen ermöglicht. Während des Maturierungsprozesses erfolgt beispielsweise die Abspaltung eines C-terminalen Peptids der großen UE, wie aus Kristallstrukturanalysen ähnlicher Proteine hervorgeht [81]. Multiple Alignments (Aminosäuresequenzvergleiche) von Hydrogenasen verschiedener Organismen haben gezeigt, dass die kleine UE periplasmatischer Hydrogenasen ein N-terminales Signalpeptid (RRxFxK-Motiv) trägt, welches den TA- (Twin-Arginin-) vermittelten Transport aus dem Cytoplasma durch die innere Membran ermöglicht [82, 83, 84].

Der komplexe genetische Hintergrund und der komplizierte Maturierungsprozess erschweren die Herstellung funktionsfähiger, rekombinanter Hydrogenasen. Daher bleibt die Kultivierung der Wildtyp-Organismen zur Gewinnung des Proteins für die spektroskopische oder röntgenkristallographische Analyse und damit zur Funktions- bzw. Strukturaufklärung eine unverzichtbare Methode.

5 Spektroskopische Methoden

5.1 Optische Spektroskopie

Spektroskopische Verfahren beruhen auf der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie. Mit Hilfe spektroskopischer Methoden lassen sich nicht nur Informationen über Aufbau und Struktur, sondern auch über die Funktion und Dynamik von Makromolekülen, beispielsweise katalytisch aktiver Zentren von Enzymen, gewinnen.

Trifft elektromagnetische Strahlung im sichtbaren und ultravioletten Bereich auf Materie, so kann ihre Energie auf Moleküle übertragen werden und diese in einen elektronisch angeregten Zustand versetzen. Moleküle gehen vom Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (z. B. S_1) über, wenn die Energie des anregenden Lichtes mit der Energiedifferenz des Elektrons zwischen Grundzustand und einem höheren Energieniveau übereinstimmt. Bei der Absorption eines Photons wird ein Elektron von einem niederen, besetzten in ein höheres, leeres Orbital gehoben, d. h. es erfolgt ein elektronischer Übergang.

Im Allgemeinen wird die Absorption (A) von monochromatischer, elektromagnetischer Strahlung durch ein Molekül gemessen, in dem die Intensität der Strahlung vor (I_0) und nach (I) dem Durchgang durch die Probe verglichen wird. Sie wird durch das Lambert-Beer-Gesetz beschrieben, wobei ε der Extinktionskoeffizient (molarer Absorptionskoeffizient) [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], c die Konzentration des absorbierenden Stoffes

[mol · L⁻¹] und d die vom Messstrahl durchsetzte Schichtdicke [cm] der Lösung bedeuten:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5.1)$$

Das Lambert-Beer-Gesetz gilt nur für monochromatisches Licht. Die Größen I , I_0 , ε und damit auch A sind wellenlängenabhängig. Daher muss die jeweilige Wellenlänge z. B. als Index angegeben werden. Trägt man die Absorption graphisch als Funktion der Wellenlänge auf, erhält man ein Absorptionsspektrum. Während die Absorption über das Lambert-Beer-Gesetz direkt mit dem molekularen Prozess der Wechselwirkung von Licht mit Materie zusammenhängt, bezeichnet der Begriff der Extinktion (optische Dichte) allerdings den gesamten aus dem ursprünglichen Messstrahl entnommenen Anteil, der sich aus verschiedenen Teilen zusammensetzen kann, z. B. der Lichtstreuung und der Absorption durch einen Chromophor. Bei einer Suspension lichtstreuender Partikel (z. B. Membranfragmente oder Bakterienzellen) spielt die Absorption im Vergleich zur Lichtstreuung keine große Rolle. In dieser Arbeit wird die spektroskopische Messung der Lichtstreuung einer Bakteriensuspension zur indirekten Bestimmung der Gesamtzellzahl der Kultur genutzt. Da die Zunahme der Bakterienanzahl während des Wachstums proportional zur Lichtstreuung ist, kann mit den ermittelten Messwerten eine Wachstumskurve erstellt werden.

5.2 FT-IR-Spektroskopie

Bei der FT-IR-Spektroskopie handelt es sich um eine schwingungsspektroskopische Methode. Die infrarote Strahlung (ca. 780 nm-1 mm), die im Vergleich zur sichtbaren Strahlung energieärmer ist, reicht für die Anregung elektronischer Übergänge nicht aus, sondern bewirkt Molekülschwingungen innerhalb des Grundzustandes S_0 . Es kommen sowohl Valenzschwingungen (symmetrische und asymmetrische

Streckschwingungen) als auch Deformationsschwingungen (Biege-, Kipp-, Torsions- und Pendelschwingungen) vor.

Eine Schwingung ist IR-aktiv, wenn sich während der Schwingung mindestens eine Komponente ihres Dipolmoments ändert. Die Größe des Übergangsdipolmoments bestimmt den molaren Absorptionskoeffizienten. Unter einem Übergangsdipolmoment versteht man die Verschiebung elektrischer Ladung in einem Molekül beim Übergang zwischen zwei elektronischen Niveaus. Meistens wird die Absorption als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ (Anzahl der Wellenzüge pro cm, $1/\lambda$) angegeben. Die Angabe der Wellenzahl an Stelle der Wellenlänge ist besser, da sie der Frequenz und damit dem Energieunterschied ΔE der Niveaus, zwischen denen der Übergang erfolgt, proportional ist.

Jede Schwingung des Gesamtmoleküls ergibt sich aus der Überlagerung gleichfrequenter Schwingungen der Atome, an der alle Atome des Moleküls zu unterschiedlichen Anteilen beteiligt sind. Ein nichtlineares Molekül aus N Atomen hat $3N-6$ Schwingungsfreiheitsgrade, die als Normalmoden bezeichnet werden. Schon bei kleinen Proteinen überlagern sich einige hundert Normalmoden und erschweren die Interpretation eines Absorptionsspektrums. Zur Vereinfachung wird das Molekül in einzelne Gruppen und Bindungen zerlegt, die in erster Näherung unabhängig voneinander in einer für sie typischen Frequenz schwingen. Beispielsweise werden alle Schwingungen des Proteinrückgrats zu den Amid-Moden zusammengefasst. Das Peptidrückgrat mit der Peptidbindung trägt am meisten zur IR-Absorption eines Proteins bei und dominiert im Absorptionsspektrum.

5.2.1 FT-IR-Spektroskopie an [NiFe]-Hydrogenasen

Alle bisher bekannten Redoxzustände, die im katalytischen Zyklus der Hydrogenase auftreten, sind mit FT-IR-spektroskopischen Methoden analysierbar. Die charakteristischen IR-aktiven Schwingungen der zweiatomigen Eisenliganden, zwei CN^- -Moleküle und ein CO-Molekül, liegen im Bereich

zwischen $1800\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$. Die Amplituden sind im Vergleich zu anderen Signalen eines FT-IR-Absorptionsspektrums, z. B. von den funktionellen Gruppen der Aminosäuren eines Proteins (z. B. Amid I 1650 cm^{-1} , Amid II 1550 cm^{-1}), klein, werden aber nicht durch sie oder durch andere Signale stark absorbierender Moleküle wie CO_2 (2200 cm^{-1}) oder H_2O (3350 , 3300 und 1660 cm^{-1}) überdeckt.

Die zweiatomigen Liganden des Eisens besitzen leere π -Orbitale wodurch eine π -Rückbindung zwischen Eisen und Ligand ermöglicht wird. Aufgrund dessen sind die IR-aktiven Schwingungen der Liganden CO und CN^- besonders sensitiv für Änderungen der elektronischen Struktur des Eisens. Deshalb ist die Analyse von Wellenzahlverschiebungen, abhängig von der Umgebung des Eisenatoms im katalytisch aktiven Zentrum, möglich. Da das Eisenatom des aktiven Zentrums jeder Hydrogenase, unabhängig von der jeweiligen Klassifizierung in [NiFe]-, [FeFe]- oder [Fe]-Hydrogenase, immer ein Cyanid und ein CO oder nur ein CO als natürlichen Liganden besitzt, ist eine Untersuchung mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie in jedem Fall durchführbar und ermöglicht einen Vergleich der unterschiedlichen Intermediate im Katalysemechanismus.

5.2.2 Messtechnik

Ein Infrarotspektrometer besteht im Allgemeinen aus einer Strahlungsquelle, einem Monochromator, einer Probenkammer und einem Detektorsystem. Als IR-Strahlungsquelle werden häufig keramische Strahler verwendet, z. B. der Glowbar (Nernst-Stift), die elektrisch aufgeheizt werden. Die dabei emittierte elektromagnetische Strahlung kommt der eines schwarzen Strahlers sehr nahe. Der Detektor wandelt die nicht absorbierte Strahlung der Probe in ein elektrisches Signal um. Der zentrale Teil eines FT-IR-Spektrometers ist neben der polychromatischen IR-Strahlungsquelle, dem Detektor und der Probenkammer das Michelson-Interferometer. Wie in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt, besteht es

aus einem halbdurchlässigen Strahlenteiler, einem festen und einem beweglichen Spiegel (Scanner).

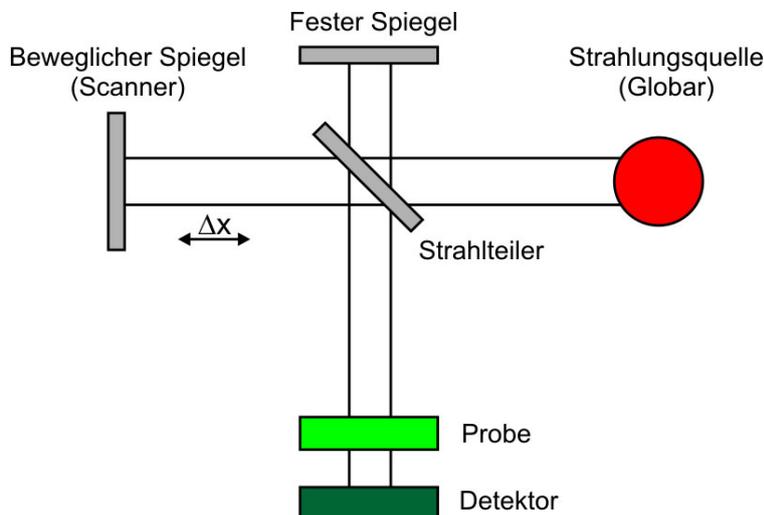


Abbildung 5.1: Schematischer Aufbau des Michelson-Interferometers: Bei der FT-IR-Spektroskopie wird die spektrale Information polychromatischer IR-Strahlung in ein Interferogramm umgewandelt. Ein Strahlteiler spaltet die von der IR-Quelle ausgehende Strahlung im Verhältnis 1:1 (Reflexion und Transmission). Beide Teilstrahlen treffen jeweils auf einen festen bzw. einen beweglichen Spiegel. Durch die Verschiebung des beweglichen Spiegels entsteht ein Gangunterschied zwischen beiden Teilstrahlen, so dass diese interferieren.

Am Strahlteiler wird der von der Strahlungsquelle ausgehende Strahl in zwei Teilstrahlen, einen durchgehenden und einen reflektierten Strahl aufgespalten. Der vom festen Spiegel reflektierte Teil tritt wieder durch den Strahlenteiler und wird dort mit dem vom beweglichen Spiegel reflektierten Teil zusammengeführt. Die Wellenlänge eines Teilstrahls kann durch Variation der Position des Scanners moduliert werden, so dass eine beliebige Wegelängendifferenz (Δx) zwischen beiden Strahlen eingestellt werden kann. Je nach Wellenlänge und Phasenlage tritt destruktive oder konstruktive Interferenz auf. Der aus der Interferenz resultierende Strahl passiert die Probenkammer und wird von dort aus weiter zum Detektor geleitet. Das entstehende Interferogramm stellt die Intensität der Strahlung in Abhängigkeit von der optischen Wegdifferenz des Scanners dar. Bei einer größtmöglichen Auslenkung des Scanners um 4 cm ist eine ma-

ximale spektrale Auflösung von $0,25\text{ cm}^{-1}$ erreichbar. Aus den gemessenen Werten muss das entsprechende Einkanalspektrum berechnet werden. Dies geschieht mit Hilfe einer mathematischen Operation, der Fourier-Transformation.

Als Fenstermaterialien für IR-Küvetten kommen infrarotdurchlässige Materialien wie Natriumchlorid (NaCl), Kaliumbromid (KBr), Calciumfluorid (CaF_2), Germanium (Ge) oder Silicium (Si) in Frage. Häufig, wie auch in dieser Arbeit, wird CaF_2 als Fenstermaterial verwendet, da es auch bei wässrigen Proben eingesetzt werden kann.

5.3 EPR-Spektroskopie

EPR- (Electron Paramagnetic Resonance) Spektroskopie ist, wie die im voran gegangenen Kapitel beschriebene FT-IR-Spektroskopie, eine absorptionsspektroskopische Methode. Grundvoraussetzung ist allerdings der Paramagnetismus der zu untersuchenden Substanz. Moleküle sind paramagnetisch, wenn mindestens ein ungepaarter Elektronenspin vorliegt wie z. B. bei Radikalen oder Übergangsmetallionen in Proteinen und Enzymen (z. B. Kupfer, Eisen, Mangan oder Nickel). Diamagnetische Substanzen, beispielsweise organische Verbindungen im Singulett-Grundzustand, besitzen eine gerade Anzahl von Elektronen, deren Spins in Paaren antiparallel angeordnet sind (Pauli-Prinzip).

EPR wird u. a. zur Charakterisierung von freien Radikalen, intermediären radikalischen Reaktionsstufen oder paramagnetischen Metallionen und Komplexen solcher Metallionen z. B. in Metalloproteinen wie der [NiFe]-Hydrogenase eingesetzt [85]. Sogenannte Spinsonden, das sind stabile organische Radikale die kovalent an Biomoleküle gebunden sind, finden häufig bei der Untersuchung der Struktur und Dynamik von Lipid-Membranen oder diamagnetischen Proteinen [86] (Spin-Label-Technik) Anwendung.

Wird eine paramagnetische Probe in ein homogenes Magnetfeld B_0

gebracht, wird die ursprünglich isotrope Verteilung der Spins aufgehoben. Der Gesamtdrehimpuls J eines Elektrons setzt sich additiv aus dem Bahndrehimpuls L , als Ausdruck für die Kreisbewegung um den Kern, und dem Eigendrehimpuls S (Spin) als Ausdruck für die Eigenrotation zusammen:

$$J = L + S \quad (5.2)$$

Für freie Elektronen ist der Gesamtdrehimpuls gleich dem Eigendrehimpuls. Auch im Molekülverbund ist der Bahndrehimpuls eines ungepaarten Elektrons weitgehend gelöscht („orbital quenching“). Mit den Elektronenspins ist ein magnetisches Moment verbunden, welches im Magnetfeld eine Orientierung erfährt. Sie präzedieren mit einer bestimmten Frequenz, der Larmor-Frequenz, abhängig von der Magnetfeldstärke um B_0 :

$$\nu_e = \frac{\beta_e g_e B_0}{h} \quad (5.3)$$

Quantenmechanisch sind parallele und antiparallele Spinrichtungen in Bezug auf den Magnetfeldvektor möglich. Diese werden durch die magnetischen Quantenzahlen $m_s = +\frac{1}{2}$ (parallele Ausrichtung, Spin aufwärts \uparrow) und $m_s = -\frac{1}{2}$ (antiparallele Ausrichtung, Spin abwärts \downarrow) wiedergegeben.

Das Messprinzip der EPR-Spektroskopie beruht auf der Absorption von Mikrowellenenergie durch eine paramagnetische Probe in einem Magnetfeld bei Erfüllung der Resonanzbedingung:

$$h \cdot \nu_e = \beta_e g_e B_0 \quad (5.4)$$

bzw.

$$\Delta E = E(m_s = +\frac{1}{2}) - E(m_s = -\frac{1}{2}) = \beta_e g_e B_0 \quad (5.5)$$

wobei h das Plancksche Wirkungsquantum ($6,62 \cdot 10^{-34} Js$), ν die Frequenz des elektromagnetischen Feldes (Larmor-Frequenz), β_e das Bohrsche Magneton ($9,2740154 \cdot 10^{24} JT^{-1}$, Maßeinheit des magnetischen Mo-

ments), g_e der g-Wert des freien Elektrons ($g_e=2,00232$) und B_0 die Flussdichte des Magnetfelds bedeuten. Der Resonanzfall tritt ein, wenn die durch ein gegebenes Magnetfeld festgelegte Larmor-Frequenz mit der Frequenz der eingestrahlten Mikrowelle übereinstimmt und dessen Magnetfeldvektor B_1 senkrecht zur B_0 -Richtung liegt. Ist diese Bedingung erfüllt, erfolgen Übergänge der ungepaarten Elektronen zwischen den Energieniveaus, bei denen das Elektron seinen Spinzustand ändert. Abbildung 5.2 verdeutlicht die Zeeman-Aufspaltung der Energieniveaus eines Elektrons schematisch.

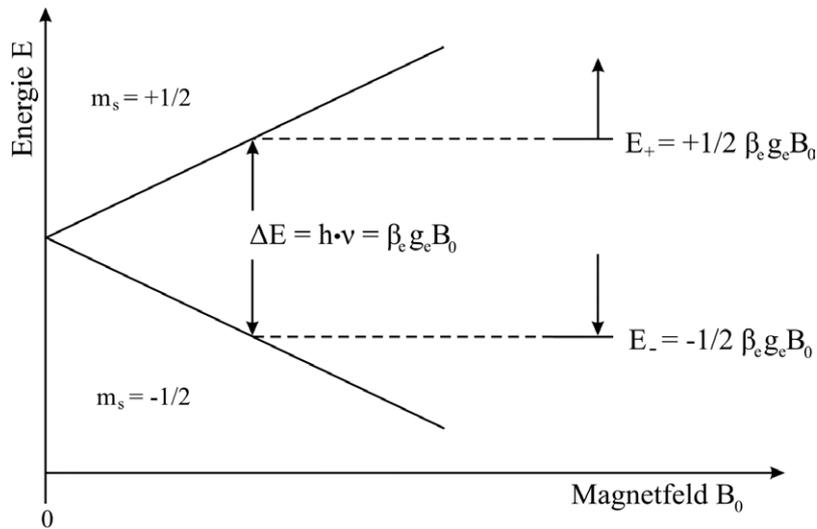


Abbildung 5.2: Darstellung der Elektron-Zeeman Aufspaltung für ein $S=\frac{1}{2}$ System mit einem ungepaarten Elektron im externen magnetischen Feld B_0 .

Aufgrund der Boltzmann-Verteilung (umgekehrt proportional zur Temperatur und proportional zur Stärke des Magnetfeldes) ist der Zustand geringerer Energie ($m_s = -\frac{1}{2}$) stärker besetzt und wird durch die Absorption der elektromagnetischen Strahlung der Frequenz $\nu = \beta_e g B_0 / h$ zugunsten des ($m_s = +\frac{1}{2}$)-Energieniveaus entvölkert. Aufgrund des bei gegebener Temperatur vorliegenden Besetzungsunterschieds erfolgt eine Netto-Absorption. Die Besetzung beider Energieniveaus wird durch die

Gleichung

$$\frac{n_{+\frac{1}{2}}}{n_{-\frac{1}{2}}} = e^{\frac{-\beta e g_e B_0}{k_B \cdot T}} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B \cdot T}} \quad (5.6)$$

beschrieben, wobei n der Besetzungszahl des entsprechenden Energieniveaus entspricht, T die Temperatur bezeichnet und k_B der Boltzmann-Konstante ($1,3805 \cdot 10^{-23} JK^{-1}$) entspricht. Voraussetzung für die Durchführung eines kontinuierlichen EPR-Experiments ist, dass durch Relaxationsprozesse (z.B. Spin-Gitter- oder Spin-Spin-Relaxation) der Besetzungsunterschied auch während der Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung aufrecht erhalten werden kann, da sonst eine Sättigung des EPR-Signals eintritt.

Aufgrund von Beiträgen des Bahn-Magnetismus und besonders der Spin-Bahn-Kopplung wird eine Vergrößerung oder Verringerung der Energiedifferenz ΔE bewirkt. Daraus ergeben sich größere oder kleinere effektive g -Werte der auftretenden Absorptionslinien, welche vom g -Wert des freien Elektrons g_e abweichen. Der g -Wert wird anisotrop, d.h. abhängig von der Orientierung des Magnetfeldes relativ zum molekularen Achsensystem, was zu einem EPR-Spektrum mit mehreren Absorptionslinien führt. Der g -Wert wird zu einem Tensor und durch die drei g -Tensor-Hauptwerte g_x , g_y und g_z charakterisiert. In einer gefrorenen Probe liegt eine zufällige, statistisch verteilte Orientierung der Molekülachsen vor (Pulverspektrum). Das resultierende rhombische EPR-Spektrum, in dem sich alle drei g -Werte voneinander unterscheiden, stellt die Überlagerung unendlich vieler Einzelspektren dar, die den jeweiligen anisotropen Spektren der einzelnen, speziell orientierten Molekülen (z. B. im Einkristall) entsprechen. Anders als bei einem isotropen Spektrum (mit dem g -Wert g_{iso}) ist in diesem Fall der g -Tensor anisotrop mit $g_x \neq g_y \neq g_z$, $g_{\text{iso}} = \frac{1}{3} (g_x + g_y + g_z)$.

Die experimentellen Beobachtungen werden in der EPR-Spektroskopie häufig in dem Formalismus des Spin-Hamilton-Operators wiedergegeben. Dieser fasst alle molekularen Wechselwirkungen zusammen, die zum magnetischen Resonanzspektrum beitragen. Dazu gehören die Elektron-

Zeeman-Wechselwirkung (Einfluss des Drehimpulses des Elektrons), die Nullfeldaufspaltung (Wechselwirkung zwischen ungepaarten Elektronenspins untereinander), die Hyperfeinwechselwirkung (Wechselwirkung von Elektronen- und Kernspins), weiterhin die Kern-Zeeman- und die Kern-Quadrupol-Wechselwirkung.

5.3.1 Untersuchung eines Übergangsmetallkomplexes

Die in dieser Arbeit untersuchte Hydrogenase aus *A. vinosum* gehört zur Gruppe der Metalloproteine mit den Übergangsmetallionen Nickel und Eisen. Die Redoxzustände (vgl. Kapitel 4, Abbildung 4.3) Ni-A, Ni-B, Ni-C bzw. Ni-L und Ni-CO sind EPR-aktiv (Ni(III) bzw. Ni(I)) und können mit dieser Methode detektiert werden. Die Elektronen mit ungepaartem Spin des paramagnetischen Nickelions befinden sich in den *d*-Orbitalen. Das Eisenion ist in allen Redoxzuständen diamagnetisch (Fe(II), „low spin“). Der *g*-Faktor weicht aufgrund kleiner Beiträge der Spin-Bahn-Kopplung und des Bahndrehmoments vom Wert des freien Elektrons $g_e = 2,00232$ ab, der *g*-Tensor ist anisotrop und rhombisch ($g_x \neq g_y \neq g_z$). Zudem sind die *g*-Faktoren von den Liganden des Metallions abhängig. Die charakteristischen *g*-Werte des EPR-Spektrums lassen somit Rückschlüsse auf die elektronische Struktur und Umgebung des durch vier Cysteinreste und X (in bestimmten Redoxzuständen vorliegender Brückenligand zwischen Ni und Fe) koordinierten Nickelions im bimetallichen Zentrum zu.

Das Nickelion im aktiven Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase wechselt im Laufe des katalytischen Zyklus seine formale Oxidationsstufe und kommt als Ni⁺, Ni²⁺ und Ni³⁺ vor. Die Zustände Ni⁺ und Ni³⁺ mit 9 (Ni-L, Ni-CO) bzw. 7 (Ni-A, Ni-B, Ni-C) Elektronen in den *d*-Orbitalen weisen ein einzelnes ungepaartes Elektron (Spin $S = \frac{1}{2}$) auf. Bei den diamagnetischen Redoxzuständen (Ni-SU, Ni-SI, Ni-R und Ni-SCO), in denen das Nickelion die formale Oxidationsstufe Ni²⁺ besitzt, liegt wahrscheinlich die „low spin“-Konfiguration mit $S = 0$ vor. Bei den in dieser Arbeit

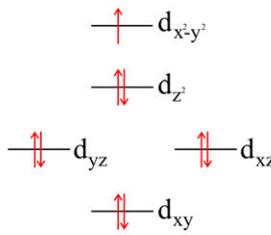
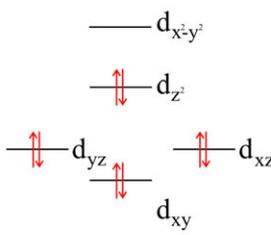
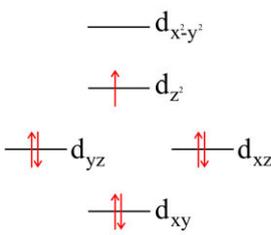
Ni^+	Ni^{2+} Low Spin	Ni^{3+}
		

Abbildung 5.3: Darstellung der Aufspaltung der d -Orbitale bei quadratisch-pyramidaler Ligandengeometrie und deren Besetzung für Ni^+ (d^9), Ni^{2+} (d^8) und Ni^{3+} (d^7). Im Falle des Ni^{2+} -Zustandes ist die paramagnetische „low spin“-Konfiguration gezeigt [39, 87].

aufgenommenen EPR-Spektren der Zustände Ni-A, Ni-B und Ni-C ist das Nickel(III) in quadratisch-pyramidaler Geometrie koordiniert und das Elektron mit ungepaartem Spin befindet sich im d_{z^2} -Orbital [39, 87] (vgl. Abbildung 5.3). Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie lassen sich die Auswirkungen von Umgebungsänderungen auf die elektronische Struktur des bimetallischen Zentrums anhand der Verschiebung der charakteristischen g -Tensor-Hauptwerte des Spektrums verfolgen. Jeder Redoxzustand ist anhand seines typischen Absorptionslinienmusters bzw. der Lage der g -Tensor-Hauptwerte zu identifizieren.

Fe^{3+} besitzt fünf d -Elektronen. Je nach Umgebung im Ligandenfeld kann ein „high spin“- bzw. „low spin“-Zustand eingenommen werden. Der „high spin“-Zustand zeichnet sich durch eine maximale Einfachbelegung der d -Orbitale und damit größtmöglichen Spin ($S = \frac{5}{2}$ bei Fe^{3+}) aus. Der „low spin“-Zustand ist durch maximale Doppelbelegung und den kleinstmöglichen Spin ($S = \frac{1}{2}$) charakterisiert. EPR- und Mössbauer-Spektroskopie haben gezeigt, dass das Eisen mit der formalen Oxidationsstufe +II in allen stabilen Redox-Zuständen der [NiFe]-Hydrogenase im „low spin“-Zustand vorliegt [61]. Beim Fe^{2+} ist nur der „high spin“-Zustand ($S = 2$) paramagnetisch, der „low spin“-Zustand hingegen diamagnetisch

Tabelle 5.1: Mikrowellenbereiche (Bänder) der EPR-Spektroskopie.

<i>Mikrowellenband</i>	<i>Frequenz (GHz)</i>
L	1
S	2-4
C	4-8
X	9-10
K	18-24
Q	35
W	95

($S=0$, kein ungepaartes Elektron) und somit nicht EPR-spektroskopisch detektierbar. Das rhombische Signal der detektierten EPR-Spektren der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* beruht daher hauptsächlich auf der Absorption des Ni-Atoms und zeigt keine Beiträge, die auf das Eisen-Atom zurückzuführen sind.

5.3.2 Messtechnik

Wesentliche Bestandteile des EPR-Spektrometers sind, wie auch bei anderen Absorptionsmethoden, Strahlungsquelle, Probenraum und ein Detektorsystem. Als Besonderheit wird ein externes Magnetfeld benötigt, welches von einem starken Magneten erzeugt wird.

Um die Resonanzbedingung zu erfüllen, kann die Frequenz und/oder die Stärke des magnetischen Feldes variiert werden. In einem typischen continuous wave (cw) EPR-Experiment wird die innerhalb eines Hohlraumresonators (Cavity) befindliche Probe im homogenen Magnetfeld B_0 mit einer Mikrowelle konstanter Frequenz ν und Amplitude bestrahlt. Durch zeitliche Variation der Magnetfeldstärke wird das Resonanzspektrum erhalten. Als Strahlungsquelle dient z. B. ein Klystron, dessen Mikrowellen durch einen Hohlleiter zum Resonator transportiert werden. Das homogene Magnetfeld wird durch einen Elektromagneten erzeugt. Häufig verwendete Mikrowellenbereiche (Bänder) fasst Tabelle 5.1 zusammen.

Der Hohlraumresonator dient zum einen als Probenraum, zum anderen

zur Erzeugung des B_1 -Magnetfeldes. Durch eine variable Lochblende im Resonator, der Iris, erfolgt die magnetische Kopplung mit den durch den Hohlleiter herangeführten elektromagnetischen Wellen. Bei entsprechender Einstellung, d. h. wenn $\lambda/2$ einem ganzen Vielfachen der Cavity-Länge entspricht (Eigenfrequenz des Resonators), wird eine stehende Welle erzeugt. Die bei erfüllter Resonanzbedingung auftretende Absorption durch die Probe wird als verringerte Mikrowellenamplitude und damit als verringerte Spannung am Detektor registriert. Durch die zusätzliche Erzeugung eines magnetischen Modulationsfeldes am Ort der Probe, welches parallel zu dem angelegten B_0 -Feld ausgerichtet ist, wird eine periodische Veränderung des B_0 -Feldes erreicht. Die Erzeugung dieses Modulationsfeldes mit einer Frequenz von 100 kHz erfolgt mit externen Modulationsspulen. Das resultierende EPR-Spektrum ist die erste Ableitung des Absorptionsspektrums und ermöglicht eine bessere Trennung der verschiedenen Komponenten des Signals. Auf diese Weise wird das Signal-Rausch Verhältnis verbessert und eine höhere Empfindlichkeit des Spektrometers erreicht.

6 Röntgenstrukturanalyse

Bei der Röntgenstrukturanalyse werden Gesetzmäßigkeiten ausgenutzt, die der Wechselwirkung von Röntgenstrahlung und Kristallen zugrunde liegen. Dazu wird das zu untersuchende Protein im kristallinen Zustand benötigt. Es folgt das Beugungsexperiment von Röntgenstrahlung am Kristall, bevor die Berechnung dreidimensionaler Elektronendichtekarten, basierend auf den Ergebnissen aus der Analyse des am Detektor registrierten Beugungsmusters, die Analyse abschließt. Ausführliche theoretische Grundlagen zur röntgenkristallographischen Analyse von Proteinen sind in verschiedenen Lehrbüchern detailliert beschrieben [88, 89, 90].

6.1 Kristallisation

Der erste Schritt zur röntgenkristallographischen Strukturbestimmung ist die Gewinnung eines geeigneten Kristalls. Eine Vorhersage der Kristallisationsbedingungen ist nicht möglich. Je nach Substanz kann die Züchtung aus Lösung, aus der Schmelze oder aus der Gasphase erfolgen. Kristallisationsversuche komplexer Proteine sind häufig bei Anwendung der Dampfdiffusionsmethode, der langsamen Gewinnung aus Lösung, erfolgreich. Die Varianten mit sitzendem oder hängendem Tropfen sind verbreitet.

Das Kristallwachstum ist von vielen Faktoren abhängig z. B. von Temperatur, Konzentration und Reinheit des Proteins, Art und Konzentration von Puffern und Fällungsmitteln. Liegen noch keine Informationen über mögliche Kristallisationsbedingungen vor, werden in den meisten

Fällen zunächst „screening kits“ verwendet, deren Zusammensetzung statistisch aus bereits bekannten Kristallisationsbedingungen unterschiedlichster Proteine ermittelt wurde. Die Lösungen dieser kommerziell erhältlichen Kits variieren z. B. schrittweise die Konzentration eines bestimmten Fällungsmittels (0,8-2,4 M Ammoniumsulfat), den pH-Wert (pH 4-9) und die Art des Puffers (Tris, HEPES, MES) bei gleich bleibender Pufferkonzentration (0,1 M). Bei Verwendung verschiedener Kits können auf diese Weise systematisch die relevanten Parameter ermittelt werden.

Für die Kristallisation durch Dampfdiffusion im hängenden Tropfen wird dieser unter einem silikonisierten Deckgläschen hängend über der Reservoirlösung platziert. Ist die Oberflächenspannung der Proteinlösung allerdings zu gering, so dass der Tropfen nicht haften bleibt, wird der Ansatz im sitzenden Tropfen durchgeführt. Dabei ist dieser meist auf einer Art Brücke oberhalb der Reservoirlösung platziert. Abbildung 6.1 stellt beide Varianten vergleichend schematisch dar.

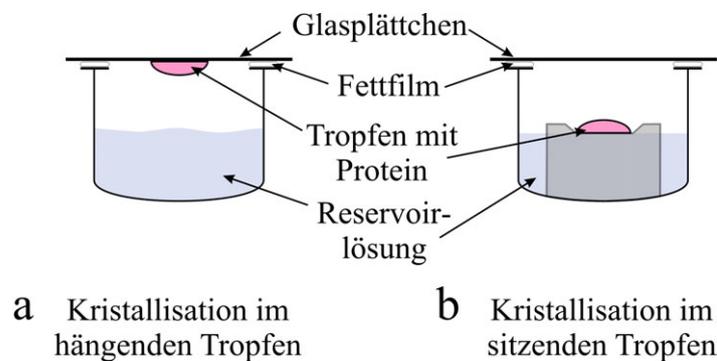


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Kristallisationsmethode durch Dampfdiffusion im hängenden Tropfen (a) und im sitzenden Tropfen (b).

Abbildung 6.2 zeigt einen „crystal strip“, der für das Screening von vielen kleinen Ansätzen im sitzenden Tropfen genutzt wurde. Jede der insgesamt 8 Einheiten bildet ein abgeschlossenes System. Der Kristall bildet sich in einem separaten Tropfen oberhalb einer Reservoirlösung. Die bei Verwendung dieses Streifens erforderlichen Volumina sind gering ($2 \mu\text{L}$

Tropfen, 100 μL Reservoirlösung) und ermöglichen die gleichzeitige Analyse vieler Ansätze bei verhältnismäßig geringem Proteinverbrauch.

In beiden Fällen besteht der Tropfen aus einer Mischung von Proteinlösung und Kristallisationslösung (entspricht der Reservoirlösung) im Verhältnis 1:1. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen von Fällungsmittel (Präzipitans) in Tropfen und Reservoirlösung entsteht ein Konzentrationsgradient. Deshalb diffundiert Wasser aus dem Tropfen in die Gasphase bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Währenddessen erhöhen sich die Konzentrationen im Tropfen bis eine Übersättigung und unter Umständen die Kristallisation des Proteins eintritt. Als Präzipitans, welches die Proteinmoleküle bei einer bestimmten Konzentration aus der Lösung verdrängt, werden z. B. Salze (Ammoniumsulfat, Natriumcitrat) und organische Verbindungen wie Polyethylenglykole oder Alkohole verwendet. Zusätzlich kann durch Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen die Bildung von Kristallen erreicht werden z. B. durch Änderung des pH-Werts oder der Temperatur.

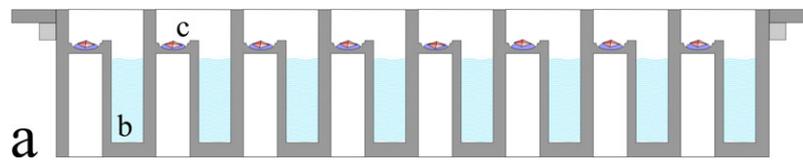


Abbildung 6.2: Darstellung eines „crystal strip“, der zur Gewinnung von Kristallen aus Lösung im sitzenden Tropfen unter Einsatz kleinster Volumina verwendet wurde. 8 sich wiederholende Einheiten bilden einen Streifen (a). Der Kristall bildet sich in einem separaten Tropfen (c) oberhalb der Reservoirlösung (b).

Proteine kristallisieren in verschiedenen Formen und Größen und nicht jeder Kristall eignet sich zur Röntgenstrukturanalyse, insbesondere wenn er kein klares Beugungsmuster liefert oder beim Einfrieren zerstört wird. Gute Kristalle haben eine ausreichende Größe, erscheinen klar, besitzen scharfe Kanten und gleichmäßige Oberflächen und liegen idealerweise einzeln vor.

6.2 Kristallgitter

Ein idealer Kristall besteht aus vielen identischen aneinandergereihten Einheitszellen, der sogenannten Basis. Sie baut das Kristallgitter durch wiederholte Translation lückenlos auf. Die primitive Einheitszelle ist eine von drei linear unabhängigen Vektoren a , b und c aufgespannte Raumeinheit mit den zugehörigen Winkeln α , β und γ (vgl. Abbildung 6.3). Dabei ist α der Winkel zwischen den Basisvektoren b und c , β der Winkel zwischen a und c und γ der zwischen a und b aufgespannte Winkel. Die Beträge der Basisvektoren (Achsen des Kristallgitters) und die eingeschlossenen Winkel werden als Gitterkonstanten bezeichnet.

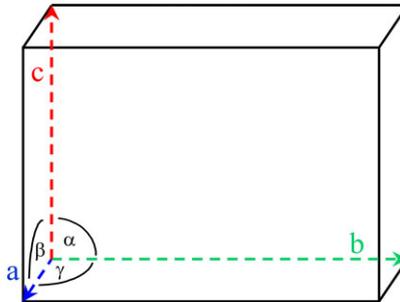


Abbildung 6.3: Achsen und Winkel der Einheitszelle: Die Einheitszelle ist die kleinste Masche eines Translationsgitters und wird durch die Gitterkonstanten (Beträge der Vektoren a , b , c und Winkel α , β , γ) charakterisiert.

Die Variation der Vektoren und Winkel der Einheitszelle führt zu unterschiedlichen Gittertypen. Jeder Kristall ist durch sein ihm eindeutig zugeordnetes Translationsgitter (Bravais-Gitter) beschrieben. Mathematisch gefasst definiert man eine Translation T , die über die Variation der n_i ein Gitter aufbaut, wobei a , b und c nicht alle in einer Ebene liegen und $n_i \in \mathbb{N}$:

$$T_{(n_1, n_2, n_3)} = n_1 a + n_2 b + n_3 c \quad (6.1)$$

Untersucht man alle unterschiedlichen Symmetriemöglichkeiten für Translationsgitter, so ergibt sich eine Einteilung in 7 mögliche Kristallsysteme, die in Tabelle 6.1 aufgeführt sind.

Tabelle 6.1: 7 mögliche Kristallsysteme nach [88].

<i>Kristallsystem</i>	<i>Gitterkonstanten</i>	
	Achsensymmetrie	Winkelsymmetrie
triklin	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$
monoklin	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
orthorhombisch	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
trigonal/ rhombohedral	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
kubisch	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Das Grundmotiv ist im Fall der primitiven Einheitszelle an allen Gitterpunkten identisch. Sie ist die kleinste Volumeneinheit und repräsentativ für den ganzen Kristall. Es gibt jedoch mehrere Möglichkeiten in einem vorgegebenen Translationsgitter Basisvektoren zu definieren. Die Einheitszelle wird so gelegt, dass sie mit dem Kristallsystem der höchstmöglichen Symmetrie vereinbar ist. Die Kombination aller möglichen Gittertypen mit den möglichen internen Punktsymmetrieklassen der Einheitszelle ergibt unterschiedliche Arten des Kristallaufbaus, die Raumgruppen. Sie geben die Art und Lage der Symmetrieelemente an, die in einer Kristallstruktur möglich sind. Der Satz von Atomen, dessen Kenntnis ausreicht, um zusammen mit den Symmetrieoperationen der Raumgruppe den kompletten Inhalt einer Einheitszelle zu beschreiben, wird als asymmetrische Einheit bezeichnet.

6.3 Röntgenbeugung

Elektromagnetische Wellen mit Wellenlängen zwischen 0,1 und 100 Å werden als Röntgenstrahlen bezeichnet ($1 \text{ pm} = 10^{-12} \text{ m} = 0,01 \text{ Å}$). Sie entstehen, wenn Elektronen beschleunigt (abgelenkt, abgebremst) werden. Sie werden entweder in einer evakuierten Röntgenröhre durch den Beschuss einer geeigneten Anode (z. B. Kupfer, $\lambda = 1,541 \text{ Å}$) mit hochenergetischen

Elektronen (Hochspannung bis zu 60 kV) erzeugt, oder man nutzt Synchrotronstrahlung aus Elektronenspeicherringen. Synchrotronstrahlung besitzt eine hohe Intensität, ist variabel in ihrer Wellenlänge und entsteht, wenn Elektronen, die sich mit einer hohen Geschwindigkeit bewegen und von einem Magnetfeld auf eine Kreisbahn abgelenkt werden. Dabei wird Bremsstrahlung tangential zur Bewegungsrichtung emittiert. Die Intensität der Strahlung ist proportional zur Geschwindigkeit der beschleunigten Elektronen.

Setzt man einen Kristall kohärenter Röntgenstrahlung aus, passiert der größte Teil des Primärstrahls den Kristall unverändert. Ein Teil allerdings wechselwirkt mit der Elektronenhülle der Atome im Kristall und wird gebeugt. Es ergibt sich ein spezifisches Muster von Röntgenbeugungsreflexen am Detektor. Diesen Zusammenhang verdeutlicht Abbildung 6.4 schematisch.

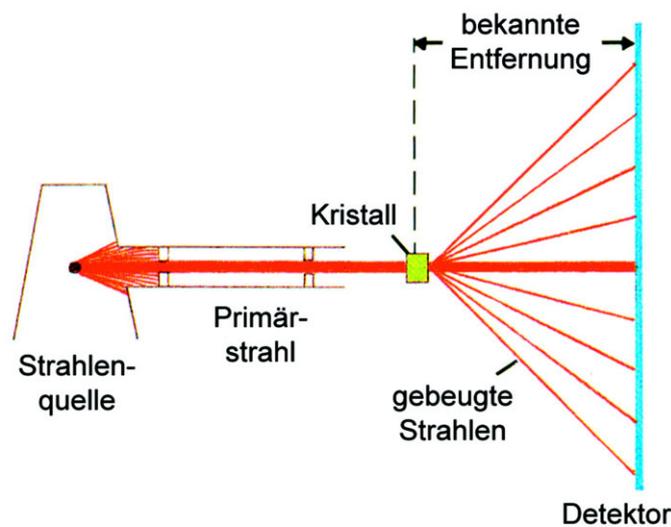


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung eines Röntgenbeugungsexperiments an einem Kristall. Der größte Teil des Primärstrahls passiert den Kristall unverändert, ein kleiner Teil wird am kristallinen Gitter gebeugt. Die abgelenkten Strahlen ergeben ein charakteristisches Diffraktionsmuster am Detektor (Abbildung verändert nach [91]).

Der Kristall konzentriert die gesamte gestreute Intensität der Strahlung

in den Beugungsmaxima. Die Erklärung für die Position der einzelnen Reflexe liefert der Braggsche Ansatz den Abbildung 6.5 darstellt.

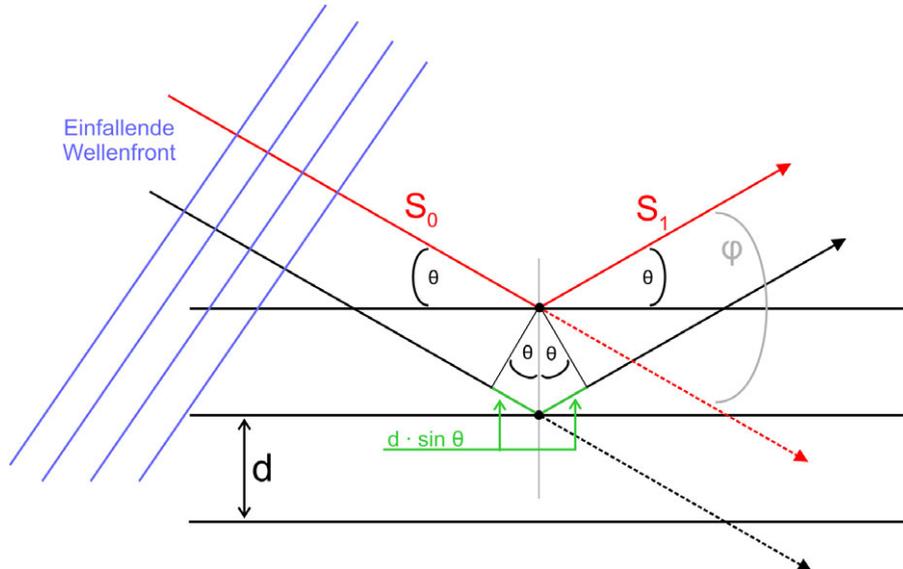


Abbildung 6.5: Geometrie bei der Bragg-Reflexion wobei S_0 =einfallender Strahl, S_1 =reflektierter Strahl, d =Abstand der Ebenen der Schar, Θ =Reflexionswinkel und φ =Streuwinkel bedeuten. Zu konstruktiver Interferenz kommt es, wenn der Gangunterschied zwischen zwei Atomen zweier benachbarter Ebenen der Schar abgelenkter Strahlen gleich Null ist (Abbildung verändert nach [92]).

Dabei wird der Streuvorgang am Kristall als Brechung bzw. Reflexion an einer Schar paralleler Gitterebenen (Netzebenenschar) aufgefasst. Die Indizes h , k und l (Miller-Indizes) ermöglichen eine eindeutige Benennung jeder beliebigen Ebenenschar, aus der ihre Orientierung relativ zu den Vektoren a , b und c und ihr spezifischer Abstand d abgeleitet werden kann. Zu konstruktiver Interferenz, d. h. zu den abgebildeten Beugungsmaxima (Reflex), kommt es, wenn der Gangunterschied Δs zwischen zwei an den Atomen zweier benachbarter Ebenen der Schar abgelenkter Strahlen gleich Null ist (vgl. Abbildung 6.5), bzw. einem ganzen Vielfachen der Wellenlänge λ entspricht, also:

$$\Delta s = 2 \cdot d \cdot \sin \Theta \quad (6.2)$$

bzw.

$$2 \cdot d \cdot \sin\Theta = n \cdot \lambda \quad (6.3)$$

wenn ($n=1,2,3, \dots$), d =Abstand der Ebenenschar und Θ =Reflexionswinkel bedeuten. Damit kann der Winkel des einfallenden bzw. reflektierten Strahls mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\sin\Theta = \frac{n \cdot \lambda}{2 \cdot d} \quad (6.4)$$

Diese Zusammenhänge erklären die Tatsache, dass Beugungsmaxima nur bei bestimmten Einfallswinkeln (Glanzwinkel) der Röntgenstrahlung möglich sind. Bei gegebener Wellenlänge hängt der „richtige“ Winkel vom Ebenenabstand der betreffenden Ebenenschar ab, wobei die Bedingung $\lambda/2 < d$ erfüllt sein muss. Nach dem Braggschen Gesetz entspricht der Beugungswinkel Θ_{max} dem kleinsten beobachtbaren Ebenenabstand d_{min} , der als Auflösung einer Kristallstruktur bezeichnet wird:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \sin\Theta_{max}} \quad (6.5)$$

Bei Proteinkristallen spricht man ab einer Auflösung von 2 Å von einer hochaufgelösten Struktur.

Tatsächlich ist die Beugung des Primärstrahls das Ergebnis der Interferenz von allen Röntgenstrahlen, die von sämtlichen Atomen im Kristall reflektiert werden. Um möglichst viele Kristallebenen im Glanzwinkel zum Primärstrahl zu orientieren, bestrahlt man den Kristall mit Röntgenstrahlen aus verschiedenen Winkeln, bzw. dreht der Einfachheit halber den Kristall im Strahl. Aus der Summe der Informationen über Lage und Abstand der Ebenenscharen aus der Analyse des Reflexmusters kann auf die Geometrie und Orientierung des Translationsgitters im Kristall geschlossen werden. Besitzt der Kristall eine hohe Symmetrie, sind viele Reflexe im detektierten Diffraktionsmuster symmetrieverwandt. Als unabhängig werden die Reflexe bezeichnet, die sich nicht durch Symmetrieoperatio-

nen ineinander überführen lassen. Aus verschiedenen Gründen, z. B. zu geringer Intensität, können häufig nicht alle unabhängigen Reflexe detektiert werden. Die Zahl der tatsächlich ermittelten unabhängigen Reflexe im Verhältnis zur maximal möglichen Anzahl aller unabhängigen Reflexe wird als Vollständigkeit des Datensatzes bezeichnet. Gute Datensätze besitzen üblicherweise eine Vollständigkeit von $\geq 95\%$.

Nachdem experimentell die Basisinformationen über die Kristallstruktur (Größe der Einheitszelle, Raumgruppe) und die Intensitätsdaten ermittelt wurden, kann aus dem Strukturfaktor F unter Anwendung der Fouriertransformation die Elektronendichte berechnet werden. Die Intensität des gebeugten Strahls $I(hkl)$ ist proportional zum Quadrat der Strukturfaktoramplitude $F(hkl)$. Die Elektronendichte ρ an einem durch die Koordinaten x, y, z beschriebenen Punkt in der Einheitszelle ergibt sich aus der folgenden grundlegenden Gleichung:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (6.6)$$

Die Wellenlänge des Primärstrahls wird durch die Beugung am Kristallgitter nicht verändert und ist somit bekannt. Die Amplitude wird durch die relative Intensität der am Detektor aufgezeichneten Reflexe bestimmt. Die Information über die Phase, der dritten beschreibenden Größe einer elektromagnetischen Welle, fehlt. Dies ist das zentrale Problem der Röntgenstrukturanalyse.

6.4 Methoden zur Phasenbestimmung

Es gibt verschiedene Ansätze zur Bestimmung der messtechnisch nicht direkt zugänglichen Phaseninformation. Die Methode des isomorphen Ersatzes wird oft bei der Bestimmung neuer Proteinkristallstrukturen verwendet. Dazu werden die Proteinkristalle in Lösungen von Salzen oder Verbin-

dungen transferiert, die ein Atom oder Ion mit hoher Massenzahl enthalten. Die Schweratomverbindungen diffundieren in den Kristall und binden an die Proteinoberfläche. Dabei ist es wichtig, dass durch die Bindung des Schweratoms keine Veränderung der Proteinstruktur oder der Packung der Proteinmoleküle im Kristall bewirkt wird (Isomorphie). Durch ihre größere Zahl an Elektronen streuen die Schweratome Röntgenstrahlen stärker. Die durch die Schweratomposition erhaltene Phaseninformation erlaubt eine grobe Abschätzung der Phasen für die Proteinstruktur (SIR = single isomorphous replacement). Die Kombination der Phaseninformation aus verschiedenen Derivatkristallen wird MIR (multiple isomorphous replacement) genannt.

Eine weitere *de novo* Methode zur Strukturbestimmung beruht auf der anomalen Streuung von Röntgenstrahlen und heißt multiple anomale Dispersion (MAD). Die Bindung von bestimmten Atomen (z.B. Schwermetallen) bewirkt, dass zwei Reflexe, die durch Inversionssymmetrie miteinander verknüpft sind (Friedel-Paar), keine identischen Intensitäten besitzen. Die gebundenen Schwermetalle verursachen durch Beteiligung der inneren Elektronen am Streuvorgang anomale Dispersion durch eine Phasenverschiebung. Aus den auftretenden Phasenunterschieden der Friedel-Paare lässt sich eine Phaseninformation ableiten. Da die anomale Dispersion wellenlängenabhängig ist, werden mehrere Datensätze bei unterschiedlichen Wellenlängen an einem einzigen Kristall aufgenommen.

Der molekulare Ersatz (MR = molecular replacement) wird angewandt, wenn bereits ein dreidimensionales Strukturmodell der gleichen oder einer homologen Verbindung vorhanden ist. Aus den Koordinaten der bekannten Proteinstruktur können die Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) und die Phasen (α_{calc}) für das unbekannte Modell berechnet werden. Mit den anhand des bekannten Modells berechneten Phasen und den gemessenen Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) kann die Elektronendichtekarte der unbekanntes Struktur nach weiteren Verfeinerungsschritten ermittelt werden. Damit

diese Methode erfolgreich ist, ist eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Modell und gesuchter Struktur notwendig. Sie findet beispielsweise bei der Strukturaufklärung einer ortsspezifischen Mutante im Vergleich zum Wildtypprotein oder bei strukturell sehr ähnlichen Proteinen häufig Anwendung.

Konnte mit Hilfe einer der oben aufgeführten Methoden erfolgreich die Phase des Primärstrahls bestimmt werden, fließen die Informationen über die Phasenwinkel $\alpha(hkl)$ bei der Berechnung der Elektronendichtekarte mit ein und erweitern Gleichung 6.6 zu:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz+i\alpha(hkl))} \quad (6.7)$$

.

6.5 Interpretation der Elektronendichtekarte

Anhand der berechneten Elektronendichteverteilung kann ein dreidimensionales Modell der Proteinstruktur erstellt werden. Die Interpretation der Elektronendichtekarte erfolgt am Bildschirm, indem manuell interaktiv Polypeptidfragmente oder Aminosäuren hineinmodelliert werden. Die Qualität ist abhängig vom Fehler der berechneten Phasen und der Auflösung der Beugungsdaten. Bei 6 Å sind Sekundärstrukturen zu erkennen, ab 4 Å ist das Proteinrückgrat zu sehen. Unterhalb von 3 Å sind Seitenketten sichtbar. Das Modell wird so lange modifiziert und verfeinert, bis die gesamte zusammenhängende Dichte erklärt wird, bzw. die gesamte Sequenz des Proteins und alle bekannten Kofaktoren umfasst.

Die in diesem Zusammenhang angegebenen Reliability-Faktoren (R-Faktoren) sind Indikatoren für die Daten- und Modellqualität. Sie sind ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem berechneten Modell und den experimentellen Messdaten. Je kleiner die R-Faktoren, desto besser

das Modell. Deren Berechnung liegt folgende Gleichung zugrunde:

$$R = \frac{\sum || F_{obs} | - | F_{calc} ||}{\sum | F_{obs} |} \quad (6.8)$$

Im Laufe des Verfeinerungsprozesses des molekularen Modells werden unterschiedliche Faktoren, durch zusätzliche Indizes gekennzeichnet, berechnet. Ein Beispiel ist der R_{free} -Faktor der sich auf eine kleine Menge zufällig ausgewählter Reflexe bezieht. Der daraus resultierende Wert wird zu Beginn einer Strukturverfeinerung ermittelt und mit dem aus dem verfeinerten Modell erhaltenen Wert, welcher den gesamten Datensatz berücksichtigt verglichen. Anhand der Differenz kann entschieden werden, ob die Verfeinerung insgesamt zu einem verbesserten, passenderem Modell geführt hat. Ein für ein frühes, vorläufiges Modell berechneter R-Faktor von 0,4 (R=0,4 ist gleichbedeutend mit R=40%) ist vielversprechend und wird nach Anwendung verschiedener Verfeinerungsmethoden noch verbessert werden können. Für das Modell eines Makromoleküls, zu dessen Berechnung Daten mit einer Auflösung von bis zu 2,5 Å berücksichtigt werden konnten, ist ein R-Faktor von 0,2 wünschenswert.

7 Material und Methoden

7.1 Material

Allgemein

CaF ₂ -Fenster	Korth Kristalloptik, Kiel
DC Protein Assay Kit II	BioRad, München
Kolloidale Coomassie-Färbelösung: „Roti blue“, 5fach konz.	Roth, Karlsruhe
Konzentratoren (30000 MWCO): „Centriprep, Centricon, Microcon“	Millipore, Schwalbach
Laminierfolien „Perfex“	GMP Photographics, Polch
Mikroliterspritzen, gasdicht	Hamilton, Reno (USA)
„Oxisorb“ Großpatrone zur Gasnachreinigung	AirLiquide, Düsseldorf
IR-Transmissionszelle	Werkstätten, MPI Mülheim
Phast-Gel, 10-15% SDS	GE Healthcare, Freiburg
Protein Marker für SDS-PAGE: „Roti Mark 10-150 PLUS“	Roth, Karlsruhe
„LMW-SDS Marker Kit“	GE Healthcare, Freiburg
Pufferstreifen für SDS-Gele	GE Healthcare, Freiburg
Rotor „JLA 8.1000“	Beckmann Coulter, Krefeld
Rotor „JLA 10.500“	Beckmann Coulter, Krefeld
Ultrafiltrationsmembran „PM 30“	Millipore, Schwalbach
Ultrafiltrationszelle	Amicon, Witten

Aktivitätsmessungen

„High Sensitivity“-Membranen	Yellow Springs, Ohio (USA)
Hydrograph	F. Reikowski, MPI Mülheim
Messprogramm „Tracer DAQ“	Meas. Computing Corp., Middleboro (USA)
Rührer	IKA-Werke, Staufen
Temperierte Messzelle	Werkstätten, MPI Mülheim
Thermostat „E100“	Lauda, Königshofen

„YSI 5331 Oxygen Probe“	Yellow Springs, Ohio (USA)
<i>FPLC</i>	
Leersäule XK 26/20	GE Healthcare, Freiburg
Leersäule XK 26/70	GE Healthcare, Freiburg
Leersäule XK 50/60	GE Healthcare, Freiburg
Leersäule Index 100/500	GE Healthcare, Freiburg
Toyopearl DEAE 650 C	Tosoh Biosciences, Stuttgart
Phenylsepharose CL4B	GE Healthcare, Freiburg
Ultrogel AcA 44	Biosepra, Dreieich
HiLoad 16/10 Q Sepharose HP	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare, Freiburg
<i>Kristallisation</i>	
Crystal Screens:	
- Cryo I sparse matrix	Emerald BioSystems, Bainbridge Island (USA)
- Cryo II sparse matrix	Emerald BioSystems, Bainbridge Island (USA)
- 2	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
- Cryo	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
- Wizard I random sparse matrix	Emerald BioSystems, Bainbridge Island (USA)
- Wizard II random sparse matrix	Emerald BioSystems, Bainbridge Island (USA)
Grid Screens:	
- A/S	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
- MPD	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
- PEG 6000	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
Crychem Plate (24 well)	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
Crystal Cap Copper	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
Crystal Clear Sealing Tape	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
Crystal Clear Strips	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
Mounted Cryo Loop	Hampton Res., Aliso Viejo (USA)
Stereomikroskop MZ12.5	Leica Microsystems, Wetzlar
<i>Soxhlet-Extraktion-Destillation</i>	
Destillationsbrücke	Schott, Mainz
Dreihalskolben	Glasbläserei, MPI Mülheim
Extraktionshülsen	Schleicher und Schuell, Dassel
Kryostat „RK20“	Lauda, Königshofen
Pumpenschlauch „Norprene“	Novodirekt, Kehl/Rhein
Schlauchpumpe	Gilson, Middleton (USA)
Soxhlet-Extraktor	Schott, Mainz

Steigrohr	Schott, Mainz
Zweihalskolben	Glasbläserei, MPI Mülheim

Gase

Argon 4.0	AirLiquide, Krefeld
Formiergas (95% N ₂ , 5% H ₂)	AirLiquide, Krefeld
H ₂ /He-Gemisch (1% H ₂ , Rest He)	AirLiquide, Krefeld
Kohlenmonoxid 4.7	AirLiquide, Krefeld
Kulturgas (95% N ₂ 5.0, 5% CO ₂ 4.5)	AirLiquide, Krefeld
Sauerstoff 4.0	AirLiquide, Krefeld
Stickstoff 4.0	AirLiquide, Krefeld
Wasserstoff 5.0	AirLiquide, Krefeld

Chemikalien

1,1-Dibenzyl-4,4-bipyridindichlorid (Benzylviologen)	Sigma-Aldrich, Seelze
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Na-Dithionit (ca. 85%, techn.)	Sigma-Aldrich, Seelze
Triton X-100	Roth, Karlsruhe

Allgemein gebräuchliche Laborchemikalien werden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Acros Organics (Geel (B)), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Seelze) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

7.2 Laborgeräte*Allgemein*

Anaerob-Zelt mit Zubehör	Töpfer, Göppingen
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Holzner, Nußloch
Elektrophoreseapparatur „PhastSystem“	GE Healthcare, Freiburg
FPLC-System „Äkta Basic“	GE Healthcare, Freiburg
Fraktionssammler „Frac-950“	GE Healthcare, Freiburg
Kühlbrutschrank	Memmert, Schwabach
Kühlzentrifuge „Avanti J20XP“	Beckmann-Coulter, Krefeld
Kühlzentrifuge „EBA 12R“	Hettich AG, Bäch (CH)
Laborkühlschrank „Profi-Line“	Liebherr, Ochsenhausen
Laminiergerät „ID/4“	Attalus, Athen (G)
Laborspülmaschine	Miele, Gütersloh
Membranpumpe „V500“	Büchi, Flawil (CH)
pH-Meter	Knick, Berlin
Rotationsverdampfer „R124“	Büchi, Flawil (CH)

Sterilbank „Microflow“	NUNC, Wiesbaden
Ultraschallbad „Sonorex RK106“	Bandelin electronic, Berlin
UV/Vis-Spektrometer: „Unicam UV2“	ATI Unicam, Cambridge (UK)
Wasseraufbereitungsanlage „MilliQ“	Millipore, Bedford (USA)
<i>Bakterienkultur</i>	
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick, Berlin
Schnell-Zentrifuge „Z41“	C. Padberg Zentrifugenbau, Lahr
Kreiselpumpe „CH 4-20“	Grundfos, Erkrath
1100 L Glasfermenter	Werkstätten, Uni Amsterdam (NL) und MPI Mülheim
60 L Glasfermenter	Werkstätten, Uni Amsterdam (NL) und MPI Mülheim
<i>Spektroskopie</i>	
FT-IR-Spektrometer: „IFS 66 v/s“	Bruker Optics, Ettlingen
Lufttrocknung „KEN30“	Zander, Essen
MCT Detektor „KMPV“	Kolmar Technologies, Newburyport (USA)
Thermostat „RML6“	Lauda, Lauda-Königshofen
EPR X-Band-Spektrometer: „ESP 380 E“	Bruker Biospin, Rheinstetten
MALDI-TOF Massenspektrometer: „Voyager-DE PRO Workstation“	Applied Biosystems, Darmstadt

Alle nicht gesondert aufgeführten Laborgeräte entsprechen dem allgemeinen Laborstandard.

7.2.1 Puffer und Lösungen

Proteinpräparation

<i>Extraktionspuffer</i>	50 mM 2 %	Tris, pH 7,4 Triton X-100
<i>Puffer für Säule 1 (IEX)</i>		
Puffer A	50 mM Tris, pH 7,4	
Puffer B	50 mM Tris, pH 7,4	600 mM NaCl
<i>Puffer für Säule 2 (HIC)</i>		
Equilibrierung	50 mM Tris, pH 8,0	150 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
Puffer A	50 mM Tris, pH 8,0	50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
Puffer B	5 mM Tris, pH 8,0	

Puffer für Säule 3 (SE)

Puffer A	50 mM Tris, pH 8,0	100 mM NaCl
----------	--------------------	-------------

Puffer für Säule 4 (IEX)

Puffer A	50 mM Tris, pH 8,0	
Puffer B	50 mM Tris, pH 8,0	1 M NaCl

Puffer für Säule 5 (SE)

Puffer A	50 mM Tris, pH 8,0	100 mM NaCl
----------	--------------------	-------------

SDS-PAGE

<i>Färbelösung</i>	60%	H ₂ O
	20%	Methanol
	20%	„Roti blue“-Lsg., 5fach konz.

<i>Entfärbelösung</i>	25%	Methanol
	75%	H ₂ O

<i>Konservierlösung</i>	10%	Glycerin
	20%	Ethanol
	70%	H ₂ O

<i>SDS-Probenpuffer</i>	10 mM	Tris, pH 8,0
	1 mM	Na ₂ -EDTA
	2,5%	SDS (w/v)
	0,01%	Bromphenolblau (w/v)
	5%	2-Mercaptoethanol
	1 M	Harnstoff

Aktivitätsmessungen

BV-Lösung	200 mM	Benzylviologen in H ₂ O
Dithionit-Lsg.	930 mM	Na-Dithionit in Puffer
Elektrodenlagerung	3 M	KCl
Puffer	50 mM	Tris, pH 8,0

7.2.2 Medien**Medien für 1 L bzw. 60 L Kulturen**

<i>Medium A</i>	30 g/L	NH ₄ Cl
<i>30fach konz.</i>	15 g/L	KH ₂ PO ₄
	15 g/L	MgCl ₂ · 6H ₂ O

	4 g/L	CaCl ₂ · H ₂ O
	152 mL	36% HCl
	39 mL	Spurenelementlsg., 1fach konz.
	30 mL	Eisen-EDTA Lsg.
<i>Medium B</i>	180 g/L	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O
<i>30fach konz.</i>	189 g/L	Na ₂ CO ₃
	1,5 g/L	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O
<i>Eisen-EDTA Lösung</i>	50 g/L	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O
<i>pH 6,5</i>	4 g/L	FeSO ₄ · 2H ₂ O
<i>Spurenelementlösung</i>	5 g/L	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O
<i>1fach konz.</i>	880 mg/L	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O
	440 mg/L	ZnSO ₄ · 7H ₂ O
	250 mg/L	CoCl ₂ · 6H ₂ O
	20 mg/L	CuSO ₄ · 5H ₂ O
	20 mg/L	MnSO ₄ · 4H ₂ O
	2,4 g/L	NiCl ₂ · 4H ₂ O

Medium für 1100 L Kultur

<i>Salze</i>	1100 g	NH ₄ Cl
	550 g	KH ₂ PO ₄
	550 g	MgCl ₂ · 6H ₂ O
	150 g	CaCl ₂ · H ₂ O
	6930 g	NaHCO ₃
	2840 g	NaCl
<i>Lösungen</i>	140 mL	Spurenelementlsg., 8fach konz.
	1100 mL	Eisen-EDTA Lsg.
	7000 mL	4,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O-Lsg.

7.3 Methoden

7.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird quantitativ, kolorimetrisch bzw. photometrisch mit dem kommerziell erhältlichen DC Protein Assay Kit II (BioRad, München) ermittelt, welches auf der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry beruht [93].

Zunächst wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Standardprote-

ins (Rinderserumalbumin) eine Eichgerade aufgenommen. 4 mL Reagenz B (verdünntes Folin-Reagenz) werden in Reagenzgläsern vorgelegt. 100 μL der Proteinstandards bzw. der zu untersuchenden Proben (evtl. Verdünnungen hoch konzentrierter Lösungen) werden mit 500 μL Reagenz A (alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung) gemischt, zum Reagenz B gegeben und 15 min bis zur vollständigen Farbausbildung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Lösungen wird in 1,5 mL Küvetten mit dem UV/Vis-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Als Referenz und Bestimmung des Nullwerts wird eine mit 100 μL dest. Wasser angesetzte Probe verwendet. Mit Hilfe der Geradengleichung, die sich aus der graphischen Auftragung der gemessenen Absorptionen für die Standardproteine ergibt, wird die Gesamtproteinkonzentration der zu untersuchenden Proben errechnet. Es wird eine Dreifachbestimmung der Proben durchgeführt.

7.3.2 SDS-PAGE

Um den Reinheitsgrad bzw. die Qualität von Proteinproben abschätzen zu können, werden diese mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu werden die Proben mit Probenpuffer (vgl. Kapitel 7.2.1) versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend mit Hilfe eines Probenkamms auf ein SDS-Gradient-Gel (10-15%) aufgetragen. Die Größenbestimmung erfolgt durch Vergleich der Proben mit gleichzeitig aufgetragenen Protein-Standard-Markern, die Proteine mit bekanntem Molekulargewicht beinhalten. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 250 V bzw. 10 mA und einer Temperatur von 15 °C in der Elektrophoreseapparatur „PhastSystem“. Das Gel wird anschließend mindestens zwei Stunden in Färbelösung inkubiert. Entfärbt wird das Gel ca. 40 min, wobei die Entfärbelösung einmal erneuert wird. Zuletzt wird es 10 min konserviert, über Nacht getrocknet und schließlich zur dauerhaften Aufbewahrung laminiert. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist in Kapitel 7.2.1 aufgeführt.

7.3.3 Herstellung von Gefrierkulturen

Um die Bakterien dauerhaft zu lagern und um bei Verlust oder Kontamination der in Flüssigkultur verwendeten Bakterien auf unversehrte Ansätze zurückgreifen zu können, werden Gefrierkulturen hergestellt, die in flüssigem Stickstoff oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden.

Zur Herstellung von Gefrierkulturen mit phototrophen Bakterien unter anaeroben Bedingungen [94] werden 1 mL bis zur mittleren- bis spät-logarithmischen Phase gewachsene Zellen 30 min bei 4000 *g* abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Sediment wird in 1 mL eiskalter DMSO-Lösung (5% v/v in H_2O) resuspendiert, 15 min im Eis-Wasserbad äquilibriert und schließlich ins Kryogefäß überführt. Die Ansätze werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Um die Gefrierkulturen aufzutauen werden diese in einem auf $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiertes Wasserbad gestellt. 5-10 mL Flüssigmedium werden mit 0,05 mL Gefrierkultur in einem sterilen Glasröhrchen angeimpft.

7.3.4 Indirekte Gesamtzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl zur Kontrolle des Zellwachstums durch spektroskopische Messung der Trübung werden unter sterilen Bedingungen 1 mL Proben des zu untersuchenden Ansatzes genommen. Die optische Dichte wird in Einmalküvetten im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen Medium bestimmt. Proben mit hohen Zelldichten werden auf eine optische Dichte zwischen 0,1 und 0,9 mit Medium verdünnt und anschließend die Extinktion bestimmt.

7.3.5 Herstellung von Proteinproben für die Spektroskopie

Das Gesamtvolumen von Proteinproben, die mit der Transmissionszelle im FT-IR-Spektrometer vermessen werden, beträgt $50\text{ }\mu\text{L}$. Zur Präparation der EPR-Proben werden mindestens $80\text{ }\mu\text{L}$ eingesetzt. Die Proteinlösun-

gen besitzen, unabhängig von der spektroskopischen Methode, Konzentrationen zwischen 800 μM und 1 mM.

Ist während der Präparation der Wechsel des Puffers erforderlich, wird dazu die Probe mit dem gewünschten Puffer zunächst auf das 10fache verdünnt und anschließend unter Verwendung von Mikrokonzentratoren in der Kühlzentrifuge bei 4 °C auf das Ausgangsvolumen aufkonzentriert. Der Vorgang wird mindestens 5 mal wiederholt.

Während der Inkubationszeiten befinden sich die Proben in einem mit Gummistopfen und Aluminiumkappe gasdicht verschlossenen Injektionsgefäß und werden mit Hilfe eines Teflonrührstäbchens kontinuierlich durchmischt. Der Gasaustausch erfolgt mit Hilfe einer angeschlossenen Membranpumpe über ein Gasverteilungssystem. Alle verwendeten Gase werden zur vollständigen Entfernung von Sauerstoff über eine Oxisorb-Großpatrone geleitet, bevor sie bei der Probenpräparation eingesetzt werden.

Ni-A

Um die Hydrogenase in den Ni-A Zustand zu bringen, wird eine entsprechende Menge Protein vom Lagerpuffer (50 mM Tris, pH 8,0) in 25 mM MES-Puffer pH 6,0 überführt. Anschließend wird das Enzym 30 min bei 45-50 °C im Wasserbad mit Wasserstoffgas aktiviert, d. h. reduziert. Nach erfolgter Reduktion wird die Proteinlösung mit CO-Gas gesättigt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgt die Rückoxidation in den Ni-A Zustand durch Luftsauerstoff bei geöffnetem Reaktionsgefäß innerhalb weiterer 30 min bei einer Temperatur von 50 °C. Die Proteinlösung wird für die FT-IR-Messungen in die Transmissionszelle bzw. mit Hilfe einer langen Kanüle in das EPR-Röhrchen überführt.

Ni-B

Zur Einstellung des Ni-B Zustandes wird eine entsprechende Proteinmenge zunächst in 25 mM CAPSO-Puffer pH 9,0 umgepuffert. Das Enzym wird im gasdicht verschlossenen Gefäß für 30 min im 45-50 °C warmen Wasserbad unter Wasserstoffgas inkubiert. Anschließend wird die Probe im Eis-Wasserbad abgekühlt und durch Zugabe der zehnfachen Probenmenge von eiskaltem, sauerstoffgesättigtem CAPSO-Puffer zurück oxidiert. Es folgt die Reduktion des Probenvolumens auf die Ausgangsmenge und ein erneuter Pufferwechsel mit 50 mM Tris pH 8,0, bevor das Protein in die entsprechenden Messgefäße gefüllt wird.

Ni-SI

Um FT-IR-Spektren vom Protein im Ni-SI_r oder Ni-SI_a Zustand aufnehmen zu können, wird die Proteinprobe zunächst in einen Puffer mit entsprechendem pH-Wert überführt (Ni-SI_r: pH 9,0 bzw. Ni-SI_a: pH 6,0) und im gasdichten Gefäß mit Wasserstoffgas ca. 30 min lang bei 45-50 °C im Wasserbad reduziert. Die Proteinlösung wird unter anaerober Atmosphäre (Anaerob-Zelt, Töpfer) in die Transmissionszelle gefüllt und sofort mit der Messung begonnen. Da die Transmissionszelle nicht vollständig gasdicht ist, kann die langsame Rückoxidation von Ni-C zu Ni-SI_r bzw. Ni-SI_a mittels kontinuierlicher Aufnahme von Spektren mit jeweils 1000 Scans verfolgt werden. Bei einer eingestellten Messtemperatur von 30 °C dauert die Rückoxidation zu Ni-SI_a mindestens 120 min, nach ca. 540 min ist der Zustand Ni-SI_r erreicht.

Ni-C

Der Lagerpuffer des Proteins wird gegen 25 mM MES-Puffer pH 6,5 ausgetauscht und für 30 min im 45-50 °C warmen Wasserbad mit Wasserstoffgas aktiviert. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im geschlossenen Reaktionsgefäß wird die Probe im Anaerob-Zelt in die Transmissi-

onszelle oder das EPR-Röhrchen gefüllt. Die EPR-Probe wird in Dunkelheit im flüssigen Stickstoff eingefroren, um die Entstehung des lichtinduzierten Ni-L Zustands bei Temperaturen ≤ 150 K zu vermeiden.

Ni-R

Die vollständige Reduktion des Enzyms zum Ni-R Zustand erfolgt bei pH 8,0 durch 60 minütige Inkubation mit Wasserstoffgas im gasdichten Gefäß im 45-50 °C warmen Wasserbad. Als Indikator für eine vollständige Reduktion kann bei FT-IR-Messungen auch Methylviologen im Verhältnis 2:1 zur Proteinkonzentration zugegeben werden. Es erfolgt ein Farbumschlag der Probe von rotbraun zu dunkelblau. Die Befüllung der Transmissionszelle erfolgt im Anaerob-Zelt. Die Messung wird unmittelbar nach der Probenpräparation durchgeführt.

7.3.6 Messparameter cw-EPR

Die EPR-Messungen werden am cw-Spektrometer ESP380E (Bruker BioSpin, Rheinstetten) bei einer Frequenz von 9,5 GHz (X-Band) und einer Temperatur von 70 K (Ni-A, Ni-B) bzw. 40 K (Ni-C) durchgeführt. Die Temperierung der Proben im Standardresonator (ER4102ST) erfolgt mit einem Helium-Durchflusskryostaten und der Steuereinheit ITC503S (Oxford Instruments, Wiesbaden). Alle Messungen sind an gefrorenen Proteinlösungen durchgeführt worden (Pulverspektren).

Bei der Aufnahme des Ni-A Spektrums (Abbildung 10.1) beträgt die Mikrowellenfrequenz 9,46 GHz, die Mikrowellenstärke 2 mW, die Modulationsamplitude 1 mT (10 G) und die Modulationsfrequenz 100 kHz. Das Magnetfeld wird in einem Bereich von 260 mT (2600 G) bis 360 mT (3600 G) gescannt. Es werden 67 Scans aufgenommen und gemittelt.

Das Ni-B Spektrum (Abbildung 10.2) wird bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,45 GHz, einer Mikrowellenstärke von 2 mW, einer Modulationsamplitude von 0,6 mT (6 G) und einer Modulationsfrequenz von

100 kHz mit einem um 320 mT (3200 G) variierenden Magnetfeld (Variationsbereich 150 mT (1500 G)) aufgenommen. Insgesamt werden 51 Scans gemittelt.

Bei den gewählten Parametern zur Aufnahme des in Abbildung 10.3 dargestellten Ni-C Spektrums handelt es sich um: Mikrowellenfrequenz 9,45 GHz, Mikrowellenstärke 20 mW, Modulationsamplitude 1 mT (10 G) und Modulationsfrequenz von 100 kHz in einem um 340 mT (3400 G) variierenden Magnetfeld (Variationsbereich 200 mT (2000 G)). Dem Spektrum liegen 16 einzelne Scans zugrunde.

Die EPR-Spektren werden mit EasySpin [95], einem von Stoll und Schweiger entwickeltem Computerprogrammpaket für Matlab (MathWorks, Natick), simuliert. Die unter definierten Bedingungen gemessenen, experimentellen Werte (Magnetfeldstärke, Mikrowellenfrequenz) werden für die Berechnungen verwendet.

7.3.7 Messparameter FT-IR

Die Messungen werden am Bruker FT-IR-Spektrometer IFS 66v/S durchgeführt, welches mit einem Globar (Siliziumcarbidstift) als Strahlungsquelle und einem stickstoffgekühlten MCT-Detektor ausgestattet und auf einem schwingungsgedämpften Tisch positioniert ist. Das Michelson-Interferometer (vgl. Kapitel 5.2.2) besitzt einen Strahlenteiler aus KBr, die Spiegel sind mit Aluminium beschichtet. Die Messoptik des Spektrometers wird während der Messungen permanent evakuiert und die Probenkammer stetig mit wasser- und kohlendioxidarmer Trockenluft gespült. Die Messungen werden mit Hilfe eines angeschlossenen Computers und der herstellereigenen Software OPUS (Version 3.1, Bruker) ausgeführt.

Als IR-Küvette wird eine Transmissionszelle (Feinmechanikwerkstatt, MPI Mülheim), bestehend aus einem Metallrahmen, der zwei CaF-Fenster hält, verwendet. Diese ist durch einen angeschlossenen Thermostaten konstant temperierbar. Die Messungen werden bei 30 °C (Thermostattem-

peratur) durchgeführt. Zur Aufnahme eines Hintergrundspektrums, das jedem Proteinspektrum als Referenz dient, wird die Küvette mit dem entsprechenden Puffer ohne Protein gefüllt und unter gleichen Bedingungen gemessen. Die im Folgenden dargestellten Spektren sind einer Basislinienkorrektur unterzogen worden. Eingestellte Parameter sind: Apodisationsfunktion Blackman-Harris 3-Term; Phasenauflösung 32 cm^{-1} ; Phasenkorrekturmodus Mertz; Zerofillingfaktor 2; Spektrale Auflösung 1 cm^{-1} ; Aquisationsmodus Single Sided, Forward-Backward; Spiegelgeschwindigkeit 20 kHz; Apertur 1,5 mm.

8 Kultivierung von *Allochromatium vinosum*

Damit die [NiFe]-Hydrogenase in ausreichender Menge für die Kristallisation und die Anwendung spektroskopischer Methoden wie EPR oder FT-IR zur Verfügung steht, ist eine entsprechend große Ausgangsmenge Zellmaterial Voraussetzung, aus der das in geringem Maße exprimierte Protein isoliert werden kann. Um diese bereit zu stellen, ist die effiziente Anzucht des bakteriellen Organismus in einem 1100 L Glasfermenter entwickelt worden.

Das folgende Kapitel beschreibt erstmalig die Kultivierung der photosynthetischen, anaeroben Bakterien *Allochromatium vinosum* im 1100 L Maßstab. Es stellt die Methodenentwicklung, angefangen bei der Herstellung der Vorkulturen, dem Aufbau des Fermenters, der Schaffung und Optimierung der Wachstumsbedingungen bis hin zur Bestimmung des Erntezeitpunktes und der Logistik der Zellernte, dar.

8.1 1 L und 60 L Vorkulturen

Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Mediums zur Kultivierung des bakteriellen Organismus *A. vinosum* basiert auf einer 1955 von Hendley beschriebenen Methode zur Anzucht von phototrophen, anaerob wachsenden Schwefel-Purpurbakterien [96]. Das dem Medium zugesetzte Natriumthiosulfat dient den Bakterien als Schwefelquelle bzw.

als Elektronendonator für die anaerobe Photosynthese. Dabei entstehender elementarer Schwefel wird in Vesikeln im periplasmatischen Raum innerhalb der Zelle gespeichert. Als Kohlenstoffquelle werden das angebotene Natriumcarbonat bzw. Natriumhydrogencarbonat und CO₂ genutzt.

Die in Kapitel 7.2.2 aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen der Medien A und B werden in dest. Wasser gelöst und separat autoklaviert. Die Eisen-EDTA Lösung und die Spurenelementlösung (Zusammensetzung nach Larsen [97] mit erhöhter Nickelkonzentration) werden ebenfalls entsprechend der Angaben in Kapitel 7.2.2 mit dest. Wasser angesetzt.

Zur Herstellung von 1 L Vorkulturen werden 33 mL 30fach konz. Medium A in einer Glasflasche mit dest. Wasser auf ein Volumen von 967 mL verdünnt. Dieser Ansatz wird mit 33 mL 30fach konz. Medium B versetzt und durch mehrmaliges Wenden der Flasche vermischt. Der verbleibende Platz in der Glasflasche wird mit ca. 120 mL Bakterienkultur im exponentiellen Wachstumsstadium aufgefüllt und mit einem Deckel fest verschlossen. Das Gesamtvolumen der so angesetzten Vorkulturen beträgt insgesamt ca. 1120 mL. Durch das nahezu vollständige Auffüllen der Flaschen wird die verbleibende Gasphase auf ein Minimum reduziert, so dass die Kultur anaerob gehalten werden kann. Die auf diese Weise angeimpften Vorkulturen werden mit einer 100 W Glühbirne im klimatisierten Laborraum belichtet. Befinden sich die Bakterienkulturen nach ein bis zwei Tagen Wachstumszeit in einem „milchigen Stadium“, können sie bei 4 °C in Dunkelheit bis zu ein Jahr gelagert werden. In diesem Stadium sind die Kulturen hellrot bis rosa gefärbt und trüb. Lässt man sie weitere 4-5 Tage wachsen, bekommen die Kulturen eine dunkelrote Farbe und können als Inokulum neuer Ansätze verwendet werden. Teil a der Abbildung 8.1 zeigt fünf 1 L Flaschen, die am Folgetag zum Animpfen einer 60 L Vorkultur verwendet wurden.

Bevor der 60 L Glasfermenter angeimpft werden kann, wird dieser mit voll entsalztem (VE-)Wasser und 18,5 mL Natriumhypochloritlösung

(NaClO in H₂O, 13% wirksames Cl) gefüllt und mindestens 12 Stunden mit Leuchtstoffröhren belichtet, die an den Längsseiten angebracht sind (2x4 je 40 W), und somit chemisch sterilisiert. Zudem wird das Medium auf die gewünschte Temperatur von 30 °C erwärmt. Das in kleinen Mengen entstehende Chlorgas und der verbliebene Sauerstoff werden durch Einleiten von Kulturgas (95% N₂ 5.0, 5% CO₂ 4.5) entfernt, wodurch eine anaerobe Atmosphäre entsteht. Durch das Einleiten des Gases über ca. 30 cm lange Glasfritten zu beiden Enden des rechteckigen Fermenters wird zudem eine Durchmischung des Mediums bzw. der Bakterienkultur erreicht. Der Fermenter ist auf einem 1,20 m hohen Gestell montiert, um die Bakterienkultur vollständig über den auf der Unterseite angebrachten Auslasshahn und eine sterile Schlauchverbindung in das 1100 L Becken überführen zu können.

Zwei Liter 30fach konz. autoklaviertes Medium B werden über einen sterilen Trichter zu 51 L dest. Wasser in den 60 L Glasfermenter gegeben. Nach ausreichender Durchmischung erfolgt die Zugabe von zwei Litern Medium A. Weicht der gemessene pH-Wert des Mediums vom Sollwert 7,6 ab, wird dieser nachträglich durch Zugabe von konz. Salzsäure eingestellt. Bevor die fünf Vorkulturen im exponentiellen Wachstumsstadium zugegeben werden, wird durch das vorbereitete Medium nochmals 30 min lang Kulturgas geleitet, um einen vollständig anaeroben Ansatz zu gewährleisten. Über die in die Kultur eingetauchte pH-Elektrode wird kontinuierlich der pH-Wert und die Temperatur kontrolliert. Abbildung 8.1 (rechte Seite) zeigt den 60 L Glasfermenter mit Bakterienkultur zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase.

8.2 1100 L Hauptkultur

Bei dem in dieser Arbeit erstmalig verwendeten 1100 L Fermenter handelt es sich um eine belichtete Glaskonstruktion zur Kultivierung photosynthetischer, anaerober Bakterien im Großmaßstab. Bei der Installation



Abbildung 8.1: a: 1 L Kulturen, b: Angeimpfter, belichteter 60 L Glasfermenter mit Gasansätzen und pH-Elektrode.

mussten die verschiedenen Bedingungen und Vorgaben zur Belichtung, Temperierung, Durchmischung, Anaerobizität, Sterilisation, Dichtigkeit, Bereitstellung ausreichender Wassermenge, Auffangmöglichkeit bei Undichtigkeit, Logistik der Ernte und die Laborsicherheit berücksichtigt und der Fermenter entsprechend individuell angepasst werden. Im Folgenden werden die technische Konstruktion des Fermenters, die Herstellung des Mediums und die Ernte der Bakterienkultur beschrieben.

8.2.1 Konstruktion des 1100 L Fermenters

Die einzelnen 12 mm starken Glasscheiben, aus denen sich das Becken zusammensetzt, werden mit Silikonkleber abgedichtet, der insbesondere bei der Verwendung hochkonzentrierter Salzlösungen empfohlen wird (Beyer J. GmbH, Lohmar). Das Becken wird mit 6 Glasdeckeln verschlossen (8 mm Stärke), die den mit einer Silikondichtung versehenen Seitenwänden aufliegen. Auf den Deckeln sind verschließbare Glasstutzen angebracht, über die die sterile Probenzugabe oder -entnahme, die Messung des pH-Wertes und die Gaszufuhr bzw. der Gasaustritt erfolgt. Die notwendige Menge VE-Wasser wird aus der hauseigenen Wasserversorgungsanlage zur Verfügung gestellt. Die Glaskonstruktion steht auf einer Grundplatte, die

wiederum auf einem 50 cm hohen Metallgestell montiert ist. Zur Schadensbegrenzung im Falle einer Undichtigkeit wird eine Auffangwanne unterhalb des Beckens installiert, an das ein Meldesystem gekoppelt ist, welches bei Flüssigkeitsaustritt Alarm auslöst. Die Sterilisation erfolgt wie bei der 60 L Vorkultur direkt im Becken unter Verwendung von Natriumhypochloritlösung.

Das Fassungsvermögen des Fermenters beträgt maximal $1,12\text{ m}^3$ bei einer Gesamthöhe von 60 cm. Abbildung 8.2 stellt die Konstruktion mit Maßangaben schematisch dar.

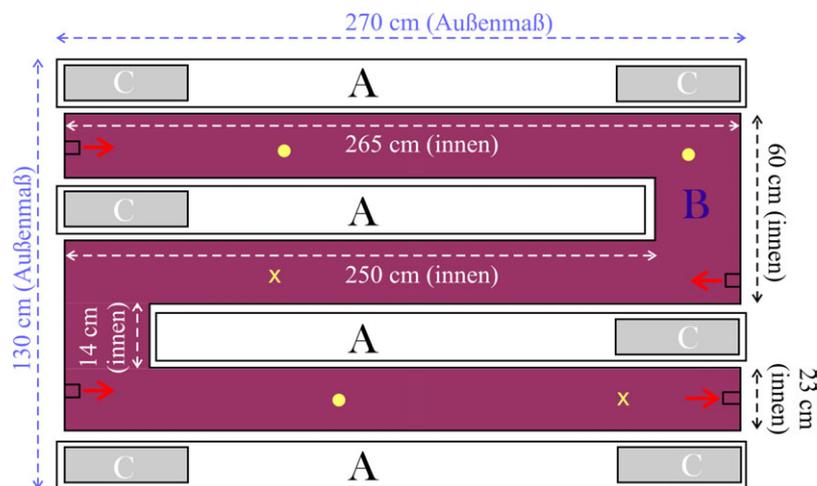


Abbildung 8.2: Schematische Darstellung des 1100 L Fermenters: A=Belichtungseinheit mit jeweils vier 185 W Leuchtstoffröhren, B=Fermenterinnenraum, C=Anlasser für Leuchtstoffröhren. Pumpeneinlass und -auslass sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die Glasstutzen für die pH-Wert Messung und die sterile Probenzugabe bzw. -entnahme sind mit einem gelben Punkt, der Gasein- bzw. Gasauslass ist mit einem gelben Kreuz gekennzeichnet.

Die Belichtung erfolgt mit vier Lampeneinheiten (vgl. Abbildung 8.2), die ihrerseits aus jeweils vier 185 W Leuchtstoffröhren (F96PG17/CWX, GE Lighting) bestehen. Die Rückseiten der beiden äußeren Belichtungseinheiten sind mit reflektierendem Metall verkleidet. Die durch die Leuchtstoffröhren erzeugte Wärme wird durch seitlich angebrachte Ventilatoren aus dem Raum zwischen Röhren und Glasscheiben abgeführt. Überdies

ist eine Klimaanlage im Laborraum installiert worden, welche die gesamte Raumluft umwälzt und kühlt. Sind alle Belichtungseinheiten, Ventilatoren und die Klimaanlage in Betrieb, ist die Bakterienkultur optimal auf 30 °C temperiert.

Um die Bakterien ausreichend und möglichst vollständig mit Licht zu versorgen, ist ein schlangenförmiger Aufbau gewählt worden. Auf diese Weise wird die Belichtungsfläche im Vergleich zu einem einfachen, würfelförmig angelegten Becken von einem Kubikmeter Fassungsvermögen und vier belichteten Seitenteilen mehr als verdoppelt. Beträgt die theoretisch belichtete Fläche beim würfelförmigen Becken etwa 4 m², ergibt sich für die hier verwendete Konstruktion eine Belichtungsfläche von ca. 9,5 m², wobei zur Berechnung nur die den Lampen gegenüberliegenden Glasflächen berücksichtigt worden sind.

Mit Hilfe einer angeschlossenen Kreiselpumpe (CH 4-20, Grundfos) wird das Medium bzw. die Bakterienkultur in Intervallen umgewälzt. Wie in Abbildung 8.2 durch rote Pfeile angedeutet, wird das Medium bzw. die Bakterienkultur am unteren Ende des Beckens abgezogen, durch ein Rohrleitungssystem transportiert und an drei Punkten wieder hineingepumpt. Dadurch wird eine Durchmischung des Ansatzes erzielt und das Absinken der Zellen auf den Fermenterboden verhindert. Der Ansatz bleibt anaerob, indem ständig Kulturgas (vgl. Kapitel 7.1) über einen sterilen Gasfilter (Gaseinlass) eingeleitet wird. Überschüssiges Gas kann durch einen zweiten sterilen Gasfilter austreten (Gasauslass).

8.2.2 Ansetzen des Mediums und Animpfen

Das Medium zur Bakterienkultur im Großmaßstab wird in 950-1000 L VE-Wasser direkt im Becken angesetzt. Wird der Glasfermenter nicht genutzt, ist er mit VE-Wasser gefüllt, dem 115 mL Hypochloritlösung zugesetzt wurde, verschlossen und unbelichtet, um Fremdkontaminationen zu vermeiden.

Die in Kapitel 7.2.2 aufgeführten Chemikalien, ausgenommen das Natriumhydrogencarbonat, werden in mit VE-Wasser gefüllte 5 L Erlenmeyerkolben zunächst in Lösung gebracht, bevor sie ins 1100 L Becken gegeben werden. Erfolgt die Zugabe der Salze auf diese Weise, wird verhindert, dass sich ein Bodenbelag bildet, der sich nur sehr langsam auflöst. Das Natriumhydrogencarbonat wird portionsweise direkt im Becken im permanent umgewälzten VE-Wasser gelöst. Desweiteren werden 140 mL 8fach konz. Spurenelementlösung und 1100 mL Eisen-EDTA Lösung zugegeben. Der Ansatz wird mit VE-Wasser auf ein Volumen von ca. 1030 L aufgefüllt. Das vorbereitete Medium wird durch Zusatz von 250 mL Hypochloritlösung und eingeschalteter Belichtung mindestens 12 Stunden chemisch sterilisiert und gleichzeitig temperiert.

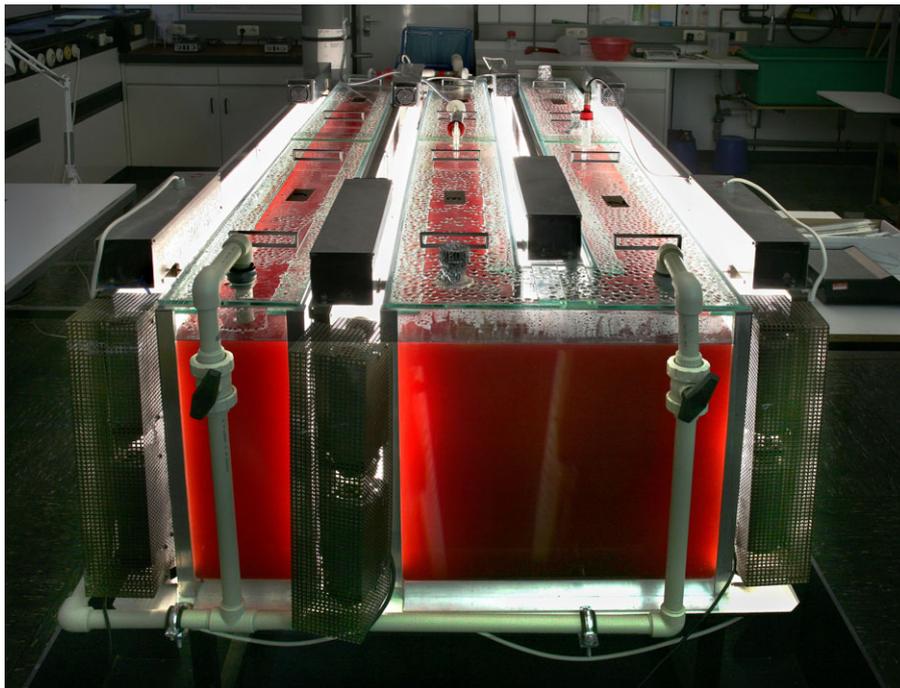


Abbildung 8.3: Belichteter 1100 L Fermenter nach ca. 144 h Wachstumszeit.

Am folgenden Tag werden 7 L sterile 4,1 M Natriumthiosulfatlösung und nach ausreichender Durchmischung und eventuell erforderlicher pH-Wert Einstellung 60 L Vorkultur im exponentiellen Wachstumsstadium zu-

gegeben. Abbildung 8.3 zeigt einen frisch angeimpften 1100 L Fermenter nach ca. 144 h Wachstumszeit. Auch im Falle des 1100 L Beckens werden die Temperatur und der pH-Wert ständig über die angebrachte pH-Elektrode gemessen und protokolliert. Während der gesamten Kultivierungszeit werden täglich zwei Proben genommen und die Gesamtzellzahl indirekt durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (vgl. Kapitel 7.3.4). Anhand der Wachstumskurven, die in Kapitel 8.3 dargestellt sind, wird die Zunahme der relativen Zelldichte verfolgt und der Zeitpunkt der Zellernte, die späte exponentielle Wachstumsphase, ermittelt.

8.2.3 Zellernte

Die 1100 L Bakterienkultur wird mit Hilfe der Schnell-Zentrifuge „Z41“ (CEPA, Lahr) geerntet. Die Durchsatzleistung der Durchflusszentrifuge beträgt bei eingebautem Bodenventil 250 L/h. Mit Hilfe der Kreiselpumpe wird die Kultur aus dem Fermenter über ein Rohrleitungssystem in einen auf ca. 2,50 m Höhe angebrachten Behälter gepumpt, damit die Kultur mit ausreichendem Gefälle der Zentrifuge zugeführt werden kann. Die Flüssigkeit wird kontinuierlich über eine Zuleitung durch die Düse im Fußlager eingespritzt. Der senkrechte Strahl aus der Einspritzdüse muss ca. 200 mm hoch in den Rotor hinein reichen, damit die Flüssigkeit nicht zurückläuft und aus dem Fußlager tropft. Ist die Düse „D4“ (Innendurchmesser 4 mm) im Bodenventil eingebaut, ist diese Bedingung erfüllt.

Der zylinderförmige Rotor (Trennzylinder) besitzt eine Drehgeschwindigkeit von maximal 20000 Umdrehungen pro Minute (17000 *g*) und fasst ca. 1 kg Zellmaterial. Der Trennzylinder wird mit einer PTFE-Folie ausgelegt, auf der sich das Produkt ablagert. Zur Entleerung wird die Folie herausgezogen und die Zellen abgestrichen. Die dem Rotor entnommenen Zellen werden in 500 g Portionen eingefroren und bei -20 °C gelagert. Tabelle 8.1 gibt einen Überblick über die Ausbeuten, die bei der Ernte ver-

Tabelle 8.1: Ausbeuten bei der Zellernte von 1100 L Bakterienkulturansätzen. Die Wachstumszeit ist in Stunden angegeben. Bei der Angabe der Zellmasse in kg handelt es sich um das ermittelte Nassgewicht der dem Rotor entnommenen Gesamtzellmenge. Die nicht aufgeführten Ansätze konnten aufgrund von Undichtigkeit des Beckens, defekter Pumpe oder abgestorbener Kultur (ungeeignete Wachstumsbedingungen) nicht geerntet werden. Ab Ansatz 15 wurde die CEPA-Zentrifuge „Z41“ verwendet.

<i>Nummer</i>	<i>Wachstumszeit</i> Stunden	<i>Ausbeute</i> Gewicht in kg
2	144	1,5
3	240	1,5
4	336	2,3
5	408	2,75
6	432	2,5
8	336	1,9
9	240	1,3
10	432	2,43
15	240	1,43
16	240	1,3
17	288	1,25
18	312	1,8

schiedener 1100 L Ansätze erhalten wurden. Zu berücksichtigen ist, dass die Ansätze 2-10 mit einer Sharples-Durchflusszentrifuge des Typs „Nr. 6“ gleichen Prinzips aber geringerer Leistung (15500 Umdrehungen pro Minute=14100 g) geerntet worden sind, bevor diese durch das Modell „Z41“ der Firma CEPA ersetzt wurde.

Der aus den Ablaufschalen austretende Überstand wird in einem Zwischenbehälter aufgefangen und von dort in einen 1100 L Rollcontainer gepumpt. Der Überstand wird mit Desinfektionsmittel versetzt, bevor er entsorgt werden kann.

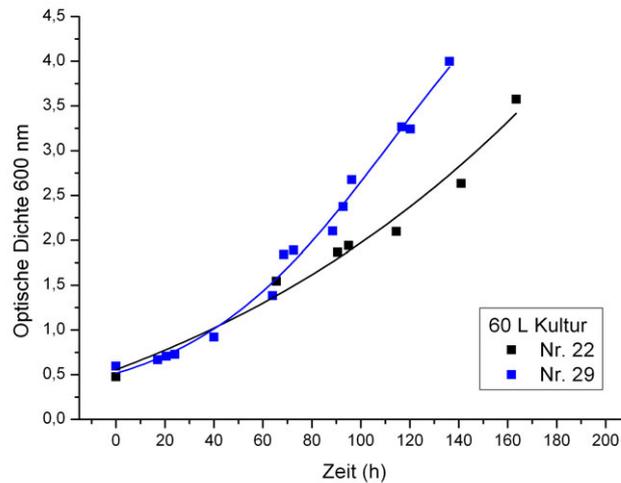


Abbildung 8.4: Beispiele von Wachstumskurven verschiedener 60 L Fermenter, die jeweils als Inokulum für eine 1100 L Bakterienkultur verwendet wurden.

8.3 Wachstumskurven

8.3.1 60 L Vorkultur

Abbildung 8.4 stellt zwei Wachstumskurven von verschiedenen 60 L Vorkulturen dar. Die gemessene optische Dichte bei 600 nm ist der relativen Zelldichte innerhalb der Bakterienkultur proportional. Die hier aufgeführten Kurven der 60 L Ansätze 22 und 29 zeigen, dass sich die Vorkulturen, die zum Animpfen der 1100 L Fermenter verwendet wurden, in der exponentiellen Wachstumssphase befinden. Nach einer Anpassungsphase von ca. 60 h Dauer vermehren sich die Bakterien maximal. Die relative Zelldichte nimmt bei den im 60 L Fermenter herrschenden Bedingungen in dieser Phase mit einer Rate von durchschnittlich $0,024 \pm 0,007$ Einheiten pro Stunde zu. Die optische Dichte liegt zum Zeitpunkt des Überimpfens zwischen 3,5 und 4,0 Einheiten. Die gesamte Kultivierungsdauer beträgt im Falle der hier dargestellten Kulturen zwischen 130 und 160 h.

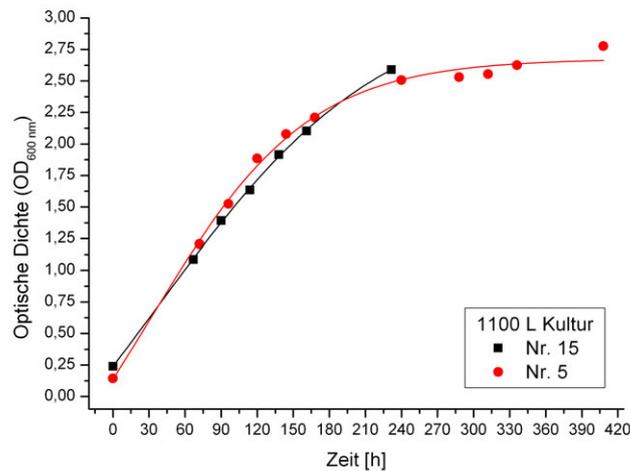


Abbildung 8.5: Darstellung ausgewählter Wachstumskurven der 1100 L Bakterienkulturen. Die ermittelten Daten beziehen sich auf die Bakterienkulturen Nr. 5 und 15 (vgl. Tabelle 8.1).

8.3.2 1100 L Hauptkultur

Die Wachstumskurven der 1100 L Hauptkulturen 5 und 15 sind in Abbildung 8.5 gezeigt. Die Zunahme der relativen Zelldichte während der exponentiellen Wachstumsphase der 1100 L Ansätze beträgt $0,011 \pm 0,004$ Einheiten pro Stunde. Die Wachstumskurven zeigen praktisch keine Anpassungsphase.

Nach ca. 230 h Wachstumszeit befindet sich Ansatz 15 am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Die Ausbeute beträgt 1,43 kg Zellmasse (Nassgewicht) bei einer zum Erntezeitpunkt gemessenen optischen Dichte von 2,6 Einheiten.

Wie die Wachstumskurve des 1100 L Beckens Nr. 5 im Vergleich dazu zeigt, geht die Bakterienkultur bei einer Kultivierungsdauer von mehr als 230 h in die stationäre Phase über. Sie besitzt zum Erntezeitpunkt nach insgesamt ca. 410 h Wachstumszeit eine optische Dichte von 2,8 Einheiten. Dieser Ansatz lieferte die höchste Ausbeute von insgesamt 2,75 kg Zellmaterial (Nassgewicht).

8.4 Diskussion

Das Animpfen von Folgekulturen, in diesem Fall die 1100 L Hauptkultur, soll mit Bakterien im frühen exponentiellen Wachstumsstadium erfolgen. In dieser Phase haben die Zellen ihre maximale Teilungsrate erreicht, die Anzahl der lebenden Zellen überwiegt und die Anpassung an eine neue Stoffwechselsituation ist schnell möglich. Wie die Wachstumskurven der 60 L Vorkulturen in Abbildung 8.4 zeigen, ist diese Bedingung erfüllt. Die insgesamt sehr hohen Extinktionswerte zwischen 3,5 und 4,0 Einheiten beruhen auf der hohen Lichtstreuung durch die Bakterienzellen. Diese wird hauptsächlich durch die für Chromatiaceae typischen stark lichtbrechenden Schwefelkugeln bestimmt, die vorübergehend intrazellulär eingelagert werden. Die gesamte Kultivierungsdauer jedes Ansatzes ist von der Dauer der Anpassungsphase und der Wachstumsrate der Zellen abhängig (vgl. Kapitel 3.3).

Die in Abbildung 8.5 dargestellte Wachstumskurve der 1100 L Hauptkultur Nr. 15 ist ein Beispiel für einen Ansatz, die am Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurde. Zu diesem Zeitpunkt überwiegt die Anzahl lebender Zellen und die maximale Populationsdichte ist nahezu erreicht. Dadurch ist die Isolierung von funktionsfähigem Protein gewährleistet und das während der Zellyse mögliche Vorkommen unerwünschter Produkte, z. B. teilweise abgebaute oder funktionsunfähige Proteine, minimiert.

Die 1100 L Kulturen gehen ohne eine erkennbare Anpassungsphase in das exponentielle Wachstumsstadium über, d. h. es ist keine oder nur eine geringe Veränderung bakterieller Stoffwechselprozesse nach der Überführung vom 60 L ins 1100 L Becken erforderlich. Dies zeigt, dass die Wachstumsbedingungen im 1100 L Fermenter mit den im 60 L Becken herrschenden Bedingungen vergleichbar sind und zu optimalem Zellwachstum führen. Überdies liegt die für die Bakterien im 1100 L Fermenter ermittelte Wachstumsrate von 0,011 ($\pm 0,004$) Einheiten pro Stunde unter Berück-

sichtigung des Fehlers nicht signifikant niedriger als die für die 60 L Vorkulturen berechnete Rate von 0,024 ($\pm 0,007$) Einheiten pro Stunde. Die etwas geringere Wachstumsrate des 1100 L Ansatzes ist durch die langsamere Durchmischung des insgesamt größeren Volumens während der Kultivierung zu erklären, so dass Zellen im Vergleich zum 60 L Becken sedimentieren können und nicht bei der stichprobenartigen Messung der relativen Zelldichte zur Verfügung stehen. Deswegen liegen die Werte der für den 1100 L Ansatz gemessenen optischen Dichten im Vergleich zur 60 L Kultur um ca. 1,5 Einheiten ebenfalls niedriger.

Bei Betrachtung der Wachstumskurve des Ansatzes Nr. 5 wird deutlich, dass nach mehr als 230 h Kultivierungsdauer das bakterielle Wachstum in die stationäre Phase übergeht. Nach ca. 180 h ist das Zellwachstum nicht mehr exponentiell und innerhalb von 200-410 h gesamter Wachstumszeit ist keine wesentliche Zunahme der relativen Zelldichte feststellbar, d. h. Zellteilung und -lyse sind im Gleichgewicht. In diesem Stadium ist nicht auszuschließen, dass bei der Zellyse entstehende Produkte die Proteinsynthese negativ beeinflussen. Erfahrungsgemäß ist die Zellernte nach insgesamt 200-250 h Kultivierungsdauer anzusetzen. Zur Feststellung des genauen Erntezeitpunktes jedes einzelnen Ansatzes ist die ständige Kontrolle des Zellwachstums durch stichprobenartige Bestimmung der relativen Zelldichte erforderlich.

Die in Tabelle 8.1 aufgeführten Ausbeuten, aller im Verlauf des Optimierungsprozesses geernteten 1100 L Fermenter erzielt wurden, variieren stark. Im Durchschnitt wurden pro Ansatz Gesamtmengen von 1,7 kg Zellmaterial (Nassgewicht) erhalten. Zu Beginn musste die Methodik zur effektiven Ernte des gesamten Zellmaterials entwickelt werden, so dass geringe Ausbeuten nicht mit schlechten Wachstumsbedingungen gleichzusetzen sind. Die Schwierigkeiten bei der Abstimmung von Zentrifugenbetrieb mit Art und Dauer der Produktzufuhr führte zu Verlusten. Zudem ist eine hohe Flexibilität bei der zeitlichen Planung und Organisation der

Ernte eines 1100 L Großansatzes erforderlich, da das Wachstumsverhalten jeder Bakterienkultur individuell verschieden ist. Durch den Ersatz der Sharples-Zentrifuge kommt es zu einer Veränderung des Anteils der mitgewogenen Suspensionsflüssigkeit (Medium), die im Sediment verbleibt. Die derzeit verwendete CEPA-Zentriuge besitzt eine um ca. 2900 g höhere relative Zentrifugationsbeschleunigung, was zu einer Verringerung des Nassgewichts der geernteten Zellmasse führt. Anfangs traten während der Kultivierungsdauer eines Großansatzes Veränderungen auf, die das bakterielle Wachstum beeinflussten, was zu einer geringen Zellausbeute oder einem verlangsamten Zellwachstum führte. Die sich im Laufe der Zeit gebildeten Salzkrusten an den Innenseiten der Rohrleitungen und innerhalb der Kreiselpumpe führten zu einer herabgesetzten Durchmischung des Ansatzes. Die Zellen sanken zu Boden, wodurch eine gleichmäßige Belichtung der photosynthetischen Bakterien verhindert wurde. Neben dem Ersatz der bisherigen Rohrleitungen durch Verbindungen aus einem anderen Kunststoffmaterial wurde die Anzahl der Pumpeneinlässe erhöht, so dass eine gleichmäßige Durchmischung des gesamten Ansatzes gewährleistet ist. Die Verwendung von Hypochloritlösung zur chemischen Sterilisation, die ständige Belichtung, die hohe Temperatur und die hohe Salzkonzentration im Medium führte zur Porosität des Silikons, welches zu Beginn zum Abdichten verwendet wurde und hatte den vollständigen Verlust einiger Ansätze aufgrund von Undichtigkeit zur Folge. Das Dichtmaterial wurde durch strapazierfähigeres Silikon ersetzt, welches für den Einsatz unter den hier herrschenden Bedingungen geeignet ist. Weiterhin ist durch die seitlich angebrachten Ventilatoren der Lampen und die installierte Klimaanlage im Laborraum eine konstante Temperierung des Ansatzes erreicht worden.

Die gegenwärtigen Wachstumsbedingungen und technischen Voraussetzungen für die Bakterienkultur im 1100 L Fermenter sind das Ergebnis eines stetigen Entwicklungs- und Optimierungsprozesses. Mit dem in die-

ser Arbeit entwickeltem Protokoll ist die Kultur von anaerob lebenden, photosynthetischen Bakterien in einem 1100 L fassenden Glasfermenter unter reproduzierbaren Bedingungen möglich.

8.5 Zusammenfassung

Der auf die in Kapitel 8.2.1 beschriebene Weise gebaute 1100 L Fermenter ist in seiner jetzigen Form eine Konstruktion, die sich dazu eignet, photosynthetische Bakterien unter den gegenwärtig eingestellten Bedingungen effizient zu kultivieren. Die Handhabung der Bakterienkultur und die Verfolgung des Wachstumsverhaltens in Kombination mit der Zellernte über eine Durchflusszentrifuge bleibt auch in dieser Ansatzgröße praktikabel und ist im Labormaßstab durchführbar.

Die Ergebnisse aus der Analyse der Wachstumskurven zeigen, dass es möglich ist, im Fermenter Bedingungen zu schaffen, die zu reproduzierbarem Bakterienwachstum führen, wie die Wachstumskurven der 60 L Vorkulturen und der 1100 L Ansätze (vgl. Abbildung 8.4 und 8.5) belegen. Aus jedem 1100 L Ansatz wird eine große Menge Zellmaterial, durchschnittlich 1,7 kg Nassgewicht (ca. 1,5 g/L), erhalten und liefert eine vergleichsweise große Menge Ausgangsmaterial zur Isolierung der in *A. vinosum* nur in geringem Maße exprimierten [NiFe]-Hydrogenase.

Durch die Festlegung des Erntezeitpunktes auf die späte exponentielle Wachstumsphase, die erfahrungsgemäß nach 200-250 h Kultivierungsdauer erreicht ist, wird eine hohe Anzahl lebender, intakter Zellen gewährleistet. Dies ist für die weitere Verwendung des Materials von Bedeutung, denn der Einfluss der bei der Zellyse entstehenden Verbindungen ist nachteilig. Das Absterben der Zellen und das Freiwerden von z. T. toxischen Verbindungen hat eine unkontrollierbare Veränderung der Wachstumsbedingungen zur Folge, so dass die Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes erschwert wird und die Kultur gegebenenfalls abstirbt. Insbesondere kann bei der Ernte am Ende der exponentiellen Wachstumsphase sichergestellt

werden, dass die zu isolierenden Proteine, in diesem Fall die membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase, unmodifiziert und in funktionsfähigem Zustand vorliegen, was für weitere spektroskopische Untersuchungen oder die Kristallisation unbedingte Voraussetzung ist.

9 Isolierung und Reinigung der [NiFe]-Hydrogenase

Aufbauend auf Kapitel 8 wird im Folgenden die Etablierung der Isolierung und Reinigung der [NiFe]-Hydrogenase (H_2 ase) aus den Zellen des bakteriellen Organismus *A. vinosum* dargestellt. Der gesamte Ablauf der Proteinpräparation ist in Abbildung 9.1 schematisch zusammengefasst. Zunächst erfolgt der Zellaufbruch und die Entfernung photosynthetischer Pigmente durch Waschen der Zellen mit Aceton, dann die Extraktion des Membranproteins mit Triton X 100 (Solubilisierung). Es schließen sich die Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation und die säulenchromatographische Reinigung des Proteins in mehreren Schritten an.

Der gesamte chromatographische Reinigungsprozess wurde zunächst mit kleinen Volumina durchgeführt, um die Bedingungen zu optimieren. Die Gradienten der Anionen-Austausch-Säulen, die Art der Säulenmaterialien als auch die Anzahl und Reihenfolge der einzelnen Reinigungsschritte wurden variiert. Die Isolierung und Aufreinigung wurde schließlich auf einen Maßstab gebracht, der es ermöglicht, eine große Menge Hydrogenase aus einem Präparationsansatz zu erhalten. Aus 2 kg Zellmasse (Nassgewicht) werden ca. 800 g Zellpulver gewonnen, woraus wiederum etwa 100 mg Protein isoliert werden können. Das Protein eignet sich aufgrund seines hohen Reinheitsgrades für die Kristallisation und die Verwendung in spektroskopischen Techniken. Die Reinheit der isolierten Hy-

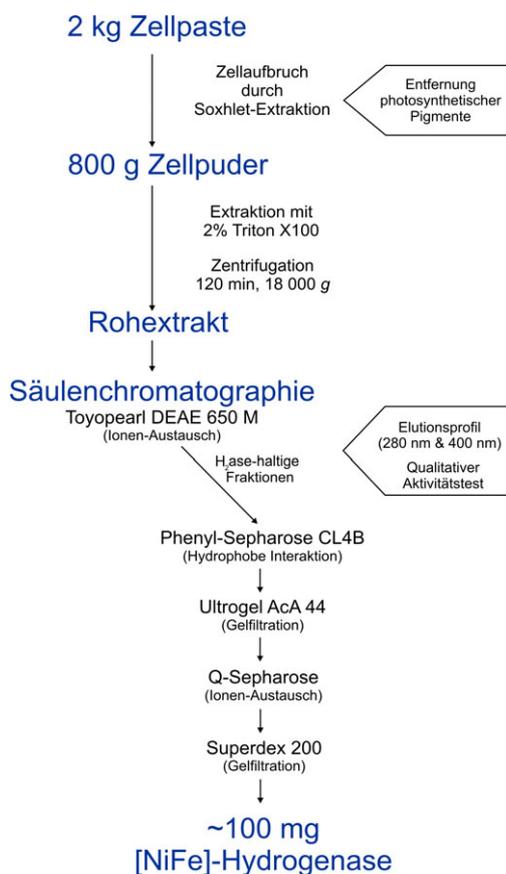


Abbildung 9.1: Schematische Übersicht der einzelnen Proteinpräparations-schritte: Zellaufbruch und Entfernung photosynthetischer Pigmente, Solubilisierung und säulenchromatographische Aufreinigung.

drogenase wird anhand der Ergebnisse aus SDS-PAGE und MALDI-TOF-Massenspektrometrie verifiziert. Die Proteinkonzentration der Probe wird photometrisch ermittelt (vgl. Kapitel 7.3.1).

Außerdem ist im Rahmen dieser Arbeit die Methode zur Identifizierung der hydrogenasehaltigen Fraktionen mit Hilfe eines polarographischen Systems standardisiert worden. Das Verfahren wird in Abschnitt 9.3.1 beschrieben. Auf diese Weise ist die Grundlage für eine schnelle, eindeutige und reproduzierbare Bestimmung der relevanten Fraktionen während des säulenchromatographischen Reinigungsprozesses geschaffen worden. Insbesondere nach dem ersten Aufreinigungsschritt, der ersten Anion-Austausch-Säule, ist eine Identifizierung der hydrogenasehaltigen

Fraktionen lediglich aufgrund des Elutionsprofils nicht ausreichend spezifisch, da es sich um ein komplexes Proteingemisch handelt, dessen Absorptionen sich überlagern. Darum ist eine Auswahl der hydrogenasehaltigen Fraktionen basierend auf der Wasserstoffspaltungsaktivität des Enzyms unerlässlich.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst das neu entwickelte Verfahren zum effektiven Zellaufbruch und gleichzeitiger Entfernung photosynthetischer Pigmente mit Hilfe einer automatischen, gekühlten Kombination aus Soxhlet-Extraktion und Destillationsapparatur beschrieben. Überdies ist die Isolierung großer Mengen Bakteriochlorophylla aus dem Aceton/Wasser-Gemisch des ersten Extraktionsschritts möglich, die in anderen biochemischen Untersuchungen eingesetzt werden können [98].

9.1 Zellaufbruch

Um ein Protein aus Bakterienzellen zu isolieren, ist es notwendig, die Zellwand zu zerstören. Vielfach erfolgt der Zellaufbruch mechanisch durch Ultraschall, Homogenisierung z. T. unter hohem Druck (French-Press), durch enzymatische Lyse (Lysozym) oder EDTA-Behandlung. Im Falle der hier verwendeten photosynthetischen Bakterien der Art *A. vinosum* werden die Zellen wiederholt mit organischem Lösemittel, Aceton, gewaschen. Dadurch wird nicht nur die Zerstörung der Zellwand erreicht, sondern auch die Entfernung der photosynthetischen Pigmente (u. a. Bakteriochlorophylle und Carotinoide), die bei der weiteren chromatographischen Aufreinigung störend sind. Die im ersten Waschschrift in großen Mengen extrahierten Bakteriochlorophylle (BChl_a) eignen sich für weitere biochemische Anwendungen [98].

Zu Beginn erfolgte der Zellaufbruch, bzw. die Entfernung der photosynthetischen Pigmente unter hohem Acetonverbrauch, indem die Zellen portionsweise mehrfach auf Eis mit kaltem Lösemittel gerührt und anschließend abzentrifugiert wurden. Der bei jedem Waschschrift anfallende

Überstand wurde verworfen. Durch die Entwicklung der im weiteren Verlauf beschriebenen Methode konnte das Verfahren automatisiert und die Acetonmenge aufgrund der ständigen Wiederverwendung im geschlossenen Reaktionskreislauf auf ein Zehntel der ursprünglichen Menge reduziert werden. Die Apparatur ist in Abbildung 9.2 schematisch veranschaulicht.

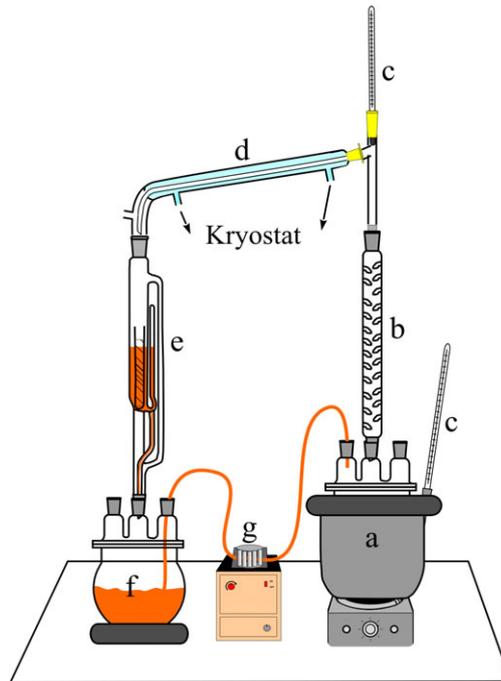


Abbildung 9.2: Schematische Darstellung der Apparatur zum Zellaufbruch und zur Entfernung der photosynthetischen Pigmente: a=Paraffinölbad mit 4 L Destillationskolben, b=Vigreux-Kolonne, c=Thermometer, d=Destillationsbrücke mit angeschlossenen Kryostaten, e=Soxhlet-Extraktor mit Cellulose-Extraktionshülle, f=4 L Auffangkolben und g=Peristaltikpumpe.

Zuerst werden ca. 500 g Zellen in eine Cellulose-Extraktionshülle gefüllt, welche in einen Soxhlet-Extraktor platziert wird. Insgesamt werden 3 L technisches Aceton mit 5% H₂O in einen 4 L Glaskolben (Destillationskolben) gefüllt, der über eine Vigreux-Kolonne und eine mit Hilfe eines Kryostaten (-20 °C) gekühlte Destillationsbrücke mit dem Soxhlet-Extraktor verbunden ist. Der Destillationskolben wird im Paraffinölbad erhitzt, welches auf 95 °C temperiert ist. Das aus der Destillationsbrücke in die Cellulosehülle tropfende Aceton besitzt eine Temperatur von 3-8 °C.

Das aus dem Extraktor in den zweiten Kolben (Auffangkolben) fließende Aceton mit den darin gelösten Pigmenten und anderen Verbindungen wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe in den Destillationskolben zurückgepumpt und somit der Reaktionskreislauf geschlossen. Der Soxhlet-Extraktor wird mit Luftpolsterfolie und Aluminiumfolie isoliert, damit der Ansatz während der gesamten Dauer der Prozedur gekühlt bleibt. Durch diesen Versuchsaufbau wird die Zellpaste durchschnittlich viermal pro Stunde mit kaltem Aceton gewaschen. Nach ca. 96 Stunden wird die Extraktion beendet. Das resultierende hellgraue Zellpulver wird in einen 1 L Glaskolben gefüllt und am Rotationsverdampfer getrocknet. Es enthält die Membranfragmente und die daran assoziierten Proteine. Aus den eingesetzten 500 g Zellen resultieren ca. 200 g getrocknetes Zellpulver. Das Zellpulver wird bei -20°C gelagert oder direkt im Anschluss im nächsten Schritt der Proteinpräparation verwendet. Das gebrauchte Lösemittel wird mit allen darin enthaltenen Verbindungen entsorgt.

Um aus den Bakterienzellen *Bakteriochlorophylla* zu gewinnen, muss das Aceton mit den darin gelösten Verbindungen nach der ersten Extraktion dem Kreislauf entnommen, und durch die gleiche Menge ungebrauchtes Aceton mit 5% Wasseranteil ersetzt werden. Ansonsten werden die Bakteriochlorophylle durch die Siedehitze geschädigt und durch die im weiteren Verlauf der Prozedur extrahierten Zellbestandteile verunreinigt. Das weitere Verfahren zur Darstellung des BChl*a* ist dem experimentellen Teil der Dissertation von A. Mennenga zu entnehmen [98].

9.2 Solubilisierung

Für einen Präparationsansatz werden 200 g Zellpulver als Ausgangsmaterial verwendet. Das feine Pulver wird in kalten, detergentenhaltigen Extraktionspuffer (vgl. Kapitel 7.2.1) eingestreut, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Für eine optimale Solubilisierung ohne Ausbildung von Aggregaten werden zwei Ansätze parallel (je ca. 350 mL) 30-40 min bei

5-10 °C im Kühlraum gerührt. Das nicht solubilisierete Material wird bei 2500 g 10 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wird aufgefangen und bis zum nächsten Schritt kalt gelagert. Das entstandene Pellet wird in ca. 350 mL Extraktionspuffer resuspendiert und erneut 30-40 min im Kühlraum gerührt. Nach dem zweiten Solubilisierungsschritt erfolgt nochmals eine Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Das aus diesem Schritt resultierende Pellet wird verworfen, der Überstand mit der Flüssigkeit aus dem ersten Zentrifugationsschritt vereinigt und für zwei Stunden bei 18600 g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene klare Überstand, in dem sich die Hydrogenase befindet, wird als Rohextrakt bezeichnet. Das Pellet wird einmal mit 500-800 mL Extraktionspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Beide Überstände werden vereinigt und gemeinsam auf die erste Anionen-Austausch-Säule aufgetragen. Insgesamt ergeben sich 1,5-2 L Rohextrakt pro Präparationsansatz.

9.3 Säulenchromatographie

Die Aufreinigung des Rohextrakts erfolgt in insgesamt fünf säulenchromatographischen Schritten bei 4 °C unter Verwendung einer FPLC-Anlage (Äkta Basic, GE Healthcare). Im Folgenden ist die gegenwärtig verwendete etablierte Methode der Isolierung und Reinigung der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* im großen Maßstab beschrieben. Alle verwendeten Puffer sind in Kapitel 7.2.1 aufgeführt. Diese werden vor deren Verwendung gefiltert (0,22 µm Flaschenaufsatzfilter) und entgast. Während der chromatographischen Auftrennung werden Elutionsprofile aufgezeichnet (Unicorn Software, GE Healthcare), welche die detektierte Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (Gesamtproteinabsorption), bei 400 nm und die Leitfähigkeit (bei den Anionen-Austausch-Säulen) wiedergeben. Das Signal bei 400 nm ist auf die Absorption durch die Eisen-Schwefelcluster zurückzuführen. Allerdings sind auch andere Proteine im Ansatz enthalten, die eine 400 nm bzw. 280 nm Absorption aufweisen, so dass die alleinige Identifika-

tion der hydrogenasehaltigen Fraktionen aufgrund der Absorptionen nicht ausreichend ist. Deswegen wurden die Fraktionen, insbesondere nach den ersten drei Chromatographieschritten anhand der gemessenen spezifischen Wasserstoffspaltungsaktivität des Enzyms ausgewählt. Die Elutionsprofile der letzten beiden Säulenläufe weisen nur einen deutlichen Peak auf, der auf die Absorption der Hydrogenase zurückzuführen ist, so dass der Aktivitätstest nicht zwangsläufig durchgeführt werden muss, da die Auswahl der Fraktionen aufgrund des Elutionsprofils zu rechtfertigen ist. Das derzeit angewendete Messverfahren wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

9.3.1 Qualitativer Aktivitätstest (H₂-Spaltung)

Die spezifische Aktivität der Hydrogenase, die Umsetzung von molekularem Wasserstoff zu Protonen und Elektronen, wird genutzt, um während der Proteinaufreinigung die hydrogenasehaltigen Fraktionen nach der säulenchromatographischen Auftrennung zu identifizieren.

Dazu wird die durch die Proteinaktivität bedingte Änderung der Wasserstoffkonzentration im Reaktionsansatz mit Hilfe eines polarographischen Systems, bestehend aus einer Platin-Anode und einer Silber-Kathode, verfolgt. Die Polarisationsspannung, d. h. die Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode, beträgt +600 mV. Die Elektroden sind mit einer semipermeablen Teflonmembran bespannt, welche den Elektrolytraum (halbgesättigte KCl-Lösung) vom Reaktionsansatz trennt. An der Pt-Elektrode findet die Oxidation des im Reaktionsansatz befindlichen Wasserstoffs gemäß der Gleichung:



statt. In Konkurrenz dazu verbraucht bzw. spaltet die Hydrogenase ebenfalls den in einer definierten Menge vorliegenden Wasserstoff, so dass dieser nicht mehr für die Reaktion an der Platinelektrode zur Verfügung steht. Der eigens für diese Anwendung gebaute Hydrograph (F. Reikowski, MPI

Mülheim) registriert die zeitliche Änderung des fließenden Stroms. Der vierfach verstärkte Messwert wird mit Hilfe des Messprogramms „Tracer DAQ“ (Version 1.6.0.0) am angeschlossenen PC graphisch dargestellt. Der Strom ändert sich proportional zur Wasserstoffkonzentration.



Abbildung 9.3: Polarographisches System aus Platin-Anode und Silber-Kathode zur Ermittlung der spezifischen H_2 -spaltungsaktivität des Enzyms. Die Elektrodenanordnung ist seitlich in einer Messzelle angebracht. Die Zelle wird mit einem angeschlossenen Wasserthermostat auf 30°C temperiert und ist auf einem Rührgerät montiert.

Die Elektrodenanordnung (Abbildung 9.3) ist seitlich in einer mit einem Thermostat auf 30°C temperierten Messzelle (Feinmechanikwerkstatt, MPI Mülheim) angebracht. Die Zelle selbst ist auf einem Rührgerät montiert, so dass der Rührstab unterhalb der in die Lösung ragenden Elektrode für die Durchmischung des Reaktionsansatzes sorgt. Die Zelle wird durch einen trichterförmigen Stopfen verschlossen, durch dessen schmale Öffnung mit Hilfe gasdichter Injektionsspritzen Lösungen hinzugefügt werden können.

Zur Messung der katalytischen Aktivität der Hydrogenase werden die in Kapitel 7.2.1 beschriebenen Lösungen und Puffer verwendet. Zunächst werden $1,2\text{ mL}$ Puffer und $30\ \mu\text{L}$ BV-Lösung in die Messzelle pipettiert und der Deckel luftblasenfrei aufgesetzt. Weiterhin werden $5\ \mu\text{L}$ Dithionitlösung zugegeben. Benzylviologen fungiert als Akzeptor für die bei der

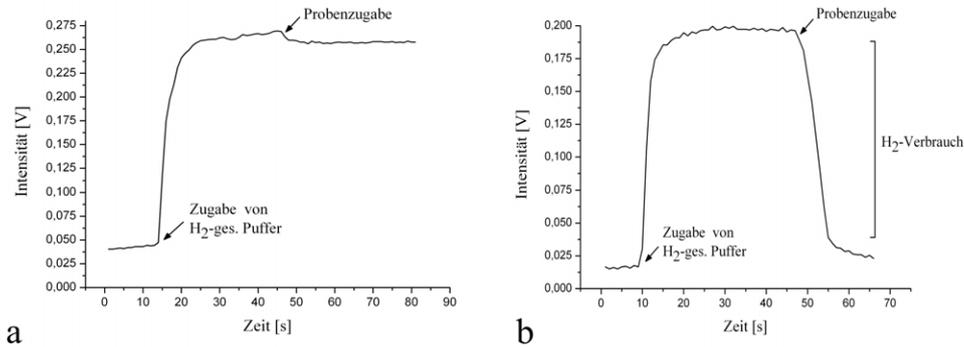


Abbildung 9.4: a: Beispiel für eine Aktivitätsmessung mit einer Fraktion die keine Hydrogenase enthält. Es zeigt sich kein Wasserstoffverbrauch. Das Messsignal bleibt nach Probenzugabe annähernd unverändert. b: Beispiel für eine Messung mit einer Fraktion, welche Aktivität zeigt. Es ist ein signifikanter Wasserstoffverbrauch durch die in der Probe enthaltene Hydrogenase zu erkennen. Das Messsignal sinkt innerhalb weniger Sekunden nach Probenzugabe stark ab.

Reaktion frei gewordenen Elektronen. Das Na-Dithionit reduziert das Benzylviologen und den in der Lösung vorhandenen Sauerstoff, so dass der Reaktionsansatz anaerob wird. Durch das reduzierte Benzylviologen färbt sich der Reaktionsansatz dunkelviolett. Es folgt die Zugabe von $100\ \mu\text{L}$ wasserstoffgesättigtem Puffer. Dieser wird kurz vor Beginn der Messung hergestellt, indem mindestens 15 min lang Wasserstoffgas durch den Puffer geleitet wird. Nach Einstellung eines konstanten Messwerts erfolgt die Zugabe von weiteren $100\ \mu\text{L}$ einer zu untersuchenden Fraktion.

Enthält die zugegebene Proteinlösung Hydrogenase, sollte innerhalb einer Minute eine deutliche Verringerung des aufgezeichneten Signals erkennbar sein. Abbildung 9.4 zeigt Beispiele von Messungen einer Fraktion ohne Wasserstoffspaltungsaktivität (a) und einer Fraktion, die Hydrogenase enthält (b). Bei dieser Messmethode handelt es sich um einen qualitativen Test. Die exakte Konzentration der Hydrogenase in den einzelnen Fraktionen ist unbekannt, da es sich um Proteingemische handelt.

9.3.2 Erste Ionen-Austausch-Chromatographie

Die Ionen-Austausch-Chromatographie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen elektrisch geladenen Ionen. Jedes Protein besitzt eine spezifische Affinität zu unterschiedlichen Säulenmaterialien aufgrund seiner Oberflächenladung. Beim Probenauftrag erfolgt zunächst die Bindung der Proteine über deren geladene Oberfläche an die positiv (Anionen-Austausch) oder negativ (Kationen-Austausch) geladenen funktionellen Gruppen der Säulenmatrix (z. B. Toyopearl DEAE 650=modifiziertes Methacrylatpolymer). Nachdem ungebundenes Material durch Waschen mit salzfreiem Puffer entfernt wurde, werden die gebundenen Proteine sukzessiv über einen Gradienten mit steigender Salzkonzentration (meist NaCl) eluiert. Die Affinität der Proteine zum Säulenmaterial wird durch die steigende Salzkonzentration herabgesetzt, bis es bei einer für jedes Protein charakteristischen Konzentration von der Matrix dissoziiert und eluiert wird. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Elutionsgeschwindigkeiten, beruhend auf der jeweiligen Bindungsstärke der verschiedenen Proteine, werden diese voneinander getrennt.

Im ersten säulenchromatographischen Reinigungsschritt soll eine grobe Auftrennung aller aus dem Zellpulver extrahierten Proteine des Rohextrakts erreicht werden. Da die Gesamtproteinkonzentration und die Konzentration der an diese Säule bindenden Proteine sehr hoch ist, ist ein entsprechend großes Säulenvolumen und ein Material mit hoher Bindekapazität gewählt worden, um ein „Überladen“ der Säule zu vermeiden. Auf diese Weise wird verhindert, dass im Rohextrakt befindliche, potentiell bindende Proteine nicht mehr an das Säulenmaterial binden können und durchfließen und so wertvolles Material verloren geht. Es beträgt in diesem Fall ca. 2100 mL. Das Rohextrakt wird auf die zuvor mit salzfreiem Puffer A äquilibrierte erste Anionen-Austausch-Säule aufgetragen. Die [NiFe]-Hydrogenase hat bei den gewählten Bedingungen (50 mM Tris, pH-Wert 7,4, Flussgeschwindigkeit beim Probenauftrag 8 mL/min)

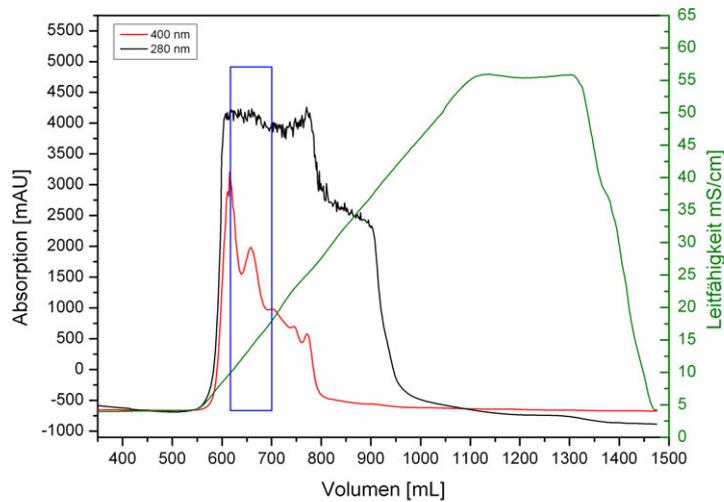


Abbildung 9.5: Elutionsprofil eines Säulenlaufs der ersten Anion-Austausch-Säule bei der chromatographischen Aufreinigung der [NiFe]-Hydrogenase. Es wurden die Absorptionen bei 280 und 400 nm und die Leitfähigkeit gegen das Puffervolumen aufgetragen. Hydrogenasehaltige Fraktionen wurden im blau markierten Bereich zwischen 10 und 18 mS/cm Leitfähigkeit identifiziert.

eine ausreichend hohe Bindungsaffinität zum verwendeten Säulenmaterial Toyopearl DEAE 650 C. Die Proteine im Rohextrakt, die nicht oder nur schwach an diese Säule binden, werden durch Waschen mit 3-4 L Puffer A abgetrennt.

Eluiert werden die gebundenen Proteine über einen Gradienten mit zunehmender Salzkonzentrationen zwischen 0 mM NaCl (Puffer A) und 600 mM NaCl (Puffer B) bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/min. Bei einer Leitfähigkeit von durchschnittlich 10-22 mS/cm bzw. 200-270 mM NaCl konnten mit Hilfe des Aktivitätstests Fraktionen identifiziert werden, die Hydrogenase enthalten, welche während des Gradienten gesammelt wurden. Abbildung 9.5 zeigt den Ausschnitt eines Elutionsprofils, welches bei einem Lauf der ersten Anion-Austausch-Säule aufgezeichnet wurde. Der Bereich, welcher hydrogenasehaltige Fraktionen beinhaltet, ist blau

markiert. Er liegt in diesem Fall bei einer Leitfähigkeit zwischen 10 und 18 mS/cm.

Da sich die Absorptionen der während des Gradienten eluierten Proteine in den Elutionsprofilen dieser Säule überlagern, ist es nicht möglich, einen bestimmten Peak einem Protein zuzuordnen. Mit der beschriebenen Methode ist vielmehr die Reduktion der Gesamtproteinmenge des Rohextrakts erreicht worden, indem zunächst die an das Säulenmaterial bindenden Proteine von den nicht bindenden Proteinen und denen mit deutlich höherer Bindeaffinität getrennt wurden. Weiterhin wurden durch die Anwendung des Aktivitätstests nur die Fraktionen ausgewählt, die Proteine enthalten, welche bei den gewählten Bedingungen eluieren und H₂spaltungsaktivität aufwiesen. Diese „aktiven“ 40 mL großen Fraktionen wurden vereinigt und auf die nächste Säule aufgetragen und weiter aufgereinigt. Die Proteine mit im Vergleich zur [NiFe]-Hydrogenase höherer Affinität zur Matrix werden durch Waschen mit Puffer B entfernt. Anschließend wird das Säulenmaterial mit Puffer A reäquilibriert.

9.3.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Viele Proteine besitzen auf ihrer Oberfläche hydrophobe Bereiche. In wässriger Lösung assoziieren diese Bereiche mit anderen hydrophoben Oberflächen. Durch hohe Konzentrationen bestimmter Salze z. B. Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄ werden hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt. Die Substanzen werden bei abnehmender Salzkonzentration aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität voneinander getrennt. Sehr hydrophile Proteine eluieren zuerst.

Die Säule (1 Säulenvolumen=560 mL) wird vor dem Probenauftrag mit ca. 800 mL Puffer äquilibriert (vgl. Kapitel 7.2.1). Die Proteinprobe wird bei hoher Ionenstärke (0,2 M (NH₄)₂SO₄) auf die hydrophobe Matrix (Phenylsepharose CL4B=4% cross-linked agarose) mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/min aufgetragen. Ungebundenes Protein wird durch Wa-

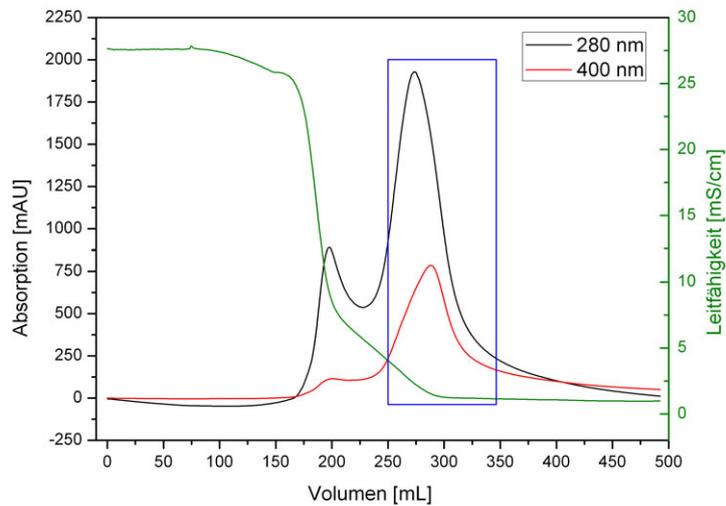


Abbildung 9.6: Elutionsprofil des zweiten säulenchromatographischen Reinigungsschritts (Hydrophobe Interaktions-Chromatographie). Das Protein eluiert in einem breiten Peak, dessen 400 nm Absorptionsmaximum durchschnittlich in einem Leitfähigkeitsbereich von 3-1 mS/cm liegt.

schen mit ca. 600 mL Äquilibrationpuffer entfernt. Die Ionenstärke wird über einen Gradienten (300 mL) mit sinkender Ammoniumsulfatkonzentration, ausgehend von einer Konzentration von 50 mM, reduziert. Puffer B (5 mM Tris, pH-Wert 8,0) ist ammoniumsulfatfrei. Das Protein eluiert in einem breiten Peak, dessen 400 nm Absorptionsmaximum im Durchschnitt zwischen 3 und 1 mS/cm Leitfähigkeit liegt. Das Fraktionsvolumen beträgt 8 mL. Abbildung 9.6 zeigt das Elutionsprofil dieses säulenchromatographischen Schritts. Der Bereich, in dem Fraktionen mit H_2 spaltungsaktivität identifiziert wurden, ist blau markiert.

Auch im Falle der chromatographischen Trennung nach dem Hydrophobizitätsprinzip ist die Auswahl der weiter zu verwendenden Fraktionen aufgrund des Elutionsprofils nicht ausreichend. Die gemessene Wasserstoffspaltungsaktivität korrespondiert bedingt mit den dominierenden Peaks bei 280 bzw. 400 nm des Elutionsprofils. Die maximalen Absorptionen gehen nicht mit maximaler Aktivität einher. Diese liegt mehr im Bereich

der rechten Flanke der Peaks, so dass davon auszugehen ist, dass auch hier eine Überlagerung von Absorptionen verschiedener Proteine vorliegt. Das im Vergleich zur 280 nm Absorption leicht nach rechts verschobene Absorptionsmaximum des 400 nm Peaks deutet ebenfalls darauf hin. Die Menge der Proteine, welche Eisen-Schwefelcluster beinhalten, zu denen auch die H₂ase zählt, liegt innerhalb der zweiten Hälfte des 280 nm Absorptionspeaks.

Die ausgewählten Fraktionen, welche H₂spaltungsaktivität aufwiesen, wurden vereinigt, aufkonzentriert und auf die nachfolgende Säule aufgetragen.

9.3.4 Erste Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Moleküle aufgrund ihrer Größe getrennt. Der verwendete Laufpuffer stellt die flüssige Phase dar. Die feste Phase wird von einer porösen Gelmatrix gebildet. Sie besteht z. B. aus einer Polyacrylamid-Agarose Matrix (AcA44=4% Polyacrylamid, 4% Agarose) oder Dextran-Agarose Matrix (Superdex 200). Kleine Proteine können in die Poren der festen Phase eindringen und besitzen deshalb eine längere Verweildauer auf der Säule im Vergleich zu den Proteinen, die um die Matrixpartikel herum wandern.

Die Gelfiltrationssäule „Ultrogel AcA44“ (350 mL Säulenvolumen) wird mit 700 mL Laufpuffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH-Wert 8,0) äquilibriert, bevor die auf ca. 30 mL konzentrierte Proteinprobe aufgetragen wird. Äquilibriert und eluiert wird mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min. Das Volumen der gesammelten Fraktionen beträgt 5 mL. Ein für diesen Schritt charakteristisches Elutionsprofil ist in Abbildung 9.7 dargestellt. Die Fraktionen, welche nachweislich H₂ase enthalten, liegen im blau markierten Bereich des zweiten Proteinpeaks. Dessen Absorptionsmaximum (280 und 400 nm) tritt auf, nachdem mit einer Puffermenge von 110 mL eluiert wurde. Die Absorption bei 550 nm korrespondiert u. a.

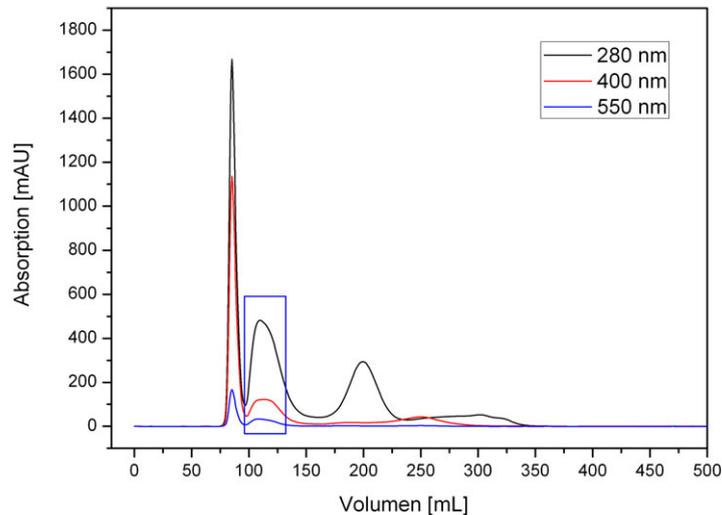


Abbildung 9.7: Charakteristisches Elutionsprofil der ersten Gelfiltrationssäule. Die H₂asehaltigen Fraktionen sind im Bereich des zweiten Absorptionspeaks identifiziert worden.

mit der Elution des Cytochrom *c*, das in diesem Schritt abgetrennt wird. Die H₂asehaltigen Fraktionen werden vereinigt und mit 50 mM Tris Puffer (pH-Wert 8,0) gewaschen, um die Salzkonzentration der Probe zu verringern.

9.3.5 Zweite Anionen-Austausch-Chromatographie

Die auf ein Volumen von ca. 10 mL aufkonzentrierten Fraktionen des vorherigen Chromatographie-Schritts werden mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 mL/min auf die zuvor mit ca. 80 mL Puffer äquilibrierte „HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP“-Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Das zu Beginn des Optimierungsprozesses verwendete Säulenmaterial Toyopearl DEAE 650 M wurde durch die Q-Sepharose ersetzt. Es zeigte sich, dass die Hydrogenase eine höhere spezifische Bindeaffinität zu diesem Material besitzt und auf diese Weise eine Verbesserung des Reinheitsgrades erzielt wird.

Das Protein wird über einen linearen Salzgradienten eluiert, der sich aus drei Stufen zusammensetzt: 1. Stufe 0-20% B (40 mL), 2. Stufe 20-50% B (120 mL), 3. Stufe 50-100% B (40 mL), wobei 100% B einer Salzkonzentration von 1 M NaCl entspricht. Fraktionen mit einem Gesamtvolumen von 5 mL, die während des Gradienten zwischen 330 und 390 mM NaCl-Konzentration bzw. 30-35 mS/cm Leitfähigkeit gesammelt wurden, enthalten Hydrogenase. Abbildung 9.8 zeigt ein für diesen Reinigungsschritt typisches Elutionsprofil. Es wird von einem 280 nm Peak dominiert, dessen Absorptionsmaximum mit dem bei 400 nm detektierten Maximum übereinstimmt.

Die Fraktionen aus der Mitte des 400 nm bzw. 280 nm Peaks, welche nachweislich H₂ase enthalten, werden vereinigt und auf ein Volumen von ca. 1 mL aufkonzentriert.

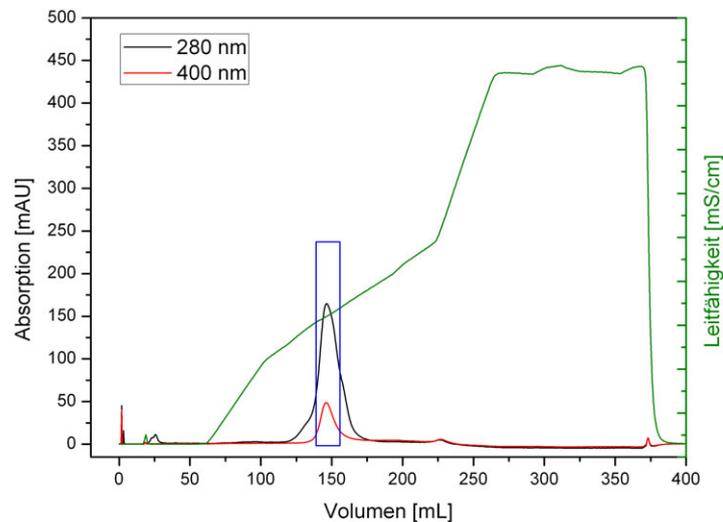


Abbildung 9.8: Elutionsprofil der zweiten Anionen-Austausch-Säule. Das Protein eluiert bei einer Konzentration von 330-390 mM NaCl bzw. einer Leitfähigkeit von 30-35 mS/cm im zweiten Teil des Stufengradienten.

9.3.6 Zweite Gelfiltration

Die aus der vorherigen zweiten Anionen-Austausch-Chromatographie hervorgegangenen aufkonzentrierten Fraktionen werden auf die letzte mit 250 mL Puffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH-Wert 8,0) äquilibrierte Gelfiltrationssäule „HiLoad 16/60 Superdex 200“ (GE Healthcare) aufgetragen. Das Säulenvolumen beträgt 120 mL. Eluiert wird isokratisch mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min und einem Gesamtvolumen von 150 mL Puffer.

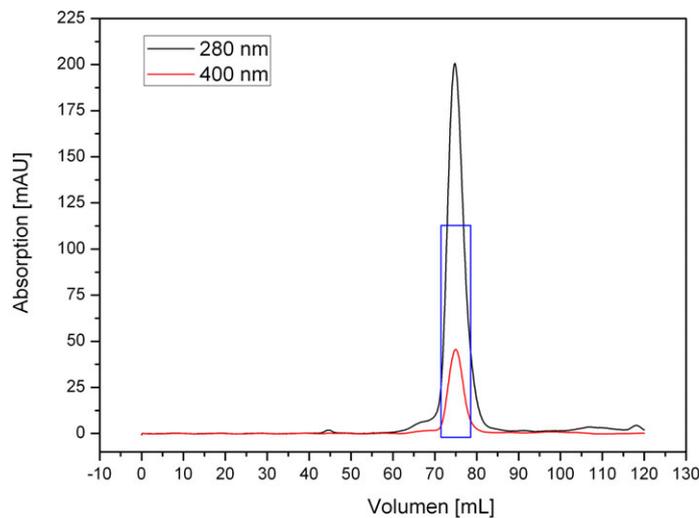


Abbildung 9.9: Elutionsprofil der zweiten Gelfiltrationssäule. Das Maximum des Peaks, in dem die Hydrogenase eluiert, liegt bei einem Puffervolumen von 75 mL.

Das in Abbildung 9.9 dargestellte Elutionsprofil des 5. säulenchromatographischen Aufreinigungsschritts zeigt einen deutlichen Hauptpeak, dessen maximale Absorption auftritt, nachdem mit insgesamt 75 mL Puffer eluiert wurde. Die hydrogenasehaltigen Fraktionen werden vereinigt und auf ein Volumen von ca. 100 μ L aufkonzentriert und in salzfreien Puffer (50 mM Tris, pH-Wert 8,0) überführt. Ein Teil der Probe ist zur Bestimmung der Proteinkonzentration und Überprüfung des Reinheitsgrades

vorgesehen. Der verbleibende Rest wird direkt für Kristallisationsansätze verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Durch die Ergänzung des bisherigen Protokolls zur Gewinnung der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* um eine weitere, abschließende Gel-filtrationssäule wird das Protein in definierte Pufferbedingungen gebracht und die Entfernung von Derivaten des Proteins mit veränderter Größe erreicht. Aufgrund dessen enthält die endgültige Proteinprobe strukturell intakte, wasserstoffspaltungsaktive Enzyme.

9.4 Bestimmung der Reinheit

Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse aus SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS belegen den hohen Reinheitsgrad der Proben, die insbesondere zur Kristallisation des Proteins verwendet wurden.

9.4.1 SDS-PAGE

Elektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Bei dieser Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung innerhalb einer Polyacrylamidgelmatrix. Unterschiedliche Ladungen und Größen der Teilchen bewirken unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Ein Substanzgemisch wird daher nach den Eigenschaften Größe und Ladung aufgetrennt. Bei der SDS-PAGE überdeckt das anionische Detergenz SDS die Eigenladung von Proteinen, so dass Micellen mit konstanter Ladung pro Masseneinheit entstehen. Durch das vorherige Erhitzen der Proben werden die Proteine denaturiert, d. h. es werden mit Ausnahme der Primärsequenz alle weiteren Strukturelemente aufgelöst. Einziges Trennungskriterium ist damit die Größe der Proteine. Durch Vergleich mit kommerziell erhältlichen Standards oder anderen Proteinen bekannter Größe lassen sich die Molekulargewichte der aufgetrennten Proben abschätzen.

Die Banden des in Abbildung 9.10 dargestellten 10-15%igen SDS-Gradientengels zeigen die elektrophoretische Analyse verschiedener Proteinproben. In Spur 1 und 2 sind die Banden beider Untereinheiten der aus *A. vinosum* isolierten [NiFe]-H₂ase zu sehen, die sich durch das eingesetzte Probenvolumen unterscheiden: Spur 1=0,5 μ L, Spur 2=1 μ L. Spur 3 zeigt die beiden Untereinheiten der [NiFe]-H₂ase, isoliert aus *D. vulgaris* Miyazaki F mit bekanntem Molekulargewicht, zum Vergleich. 4 μ L der *D. vulgaris* MF Probe (ca. 70 μ M) werden 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Die *A. vinosum* Proteinproben werden entsprechend mit Probenpuffer auf 8 μ L Gesamtvolumen gebracht.

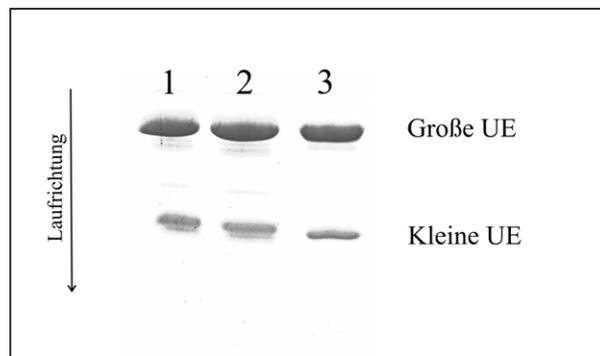


Abbildung 9.10: 10-15%iges SDS-Gradientengel: Spuren 1 und 2 zeigen Banden der großen und kleinen Untereinheit der aus *A. vinosum* isolierten [NiFe]-Hydrogenase. In Spur 3 ist zum Vergleich eine Probe der aus *D. vulgaris* MF isolierten [NiFe]-Hydrogenase aufgetragen. Die Molekulargewichte betragen ca. 30 kDa (kleine Untereinheit) und ca. 60 kDa (große Untereinheit).

Anhand eines SDS-Gels ist nur eine grobe Abschätzung der Molekulargewichte durch den Vergleich mit Markerproteinen, in diesem Fall mit der aus *D. vulgaris* MF isolierten Hydrogenase, möglich. Die Proteinbanden liegen im Bereich von 30 bzw. 60 kDa und zeigen einen hohen Reinheitsgrad der Proben.

Unterhalb der 30 kDa Bande in Spur 1 und 2 der aus *A. vinosum* isolierten [NiFe]-H₂ase ist eine weitere schwache Bande zu erkennen. Dabei handelt es sich um eine Verunreinigung der Probe mit Fremdprotein oder

um eine verkürzte Form der kleinen Untereinheit, welche im Laufe des Reinigungsprozesses nicht abgetrennt werden konnte.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die aus *D. vulgaris* MF isolierte [NiFe]-Hydrogenase im Vergleich zum aus *A. vinosum* gewonnenen Enzym ein geringeres Molekulargewicht aufweist, da die Bande der kleinen Untereinheit des in Spur 3 aufgetragenen Proteins (*D. vulgaris* MF [NiFe]-H₂ase) etwas unterhalb der entsprechenden Bande der Hydrogenase aus *A. vinosum* liegt. Der Größenunterschied ist im Falle der großen Untereinheit nicht eindeutig zu erkennen, da diese aufgrund des hohen eingesetzten Proteinmenge in einer breiteren Bande im Gel läuft. Wird die Menge des verwendeten Proteins soweit reduziert, dass die große Untereinheit als schmale Bande zu erkennen ist, bleibt die Bande der kleinen UE nicht sichtbar.

9.4.2 MALDI-TOF-MS

Bei der MALDI-TOF-MS handelt es sich um eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Laser verdampft kleine Mengen einer Matrix und die darin enthaltenen Proteinmoleküle. Dabei werden Protonen von der Matrix auf das Protein übertragen. Die entstandenen Kationen werden im Massenanalysator nach der Beschleunigungsphase bezüglich ihres Masse-Ladungsverhältnisses aufgrund ihrer spezifischen Flugzeit im Messrohr („time of flight“ (TOF)) aufgetrennt. Die am Detektor registrierten Informationen über Masse und entsprechende Intensität werden im Spektrum dargestellt. Es wurde eine DHB (Dihydroxybenzoesäure) oder Sina (Sinapinsäure) Matrix verwendet.

Das in Abbildung 9.11 dargestellte MALDI-TOF-Massenspektrum zeigt zwei Peaks, die eindeutig der kleinen (29688 ± 300 Da) und der großen (62056 ± 300 Da) Untereinheit der aus *A. vinosum* isolierten [NiFe]-H₂ase zuzuordnen sind. Weiterhin ist ein kleiner Anteil des nicht dissoziierten Apoproteins mit einer Größe von 91889 ± 300 Da zu sehen.

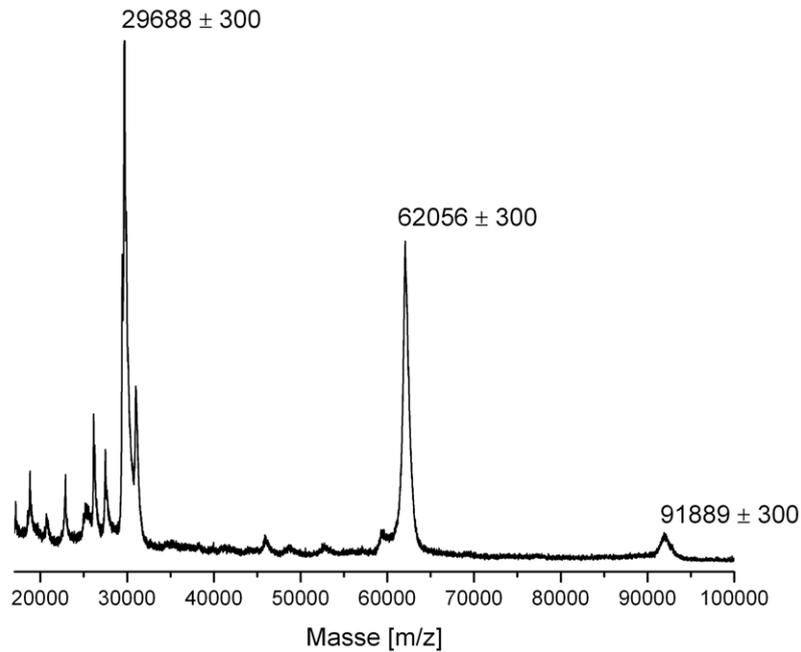


Abbildung 9.11: MALDI-TOF-Massenspektrum der aus *A. vinosum* isolierten und aufgereinigten [NiFe]-Hydrogenase. Die Peaks der Massen 29688 Da und 62056 Da sind der kleinen, bzw. großen Untereinheit der Hydrogenase zuzuordnen. Der bei 91889 Da liegende Peak entspricht dem ungetrennten Proteinkomplex. Der Fehler beträgt ± 300 Da.

Das Massenspektrum bestätigt die in Abschnitt 9.4.1 beschriebenen Ergebnisse und damit den hohen Reinheitsgrad der Proteinproben. Zudem wird der bereits im SDS-Gel erkennbare Größenunterschied der aus unterschiedlichen Organismen isolierten Enzyme durch die hier dargestellten Daten konkretisiert. Tabelle 9.1 listet die experimentell ermittelten und aus der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewichte der [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* und *D. vulgaris* MF auf.

Aus dem Vergleich der mit Hilfe der MALDI-TOF-MS ermittelten Molekulargewichte mit den Werten, die aus der Aminosäuresequenz berechnet wurden geht hervor, dass die experimentell ermittelten Molekulargewichte der [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* geringer sind. Die Unterschiede belaufen

Tabelle 9.1: Molekulargewichte der [NiFe]-H₂asen aus *A. vinosum* und *D. vulgaris* MF. Die aufgeführten Werte, angegeben in Dalton, basieren auf Ergebnissen der MALDI-TOF-MS (diese Arbeit und [79]) oder wurden mit Hilfe des ProtParam Programms aus den Aminosäuresequenzen berechnet.

Protein- einheit	<i>A. vinosum</i>		<i>D. vulgaris</i> MF	
	MALDI-TOF- MS	ProtParam	MALDI-TOF- MS	ProtParam
Klein	29688±300	33343	28748±300	28762
Groß	62065±300	63593	59090±300	59128
Apoprotein	91889±300	96919	87838±300	87873

sich auf 3655±300 Da für die kleine UE, 1528±300 Da für die große UE und bei Betrachtung des Apoproteins auf 5030±300 Da. Da zur Berechnung der Molekulargewichte mit Hilfe des ProtParam Programms (ExpASY-Homepage [99]) die aus der Gensequenz abgeleitete Aminosäuresequenz verwendet wurde, sind keine posttranskriptionalen oder posttranslationalen Modifikationen berücksichtigt worden (vgl. Kapitel 4.4). Daraus ergibt sich die Differenz zwischen den experimentellen und berechneten Daten.

Bei der *D. vulgaris* MF H₂ase sind die experimentellen und berechneten Werte praktisch identisch, da die verwendete Aminosäuresequenz auf Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse basiert [45, 100, 38]. Bei vergleichender Betrachtung der experimentell ermittelten Molekulargewichte der funktionellen H₂asen beider Organismen bestätigt sich der Größenunterschied, der bereits in der SDS-PAGE angedeutet wird und beträgt im Falle des Apoproteins 4000±300 Da.

9.5 Zusammenfassung

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Methode zur Gewinnung der [NiFe]-H₂ase aus dem photosynthetischen Bakterium *A. vinosum* wurde durch Schaffung entsprechender technischer Gegebenheiten und neu eingebrachter Änderungen derart optimiert, dass auf effiziente Weise hoch-

reines und kristallisationsfähiges Protein gewonnen werden konnte. Insbesondere die in Kapitel 9.4 dargestellten Ergebnisse der Reinheitsgradbestimmung mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF-Massenspektrometrie dokumentieren den hohen Reinheitsgrad der Proteinproben, die mit dem hier beschriebenen Isolierungs- und Reinigungsverfahren erhalten wurden.

Der in diesem Protokoll erstmals dargestellte, automatisierte und gekühlte Zellaufbruch durch wiederholtes Waschen der Zellen mit Aceton in einer Kombination aus Soxhlet-Extraktions- und Destillationsapparatur, ermöglicht eine effiziente Entfernung photosynthetischer Pigmente. Zudem konnte die erforderliche Acetonmenge auf ein Zehntel der ursprünglich eingesetzten Menge reduziert werden. Gleichzeitig ist die Isolierung großer Mengen BChl*a* möglich, welches sich für die weitere Verwendung in biochemischen Untersuchungen eignet.

Um den säulenchromatographischen Reinigungsprozess zu optimieren, wurde zunächst das bisherige Verfahren an die Arbeit mit einer FPLC-Anlage angepasst und auf einen Maßstab gebracht, der es ermöglicht, ca. 100 mg reiner [NiFe]-H₂ase aus 2 kg Zellmaterial zu erhalten. Im Reinigungsverfahren wurde das Säulenmaterial der zweiten Anion-Austausch-Säule durch eine besser trennendere Matrix ersetzt und der gesamte Prozess durch einen weiteren, abschließenden Gelfiltrationsschritt ergänzt. Dadurch ist die Qualität des isolierten Enzyms erhöht worden.

Die eindeutige Auswahl der bei der chromatographischen Auftrennung des komplexen Proteingemisches erhaltenen H₂asehaltigen Fraktionen ist durch Anwendung des Verfahrens zur Ermittlung der spezifischen Wasserstoffspaltungsaktivität des Enzyms möglich. Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Aktivitätsbestimmung eignet sich zur schnellen, qualitativen und reproduzierbaren Identifikation einer großen Anzahl relevanter Ansätze.

10 Spektroskopische Charakterisierung

Das folgende Kapitel stellt die eingehende spektroskopische Charakterisierung der einzelnen Redoxzustände des auf die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Weise isolierten und gereinigten Enzyms dar. Sie erlaubt eine Aussage bezüglich der Proteinqualität und der Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse mit bisher publizierten Resultaten. Die Analyse der einzelnen Redoxzustände, welche die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* einnehmen kann, erfolgte mit Hilfe FT-IR- und EPR-spektroskopischer Methoden. Weisen die in diesem Kapitel dargestellten Spektren Eigenschaften auf, die mit den aus anderen Publikationen bekannten Sachverhalten übereinstimmen, ist von qualitativ einwandfreiem, uneingeschränkt verwendbarem Material auszugehen. Die Charakterisierung beschränkt sich auf die im katalytischen Zyklus natürlich vorkommenden Redoxzustände (vgl. Abbildung 4.3). Diese sind bereits ausführlich untersucht und bilden die Grundlage für den Vergleich mit den in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnissen. Die Spektren der artifiziellen Ni-L bzw. Ni-CO Zustände werden deswegen nicht in dieser Arbeit dargestellt.

Um das isolierte Protein, die membrangebundene [NiFe]-H₂ase des photosynthetischen Bakteriums detailliert zu untersuchen, werden die verschiedenen Zustände durch entsprechende Probenvorbehandlung eingestellt und anschließend spektroskopisch vermessen. FT-IR lässt indirekt

über die Beobachtung der Schwingungsfrequenzverschiebungen der CN^- - und CO -Liganden des Eisenatoms im katalytischen Zentrum Rückschlüsse auf Veränderungen der Elektronendichte in dessen Umgebung zu. Mittels EPR ist vornehmlich der elektronische Zustand des Nickelatoms dieses bimetallichen Zentrums zu verfolgen. Informationen beider Methoden ergänzen sich und führen zu einem Gesamtbild über die an dieser funktionellen Einheit stattfindenden Prozesse bei der Umsetzung von Wasserstoff.

Die Einstellung der jeweiligen Redoxzustände des Enzyms erfolgt bei variierenden pH-Werten durch Reduktion mit molekularem Wasserstoff bei 45-50 °C oder durch zuerst erfolgende Reduktion und anschließender Rückoxidation unter definierten Bedingungen. Die genauen Protokolle zur Herstellung der Proben sind Abschnitt 7.3.5 zu entnehmen. Die paramagnetischen Zustände Ni-A, Ni-B und Ni-C wurden sowohl FT-IR- als auch EPR-spektroskopisch (X-Band) vermessen. Die FT-IR-Spektren aller Redoxzustände wurden mit Hilfe der im IFS 66 v/s-Spektrometer eingebauten Transmissionszelle aufgenommen.

10.1 cw-EPR

Beim hier angewendeten cw-EPR Standardverfahren (cw=continuous wave) wurde die Absorption einer paramagnetischen Probe durch kontinuierliches Bestrahlen mit Mikrowellen einer festgelegten Frequenz als Funktion eines Magnetfeldes gemessen. Das angelegte Magnetfeld wird zudem mit einer bestimmten Frequenz und Amplitude sinusförmig moduliert.

Die hier dargestellten EPR-Spektren entsprechen der ersten Ableitung des Absorptionssignals und werden als rhombisch bezeichnet, da sich die drei gemessenen g -Tensor-Hauptwerte unterscheiden: $g_x \neq g_y \neq g_z$. Die gemessenen Signale sind auf die Absorption des paramagnetischen Nickeliens im aktiven Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase zurückzuführen. Nickel besitzt in den formalen Oxidationsstufen +I und +III ein ungepaartes Elektron (Spin $S=\frac{1}{2}$) im $d_{x^2-y^2}$ bzw. d_{z^2} -Orbital, so dass es mit EPR-

Techniken detektierbar ist. Redoxzustände mit Ni(II)-Konfiguration sind nicht EPR-aktiv, da das Nickel im „low spin“-Zustand (Spin $S=0$) vorliegt. Das Eisen befindet sich in allen Redoxzuständen in Fe^{2+} „low spin“-Konfiguration (Spin $S=0$) und bleibt diamagnetisch [101]. Es trägt somit nicht zu den im EPR-Spektrum sichtbaren Signalen bei.

10.1.1 Ergebnisse

Der Redoxzustand Ni-A

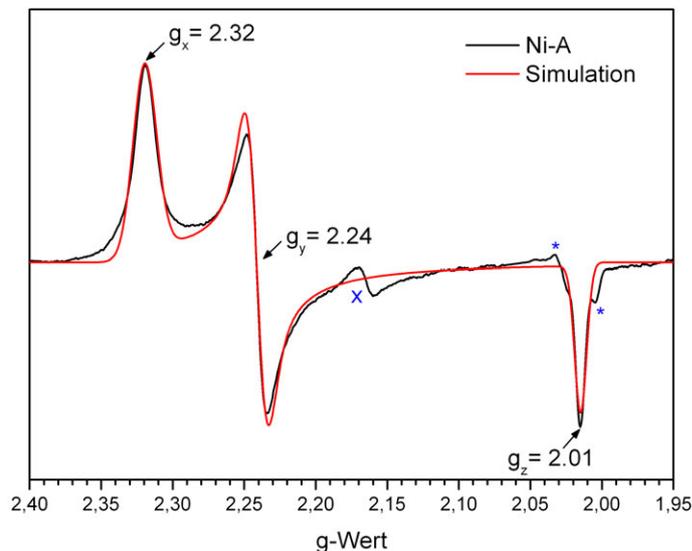


Abbildung 10.1: X-Band EPR-Spektrum des paramagnetischen Redoxzustandes Ni-A (schwarzes Spektrum) und dessen Simulation (rotes Spektrum). Experimentelle Bedingungen: Temperatur 70 K, Mikrowellenfrequenz 9,46 GHz, Mikrowellenstärke 2 mW, Modulationsfrequenz 100 KHz, Modulationsamplitude 1 mT. Es wurden 67 Spektren gemittelt. Die Proteinkonzentration beträgt 1 mM. Blaue Markierungen: *=Verunreinigung durch unbekanntes, organisches Radikal ($\leq 5\%$), x=Signal der [NiFe]-Hydrogenase im Ni-B Zustand (ca. 13%).

Abbildung 10.1 zeigt das charakteristische rhombische Signal der [NiFe]-H₂ase im Ni-A (Ni(III)) Zustand. Die aus der Simulation (rote Linie) erhaltenen g-Tensor-Hauptwerte betragen: $g_x=2,32$, $g_y=2,24$ und

$g_z=2,01$. Ein geringer Anteil der Proteinprobe (ca. 13%) verblieb im Ni-B Zustand und ist dem Signal bei $g_y=2,16$ (Markierung durch blaues x) zuzuordnen. Das EPR-Spektrum weist weiterhin eine mit einem * markierte Verunreinigung von weniger als 5% auf, bei der es sich um ein unbekanntes, organisches Radikal handelt. Das Signal dieser Spezies wird größtenteils durch das g_z -Signal des Ni-A Zustandes überdeckt.

Der Redoxzustand Ni-B

In Abbildung 10.2 ist das experimentell ermittelte EPR-Spektrum (schwarze Linie) und dessen Simulation (rote Linie) der [NiFe]-Hydrogenase des Redoxzustandes Ni-B (Ni(III)) gezeigt. Dieser Zustand zeichnet sich dadurch aus, dass er innerhalb weniger Minuten durch Wasserstoff reduziert werden kann. Der Anteil von Protein im Ni-A Zustand ($g_y=2,24$, Markierung durch blaues x) beträgt ca. 10%. Die g-Tensor-Hauptwerte der signifikanten Ni-B Signale liegen bei: $g_x=2,33$, $g_y=2,16$ und $g_z=2,01$.

Der Redoxzustand Ni-C

Das charakteristische Spektrum des Enzyms im Ni-C Zustand ist in Abbildung 10.3 gezeigt. Es handelt sich um einen Zustand, der im Gegensatz zu Ni-A und Ni-B direkt am Katalysezyklus beteiligt ist. Die formale Oxidationsstufe des Nickels bleibt in allen drei gezeigten Redoxzuständen unverändert +III. Die korrespondierenden g-Tensor-Hauptwerte des Ni-C Zustandes sind: $g_x=2,21$, $g_y=2,15$ und $g_z=2,01$.

Tabelle 10.1 fasst die in dieser Arbeit ermittelten g-Tensor-Hauptwerte für die membrangebundene [NiFe]-H₂ase der paramagnetischen Redoxzustände Ni-A, Ni-B und Ni-C des bimetallichen aktiven Zentrums zusammen. Die Ergebnisse stimmen mit den aus der Literatur bekannten Daten überein [102, 17, 53, 39].

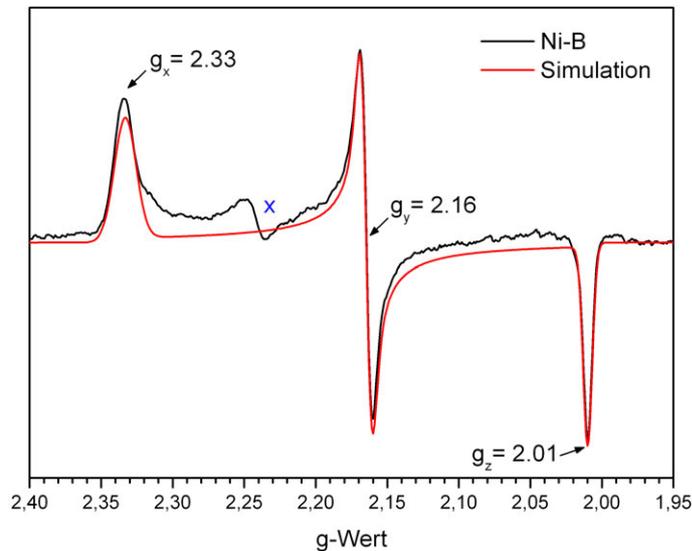


Abbildung 10.2: X-Band EPR-Spektrum des paramagnetischen Redoxzustandes Ni-B (schwarze Linie) und dessen Simulation (rote Linie). Experimentelle Bedingungen: Temperatur 70 K, Mikrowellenfrequenz 9,45 GHz, Mikrowellenstärke 2 mW, Modulationsfrequenz 100 KHz, Modulationsamplitude 0,6 mT, Proteinkonzentration 1 mM. Die Anzahl der gemittelten Spektren beträgt 51. Blaue Markierung: x=Signal der [NiFe]-Hydrogenase im Ni-A Zustand (ca. 10%).

10.1.2 Diskussion

Die im Ergebnisteil dargestellten EPR-Spektren der Zustände Ni-A, Ni-B und Ni-C zeigen unter den gewählten, experimentellen Bedingungen die zu erwartende charakteristische, rhombische Struktur. Vergleicht man die Spektren miteinander ist zu erkennen, dass sich die Positionen der ermittelten g_x - und g_y -Signale in Abhängigkeit vom jeweiligen Redoxzustand ändern, wohingegen der für g_z bestimmte Wert in allen Spektren identisch ist.

Bei Betrachtung der EPR-Spektren der nicht am katalytischen Zyklus beteiligten Zustände Ni-A und Ni-B ist festzustellen, dass sich diese nur geringfügig unterscheiden. Die g -Tensor-Hauptwerte stimmen mit Ausnahme

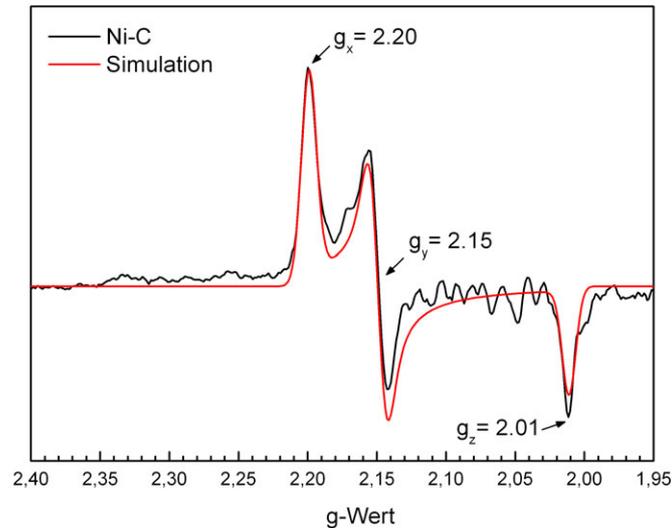


Abbildung 10.3: X-Band EPR-Spektrum des paramagnetischen Redoxzustandes Ni-C (schwarzes Spektrum) und dessen Simulation (rotes Spektrum). Experimentelle Bedingungen: Temperatur 40 K, Mikrowellenfrequenz 9,45 GHz, Mikrowellenstärke 20 mW, Modulationsfrequenz 100 KHz, Modulationsamplitude 1 mT. Insgesamt wurden 16 Spektren aufgenommen und gemittelt. Die Proteinkonzentration beträgt 1 mM.

von g_y praktisch überein. Es ist davon auszugehen, dass die Geometrie und die elektronische Struktur des Ni-Zentrums in beiden Zuständen sehr ähnlich ist, zudem die Oxidationsstufe des Nickels unverändert bleibt. Worin der Unterschied dieser Zustände besteht, wird kontrovers diskutiert und ist in verschiedenen Reviews ausführlich dargelegt [6, 36, 39, 40, 41, 42].

Eine Erklärung basiert auf der Natur des Brückenliganden zwischen dem Ni- und dem Fe-Atom des aktiven Zentrums, der sich möglicherweise unterscheidet. Für Ni-B ist ein Hydroxid-Anion nachgewiesen worden [47, 48, 49]. Im Falle des Ni-A handelt es sich vermutlich um eine ähnliche, aber nicht identische Spezies. Kristallstrukturanalysen der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans* zeigen eine im Vergleich zu Ni-B etwas längliche Form der Elektronendichte in diesem Bereich und

Tabelle 10.1: Übersicht über die in dieser Arbeit ermittelten g-Tensor-Hauptwerte der Redoxzustände des bimetallichen aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum*.

Redoxzustand	g_x	g_y	g_z
Ni-A	2,32	2,24	2,01
Ni-B	2,33	2,16	2,01
Ni-C	2,21	2,15	2,01

schlagen ein OOH^- vor [46]. Ein weiterer Erklärungsansatz berücksichtigt die Veränderung der räumlichen Umgebung des bimetallichen Zentrums, beispielsweise durch Protonierung oder Oxigenierung einer umliegenden Aminosäure oder eine Konformationsänderung einer Seitenkette in naher Umgebung. Aus röntgenkristallographischen Analysen [22] und EPR-Messungen [53] anderer [NiFe]- bzw. [NiFeSe]-Hydrogenasen geht hervor, dass einer der terminalen Cysteinliganden (Cys533 in *D. gigas* Nummerierung) des Nickels während des katalytischen Zyklus protoniert wird. Es wurde gezeigt, dass die konservierte Aminosäure Glutamat (Glu-25 in *D. fructosovorans* bzw. Glu-18 in *D. gigas* Nummerierung) eine wichtige Rolle beim Protonentransfer vom bzw. zum aktiven Zentrum spielt. Der Ersatz dieser Aminosäure durch Aspartat (E25D Mutante) oder Glutamin (E25Q Mutante) beeinträchtigt die katalytische Aktivität signifikant [55]. Die Oxigenierung, also die Ausbildung einer S=O oder S-OH Bindung eines umliegenden Cysteins wird ebenfalls diskutiert. Die Positionsänderung eines in beiden Zuständen gleichen Brückenliganden im aktiven Zentrum, z. B. des OH^- , könnte ebenfalls ein Grund für die genannten Unterschiede sein. Es wurde postuliert, dass im Ni-A Zustand die Sauerstoffspezies die Brückenposition zwischen dem Ni und dem Fe des aktiven Zentrums einnimmt, wohingegen im Ni-B Zustand eine Bindung zum Ni in anderer Konformation vorliegt [53]. Es bleiben weitere Messungen und Strukturanalysen notwendig um die verschiedenen Interpretationen zu verifizieren

und um die tatsächliche Natur des Brückenliganden bzw. die Struktur des Ni-A Zustandes zu bestimmen.

Der im Vergleich zu den inaktiven Zuständen Ni-A und Ni-B unterschiedliche Brückenligand, das Hydrid (H^-), des aktiven Zustandes Ni-C erklärt die deutliche Veränderung der ermittelten g-Tensor-Hauptwerte. Die elektronische Struktur des Ni-C scheint sich deutlicher vom Ni-A als vom Ni-B Zustand zu unterscheiden, denn im Vergleich von Ni-B mit Ni-C verschiebt sich lediglich der g_x -Wert, wohingegen g_y und g_z nahezu unverändert bleiben. Im Vergleich mit dem Ni-A Zustand verändern sich sowohl g_x als auch g_y signifikant. Die durch die Aktivierung des Enzyms verursachten Unterschiede in der elektronischen Struktur des aktiven Zentrums zwischen Ni-A und Ni-C sind bedeutender als die Veränderungen beim Übergang von Ni-B über die EPR-inaktiven Intermediate Ni-SI_r bzw. Ni-SI_a in den Ni-C Zustand. Es wurde gezeigt, dass das Protein im Ni-A Zustand nicht direkt mit Wasserstoff reagiert [43] und wahrscheinlich zunächst eine Konformationsänderung stattfinden muss bevor es aktiviert werden kann [53, 39]. Die im Ni-C Zustand nachgewiesene Interaktion des Nickelatoms mit dem reduziert vorliegenden proximalen Fe-S Cluster, welche bei Tieftemperaturen (≤ 20 K) zur Verbreiterung bzw. zu einer Aufspaltung des Signals führt, erklärt die charakteristischen g-Werte des Ni-C Zustandes [103, 104].

Die Kontaminationen der Spektren des Ni-A und Ni-B Zustandes durch Signale des Proteins in anderen Zuständen belaufen sich auf 10-15% und sind damit in einem tolerierbaren Größenordnungsbereich. Sie entstehen durch nicht vollständige Reduktion oder Oxidation des gesamten Materials während der Probenpräparation und sind kaum zu vermeiden. Die Herkunft des im Ni-A Spektrum auftretenden Signals eines organischen Radikals ist unbekannt. Da es nicht grundsätzlich in allen Spektren auftritt, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um einen systematischen Fehler während der Isolierung und Reinigung des Proteins handelt. Eine

mögliche Ursache könnten Verunreinigungen der Probengefäße oder innerhalb des Spektrometers gewesen sein. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass während der Probenpräparation unter Inkubation mit Wasserstoffgas Radikale entstehen.

Worum es sich bei den zusätzlichen Signalen im Bereich zwischen den g -Tensor Hauptwerten $g=2,03$ und $g=2,12$ handelt ist ungeklärt. Die Aufspaltung des Ni-C Signals, welches aufgrund der Wechselwirkungen mit dem $[4\text{Fe} - 4\text{S}]^+$ bei 4 K auftritt, ist bei der eingestellten Messtemperatur von 40 K nicht zu erwarten. Nicht auszuschließen sind kleine Beiträge der g_y bzw. g_z Signale eines lichtinduzierten Ni-L Zustandes ($\text{Ni-L}_1=g_x=2,26$, $g_y=2,12$ und $g_z=2,05$ bzw. $\text{Ni-L}_2=g_x=2,28$, $g_y=2,12$ und $g_z=2,05$), der bereits bei Temperaturen unter 150 K auftritt. Zudem könnte es sich um degeneriertes Protein handeln, welches während der 60 minütigen Inkubation mit Wasserstoffgas im 45-50 °C warmen Wasserbad entstanden ist. Diese Signale treten in allen präparierten Ni-C Proben auf und bleiben auch in Spektren mit einer hohen Anzahl gemittelter Scans bestehen. Vergleichbare Signale sind bei Proben des Ni-C Standes mit Protein aus *D. vulgaris* MF detektiert worden. Daher ist anzunehmen, dass es sich nicht um Signale spezifisch für die [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* handelt.

Da alle in dieser Arbeit dargestellten experimentellen EPR-Spektren und deren Simulationen (siehe Tabelle 10.1) mit den bisher publizierten Ergebnissen aus anderen Arbeiten mit der [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* übereinstimmen (vgl. Review [39]), ist vom einwandfreien Zustand des isolierten Proteins auszugehen. Die Anwendung der Protokolle zur Herstellung von Proteinproben einzelner Redoxzustände für die EPR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 7.3.5) führte mit dem präparierten Material ebenfalls zu reproduzierbaren Resultaten.

10.2 FT-IR

Alle bisher bekannten Redoxzustände, die im katalytischen Zyklus der Hydrogenase auftreten, sind mit FT-IR-spektroskopischen Methoden analysierbar. Die charakteristischen Schwingungen der zweiatomigen Eisenliganden, zwei CN^- -Moleküle und ein CO-Molekül, liegen im Bereich zwischen $1800\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$. Die detektierten Schwingungsfrequenzänderungen bzw. Wellenzahlverschiebungen im Spektrum sind insbesondere auf die Änderungen der elektronischen Umgebung des Eisenatoms im bimetallicen aktiven Zentrum zurückzuführen.

10.2.1 Ergebnisse und Diskussion

Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Banden der im Folgenden dargestellten FT-IR-Spektren (Abbildungen 10.4, 10.5 und 10.6) bezeichnen die für die jeweiligen Redoxzustände charakteristischen Schwingungen des CO- bzw. der beiden CN^- -Liganden. Die nicht gekennzeichneten Banden sind Schwingungen anderer Redoxzustände zuzuordnen. Die Auflösung beträgt 1 cm^{-1} . Tabelle 10.2 fasst die ermittelten IR-Schwingungsfrequenzen aller in diesem Kapitel dargestellten Redoxzustände der [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* zusammen. Die aufgelisteten Ergebnisse stimmen mit den bisher publizierten Daten überein [40].

Die inaktiven Zustände Ni-A und Ni-B

Abbildung 10.4 zeigt die FT-IR-Spektren der inaktiven Redoxzustände Ni-A (schwarzes Spektrum) und Ni-B (blaues Spektrum). Diese sind durch die signifikante Absorption des CO-Liganden bei 1944 cm^{-1} , und der beiden Banden der CN^- -Moleküle bei 2081 und 2092 cm^{-1} (Ni-A) bzw. 1943 , 2079 und 2090 cm^{-1} (Ni-B) gekennzeichnet. Die experimentell ermittelten Schwingungsfrequenzen der Liganden des Fe-Atoms des aktiven Zentrums stimmen im Rahmen der Auflösung mit bisher publizierten Daten der Redoxzustände Ni-A und Ni-B dieses Organismus überein [40, 56, 105].

Tabelle 10.2: Übersicht über die in dieser Arbeit ermittelten IR-Schwingungsfrequenzen der Liganden des Eisenatoms (CO und CN⁻) im aktiven Zentrum der jeweiligen Redoxzustände der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum*. Die Auflösung beträgt 1 cm⁻¹.

Redoxzustand	$\tilde{\nu}(\text{CO})$	$\tilde{\nu}(\text{CN})$
Ni-A	1944	2081, 2092
Ni-B	1943	2079, 2090
Ni-SI _r	1911	2053, 2067
Ni-SI _a	1931	2073, 2084
Ni-C	1948/1950	2073, 2084
Ni-R _I	1936	2058, 2072
Ni-R _{II}	1921	2048, 2063

Die Probe zur Aufnahme des Ni-A Spektrums lag beinahe vollständig ($\gg 95\%$) im gewünschten Zustand vor. Lediglich kleine Schultern der Bande des CO-Liganden bei 1951 cm⁻¹ und 1936 cm⁻¹ deuten auf geringe Mengen Protein im Redoxzustand Ni-C bzw. Ni-R hin. Im Gegensatz zur EPR, welche sich auf die paramagnetischen Zustände beschränkt, tragen hier die Signale aller Redoxzustände zum Spektrum bei. Dadurch ist die höhere Anzahl „sichtbarer“ Kontaminationen zu erklären. Die im Vergleich zu den scharfen Signalen im Ni-B Spektrum auftretende Verbreiterung der CN⁻-Banden dieses Spektrums ist durch in kleinen Mengen vorliegendes Protein im Ni-B Zustand zu erklären. Die eng beieinander liegenden Absorptionsmaxima beider Zustände führen zu dem Effekt der Bandenverbreiterung.

Das Ni-B Spektrum besitzt ebenfalls einen sehr hohen Reinheitsgrad. Das Protein der angefertigten Probe liegt nahezu vollständig ($\gg 95\%$) im Ni-B Zustand vor. Die zusätzliche $\tilde{\nu}(\text{CN})$ Bande bei 2099 cm⁻¹ ist dem Ni-SU Zustand zuzuordnen. Dieser Teil der Proteinprobe ist im Verlauf der Probenpräparation nicht vollständig in den Ni-B Zustand zurück oxidiert und im Ni-SU Zustand verblieben. Das Auftreten geringer Mengen im Reaktionszyklus benachbarter Redoxzustände ist bei der Probenher-

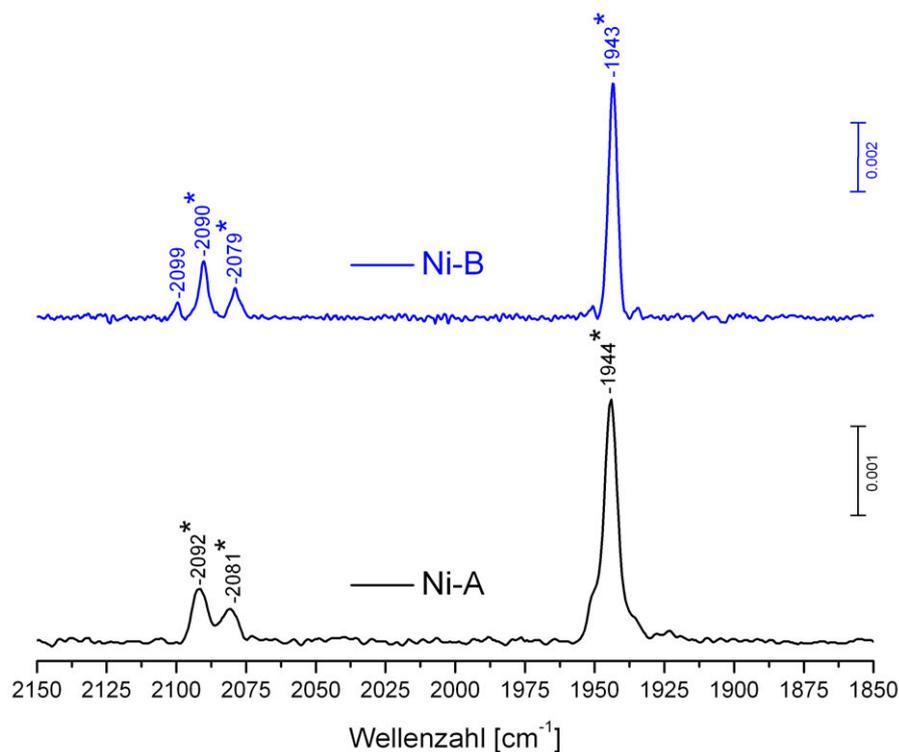


Abbildung 10.4: FT-IR-Spektren der inaktiven Redoxzustände Ni-A (schwarzes Spektrum) und Ni-B (blaues Spektrum). Die Auflösung beträgt 1 cm^{-1} , die Messtemperatur liegt bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, die Proteinkonzentration der Probe beträgt $800\text{ }\mu\text{M}$.

stellung nicht zu vermeiden [66] und auch bei der Verwendung alternativer Methoden (z. B. elektrochemische IR-Messungen) zu beobachten [56, 51].

Beide Spektren der katalytisch inaktiven Zustände Ni-A und Ni-B unterscheiden sich in sehr geringem Maße. Die Absorptionsbanden der Eisenliganden sind im Ni-B Zustand im Vergleich zu Ni-A konsistent um $1\text{-}2\text{ cm}^{-1}$ zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Dies bedeutet, dass die Umgebung des Eisenatoms im aktiven Zentrum der beiden redoxinaktiven Zustände, aufgrund der detektierten geringfügigen Schwingungsänderungen der Liganden, nur minimal variiert. Eine Aussage in Bezug auf die tatsächliche Natur des Brückenliganden, der in beiden Zuständen verschie-

denartig sein kann, ist aufgrund dieser Ergebnisse jedoch nicht möglich. Die Unterschiede zwischen Ni-A und Ni-B können alternativ dazu auch durch verschiedene Positionen des gleichen Brückenliganden im aktiven Zentrum oder eine Änderung der Proteinumgebung, z. B. Protonierung oder Konformationsänderung umliegender Aminosäuren, begründet werden [39]. EPR-spektroskopische Untersuchungen und DFT-Rechnungen haben ergeben, dass es sich beim Brückenliganden des Ni-B Zustandes um ein Hydroxid-Anion (OH^-) handelt [47, 48, 49]. Da das Nickelatom des aktiven Zentrums sowohl im Ni-A als auch im Ni-B Zustand die gleiche Oxidationsstufe (+III) besitzt und sich die FT-IR- sowie die EPR-Spektren nur geringfügig unterscheiden, ist eine Sauerstoffspezies als Brückenligand für Ni-A wahrscheinlich [44, 45]. Aufgrund der aus Kristallstrukturanalysen der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans* erhaltenen Ergebnisse wurde ein OOH^- als möglicher Brückenligand postuliert [46].

Die Ni-SI-Redoxzustände

Bei den in Abbildung 10.5 dargestellten Spektren handelt es sich um Signale des ersten redoxaktiven, noch oxidierten Zustandes Ni-SI_a, der direkt am Wasserstoffspaltungsprozess beteiligt ist und um Signale des Redoxzustandes Ni-SI_r. Die beiden Subformen Ni-SI_r (schwarzes Spektrum) und Ni-SI_a (blaues Spektrum) liegen in einem Säure-Base-Gleichgewicht vor ($\text{pK}_a \approx 8$). Sie unterscheiden sich signifikant in der Lage ihrer Absorptionsbanden. Die charakteristischen Banden des Ni-SI_r Zustandes liegen bei 1911, 2053 und 2067 cm^{-1} (pH 9,0), die Banden des Ni-SI_a Zustandes bei 1931, 2073 und 2084 cm^{-1} (pH 6,0).

Die Spektren weisen neben den dominierenden Banden des jeweiligen Zustandes, Signale des entsprechend anderen Ni-SI Zustandes auf. Das schwarze Ni-SI_r Spektrum zeigt Banden bei 1932 und 2083 cm^{-1} (Ni-SI_a Zustand), das blaue Ni-SI_a Spektrum beinhaltet eine zusätzliche CO-Bande bei 1911 cm^{-1} (Ni-SI_r Zustand). Weiterhin treten in beiden

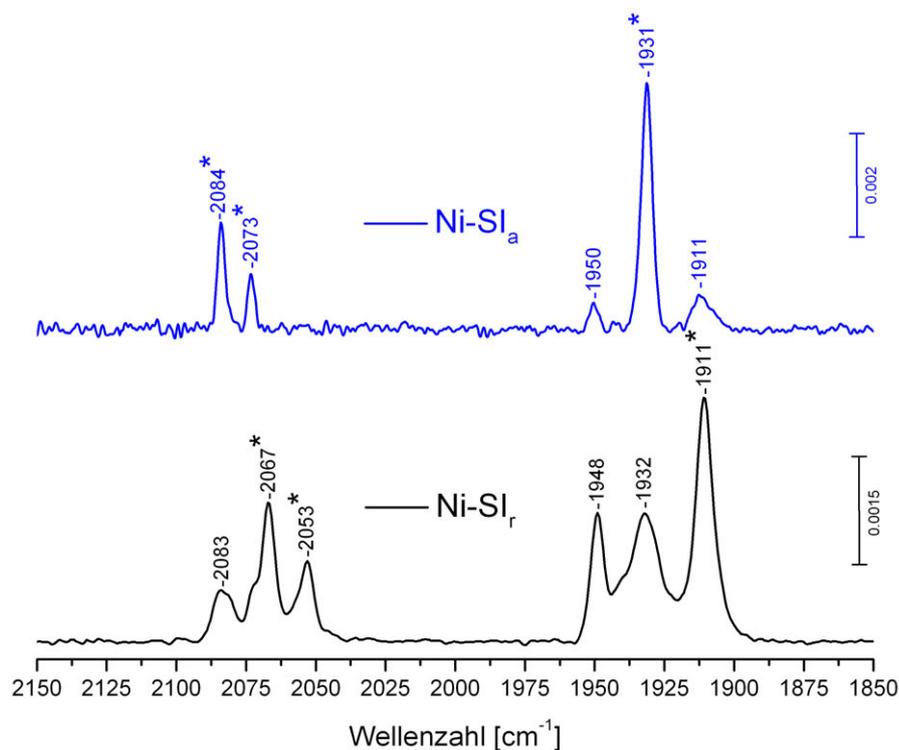


Abbildung 10.5: FT-IR-Spektren der Redoxzustände Ni-SI_r (pH 9,0) und Ni-SI_a (pH 6,0). Die Auflösung beträgt 1 cm^{-1} , die Messtemperatur $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Proteinkonzentration $800 \mu\text{M}$.

Spektren Banden des Ni-C Zustandes auf welche abhängig vom pH-Wert der Probe, um zwei Wellenzahlen verschoben und jeweils bei 1948 cm^{-1} (pH 9,0, Ni-SI_r Spektrum) bzw. 1950 cm^{-1} (pH 6,0, Ni-SI_a Spektrum) liegen [56]. Diese Änderungen sind mit dem elektronischen Zustand des proximalen Eisen-Schwefelclusters gekoppelt. EPR-Messungen belegen Spin-Spin-Wechselwirkungen zwischen dem Nickelatom des aktiven Zentrums und dem Cluster im reduzierten Zustand [103, 104]. Bei pH 9,0 liegen alle Fe-S Cluster im reduzierten Zustand vor [61], bei pH 6,0 ist der proximale Cluster oxidiert [106]. Die Elektronen werden im Laufe des katalytischen

Zyklus aufgenommen, bzw. abgegeben und über die Eisen-Schwefelcluster transportiert.

Der Ni-SI_a Zustand (blaues Spektrum) liegt zu ca. 85% vor. Der Anteil des Ni-SI_r Zustandes in der Probe, die dem schwarzen Spektrum zugrunde liegt, beträgt etwa 60%. Bei der Probenpräparation zur Einstellung des Ni-SI_r Zustandes war zu beobachten, dass etwa die Hälfte des Proteins bei der Überführung in Puffer mit dem pH-Wert 9,0 ausfielen. Diese Instabilität bei hohen pH-Werten führt zu der Annahme, dass sich das Protein bevorzugt im Ni-SI_a Zustand befindet und der Übergang in den Ni-SI_r Zustand unter diesen Bedingungen dagegen nicht bevorzugt wird. Zudem ist nicht auszuschließen, dass das Protein unabhängig vom Zustand bei hohen pH-Werten instabil wird. Daher sind die Signale anderer Zustände im Ni-SI_r Spektrum im Vergleich zum Spektrum des Ni-SI_a Zustandes größer.

Die unterschiedlichen Bandenlagen der beiden Redoxzustände sind auf den jeweiligen Protonierungszustand des Enzyms zurückzuführen. Bei hohen pH-Werten besitzt das Enzym im Ni-SI_r Zustand wahrscheinlich ein Hydroxid-Anion als Brückenligand zwischen dem Nickel- und dem Eisenatom des aktiven Zentrums, welcher, durch Aufnahme eines weiteren Protons, zu einem Wassermolekül protoniert wird. Dieses Wasser ist nicht länger an das aktive Zentrum gebunden und die Bindestelle des Brückenliganden wird frei. Dadurch ergeben sich die strukturellen Unterschiede, die sich in den deutlich unterschiedlichen Spektren widerspiegeln. Im nächsten Schritt des Reaktionszyklusses wird die frei gewordene Bindestelle des Brückenliganden formal mit einem Hydrid-Anion (H⁻) neu besetzt und der Ni-C Zustand entsteht [53].

Die reduzierten Zustände Ni-C und Ni-R

Die Spektren des Ni-C (schwarzes Spektrum) bzw. Ni-R Zustandes (blaues Spektrum) sind in Abbildung 10.6 dargestellt. Der Ni-C Zustand ist

durch die Schwingungsfrequenzen des CO-Liganden bei 1950 cm^{-1} (pH-Wert 6,5, proximaler Fe-S Cluster oxidiert, vgl. dazu Abschnitt 10.2.1) und die beiden CN^- -Banden bei 2073 bzw. 2084 cm^{-1} gekennzeichnet [56]. Das Protein liegt zu mehr als 95% im gewünschten Zustand vor.

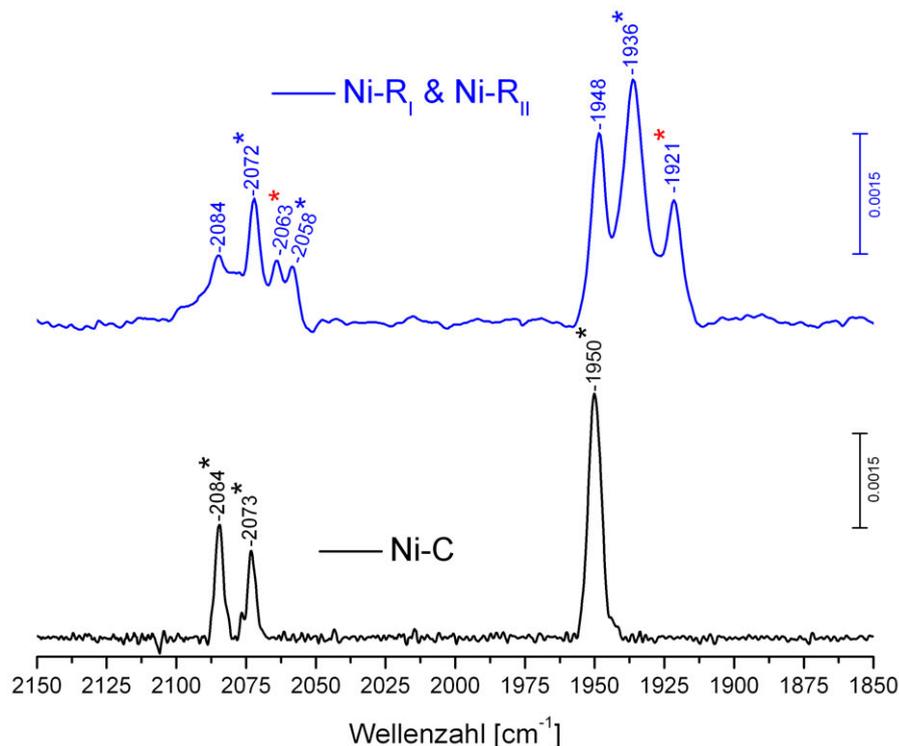


Abbildung 10.6: FT-IR-Spektren der Redoxzustände Ni-C (pH 6,5) und Ni-R (pH 8,0) wobei die Subzustände Ni-R_I (blaue * Markierung) bzw. Ni-R_{II} (rote * Markierung) zu unterscheiden sind. Die Auflösung betrug 1 cm^{-1} , die Proteinkonzentration $800\text{ }\mu\text{M}$ und die Messtemperatur $30\text{ }^\circ\text{C}$.

Durch die formale Neubesetzung der Liganden-Bindestelle im aktiven Zentrum des Ni-C Zustandes mit einem Hydrid-Anion ergibt sich die im Vergleich zum Ni-SI_a Zustand deutliche Verschiebung der Schwingungsfrequenz des CO-Liganden um 19 Wellenzahlen von 1931 zu 1950 cm^{-1} . Die dadurch verursachten strukturellen Änderungen im aktiven Zentrum beeinflussen die Cyanid-Liganden des Eisens nicht. Ihre Bandenlagen blei-

ben im Rahmen der Auflösung unverändert. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass elektronische Änderungen am Eisen des aktiven Zentrums größere Auswirkungen auf die Schwingungsfrequenz des CO-Liganden als auf die CN⁻-Liganden haben [107]. Zusätzlich bewirken spezifische Wechselwirkungen mit Molekülen in unmittelbarer Umgebung des CO-Liganden Änderungen der CO-Schwingungsfrequenzen, beispielsweise aufgrund von van der Waals-Wechselwirkungen. Die deutliche Verschiebung der Schwingungsfrequenzen zu niedrigeren Wellenzahlen beim Übergang von Ni-B zu Ni-SI_r (1943 → 1911 cm⁻¹) bzw. die entgegengesetzte Verschiebung beim Übergang von Ni-SI_a zu Ni-C (1931 → 1950 cm⁻¹) wurde durch eine Erhöhung bzw. Verringerung der Elektronendichte am Eisenatom erklärt [51]. Diese Veränderung beeinflusst die Metall-CO-Bindung und bewirkt die dadurch bedingten Frequenzverschiebungen.

Durch weitere Reduktion des Ni-C Zustandes entsteht der Ni-R Zustand. Bei einem pH-Wert von 8,0 liegen die beiden Subzustände Ni-R_I (1936, 2058 und 2072 cm⁻¹, blaue * Markierung) und Ni-R_{II} (1921 und 2063 cm⁻¹, rote * Markierung) im Verhältnis 2:1 vor, wie das gezeigte Spektrum verdeutlicht. Signale des dritten Ni-R Zustands (Ni-R_{III}) sind, in Übereinstimmung mit den von Bleijlevens *et al.* im Jahre 2002 veröffentlichten Ergebnissen [66], in diesem Spektrum nicht sichtbar. Diese Zustände treten abhängig vom Protonierungszustand des aktiven Zentrums, also pH-Wert gebunden auf: Ni-R_I - niedriger pH-Wert (pH 6,0), Ni-R_{II} - mittlerer pH-Wert (pH 8,0), Ni-R_{III} - nur bei pH 9,4 detektiert. Die CO-Bande bei 1948 cm⁻¹ und das Signal des CN-Liganden bei 2084 cm⁻¹ sind auf Protein im Ni-C Zustand in Kombination mit dem gleichzeitig reduziert vorliegenden proximalen Fe-S Cluster (vgl. Abschnitt 10.2.1) zurückzuführen [56].

Da das Protein beim Befüllen der Transmissionszelle bereits vom Ni-R in den Ni-C Zustand zurückoxidiert, obwohl unter anaerober Atmosphäre (Anaerob-Zelt) gearbeitet und das Spektrometer mit Stickstoffgas statt

Trockenluft geflutet wird, ist der Anteil des Proteins im Ni-C Zustand zu Beginn der Messung bereits sehr hoch. Vermutlich ist das Protein, wenn die Inkubation mit Wasserstoff beendet und das Reaktionsgefäß vom Gasverteilungssystem genommen wurde, sehr leicht durch Spuren von Sauerstoff oxidierbar.

Bei dem Versuch, den Zustand Ni-R_{II} bei hohen pH-Werten (pH 9,0) anzureichern, ist, wie bereits unter Abschnitt 10.2.1 beschrieben, während der Probenpräparation eine große Menge Protein ($\gg 50\%$) ausgefallen. Dadurch wird die Annahme unterstützt, dass das Protein unabhängig vom Redoxzustand bei hohen pH-Werten grundsätzlich destabilisiert wird. Dieser Materialverlust führte zu einer Verringerung der Signalgröße und damit zu einer signifikanten Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses, so dass die Banden kaum zu detektieren waren. Da das Protein bereits bei pH 8,0 hauptsächlich im Ni-R_I Zustand vorlag, wurde auf die Anfertigung von Proben bei niedrigeren pH-Werten verzichtet.

Die Änderung der Oxidationsstufe des Nickelatoms im aktiven Zentrum von +III zu +II und die Aufnahme eines weiteren Protons beim Übergang vom Ni-C in den Ni-R Zustand führen zu den strukturellen Unterschieden des aktiven Zentrums und dessen Umgebung und damit zu den Verschiebungen der CO- bzw. CN⁻-Schwingungsfrequenzen die in den IR-Spektren der jeweiligen Zustände zu sehen sind. Bei dem Brückenliganden im Ni-R Zustand handelt es sich vermutlich ebenfalls, wie bereits für Ni-C gezeigt, um ein Hydrid [61], jedoch fehlen bisher direkte spektroskopische Beweise.

Die in diesem Kapitel dargestellten FT-IR-Spektren weisen alle charakteristischen Schwingungsfrequenzen der CO- bzw. CN⁻-Liganden des Eisenatoms des aktiven Zentrums der [NiFe]-Hydrogenase des jeweiligen Redoxzustandes auf und bestätigen damit, ergänzend zu den Ergebnissen der cw-EPR Messungen (siehe Abschnitt 10.1), die hohe Qualität des Enzyms. Da sich mit diesem Material die bekannten Protokolle zur Probenherstel-

lung (siehe Kapitel 7.3.5) reproduzieren lassen und die erhaltenen Werte mit den aus anderen Veröffentlichungen bekannten IR-spektroskopischen Daten übereinstimmen, konnte eindeutig die Funktionalität des isolierten Proteins festgestellt werden.

10.3 Zusammenfassung

Mit den in diesem Kapitel aufgeführten Ergebnissen der EPR- und FT-IR-spektroskopischen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass das auf die in Kapitel 9 beschriebene Art isolierte und gereinigte Enzym den Erwartungen bezüglich seiner Funktionalität und der Reproduzierbarkeit bisheriger Ergebnisse entspricht. Die experimentellen Daten weisen alle Eigenschaften auf, die aufgrund der jeweiligen Probenvorbereitung zur Einstellung einzelner Redoxzustände vorausgesetzt und bereits publiziert wurden. Die aus den EPR-Spektren erhaltenen g-Tensor-Hauptwerte und die anhand der FT-IR-Spektren ermittelten Schwingungsfrequenzen stimmen mit den aus der Literatur bekannten Daten überein. Die EPR-Spektren weisen die charakteristische rhombische Struktur auf, die auf die Absorption des Nickelions (Ni(III) mit Spin $S=\frac{1}{2}$) aktiven Zentrum zurückzuführen ist, dessen ungepaartes Elektron sich im d_{z^2} -Orbital befindet. Die typischen IR-Bandenlagen der CO- bzw. CN^- -Liganden des Eisens liegen, vom jeweiligen Redoxzustand abhängig, zwischen 1800 und 2100 cm^{-1} .

Die Ergebnisse bestätigen die Anwendbarkeit der in dieser Arbeit weiterentwickelten Proteinreinigungsmethode. Das Protein kann für anders motivierte spektroskopische Untersuchungen oder alternative Methoden verwendet werden. Damit ist die weiterführende Analyse des katalytischen Mechanismus der Wasserstoffumsetzung eines bakteriellen, photosynthetischen Organismus möglich, welche die Ergebnisse aus Arbeiten mit anderen Standardhydrogenasen ergänzen.

11 Röntgenkristallographische Analyse

Die Zahl der in der Proteindatenbank (PDB: <http://www.rcsb.org/pdb>) [108] veröffentlichten Datensätze hat seit Beginn der 90er Jahre exponentiell zugenommen und beinhaltet im Augenblick insgesamt über 48000 Strukturen biologischer Makromoleküle. Dabei handelt es sich bei ca. 80% um röntgenkristallographisch ermittelte Proteinstrukturen. Die alternativ verwendeten Methoden NMR (Nuclear Magnetic Resonance) und EM (Elektronenmikroskopie) zur Strukturaufklärung von Proteinen tragen mit jeweils etwa 13% bzw. $\ll 0,5\%$ zur Gesamtzahl bekannter Proteinstrukturen bei. Wie diese Werte verdeutlichen, ist die Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen die am häufigsten angewandte Methode. Unbedingte Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von Proteinkristallen, jedoch lassen sich nicht alle Proteine kristallisieren. Weiterhin eignen sich nicht alle gewonnenen Kristalle zur Aufnahme auswertbarer Diffraktionsmuster im Beugungsexperiment. Die hochaufgelöste, molekulare Kristallstruktur, welche idealerweise das Ergebnis einer röntgenkristallographischen Analyse darstellt, bildet die Grundlage für die Interpretation von Ergebnissen funktioneller Charakterisierungen, beispielsweise aus spektroskopischen Messungen (EPR, FT-IR) oder elektrochemischen Experimenten.

Bereits 1987 wurde über die Gewinnung von Kristallen der [NiFe]-

Tabelle 11.1: Kristallstrukturen von Hydrogenasen unterschiedlicher Herkunft in antichronologischer Reihenfolge. Das Veröffentlichungsjahr, die Auflösung (in Angström), der Name des jeweiligen Organismus und der Redoxzustand des Proteins sind aufgeführt. Ist kein Redoxzustand angegeben, befindet sich das Protein im unbehandelten „wie isolierten“ Zustand.

Klasse	Organismus	Referenz	PDB	Auflösung [Å]	Jahr
NiFe	<i>D. vulgaris</i> , Unready	[45]	1WUI	1,0	2005
NiFe	<i>D. vulgaris</i> , Ready	[45]	1WUJ	1,4	2005
NiFe	<i>D. fructosovorans</i> , Ready	[46]	1YRQ	2,1	2005
NiFe	<i>D. fructosovorans</i> , Unready	[46]	1YQW	1,8	2005
NiFe	<i>D. vulgaris</i> , CO-Komplex	[111]	1UBH	1,35	2002
NiFe	<i>D. desulfuricans</i>	[112]	1E3D	1,8	2001
FeFe	<i>D. desulfuricans</i>	[113]	1HFE	1,6	1999
NiFeSe	<i>D. baculatum</i> , Active	[22]	1CC1	2,2	1999
NiFe	<i>D. vulgaris</i> , Active	[100]	1H2R	1,4	1999
FeFe	<i>C. pasteurianum</i>	[25]	1FEH	1,8	1998
NiFe	<i>D. vulgaris</i> , Ready	[38]	1H2A	1,8	1997
NiFe	<i>D. gigas</i> , Unready	[62]	2FRV	2,5	1996
NiFe	<i>D. gigas</i> , Unready	[110]	1FRV	2,8	1995

Hydrogenase aus *D. vulgaris* MF berichtet [109]. Allerdings konnte erst 1995 die erste röntgenkristallographisch ermittelte Struktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *D. gigas* von Volbeda *et al.* publiziert werden [110]. Anhand dieser Struktur mit einer Auflösung von 2,80 Å konnten erste Informationen über die Zusammensetzung des aktiven Zentrums erhalten werden, die den in Kapitel 4 beschriebenen strukturellen Aufbau von [NiFe]-Hydrogenasen begründen.

Tabelle 11.1 listet eine Auswahl weiterer bekannter Kristallstrukturen mit Auflösungen bis zu 1,0 Å von Hydrogenasen aus verschiedenen Organismen auf. Alle bisher veröffentlichten Strukturen von [NiFe]-H₂asen sind bakteriellen Ursprungs und wurden ausschließlich aus Sulfatreduzieren der Gattung *Desulfovibrio* isoliert. Eine Kristallstruktur von einer aus einem photosynthetischen Organismus isolierten Hydrogenase, insbesondere aus Bakterien der Gattung *Allochromatium*, ist bisher nicht be-

kannt. Aus dem Vergleich von Hydrogenasen aus Organismen, die deutliche Unterschiede bezüglich ihres Energiemetabolismus aufweisen, lassen sich Erkenntnisse einerseits über organismusunabhängige, generelle oder auch sehr spezifische Eigenschaften des Proteins ableiten.

Neben der in dieser Arbeit verwendeten [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* sind Hydrogenasen eines anderen photosynthetischen Organismus, dem Schwefel-Purpurbakterium *Thiocapsa roseopersicina*, bekannt [70]. Bisher sind insgesamt 5 verschiedene Hydrogenasen, davon zwei membrangebundene, eine sensorische, und zwei cytoplasmatische H₂asen, identifiziert worden, welche vornehmlich auf molekularbiologischer Ebene untersucht worden sind. Deren Analyse hat Erkenntnisse hinsichtlich der komplexen genetischen Kodierung, Maturierung und Regulation der Biosynthese von H₂asen geliefert.

Die Gewinnung von Proteinkristallen, die Ergebnisse der röntgenkristallographischen Analyse dieser Kristalle und die Erstellung des ersten, bisher vorläufigen Molekülmodells der membrangebundenen [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* werden im folgenden Kapitel dieser Arbeit beschrieben. Die aus einer vollständigen Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Erkenntnisse, bzw. ein hochaufgelöstes Molekülmodell stellen eine wesentliche Ergänzung der spektroskopischen funktionellen Charakterisierung des Proteins auf struktureller Ebene dar.

11.1 Kristallisation

11.1.1 Ergebnisse

Gewinnung erster Kristalle

Wie bereits erwähnt, ist die Existenz geeigneter Kristalle eine Grundbedingung für die Anwendung der röntgenkristallographischen Analyse. Das Verfahren zu deren Gewinnung ist der am wenigsten verstandene Schritt dieser Methode. Ein wichtiger Faktor, der zum Gelingen der Kristallisation

on eines Proteins beiträgt ist die Qualität des eingesetzten Ausgangsmaterials. Aufgrund dessen wurde die in Kapitel 9 dieser Arbeit beschriebene Isolierungs- und Reinigungsmethode dahingehend optimiert, eine sehr reine Proteinprobe zu erhalten. Der hohe Reinheitsgrad des Enzyms wurde mit Hilfe von SDS-PAGE bzw. MALDI-TOF-Massenspektrometrie (vgl. Abschnitt 9.4.2) nachgewiesen, die Ergebnisse der EPR- und FT-IR-spektroskopischen Charakterisierung bestätigten dessen Funktionalität.

Um die generellen Kristallisationsbedingungen zu ermitteln, wurden für ein erstes Screening zunächst verschiedene kommerziell erhältliche Kristallisationslösungen verwendet, die in Kapitel 7.1 aufgelistet sind. Für diese Ansätze im sitzenden Tropfen wurde je $1\ \mu\text{L}$ Proteinlösung mit $1\ \mu\text{L}$ Reservoirlösung vermischt und auf die höher gelegene Plattform mit Vertiefung des in Kapitel 6.1 beschriebenen „crystal strip“ pipettiert. Das Gesamtvolumen der Reservoirlösung betrug $100\ \mu\text{L}$. Insgesamt wurden 360 verschiedene Ansätze mit kleinen Volumina getestet von denen einer in einem Zeitraum von ca. zwei Wochen zum Wachstum erster Proteinkristalle führte. Eine Übersicht der gewonnenen Kristalle zeigt Abbildung 11.1. Ein Tropfen enthält eine Vielzahl dreieckiger und quadratischer dünner Plättchen, die teilweise fächerartig zusammengelagert sind. Bei den Parametern der Kristallisationslösung handelt es sich um: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol und pH-Wert 8,0. Die Kristalle wuchsen im Kühlbrutschrank bei einer Temperatur von $4\ ^\circ\text{C}$. Die Konzentration der Proteinlösung betrug $40\ \text{mg/mL}$. Neben Ammoniumsulfat wird Natriumcitrat häufig als Fällungsmittel in der Dampfdiffusionsmethode verwendet, welches zu einer langsamen Übersättigung im Tropfen führt und das Kristallwachstum begünstigt. Imidazol ist eine basisch reagierende organische Verbindung, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen der Lösung beeinflusst und zur Ausbildung von Kristallen beitragen kann.

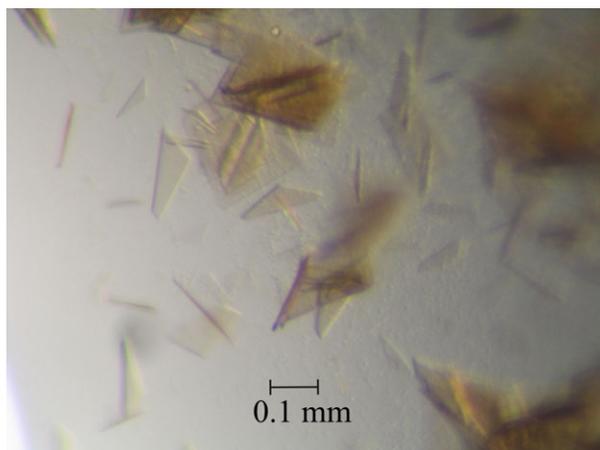


Abbildung 11.1: Fotografie eines Ansatzes, welcher die ersten gewonnen Proteinkristalle enthält. Es handelt sich um dünne Plättchen, die teilweise dicht beieinander liegen. Sie wachsen in dreieckiger oder rechteckiger Form. Bedingungen: Proteinkonzentration: 40 mg/mL, Inkubationstemperatur: 4 °C, Reservoirlösung: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0.

Erste Optimierungsansätze

Nachdem die grundsätzlich bestehende Kristallisationsfähigkeit der [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* festgestellt werden konnte, wurden in einem anschließenden Verfeinerungsprozess die Parameter geringfügig abgeändert, um das Kristallwachstum zu optimieren. Es wurde untersucht, ob eine Variation der Parameter zu Kristallen anderer Form und Größe führt oder deren Anzahl verringert werden kann. Anders als bei Kristallen kleiner Moleküle sind Proteinkristalle sehr empfindlich und zerbrechen leicht. Dies ist auf die geringe Packungsdichte und den hohen Lösungsmittelanteil, welcher ca. 40-60% des Kristallvolumens ausmacht, zurückzuführen. Deswegen ist es von Vorteil die Kristalle einzeln in Lösung vorliegen zu haben.

Dazu wurden die Parameter pH-Wert (pH 7,5; 8,5) und Natriumcitratkonzentration (0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6 M) in kleinen Ansätzen im sitzenden Tropfen bei gleicher Imidazolkonzentration (100 mM) variiert. Die Proteinkonzentration betrug unverändert 40 mg/mL und die Brutschranktemperatur 4 °C. Außerdem wurden weitere Versuche mit Kombinationen aus verschiedenen Natriumcitrat- (1,0; 1,1; 1,2 M), Imidazol- (100,

110 mM) und Glycerolkonzentrationen (0, 5, 10%) bei ansonsten gleichen Bedingungen (4 °C Temperatur, 40 mg/mL Proteinkonzentration, pH-Wert 8,0) angesetzt. Weiterhin wurden identische Ansätze (1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0, Proteinkonzentration 40 mg/mL) allerdings mit größeren Volumina (10 μ L Tropfen und 1 mL Reservoirlösung) bei unterschiedlichen Temperaturen (4 und 10 °C) gelagert. Zudem wurde das sogenannte „Seeding“-Verfahren angewendet. Dazu wurden 10 μ L große Proteintropfen mit einem aus früheren Ansätzen gewonnenen Kristall versetzt. Dieser Kristall diente bei dieser Methode als Keim, an dem sich weitere Proteinmoleküle hätten anlagern können.

Bei der Mehrzahl der oben beschriebenen Ansätze war kein Kristallwachstum festzustellen. Teilweise bildeten sich Kristalle, die jedoch aufgrund ihrer geringen Größe nicht zu verwenden waren. Einige Tropfen zeigten unterschiedliche Phasen, die durch die rot-braune Färbung der [NiFe]-H₂ase leicht auszumachen waren. Andere Ansätze waren homogen und klar, d. h. das Protein blieb gelöst.

Weitere Optimierungsansätze

Neue Versuche zur Kristallisation der [NiFe]-Hydrogenase im sitzenden Tropfen führten in einigen Ansätzen zur Ausbildung einer großen Anzahl kleiner, dicht beieinander liegender Kristalle, die in Abbildung 11.2 dargestellt sind. Bei diesen Ansätzen war die Proteinkonzentration im Vergleich zu den vorherigen Ansätzen erhöht und lag bei 50 mg/mL. Die Art der Reservoirlösung blieb unverändert (1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0), die Volumina betragen 10 μ L (Tropfen) bzw. 500 μ L (Reservoirlösung), die Inkubationstemperatur lag bei 4 °C.

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte in diesem Fall die Kristallisation der Hydrogenase unter den beschriebenen Bedingungen reproduziert werden. Ansätze im hängenden Tropfen unter identischen Bedingungen lieferten ebenfalls Kristalle, lediglich die Gesamtzahl war etwas reduziert.

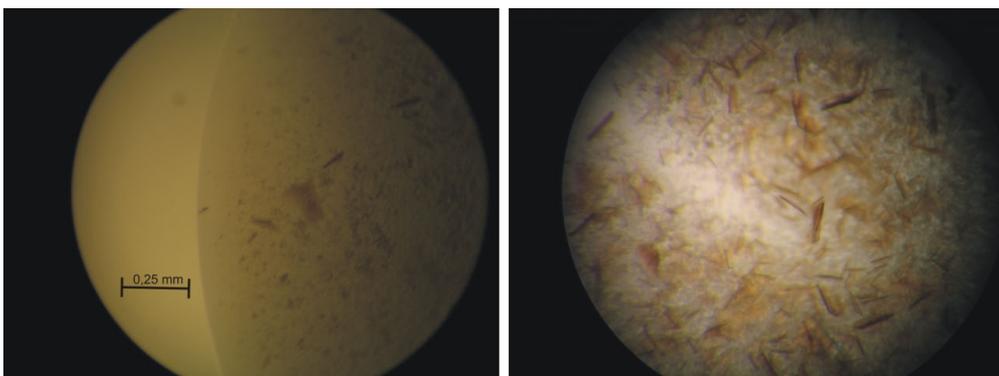


Abbildung 11.2: Kristallisationsansätze mit erhöhter Proteinkonzentration. Bedingungen: Proteinkonzentration: 50 mg/mL, Inkubationstemperatur: 4 °C, Reservoi rlösung: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0.

Erste Kristalle wurden bei beiden Verfahren bereits nach 14 Tagen sichtbar. Parallele Ansätze, deren Proteinkonzentration 20 mg/mL betrug oder die Reservoi rlösung bei gleicher Natriumcitrat- und Imidazolkonzentration und unverändertem pH-Wert zusätzlich 10% Glycerol enthielt, blieben erfolglos.

Abbildung 11.3 zeigt einen einzelnen Kristall, der sich, neben anderen Kristallen im gleichen Ansatz, unter folgenden Bedingungen in einem Zeitraum von zwei Wochen ausbildete: 40 mg/mL Proteinkonzentration, 4 °C Inkubationstemperatur, Reservoi rlösung: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0. Zur Herstellung des sitzenden Tropfens wurden 10 μ L Proteinlösung mit 10 μ L Reservoi rlösung gemischt und über insgesamt 1 mL Reservoi rlösung platziert.

Die Anzahl der ausgebildeten Kristalle war, im Vergleich zu den ebenfalls in diesem Abschnitt beschriebenen Ansätzen, geringer und der Kristall leicht zu separieren. Die Kantenlänge des dargestellten Plättchens betrug ca. 0,2-0,25 mm bei einer Schichtdicke von ca. 0,01 mm. Spätere Ansätze mit einer Proteinkonzentration von 30 mg/mL unter sonst gleichen Bedingungen führten zu einer weiteren Reduktion der Gesamtzahl gewachsener Kristalle, die sich in Form und Größe nicht von den vorheri-

gen unterschieden. Einzelne, gleichmäßige Kristalle dieser Ansätze wurden für die in Kapitel 11.2 beschriebenen Beugungsexperimente ausgewählt.

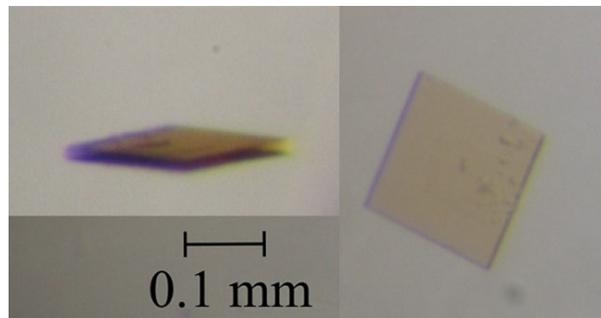


Abbildung 11.3: Ein einzelner Kristall der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* mit einer Kantenlänge von 0,2-0,25 mm und einer Schichtdicke von 0,01 mm. Proteinkonzentration: 40 mg/mL, Inkubationstemperatur: 4 °C, Reservoirlösung: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0. Die zusätzliche kleine Abbildung zeigt den Kristall in Seitenansicht.

Abgeleitete Kristallisationsparameter

Aus den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Ergebnissen lassen sich die Bedingungen, unter denen die [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* reproduzierbar kristallisiert, auf folgende Parameter eingrenzen:

- Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0.
- Proteinkonzentration: 30 mg/mL, wobei die Gesamtzahl der gewachsenen Kristalle bei geringeren Proteinkonzentrationen reduziert ist.
- Temperatur während der Inkubationszeit: 4 °C.
- Inkubationszeit, bis erste Kristalle sichtbar werden: Mindestens zwei Wochen.

Es hat sich gezeigt, dass die Vermeidung von Temperaturschwankungen und Erschütterungen während der Wachstumszeit die Ausbildung der Kristalle positiv beeinflusst. Es sind keine Unterschiede zwischen den Varianten der Kristallisation mit der Dampfdiffusionsmethode im hängenden

oder sitzenden Tropfen festzustellen. Die Kontrolle älterer Ansätze zeigt, dass nach einer Inkubationszeit von ca. 3 Monaten unter konstanten Bedingungen die Schichtdicke der Plättchen zugenommen hat.

11.1.2 Diskussion

Da die Kristallisationsbedingungen eines Proteins nicht vorhergesagt werden können und individuell ermittelt werden müssen, kann die Gewinnung von Kristallen der zeitaufwendigste Schritt in der Röntgenstrukturanalyse sein. Die Parameter, unter denen es zur Kristallisation der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* kommt, konnten innerhalb eines vergleichsweise kurzen Zeitraums ermittelt, bzw. eingegrenzt werden. Die Resultate zeigen homogene, rechteckige bis quadratische Plättchen mit scharfen Kanten. Diese besitzen eine Länge von etwa 0,2-0,25 mm bei einer Schichtdicke von ca. 0,01 mm und lassen sich gut separieren. Die tatsächliche Qualität der Kristalle kann erst nach Durchführung eines Beugungsexperiments beurteilt werden.

Weswegen es in den übrigen Versuchen nicht zur Ausbildung von Kristallen kommt, liegt zum einen an den „falschen“ Kristallisationsbedingungen bzw. der Zusammensetzung der Kristallisationslösungen. In manchen Fällen sind diese sofort durch ausfallendes, denaturiertes Protein zu identifizieren. Andererseits kann die zu Beginn häufige Kontrolle der Platten unter dem Mikroskop zu ungünstigen Temperaturschwankungen geführt haben, die das Wachstum verhinderten. Zudem ist nicht auszuschließen, dass die Ausbildung der Hydrogenasekristalle unter den gewählten Bedingungen in den noch klaren Tropfen bisher noch nicht stattgefunden hat. Da die Kristallisation allerdings von vielen Parametern abhängt, ist die genaue Ursache für das ausbleibende Kristallwachstum nicht festzustellen.

Tabelle 11.2: Auflistung der für die Aufnahmen nativer Datensätze von verschiedenen Kristallen gewählten Bedingungen bei den Messungen am SPring8 (Hyogo, Japan), an der Swiss Light Source des Paul-Scherer-Instituts (Villigen, Schweiz) und am BESSY-Synchrotron (Berlin).

Bedingung	SPring8	SLS	BESSY
Beamline	BL41XU	PX06SA	BESSY-MX BL14.1
Wellenlänge (Å)	1,00000	0,9805	0,91841
Oszillationsbereich (°)	1	0,2	0,2
Expositionszeit (sec)	0,5	0,4	10
Temperatur (K)	100	100	100
Detektorabstand (mm)	540	500	230
Detektor	ADSC Q315	Pilatus 6M	225 mm CCD
Max. Auflösung (Å)	3,5-4,0	2,8-3,0	2,5-2,8

11.2 Diffraction

11.2.1 Ergebnisse und Diskussion

Die Beugungsexperimente mit Kristallen der [NiFe]-H₂ase, deren Protein aus *A. vinosum* isoliert wird, konnten am SPring8, Beamline BL41XU (Hyogo, Japan), an der BESSY-MX Beamline BL14.1 (TU Berlin) und der PX06SA Beamline an der Swiss Light Source des Paul-Scherer-Instituts (Villigen, Schweiz) durchgeführt werden. Die für die Aufnahme der nativen Datensätze gewählten Bedingungen sind Tabelle 11.2 zu entnehmen.

Im Rahmen der zur Verfügung gestellten Messzeit werden jeweils etwa 10-15 verschiedene Kristalle getestet. Entweder werden die Kristalle direkt dem Ansatz entnommen und in einem Nylonloop auf den Goniometerkopf in den Stickstoffdampfstrahl montiert oder zuvor in Puffer (Reservoirlösung mit 10% Glycerol (v/v)) oder Mineralöl getaucht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend montiert. Von den Kristallen die den Primärstrahl ausreichend stark beugen und ein aussagekräftiges Beugungsmuster mit klaren Reflexen produzieren, werden native Datensätze, d. h. Reflexmuster bei einer Drehwinkeländerung von insgesamt mindestens 90° aufgenommen.

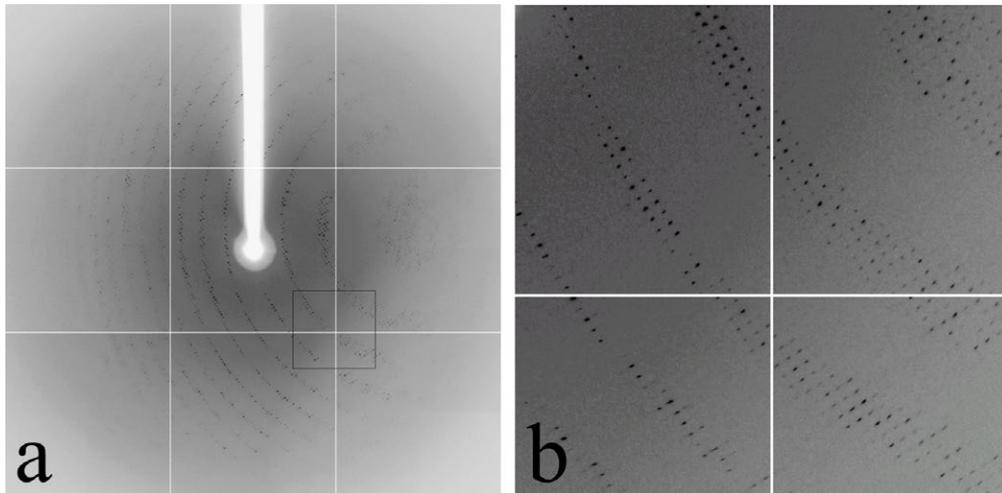


Abbildung 11.4: Beispiel eines Reflexmusters (Maximale Auflösung=3,64 Å am äußeren Bildrand) (a) und einen daraus vergrößerten Ausschnitts (Auflösungsbereich $\gg 8$ Å) (b) der am Kristall der [NiFe]-Hydrogenase gebeugten Röntgenstrahlen (SPring8-Experiment).

Abbildung 11.4 zeigt das Beispiel eines Reflexmusters in einem Auflösungsbereich bis 3,64 Å am äußeren Bildrand (a) und einen vergrößerten Ausschnitt daraus (Auflösungsbereich $\gg 8$ Å) (b), welches bei einer Messung am SPring8 detektiert worden ist. Die klaren Reflexe besitzen im Bereich um den Strahlstopper (Bildmitte) hohe Intensitäten, werden allerdings zum Bildrandbereich schwächer und unterscheiden sich dort nicht mehr signifikant vom Hintergrundrauschen. Dies ist auf die geringe Schichtdicke der Kristalle zurückzuführen. Zudem lässt die Intensität der Reflexe während der Aufnahme eines Datensatzes aufgrund der Schädigung des Kristalls durch den Röntgenstrahl nach. Die bisher erreichte maximale Auflösung beträgt 2,5 Å.

Wie der vergrößerte Ausschnitt des Beugungsmusters in Abbildungsteil b zeigt, liegen die Reflexe deutlich voneinander getrennt vor. Es ist davon auszugehen, dass es sich um einen einzelnen Kristall im Röntgenstrahl handelt, dem das vorliegende Beugungsmuster eindeutig zuzuordnen ist.

11.3 Prozessierung der nativen Datensätze

11.3.1 Ergebnisse

Im Folgenden wird die Verfahrensweise bei der weiteren Auswertung der Datensätze, die Berechnung der Elektronendichtekarte und die Erstellung eines ersten Molekülmodells beschrieben. Die Ergebnisse basieren auf den Diffraktionsmustern mit einer Auflösung von 2,5 Å, die beim Experiment an der BESSY-MX Beamline 14.1 detektiert worden sind.

Anhand der Daten, die direkt aus den Reflexmustern hervorgehen, werden die Raumgruppe und die Maße der Einheitszelle ermittelt. Zu deren Berechnung werden die Programme MOSFLM [114] und CCP4 [115] verwendet. Es handelt sich um eine orthorhombische Einheitszelle der Raumgruppe $P2_12_12$ (Nr. 8 der International Tables for Crystallography [116]). Die Maße und entsprechenden Winkel der Einheitszelle betragen: $a=205,00$ Å, $b=217,42$ Å, $c=120,44$ Å bzw. α , β und $\gamma=90^\circ$.

Um den Inhalt der Einheitszelle zu bestimmen, wird der Matthews-Koeffizient V_M [117, 118] berechnet. Der Quotient aus Zellvolumen und molarer Masse beträgt $V_M=3,69$ Å³Da⁻¹, wenn eine Anzahl von vier Proteinmolekülen pro asymmetrischer Einheit und eine molare Masse von 91000 Da vorausgesetzt wird. Da eine Einheitszelle dieser Raumgruppe aus vier asymmetrischen Einheiten besteht, liegen insgesamt 16 Hydrogenasemoleküle pro Einheitszelle vor. Der Lösungsmittelanteil des Kristalls beträgt 66,62%.

Berechnung der Elektronendichtekarte

Abbildung 11.5 stellt die weitere Vorgehensweise bei der detaillierten Analyse der Datensätze graphisch zusammengefasst in einem Schema dar. Die aufgenommenen Daten, welche in Tabelle 11.3 dargestellt sind, werden unter Anwendung bestimmter Computerprogramme (siehe in Klammern

gesetzte Angaben in Abbildung 11.5) bzw. der CCP4 Program Suite prozessiert und ausgewertet.

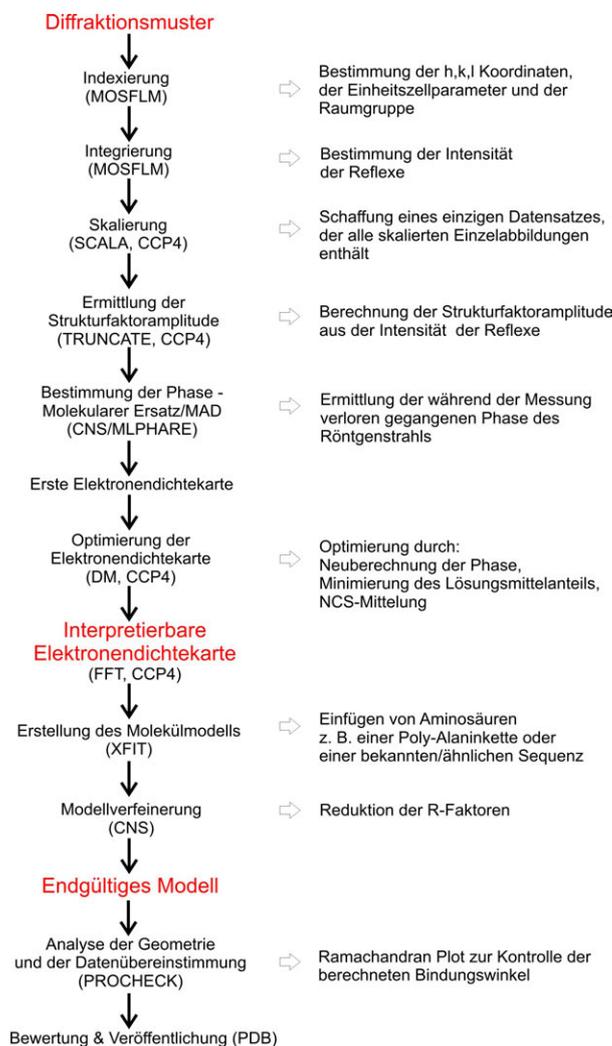


Abbildung 11.5: Schematische Darstellung zur Verdeutlichung der Vorgehensweise bei der Auswertung der aufgenommenen röntgenkristallographischen Datensätze. Die linke Hälfte des Schemas bezeichnet den jeweiligen Schritt mit der in Klammern gesetzte Angabe des verwendeten Computerprogramms, die rechte Hälfte beschreibt deren Nutzen daraus.

Zunächst erfolgt anhand des Diffraktionsmusters die Bestimmung der Koordinaten h , k und l des reziproken Gitters sowie der Einheitszellparameter und der Raumgruppe (Indexierung). Somit werden jedem einzelnen Reflex jeweils drei Koordinaten zugeordnet, die diesen eindeutig beschreiben. Durch die Integrierung eines jeden Reflexes wird dessen Intensität

ermittelt. Nachdem die einzelnen Reflexmuster eines Datensatzes aufeinander skaliert und vereinigt worden sind, erfolgt im nächsten Schritt die Berechnung der Strukturfaktoramplituden.

Zur Ermittlung der Phase der vom Kristall gebeugten elektromagnetischen Welle wird in ersten Auswertansätzen die MAD-Methode anhand der im Protein vorhandenen Fe-Atome der Eisen-Schwefelcluster bzw. des katalytisch aktiven [NiFe]-Zentrums angewendet. Die Aufnahme der entsprechenden Datensätze (Fluoreszenzmaximum=1,74014 Å, Wendepunkt=1,74213 Å, Nativ=0,91841 Å) erfolgte bei Messungen an der BESSY-MX Beamline 14.1 (TU Berlin). Nachdem eine hohe Übereinstimmung mit der Struktur der [NiFe]-H₂ase aus *D. vulgaris* MF festgestellt wurde, konnte in weiteren Rechnungen die Methode des molekularen Ersatzes (MR) zur Phasenbestimmung verwendet werden.

Mittels eines iterativen Verfahrens wird die erste errechnete Elektronendichtekarte wiederholt modifiziert und verbessert. Verfahren zur Minimierung des Lösungsmittelanteils und die NCS-Mittelung (NCS = no crystallographic symmetry) sowie die Neuberechnung der Phase tragen zur Erstellung einer ersten interpretierbaren Elektronendichtekarte bei.

Tabelle 11.3 fasst die Statistik der Analyseergebnisse des nativen Datensatzes eines [NiFe]-Hydrogenase Kristalls (Beugungsexperiment an der BESSY-MX Beamline BL14.1, TU Berlin) zusammen. Die in Klammern stehenden Werte beziehen sich auf den Auflösungsbereich 2,64-2,50 Å. Insgesamt werden 771564 Reflexe beobachtet, die zu einem Datensatz vereinigt, gemittelt und skaliert worden sind. Davon beschreiben 185391 unabhängige Reflexe, mit einer Vollständigkeit von 94,8% (100% in der Auflösungsebene 2,64-2,50 Å) der theoretisch möglichen Reflexe, die Einheitszelle. Der R_{merge} -Faktor bewertet die Qualität des auf diese Weise erhaltenen Datensatzes. Dazu wird die Übereinstimmung der Intensitäten der individuellen Reflexe der im Abstand von 0,2° aufgenommenen Einzelbilder mit den skalierten Reflexintensitäten des kompletten Datensatzes ermittelt.

Tabelle 11.3: Statistik zur Auswertung des nativen Datensatzes eines [NiFe]-Hydrogenasekristalls. Die Datenaufnahme erfolgte an der BESSY-MX Beamline BL14.1 (TU Berlin). Die in Klammern stehenden Werte beziehen sich auf den Auflösungsbereich 2,64-2,50 Å.

<i>Bedingung</i>	
Beamline	BL14.1
Wellenlänge (Å)	0,91841
Oszillationsbereich (°)	0,2
Temperatur (K)	100
Raumgruppe	$P2_12_12$
Zellparameter (Å)	a = 205,0007 b = 217,4189 c = 120,4449
Auflösung (Å)	68,359-2,500 (2,64-2,50)
Anzahl Moleküle/asym. Einheit	4
Anzahl beobachteter Reflexe	771564
Anzahl unabhängiger Reflexe	185391
Vollständigkeit (%)	94,8 (100,0)
R_{merge} (%)	9,0 (44,2)
Durchschnittliche $I/\sigma(I)$	6,8 (1,7)
Redundanz	4,2

Dabei gilt, je niedriger der R-Faktor, desto besser die Übereinstimmung. In diesem Fall beträgt $R_{merge}=9\%$ bei Betrachtung des gesamten Auflösungsbereichs (68,359-2,50 Å) bzw. 44% für den höchsten Auflösungsbereich (2,64-2,50 Å). Zur Integration werden die Reflexe ausgewählt, deren Signalgrößen sich mindestens um den Faktor 6,8 (68,359-2,50 Å) bzw. 1,7 (2,64-2,50 Å) vom Hintergrundrauschen unterscheiden ($I/\sigma(I)=6,8$ bzw. 1,7). Aufgrund der Symmetrie des Kristalls werden einzelne Reflexe, die durch die gleichen h,k,l-Koordinaten beschrieben werden, mehrmals gemessen. Die Anzahl der Mehrfachmessungen wird durch den Redundanzwert ausgedrückt, der hier bei 4,2 liegt. Eine hohe Anzahl wiederholter Messungen führt zu einer Verbesserung der Qualität des Datensatzes.

```

1WUI_L      SSYSGPIVVDVPVTRIEGHLRIEVEVENGKVKNAVSSSTLFRGLEIILKGRDPRDAQHFTQRTCGVCTYT
AA Y89334   --MSERIVVDPIITRIEGHLRIEAQMDGATIAQAYSSSGTMVIRGIEIILKGRDPRDAWAFVQRICGVCTLV
          *   ****:*****.::::.: :****.*:.*.* ***** *.* ***** .

1WUI_L      HALASTRCVDNAVGVHVPKNATYIRNLVLGAQYLHDHIVHFYHLHALDFVDVTAALKADPAKAAKVASS
AA Y89334   HGIASVRAVEDALRIELPLNAQLIRNLMIGAQYIHDHVMHFYHLHALDWVDVVSALSADPRATSELAQS
          *.:*.*.*.:.: :.:* **   ****:****:****:*****:****:.*.*.* *.:.*.*

1WUI_L      ISPR-KTTAADLKAVQDKLKTFFVETGQLGFPTNAYFLGGHPAYYLDPETNLIATAHYLEALRLQVKAAR
AA Y89334   ISAWPKSSPGYFADTQKRIKTFVSESGQLGIFANGYWG--HPAYRLPPEANLMAVAHYLEALAWQRDTAK
          **.*.:.:. : .*:.*****:****.*:*.*:   **** * **:*.*.****** *.:.*.*

1WUI_L      AMAVFGAKNPHTQFTVVGG-----VTCYDALTPQRIAEFEALWKETKAFVDEVYIPDLLVAAAYKDWI
AA Y89334   FHAIFGGKNPHPNFVGGVPSIDLDSDSALNAKRLAEVRNLIQSMRTFVDQVYVPTLAIAGFYKDWG
          *:*.*****:.*.* *   : . .****:****.. * .: .:****:****.*.:.*. ****

1WUI_L      QYG-GTDNFITFGEFPK-DEYDLNSRFFKPGVVFKRDFKNIKPFDKMQ---IEEHRHSWYEGAEAR--
AA Y89334   ERGELGNFLCYGDLPTGASLDPATFLFPRGAILDRDLSTIHEVDLEATGEIQEFVNHWSWYESVGNDR
          : * * .**.:*:.*. . * : :* *.:.*.:.*.:.* *.:.*.****** : ..

1WUI_L      --HPWKQT-----QPKYTDLHGDDRYSWMKAPRYMGPEMETGPLAQVLIAYSQGHKPKVAVTD
AA Y89334   GLHPYEGQTNLEYDRRGVAPPYQLDVSDBGYSLKAPRWKGRSVEVGPLARVLMYATGHDQARELVD
          **.:***          * *.:.*. * ****:****: *.:.*.*****:****: *:* ** :.: :.*

1WUI_L      AVLAKLGVGPEALFSTLGRTAARGIETAVIAEYVGVMLQEYKDNIAG-----DNVICAPWEMPKQAE
AA Y89334   STLSRLDLPVDALYSTLGRTAARALESKILVDAMQGWYDGLIANVKSQDTKTFNETLWEPSSWPSRAQG
          :.:*.*.: :*:.******.:*: :.:. :   :   *:*.*   :.:. * .*.:*.*

1WUI_L      VGFVNAPRGGLSHWIRIEDGKIGNFQLVVPSTWTLGPRCDKNKLSPVEASLIG-TPVADAKRVEILRT
AA Y89334   VGIMEAPRGALGHWIVIEDGRIANYQAVVPSTWVAGPRDGRGQAGAYEAAALQDNHQLVDVKQPIEILRT
          **.:.*****.*.* ** **:.*.* *****. *** .:.: . . **:* .   :.*.*:*****

1WUI_L      VHSFDPCACGVH-----
AA Y89334   IHSFDPCACAVHLADPESGESFQVRVV
          :*****.*.*
    
```

Abbildung 11.6: Vergleich der Aminosäuresequenzen der großen UE der [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. vulgaris* MF (Erste Zeile, PDB 1WUI) und *A. vinosum* (Zweite Zeile, NCBI: AY89334) im Ein-Buchstaben-Code. Die Markierungen Punkt, Doppelpunkt und * der dritten Zeile (Erklärung im Text) zeigen Übereinstimmungen an. Nicht markierte Bereiche weisen keine Übereinstimmung auf. Ein Strich innerhalb der Sequenzen deutet das Fehlen einer kompatiblen Aminosäure an.

Erstellung eines ersten Modells

Mit Hilfe der bekannten Aminosäuresequenz einer hochaufgelösten Struktur der [NiFe]-H₂ase aus *D. vulgaris* MF (PDB 1WUI, vgl. Tabelle 11.1) und eines Alignments (Aminosäuresequenzvergleichs) mit der Aminosäuresequenz der *A. vinosum*-H₂ase (NCBI: AY89334 bzw. NCBI: AY93828, vgl. Kapitel 4.4), ist mit der Erstellung eines ersten Molekülmodells begonnen worden. Nicht konservierte Aminosäuren der *D. vulgaris* MF-Sequenz werden durch die entsprechenden Aminosäuren der *A. vinosum*-Sequenz

ersetzt und in die Elektronendichte eingepasst. Bereiche die keine Übereinstimmungen der Sequenzen aufweisen bleiben im vorläufigen Modell unberücksichtigt.

```

1WUI_S      LMGPRRPSVVYLHNAECTGCSESVLRAFEPYIDTLILDTLISLDYHETIMAAAGDAAEALEQAVNS
AAU93828    -----PSVVWLSFQECTGCTESLTRAHAPTLEDLILDFISLDYHHTLQAASGEAAEAARLQAMDE
          ****:*      *****:**: ** . * :: **** :*****.*: **:*:***** **::
1WUI_S      PHG-FIAVVEGGIP-TAANGIYGKVANHTMLDICSRLPKAQAVIAYGTCAFGGVQAAKPNPTGA
AAU93828    NRGQYLVIVDGSIPGPDANPGFSTVAGHSNYSILMETVEHAAAVIAGTCAAFGGLPQARNPTGA
          :* ::::*:*.** . ** :..**.*: .* . : :* **** *****:**: *:*:*****
1WUI_S      KGVNDALKHLGVKAINIAGCPPNPYNLVGTIVYYLKNKAPELDSLNRPTMFFGQTVHEQCPLRPH
AAU93828    MSVMDLVRDK--PVINVPGCCPIPMVITGVIAHYLVFGRLPEVDGYGRPLAFYQSIHRCYRRPF
          . * * ::. .**:*:***** * :*.*.**      **:* . ** *:*:*.**:* * *
1WUI_S      FDAGEFAPSEFESEARKGWCLYELGCKGPVTMNNCPKIKFN-QTNWPVDAGHPCIGCSEPFDWDAM
AAU93828    YDKGLFAESFDDEGAKQGWCLYRLGCKGPTTYNACATMKWNDGTSWPVEAGHPCLGCSEPFDWDAG
          :* * * *:.* :*:*****.*****.* * *..*:.* *.*:*:*****:*****:*****
1WUI_S      TPFYQN-----
AAU93828    GFYEPVSVPLTLGPATLLGAGAAGAVVGGGLAALSRRKKGRDAAATRQPVTVDELEQKL
          :

```

Abbildung 11.7: Vergleich der Aminosäuresequenzen der kleinen UE der [NiFe]-Hydrogenasen aus *D. vulgaris* MF (Erste Zeile, PDB 1WUI) und *A. vinosum* (Zweite Zeile, NCBI: AY93828) im Ein-Buchstaben-Code. Die Markierungen Punkt, Doppelpunkt und * der dritten Zeile (Erklärung im Text) zeigen Übereinstimmungen an. Nicht markierte Bereiche weisen keine Übereinstimmung auf. Ein Strich innerhalb der Sequenzen deutet das Fehlen einer kompatiblen Aminosäure an.

Abbildungen 11.6 und 11.7 zeigen den mit dem Alignment-Programm CLUSTALW (Version 1.83 [119]) durchgeführten Sequenzvergleich der großen und der kleinen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase im Ein-Buchstaben-Code. Die Aminosäuresequenzen stimmen zu 49% (Große UE) bzw. 48% (Kleine UE) überein. Gleiche, konservierte Aminosäuren sind durch ein * gekennzeichnet. Aminosäuren, die in beiden Proteinen vorkommen und zu einer bestimmten konservierten „starken“ bzw. „schwachen“ Aminosäuregruppe gehören, sind mit einem Doppelpunkt bzw. mit einem einfachen Punkt markiert. Diese Gruppierung basiert auf einer mathematisch ermittelten, evolutionären Austauschwahrscheinlichkeit von Aminosäuren (Gonnet PAM250 Matrix) und ist im Programm festgelegt. Der Austausch von Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften gilt dabei

als wahrscheinlich. Unter Berücksichtigung dieser Gruppen ergibt sich eine Ähnlichkeit der Hydrogenasen von 60%.

Abbildung 11.8 zeigt die vorläufige molekulare Struktur der membran- gebundenen [NiFe]-Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum* im Bänder- modell mit einer Auflösung von 2,50 Å. Es handelt sich um ein aus zwei Proteinmolekülen bestehendes Dimer. Das bimetallische Zentrum und die drei Eisen-Schwefelcluster sind im Kugelmodell dargestellt. Die vorliegen- den Sekundärelemente α -Helix und β -Faltblatt sind deutlich zu erkennen. Das [NiFe]-Zentrum befindet sich im Inneren der großen Untereinheit des Proteins und ist durch die in einer Reihe angeordneten [FeS]-Cluster, wel- che den Elektronentransportweg vom bzw. zum katalytisch aktiven Zen- trum darstellen, mit der Oberfläche verbunden. Dies entspricht der aus anderen [NiFe]-Hydrogenasestrukturen bekannten Anordnung (vgl. Kapi- tel 4).

Eine vergrößerte Darstellung des in die berechnete Elektronendichte- karte eingepassten katalytisch aktiven [NiFe]-Zentrums der *A. vinosum* Hydrogenase ist in Abbildung 11.9 gezeigt. Das Ni-Atom ist durch vier Cysteinreste an das Protein gebunden. Zwei dieser Aminosäurereste koor- dinieren ebenfalls das Eisen und bilden auf diese Weise eine Brücke zwis- chen beiden Atomen. Weiterhin sind drei nicht vom Protein stammende Eisenliganden dargestellt. Ein zusätzlicher Brückenligand zwischen dem Eisen- und dem Nickelatom fehlt in dem hier präsentierten Modell. Rote Bereiche der Elektronendichtekarte konnten noch nicht erklärt werden.

Der in Abbildung 11.10 vergrößert dargestellte Ausschnitt der *A. vino- sum*-Hydrogenasestruktur zeigt einen [4Fe4S]-Cluster. Dieser besitzt die typische kubische Form und ist in der kleinen UE des Enzyms locali- siert. Der Cluster ermöglicht zusammen mit den beiden anderen [FeS]- Komplexen den Elektronentransfer durch das Protein.

Da es sich um ein vorläufiges Proteinmodell handelt, wurde bewusst auf die Ermittlung von R-Faktoren, welche die Übereinstimmung von Modell

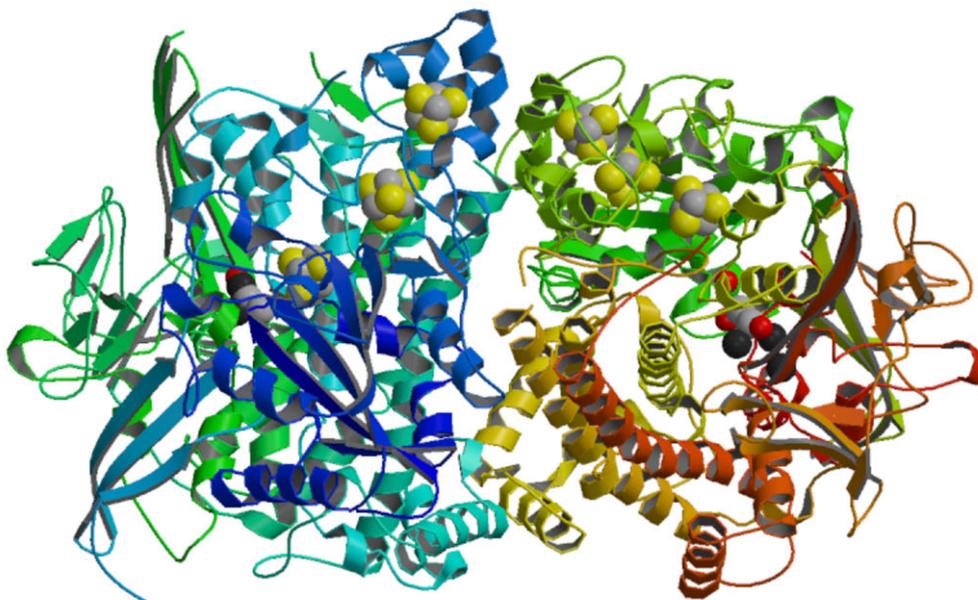


Abbildung 11.8: Darstellung der Struktur der [NiFe]-Hydrogenase aus dem photosynthetischen Schwefel-Purpurbakterium *Allochrochromatium vinosum*. Die Abbildung zeigt das als Dimer kristallisierte Enzym im Bändermodell. Dargestellt sind ebenfalls die drei [FeS]-Cluster und das bimetallische [NiFe]-Zentrum im Kugelmodell. Die Auflösung beträgt 2,50 Å.

und Elektronendichtekarte bewerten, verzichtet. Durch die unbesetzten Bereiche der Elektronendichtekarte wird der R-Faktor, der sich auf das gesamte Modell bezieht, sehr groß und gibt nicht die tatsächliche Genauigkeit der eingepassten Bereiche wieder.

11.3.2 Diskussion

Die Qualität eines Datensatzes hängt im Wesentlichen von der Qualität der Kristalle und der erzielten Auflösung ab. Aufgrund der geringen Schichtdicke der gewonnenen Hydrogenasekristalle besitzen die Reflexe des Beugungsmusters, insbesondere in hohen Auflösungsbereichen von mehr als 2,50 Å, eine sehr geringe Intensität. Der R_{merge} -Faktor, der die Qualität des gesamten Datensatzes bewertet, liegt bei Betrachtung des höchsten Auflösungsbereichs von 2,64-2,50 Å bei 44% bzw. unter Berücksichtigung

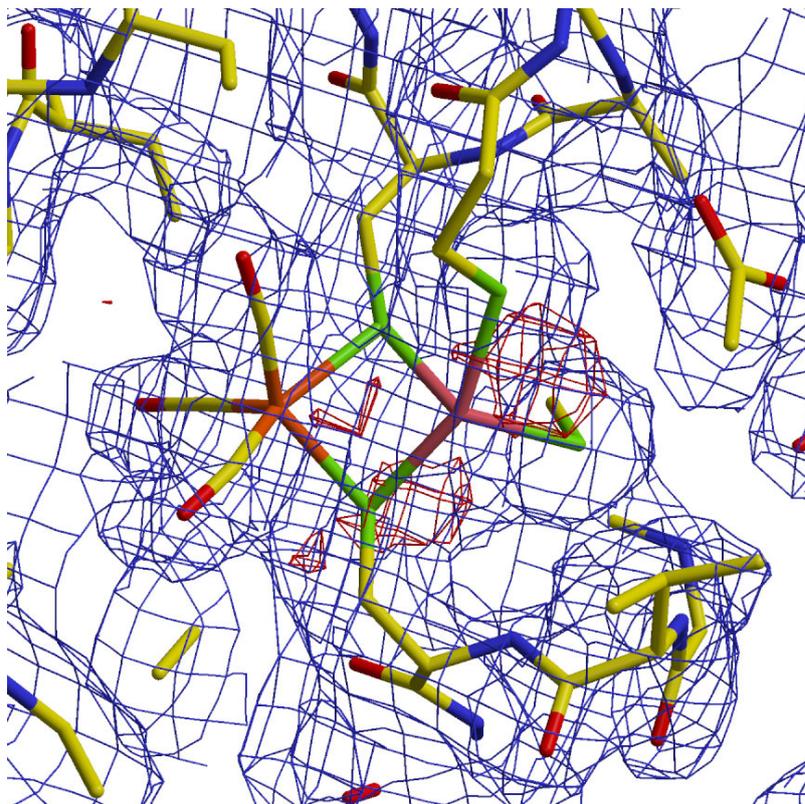


Abbildung 11.9: Vergrößerte Darstellung des in die berechnete Elektronendichtekarte eingepasste, in der großen Untereinheit lokalisierte [NiFe]-Zentrum im Stabmodell. Die Koordinierung des Nickels (pink) durch vier Cysteinreste (grün-gelb), wovon zwei gleichzeitig das Eisenatom binden, ist zu erkennen. Die drei nicht vom Protein stammenden Liganden des Eisens (rot), sind ebenfalls zu sehen. Da im vorliegenden Modell nicht zwischen CO und CN^- unterschieden werden kann, sind diese einheitlich (gelb-rot) dargestellt. Rote Bereiche der Elektronendichtekarte konnten noch nicht erklärt werden.

aller im Bereich von $68,359\text{-}2,50\text{ \AA}$ detektierten Reflexe bei 9%. Da zur Auswertung des höchsten Auflösungsbereichs ($2,64\text{-}2,50\text{ \AA}$) Reflexe verwendet werden, die sich um den Faktor 1,7 vom Hintergrundrauschen unterscheiden ($I/\sigma(I)=1,7$), liegt der R_{merge} -Faktor in diesem Bereich bei 44%, und damit etwas über dem akzeptablen Bereich von 30-40%. Beschränkt sich die Auswertung auf Reflexe, deren durchschnittliche Intensität sich mindestens um den Faktor 2 vom Hintergrund unterscheidet ($I/\sigma(I)=6,8$), ergibt sich ein verbesserter R_{merge} -Faktor von =9% für den gesamten Datensatz ($68,359\text{-}2,50\text{ \AA}$). Ausgezeichnete Datensätze besitzen

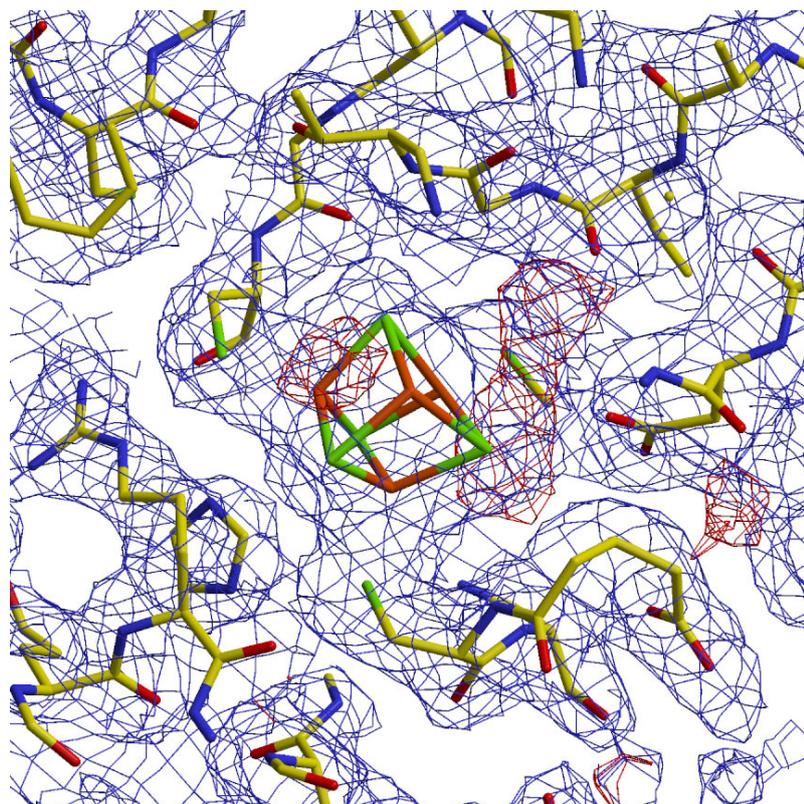


Abbildung 11.10: Ausschnitt der Elektronendichtekarte, die einen kubischen [4Fe4S]-Cluster zeigt, welcher in der kleinen Untereinheit des Proteins lokalisiert ist. Der Cluster und die umliegenden Aminosäuren sind im Stabmodell dargestellt. Rot gefärbte Bereiche der Elektronendichtekarte konnten bisher noch nicht erklärt werden.

einen R_{merge} -Faktor von $\leq 10\%$. Die Qualität der Daten mit maximaler Auflösung von $2,50 \text{ \AA}$ sind durch Aufnahme neuer Diffraktionsmuster mit höheren Reflexintensitäten zu verbessern. Andernfalls ist der maximale Auflösungsbereich von derzeit $2,64\text{-}2,50 \text{ \AA}$ auf $\approx 2,7 \text{ \AA}$ zu reduzieren. Durch die Vereinigung von Datensätzen verschiedener Kristalle sind die Werte, welche die Datenqualität (R_{merge} -Faktor) und die Vollständigkeit des hier verwendeten Datensatzes beschreiben ($94,8\%$ im Bereich von $68,359\text{-}2,50 \text{ \AA}$), wahrscheinlich weiterhin zu verbessern.

Die höchste Symmetrieebene, mit der dieser Datensatz zu beschreiben ist, wird durch die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12$ wiedergegeben und findet häufig Anwendung bei der Analyse von Proteinkristal-

len. Der errechnete Matthews-Koeffizient V_M liegt bei Proteinen in einem statistisch ermittelten Bereich zwischen $V_M=1,7$ und $3,5 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ woraus sich ein Lösungsmittelanteil von 27-64% ergibt. Die in diesem Fall ermittelten Werte von $V_M=3,69 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ und einem Lösungsmittelanteil von 66,62% liegen etwas über dem für verschiedenste Proteine ermittelten Durchschnittswert. Es liegen vier Moleküle pro asymmetrische Einheit, also insgesamt 16 Proteinmoleküle pro Einheitszelle vor.

Die Qualität der Elektronendichtekarte hängt von den zur Berechnung eingesetzten Daten, die aus den Beugungsexperimenten erhalten werden, ab. Mit den in dieser Arbeit vorliegenden Werten konnte eine Elektronendichtekarte mit einer Auflösung von $2,50 \text{ \AA}$ erstellt werden. In diese konnten ein erstes Proteinmodell, das katalytisch aktive [NiFe]-Zentrum und drei [FeS]-Cluster mit guter Übereinstimmung eingepasst werden. Da die Auflösung der Elektronendichtekarte $2,50 \text{ \AA}$ beträgt und das vorläufige Modell weiter zu verfeinern ist, bleiben einige Aspekte der vorliegenden röntgenkristallographisch ermittelten Struktur ungeklärt.

Aufgrund der Ergebnisse der FT-IR-spektroskopischen Charakterisierung ist davon auszugehen, dass es sich bei den in Abbildung 11.9 dargestellten Liganden des Eisenatoms im aktiven Zentrum nicht um drei CO-Moleküle, sondern um ein CO und zwei CN^- -Liganden handelt. Da das unbehandelte Protein hauptsächlich in den Redoxzuständen Ni-A und Ni-B im Verhältnis 30:70 vorliegt, wird eine hohe Elektronendichte im Bereich zwischen dem Ni- und dem Eisenatom des aktiven Zentrums erwartet. Die Position des Brückenliganden, bei dem es sich um ein OH^- (Ni-B) bzw. entweder um ein OOH^- oder ein OH^- (Ni-A) handelt, bleibt in diesem Modell jedoch unbesetzt. Im Bereich des aktiven Zentrums ist Elektronendichte vorhanden, die noch nicht erklärt werden konnte (vgl. Abbildung 11.9). Weiterhin ist die Natur der Eisen-Schwefelcluster zu überprüfen, wobei es sich entweder um drei [4Fe4Fe]-Cluster oder um einen [3Fe4Fe]- und zwei [4Fe4Fe]-Cluster handeln kann.

Bisher kann keine detaillierte Aussage über die molekulare Struktur der [NiFe]-H₂ase aus *A. vinosum* bzw. Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Vergleich mit bekannten Strukturen anderer Hydrogenasen getroffen werden. Auf den ersten Blick ist eine hohe Ähnlichkeit mit der Struktur der [NiFe]-H₂ase aus *D. vulgaris* MF festzustellen, die jedoch durch weitere Analysen zu verifizieren ist.

11.4 Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das aus *A. vinosum* isolierte Protein grundsätzlich kristallisiert und sich die gewonnenen Kristalle zur röntgenkristallographischen Analyse eignen. Bei den Bedingungen, unter denen innerhalb von ca. zwei Wochen Plättchen mit einer Kantenlänge von 0,2-0,25 mm und einer Schichtdicke von ca. 0,01 mm gewonnen wurden, handelt es sich um: Inkubationstemperatur: 4 °C, Proteinkonzentration: 30 mg/mL, Reservoirolösung: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0.

Die bei röntgenkristallographischen Experimenten aufgenommenen Diffraktionsmuster zeigen einzelne, klare Reflexe bis zu einer Auflösung von 2,50 Å. Die Auswertung der aufgenommenen Datensätze ergab, dass es sich bei den Kristallen um eine orthorhombische Einheitszelle der Raumgruppe $P2_12_12$ handelt, welche insgesamt 16 Proteinmoleküle enthält. Die Maße und entsprechenden Winkel der Einheitszelle betragen $a=205,00$ Å, $b=217,42$ Å, $c=120,44$ Å bzw. α, β und $\gamma=90^\circ$. Der R_{merge} -Faktor, der die Qualität des gesamten Datensatzes beschreibt, liegt unter Berücksichtigung aller im Bereich von 68,359-2,50 Å detektierten Reflexe bei 9%.

In die berechnete Elektronendichtekarte konnte das vorläufige Molekülmodell der [NiFe]-Hydrogenase aus *A. vinosum* eingepasst werden. Die in dieser Arbeit erstmalig vorgestellte Struktur einer aus einem photosynthetischen Organismus isolierten [NiFe]-Hydrogenase besitzt eine Auflösung von 2,50 Å und lässt die Lage des katalytisch aktiven

[NiFe]-Zentrums und der Eisen-Schwefelcluster erkennen. Das als Dimer kristallisierte Enzym zeigt hauptsächlich α -Helix- und β -Faltblatt-Sekundärstrukturelemente. Das vorliegende Modell weist eine hohe Ähnlichkeit mit den aus verschiedenen *Desulfovibrio*-Gattungen stammenden [NiFe]-Hydrogenasen auf.

12 Zusammenfassung und Ausblick

Die membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase aus dem photosynthetischen Schwefel-Purpurbakterium *Allochromatium vinosum* gehört zur Gruppe der Standardhydrogenasen und eignet sich gut, um den wasserstoffumsetzenden Mechanismus dieser Proteingruppe zu untersuchen. Sie ist sauerstofftolerant, kann durch Reduktion mit Wasserstoff aktiviert werden und bleibt auch bei hohen Temperaturen, bis 50 °C, stabil.

In dieser Arbeit wurde die Bakterienanzucht im großen Maßstab etabliert und die Methode zur Gewinnung hochreiner Hydrogenase optimiert. Das eingehend spektroskopisch charakterisierte Enzym wurde erfolgreich kristallisiert und ist in Röntgenbeugungsexperimenten eingesetzt worden. Aus den erhaltenen Diffraktionsmustern konnte eine Elektronendichtekarte mit einer Auflösung von 2,50 Å berechnet werden, in die das erste, vorläufige Molekülmodell einer aus einem photosynthetischen Organismus isolierten [NiFe]-Hydrogenase eingepasst wurde.

Kultivierung von *Allochromatium vinosum*

Um genügend homogenes Zellmaterial für die Isolierung der in geringem Maße expremierten Hydrogenase vorliegen zu haben, erfolgte die Anzucht des bakteriellen Organismus erstmals in einem 1100 L Glasfermenter. In der gegenwärtigen Fermenterkonstruktion und unter den optimal eingestellten Bedingungen konnten die Bakterien reproduzierbar kultiviert werden. Die effiziente Ernte mit einer Durchflussszentrifuge lieferte maxi-

mal 2,7 kg Zellmasse (Nassgewicht) und durchschnittlich 1,7 kg Zellmasse (Nassgewicht) pro Ansatz.

Isolierung und Reinigung der [NiFe]-Hydrogenase

Neben dem Aufbau und der Inbetriebnahme des 1100 L Fermenters erfolgte die Etablierung der Präparation kristallisationsfähiger [NiFe]-Hydrogenase aus dem geernteten Zellmaterial. Das optimierte Präparationsverfahren ermöglichte die Isolierung von durchschnittlich 100 mg hochreinem Protein aus 2 kg Zellmasse. Die verbesserte Methode zur qualitativen Ermittlung der spezifischen Wasserstoffspaltungsaktivität gewährleistete eine schnelle, reproduzierbare Identifizierung der hydrogenasehaltigen Fraktionen während der säulenchromatographischen Auftrennung. Die Qualität der hergestellten Proteinproben wurde durch SDS-PAGE und MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen. Durch die Entwicklung einer automatischen, gekühlten Soxhlet-Extraktionsapparatur konnte die Entfernung der in der Proteinpräparation störenden photosynthetischen Pigmente erreicht und die erforderliche Acetonmenge auf ein Zehntel des ursprünglich verwendeten Volumens reduziert werden. Als Nebenprodukt dieser Methode konnten große Mengen Bakteriochlorophylla isoliert werden, die für weitere biochemische Anwendungen genutzt wurden.

Spektroskopische Charakterisierung

Die Ergebnisse der unter Anwendung EPR- und FT-IR-spektroskopischer Techniken erfolgten Charakterisierung bestätigten die Erwartungen bezüglich Qualität und Funktionalität der isolierten Hydrogenase. Die Anwendbarkeit der in dieser Arbeit beschriebenen, modifizierten Proteinreinigungsmethode wurde damit nachgewiesen.

Die aus den rhombischen EPR-Spektren erhaltenen g -Tensor-Hauptwerte für die paramagnetischen Zustände Ni-A, Ni-B und Ni-C stimmten mit den bisher publizierten Daten überein. Auch die anhand

der FT-IR-Spektren ermittelten Schwingungsfrequenzen des CO- bzw. der CN⁻-Liganden des Eisens im katalytisch aktiven Zentrum aller natürlich vorkommenden Redoxzustände der Hydrogenase entsprachen den aus der Literatur bekannten Werten und zeigten die vom jeweiligen Redoxzustand abhängigen, charakteristischen Banden zwischen 1900 und 2100 cm⁻¹.

Röntgenkristallographische Analyse

Nachdem die Funktionalität des Enzyms in EPR- und FT-IR-spektroskopischen Messungen nachgewiesen werden konnte, ist das Material zur Gewinnung von Proteinkristallen eingesetzt worden. Das hochreine Enzym kristallisierte erfolgreich unter Verwendung der Dampfdiffusionsmethode. Die Kristallisationsbedingungen ließen sich auf folgende Parameter eingrenzen: Inkubationstemperatur: 4 °C, Proteinkonzentration: 30 mg/mL, Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 1 M Natriumcitrat, 100 mM Imidazol, pH-Wert 8,0. Nach zwei Wochen wurden erste Kristalle sichtbar. Es handelte sich um dünne, quadratische Plättchen mit einer Kantenlänge von 0,2-0,25 mm und einer Schichtdicke von ca. 0,01 mm.

Die Röntgenbeugungsexperimente wurden am SPring8 (Hyogo, Japan), an der Swiss Light Source (SLS) des Paul-Scherer-Instituts (Villigen, Schweiz) und am BESSY-Synchrotron (TU Berlin) durchgeführt. Es konnten native Datensätze mit klaren, auswertbaren Diffraktionsmustern bis zu einer Auflösung von 2,50 Å detektiert werden. Die aus der Prozessierung der Daten erhaltenen Ergebnisse ließen auf eine orthorhombische Einheitszelle der Raumgruppe $P2_12_12$ schließen. Die Maße und Winkel der den Kristall aufbauenden Einheitszelle betragen: $a=205,00$ Å, $b=217,42$ Å, $c=120,44$ Å bzw. α, β und $\gamma=90^\circ$. Nach erfolgter Berechnung der Elektronendichtekarte wurde ein vorläufiges Molekülmodell der aus dem photosynthetischen Bakterium *Allochromatium vinosum* isolierten [NiFe]-Hydrogenase erstellt. Die Informationen über die Koordinierung des aktiven [NiFe]-Zentrums und die Lage der Eisen-Schwefelcluster konnten

dem in dieser Arbeit erstmalig vorgestellten Modell des als Dimer kristallisierten Enzyms entnommen werden. Auf den ersten Blick war eine hohe Ähnlichkeit mit der hochaufgelösten Struktur der [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* MF festzustellen.

Ausblick

Mit dieser Arbeit wurde die Basis für die Durchführung einer vollständigen röntgenkristallographischen Analyse der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum* geschaffen. Die Bakterienkultur im 1100 L Fermenter liefert eine große Menge Zellmasse, aus der mit der optimierten Präparationsmethode effizient hochreines Enzym isoliert werden kann. Nachdem die grundsätzliche Kristallisationsfähigkeit des Proteins und die Verwendbarkeit der Kristalle in Röntgenbeugungsexperimenten nachgewiesen wurde, können darauf aufbauend die ermittelten Bedingungen dahingehend optimiert werden, Kristalle mit einer höheren Schichtdicke zu erhalten. Ziel ist die Gewinnung von Kristallen, die im Röntgenbeugungsexperiment ein abermals verbessertes Diffraktionsmuster erzeugen, um ein hochaufgelöstes Molekülmodell erstellen zu können. Zudem ist das vorliegende Molekülmodell weiter zu verfeinern, um es mit den bekannten Röntgenstrukturen anderer Hydrogenasen umfassend zu vergleichen.

Eine detaillierte röntgenkristallographisch ermittelte Struktur bildet die Grundlage für die Interpretation bisheriger funktioneller Charakterisierungen, insbesondere der spektroskopischen Messergebnisse aus FT-IR- und EPR-Experimenten. Mit Hilfe eines detaillierten Modells sind die funktionellen Eigenschaften des Proteins direkt mit den strukturellen Besonderheiten, insbesondere der spezifischen Proteinumgebung des aktiven Zentrums, zu korrelieren. Einzelne Aminosäuren, denen eine konkrete Bedeutung im Katalysemechanismus zukommt, können identifiziert werden. Mit dem erstellten Molekülmodell ist weiterhin die genaue Aminosäurese-

quenz des funktionellen Enzyms zu bestimmen. Anhand eines Vergleichs mit der aus der Gensequenz abgeleiteten Primärstruktur sind die genauen posttranskriptionalen und posttranslationalen Modifikationen der Hydrogenase aus *Allochromatium vinosum* zu ermitteln.

Die Analyse von Proteinkristallen einzelner Redoxzustände lässt Rückschlüsse auf die entsprechende elektronische Struktur des katalytisch aktiven Zentrums und die spezifisch vorliegende Koordinierung des Nickel- bzw. des Eisenatoms zu. Die Ergebnisse sind mit den Strukturen aus unterschiedlichen *Desulfovibrio*-Gattungen stammenden [NiFe]-Hydrogenasen detailliert zu vergleichen. Aus diesen Ergebnissen sind einerseits organismusspezifische und andererseits generelle Konstruktions- oder Funktionsprinzipien des Enzyms in Bezug auf den Mechanismus der Wasserstoffspaltung oder der Inhibierung durch Sauerstoff oder CO abzuleiten.

Mit dem isolierten Enzym oder den Kristallen der Hydrogenase, sind neben der röntgenkristallographischen Analyse weiterführende, spektroskopische Untersuchungen mit verschiedenen Techniken möglich. Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie ist beispielsweise die Untersuchung der exakten elektronischen Struktur des paramagnetischen Zentrums bei räumlich gleich orientierten Proteinmolekülen im Einkristall denkbar. Bei der Messung im ENDOR-Experiment kann die Kopplung des Elektronenspins des freien Elektrons im Nickelion mit z. B. Protonen untersucht werden. Auf diese Weise kann ein weiterer Beitrag zur Identifikation der Brückenliganden der EPR-aktiven Redoxzustände geleistet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten tragen somit ebenfalls zur strukturellen und funktionellen Aufklärung des Katalysemechanismus bzw. der Inhibierung des Enzyms z. B. durch O₂ bei und ergänzen damit die bisherigen Erkenntnisse aus Studien anderer Standardhydrogenasen. Diese Erkenntnisse können in biotechnologischen Verfahren zur alternativen Energiegewinnung auf Wasserstoffbasis Anwendung finden.

13 Abkürzungen

λ	Wellenlänge
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
Å	Angström, 1 Å=0,1 nm
A	Absorption
<i>A. vinosum</i>	<i>Allochromatium vinosum</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BChl _a	Bakteriochlorophyll <i>a</i>
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring - Gesellschaft für Synchrotronstrahlung mbH
BV	Benzyliologen
BZ	Brennstoffzelle
c	Konzentration
<i>Ch. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CN ⁻ -Ligand	Cyanid-Ligand
CO-Ligand	Carbonyl-Ligand
cw	Continuous Wave
Da	Dalton
DEAE- dest.	Diethylaminoethyl- destilliert
DMFC	Direct Methanol Fuel Cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>D. vulgaris</i> MF	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Miyazaki F
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENDOR	Electron Nuclear Double Resonance
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FT-IR	Fourier Transform-Infrarot
<i>g</i>	Fallbeschleunigung, $g=9,80665\text{ ms}^{-2}$
H ₂ ase	Hydrogenase
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
Hmd	Eisen-Schwefelclusterfreie Hydrogenase bzw. Methylentetrahydromethanopterin Dehydrogenase
IEX	Ion Exchange Chromatography
IR	Infrarot

K	Kelvin, 273 K=0 °C
konz.	konzentriert
L	Liter
LMW	Low Molecular Weight
Lsg.	Lösung
M	molar, 1 M=1 mol/L
MAD	Multiple Anomale Dispersion
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MBH	Membrane Bound Hydrogenase
methenyl-H ₄ MPT ⁺	N ⁵ ,N ¹⁰ methenyltetrahydromethanopterin
methylen-H ₄ MPT	N ⁵ ,N ¹⁰ methylen tetrahydromethanopterin
MIR	Mittlerer Infrarotbereich
MR	Molecular Replacement
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCS	No Crystallographic Symmetry
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAM	Point Accepted Mutation
PDB	Protein Data Bank
PEM	Proton Exchange Membrane
RH	Regulatory Hydrogenase
SE	Size Exclusion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Soluble Hydrogenase
SLS	Swiss Light Source
T	Transmission
TOF	Time Of Flight
<i>T. roseopersicina</i>	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UE	Untereinheit
UV	Ultravioletter Spektralbereich
VE	Voll entsalzt
Vis	Sichtbarer Spektralbereich

Literaturverzeichnis

- [1] United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC). Kyoto protocol. <http://unfccc.int>, 1998.
- [2] Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen (WBGU). Über Kioto hinaus denken - Klimaschutzstrategien für das 21. Jahrhundert. Sondergutachten. <http://www.wbgu.de>, 2003.
- [3] M. Altmann, S. Gaus, H. Landinger, C. Stiller und R. Wurster. Wasserstofferzeugung in offshore Windparks- Killerkriterien, grobe Auslegung und Kostenabschätzung. *Studie im Auftrag von GEO Gesellschaft für Energie und Ökologie mbH*, 2001.
- [4] Deutscher Wasserstoff- und Brennstoffzellen-Verband e.V. (DWV). Wasserstoff - Der neue Energieträger. Eine fachliche Einführung vom DWV. *Hydrozeit Verlag*, 2007.
- [5] Rheinbahn AG. Pressemitteilung. August 2006.
- [6] S.P.J. Albracht. Nickel hydrogenases: In search of the active site. *Biochim. Biophys. Acta*, 1188:167–204, 1994.
- [7] K. L. Kovacs, G. Maroti, and G. Rakhely. A novel approach for biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, 31:1460–1468, 2006.
- [8] J. R. Benemann and P. C. Hallenbeck. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting factors. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27:1185–1193, 2002.
- [9] E. Greenbaum. Energetic efficiency of hydrogen photoevolution by algal water splitting. *Biophys. J.*, 54:365–368, 1988.
- [10] A. Rosenkranz and A. J. Krasna. Stimulation of hydrogen photo-production in algae by removal of oxygen by reagents that combine reversibly with oxygen. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:1334–1342, 1984.
- [11] M. L. Ghirardi, R. K. Togasaki, and M. Seibert. Oxygen sensitivity of algal H₂-production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65:141–151, 1997.

- [12] T. V. Laurinavichene, I. V. Tolstygina, R. R. Galiulina, M. L. Ghiardi, M. Seibert, and A. A. Tsygankov. Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27:1245–1249, 2002.
- [13] M. Winkler, A. Hemschemeier, C. Gotor, A. Melis, and T. Happe. [Fe]-hydrogenases in green algae: Photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27:1431–1349, 2002.
- [14] A. A. Tsygankov. Biological generation of hydrogen. *Russ. J. Gen. Chem.*, 77:685–693, 2007.
- [15] M. W. W. Adams, L. E. Mortenson, and J.-S. Chen. Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 594:105–176, 1981.
- [16] M. Düggeli. Die Schwefelbakterien. *Neujahrsblatt der NGZH*, 121, 1919.
- [17] R. Cammack, Frey M., and R. Robson, editors. *Hydrogen as a fuel, Learning from Nature*. Taylor & Francis, London and New York, 2001.
- [18] J. F. Imhoff, J. Süling, and R. Petri. Phylogenetic relationship among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48:1129–1143, 1998.
- [19] H. G. Schlegel. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag, 2006.
- [20] T. D. Brock. *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2000.
- [21] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
- [22] E. Garcin, X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 7(5):557–566, 1999.
- [23] S. H. He, M. Teixeira, J. LeGall, D. S. Patil, I. Moura, J. J. G. Moura, D. V. DerVartanian, B. H. Huynh, and H. D. Peck. EPR studies with ⁷⁷Se-enriched [NiFeSe] hydrogenase of *Desulfovibrio baculatus*. *J. Biol. Chem.*, 264(5):2678–2682, 1989.

-
- [24] O. Sorgenfrei, D. Linder, M. Karas, and A. Klein. A novel very small subunit of a selenium-containing [NiFe] hydrogenase of *Methanococcus voltae* is posttranslationally processed by cleavage at a defined position. *Eur. J. Biochem.*, 213(3):1355–1358, 1993.
- [25] J. W. Peters, W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, and L. C. Seefeldt. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Å resolution. *Science*, 282(5395):1853–1858, 1998.
- [26] O. Pilak. *Kristallstruktur von [Fe]-Hydrogenase Hmd*. PhD thesis, Philipps-Universität Marburg, 2007.
- [27] S. Shima and R. K. Thauer. A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *Chem. Rec.*, 7:37–46, 2007.
- [28] O. Pilak, B. Mamat, S. Vogt, C. H. Hagemeyer, R. K. Thauer, S. Shima, C. Vonrhein, E. Warkentin, and U. Ermler. The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. *J. Mol. Biol.*, 358(3):798–809, 2006.
- [29] S. Shima, E. J. Lyon, M. Sordel-Klippert, M. Kauá, J. Kahnt, R. K. Thauer, K. Steinbach, X. Xie, L. Verdier, and C. Griesinger. The cofactor of the iron-sulfur cluster free hydrogenase Hmd: Structure of the light-inactivation product. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:2547–2551, 2004.
- [30] E. J. Lyon, S. Shima, R. Boecher, R. K. Thauer, F.-W. Grevels, E. Bill, W. Roseboom, and S. P. J. Albracht. Carbon monoxide as an intrinsic ligand in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:14239–14248, 2004.
- [31] O. Lenz, A. Strack, A. Tran-Betcke, and B. Friedrich. A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species. *J. Bacteriol.*, 179:1655–1663, 1997.
- [32] H. Ogata, S. Hirota, A. Nakahara, H. Komori, N. Shibata, T. Kato, K. Kano, and Y. Higuchi. Structural basis for the activation process of [NiFe] hydrogenase from *D. vulgaris* Miyazaki F. *To be published*.
- [33] R. P. Happe, W. Roseboom, A. J. Pierik, S. P. J. Albracht, and K. A. Bagley. Biological activation of hydrogen. *Nature*, 385(6612):126–126, 1997.
- [34] A. J. Pierik, W. Roseboom, R. P. Happe, K. A. Bagley, and S. P. J. Albracht. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. *J. Biol. Chem.*, 274(6):3331–3337, 1999.

- [35] C. Fichtner, C. Laurich, E. Bothe, and W. Lubitz. Spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochemistry*, 45(32):9706–9716, 2006.
- [36] W. Lubitz, M. van Gastel, and W. Gärtner. Metal ions in life sciences. Chapter 7: Nickel and its surprising impact in nature. *Wiley-VCH*, 2:279–322, 2007.
- [37] A. Volbeda and J. C. Fontecilla-Camps. Structure-function relationship of nickel-iron sites in hydrogenase and a comparison with the active site of other nickel-iron enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, 249:1609–1619, 2005.
- [38] Y. Higuchi, T. Yagi, and N. Yasuoka. Unusual ligand structure in NiFe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, 5(12):1671–1680, 1997.
- [39] W. Lubitz, E. Reijerse, and van Gastel M. [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques. *Chem. Rev.*, 107:4331–4365, 2007.
- [40] A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, and R. Cammack. Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: Spectroelectrochemical studies. *Chem. Rev.*, 107:4304–4330, 2007.
- [41] J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, C. Cavazza, and Y. Nicolet. Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem. Rev.*, 107:4273–4303, 2007.
- [42] K. A. Vincent, A. Parkin, and F. A. Armstrong. Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem. Rev.*, 107:4366–4413, 2007.
- [43] S. Kurkin, S. J. George, R. N. F. Thorneley, and S. P. J. Albracht. Hydrogen induced activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum* as studied by stopped-flow infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 43:6820–6831, 2004.
- [44] J. W. van der Zwaan, J. M. C. C. Coremans, E. C. M. Bouwens, and S. P. J. Albracht. Effect of $^{17}\text{O}_2$ and ^{13}CO on EPR spectra of nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1041:101–110, 1990.
- [45] H. Ogata, S. Hirota, A. Nakahara, H. Komori, N. Shibata, T. Kato, K. Kano, and Y. Higuchi. Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high resolution X-ray analysis - Conversion of the ready to unready state. *Structure*, 13:1635–1642, 2005.

-
- [46] A. Volbeda, L. Martin, C. Cavazza, M. Matho, B. W. Faber, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, E. Garcin, M. Rousset, and J. C. Fontecilla-Camps. Structural difference between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10:239–249, 2005.
- [47] M. van Gastel, M. Stein, M. Brecht, O. Schröder, F. Lendzian, R. Bittl, H. Ogata, Y. Higuchi, and W. Lubitz. A single-crystal ENDOR and density functional theory study of the oxidized states of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11:41–51, 2006.
- [48] M. van Gastel, C. Fichtner, F. Neese, and W. Lubitz. EPR experiments to elucidate the structure of the ready and unready states of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochem. Soc. Trans.*, 33(1):7–11, 2005.
- [49] S. Foerster, M. Stein, M. Brecht, H. Ogata, Y. Higuchi, and W. Lubitz. Single crystal EPR studies of the reduced active site of [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J. Am. Chem. Soc.*, 125:83–93, 2003.
- [50] A. Volbeda and J. C. Fontecilla-Camps. Structure-function relationships of nickel-iron sites in hydrogenases and a comparison with the active sites of other nickel-iron enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, 249:1609–1619, 2005.
- [51] C. Fichtner. *Spektroskopische und elektrochemische Untersuchung der [NiFe]-Hydrogenase aus Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F.* PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2005.
- [52] C. Stadler, A.L. De Lacey, Y. Montet, A. Volbeda, J.C. Fontecilla-Camps, J.C. Conesa, and V.M. Fernandez. Density functional calculations for modeling the active site of nickel-iron hydrogenases. predictions for the unready and ready states and the corresponding activation processes. *Inorg. Chem.*, 41:4424–4434, 2002.
- [53] B. Bleijlevens, B. W. Faber, and S. P. J. Albracht. The [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* studied in EPR-detectable states: H/D exchange experiments that yield new information about the structure of the active site. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6:763–769, 2001.
- [54] C. Fichtner, M. van Gastel, and W. Lubitz. Wavelength dependence of the photo-induced conversion of the Ni-C to the Ni-L redox state in the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5:5507–5513, 2003.

- [55] S. Dementin, B. Burlat, A. L. De Lacey, A. Pardo, G. Adryanczyk-Perrier, B. Guigliarelli, V. M. Fernandez, and M. Rousset. A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 279(11):10508–10513, 2004.
- [56] B. Bleijlevens, F. A. van Broekhuizen, A. L. De Lacey, W. Roseboom, V. M. Fernandez, and S. P. J. Albracht. The activation of the [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. An infrared spectro-electrochemical study. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 9:743–752, 2004.
- [57] S. Foerster, M. van Gastel, M. Brecht, and W. Lubitz. An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni-C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F hydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10:51–62, 2005.
- [58] M. Brecht, M. van Gastel, T. Buhrke, B. Friedrich, and W. Lubitz. Direct detection of a hydride ligand in the [NiFe] center of the regulatory hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 125:13075–13083, 2003.
- [59] M. Medina, E. C. Hatchikian, and R. Cammack. Studies of light-induced nickel EPR signals in hydrogenase: Comparison of enzymes with and without selenium. *Biochim. Biophys. Acta*, 1275:227–236, 1996.
- [60] M. Medina, R. Williams, and R. Cammack. Studies of light-induced nickel EPR signals in *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 90(19):2921–2924, 1994.
- [61] K. K. Surerus, M. Chen, J. W. van der Zwaan, F. M. Rusnak, M. Kolk, E. C. Duin, S. P. J. Albracht, and E. Münck. Further characterization of the spin coupling observed in oxidized hydrogenase from *Chromatium vinosum*. A Mössbauer and multifrequency EPR study. *Biochemistry*, 33:4890–4993, 1994.
- [62] A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:12989–12996, 1996.
- [63] A. L. De Lacey, C. Stadler, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, H.-J. Fan, S. Li, and M. B. Hall. IR spectroelectrochemical study of the binding of carbon monoxide to the active site of *Desulfovibrio fructosovorans* Ni-Fe hydrogenase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 7:318–326, 2002.

-
- [64] J. W. van der Zwaan, S. P. J. Albracht, R. D. Fontijn, and Y. B. M. Roelofs. EPR evidence for direct interaction of carbon monoxide with nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 872(3):208–215, 1986.
- [65] S. J. George, S. Kurkin, R. N. F. Thorneley, and S. P. J. Albracht. Reactions of H₂, CO, and O₂ with active [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. a stopped-flow infrared study. *Biochemistry*, 43:6808–6819, 2004.
- [66] B. Bleijlevens. *Activation and sensing of hydrogen in nature*. PhD thesis, University of Amsterdam, 2002.
- [67] A. Böck, P. W. King, M. Blokesch, and Posewitz M. C. Maturation of hydrogenases. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 51:1–71, 2006.
- [68] L. Forzi and R. G. Sawers. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals*, 20:565–578, 2007.
- [69] J. F. Heidelberg, R. Seshadri, S. A. Haveman, C. L. Hemme, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, J. A. Eisen, N. Ward, B. Methe, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, R. Madupu, W. C. Nelson, S. A. Sullivan, D. Fouts, D. H. Haft, J. Selengut, J. D. Peterson, T. M. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, D. Radune, G. Dimitrov, M. Hance, K. Tran, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, T. V. Feldblyum, J. D. Wall, G. Voordouw, and C. M. Fraser. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nat. Biotechnol.*, 22:554–559, 2004.
- [70] K. L. Kovacs, A. T. Kovacs, G. Maroti, L. S. Meszaros, J. Balogh, D. Latinovics, A. Fülöp, R. David, E. Doroghazi, and Rakhely G. The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochem. Soc. Trans.*, 33:61–63, 2005.
- [71] W. Roseboom, M. Blokesch, A. Böck, and S. P. J. Albracht. The biosynthetic routes of carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different. *FEBS Lett.*, 579(1):469–472, 2005.
- [72] Y. Liang, M. Long, X. Wu, H. Xu, and S. P. J. Albracht. Cloning and analysis of membrane-bound hydrogenase genes from *Chromatium vinosum*. *Unpublished*.
- [73] G. Rakhely, A. Colbeau, Garin J., P. M. Vignais, and Kovacs K. L. Unusual organization of the genes coding for HydSL, the stable [NiFe] hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *J. Bacteriol.*, 180 (6):1460–1465, 1998.

- [74] M. Blokesch and A. Böck. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: The HypC cycle. *J. Mol. Biol.*, 324:287–296, 2002.
- [75] M. Blokesch. *[NiFe]-Hydrogenasen von Escherichia coli: Funktionen der am Metalleinbau beteiligten Proteine*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004.
- [76] G. Winter, T. Buhrke, A. K. Jones, and B. Friedrich. The role of the active site-coordinating cystein residues in the maturation of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Arch. Microbiol.*, 182 (2-3):138–146, 2004.
- [77] A. K. Jones, Lenz. O., A. Strack, T. Buhrke, and B. Friedrich. [Ni-Fe] hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry*, 43:13467–13477, 2004.
- [78] A. Gebler, T. Burgdorf, A. L. DeLacey, O. Rüdiger, A. Martinez-Arias, O. Lenz, and B. Friedrich. Impact of alterations near the [NiFe] active site on the function of the H₂ sensor from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Journal*, 274 (1):74–85, 2007.
- [79] A. Goenka Agrawal. *Molecular biological and spectroscopic characterization of the [NiFe]-hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris*. PhD thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2005.
- [80] A. Goenka, J. J. K. Voordouw, W. Lubitz, and G. Voordouw. Construction of a [NiFe]-hydrogenase deletion mutant of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Biochem. Soc. Trans.*, 33(1):59–60, 2005.
- [81] N. K. Menon, J. Robbins, M. Der Vartanian, D. Patil, H. D. Peck Jr., A. L. Menon, R. L. Robson, and Przybyla A. E. Carboxy-terminal processing of the large subunit of [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett.*, 331:91–95, 1993.
- [82] L. F. Wu and M. A. Mandrand. Microbial hydrogenases - primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol. Rev.*, 104(3-4):243–270, 1993.
- [83] G. Voordouw. Evolution of hydrogenase genes. *Adv. Inorg. Chem.*, 38:397–422, 1992.
- [84] T. Schubert, O. Lenz, E. Krause, R. Volkmer, and B. Friedrich. Chaperones specific for the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase interact with the tat signal peptide of the small subunit precursor in *Ralstonia eutropha* H16. *Mol. Microbiol.*, 66 (2):453–467, 2007.
- [85] J. A. Weil and J. R. Bolton. *Electron Paramagnetic Resonance*. Wiley and Sons, 2007.

-
- [86] L. J. Berliner. *Spin Labelling. The next millenium*. Plenum Press, 1998.
- [87] E. I. Solomon, E. G. Pavel, K. E. Loeb, and C. Campochiaro. Magnetic circular-dichroism spectroscopy as a probe of the geometric and electronic-structure of nonheme ferrous enzymes. *Coordination Chemistry Reviews*, 144:369–460, 1995.
- [88] A. McPherson. *Introduction to macromolecular crystallography*. Wiley and Sons, 2003.
- [89] D. Blow. *Outline of Crystallography for Biologists*. Oxford University Press, 2002.
- [90] J. Drenth. *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. Springer Verlag, 1999.
- [91] C. Branden and J. Tooze. Introduction to protein structure. *Garland Publishing*, 1991.
- [92] W. Massa. *Kristallstrukturbestimmung*. Teubner Studienbücher, 2007.
- [93] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265–275, 1951.
- [94] K. A. Malik. A new method for liquid nitrogen storage of phototrophic bacteria under anaerobic conditions. *J. Microbiol. Methods*, 2:41–47, 1984.
- [95] S. Stoll and A. Schweiger. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Res.*, 178:42–55, 2006.
- [96] D. D. Hendley. Endogenous fermentation in *Thiorhodaceae*. *J. Bacteriol.*, 70:625–634, 1955.
- [97] H. Larsen. On the culture and general physiology of the green sulfur bacteria. *J. Bacteriol.*, 64:187–196, 1952.
- [98] A. Mennenga. *Einlagerung von Häm, Chlorophyll- und Bakteriochlorophyllderivaten in de novo synthetisierte Peptide als Modellsysteme natürlicher Protein-Kofaktor-Komplexe*. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2007.
- [99] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, Wilkins M. R., R. D. Appel, and A. Bairoch. *The Proteomics Protocols Handbook: Protein identification and analysis tool on the ExpASY Server*. Humana Press, 2005.

- [100] Y. Higuchi, H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka, and T. Yagi. Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure*, 7:549–556, 1999.
- [101] J.E. Huyett, M. Carepo, A. Pamplona, R. Franco, I. Moura, J. J. G. Moura, and B. M. Hoffman. ⁵⁷Fe Q-band pulsed ENDOR of the hetero-dinuclear site of nickel hydrogenase: Comparison of the NiA, NiB, and NiC states. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:9291–9292, 1997.
- [102] J. M. C. C. Coremans, C. J. van Garderen, and S. P. J. Albracht. On the redox equilibrium between H₂ and hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1119:148–156, 1992.
- [103] J. W. van der Zwaan, S. P. J. Albracht, R. D. Fontijn, and E. C. Slater. Monovalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *FEBS Lett.*, 2:271–277, 1985.
- [104] J. W. van der Zwaan, S. P. J. Albracht, R. D. Fontijn, and P. Mul. On the anomalous temperature behaviour of the EPR signal of monovalent nickel in hydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 169:377–384, 1987.
- [105] K. A. Bagley, E. C. Duin, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, and W. H. Woodruff. Infrared-detectable groups sense changes in charge density on the nickel center in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, 34(16):5527–5535, 1995.
- [106] J. M. C. C. Coremans, J. W. van der Zwaan, and S. P. J. Albracht. Distinct redox behaviour of the prosteic groups in ready and unready hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1119:157–168, 1992.
- [107] C.-H. Lai, W.-Z. Lee, M. L. Miller, J. H. Reibenspies, D. J. Darensbourg, and M. Y. Darensbourg. Responses of the Fe(CN)₂(CO) unit to electronic changes as related to its role in [NiFe]hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:10103–10114, 1998.
- [108] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and Bourne P. E. The protein data bank. *Nucl. Acids Res.*, 28:235–242, 2000.
- [109] Y. Higuchi, N. Yasuoka, M. Kakudo, Y. Katsube, T. Yagi, and H. Inokuchi. Single crystals of hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J. Biol. Chem.*, 262(25):2823–2825, 1987.
- [110] A. Volbeda, M.-H. Charon, E. C. Hatchikian, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373:580–587, 1995.

- [111] H. Ogata, Y. Mizogushi, N. Mizuno, K. Miki, S. Adachi, N. Yasuoka, T. Yagi, O. Yamauchi, S. Hirota, and Y. Higuchi. Structural studies of the carbon monoxide complex of [NiFe]hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Suggestion for the initial activation site for dihydrogen. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:11628–11635, 2002.
- [112] P. M. Matias, C. M. Soares, L. M. Saraiva, R. Coelho, J. Morais, J. LeGall, and M. A. Carrando. [NiFe] hydrogenase form *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 c_3 . *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6:63–81, 2001.
- [113] Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, C. E. Hatchikian, and J. C. Fontecilla-Camps. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: The structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure Fold. Des.*, 7(1):13–23, 1999.
- [114] A. G. W. Leslie. Jnt CCP4/ESF-EAMCB. *Newsl. Protein Crystallogr.*, 26, 1992.
- [115] Collaborative Computational Project No 4. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D*, 50:760–736, 1994.
- [116] T. Hahn, editor. *International Tables for Crystallography, Vol. A. Space Group Symmetry, 5th Ed.* Kluwer Acad. Publ., 2001.
- [117] B. W. Matthews. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, 33:491–497, 1968.
- [118] K. A. Kantardjieff and B. Rupp. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA and protein-nucleic acid complex crystals. *Prot. Science*, 12:1865–1871, 2003.
- [119] R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucl. Acids Res.*, 31 (13):3497–3500, 2003.

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. Lubitz möchte ich mich für die Überlassung des spannenden Themas, für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie und für das stetige Interesse an meiner Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. S. P. J. Albracht und W. Roseboom für die Überlassung zahlreicher Laborgeräte, ihre Unterstützung und Hilfe, das Interesse an meiner Arbeit und die ausführliche Beantwortung verschiedenster Fragen.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jaeger danke ich für die Übernahme des Korreferats dieser Dissertation.

Bei Dr. H. Ogata möchte ich mich für die geduldigen Erklärungen, die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Proteinkristallisation und die Durchführung der röntgenkristallographischen Analyse bedanken. Insbesondere während unserer Aufenthalte am BESSY und am SLS habe ich viele spannende Dinge gelernt.

Den Mitarbeitern am SPring8, am SLS des Paul-Scherer-Instituts und des BESSY, insbesondere T. Tomizaki (SLS) und G. Zocher (BESSY) sei herzlich für ihre Unterstützung bei den Messungen gedankt. Das am SLS durchgeführte Projekt 20071201 wurde durch die EU-Kommission im 6. Rahmenprogramm zur Stärkung des Europäischen Forschungsraums und der Forschungsinfrastruktur gefördert.

Dr. M. Flores, M. E. Pandelia, F. Reikowski und G. Klihm danke ich herzlich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei den EPR-Messungen. Besonderer Dank gilt Dr. M. Flores, der die Simulation meiner experimentellen EPR-Spektren übernommen hat. Bei F. Reikowski bedanke ich mich zudem herzlich für den Bau des Hydrographen.

Der gesamten „Hase-Gruppe“ danke ich für die hilfreichen Diskussionen und Ideen, die während der Treffen und der gemeinsamen Arbeit entstanden, insbesondere Dr. A. Goenka Agrawal, A. Kaur, Dr. A. Silakov, Dr. M. van Gastel und B. Wenk.

Bei Dr. C. Breitenstein bedanke ich mich sehr herzlich für seine Hilfe bei der Entwicklung der Extraktionsapparatur, für seine ausführlichen Erklärungen, die aufschlussreichen Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht ebenfalls an Dr. C. Fichtner, die mir während unserer gemeinsamen Zeit hier am MPI mit Rat und Tat als Kollegin und Freundin zur Seite stand und diese Arbeit ebenfalls Korrektur gelesen hat.

Ganz besonderer Dank gilt den technischen Mitarbeitern T. Berndsen, K. Schwarzbach, P. Malkowski, B. Jung, M. Reus, N. Dickmann und L. Currell, der gesamten Feinmechanikabteilung und unseren Auszubildenden, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich fand jederzeit ein offenes Ohr für meine Sorgen oder neuen Ideen und bekam jede Unterstützung bei der Bewerksstellung meiner Vorhaben.

Nicht zuletzt haben die angenehme Atmosphäre in unserem Büro, die „Mittagessensgruppe“ und die Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter dazu beigetragen, dass ich mich an diesem Institut sehr wohl gefühlt habe. Bei meinen Kollegen D. Biglino, C. Bongards, A. Hoppe, M. Mansurova, J. Shaw und M. Koay bedanke ich mich herzlich für die netten Kaffeepausen und lustigen Unterhaltungen innerhalb und außerhalb des Labors!

Meiner lieben Familie und all meinen Freunden und Freundinnen danke ich von ganzem Herzen für ihre stetige Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Geduld und ihr Vertrauen in mich getreu dem Motto: „Alles wird gut, gleich morgen geht's los!“

Diese Arbeit wurde finanziell durch die Max-Planck-Gesellschaft und die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Publikationen

Veröffentlichung von Teilen der vorliegenden Arbeit

P. Kellers, H. Ogata und W. Lubitz. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the membrane bound [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. Eingereicht.

P. Kellers, H. Ogata und W. Lubitz. First crystal structure of the membrane bound [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. In Vorbereitung.

Posterpräsentationen

P. Kellers, H. Ogata, K. Schwarzbach, W. Lubitz. Cell growth of *Allochromatium vinosum* [DSM 185] and Crystallization of the [NiFe] Hydrogenase. 27.-28.03.2004, Interne Revision des Max-Planck-Instituts für Bioanorganische Chemie, Mülheim.

P. Kellers, H. Ogata, W. Lubitz. Isolation and Characterization of the [NiFe] Hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. 25.-28.04.2006, Solar-H Workshop 2006, Gelsenkirchen.

P. Kellers, H. Ogata, W. Lubitz. Isolation and Crystallization of the [NiFe] Hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. 21.-22.05.2007, Interne Revision des Max-Planck-Instituts für Bioanorganische Chemie, Mülheim.

M. E. Pandelia, P. Kellers, L. Currell, W. Lubitz. FTIR kinetic studies of the light sensitive catalytic intermediates and the CO inhibited state of [NiFe] hydrogenase from *D. vulgaris* Miyazaki F. 21.-22.05.2007, Interne Revision des Max-Planck-Instituts für Bioanorganische Chemie, Mülheim.

P. Kellers, H. Ogata, W. Lubitz. Isolation, Characterization and Crystallization of the [NiFe] Hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. 29.05-01.06.2007, Solar-H Workshop 2007, Uppsala (Schweden).

P. Kellers, H. Ogata, W. Lubitz. Isolation, Characterization and Crystal Structure of the [NiFe] Hydrogenase from *Allochromatium vinosum*. 21.02-22.02.2008, BioH₂ Workshop 2008, Marburg.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Petra Kellers
Geburtsdatum	01. Mai 1979
Geburtsort	Borken, Westfalen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1985–1989	Michael-Grundschule in Groß-Reken
1989–1995	Elisabeth-von-Thüringen-Realschule in Bahnhof-Reken
1995–1998	Gymnasium der Mariannahiller-Missionare in Maria-Veen

Hochschulausbildung

10/1998–07/2003	Diplom-Studiengang Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
09/2002–07/2003	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biophysik unter der Leitung von Prof. Dr. K. Gerwert, Ruhr-Universität Bochum: FT-IR-Spektroskopie am bakteriellen Reaktionszentrum aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , an PSII aus <i>S. elongatus</i> und Isolierung, Aufreinigung und Kristallisation des bakteriellen Reaktionszentrums
ab 12/2003	Beginn der vorliegenden Promotion am Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. W. Lubitz, Mülheim an der Ruhr: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase aus <i>Allochromatium vinosum</i>

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 27.02.2008