

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Struktura, funkce a evoluce hydrogenáz

Eva Nývltová

Bakalářská práce
Praha 2006

Školitel: doc. RNDr. Jan Tachezy, PhD.

OBSAH:

1.	ÚVOD	2
2.	HYDROGENÁZA	4
2.1	Funkce hydrogenázy.....	4
2.2	Strukturní klasifikace.....	5
2.2.1	Ni-Fe hydrogenáza	6
2.2.1.1	Velká podjednotka	7
2.2.1.2	Malá podjednotka	8
2.2.1.3	Formy NiFe hydrogenázy.....	9
2.2.1.4	Katalytická cesta aktivace vodíku-energetický metabolismus.....	11
2.2.1.5	Skupiny Ni Fe hydrogenáz.....	12
2.2.2	Fe hydrogenáza.....	14
2.2.2.1	Katalytický H – cluster.....	15
2.2.2.2	Katalytická aktivita	16
2.2.2.3	Doplňkové domény na N-konci enzymu.....	17
2.2.2.4	Přídavné podjednotky	17
2.2.2.5	Jednobuněčné zelené řasy	18
2.2.2.6	Nejmenší Fe-hydrogenáza.....	18
2.2.3	Hydrogenázy neobsahující atom kovu	18
2.3	Evoluční původ	19
2.3.1	Příbuznost hydrogenáz	19
2.3.2	Monofyletická skupina NiFe hydrogenáz	20
2.3.3	Skupina Fe hydrogenáz.....	20
2.3.4	Podobnosti mezi hydrogenázami a komplexem I dýchacího řetězce mitochondrie	21
3.	ZÁVĚR.....	23
4.	Příloha	24
5.	Použitá literatura	25

1. ÚVOD

Pro většinu organismů na této planetě je kyslík nezbytnou součástí pro jejich život. Kyslík – jako prvek s nejvyšším redoxním potenciálem – je, jako akceptor elektronů pro jejich energetický metabolismus, velmi výhodný. V každé eukaryotní buňce se nachází organely mitochondrie, které kyslík využívají při oxidativní fosforilaci a vyrobí tak mnohonásobně víc energie v podobě ATP než při anaerobní glykolýze. Aerobní prokaryota soustředily dýchací řetězec na svou plazmatickou membránu kolem buňky.

Avšak i přes tuto, na první pohled nezbytnost kyslíku pro život, existují organismy, které dokáží žít bez kyslíku a pro část z nich je kyslík dokonce toxický. Tyto organismy zvolily jiný akceptor elektronů např. protony. Spojení elektronů a protonů vede k tvorbě molekulárního vodíku. Tato syntéza je u anaerobních organismů katalyzována enzymem hydrogenázou. U anaerobních eukaryot je tento enzym nejčastěji lokalizován ve zvláštní organelle – hydrogenosomu, výjimečně však může být i v cytoplazmě.

Hydrogenosomy se vyskytují u celé škály protistů. Poprvé byly popsány u parazitických bičíkovců – trichomonád (Lindmark & Muller, 1973 ; Cerkasovova *et al.*, 1973). Později byl také objeven u volně žijících nálevníků (van Bruggen *et al.*, 1983) a endosymbiotických Chytridiomycet (Yarlett *et al.*, 1986).

Hydrogenosomy mají řadu společných znaků s mitochondriemi. Pro obě organely je typická dvojitá membrána, což podporuje hypotézu endosymbiotického původu organel. V současné době na původ hydrogenosomu a mitochondrie existují 2 základní hypotézy: vodíková hypotéza (Martin & Müller, 1998) a syntrofická hypotéza (Moreira & Lopez-Garcia, 1998).

Vodíková hypotéza předpokládá, že původní hostitelskou buňkou byla anaerobní metanogenní archebakterie potřebující vodík a symbiontem byla fakultativně anaerobní α -proteobakterie produkující vodík. Eukaryotická buňka tak měla vzniknout symbiózou 2 prokaryot, které produkce a potřeba vodíku svazovala k sobě (Martin & Müller, 1998). Syntropická hypotéza předpokládá, že eukaryota vznikly primární symbiózou anaerobní metanogenní archebakterie potřebující vodík (která vytvořila jádro) a fakultativně anaerobní δ -proteobakterie produkující vodík, která se stala hostitelskou buňkou. Mitochondrie se do buňky začlenila následnou endosymbiózou

s fakultativně anaerobní metan-konzumující α -proteobakterií (Moreira & Lopez-Garcia, 1998).

Zatímco mitochondrie má vlastní genom a provádí příslušnou transkripci i translaci, hydrogenosomální geny jsou kódovány v jádře a do organely jsou transportovány až posttranslačně díky signální sekvenci na N-konci nascentního proteinu (Sutak *et al.*, 2004).

Hydrogenosom také neobsahuje cytochromy a mitochondriální enzymy z cyklu kyseliny citrónové. Naopak obsahuje enzym typický pro anaerobní metabolismus, jakým je hydrogenáza. Ta je objektem intenzivního bádání nejen z hlediska jejího významu pro evoluci eukaryotických buněk, ale rovněž pro své jedinečné vlastnosti redukce protonů na molekulární vodík, který se jeví jako dobré palivo šetrné k životnímu prostředí. Tímto enzymem se budu zabývat ve své práci.

2. HYDROGENÁZA

Hydrogenáza je klíčovým enzymem anaerobních organismů produkujících vodík, která byla poprvé objevena ve 30. letech 20. století (Stephenson a Stickland, 1931).

Jedná se zpravidla o metaloprotein složený z 1-4 podjednotek (Razavet *et al.*, 2001). Hydrogenáza je často extrémně citlivá na kyslík, který působí její inaktivaci, což je pro striktně anaerobní organismy letální (Muller, 1993).

Hydrogenáza je vlastně velmi obecný a nekonkrétní název pro celou velkou skupinu enzymů, které mají společný vztah k vodíku – buď, že ho vyrábějí, nebo naopak zpracovávají, přičemž tyto reakce jsou vázány na energetický metabolismus daného organismu.

Můžeme ji najít u řady anaerobních bakterií (Meyer *et al.*, 1978), v plastidech zelených řas (Urbig, Schulz and Senger, 1993), všech anaerobních prvoků nesoucích hydrogenosom, ale také u protist bez hydrogenosomu jako je *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* nebo *Spironucleus barkhanus* (Horner *et al.*, 2000). Podle její schopnosti zpracovávat nebo vyrábět vodík a podle druhu donoru elektronů se hydrogenáza dělí do několika biochemických tříd (viz. příloha).

2.1 Funkce hydrogenázy

Hydrogenázy obecně katalyzují syntézu protonů a elektronů na molekulární vodík nebo jeho štěpení. V jednom organismu však buď vodík pouze vyrábí nebo ho pouze zpracovávají (Vignais *et al.*, 2001).

Ni-Fe hydrogenáza vodík převážně zpracovává a Fe – hydrogenáza vodík převážně vyrábí (Lindmark & Muller, 1973 ; Horner *et al.*, 2000 ; Tosatto *et al.*, 2006). Podle biochemické klasifikace však hydrogenázy dělíme do většího počtu tříd, podle jejich redoxních partnerů (viz. kap. 2.2). Z hlediska eukaryot je nejvýznamnější Fe-hydrogenáza, která odebírá elektrony z feredoxinu, EC 1.12.7.2 (viz. příloha).

Hlavní funkcí hydrogenázy je odstraňování elektronů uvolněných oxidací substrátů. Tento proces je vázán na tvorbu ATP na úrovni substrátové fosforilace. U bakterií se podílí většinou na zpracování vodíku, který jim slouží jako zdroj energie a vytváří transmembránový protonový gradient (Pavlov *et al.*, 1999).

Průběh oxidace: $\text{H}_2 + \text{A}_{\text{ox}} \leftrightarrow 2 \text{H}^+ + \text{A}_{\text{red}}$

Průběh redukce: $2 \text{H}^+ + \text{D}_{\text{red}} \leftrightarrow \text{H}_2 + \text{D}_{\text{ox}}$

Pro průběh reakce je kromě vodíku / protonů a hydrogenázy nutný také akceptor (A) nebo donor (D) elektronů. Donorem elektronů bývá nejčastěji v přírodě ferredoxin (Müller, 1993). Při oxidaci vodíku je u bakterií redukováným akceptorem často nitrát, kyslík, sulfát nebo fumarát (Pavlov *et al.*, 1999).

2.2 Strukturní klasifikace

Hydrogenázy obsahující kovy se dělí na 3 základní skupiny:

- Fe –hydrogenázy (Fe-only hydrogenase ; Hases) – které obsahují jediný kov, železo, a katalyzují hlavně výrobu vodíku
- Ni – Fe hydrogenázy – heterodimer, obsahující kromě železa ještě nikl. Tento typ katalyzuje hlavně zpracování vodíku a nachází se hlavně u bakterií. Fyziologickým akceptorem elektronů je cytochrom c .
- Ni – Fe –Se hydrogenázy – se zbytkovým jednoduchým selenocysteinem jsou dnes často řazeny mezi Ni – Fe hydrogenázy

V poslední době byla objevena ještě 4. skupina - Hydrogenázy bez atomu kovu, které jsou u Archebakterií.

(Rubach *et al.*, 2005 ; Tosatto *et al.*, 2006)

Podle nejnovějších studií, které objevují hydrogenázy u stále nových organismů, však ani toto rozdělení není přesné a konečné. Například u metanogenních Archebakterií byla objevena další nová hydrogenáza, která neobsahuje ani nikl ani FeS centra. Obsahuje pouze jeden atom železa s CO ligandy (Vignais *et al.*, 2001).

Podle buněčné lokalizace můžeme hydrogenázy také rozdělit na:

- cytoplazmatické – rozpustný monomer, extrémně náchylná na kyslík, můžeme ji najít u striktních anaerobů jako *Clostridium pasteurianum* nebo *Megasphaera elsdenii*

- periplasmatické – heterodimer, nachází se například u *Desulfovibrio*
- vázané v hydrogenosomech (například *Trichomonas vaginalis*) nebo chloroplastech zelených řas (například *Scenedesmus*)

(Vignais *et al.*, 2001)

Hydrogenázy obvykle obsahují 1 až 2 atomy železa (výjimkou jsou nekovové hydrogenázy u Archeí, Tosatto *et al.*, 2006), které se podílí na tvorbě aktivního místa s koordinačními ligandy kovu nejčastěji CO a CN⁻.

Dále obsahují FeS centrum typu: [2Fe2S], [3Fe 4S] nebo [4Fe 4S] . Jejich funkcí je přenos elektronů mezi aktivním místem enzymu a redoxními partnery tj. donorem nebo akceptorem elektronů (Vignais *et al.*, 2001).

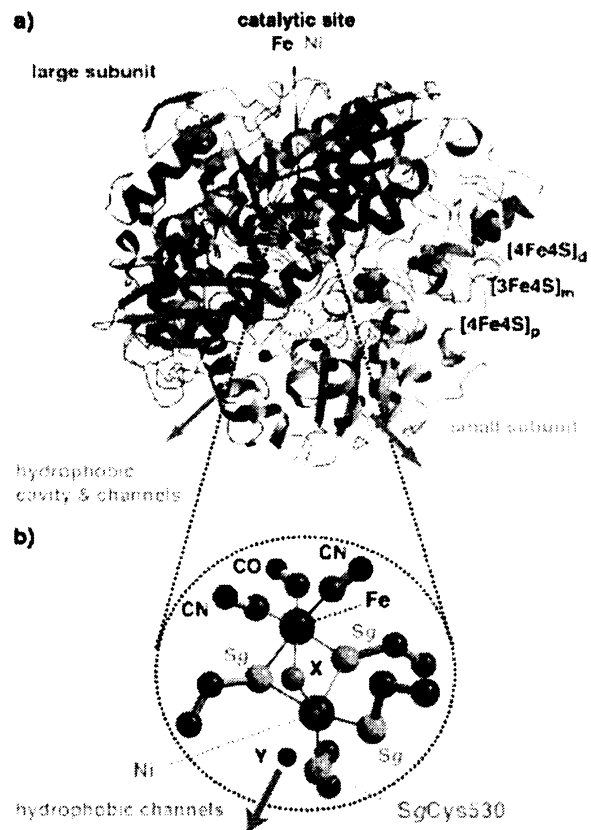
2.2.1 Ni-Fe hydrogenáza

Ni-Fe hydrogenáza může katalyzovat jak redukci protonů na molekulární vodík, tak opačnou reakci tj. oxidaci vodíku za vzniku protonů (Adams *et al.*, 1980). Přesto u většiny organismů NiFe hydrogenázy molekulární vodík zpracovávají. Jen u některých bakterií, jako *Desulfovibrio gigas* nebo *Thiocapsa roseopersicina*, vodík také vyrábí (Pavlov *et al.*, 1999).

V současné době je velmi intenzivně studována. Nachází se u anaerobních nebo fakultativních archeí, eubakterií a cyanobakterií (Tosatto *et al.*, 2006).

Jedná se o periplasmatický $\alpha\beta$ heterodimer složený z malé a velké podjednotky. Ty jsou propojeny hydrofobním kanálem (viz. obr 1) a k jejich biogenesi dochází současně. Obě jsou kódovány multicistronními operony (Vignais *et al.*, 2001).

Obr 1: Struktura NiFe hydrogenázy:



a) Celkový pohled – velká a malá podjednotka, hydrofobní kanál a dutiny

b) Detail katalytického centra (Ni Fe)

(podle: Frey , 2002)

2.2.1.1 Velká podjednotka

Obsahuje hlavní aktivní místo enzymu – Ni-Fe centrum, složené z iontů niklu a železa o velikosti asi $2,55$ až $2,9 \cdot 10^{-10}$ m.

Nikl je koordinován s pěti ligandy do tvaru pyramidy, kdy ve vrcholcích základny se nacházejí 4 atomy síry cysteinu a ve vrcholu pyramidy atom síry nebo kyslíku.

Ligandy kolem železa vytvářejí nepatrně zdeformovaný oktaedr :

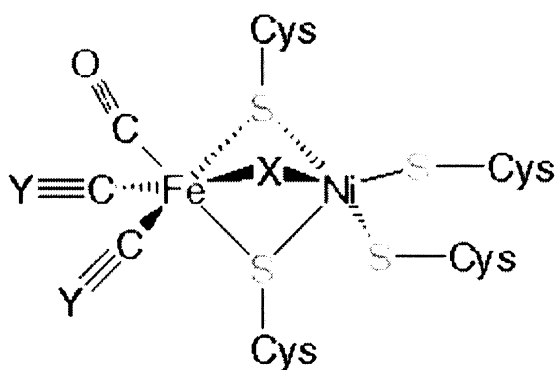
- 3 větší ligandy tvoří 2 síry cysteinu a 1 kyslík
- 3 menší, terminální ligandy jsou označovány L1 – 3 a tvoří je obvykle jeden CO a dva CN.

(viz. obr 2)

U karboxylového konce bylo také nalezeno Mg-centrum, jehož role je zatím nejasná (Pavlov *et al.*, 1999).

Strukturní geny kódující velkou podjednotku se nazývají L nebo G (z anglického large nebo německého gross) a mají velikost asi 45-70 kDa (Vignais *et al.*, 2001).

Obr 2 : Vazba NiFe centra v aktivním místě hydrogenázy



X = S nebo O

Y = O nebo N

(podle: <http://metalo.scripps.edu/PROMISE/>)

2.2.1.2 Malá podjednotka

Strukturní geny kódující malou podjednotku se nazývají S nebo K (z angličtiny small nebo z němčiny klein) a mají velikost cca 28-35 kDa (Vignais *et al.*, 2001).

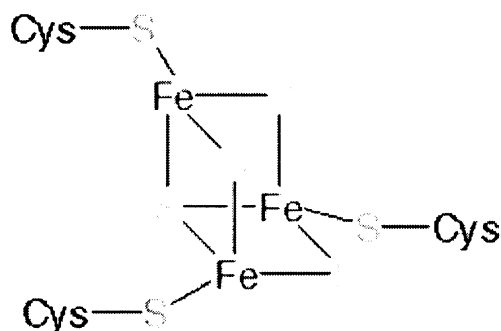
Malá podjednotka je složena ze 2 domén. Doména I_S na svém N-konci vytváří strukturu skládaného β listu podobného flavodoxinu. Na C-konci druhé domény II_S je převážně struktura α helixů.

Malá podjednotka koordinuje 3 FeS clustery, které leží téměř v rovině. Uprostřed je [3Fe4S] centrum, které se váže na II_S doménu (viz. obr 3). Na proximálním a distálním konci jsou [4Fe4S] centra (viz. obr 4). Proximální centrum se váže na I_S doménu a distální na II_S .

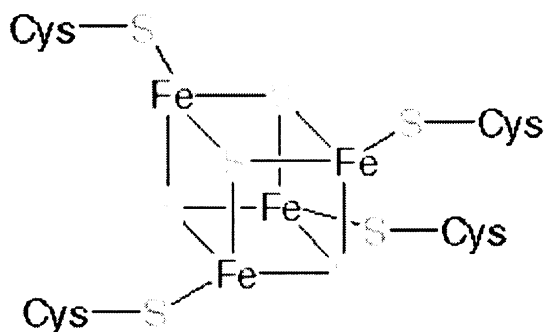
Distální centrum je také koordinováno se třemi cysteinovými zbytky a jedním histidinem. Je to jediný známý příklad, kdy se histidin účastní proteinové struktury FeS centra.

Proximální [4Fe 4S] cluster je esenciální pro aktivaci vodíku - viz. níže (Vignais *et al.*, 2001).

Obr 3: Stavba [3Fe 4S] centra malé podjednotky Ni Fe hydrogenázy



Obr 4: Stavba [4Fe 4S] centra malé podjednotky Ni Fe hydrogenázy



(podle : <http://metalo.scripps.edu/PROMISE/>)

2.2.1.3 Formy NiFe hydrogenázy

U Ni-Fe hydrogenázy můžeme, podle vzdálenosti niklu a železa v Ni-Fe centru a případného navázání dalších atomů, které mohou oba kovy propojit jako můstek, rozlišit několik forem tohoto enzymu. Jako základní můžeme označit 3 formy.

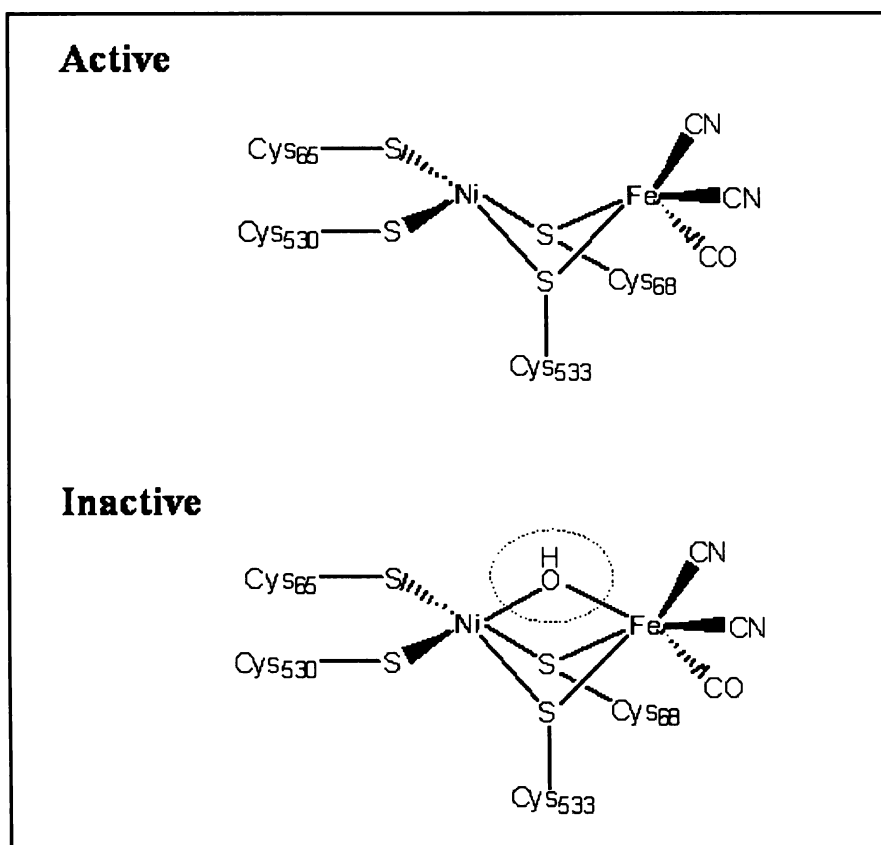
V aerobní atmosféře vzniká Ni-A forma (obr 5 dole), tzv. oxidovaná a nevhodná pro navázání vodíku z okolí. Toto navázání je sice možné, ale až po několika hodinách, což je pro striktně anaerobní organismus, závislý na vodíku jako zdroj energie, často

letální. V této formě se také vytváří OH most mezi atomem niklu a železa a brání tak přímo navázání vodíku (viz. níže).

Ni-B forma je sice v principu také neaktivní, ale navázání vodíku zde nic nebrání a tak se v jeho přítomnosti rychle mění na třetí, aktivní Ni-C formu. Mezi těmito třemi základními formami existuje řada přechodů (Pavlov *et al.*, 1999).

Ve své podstatě se Ni-B forma redukuje jedním elektronem na Ni-SI (S od slova silent = tichý, mlčící), která je pouze přechodná a ne plně aktivní. Teprve po navázání druhého elektronu se mění na Ni-C aktivní formu (Frey, 2002).

Obr 5: Neaktivní forma (Ni-A) a aktivní forma (Ni-B) NiFe hydrogenázy



(podle : <http://metalo.scripps.edu/PROMISE/>)

2.2.1.4 Katalytická cesta aktivace vodíku-energetický metabolismus

Ni-Fe je aktivním centrem enzymu. Do tohoto centra také probíhá vazba molekulárního vodíku, který slouží jako hlavní zdroj energie. Protony uvolněné z vodíku slouží přímo pro výrobu membránového protonového gradientu. Elektrony jsou využity v dalších redukčních reakcích. Proto schopnost NiFe centra navázat a rozložit vodík je pro tyto organismy esenciální.

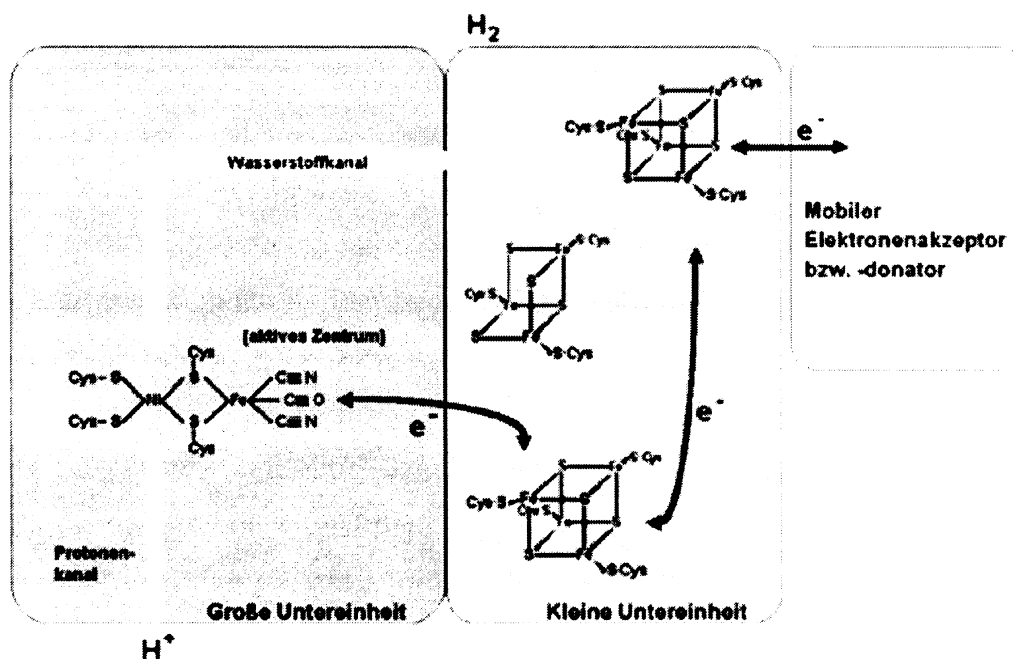
Molekulární vodík je schopné navázat pouze NiFe centrum s lichým počtem elektronů a oxidační formě $\text{Ni}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}$. Tento oxidační stav atomů je z hlediska své funkce vázat a rozkládat vodík energeticky výhodný.

Prekurzor molekulárního vodíku se váže na železo. Dalším krokem je heterolytické štěpení na proton H^+ a hydrid H^- . Proton H^+ se váže na síru cysteinu vázanou na atom železa. Hydrid se nejprve naváže na železo a následně vytvoří most k niklu, přičemž hydrid neleží uprostřed, ale je blíže železa. Oba atomy se také významně přiblíží a to z 2,8 angstromů na 2,62 angstromů.

Celková energie potřebná pro tuto reakci je spočtena na 14,7 kcal/mol, experimentální hodnota je kolem 10 kcal/mol. Disociace vodíku na nikl je velmi nepravděpodobná, protože tato reakce by vyžadovala víc energie a trvala by také déle (Pavlov *et al.*, 1999 ; Casalot & Rousset, 2001).

Obr 6: Průběh cesty vodíku NiFe hydrogenázou

Vodík prochází k aktivnímu NiFe centru skrz hydrofobní kanál velké podjednotky, tvořený hydrofobními částmi aminokyselin. Protony poté odcházejí přímo skrz protonový kanál ven do cytoplazmy buňky a jsou využity na pohon ATPázy v membráně bakterie a výrobu ATP. Elektrony jsou předávány na FeS centra malé podjednotky, které je dále předávají na akceptory elektronů v cytoplazmě, ti je využívají dále v energetickém metabolismu buňky.



(podle: Wünschiers *et al.*, 1998)

2.2.1.5. Skupiny Ni Fe hydrogenáz

Ni-Fe hydrogenázy můžeme rovněž dělit do 4 skupin (Wu & Mandrand, 1993). Tyto skupiny jsou definovány konzervativními sekvencemi cysteinových ligandů L1 a L2 na N- a C- konci velké podjednotky (Vignais *et al.*, 2001).

a) Skupina 1:

Obsahuje hydrogenázy, které váží vodík a využívají ho jako zdroj energie pro buňku. Elektrony z vodíku jsou předány na cytochromový komplex v membráně, který se podílí na tvorbě protonového gradientu.

Jedná se o nejběžnější skupinu NIFe hydrogenázy. Můžeme ji najít například u *Desulfovibrio vulgaris*, *Azotobacter chroococcum* nebo *Methanosarcina mazei*.

b) Skupina 2:

Jedná se o cytoplazmatické heterodimerické hydrogenázy. Nacházíme je u cyanobakterií *Nostoc* a *Anabaena* v buňkách fixujících dusík. Konkrétně transkripce hydrogenázových genů *hupSL* bakterie *Nostoc* je indukována jen v přítomnosti dusíku a u *Anabaeny* je hydrogenáza produkována pouze v buňkách specializovaných na fixaci dusíku tzv. heterocytech. Podle posledních studií hydrogenáza součinností zde stabilizuje aktivitu nitrogenázy vytvářením anaerobního prostředí (Carrasco *et al.*, 1995).

U *Bradyrhizobium japonicum* nebo *Rhodobacter capsulatus* se tato hydrogenáza nachází také v cytoplazmě. Tento druh hydrogenázy se výjimečně nepodílí na energetickém metabolismu buňky, ale slouží pouze k detekci přítomnosti vodíku v prostředí. Geny pro tuto hydrogenázy jsou regulovány přítomností vodíku spolu s ostatními regulátory proteinů, které se nacházejí ve stejném centru. Vodík v prostředí je detekován HupUV/HoxBC hydrogenázou, která přepoše signál na histidinovou kinázu HupT/HoxJ řídí fosforilaci dalších regulátorů, které zpětně ovlivňují detekci vodíku (Elsen *et al.*, 1996).

c) Skupina 3:

Hydrogenázy této skupiny obsahují navíc podjednotku, která je schopná vázat rozpustné kofaktory jako je F_{420} (u metanogenních archeí), NAD nebo NADP (u termofilních anaerobních archeí) a využívat tyto kofaktory jako donory nebo akceptory elektronů.

Do této skupiny patří i cytoplazmatická hydrogenáza, nacházející se u termofilních bakterií jako *Pyrococcus furiosus* nebo *Thermococcus litoralis*, umí redukovat síru a produkovat H_2S . Tato hydrogenáza má 2 funkce – schopnost redukovat molekulární síru a oxidovat molekulární vodík a nazývá se sulfhydrogenáza. Fyziologickým donorem elektronů pro tuto hydrogenázu je NADPH. Pro tyto organismy je optimální teplota kolem $80^{\circ}C$ (Ma *et al.*, 1994)

Patří sem i tetramerní hydrogenáza schopná reverzibilní redukce NAD pomocí vodíku, poprvé izolovaná u *Ralstonia eutropha*. Skládá se ze 2 dimerických motivů. Jeden z nich je homologní ke 2 transmembránovým podjednotkám komplexu I

dýchacího řetězce mitochondrie – NuoH a NuoL, které jsou v komplexu I důležité pro přenos protonů a výrobu energie (Fox *et al.*, 1996).

d) Skupina 4:

NiFe hydrogenázy čtvrté skupiny jsou velmi citlivé na přítomnost kyslíku v prostředí a jsou tak značně nestabilní. Jedná se o nejméně početnou skupinu NiFe hydrogenáz. Můžeme je najít například u *Escherichia coli* nebo *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Tyto hydrogenázy jsou vždy asociované s membránou a podílí se na vývoji vodíku. Tato činnost je velmi často spojena i s oxidací CO na CO₂. U hydrogenázy *Escherichia coli* můžeme opět nalézt dva geny *hyf* operonu, které velmi připomínají podjednotky NuoH a NuoL komplexu I mitochondrie (Andrews *et al.*, 1997).

2.2.2 Fe hydrogenáza

Fe – hydrogenáza je rozšířená u celé škály různých organismů. Najdeme ji v hydrogenozomech ciliátů a Trichomonád (Bui & Johnson, 1996) i u protist bez hydrogenosomů jako je parazitická *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* a *Spironucleus barkhanus* (Lloyd *et al.*, 2002 ; Horner *et al.*, 2000), v plastidech některých jednobuněčných zelených řas jako je *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus obliquus* (Florin *et al.*, 2001) a u striktně anaerobních bakterií jako je *Clostridium pasteurianum* nebo *Desulfovibrio desulfuricans* (Davidson *et al.*, 2002; Nixon *et al.*, 2003 ; Tosatto *et al.*, 2006)

Hlavní funkcí Fe-hydrogenázy je přenos elektronů z ferredoxinu (za jeho současné redukce) na dva protony za následného vzniku plynného vodíku (Lindmark & Muller, 1973; Muller, 1993 ; Horner *et al.*, 2000).

Fe - hydrogenázy jsou velmi citlivé k inaktivaci kyslíkem, v porovnání s jinými druhy hydrogenáz. Na druhou stranu jejich katalytická aktivita je 10 až 100krát vyšší než Ni-Fe hydrogenázy a jsou to tedy mnohem výkonnější producenti vodíku (Frey , 2002 ; Tosatto *et al.*, 2006).

Většina Fe-hydrogenáz jsou monomery obsahující pouze katalytickou podjednotku, jsou známy však i dimery, trimery a dokonce i tetramery (Vignais *et al.*, 2001).

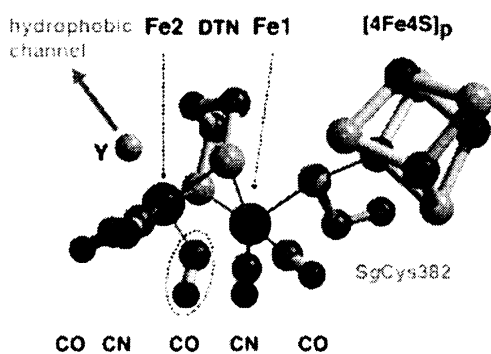
2.2.2.1 Katalytický H – cluster

Fe-hydrogenázy jsou typické přítomností vysoce konzervované domény o přibližně 320 aminokyselinách, která koordinuje základní katalytické centrum enzymu, tzv. H-cluster (hydrogen cluster) (Tosatto *et al.*, 2006).

H-cluster obsahuje šest atomů železa koordinovaných s CO a CN ligandy. Těchto 6 atomů železa je rozděleno do 2 subcenter. 4 atomy železa jsou organizovány do [4Fe 4S] centra (Razavet *et al.*, 2001 ; Tard *et al.*, 2005). Zbylé 2 železa tvoří tzv. Fe-Fe centrum enzymu, které lze přirovnat k NiFe centru NiFe hydrogenáz. Atomy železa lze od sebe rozeznat a jsou označeny podle vzdálenosti od [4Fe 4S] centra. Vzájemně jsou propojeny di(thiomethyl)aminem (DTN) (Nicolet *et al.*, 2002). Při vazbě vodíku je významnější atom Fe² (vzdálenější od [4Fe 4S] centra) (viz. obr 6).

Železo se nachází v oxidační formě Fe^I Fe^{II} nebo Fe^{III} Fe^{II}. Pro vazbu vodíku je důležité železo v oxidačním stavu Fe^I. Toto železo je označováno jako Fe² (viz. níže, obr 7) a je také nejvíce vzdálené od [4Fe4S] (Frey , 2002). Čtyři cysteinové ligandy aktivního místa pravděpodobně tvoří kanál pro vodík a proteiny (Vignais *et al.*, 2001). Aktivní místo obsahuje ligandy CO a CN koordinované na atomech železa. Tyto neproteinové ligandy stabilizují železo v jeho nízko-oxidovaném stavu a tím hrají důležitou roli při aktivaci vodíku (Tosatto *et al.*, 2006).

Obr 7: Struktura katalytického H-clusteru Fe hydrogenázy

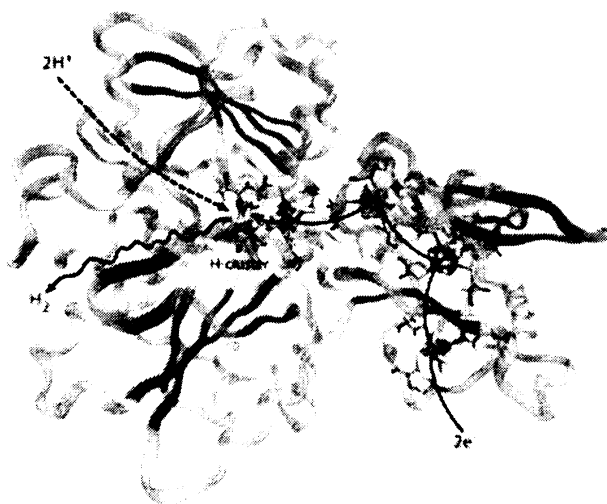


DNT = di(thiomethyl)amin, hydrofóbní kanál
(podle: Frey, 2002)

2.2.2.2 Katalytická aktivita

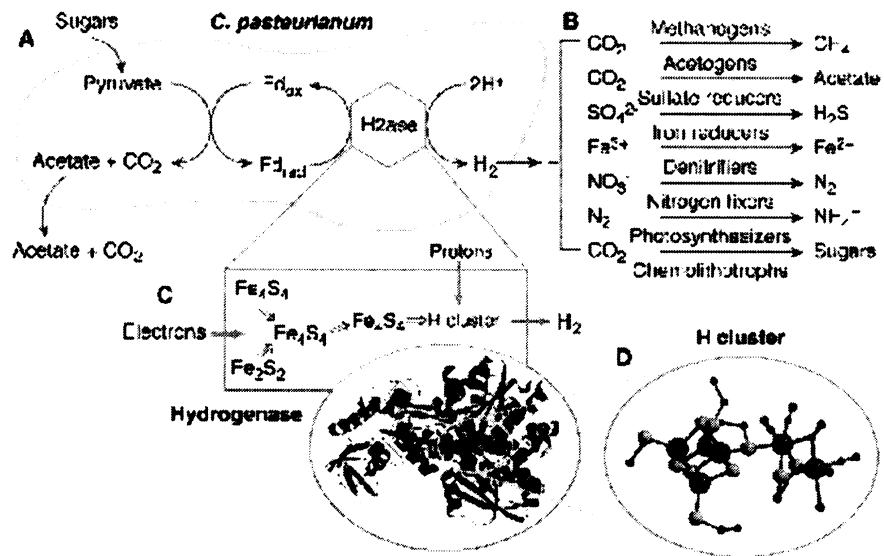
Bližší studie atomické struktury Fe-hydrogenázy byly zatím prováděny na bakteriích *Clostridium pasteurianum* a *Desulfovibrio desulfuricans* (Nicolet *et al.*, 2002), které vodík využívají jako zdroj energie. Vodík prostupuje dovnitř hydrofobním kanálem. Naváže se na Fe²⁺, kde disociuje na proton a hydrid a ty se naváží na sousední cysteiny (Frey, 2002).

Obr 8: Schématické znázornění vzniku vodíku spojením protonů a elektronů v Fe hydrogenáze.



(podle: Cohen *et al.*, 2005)

Obr 9: Účast Fe hydrogenázy na energetickém metabolismu *Clostridium pasteurianum*



(H2ases = Fe hydrogenáza, přebírá elektrony z redukováného feredoxinu Fd a předává je na protony)

(podle: Adams & Stiefel, 1998)

2.2.2.3 Doplnkové domény na N-konci enzymu

Aminoterminální část enzymu obvykle nese různý počet [4Fe 4S] nebo [2Fe2S] center, které se patrně podílí na transportu elektronů z donoru (ferredoxin) na H - cluster (Vignais *et al.*, 2001 ; Tosatto *et al.*, 2006 ; Tachezy a Doležal in press).

2.2.2.4 Přídavné podjednotky

Dimerický typ Fe hydrogenázy byl zjištěn například u *Desulfovibrio*. Přídavná podjednotka je menší, neobsahuje prostetické skupiny, ale vlastní koncovou signální sekvenci pro export enzymu do periplazmatického prostoru, kde je jeho konečná lokalizace.

Dalším příkladem mohou být příbuzné hydrogenázy – tetramerní u *D. fructosovorans* a trimerní u *Thermotoga maritima*. Ty obsahují menší podjednotku (cca 19 kDa), jejíž součástí je [2Fe2S] centrum – homolog k NuoE podjednotce

komplexu I. Pro tetramerní u *D. fructosovorans* je redoxním partnerem navíc NADP (Vignais *et al.*, 2001).

2.2.2.5 Jednobuněčné zelené řasy

Tyto organismy uvolňují vodík při luminiscenci. Díky tomu se dostávají v poslední době do popředí zájmu jako možný přírodní zdroj energie (Happe & Kaminski, 2002 ; Tosatto *et al.*, 2006). Jedná se o menší typ Fe-hydrogenázy obsahující pouze H – cluster (Vignais *et al.*, 2001).

2.2.2.6 Nejmenší Fe-hydrogenáza

Nejmenší Fe hydrogenáza byla zatím nalezena u *Enterobacter cloacea*, gram negativní, fakultativně anaerobní bakterie, která produkuje také značné množství vodíku. Tato hydrogenáza má pouze 147 aminokyselin. Tento organismus je v současné době objektem intenzivního výzkumu. Nukleotidová sekvence této nové hydrogenázy je velmi podobná ostatním známým Fe hydrogenázám, především karboxylový konec, který tradičně obsahuje aktivní místo. Hydrogenáza je monomer a skládá se ze 2 odlišných sub-domén (Tosatto *et al.*, 2006).

2.2.3 Hydrogenázy neobsahující atom kovu

Hydrogenáza, která nemá v katalytickém centru atom kovu byla zatím popsána pouze u metanogenních Archeí, poprvé roku 1990 u *Methanothermobacter marburgensis* doktorem Tauerem (Berkessel & Thauer, 1995). Jedná se o homodimer, který je kódován monocistronními geny (Vignais *et al.*, 2001 ; Berkessel, 2001). Jediná podjednotka tohoto enzymu je velká asi 40 kDa (Thauer *et al.*, 1996). V příloze je označena jako EC 1.12.98.2 5,10-methenyltetrahydromethanopterin hydrogenáza.

Katalyzuje reverzibilní redukci N⁵ , N¹⁰ - methylentetrahydromethanopterinu s vodíkem bez pomoci Fe (Ni) centra. Při této reakci následně vzniká

methylenetetrahydromethanopterin, což je intermediát metabolické cesty, kterou se tvoří methan z oxidu uhličitého a vodíku.

Působí současně s methenyltetrahydromethanopterin dehydrogenázou závislou na organickém kofaktoru F_{420} . Syntéza těchto enzymů začíná během životního cyklu organismu ve chvíli nedostatku niklu v prostředí (Vignais *et al.*, 2001).

Dnes je známá řada methanogenních bakterií, rostoucích v přítomnosti vodíku a oxidu uhličitého, obsahujících tuto hydrogenázu (Thauer *et al.*, 1996). Díky své vyšší stabilitě byla studována hydrogenáza hlavně 3 methanogenních termofilních bakterií *M. marburgensis*, *Methanococcus jannaschii* a *Methanopyrus kandleri*, které mají své teplotní optimum v 65, 85 a 98°C (Buurman *et al.*, 2000 ; Berkessel, 2001).

2.3 Evoluční původ

Většinu známých hydrogenáz nacházíme u Archeí a bakterií (Davidson *et al.*, 2002 ; Nixon *et al.*, 2003 ; Tosatto *et al.*, 2006), menší část také u Eukaryot (Bui *et al.*, 1996 ; Bui & Johnson, 1996 ; Horner *et al.*, 2000). Společnou vlastností hydrogenáz je schopnost vyrábět nebo zpracovávat vodík (Vignais *et al.*, 2001).

2.3.1 Příbuznost hydrogenáz

Rozborem sekvencí a struktur těchto enzymů bylo prokázáno, že hydrogenázy tvoří 3 fylogeneticky zcela odlišné skupiny: Ni-Fe hydrogenázy, Fe-hydrogenázy a hydrogenázy neobsahující atomy kovu.

Aktivní místa Ni-Fe hydrogenázy i Fe-hydrogenázy obsahují stejný typ ligandů (CO a CN), což by mohlo ukazovat na určitou příbuznost. Ve skutečnosti je to však pouze důkaz toho, že tyto ligandy jsou vhodné pro určitou specializovanou funkci, tedy práci s vodíkem. Oba typy enzymů se však liší způsobem skládání aktivního centra i jeho biogenezí. Jedná se pouze o příklad toho, že pokud je určitý typ ligandů nebo cesta biogeneze energeticky nebo funkčně výhodná, může vzniknout v evoluci i vícekrát nezávisle na sobě (Vignais *et al.*, 2001).

2.3.2 Monofyletická skupina NiFe hydrogenáz

Fylogenetické stromy příbuznosti známých NiFe hydrogenáz byly vytvořeny na základě analýzy sekvencí aminokyselin. Tyto analýzy určili NiFe hydrogenázy jako monofyletickou skupinu hydrogenáz. V rámci této skupiny se NiFe hydrogenázy rozdělily dále překvapivě podle funkčních skupin do 4 oddělení (viz. výše). Například NiFe hydrogenázy skupiny 2 mají společného předka, přestože jejich funkce se liší podle organismu, u kterého se vyskytují (Vignais *et al.*, 2001).

2.3.3 Skupina Fe hydrogenáz

U skupiny Fe hydrogenáz je otázka monofyletického původu složitější. Můžeme je najít jak u prokaryot, tak i u eukaryot a u jednoho organismu často najdeme i více typů Fe hydrogenáz. Ani kvartérní struktura proteinu nebo velikost katalytického centra hydrogenázy nesouvisí s fylogenetickou pozicí daného organismu.

U bakterií nacházíme jak monomerní typy Fe hydrogenáz, tak i dimery, trimetry i tetrametry. U eukaryot se vyskytují pouze monomerní Fe hydrogenázy, avšak odlišných velikostí katalytického centra i velikostí celých proteinů. Velikost proteinu je proměnná hlavně díky různému počtu přídatných [2Fe2S] domén na aminokyselinovém konci enzymu. Navíc u jednoho organismu se může nacházet i větší počet různě velkých hydrogenáz. Tak tomu je například u *Trichomonas vaginalis* – zde se nachází 4 různé typy. Jak se ukazuje, právě velikost jednotlivých Fe-hydrogenáz by mohla být vodítkem k nalezení příbuzných skupin těchto enzymů. (Vignais *et al.*, 2001 ; Nixon *et al.*, 2003).

Fylogenetické analýzy zatím ukazují na pravděpodobně monofyletický původ Fe hydrogenáz u *Entamoeba histolytica*, *Spironukleus barkhanus*, *Giardia intestinalis* (které nemají hydrogenosom a hydrogenáza je cytozolická) a *Trichomonas vaginalis* (která má hydrogenázy v hydrogenosomu). Jedná se o krátkou 50-ti kDa Fe-hydrogenázu (Lloyd *et al.*, 2002 ; Horner *et al.*, 2000 ; Nixon *et al.*, 2003).

U *Entamoeba histolytica* a *Giardia intestinalis* je zajímavé, že jejich Fe-hydrogenáza je v cytoplazmě. Přesto se u nich nacházejí organely mitosomy pravděpodobně odvozené od hydrogenosomu nebo mitochondrii (Horner *et al.*, 2000).

Na původ hydrogenosomu dosud neexistuje jednotný názor. Vodíková hypotéza (Martin & Müller, 1998) předpokládá, že hostitelská buňka vznikla z anaerobní metanogenní archebakterie, která využívala vodík jako zdroj energie. Ta pohltila fakultativně anaerobní α -proteobakterii, která vodík produkovala. Z té se stal endosymbiont, ze kterého se následně v anaerobním prostředí stal hydrogenosom a u aerobních organismů mitochondrie. Eukaryotická buňka tedy podle této teorie vznikla symbiózou 2 prokaryot, které produkce a potřeba vodíku svazovala k sobě. Pokud by tato teorie byla pravdivá, měla by každá eukaryotická buňka nést v sobě stopu po tomto spojení.

Možnou stopou po tomto evolučním spojení jsou geny kódující proteiny Narf v genomu všech dnes žijících eukaryot. Tyto Narf proteiny jsou až nápadně podobné 50kDa Fe hydrogenáze z protist *Entamoeba histolytica*, *Spironukleus barkhanus*, *Giardia intestinalis* a *Trichomonas vaginalis*. Proteiny Narf byly nalezeny dosud u všech eukaryot včetně člověka. U lidí tento protein interaguje s prelaminem A, který se účastní udržování jaderné membrány eukaryotické buňky. Aminokyselinové sekvence Narf proteinů mají řadu konzervovaných oblastí shodných s Fe hydrogenázou *Trichomonas vaginalis* a *Desulfovibrio desulfuricans*.

Tyto Narf proteiny sice neobsahují všechny důležité části Fe hydrogenáz, ale obsahují stejné uspořádání cysteinů pro koordinaci aktivního centra hydrogenázy a další struktury jako hydrofobní kanál (Barton & Worman, 1999 ; Vignais *et al.*, 2001).

2.3.4 Podobnosti mezi hydrogenázami a komplexem I dýchacího řetězce mitochondrie

Podobnosti mezi komplexem I a hydrogenázami popsal poprvé Böhm *et al.* (1990). Sekvence fylogenetické analýzy ukazují, že podjednotky komplexu I – konkrétně NuoE, NuoF, NuoI a NuoG – mají homologní protějšky v podjednotkách a doménách NiFe i Fe hydrogenáz (Albracht & de Jong, 1997).

Podjednotkám NuoE a NuoF komplexu I je nejvíce podobná Fe hydrogenáza, která má jako akceptor elektronů NAD(P) (Malki *et al.*, 1995).

Oba typy hydrogenáz i komplex I obsahují FeS domény podobného typu. Fylogenetická podobnost mezi hydrogenázami a komplexem I lze vysledovat hlavně

u redoxních kovových podjednotek, které jsou u hydrogenáz i komplexu I vhodné pro transport protonů a tvorbu membránového potenciálu. To znamená, že nejen transport elektronů, ale i další složky energetického mechanismu mohou být společné pro život v anaerobním i aerobním prostředí (Friedrich & Scheide, 2000 ; Albracht & Hedderich, 2000 ; Vignais *et al.*, 2001)

3. ZÁVĚR

Hydrogenázy jsou důležitou součástí energetického metabolismu řady anaerobních organismů (Meyer *et al.*, 1978 ; Lindmark & Miller, 1973 ; Horner *et al.*, 2000 ; Tosatto *et al.*, 2006). Při výrobě vodíku je jejich hlavním úkolem odstraňovat přebytečné elektrony na vodík. Při vázání vodíku z prostředí hydrogenázy tento plyn zase štěpí na elektrony a protony, které slouží k výrobě ATP (Vignais *et al.*, 2001 ; Pavlov *et al.*, 1999).

Většinu hydrogenáz lze rozdělit do tří základních tříd: NiFe hydrogenázy, Fe hydrogenázy a hydrogenázy neobsahující atomy kovu (Rubach *et al.*, 2005 ; Tosatto *et al.*, 2006 ; Vignais *et al.*, 2001). NiFe hydrogenázy nacházíme u bakterií a podílejí se hlavně na zpracování vodíku, který tak těmto organismům slouží jako zdroj energie (Adams *et al.*, 1980).

Fe hydrogenázy jsou hlavně u eukaryot, můžeme je ale nalézt i u řady bakterií. U eukaryot je jejich hlavní funkcí přemístování elektronů na protony a následné vylučování vodíku. U bakterií naopak vodík zpracovávají, obdobně jako NiFe hydrogenázy (Lindmark & Muller, 1973 ; Muller, 1993 ; Horner *et al.*, 2000 ; Frey, 2002 ; Tosatto *et al.*, 2006).

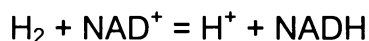
Hydrogenázy tvoří polyfyletickou skupinu enzymů, která nemá společného předka (Vignais *et al.*, 2001). Uvnitř jednotlivých skupin můžeme větší či menší podobnost nalézt. NiFe hydrogenázy mají jasně monofyletický původ, zatímco Fe hydrogenázy nikoliv (Vignais *et al.*, 2001 ; Nixon *et al.*, 2003). U nich se na základě fylogenetické analýzy ukázalo, že určitým evolučním pojítkem může být jejich proteinová velikost. Tak tomu je u 50 kDa Fe hydrogenázy *Entamoeba histolytica*, *Spironukleus barkhanus*, *Giardia intestinalis* a *Trichomonas vaginalis* (Lloyd *et al.*, 2002 ; Horner *et al.*, 2000 ; Nixon *et al.*, 2003). Pozůstatky této Fe hydrogenázy, nazývané Narf proteiny, můžeme nalézt v genomech všech dnešních eukaryot (Barton & Worman, 1999 ; Vignais *et al.*, 2001). Stejně tak řada domén hydrogenáz je homologní k podjednotkám komplexu I mitochondrie (Albracht & de Jong, 1997 ; Friedrich & Scheide, 2000 ; Albracht & Hedderich, 2000 ; Vignais *et al.*, 2001).

4. Příloha

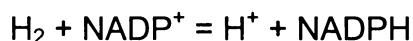
Biochemické rozdělení hydrogenáz

(podle databáze Brenda)

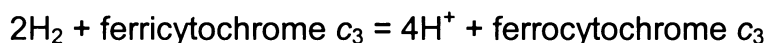
EC 1.12.1.2 hydrogen dehydrogenase (hydrogen:NAD⁺ oxidoreductase)



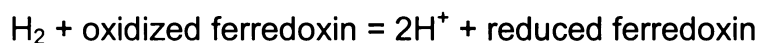
EC 1.12.1.3 hydrogen dehydrogenase (NADP) (hydrogen:NADPH⁺ oxidoreductase)



EC 1.12.2.1 cytochrome-*c*₃ hydrogenase (hydrogen:ferricytochrome-*c*₃ oxidoreductase)



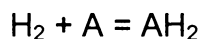
EC 1.12.7.2 ferredoxin hydrogenase (hydrogen:ferredoxin oxidoreductase)



EC 1.12.98.1 coenzyme F₄₂₀ hydrogenase (hydrogen:coenzyme F₄₂₀ oxidoreductase)



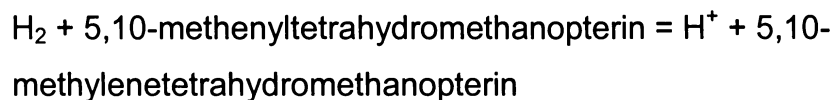
EC 1.12.99.6 hydrogenase (acceptor) (hydrogen:acceptor oxidoreductase)



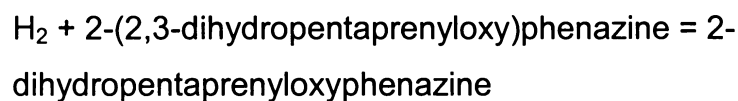
EC 1.12.5.1 hydrogen:quinone oxidoreductase



EC 1.12.98.2 5,10-methenyltetrahydromethanopterin hydrogenase (hydrogen:5,10-methenyltetrahydromethanopterin oxidoreductase)



EC 1.12.98.3 *Methanosarcina*-phenazine hydrogenase [hydrogen:2-(2,3-dihydropentaprenyloxy)phenazine oxidoreductase]



5. Použitá literatura

ADAMS, M.W., MORTENSON, L.E., & CHEN, J.S. (1980) Hydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **594**, 105-176.

ADAMS, M.W. & STIEFEL, E.I. (1998) Biological hydrogen production: not so elementary. *Science* **282**, 1842-1843.

ALBRACHT, S.P.J., MARIETTE, A., & DE JONG, P. (1997) Bovine-heart NADH:ubiquinone oxidoreductase is a monomer with 8 Fe-S clusters and 2 FMN groups. *Biochim. Biophys. Acta Bio-Energetics* **1318**, 92-106.

ALBRACHT, S.P.J. & HEDDERICH, R. (2000) Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *FEBS Lett.* **485**, 1-6.

ANDREWS, S.C., BERKS, B.C., MCCLAY, J., AMBLER, A., QUAIL, M.A., GOLBY, P., & GUEST, J.R. (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143**, 3633-3647.

BARTON, R.M. & WORMAN, H.J. (1999) Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein. *J Biol Chem* **274**, 30008-30018.

BERKESSEL, A. & THAUER, R. K. (1995) On the mechanism of catalysis by metal-free hydrogenase from methanogenic archea: enzymatic transformation without a metal. *Angew. Chem. Ins.* **34**, 2247.

BERKESSEL, A. (2001) Activation of dihydrogen without transition metals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 486–490.

BÖHM, R. *et al.* (1990) Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol. Microbiol.* **4**(2), 231-43.

BUI, E.T., BRADLEY, P.J., & JOHNSON, P.J. (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9651-9656.

BUI, E.T. & JOHNSON, P.J. (1996). Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **76**, 305-310.

BUURMAN, G., SHIMA, S. & THAUER, R. K. (2000) The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett.* **485**, 200-204

CARRASCO, C.D., BUETTNER, J.A., & GOLDEN, J.W. (1995). Programmed DNA rearrangement of a cyanobacterial hupL gene in heterocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 791-795.

CASALOT, L. & ROUSSET, M. (2001). Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends in Microbiology* **9**, 228-237.

CERKASOVOVA, A., LUKASOVA, G., CERKASOV, J., & KULDA, J. (1973). *J. Protozool.*, **20**, 537.

COHEN, J., KWISEON, K., KING, P., SEIBERT, M., & SCHULTEN, K. (2005) Finding gas diffusion pathways in proteins: Application to O₂ and H₂ transport in Cpl [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects. *Structure* **13**, 1321-1329

DAVIDSON, E.A., VAN DER, G.M., HORNER, D.S., EMBLEY, T.M., & HOWE, C.J. (2002) An [Fe] hydrogenase from the anaerobic hydrogenosome-containing fungus *Neocallimastix frontalis* L2. *Gene* **296**, 45-52.

ELSEN, S., COLBEAU, A., CHABERT, J., & VIGNAIS, P.M. (1996) The hupTUV operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* **178**, 5174-5181.

- FLORIN, L., TSOKOGLOU, A., & HAPPE, T. (2001) A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *J Biol Chem* **276**, 6125-6132.
- FOX, J.D., KERBY, R. L., ROBERTS, G. P. & LUDDEN, P. W. (1996) Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrik* and the gene encoding the large subunit of enzyme. *J. Bacteriol.* **178**, 1515-1524.
- FREY, M. (2002) Hydrogenases: Hydrogen-activating enzymes. *ChemBiochem* **3**, 153–160.
- FRIEDRICH, T. & SCHEIDE, D. (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.* **479**, 1-5.
- HAPPE, T. & KAMINSKI, A. (2002) Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **269**, 1022-1032.
- HORNER, D.S., FOSTER, P.G., & EMBLEY, T.M. (2000) Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 1695-1709.
- LINDMARK, D.G. & MULLER, M. (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem* **248**, 7724-7728.
- LLOYD, D., RALPHS, J.R., & HARRIS, J.C. (2002). *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology-Sgm* **148**, 727-733.
- MA, K., ZHOU, Z. H. & ADAMS, M. W. W. (1994) Hydrogen production from pyruvate by enzymes purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: a key role for NADP. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**, 263-266.

MALKI, S., SAIMMAIME, I., DE, L.G., ROUSSET, M., DERMOUN, Z., & BELAICH, J.P. (1995) Characterization of an operon encoding an NADP-reducing hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans*. *Journal of Bacteriology* **177**, 2628-2636.

MARTIN, W. & MÜLLER, M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37-41.

MEYER, J., KELLEY, B.C., & VIGNAIS, P.M. (1978) Effect of light nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Journal of Bacteriology* **136**, 201-208.

MOREIRA, D. & LOPEZ-GARCIA, P. (1998) Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol* **47**, 517-530.

MULLER, M. (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* **139**, 2879-2889.

NICOLET, Y., CAVAZZA, C., & FONTECILLA-CAMPS, J.C. (2002) Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *J Inorg Biochem* **91**, 1-8.

NIXON, J.E.J., FILED, J., MCARTHUR, A.G., SOGIN, M.L., YARLETT, N., LOFTUS, B.J., & SAMUELSON, J. (2003) Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Activity of the recombinant entamoebic enzyme and evidence for lateral gene transfer. *Biological Bulletin* **204**, 1-9.

PAVLOV, M. *et al.* (1999) New aspects of H₂ activation by nickel – iron hydrogenase. *International journal of Quantum Chemistry* **73**, 197-207.

PETERS, J.W., LANZILOTTA, W.N., LEMON, B.J. & SEEFELDT, L.C. (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**, 1853–1858.

RAZAVET, M. *et al.* (2003) All-iron hydrogenase: synthesis, structure and properties of {2Fe3S}-assemblies related to the di-iron sub-site of the H-cluster. *Dalton Trans.* 586–595

RUBACH, J.K., BRAZZOLOTTO, X., GAILLARD, J., & FONTECAVE, M. (2005) Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from *Thermatoga maritima*. *FEBS Lett* **579**, 5055-5060.

STEPHENSON, M. & STICKLAND, L. H. (1931) Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J.* **25**, 205–214.

SUTAK, R., DOLEZAL, P., FIUMERA, H.L., HRDY, I., DANCIS, A., GADILLO-CORREA, M., JOHNSON, P.J., MULLER, M., & TACHEZY, J. (2004) Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10368-10373.

TARD, C., LIU, X., IBRAHIM, S.K., BRUSCHI, M., DE, G.L., DAVIES, S.C., YANG, X., WANG, L.S., SAWERS, G., & PICKETT, C.J. (2005) Synthesis of the H-cluster framework of iron-only hydrogenase. *Nature* **433**, 610-613.

THAUER, R.K., KLEIN, A.R. & HARTMANN, G.C. (1996) Reactions with molecular hydrogen in microorganisms. Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. *Chem. Rev.* **96**, 3031–3042.

TOSATTO, S.C., GIACOMETTI, G.M., VALLE, G., & COSTANTINI, P. (2006) Functional insights from the structural modelling of a small Fe-hydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 277-283.

URBIG T., SCHULZ R. & SENGER H. (1993) Inactivation and reactivation of the hydrogenases of the green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z. Naturforsch.* **48c**, 41-45.

VAN BRUGGEN, J. J. A., STUMM, C. K. & VOGELS, G. D. (1983) Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Arch. Microbiol.* **136**, 89–95.

VIGNAIS, P.M., BILLOUD, B., & MEYER, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *Fems Microbiology Reviews* **25**, 455-501.

WU, L.F. & MANDRAND, M.A. (1993) Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol Rev* **10**, 243-269.

WÜNSCHERS, R., SENGER, H. & SCHULZ, R. (1998) Photohydrogen production - Hydrogenases in the green alga *Scenedesmus obliquus*. In: "Photosynthesis: Mechanisms and Effects". *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht* **Vol. III**, 1951-1954.

YARLETT, N., ORPIN, C.G., MUNN, E.A., YARLETT, N.C., & GREENWOOD, C.A. (1986) Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J* **236**, 729-739.

<http://metalo.scripps.edu/PROMISE/>