

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Alena Košťálová

Funkce a struktura hydrogenáz a jejich rozšíření v organismech

Function and structure of hydrogenases and their occurrence in organisms

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D.

Praha, 2013

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Ivanovi Hrdému, Ph.D. za cenné rady, motivaci a vstřícnost při psaní této práce, celému týmu protozoologické laboratoře za přátelskou a podnětnou atmosféru a v neposlední řadě také svému příteli a celé rodině za psychickou podporu a zázemí.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 5. 2013

Podpis

ABSTRAKT

Hydrogenázy jsou mikrobiální enzymy katalyzující reverzibilní oxidaci vodíku. Většina těchto enzymů se nachází v prokaryotech, ale několik jich je přítomno i v eukaryotech. Jde o metaloproteiny, které jsou na základě stavby aktivního místa děleny do tří tříd na [NiFe]-, [FeFe]- a [Fe]-hydrogenázy. [NiFe]-hydrogenázy jsou heterodimerní proteiny, jejichž aktivní místo se nachází ve velké podjednotce. [FeFe]-hydrogenázy jsou většinou monomerní a jejich aktivní místo se nazývá H-klastr. Hydrogenázy mají často další domény, které obsahují redoxní centra, převážně železo-sírné klastry. Většina přídatných domén hydrogenáz je homologní s jinými redoxními komplexy, např. s komplexem I respiračního řetězce. Maturace hydrogenáz je komplexní proces, který zahrnuje aktivitu několika proteinů, z nichž některé již byly částečně charakterizovány. Přesvědčivé důkazy nasvědčují tomu, že [NiFe]- a [FeFe]-hydrogenázy jsou fylogeneticky odlišné třídy proteinů. Práce poukazuje na rozdíly mezi hydrogenázami včetně funkce, struktury, maturace a rozšíření, a také poukazuje na jejich podobnost s jinými enzymy.

Klíčová slova: hydrogenáza, vodík, Fe-S klastr, H-klastr, maturace, komplex I

ABSTRACT

Hydrogenases are microbial enzymes catalyzing reversible oxidation of molecular hydrogen. These enzymes are mostly found in prokaryotes, but a few of them are present in eukaryotes as well. Hydrogenases are metalloproteins which are classified into three classes, [NiFe]-, [FeFe]- and [Fe]-hydrogenases, based on the composition of the active site. [NiFe]-hydrogenases are heterodimeric proteins with the active site localized in the large subunit. [FeFe]-hydrogenases are mostly monomeric and their active site is called H-cluster. Hydrogenases often possess additional domains that contain redox centers, mostly iron-sulfur clusters. Most of the accessory domains of hydrogenases are homologous to other redox complexes, e. g. Complex I of respiratory chain. Maturation of hydrogenases is a complex process involving the activity of several proteins, some of which have been already partially characterized. Compelling evidence indicates that [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases are phylogenetically distinct classes of proteins. This work deals with the differences among hydrogenases including their function, structure, maturation and distribution, and also mentions their similarities with other enzymes.

Key words: hydrogenase, hydrogen, Fe-S cluster, H-cluster, maturation, complex I

OBSAH

1. Úvod	6
2. Klasifikace hydrogenáz	7
3. Fyziologická funkce hydrogenáz	8
3.1. [NiFe]-hydrogenázy	8
3.1.1. [NiFe]-hydrogenázy pohlcující H ₂	9
3.1.2. Cyanobakteriální hydrogenázy pohlcující H ₂ a senzorové hydrogenázy.....	9
3.1.3. Obousměrné heteromultimerní cytoplazmatické [NiFe]-hydrogenázy	10
3.1.4. Membránové [NiFe]-hydrogenázy uvolňující H ₂ a přeměňující energii.....	11
3.2. [FeFe]-hydrogenázy.....	12
3.2.1. Eukaryotické [FeFe]-hydrogenázy.....	12
3.2.2. Prokaryotické [FeFe]-hydrogenázy	13
3.3. [Fe]-hydrogenázy	13
4. Struktura hydrogenáz	14
4.1. [NiFe]-hydrogenázy	14
4.1.1. Standardní [NiFe]-hydrogenázy	14
4.1.2. [NiFeSe]-hydrogenázy.....	16
4.1.3. [NiFe]-hydrogenázy odolné vůči kyslíku.....	16
4.2. [FeFe]-hydrogenázy.....	17
4.2.1. Bifurkační [FeFe]-hydrogenáza.....	19
4.3. [Fe]-hydrogenázy	20
5. Maturace hydrogenáz	22
5.1. Maturace [NiFe]-hydrogenáz.....	22
5.1.1. Syntéza CN- ligandu.....	23
5.1.2. Syntéza CO ligandu	23
5.1.3. Inzerce niklu.....	23
5.1.4. Endoproteolytické štěpení	24
5.2. Maturace [FeFe]-hydrogenáz	25
5.2.1. HydF protein.....	26
5.2.2. HydE protein	26
5.2.3. HydG protein.....	27
5.3. Syntéza Fe-S klastrů.....	29
6. Rozšíření hydrogenáz mezi organismy	30

7. Fylogenetické vztahy hydrogenáz s dalšími proteiny	31
7.1. Homologie mezi hydrogenázami a komplexem I.....	31
7.2. Homologie mezi hydrogenázami a Narf proteiny.....	33
8. Závěr	34
9. Seznam použité literatury	35

1. ÚVOD

Hydrogenáza byla poprvé popsána v roce 1931 jako enzym, který je schopný katalyzovat aktivaci H_2 využitelného pro redukci elektronových akceptorů, jako je např. O_2 , nitrát, fumarát, nebo sulfát (Stephenson & Stickland, 1931). Nejenže je široká škála dnešních mikroorganismů schopna díky hydrogenázám využívat molekulární vodík jako zdroj energie, ale některé mikroorganismy jsou také obdařené schopností vodík produkovat. Obecně se dá říct, že hydrogenázy katalyzují vzájemnou přeměnu molekulárního vodíku s protony a elektrony podle reakce: $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$. Ačkoliv většina známých hydrogenáz může tuto reakci *in vitro* katalyzovat v obou směrech, *in vivo* hydrogenázy obvykle katalyzují buď spotřebu, nebo produkci H_2 , v závislosti na potřebách daného organismu. Kromě toho hydrogenázy také dovedou katalyzovat izotopickou výměnu mezi molekulou vodíku a vodou, a přeměnu mezi para-vodíkem a orto-vodíkem (Krasna & Rittenberg, 1954).

Naprostá většina hydrogenáz jsou metaloenzymy, jež disponují jednak klasickými železo-sirnými klastry, jednak aktivními místy, která obsahují atom niklu a železa, popř. dva atomy železa. Tato aktivní místa jsou pro hydrogenázy charakteristická. Většina hydrogenáz byla nalezena u mikroorganismů patřících k doménám Bacteria a Archaea, nicméně také u eukaryot je jich několik přítomno.

Cílem této práce je podat ucelené informace o rozmanitých fyziologických funkcích hydrogenáz a jejich roli v metabolických dějích různých organismů, shrnout dosavadní znalosti o struktuře a maturaci jednotlivých skupin hydrogenáz, nastínit možné evoluční vztahy hydrogenáz s dalšími enzymy, a v neposlední řadě také přiblížit rozšíření hydrogenáz mezi žijícími organismy.

2. KLASIFIKACE HYDROGENÁZ

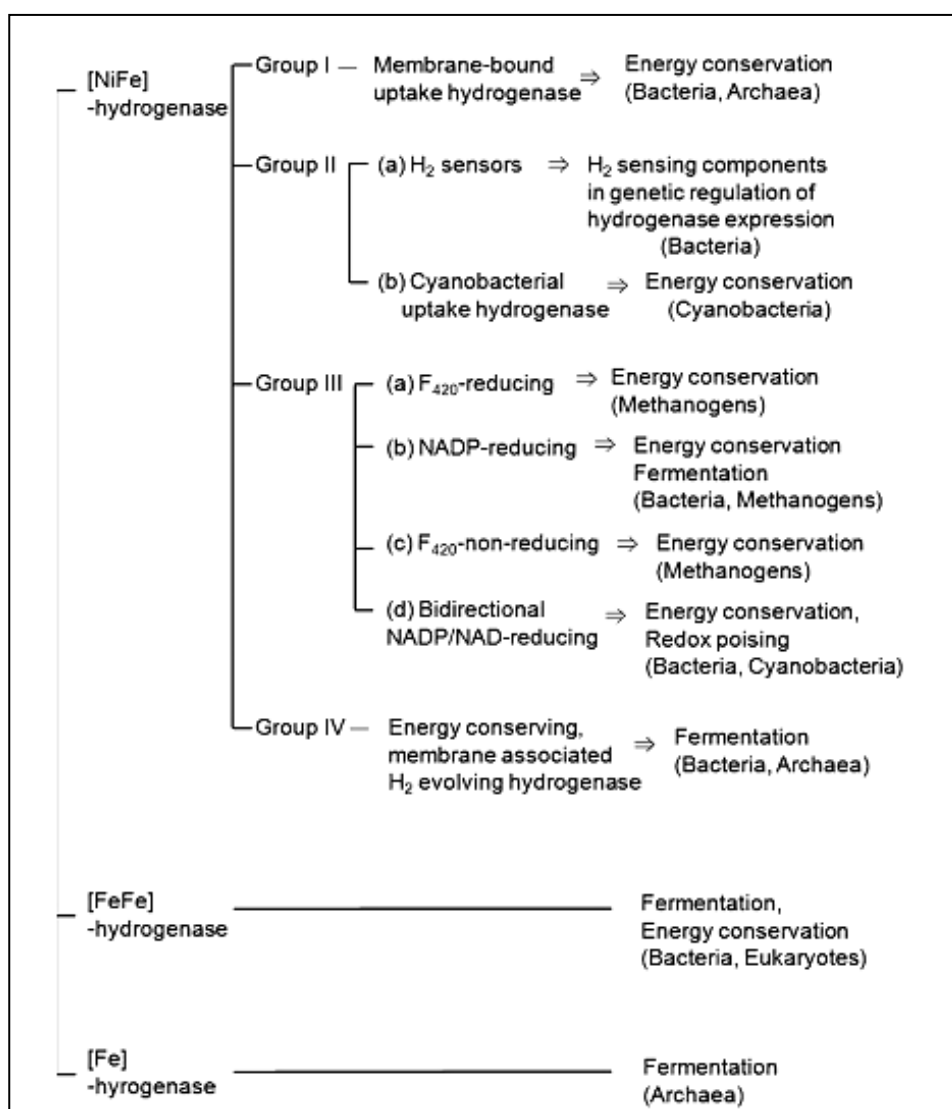
Hydrogenázy jsou klíčové enzymy podílející se na metabolismu vodíku, konkrétně katalyzují jednoduchou chemickou reverzibilní reakci: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$. Podle toho, kterým směrem reakce probíhá, mluvíme buď o hydrogenázách pohlcujících H_2 (H_2 -uptake hydrogenases), nebo o hydrogenázách uvolňujících H_2 (H_2 -evolving hydrogenases). Hydrogenázy pohlcující H_2 za přítomnosti akceptoru elektronu vodík spotřebovávají (oxidují), kdežto hydrogenázy uvolňující H_2 vodík naopak produkují, a to v přítomnosti nízkoredoxpotenciálového donoru elektronů s využitím protonů vody jako akceptoru těchto elektronů. Hydrogenázy, které katalyzují reakci oběma směry, se nazývají obousměrné (bidirectional) hydrogenázy (Vignais & Billoud, 2007).

Nejdříve se uplatňovala klasifikace hydrogenáz na základě využívaných specifických elektronových přenašečů (donorů a akceptorů). Mezi dodnes objevenými přenašeči elektronů figurují zejména ferredoxin, NAD, cytochromy a koenzym F_{420} . Hydrogenázy lze také rozřadit na základě struktury aktivního místa. Dvě hlavní třídy zahrnující téměř všechny známé hydrogenázy tvoří [NiFe]- a [FeFe]-hydrogenázy. [NiFe]-hydrogenázy mají ve svém aktivním místě atomy niklu a železa, [FeFe]-hydrogenázy obsahují místo niklu druhý atom železa. Tyto dvě skupiny hydrogenáz se kromě binukleárních center v aktivním místě vyznačují také tím, že obsahují železo-sírné klastry. Poslední, zcela se vymykající třídu hydrogenáz, tvoří tzv. Fe-S klastrů prosté (iron-sulfur-cluster-free) hydrogenázy, též [Fe]-hydrogenázy, které se vyznačují mononukleárním centrem s atomem železa v aktivním místě a absencí železo-sírných klastrů. [Fe]-hydrogenáza je zastoupena pouze enzymem H_2 -tvořící metylentetrahydrometanopterin dehydrogenázou (Hmd) nalezenou v některých metanogenních organismech (Vignais & Billoud, 2007; Yagi & Higuchi, 2013).

Mezi typem aktivního místa a specifickým elektronovým přenašečem neexistuje žádná korelace. V dalších kapitolách budou tedy hydrogenázy rozdělovány pouze na základě rozdílnosti struktury aktivního místa, nikoli přenašeče elektronů.

3. FYZIOLOGICKÁ FUNKCE HYDROGENÁZ

Ačkoli hydrogenázy katalyzují zcela jednoduchou chemickou reakci, podílejí se na mnoha rozmanitých metabolických dějích, a tak zastávají velmi různorodé fyziologické funkce. Funkce hydrogenázy často souvisí s její buněčnou lokalizací, např. produkce vodíku se často děje v cytosolu, kdežto spotřeba vodíku je spíše lokalizovaná v periplasmickém prostoru či v membráně. [NiFe]-hydrogenázy se všeobecně spíše podílejí na spotřebě vodíku, zatímco [FeFe]-hydrogenázy jsou obvykle zapojeny do jeho produkce (Vignais et al., 2001).



Obr. 1: Klasifikace hydrogenáz na základě jejich sekvence a funkce (převzato z Kim & Kim, 2011).

3.1. [NiFe]-hydrogenázy

Porovnání sekvencí malé a velké podjednotky známých [NiFe]-hydrogenáz vedlo k rozdělení těchto hydrogenáz do čtyř skupin, které jsou v souladu s jejich buněčnými

funkcemi (obr. 1). Jelikož [NiFe]-hydrogenáz existuje nepřeborné množství, jsou u každé skupiny popsány jen některé hydrogenázy vybraných charakteristických zástupců.

3.1.1. [NiFe]-hydrogenázy pohlcující H₂

První skupinu [NiFe]-hydrogenáz tvoří tzv. respirační hydrogenázy, které buňce umožňují využívat H₂ jako zdroj energie. Oxidace H₂ je spojena s redukcí elektronových akceptorů, jako NO₃⁻, SO₄²⁻, fumarát, nebo CO₂ (anaerobní respirace), nebo s redukcí O₂ (aerobní respirace). Energie je pak získávána ve formě protonmotivní síly (Vignais & Colbeau, 2004).

Anaerobní respirace je nejrozsáhleji studována u ϵ -proteobakterie *Wolinella succinogenes*. *W. succinogenes* využívá při oxidativní fosforylaci jako koncový akceptor elektronů fumarát, a jako donor elektronů H₂ nebo formiát. Redukce fumarátu („fumarátová respirace“) je katalyzovaná elektron transportním řetězcem vnitřní bakteriální membrány, který se skládá z fumarát reduktázy, menachinonu (MK) a z jednoho ze dvou membránových enzymů, hydrogenázy nebo formiát dehydrogenázy. Hydrogenáza sestává z jedné hydrofobní a dvou hydrofilních podjednotek. Katalytická podjednotka hydrogenázy je vystavena do periplasmatického prostoru. Hydrofobní podjednotku tvoří cytochrom b, který ukotvuje enzym v membráně a redukuje membránový MK. Redukcí MK je přes vnitřní bakteriální membránu vytvářen elektrochemický protonový gradient. Elektrony dále putují z MK na fumarát reduktázu, která redukuje fumarát na sukcinát (Kröger et al., 2002).

Podobná membránová respirační hydrogenáza byla identifikována také u archeí, konkrétně u metylotrofního metanogena *Methanosarcina mazei* Gö1. Hydrofobní podjednotku F₄₂₀-neredukující hydrogenázy *M. mazei* také tvoří cytochrom b, který předává elektrony přes metanofenazin na heterosulfid reduktázu. Metanofenazin plní stejnou úlohu jako menachinon *W. succinogenes*. Heterosulfid reduktáza redukuje koenzym M 7-merkaptiheptanoyltreoninfosfát heterosulfid (CoM-S-S-CoB) na koenzym M (CoM-SH) a koenzym B (CoB-SH), který slouží jako redukční činidlo při vzniku metanu z metylkoenzymu M (metyl-S-CoM). Oba enzymy tvoří elektron transportní systém nazývaný H₂:heterosulfid oxidoreduktáza (Ide et al., 1999).

3.1.2. Cyanobakteriální hydrogenázy pohlcující H₂ a sensorové hydrogenázy

Druhá skupina [NiFe]-hydrogenáz zahrnuje sinicové hydrogenázy pohlcující H₂ a hydrogenázy sloužící k detekci H₂. Tato skupina [NiFe]-hydrogenáz postrádá N-koncovou signální sekvenci, jež definuje konečnou lokalizaci proteinu v buňce, místo exportu do

dalších buněčných kompartmentů tedy tyto hydrogenázy zůstávají v cytoplazmě (Vignais & Colbeau, 2004).

Sinicové hydrogenázy se nazývají HupSL a byly nalezeny ve všech dosud popsaných sinicích fixujících dusík. Tyto hydrogenázy katalyzují spotřebu H_2 , který je zároveň s amoniakem vzniklým redukcí N_2 produkovan enzymem nitrogenázou. Vzhledem k absenci N-koncového signálního peptidu se předpokládá, že se enzym nachází na cytoplazmatické straně buď cytoplazmatické, nebo thylakoidní membrány. Přesná buněčná lokalizace zůstává nejasná. Mezi fixací N_2 a aktivitou hydrogenázy existuje silná korelace, činnost hydrogenázy je tedy vyvolána za podmínek, kdy je N_2 buňkou fixován (Tamagnini et al., 2002).

Rodina senzorových hydrogenáz schopných detekovat H_2 představuje zvláštní podskupinu [NiFe]-hydrogenáz označovanou jako regulační hydrogenázy. Tato hydrogenáza byla popsána mj. u β -proteobakterie *Ralstonia eutropha* a nese název HoxBC. Jedná se o cytoplazmatické heterodimerní enzymy, které narozdíl od ostatních hydrogenáz nezajišťují buňce přísun energie. Úlohou regulačních hydrogenáz je zjištění přítomnosti H_2 v prostředí a následné spuštění kaskády buněčných reakcí řídících syntézu respiračních hydrogenáz, podílejí se tedy na regulaci genové exprese. Správná funkce těchto hydrogenáz je přísně závislá na dostupnosti niklu, který je pro detekci H_2 nezbytný (Kleinhues et al., 2000).

3.1.3. Obousměrné heteromultimerní cytoplazmatické [NiFe]-hydrogenázy

Třetí skupinu tvoří obousměrné heteromultimerní cytoplazmatické [NiFe]-hydrogenázy vyznačující se dimerní hydrogenázovou podjednotkou spojenou s dalšími podjednotkami, které jsou schopné vázat solubilní kofaktory, jako jsou F_{420} , NAD, nebo NADP. Tyto hydrogenázy se nazývají obousměrné, protože fungují reverzibilně, tudíž mohou za anaerobních podmínek s využitím protonů vody jako elektronových akceptorů dané kofaktory reoxidovat (Vignais & Colbeau, 2004).

Mnoho nositelů této skupiny hydrogenáz patří mezi Archaea. Jedním z nich je také hypertermofil *Pyrococcus furiosus*, jehož heterotetramerní bifunkční cytoplazmatická hydrogenáza je schopná katalyzovat jak produkci H_2 , tak redukcí síry a polysulfidů na H_2S . Jako donor elektronů pro redukcí S^0 slouží NADPH i H_2 . Enzym dává raději přednost produkci sulfidu před produkcí H_2 , pokud tedy S^0 není přítomna, slouží jako akceptory elektronů z NADPH protony a hydrogenáza produkuje H_2 . Díky schopnosti redukovat S^0 se také někdy nazývá sulfhydrogenáza (Ma et al., 2000).

Obousměrné hydrogenázy interagující s NAD(P) lze také najít mezi bakteriemi a sinicemi. Jednou z nich je sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803, jejíž hydrogenáza se uplatňuje během fotosyntézy jako elektronová pumpa. Tato obousměrná hydrogenáza je lokalizovaná na thylakoidní membráně a její aktivita je regulovaná souběžně s fotosyntézou. Během světelné fáze fotosyntézy hydrogenáza odvádí vznikající nízkopotenciální elektrony, čímž zabraňuje zpomalení elektronového transportu a umožňuje adaptaci na proměnlivou intenzitu světla (Appel et al., 2000).

3.1.4. Membránové [NiFe]-hydrogenázy uvolňující H₂ a přeměňující energii

Čtvrtá skupina zahrnuje membránové [NiFe]-hydrogenázy schopné přeměny energie, které se skládají z šesti či více podjednotek a redukují protony vody, aby se zbavily nadměrného množství redukčních ekvivalentů vznikajících oxidací C₁ organických sloučenin s nízkým redoxním potenciálem, jako jsou CO nebo formiát (Vignais & Colbeau, 2004).

Jedním ze členů této skupiny je kupř. hydrogenáza indukovaná CO z fotosyntetické bakterie *Rhodospirillum rubrum*. Přítomnost CO indukuje expresi několika proteinů *R. rubrum*, včetně CO-dehydrogenázy (CODH) a hydrogenázy odolné vůči CO (CooLH). Tyto enzymy společně katalyzují přeměnu CO na CO₂ podle rovnice: $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$, přičemž CODH oxiduje CO na CO₂ za vzniku dvou redukčních ekvivalentů, které jsou poté spotřebovány hydrogenázou redukcí dvou protonů na H₂. Tento systém umožňuje *R. rubrum* využívat CO jako zdroj energie při růstu ve tmě. CooLH komplex je pevně ukotven v membráně a mohl by mít schopnost přeměňovat energii, třeba skrze mechanismus translokace protonů (Fox et al., 1996).

Většina hydrogenáz spadajících do této skupiny byla nalezena u archeí, např. u metanogena *Methanosarcina barkeri* (Ech). Ech hydrogenáza zastává v metabolismu *M. barkeri* několik důležitých funkcí, a to díky schopnosti katalyzovat reverzibilní redukci ferredoxinu vodíkem. Při metanogenezi využívající jako substrát aceton katalyzuje Ech hydrogenáza tvorbu H₂ z redukovaného ferredoxinu, který vznikl oxidací karbonylové skupiny acetátu na CO₂. Tento enzym je také nezbytný pro první krok klasické metanogeneze, kdy metan vzniká z CO₂ a H₂. Ech hydrogenáza nejdříve katalyzuje redukci nízkoredoxpotenciálního ferredoxinu vodíkem, redukovaný ferredoxin poté slouží jako elektronový donor pro redukci CO₂ na formylmetanofuran. Kromě metanogeneze se Ech hydrogenáza uplatňuje také při biosyntéze pyruvátu vyžadující elektrony dodávané redukovaným ferredoxinem. Energeticky nevýhodná redukce ferredoxinu vodíkem je s největší pravděpodobností poháněná translokací protonů přes buněčnou membránu. Ech hydrogenáza tedy za určitých

růstových podmínkách funguje jako enzym přeměňující energii, za jiných podmínek spojuje energeticky nevýhodné reakce s elektronovým transportem (Meuer et al., 2002).

3.2. [FeFe]-hydrogenázy

[FeFe]-hydrogenázy se vyskytují ve velmi různorodých organismech obdařených širokým spektrem metabolických schopností. V souladu s jejich výskytem jsou [FeFe]-hydrogenázy s ohledem na donory a akceptory elektronů velmi všestranné. Tyto hydrogenázy se navzájem značně liší ve velikosti a počtu přídatných domén, nicméně se zdá, že tato skutečnost nijak nesouvisí s výběrem redoxních partnerů těchto enzymů (Vignais et al., 2001). Dále budou popsány hydrogenázy pouze některých vybraných zástupců.

3.2.1. Eukaryotické [FeFe]-hydrogenázy

[FeFe]-hydrogenázy byly objeveny u zástupců některých skupin prvoků, zelených řas a několika anaerobních hub. Dobře prostudovaná je mj. hydrogenáza jednobuněčné zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*, jež je lokalizována ve stromatu chloroplastů. Syntéza hydrogenázy je indukována adaptací buněk na anaerobní prostředí, ve kterém přecházejí z oxidativního na fermentativní metabolismus. [FeFe]-hydrogenázy zelených řas za anaerobních podmínek zprostředkovávají světlem poháněnou produkci H_2 , za fotosyntetických podmínek však nikoliv. Elektrony potřebné pro produkci H_2 jsou do fotosyntetického elektronového transportního řetězce dodávány přes plastochinon oxidací redukčních ekvivalentů vzniklých při glykolýze či citrátovém cyklu. Přirozeným elektronovým donorem *C. reinhardtii* je ferredoxin (PetF), který přenáší elektrony z fotosystému I přímo na hydrogenázu, která uvolňuje H_2 . Za anaerobních podmínek je metabolismus H_2 jedinou cestou, jak může řasa vytvořit dostatek ATP pro přežití těchto stresových podmínek (Happe & Kaminski, 2002).

Mezi prvoky lze hydrogenázy nalézt u parabasalií, např. u *Trichomonas vaginalis*, jejíž hydrogenázu můžeme najít v hydrogenozomech. Tato hydrogenáza se podílí na energetickém metabolismu hydrogenozomu a jako zdroj elektronů využívá pyruvát, který vzniká při glykolýze v cytosolu. Pyruvát je v hydrogenozomu pomocí pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy dekarboxylován na acetyl-CoA a CO_2 . Elektrony uvolněné z pyruvátu jsou přeneseny na elektronový přenašeč ferredoxin. Redukovaný ferredoxin je reoxidován předáním elektronů hydrogenáze, která redukuje protony za vzniku H_2 . Jako zdroj elektronů může být též využíván malát, který je NAD-dependentní malát dehydrogenázou (dekarboxylující) dekarboxylován na pyruvát a CO_2 . NADH vznikající touto reakcí je poté reoxidováno enzymem NAD:ferredoxin oxidoreduktázou, která opět přenáší elektrony přes

ferredoxin na hydrogenázu produkující H_2 . Produkce H_2 je inhibována v přítomnosti metronidazolu, léku proti anaerobním mikrobům, který přednostně vychytává elektrony přenášené ferredoxinem (Hrdý et al., 2008).

3.2.2. Prokaryotické [FeFe]-hydrogenázy

Mezi anaerobními prokaryoty nalezneme [FeFe]-hydrogenázy u klostridií a reducentů sulfátu. Za zmínku stojí např. heterotrimerní cytoplazmatická hydrogenáza hypertermofilní bakterie *Thermotoga maritima*, která byla označena jako bifurkační hydrogenáza. Tato hydrogenáza vyžaduje pro katalýzu produkce H_2 přítomnost elektronových přenašečů NADH a redukováného ferredoxinu, jež jsou generovány při glykolýze. Aby mohl enzym produkovat H_2 , musí oxidovat oba elektronové přenašeče zároveň v poměru 1:1, endergonická redukce protonů pomocí NADH je tedy spřažena s exergonickou redukcí protonů pomocí redukováného ferredoxinu za vzniku čtyř molekul H_2 na jednu rozštěpenou glukózu (Schut & Adams, 2009).

Přestože [FeFe]-hydrogenázy jsou spojovány především s uvolňováním H_2 , periplazmatická [FeFe]-hydrogenáza proteobakterie *Desulfovibrio vulgaris* funguje jako hydrogenáza pohlcující H_2 . Společně s laktátem slouží H_2 jako donor elektronů pro redukcí sulfátu. Hydrogenáza *D. vulgaris* tedy spotřebovává H_2 , který může být produkován jinou hydrogenázou tohoto organismu. Kandidátem pro tuto funkci je homolog Ech-hydrogenázy *M. barkeri* (viz kapitola 3.1.4.), který se zdá být přítomen v genomu *D. vulgaris* (Pohorelic et al., 2002).

3.3. [Fe]-hydrogenázy

[Fe]-hydrogenázy byly objevené u některých metanogenních archeí, hojně studovaná je tato hydrogenázy např. u *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Jedná se o enzym H_2 -tvořící metylentetrahydrometanopterin dehydrogenázu (Hmd), která využívá H_2 ke katalýze reverzibilní redukce N^5,N^{10} -metenyltetrahydrometanopterinu ($CH\equiv H_4MPT^+$) na N^5,N^{10} -methyltetrahydrometanopterin ($CH_2=H_4MPT$). Hmd se vyskytuje společně s F_{420} -dependentní metylentetrahydrometanopterin dehydrogenázou (Mtd), která ke katalýze reverzibilní dehydrogenace $CH_2=H_4MPT$ na $CH\equiv H_4MPT^+$ využívá jako elektronový akceptor koenzym F_{420} . Oba enzymy jsou v buňce indukovány za podmínek s nedostatkem niklu. V metanogenezi hraje důležitou roli reakce, při které je koenzym F_{420} redukován pomocí H_2 . Tato reakce je za normálních podmínek katalyzovaná F_{420} -redukující [NiFe]-hydrogenázou, která při nedostatku niklu nemůže být syntetizována, a proto její funkci zastupují enzymy Hmd a Mtd (Afting et al., 1998).

4. STRUKTURA HYDROGENÁZ

Mezi hydrogenázy spadají tři fylogeneticky rozdílné třídy: [NiFe]-, [FeFe]- a [Fe]-hydrogenázy, z nichž každá je definovaná rozdílným funkčním jádrem, které se skládá z podjednotek či domén tvořících katalytické místo. Toto funkční jádro je nezbytné pro strukturu a funkci hydrogenázy a je v rámci dané skupiny konzervováno, proto slouží jako osvědčené kritérium klasifikace (Vignais & Billoud, 2007).

4.1. [NiFe]-hydrogenázy

[NiFe]-hydrogenázy jsou nejpočetnějšími a nejstudovanějšími hydrogenázami. Kromě standardních [NiFe]-hydrogenáz, popsanych u *Desulfovibrio gigas* (Volbeda et al., 1995) a *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (Higuchi et al., 1997), jsou rozeznávány také [NiFeSe]-hydrogenázy a [NiFe]-hydrogenázy tolerantní ke kyslíku.

4.1.1. Standardní [NiFe]-hydrogenázy

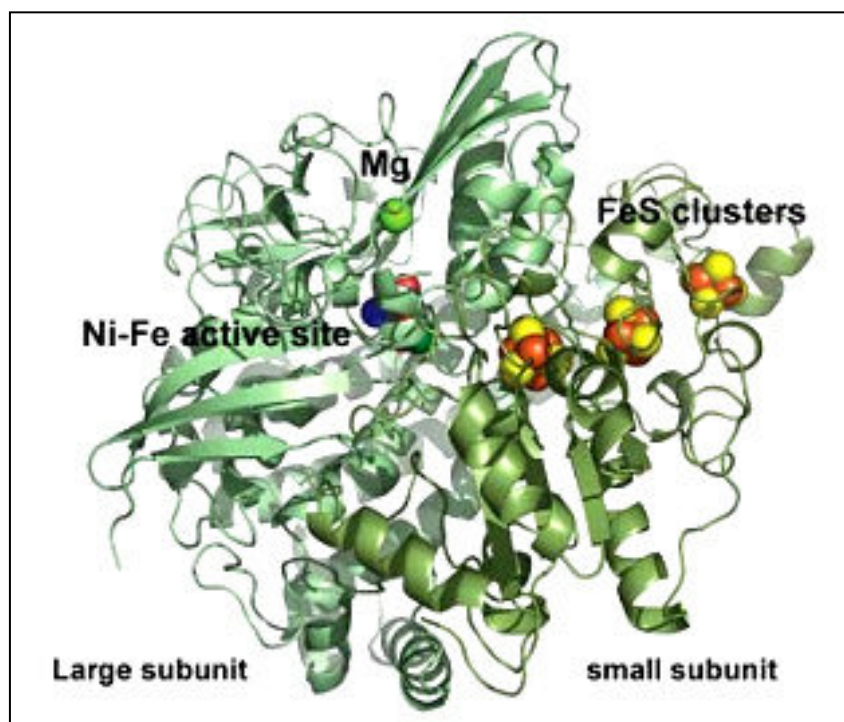
Krystalová struktura [NiFe]-hydrogenáz z bakterií rodu *Desulfovibrio* odhalila uspořádání aktivního místa enzymu. Protein se skládá z velké α -podjednotky o velikosti cca 60 kDa a malé β -podjednotky o velikosti cca 30 kDa (Yagi et al., 1976). Tyto podjednotky tvoří globulární heterodimer a navzájem spolu interagují. Velká podjednotka obsahuje bimetalické aktivní místo, zatímco malá podjednotka váže tři Fe-S klastry (Volbeda et al., 1995). Studovány byly struktury hydrogenáz *D. gigas* a *D. vulgaris* Miyazaki, jež jsou si velmi podobné, nicméně drobné rozdíly mezi nimi najdeme, a to zejména v aktivním místě.

Aktivní místo je zanořeno hluboko ve velké podjednotce a obsahuje dva ionty kovu, nikl a železo, které jsou v proteinu koordinovány čtyřmi sirnými atomy cysteinových zbytků. Kromě těchto proteinových ligandů je ion železa ještě koordinován třemi neproteinovými ligandy, které byly identifikovány jako dvouatomové molekuly (Volbeda et al., 1996). Tyto tři ligandy byly stanoveny jako dva CN^- a jeden CO u *D. gigas* (De Lacey et al., 1997), zatímco u *D. vulgaris* Miyazaki byly určeny jako CN, CO a SO (Higuchi et al., 1997). Mezi niklem a železem byla zjištěna přítomnost dalšího ligandu, tzv. přemosťujícího (bridging) ligandu. Pro enzym *D. gigas* byl jako bridging ligand stanoven kyslíkový radikál (Volbeda et al., 1996). Ligand enzymu *D. vulgaris* Miyazaki byl nejdříve určen jako sirný radikál (Higuchi et al., 1997), posléze byl však jako ligand stanoven v různých formách enzymu hydroperoxid a kyslíkový radikál (Ogata et al., 2005). Pro *Desulfovibrio fructosovorans* byl v různých formách enzymu jako ligand stanoven hydroperoxid a hydroxidový ion (Volbeda et al., 2005). Kromě bimetalického NiFe centra bylo ve velké podjednotce objeveno

další metalické centrum, Mg^{2+} centrum. Jedná se monoatomární centrum nacházející se blízko C-konce velké podjednotky. Jeho úloha v metabolismu vodíku zatím není jasná (Higuchi et al., 1997).

Malá podjednotka váže tři lineárně uspořádané Fe-S klastry, a to dva [4Fe-4S] klastry a jeden [3Fe-4S] klastr. Fe-S klastry jsou zodpovědné za přenos elektronů mezi aktivním místem a elektronovým akceptorem (donorem) hydrogenázy. [3Fe-4S] klastr se nachází uprostřed mezi dvěma [4Fe-4S] klastry, jde tedy o mediánní Fe-S klastr. [4Fe-4S] klastry se nazývají proximální a distální, podle vzdálenosti od aktivního místa. Fe-S klastry jsou v malé podjednotce koordinovány téměř výhradně sirnými atomy cysteinových zbytků, výjimku tvoří histidinový ligand vázaný na distální [4Fe-4S] klastr (Volbeda et al., 1995; Higuchi et al., 1997).

Skryté aktivní místo je s povrchem proteinu propojeno hydrofobním kanálem, který umožňuje přístup H_2 a jiných molekul, jako O_2 či CO , do aktivního místa. U povrchu enzymu se nachází několik výstupů, které se spojují do jednoho kanálu vedoucího k aktivnímu místu. Předpokládá se, že kanál končí v aktivním místě blízko atomu niklu (Ogata et al., 2009). Celková struktura [NiFe]-hydrogenáz je znázorněna na obr. 2.



Obr. 2: Struktura [NiFe]-hydrogenázy *D. vulgaris* Miyazaki F (převzato z Ogata et al., 2009).

4.1.2. [NiFeSe]-hydrogenázy

Struktura [NiFeSe]-hydrogenáz z bakterií *Desulfomicrobium baculatum* (Garcin et al., 1999) a *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Marquez et al., 2010) je podobná standardním [NiFe]-hydrogenázám, nicméně patrné rozdíly mezi nimi existují.

Malá podjednotka [NiFeSe]-hydrogenáz obsahuje mediánní [4Fe-4S] klastr, nikoliv [3Fe-4S] klastr, jako je tomu u standardních [NiFe]-hydrogenáz. Dohromady mají tedy tři [4Fe-4S] klastry. [NiFeSe]-hydrogenázy mají jeden cysteinový zbytek koordinující atom niklu v aktivním místě nahrazen selenocysteinem. Tři dvouatomové ligandy koordinující v aktivním místě železo se shodují s těmi u enzymu *D. gigas*, jsou to tedy 2 CN⁻ a 1 CO. Monoatomární metalické centrum na C-konci velké podjednotky obsahuje Fe místo Mg. Ligand tvořící můstek mezi Ni a Fe („bridging“ ligand) v aktivním místě nebyl nalezen ani u *D. baculatum*, ani u *D. vulgaris* Hildenborough (Garcin et al., 1999; Marquez et al., 2010).

[NiFeSe]-hydrogenázy jsou známé svou tolerancí ke kyslíku. Stejně jako [NiFe]-hydrogenázy obsahují hydrofobní kanál vedoucí od aktivního místa až k povrchu proteinu, rezistence vůči inaktivaci kyslíkem tedy může souviset s přítomností selenocysteinu v aktivním místě. Selenocystein je větší než cystein a částečně tak blokuje přístup O₂ do aktivního místa (Marquez et al., 2010).

4.1.3. [NiFe]-hydrogenázy odolné vůči kyslíku

[NiFe]-hydrogenázy odolné vůči kyslíku jsou, jak z názvu vyplývá, schopné zastávat svoji fyziologickou funkci i v přítomnosti kyslíku, který drtivou většinu ostatních hydrogenáz ireverzibilně inhibuje. Tato vlastnost je tedy mezi hydrogenázami jedinečná a disponuje jí pouze několik druhů, mezi něž patří *Hydrogenovibrio marinus*, jehož membránová hydrogenáza je nejen odolná vůči kyslíku, ale také extrémně termofilní (Nishihara et al., 1997) a *Ralstonia eutropha* H16 produkující dokonce tři různé ke kyslíku tolerantní hydrogenázy, z nichž každá slouží k jiné fyziologické funkci (Burgdorf et al., 2005).

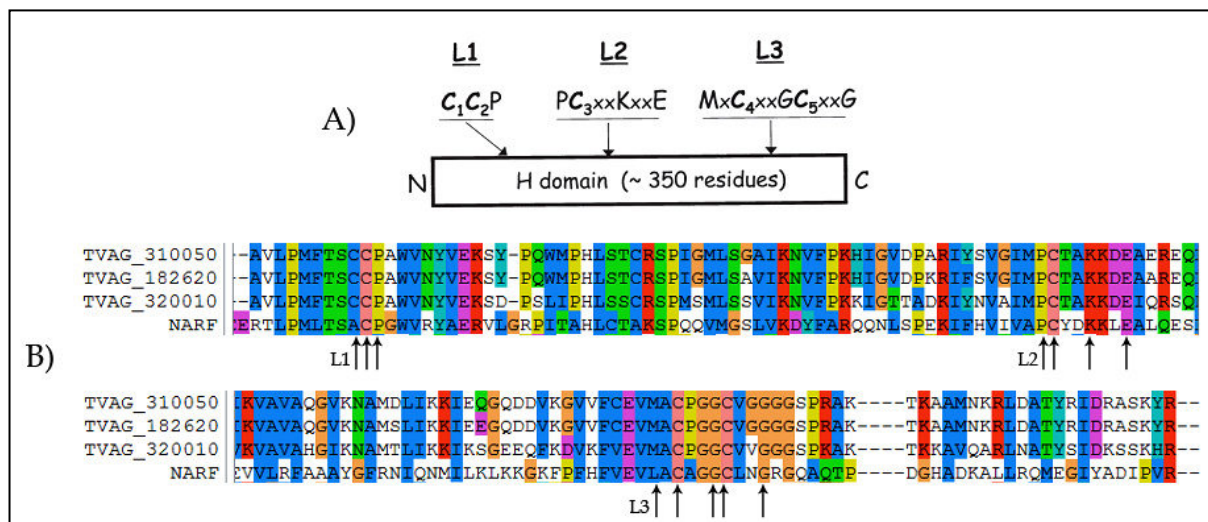
Struktura enzymu *H. marinus* je velmi podobná standardním [NiFe]-hydrogenázám, výjimkou je proximální Fe-S klastr malé podjednotky. Narozdíl od standardních [NiFe]-hydrogenáz, kde je v proximální pozici od NiFe centra [4Fe-4S] klastr koordinovaný čtyřmi cysteinovými zbytky, se v hydrogenáze *H. marinus* nachází [4Fe-3S] klastr koordinovaný šesti cysteinovými zbytky. Ve [4Fe-3S] klastru enzymu *H. marinus* sice chybí vazba mezi Fe a S, zato každý ze čtyř Fe atomů je koordinován čtyřmi Cys-thioláty, proto je [4Fe-3S] klastr v proteinu sevřen stabilněji (Shomura et al., 2011).

Nejlépe charakterizovanou hydrogenázou z *R. eutropha* je membránová [NiFe]-hydrogenáza propojená s dýchacím řetězcem. Stejně jako u hydrogenázy *H. marinus*, je i zde proximální klastr malé podjednotky [4Fe-3S] koordinovaný šesti cysteiny. Ten slouží jako elektronový přepínač v závislosti na tom, jaká molekula se blíží do aktivního místa. Pokud je v aktivním místě přítomen H_2 , slouží jako elektronový akceptor. Pokud se do aktivního místa dostane O_2 , pracuje jako donor elektronů. Mechanismus tolerance vůči O_2 tedy spočívá ve schopnosti odstranit nežádoucí molekulu redukcí, nikoliv zabráněním přístupu O_2 do aktivního místa jako u [NiFeSe]-hydrogenáz (Fritsch et al., 2011).

4.2. [FeFe]-hydrogenázy

Narozdíl od [NiFe]-hydrogenáz, které se skládají nejméně ze dvou podjednotek, mnoho [FeFe]-hydrogenáz je monomerních a sestává pouze z katalytické podjednotky, nicméně dimerní, trimerní, i tetramerní enzymy jsou také známé. Katalytické podjednotky [FeFe]-hydrogenáz se narozdíl od těch v [NiFe]-hydrogenázách navzájem značně liší svou velikostí. Kromě konzervovaných domén o délce cca 350 zbytků obsahujících aktivní místo (H-klastr), často obsahují další domény, ve kterých jsou umístěny Fe-S klastry (Vignais et al., 2001). Struktura byla stanovena mj. u monomerní, cytosolické [FeFe]-hydrogenázy z *C. pasteurianum* (Peters et al., 1998) a dimerní, periplasmické [FeFe]-hydrogenázy z *D. desulfuricans* (Nicolet et al., 1999).

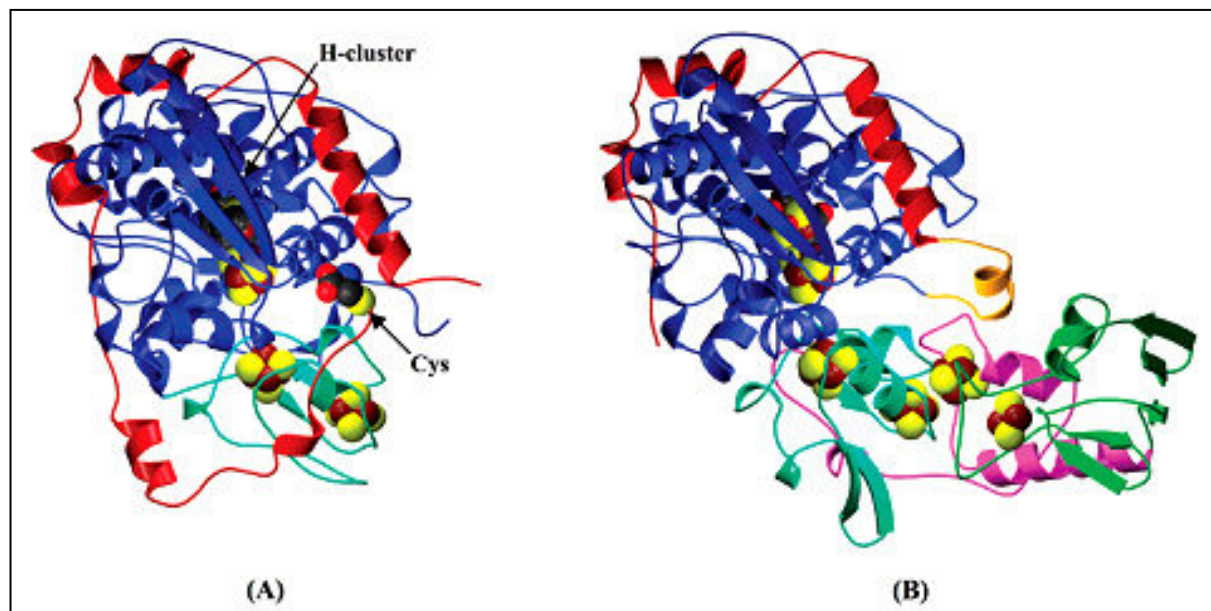
Středem zájmu je struktura jedinečné prostetické skupiny, která se nazývá H-klastr a nachází se v aktivním místě enzymu. H-klastr může být rozdělen na dvě části. Jednou z nich je [4Fe-4S] klastr, který podle všeho slouží k přenosu elektronů. Druhou část tvoří Fe-Fe centrum, které je místem reverzibilní oxidace H_2 . Důležitou úlohu při katalýze zřejmě hraje terminální Fe atom (Fe^{2+}) zmíněného Fe-Fe centra, který je ve svém prostředí chráněn před solventem řadou hydrofobních zbytků. Ligandem Fe^{2+} je molekula vody, která může být snadno vytěsněna, čímž se vytvoří katalytické místo pro produkci/oxidaci H_2 . V případě oxidace H_2 v místě Fe^{2+} dochází k navázání molekuly H_2 a vytvoření hydridu, které vede k přenosu protonů do solventu, a po oxidaci aktivního místa k přenosu elektronů na specifický elektronový akceptor. Produkce H_2 v aktivním místě nastává kondenzací elektronů z redukováného Fe-S klastru s protony, čímž vzniká k Fe^{2+} vázaný hydrid, jehož další protonace vede k vytvoření H_2 (Peters, 1999). H-klastr lze identifikovat podle tří konzervovaných sekvenčních úseků, které obsahují cysteinové zbytky nezbytné pro katalýzu. Na obr. 3 jsou tyto úseky zachyceny.



Obr. 3: (A) Schématické zobrazení H-klastru. L1-L3 představují zmíněné konzervované úseky. Cys 2-5 koordinují [4Fe-4S] klastr, Cys 5 přemostňuje tento Fe-S klastr a Fe-Fe centrum enzymu, Cys 1 pravděpodobně slouží jako kyselina/báze při katalýze. (B) Porovnání sekvencí tří homologů hydrogenáz v *T. vaginalis* (TVAG) se sekvencí Narf proteinu. Konzervované aminokyselinové zbytky úseků L1-L3 ze schématu A jsou označeny šipkami. Narf protein (kapitola 7.2.) je homologní k [FeFe]-hydrogenázám, postrádá však jeden z důležitých cysteinů, Cys 1 (převzato z Meyer, 2007).

Heterodimerní [FeFe]-hydrogenáza z *D. desulfuricans* (DdH) se svou strukturou od [NiFe]-hydrogenáz liší, ale některé rysy mají společné. Velikost velké podjednotky DdH je 42 kDa, malá podjednotka má 11 kDa. DdH obsahuje tři rovnoměrně rozložené [4Fe-4S] klastry. Distální a mediální [4Fe-4S] klastry se podílejí na interakci s redoxními partnery DdH. Proximální [4Fe-4S] klastr je Cys-thiolátem propojen s binukleárním Fe-Fe centrem, s kterým dohromady tvoří aktivní místo enzymu. Toto aktivní místo zvané H-klastr je zanořeno hluboko v centru proteinu. Fe atomy v binukleárním FeFe centru jsou spojeny dvěma thiolovými skupinami propan-1,3-dithiolu, narozdíl od [NiFe]-hydrogenáz, jejichž Ni a Fe atomy v NiFe centru jsou spojeny dvěma Cys zbytky. Stejně jako v NiFe centru jsou Fe atomy v Fe-Fe centru koordinovány CO a CN⁻ ligandy. Atom Fe₂ binukleárního FeFe centra má prázdné koordinační místo, proto se předpokládá, že zde se během katalýzy váže H₂. V proteinu se také nachází hydrofobní kanál vedoucí z povrchu do aktivního místa, kde směřuje k neobsazenému koordinačnímu místu Fe₂ atomu. Tento kanál pravděpodobně poskytuje přístup H₂ do aktivního místa. Navržena byla také možná cesta přenosu protonů na povrch proteinu (Nicolet et al., 1999).

Monomerní [FeFe]-hydrogenáza z *C. pasteurianum* (CpI) má velikost přibližně 60 kDa. H-klastr CpI je podobný jako u DdH. Ve struktuře CpI je však narozdíl od DdH přítomen další [4Fe-4S] a [2Fe-2S] klastr. Celkem má tedy CpI čtyři [4Fe-4S] klastry a jeden [2Fe-2S] klastr, které spolu tvoří cestu pro přenos elektronů (Peters et al., 1998). Porovnání struktur obou hydrogenáz je na obr. 4.



Obr. 4: Struktura [FeFe]-hydrogenáz (A) *D. desulfuricans* (Dd) a (B) *C. pasteurianum* I (CpI). Fe-S klastry jsou znázorněny žlutými a hnědými koulemi. U enzymu Dd je velká podjednotka zobrazena modře, malá podjednotka červeně a ferredoxin-like doména světle modře. Topologicky shodné oblasti CpI jsou vyobrazeny stejnými barvami. Narozdíl od Dd má CpI navíc dvě další domény zachycené fialově a zeleně; oranžová smyčka představuje spojení velké a malé podjednotky (převzato z Fontecilla-Camps et al., 2007).

4.2.1. Bifurkační [FeFe]-hydrogenáza

Elektronová bifurkace založená na flavinech (flavin-based electron bifurcation, FBEB) je proces, při kterém je nízkoredoxpotenciální ferredoxin redukován elektronovým donorem s vyšším potenciálem, jako je NAD(P)H nebo H_2 , přičemž je tato endergonická reakce poháněna současnou oxidací stejného donoru akceptorem s vyšším potenciálem, jako je NAD^+ nebo heterosulfid. Tento proces je katalyzován cytoplazmatickými multienzymovými komplexy obsahujícími flavin, mezi něž patří také multipodjednotková [FeFe]-hydrogenáza *T. maritima* (Buckel & Thauer, 2013).

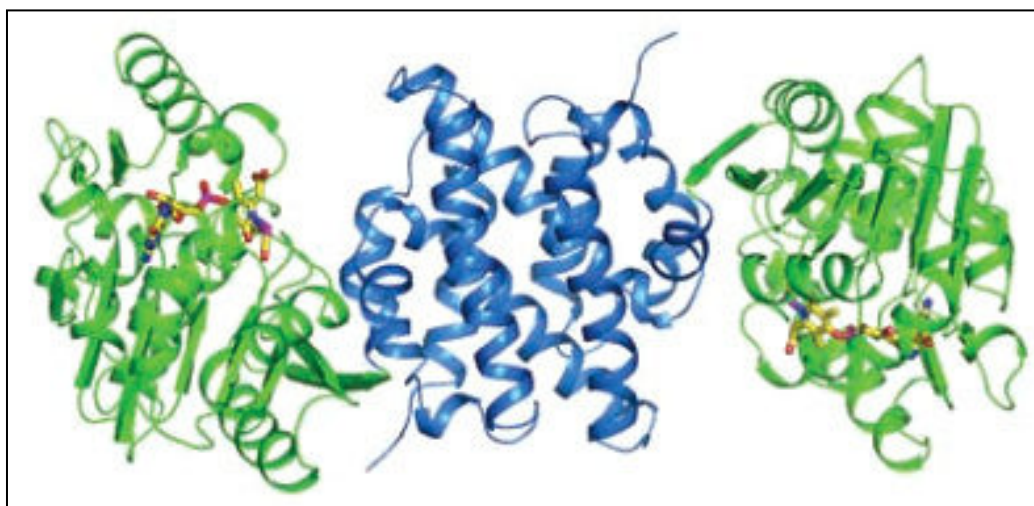
Bifurkační hydrogenáza *T. maritima* se skládá ze tří rozdílných podjednotek α (73 kDa), β (68 kDa) a γ (19 kDa). Podjednotka α obsahuje H-klastr a představuje tedy aktivní místo enzymu interagující s H_2 , kromě toho obsahuje také tři [4Fe-4S] a dva [2Fe-2S] klastry. Podjednotka α tohoto enzymu je analogická s monomerními [FeFe]-hydrogenázami.

Podjednotka β nese vazebná místa pro NAD^+ a FMN, mimo to obsahuje též jeden [2Fe-2S] a tři [4Fe-4S] klastry. Podjednotka β pravděpodobně představuje místo oxidace NADH s následným přenosem elektronů na podjednotku α . Podjednotka γ obsahuje pouze jeden [2Fe-2S] klastr a mohla by být místem oxidace redukováného ferredoxinu (Verhagen et al., 1999; Schut & Adams, 2009).

4.3. [Fe]-hydrogenázy

Mezi [Fe]-hydrogenázami patří pouze enzym H_2 -tvořící metylentetrahydrometanopterin dehydrogenáza (Hmd), který katalyzuje reverzibilní redukci metenyltetrahydrometanopterinu ($\text{CH}=\text{H}_4\text{MPT}^+$) vodíkem na metylentetrahydrometanopterin ($\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$). Jedinečné vlastnosti Hmd byly odhaleny u *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Zirngibl et al., 1992), krystalová struktura enzymu byla později popsána u *Methanocaldococcus jannaschii* (Pilak et al., 2006).

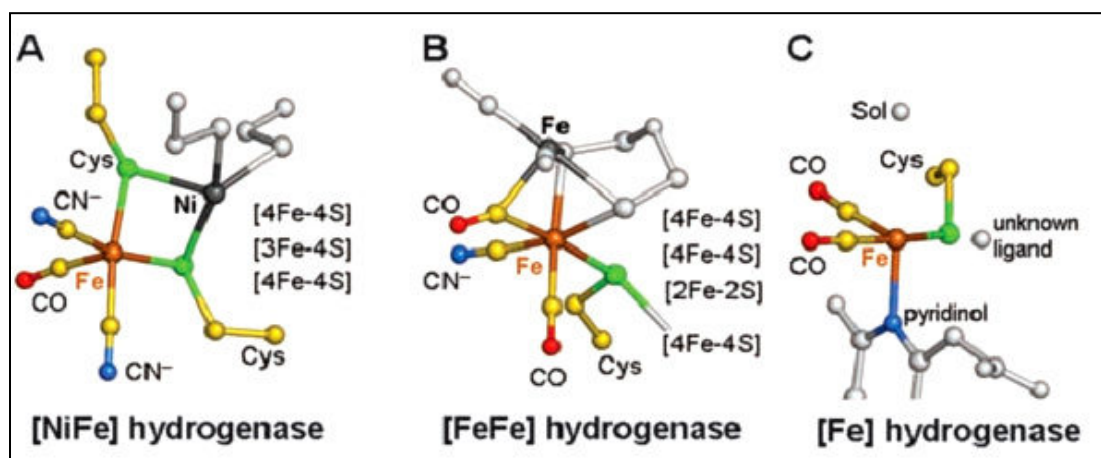
Hmd se skládá ze dvou identických podjednotek o velikosti 38 kDa, každá z podjednotek obsahuje jeden Fe atom, který je součástí kofaktoru nezbytného pro enzymovou aktivitu. Homodimer lze dále rozčlenit na centrální globulární jednotku připojenou ke dvěma periferním jednotkám, které odpovídají N-koncovým doménám jedné podjednotky. Centrální globulární jednotka je složena z propletených C-koncových částí obou podjednotek. Aktivní místo Hmd je lokalizováno v mezeře mezi periferní a centrální jednotkou. Fe atom je nízkospinový, nachází se v oxidačním stavu Fe(0) nebo Fe(II), a je koordinován dvěma molekulami CO, jedním atomem síry a jedním atomem dusíku. Sírný ligand poskytuje Cys176, který je součástí Fe-vazebného místa. Dusíkatý ligand je součástí pyridinolu, spojuje tedy mononukleární Fe centrum a molekulu guanylylpyridinolu, které dohromady tvoří FeGP kofaktor. Chemická povaha pátého ligandu je neznámá, šesté koordinační místo je prázdné. Metenyl- H_4MPT^+ i H_2 se najednou vážou v aktivním místě blízko Fe centra, kde spolu přímo reagují (Pilak et al., 2006; Shima et al., 2008). Na obr. 5 je znázorněna struktura tohoto enzymu.



Obr. 5: Struktura [Fe]-hydrogenázy *M. jannaschii*. Periferní jednotky jsou znázorněny zeleně, centrální jednotka modře. Barevný tyčinkový model v periferních podjednotkách představuje kofaktor FeGP (převzato z Schima et al., 2008).

V některých ohledech jsou si všechny tři rodiny hydrogenáz podobné. Všechny tři typy obsahují redoxně-inaktivní nízkospinové železo, podle všeho v oxidačním stavu Fe(II), které je koordinováno pěti nebo šesti ligandy. Všechna tři Fe-centra (obr. 6) spolupracují se svými redoxními partnery, jsou však součástí architektonicky odlišných struktur.

Hmd se od ostatních hydrogenáz zásadně liší svými katalyckými vlastnostmi. Aktivní místo [NiFe]- a [FeFe]-hydrogenáz je zanořeno hluboko v proteinu a elektrony z redukovaného H₂ musí překonat dlouhou vzdálenost z aktivního místa přes Fe-S klastry až k elektronovému akceptoru. Hmd žádné Fe-S klastry neobsahuje, metenyl-H₄MPT⁺ a H₂ spolu reagují přímo, Hmd tedy nekatalyzuje reverzibilní reakci: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$, typickou pro ostatní hydrogenázy.



Obr. 6: Struktury aktivních míst tří fylogeneticky nepříbuzných hydrogenáz. (A) [NiFe]-hydrogenáza *D. gigas*, (B) [FeFe]-hydrogenáza *C. pasteurianum* a *D. desulfuricans*, (C) [Fe]-hydrogenáza *M. jannaschii*. Všechny hydrogenázy mají společné nízkospinové železo (hnědě), které je koordinované thioláty, CO a kyanidem, nebo pyridinolem. Páté a šesté liganční místo [Fe]-hydrogenázy je označeno šedými koulemi (převzato z Schima et al., 2008).

5. MATURACE HYDROGENÁZ

Vzhledem ke komplexitě hydrogenáz, která je daná mj. přítomností několika dvouatomových ligandů, zahrnuje biosyntéza těchto enzymů řadu složitých událostí, které vedou k aktivnímu enzymu. Hydrogenázy tedy nejsou syntetizovány v aktivní podobě, nýbrž vyžadují složitý maturační systém.

Maturace velké podjednotky [NiFe]-hydrogenáz závisí na aktivitě nejméně sedmi hlavních proteinů, které katalyzují syntézu CN/CO ligandů a hrají úlohu při koordinaci Fe v aktivním místě, inzerci niklu a proteolytické maturaci velké podjednotky. Maturace [FeFe]-hydrogenáz zřejmě vyžaduje jen tři pomocné proteiny, dva z nich patří do třídy radikálových S-adenosylmetionin (SAM) enzymů a poslední, který je také metaloproteinem, je z rodiny GTPáz. Tyto proteiny jsou považovány za dostačující k tomu, aby daly vznik aktivnímu enzymu. O maturaci [Fe]-hydrogenáz zatím nejsou žádné dostupné informace (Vignais & Billoud, 2007).

5.1. Maturace [NiFe]-hydrogenáz

Geny kódující hydrogenázy jsou v proteobakteriích uspořádány do operonů. Tyto operony zahrnují strukturální geny, obecně značené L (G) pro velkou podjednotku a S (K) pro malou podjednotku, a přídatné geny pro maturaci a inzerci Ni, Fe, CO a CN⁻ do aktivního místa heterodimeru. V některých organismech tyto operony také obsahují regulační geny, které řídí expresi strukturálních genů. Maturace hydrogenáz následuje složitou cestu, která zahrnuje alespoň sedm pomocných proteinů, šest z nich jsou produkty tzv. *hyp* genů, jmenovitě HypA, HypB, HypC, HypD, HypE a HypF, a sedmým je endopeptidáza (Vignais & Colbeau, 2004). Přestože jsou operony hydrogenáz velmi konzervované a vykazují vysokou míru podobnosti, pro příslušný enzym je daný maturační systém specifický, a to pravděpodobně kvůli úzkým interakcím protein-protein, které se během maturačního procesu objevují. Tato bariéra je také zodpovědná za neschopnost hydrogenáz maturovat při produkci v heterologním hostiteli (Casalot & Rousset, 2001). Nejlépe prostudovaný maturační systém je ten, který se podílí na biosyntéze hydrogenázy 3 (Hyd3) z *Escherichia coli* (Forzi & Sawers, 2007).

Maturační proces lze rozdělit do několika kroků: (1) syntéza apoenzymu, (2) transport a uložení niklu a železa, (3) syntéza ligandů a částečné složení aktivního místa, (4) inzerce niklu, proteolýza prodlouženého C-konce a jeho zabalení do zbytku velké podjednotky. Krok 1 závisí na okolním prostředí. Některé organismy mohou cítit přítomnost H₂ v okolí díky cytosolickým regulačním proteinům detekujícím H₂, které jsou

hydrogenázám podobné. Tak se spustí signální dráha, která má za následek změnu exprese strukturálních genů [NiFe]-hydrogenázy. Krok 2, transport niklu a železa, je kvůli toxickému vlivu těchto metalických iontů v mikroorganismech vysoce regulován. U *E. coli* je za transport Ni zodpovědný ABC transportér kódovaný *nik* operonem, a transport Fe je závislý na syntéze sideroforů. V krocích 3 a 4 jsou syntetizovány ligandy aktivního místa a aktivní místo musí být sestaveno a uloženo do velké podjednotky. Tento proces je pod kontrolou šesti genů *hyp* operonu a nikl-dependentní proteázy (Fontecilla-Camps et al., 2007).

5.1.1. Syntéza CN⁻ ligandu

Syntéza CN⁻ v *E. coli* závisí na dvou maturačních proteinech, HypE a HypF. HypF obsahuje sekvenční motivy charakteristické pro O-karbamoyltransferázy a acylfosfatázy. HypF hydrolyzuje karbamoylfosfát, který je prekurzorem CN⁻, a je tudíž nezbytný pro syntézu aktivního místa (Paschos et al., 2001). V přítomnosti ATP a HypE katalyzuje HypF přenos karbamoyl skupiny na C-koncový cystein proteinu HypE za tvorby enzym-thiokarbamátu. HypE má kromě C-koncového cysteinu také vazebné místo pro ATP, a vykazuje sekvenční podobnost s PurM, enzymem katalyzujícím ATP-dependentní dehydrataci. HypE dehydratuje S-karbamoyl za vzniku enzym-thiokyanátu, který může dodat CN⁻ železu v aktivním místě (Reissmann et al., 2003). HypE a HypF tvoří dynamický komplex s HypC-HypD. Komplex HypC-HypD přijímá CN⁻ skupinu od HypE a připojuje ji na Fe atom NiFe centra Hyd3 (Blokesh et al., 2004).

5.1.2. Syntéza CO ligandu

Nejdříve se myslelo, že CO je stejně jako CN⁻ syntetizován z karbamoylfosfátu (Paschos et al., 2001). Tato možnost však byla vyvrácena a ukázalo se, že metabolický původ CO a CN⁻ ligandů Fe atomu je rozdílný, přinejmenším u *Allochromatium vinosum* může být CO odvozen od acetátu, konkrétně od jeho karboxylového uhlíku. Jedním z možných způsobů, jak by mohl dát acetát vznik CO, je zapojení jednoho či více Hyp proteinů do procesu formace CO (Roseboom et al., 2005).

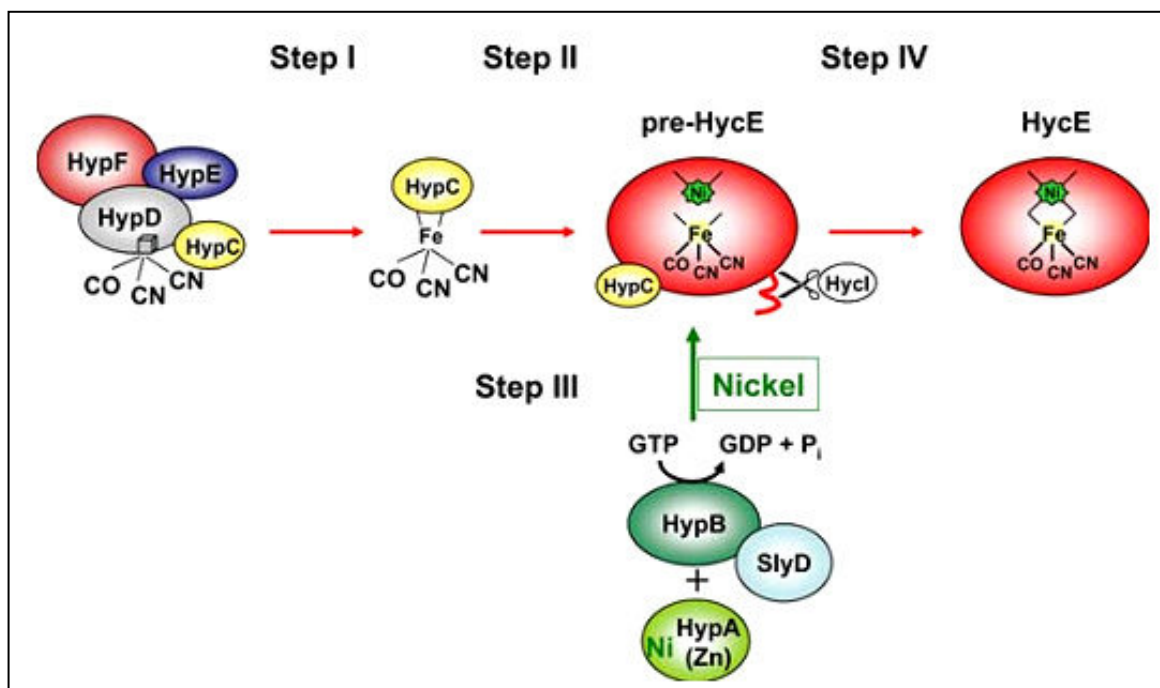
5.1.3. Inzerce niklu

Předpokládá se, že nikl je vložen do NiFe centra teprve po inkorporaci Fe a jeho ligandů do prekurzoru velké podjednotky (pre-HycE), tedy až po zavedení Fe(CN)₂(CO) do aktivního místa (Maier & Böck, 1996). Pro sestavení metalického centra hydrogenázy je klíčový komplex mezi pre-HycE a HypC, který se po navázání niklu na C-koncový cystein

pre-HycE rozpadá (Magalon & Böck, 2000a). Protein HypA, který je specifický pro Hyd-3, váže nikl a dopravuje ho do aktivního místa. Jeho homologem je protein HybF, který dodává nikl hydrogenázám 1 a 2 (Hyd-1 a Hyd-2) *E. coli* (Atanassova & Zamble, 2005). Na inkorporaci niklu se podílí také GTP-vazebný protein HypB, který obsahuje Ni-vazebnou oblast. HypB tvoří GTP-indukovaný dimer, který interaguje s velkou podjednotkou a předává jí ion niklu. Po úspěšné inkorporaci niklu dochází k hydrolýze GTP a disociaci dimeru (Gasper et al., 2006). Dalším proteinem ovlivňujícím inzerci niklu je peptidyl-prolyl *cis/trans* izomeráza SlyD. SlyD specificky interaguje s HypB, jeho přesná úloha však není jasná. SlyD může přímo dodávat nikl do NiFe centra, nebo optimalizovat aktivitu HypB, a tím usnadňovat inzerci niklu. Existuje také možnost, že se uplatňuje při správném složení velké podjednotky po inkorporaci niklu, nebo při sestavě proteinového komplexu požadovaného pro inzerci (Zhang et al., 2005).

5.1.4. Endoproteolytické štěpení

Posledním krokem maturačního procesu je odštěpení C-koncového peptidu velké podjednotky. Enzym podílející se na proteolýze je velmi specifický, každá hydrogenáza *E. coli* má vlastní proteázu. Tyto proteázy jsou kódovány operonem pro strukturní geny, konečný maturační krok zastávají proteázy HyaD pro Hyd-1, HybD pro Hyd-2, a HycI pro Hyd-3 (Rossmann et al., 1995). Proteolytické štěpení nastává až po inzerci niklu do aktivního místa. Podle niklu jsou hydrogenázy rozeznávány svými endopeptidázami, které obsahují konzervované aminokyselinové zbytky (Glu, Asp a His) interagující právě s niklem navázaným v pre-HycE (Theodoratou et al., 2000). Teprve po odstranění C-koncového peptidu dochází k asociaci HycE s malou podjednotkou (HycG). Komplex HycE-HycG pak může zakotvit do membrány, popř. je díky signálnímu peptidu malé podjednotky translokován do periplasmického prostoru (Magalon & Böck, 2000b). Schéma maturace [NiFe]-hydrogenáz je vyobrazeno na obr. 7.



Obr. 7: Model maturace aktivního místa [NiFe]-hydrogenázy 3 *E. coli*. Krok I, vytvořená skupina Fe(CN)₂CO je přenesena na HypC. Krok II, HypC tuto skupinu předává prekurzoru velké podjednotky pre-HycE. Krok III, komplex HypA-HypB-SlyD dodává pre-HycE obsahujícímu železo nikl. Krok IV, specifická proteáza HycI odštěpuje C-koncový peptid a dokončuje uzavření aktivního místa (převzato z Forzi & Sawers, 2007).

5.2. Maturace [FeFe]-hydrogenáz

Narozdíl od [NiFe]-hydrogenáz se o maturaci [FeFe]-hydrogenáz dlouho vědělo podstatně méně. Průlom nastal při genetické analýze mutantů s nefunkčními hydrogenázami zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Identifikovány byly tři striktně konzervované maturační proteiny [FeFe]-hydrogenáz, a to HydE, HydF a HydG. Geny *hydE*, *hydF* a *hydG* jsou ve většině organismů rozděleny, u *C. reinhardtii* byly identifikovány jen dva geny pojmenované *hydG* a *hydEF*. Gen *hydEF* obsahuje dvě domény homologní ke dvěma různým genům kódujícím proteiny HydE a HydF, které se objevují v prokaryotických organismech. Všechny tři proteiny jsou nezbytné pro složení aktivního místa [FeFe]-hydrogenáz. HydF doména HydEF proteinu *C. reinhardtii* patří ke GTPázovým proteinům. Maturázy HydG a HydE patří mezi radikálové S-adenosylmetionin (SAM) enzymy (Posewitz et al., 2004). Maturační proteiny HydE, HydF a HydG byly charakterizovány také u *Thermotoga maritima*. Protein HydF *T. maritima* patří rovněž mezi GTPázy (Brazzolotto et al., 2006). HydE a HydG jsou podle očekávání také radikálové SAM enzymy (Rubach et al., 2005). Kromě maturáz HydE, HydF a HydG se při maturaci [FeFe]-hydrogenáz mohou uplatňovat také přídatné proteiny, jako TM1420 v *T. maritima*, který se pravděpodobně podílí

na sestavení metalického klastru hydrogenázy (Pan et al., 2003). Vlastnosti jednotlivých maturačních proteinů jsou podrobněji popsány níže.

Maturační proces zahrnuje řadu složitých reakcí: (1) syntéza ligandů CO, CN a dithiolátového můstkového ligandu, (2) složení binukleárního FeFe aktivního místa, (3) inkorporace složeného aktivního místa do enzymu, který již obsahuje [4Fe-4S] klastr tvořící součást H-klastru, a (4) složení a přenos přídatných Fe-S klastrů. Všechny tyto reakce jsou přísně kontrolovány, protože při nich vzniká toxický CN⁻ a CO, stejně jako dithiolát citlivý na hydrolýzu. Předpokládá se, že syntéza těchto ligandů a jejich vazba k Fe probíhá současně, pravděpodobně v rámci multiproteinového komplexu (Nicolet et al., 2010a).

5.2.1. HydF protein

HydF doména HydEF proteinu *C. reinhardtii* obsahuje na N-konci GTP-vazebný motiv GxxNxGKS (P-loop) naznačující příslušnost ke GTPázovým proteinům. Na C-konci proteinu se nachází vazebný motiv se třemi konzervovanými cysteiny CxH_xHCxxC, který je charakteristický pro vazbu Fe-S klastru. Obě vazebné domény jsou nezbytné pro aktivaci hydrogenázy (King et al., 2006). U proteinu HydF *T. maritima* bylo prokázáno, že váže nestálý [4Fe-4S] klastr, který je koordinován třemi cysteiny. Čtvrté koordinační místo je přístupné exogenním ligandům, které jsou zaměnitelné (Brazzolotto et al., 2006).

HydF při sestavě H-klastru funguje jako lešení. HydF tedy neslouží jen jako přenašeč FeFe centra do H-klastru, ale přímo se podílí na složení tohoto centra, neboť na HydF je z [2Fe-2S] klastru sloužícího jako prekurzor sestavováno FeFe centrum prostřednictvím působení maturáz HydE a HydG. Diatomické ligandy CO a CN⁻ koordinující FeFe centrum, i můstkový dithiolát FeFe centra, jsou tedy v HydF přítomny již před přenosem tohoto centra do H-klastru a aktivací holoenzymu. Vazba a hydrolýza GTP je pro správnou funkci HydF nezbytná, nicméně přesná úloha GTP zůstává nejasná (Shepard et al., 2010a).

5.2.2. HydE protein

Protein HydE patří mezi radikálové SAM enzymy. HydE doména proteinu HydEF *C. reinhardtii* obsahuje ve své sekvenci motiv CxxxCxxC typický pro tuto skupinu enzymů. Tyto tři konzervované cysteiny jsou nezbytné pro maturaci aktivní hydrogenázy (Posewitz et al., 2004). HydE z *T. maritima* disponuje dvěma [4Fe-4S] klastry, jeden z nich se váže na CxxxCxxC sekvenci blízko N-konce a je schopný katalyzovat redukci SAM na 5'-deoxyadenosylový radikál a metionin, druhý [4Fe-4S] klastr je pravděpodobně navázán na C-konci obsahujícím tři konzervované cysteinové zbytky (Rubach et al., 2005).

Struktura HydE obsahuje $(\beta\alpha)_8$ triázafosfátizomerázový (TIM) barel a tři rozdílná místa vázající anion. Dvě z těchto míst se nacházejí v oblasti, kde se pravděpodobně váže substrát, třetí je umístěno na dně barelu daleko od SAM. Substrát HydE není známý, předpokládá se však, že se jedná o malý běžný metabolit obsahující karboxylátovou část a částečný kladný náboj. Na základě pozorování lze navrhnout možný mechanismus, ve kterém dochází nejdříve k vazbě substrátu blízko SAM a katalýze radikálové reakce ve vrchní části barelu, poté produkt přeskakuje z jednoho aniontového místa do druhého, až se nakonec usadí na dně barelu, kde se pevně naváže do třetího aniontového místa. Produkt potom může být přenesen na další komponenty maturačního ternárního komplexu. HydE se pravděpodobně podílí na syntéze dithiolátového ligandu aktivního místa, nicméně druhý [4Fe-4S] klastr, který byl považován za zdroj sirného atomu pro jeho syntézu, není pro maturaci nezbytný. Atom síry tedy musí být získáván odjinud (Nicolet et al., 2008).

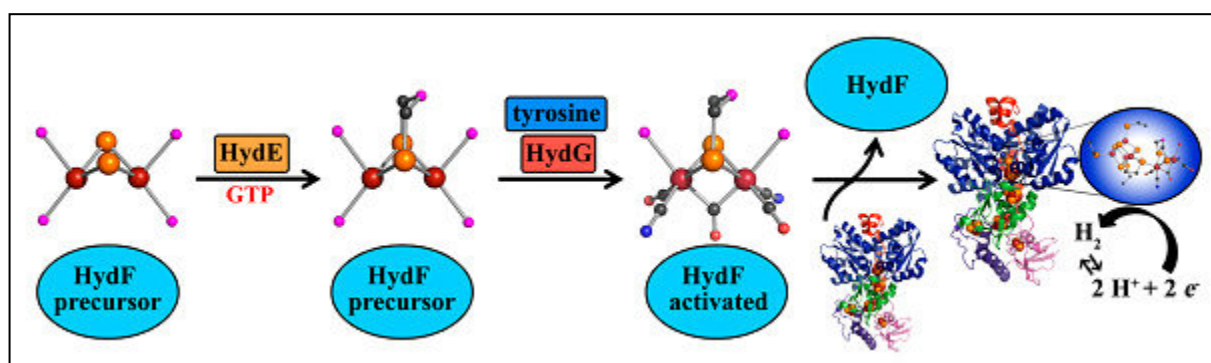
5.2.3. HydG protein

Protein HydG patří stejně jako HydE mezi radikálové SAM enzymy. Genová sekvence obsahuje charakteristický motiv CxxxCxxC. Analýza HydG *T. maritima* ukázala, že protein nejspíše váže dva Fe-S klastry. Jeden z nich je klasický [4Fe-4S] klastr, který je navázán na cysteinový motiv v N-koncové doméně, a dokáže štěpit SAM (Rubach et al., 2005). HydG obsahuje další konzervovaný cysteinový motiv CxxCx₂₂C v C-koncové doméně. Tento motiv je naprosto nezbytný pro maturaci hydrogenázy a předpokládá se, že slouží ke koordinaci druhého Fe-S klastru. Totožnost tohoto Fe-S klastru zatím nebyla odhalena (King et al., 2006). Ve struktuře proteinu by měl být přítomen stejný $(\beta\alpha)_8$ TIM barel jako u HydE (Nicolet et al., 2008).

Proteinová sekvence HydG je velmi podobná dalšímu radikálovému SAM enzymu ThiH (tyrosin lyáza). Byly u nich objeveny podobné úseky konzervovaných aminokyselin, které naznačují, že oba proteiny mají podobné substráty i funkci. Jako možný substrát HydG byl označen tyrosin, neboť bylo prokázáno, že HydG katalyzuje SAM-dependentní štěpení tyrosinu na p-kresol. Nezávisle na HydE byla i pro HydG vyslovena hypotéza, že je zodpovědný za syntézu dithiolového ligandu, jehož prekurzorem by měl být právě tyrosin. Tímto ligandem se zdá být dithiometylamín (DTMA), nicméně vyloučen nemůže být ani dithiometyleter. Syntéze DTMA vyžaduje dekarboxylaci dvou molekul DHG a doprovodné uvolnění amoniaku. Navržený mechanismus syntézy dithiolátového ligandu začíná štěpením SAM, který dá vznik 5'-deoxyadenosylovému radikálu (Ado°). Ado° přemění tyrosin na p-kresol a dehydroglycin (DHG). Molekula DHG reaguje s ionty sulfidu, které

pocházejí z druhého Fe-S klastru HydG, a vytváří dvojité alkylované meziproducty. Jedna z DHG-odvozených S-vázaných látek potom projde dekarboxylací, která je provázena redukcí dvou iontů železa Fe-S klastru. Tento krok dává vznik iminiové skupině, která může být atakována amino skupinou druhé DHG-odvozené S-vázané látky. Následná ztráta NH_3 poskytuje hnací sílu pro β -eliminaci zbylé karboxylové skupiny jako CO_2 . Konečné utvoření DTMA vyžaduje dva protony a dva elektrony. Elektrony jsou poskytovány železnými ionty Fe-S klastru (Pilet et al., 2009).

Také bylo dokázáno, že HydG je zodpovědný za syntézu ligandů CN^- a CO. CN^- je produktem štěpení tyrosinu, které je katalyzované proteinem HydG využívajícím radikálovou SAM reakci. Při štěpení tyrosinu vzniká společně s CN^- také p-kresol. Vzniklý CN^- je pak spojen se scaffold proteinem HydF (Driesener et al., 2010). I při syntéze CO využívá HydG jako substrát tyrosin. CO je stejně jako CN^- následně připojen k HydF. Meziproductem reakce by mohl být DHG, který podléhá dekarboxylaci za tvorby obou dvouatomových ligandů (Shepard et al., 2010b). Studium mutací cysteinových ligandů [4Fe-4S] klastru C-koncové domény HydG bylo zjištěno, že k syntéze CN^- není tento Fe-S kluster zapotřebí, kdežto pro syntézu CO je nutný. Na základě tohoto pozorování byl navržen reakční mechanismus, ve kterém místo DHG jako meziproductu figuruje glycylový radikál, který vzniká homolytickým štěpením tyrosylového radikálu. Tyrosylový radikál vzniká odejmutím $\text{H}\cdot$ z tyrosinu působením 5'-deoxyadenosylového radikálu, produktu štěpení SAM (Nicolet et al., 2010b). Zevrubnější studie poté prokázala, že CN^- ligand je odvozen od amino skupiny tyrosinu, zatímco zdrojem CO ligandu je karboxylová skupina tyrosinu (Kuchenreuther et al., 2011). Schéma shrnující maturaci [FeFe]-hydrogenáz je na obr. 8.



Obr. 8: Předpokládané schéma maturace H-klastru [FeFe]-hydrogenáz. HydE na [2Fe-2S] klastru HydF syntetizuje dithiolátový přemosťující ligand, pravděpodobně s využitím hydrolýzy GTP. Tento meziproduct je dále zpracováván HydG, který využívá tyrosin k syntéze CO a CN^- ligandů, a tím dokončuje syntézu 2Fe jednotky na HydF prekurzoru. Aktivovaná forma HydF poté interaguje s apoenzymem, kterému předává 2Fe centrum a dává vznik holo-hydrogenáze (převzato z Shepard et al., 2010a).

5.3. Syntéza Fe-S klastrů

Fe-S klastry jsou nedílnou součástí hydrogenáz, proto si jejich biosyntéza zaslouží alespoň malou zmínku. K sestavení intracelulárních Fe-S klastrů většinou nedochází spontánně, ale jejich tvorba vyžaduje složitý biosyntetický aparát. Popsány byly nejméně tři odlišné typy biosyntetických systémů Fe-S klastrů. Nejběžnější z nich je Isc systém kódovaný geny *isc*, které jsou široce konzervované mezi bakteriemi, a homology proteinů kódovaných těmito geny nalezneme také mezi eukaryotickými organismy. Označení *isc* poukazuje na úlohu při sestavování Fe-S klastrů (iron-sulfur-cluster). Všechny produkty *isc* operonu se podílejí na biogenezi Fe-S klastrů. Protein IscS se obecně uplatňuje při přepravě intracelulární síry. IscS má cystein desulfurázovou aktivitu a jeho úlohou je zajistit fyziologický zdroj síry pro další metabolické procesy, maturaci kofaktorů a proteinů díky desulfurizaci L-cysteinu. Protein IscU poskytuje molekulární lešení (scaffold) pro sestavení Fe-S klastru zprostředkovaného IscS. Fe-S klastr je následně z IscU přenesen do cílového proteinu. Protein IcsA může stejně jako IscU fungovat jako lešení pro sestavení Fe-S klastru. Kromě toho bylo prokázáno, že IcsA může přijímat Fe-S klastry od IscU, existuje tedy možnost, že oba proteiny představují primární a sekundární donory Fe-S klastrů. Alternativně může IcsA hrát roli donoru železa pro vznikající Fe-S klastr na IscU. Při maturaci Fe-S proteinů závislé na Isc proteinech se dále uplatňují chaperony HscA a HscB (heat shock cognate proteins). HcsA tvoří s HscB komplex, který je schopný interagovat s IscU. Interakce IscU s HscBA stimuluje vlastní ATPázovou aktivitu HscA, která může být zodpovědná za přenos Fe-S klastru na maturující Fe-S protein (Johnson et al., 2005).

6. ROZŠÍŘENÍ HYDROGENÁZ MEZI ORGANISMY

Většina organismů schopných metabolizovat H_2 patří mezi prokaryota. Tyto organismy zahrnují fermentující organismy, fotosyntetická prokaryota, aeroby, anaeroby, autotrofy, heterotrofy, ad. Také některá nižší eukaryota jsou schopna metabolizovat H_2 . [NiFe]-hydrogenázy se objevují výhradně u prokaryot, tedy v doménách Bacteria a Archaea. [FeFe]-hydrogenázy se naproti tomu vyskytují v bakteriích a eukaryotech. Všeobecně jsou hydrogenázy nejčastěji zastoupeny v doméně Bacteria, mnoho druhů obsahuje několik [NiFe]-hydrogenáz (*Escherichia coli*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Anabaena variabilis*), některé z nich dokonce obsahují [FeFe]- i [NiFe]-hydrogenázy zároveň (*Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium acetobutylicum*), jiné obsahují pouze [FeFe]-hydrogenázy (*Clostridium pasteurianum*, *Thermotoga maritima*). [NiFe]-hydrogenázy jsou dobře zastoupeny zejména v proteobakteriích, [FeFe]-hydrogenázy jsou přítomné především v Gram-pozitivních bakteriích a v zástupcích γ - a δ -proteobakterií. Co se týče domény Archaea, převládají zejména zástupci kmene Euryarchaeonta. Některé druhy archeí obsahují pouze [NiFe]-hydrogenázy (*Pyrococcus furiosus*, *Methanosarcina barkeri*), jiné mohou disponovat také [Fe]-hydrogenázami (*Methanocaldococcus jannaschii*). V doméně Eukarya jsou zastoupeny pouze [FeFe]-hydrogenázy (Vignais & Billoud, 2007).

Výskyt eukaryotických [FeFe]-hydrogenáz je omezen na několik fylogeneticky nepříbuzných skupin, jmenovitě hydrogenázy obsahuje několik anaerobních hub, někteří nálevníci, bičíkatá parabasalia, fylogeneticky nepříbuzné anaerobní améby a některé zelené řasy. Eukaryotické hydrogenázy jsou lokalizovány většinou v organelách endosymbiotického původu. V případě chytridiomycet (např. *Neocallimastix frontalis*), trichomonád (*Trichomonas vaginalis*) a anaerobních nálevníků (např. *Nyctotherus ovalis*) se jedná o organelu zvanou hydrogenozom. V zelených řasách (např. *Chlorella fusca*, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus obliquus*) se hydrogenázy nacházejí ve stromatu chloroplastů (Horner et al., 2002). Překvapením bylo objevení genů kódujících [FeFe]-hydrogenázy v genomech améby *Entamoeba histolytica* a diplomonád *Spironucleus barkhanus* a *Giardia intestinalis*. Tato protista postrádají hydrogenozomy a jejich hydrogenázy nemají N-koncovou cílovou sekvenci směřující protein do organel, což ukazuje na cytosolickou lokalizaci těchto hydrogenáz. Fylogenetické analýzy nasvědčují tomu, že geny [FeFe]-hydrogenáz těchto tří protist pocházejí od stejného předka (Nixon et al., 2003).

7. FYLOGENETICKÉ VZTAHY HYDROGENÁZ S DALŠÍMI PROTEINY

Hydrogenázy se vyznačují ohromnou rozmanitostí kvartérních struktur, v případě [FeFe]-hydrogenáz i velikostí katalytické podjednotky. Kromě toho najdeme u většiny podjednotek a domén, vyjma H-klastr domény [FeFe]-hydrogenáz, homologii s dalšími redoxními proteiny, např. s NADH-ubichinon oxidoreduktázou (komplex I), nebo s Narf proteiny. Na základě porovnání sekvencí katalytických podjednotek [FeFe]-hydrogenáz a velkých a malých podjednotek [NiFe]-hydrogenáz lze usoudit, že hydrogenázy představují příklad konvergentní evoluce (Vignais & Billoud, 2007).

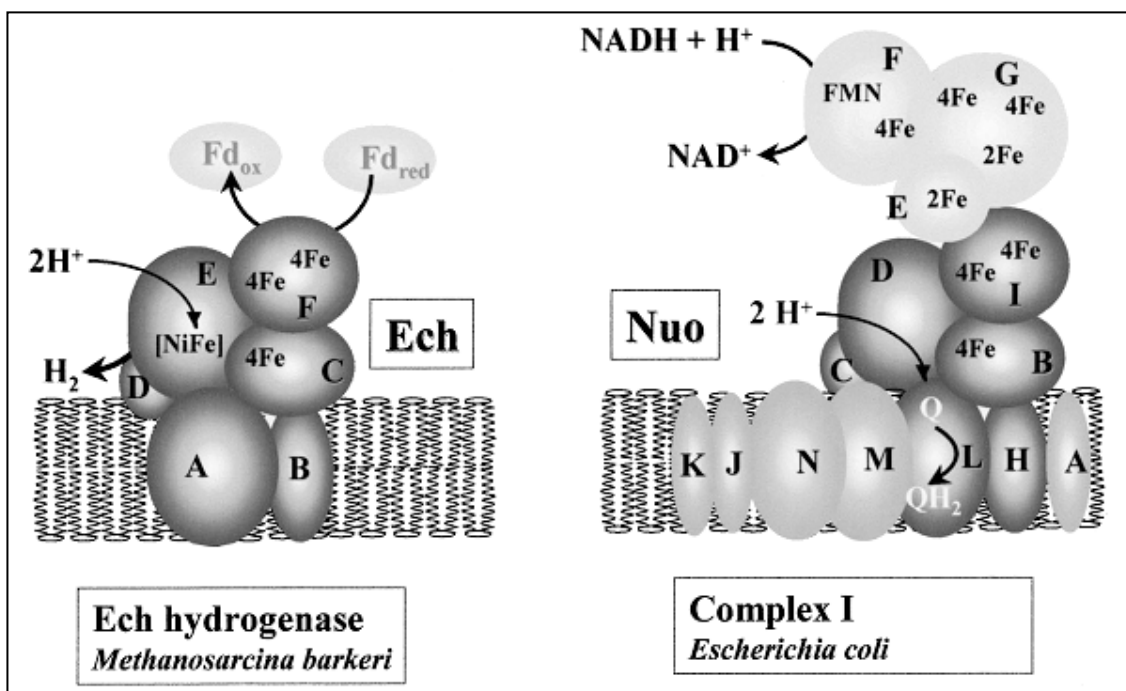
7.1. Homologie mezi hydrogenázami a komplexem I

NADH-ubichinon oxidoreduktáza, neboli komplex I respiračního řetězce, se nachází ve vnitřní membráně mitochondrií a v cytoplazmatické membráně bakterií. Komplex I mitochondrií se skládá nejméně z 42 podjednotek, kdežto bakteriální komplex I je složen pouze ze 14 podjednotek, jež jsou všechny homologní k podjednotkám mitochondriálního enzymu. Pro srovnání podjednotek hydrogenáz s těmi z komplexu I bude použita nomenklatura bakteriálního enzymu, který obsahuje stejné prostetické skupiny (1 FMN, 8-9 Fe-S klastrů, několik chinonů) a disponuje stejnými katalytickými vlastnostmi jako mitochondriální enzym. Genový lokus kódující bakteriální komplex I byl pojmenován *nuo* (NADH:ubichinon oxidoreduktáza) a obsahuje strukturní geny *nuoA-N*. Solubilní NADH dehydrogenázová část komplexu I je tvořena podjednotkami NuoE, F a G. Tato část obsahuje místa pro vazbu FMN a NADH, a také Fe-S klastry (N1b, N1c, N3 a N4). Spojovací část komplexu I se skládá z podjednotek NuoB, C a D. Tato část obsahuje Fe-S klastr N2 a slouží k propojení NADH dehydrogenázové a membránové části. Membránová část komplexu I je sestavena z podjednotek NuoA, H a J-N. Tato část neobsahuje žádné kofaktory ani Fe-S klastry, pouze NuoH obsahuje vazebné místo pro ubichinon. Tyto podjednotky se tedy pravděpodobně podílejí na translokaci protonů (Friedrich, 1998).

Dnes je již dobře prokázáno, že podjednotky NuoE, NuoF, NuoI a N-terminální doména NuoG obsahující vazebné místo pro Fe-S klastr mají své homologie v přídatných podjednotkách a doménách [NiFe]- a [FeFe]-hydrogenáz. Další podjednotky komplexu I již sdílejí podobné vlastnosti pouze s podjednotkami [NiFe]-hydrogenáz, podjednotka NuoB s malou podjednotkou a podjednotky NuoC a NuoD s velkou podjednotkou hydrogenázy. Nejvyšší sekvenční podobnost mezi NuoD a velkou podjednotkou se nachází v místech obklopujících Ni-Fe centrum hydrogenázy (Albracht & de Jong, 1997; Albracht & Hedderich, 2000). Dále lze zmínit hydrofobní podjednotky multimerních, membránových [NiFe]-

hydrogenáz (kapitola 3.1.4.), které jsou homologní s membránovými podjednotkami NuoH, NuoL, NuoM a NuoN komplexu I. Tyto hydrogenázy také fungují jako iontové pumpy (pro H^+ nebo Na^+), evoluční pojitko mezi hydrogenázami a komplexem I se tedy týká nejen elektronového přenosu, ale i jednotek pumpujících ionty, tj. spřažení elektronového transportu se získáváním energie chemiosmotickým mechanismem. Komplex I se mohl vyvinout z těchto hydrogenáz pumpujících ionty přidáním dalších vstupních domén pro elektrony, nahrazením Ni-Fe centra místem pro vazbu chinonu, a přidáním dalších membránových podjednotek (Hedderich, 2004).

Podjednotky NuoB a NuoD spojovací části komplexu I vykazují překvapivou podobnost s [NiFe]-hydrogenázami, a to včetně sekvence pro vazbu chinonu v NuoD, která se nachází ve velké podjednotce hydrogenázy blízko styku s malou podjednotkou. Na základě podobností hydrogenáz pumpujících protony s jednotlivými částmi komplexu I se ukázalo, že jednotka komplexu I podílející se na pumpování protonů se skládá minimálně z podjednotek NuoB, NuoD, NuoI, a NuoL. NuoD poskytuje vstupní bránu pro chinon a potenciální vstup protonového kanálu. Podjednotky NuoL, NuoM a NuoN, které zřejmě vznikly ztrojením původního genu bakteriálních H^+/K^+ antiporterů, pak poskytují transmembránový kanál protonové pumpy (Dupuis et al., 2001). Na obr. 9 je schématicky znázorněná podobnost komplexu I s multimerní, membránovou [NiFe]-hydrogenázou.



Obr. 9: Schématické znázornění podjednotek Ech hydrogenázy *M. barkeri* a komplexu I *E. coli*. Konzervované podjednotky obou enzymů jsou zobrazené tmavě šedou barvou. Velká písmena označují jednotlivé podjednotky enzymů. Zkratky: [NiFe], binukleární NiFe centrum; 4Fe, [4Fe-4S] klastr; 2Fe, [2Fe-2S] klastr; FMN, flavin mononukleotid; Q, ubichinon nebo menachinon (převzato z Hedderich, 2004).

7.2. Homologie mezi hydrogenázami a Narf proteiny

Narf je lidský protein, který se váže na C-konec prelaminu A obsahující motiv CaaX, jehož cysteinový zbytek je farnesylován a metylován. V jádře je prelamin A proteolytickým štěpením koncových 18 aminokyselin, včetně farnesylovaného cysteinového zbytku, zpracován na lamin A. Narf (nuclear prelamin A recognition factor) se nachází výhradně v jádře a jeho schopnost vázat prelamin A je dána právě farnesyací prelaminu A. Protein Narf vykazuje homologii s [FeFe]-hydrogenázami a eukaryotickými proteiny neznámé funkce (Barton & Worman, 1999).

Krátké Narf-like (podle lidského homologu) sekvence lze najít v široké škále různých eukaryotických genomů zahrnujících houby, rostliny i živočichy. Narf-like geny vykazují značnou podobnost s [FeFe]-hydrogenázami, zvláště co se týká konzervovaných cysteinů uplatňujících se při koordinaci jednoho z [4Fe-4S] klastrů a také H-klastru, který je jinak pro [FeFe]-hydrogenázy jedinečný. Na základě strukturních podobností se předpokládá, že Narf-like geny byly zděděny od [FeFe]-hydrogenáz, které ztratily některé strukturní vlastnosti (např. došlo ke snížení citlivosti na kyslík), zatímco jiné získaly (Horner et al., 2000). Narf-like proteinům nicméně chybí jeden z důležitých cysteinových zbytků přítomných v sekvenci H-klastru (obr. 3), přičemž tento cysteinový zbytek je při katalýze nepostradatelný. Biochemická data a sekvence Narf-like proteinů nasvědčují tomu, že tyto proteiny nejsou schopné metabolizovat H₂ (Meyer, 2007).

Otázkou zůstává, co sekvence [FeFe]-hydrogenáz dělají v tolika odlišných aerobních eukaryotech, když jinak je najdeme pouze v anaerobních organismech, a zdali mohou mít všechny Narf-like proteiny obecnou funkci. Jelikož jsou všechny dosud prozkoumané [FeFe]-hydrogenázy velmi citlivé vůči kyslíku, je nepravděpodobné, že by Narf-like proteiny fungovaly jako klasické hydrogenázy. Fe-S proteiny se vyskytují prakticky ve všech organismech a zastávají rozmanité funkce. Fe-S klastry těchto proteinů mohou umožňovat přenos elektronů, nebo se podílet na katalytické funkci proteinu. Jiné proteiny obsahující Fe-S klastry se mohou uplatňovat při detekci oxidativního stresu, nebo při genové regulaci. Lze tedy uvažovat o tom, že vlastnosti eukaryotických Narf-like proteinů jim umožňují účastnit se těchto procesů jako sensorické či regulační proteiny (Horner et al., 2000).

8. ZÁVĚR

Hydrogenázy jsou strukturně i funkčně různorodá skupina enzymů, jež lze rozdělit do několika fylogeneticky odlišných skupin a podskupin, které tvoří ucelený systém klasifikace. Dodnes bylo rozpoznáno a porovnáno nespočetné množství genových sekvencí hydrogenáz, které odhalily přítomnost těchto enzymů v celé řadě organismů včetně patogenů, dokonce se ukázalo, že některé druhy disponují více hydrogenázami. Krystalová struktura ukázala, že stavba aktivního místa jednotlivých skupin hydrogenáz se až na některé strukturní a chemické podobnosti výrazně liší. Co se týče maturace hydrogenáz, je tento proces dosud nejlépe prostudován u [NiFe]-hydrogenáz, i když maturační mechanismus [FeFe]-hydrogenáz byl již také částečně odhalen. Nicméně stále jsou zde nejasnosti, které potřebují vyřešit, jako např. biosyntéza a inkorporace dvouatomových ligandů, nebo kompletní objasnění maturace [Fe]-hydrogenáz metanogenních archebakterií.

Hlavní rolí hydrogenáz je oxidace H_2 či redukce protonů spřažená s elektronovým transportním řetězcem, který umožňuje získávat energii oxidací H_2 či substrátů s nižším redoxním potenciálem. Hydrogenázy však mohou také hrát úlohu při regulaci syntézy dalších hydrogenáz (senzorové hydrogenázy), nebo mohou pracovat jako elektronové pumpy a regulovat tak redoxní rovnováhu respiračního řetězce (obousměrné hydrogenázy). Některé hydrogenázy, které měly údajně hrát pouze úlohu terminálních oxidoreduktáz, se ve skutečnosti podílejí na přeměně energie díky tvorbě protonmotivní síly.

Zatímco struktura aktivního místa katalytické podjednotky je výjimečným rysem hydrogenáz, některé další domény a podjednotky těchto enzymů mají své homology v rámci jiných redoxních proteinů a komplexů, např. komplexu I respiračního řetězce, což poukazuje na značnou příbuznost mezi současnými proteinovými komplexy transformujícími energii.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Afting, C., Hochheimer, A., & Thauer, R. K. (1998). Function of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F₄₂₀ reduction with H₂. *Archives of Microbiology*, 169(3), 206-210.
- Albracht, S. P., & Hedderich, R. (2000). Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *FEBS Letters*, 485(1), 1-6.
- Albracht, S. P. & de Jong, A. M. P. (1997). Bovine-heart NADH:ubiquinone oxidoreductase is a monomer with 8 Fe-S clusters and 2 FMN groups. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1318(1-2), 92-106.
- Appel, J., Phunpruch, S., Steinmüller, K., & Schulz, R. (2000). The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(5-6), 333-338.
- Atanassova, A., & Zamble, D. B. (2005). *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *Journal of Bacteriology*, 187(14), 4689-4697.
- Barton, R. M., & Worman, H. J. (1999). Prenylated prelamin A interacts with Narf, a novel nuclear protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(42), 30008-30018.
- Blokesch, M., Albracht, S. P., Matzanke, B. F., Drapal, N. M., Jacobi, A., & Böck, A. (2004). The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *Journal of Molecular Biology*, 344(1), 155-167.
- Brazzolotto, X., Rubach, J. K., Gaillard, J., Gambarelli, S., Atta, M., & Fontecave, M. (2006). The [Fe-Fe]-hydrogenase maturation protein HydF from *Thermotoga maritima* is a GTPase with an iron-sulfur cluster. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 769-774.
- Buckel, W., & Thauer, R. K. (2013). Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827(2), 94-113.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., Van der Linden, E., Jones, A. K., Albracht, S. P., & Friedrich, B. (2005). [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 10(2-4), 181-196.
- Casalot, L., & Rousset, M. (2001). Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends in Microbiology*, 9(5), 228-237.
- De Lacey, A. L., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C., & Fernandez, V. M. (1997). Infrared spectroelectrochemical characterization of the [NiFe] hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *Journal of the American Chemical Society*, 119(31), 7181-7189.
- Driesener, R. C., Challand, M. R., McGlynn, S. E., Shepard, E. M., Boyd, E. S., Broderick, J. B., Peters, J. W., & Roach, P. L. (2010). [FeFe]-hydrogenase cyanide ligands derived from S-adenosylmethionine-dependent cleavage of tyrosine. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 49(9), 1687-1690.
- Dupuis, A., Prieur, I., & Lunardi, J. (2001). Toward a characterization of the connecting module of complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(3), 159-168.
- Fontecilla-Camps, J. C., Vobeda, A., Cavazza, C., & Nicolet, Y. (2007). Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chemical Reviews*, 107(10), 4273-4303.

- Forzi, L., & Sawers, R. G. (2007). Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals*, 20(3-4), 565-578.
- Fox, J. D., He, Y., Shelver, D., Roberts, G. P., & Ludden, P. W. (1996). Characterization of the region encoding the CO-induced hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6200-6208.
- Friedrich, T. (1998). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1364(2), 134-146.
- Fritsch, J., Scheerer, P., Frielingsdorf, S., Kroschinsky, S., Friedrich, B., Lenz, O., & Spahn, C. M. (2011). The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, 479(7372), 249-252.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1999). The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 7(5), 557-566.
- Gasper, R., Scrima, A., & Wittinghofer, A. (2006). Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 27492-27502.
- Happe, T., & Kaminski, A. (2002). Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 269(3), 1022-1032.
- Hedderich, R. (2004). Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(1), 65-75.
- Higuchi, Y., Yagi, T., & Yasuoka, N. (1997). Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, 5(12), 1671-1680.
- Horner, D. S., Foster, P. G., & Embley, T. M. (2000). Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 17(11), 1695-1709.
- Horner, D. S., Heil, B., Happe, T., & Embley, T. M. (2002). Iron hydrogenases - ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(3), 148-53.
- Hrdý, I., Tachezy, J., & Müller, M. (2008). Metabolism of Trichomonad Hydrogenosomes. In J. Tachezy (Ed.), *Hydrogenosomes and mitosomes: Mitochondria of anaerobic eukaryotes* (s. 113-145). Berlin: Springer-Verlag. ISBN 978-3-540-76732-9.
- Ide, T., Bäumer, S., & Deppenmeier, U. (1999). Energy conservation by the H₂:heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Gö1: identification of two proton-translocating segments. *Journal of Bacteriology*, 181(13), 4076-4080.
- Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., & Johnson, M. K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 247-281.
- Kim, D. H., & Kim, M. S. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8423-8431.
- King, P. W., Posewitz, M. C., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2006). Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2163-2172.

- Kleinhues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., & Friedrich, B. (2000). The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 16-24.
- Krasna, A. I., & Rittenberg, D. (1954). The mechanism of action of the enzyme hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*, 76(11), 3015-3020.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Unden, G., & Lancaster, C. R. (2002). Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553(1-2), 23-38.
- Kuchenreuther, J. M., George, S. J., Grady-Smith, C. S., Cramer, S. P., & Swartz, J. R. (2011). Cell-free H-cluster synthesis and [FeFe] hydrogenase activation: all five CO and CN⁻ ligands derive from tyrosine. *PloS One*, 6(5), e20346.
- Ma, K., Weiss, R., & Adams, M. W. (2000). Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1864-1871.
- Magalon, A., & Böck, A. (2000a). Analysis of the HypC-HycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21114-21120.
- Magalon, A., & Böck, A. (2000b). Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. *FEBS Letters*, 473(2), 254-258.
- Maier, T., & Böck, A. (1996). Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form. *Biochemistry*, 35(31), 10089-10093.
- Marques, M. C., Coelho, R., De Lacey, A. L., Pereira, I. A., & Matias, P. M. (2010). The three-dimensional structure of [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: a hydrogenase without a bridging ligand in the active site in its oxidised, "as-isolated" state. *Journal of Molecular Biology*, 396(4), 893-907.
- Meuer, J., Kuettner, H. C., Zhang, J. K., Hedderich, R., & Metcalf, W. W. (2002). Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5632-5637.
- Meyer, J. (2007). [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(9), 1063-84.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E., & Fontecilla-Camps, J. C. (1999). *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, 7(1), 13-23.
- Nicolet, Y., Rubach, J. K., Posewitz, M. C., Amara, P., Mathevon, C., Atta, M., Fontecave, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (2008). X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from *Thermotoga maritima*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18861-18872.
- Nicolet, Y., Fontecilla-Camps, J. C., & Fontecave, M. (2010a). Maturation of [FeFe]-hydrogenases: structures and mechanisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10750-10760.
- Nicolet, Y., Martin, L., Tron, C., & Fontecilla-Camps, J. C. (2010b). A glycyI free radical as the precursor in the synthesis of carbon monoxide and cyanide by the [FeFe]-hydrogenase maturase HydG. *FEBS Letters*, 584(19), 4197-4202.

- Nishihara, H., Miyashita, Y., Aoyama, K., Kodama, T., Igarashi, Y., & Takamura, Y. (1997). Characterization of an extremely thermophilic and oxygen-stable membrane-bound hydrogenase from a marine hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232(3), 766-770.
- Nixon, J. E., Field, 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. *The Biological Bulletin*, 204(1), 1-9.
- Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., Kano, K. & Higuchi, Y. (2005). Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure*, 13(11), 1635-1642.
- Ogata, H., Lubitz, W., & Higuchi, Y. (2009). [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Transactions*, (37), 7577-7587.
- Pan, G., Menon, A. L., & Adams, M. W. (2003). Characterization of a [2Fe-2S] protein encoded in the iron-hydrogenase operon of *Thermotoga maritima*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8(4), 469-474.
- Paschos, A., Glass, R. S., & Böck, A. (2001). Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Letters*, 488(1-2), 9-12.
- Peters, J. W. (1999). Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 670-676.
- Peters, J. W., Lanzilotta, W. N., Lemon, B. J., & Seefeldt, L. C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 282(5395), 1853-1858.
- Pilak, O., Mamat, B., Vogt, S., Hagemeyer, C. H., Thauer, R. K., Shima, S., Vornrhein, C., Warkentin, E., & Ermler, U. (2006). The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. *Journal of Molecular Biology*, 358(3), 798-809.
- Pilet, E., Nicolet, Y., Mathevon, C., Douki, T., Fontecilla-Camps, J. C., & Fontecave, M. (2009). The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly. *FEBS Letters*, 583(3), 506-511.
- Pohorelic, B. K., Voordouw, J. K., Lojou, E., Dolla, A., Harder, J., & Voordouw, G. (2002). Effects of deletion of genes encoding Fe-only hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough on hydrogen and lactate metabolism. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 679-686.
- Posewitz, M. C., King, P. W., Smolinski, S. L., Zhang, L., Seibert, M., & Ghirardi, M. L. (2004). Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25711-25720.
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S., & Böck, A. (2003). Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science*, 299(5609), 1067-70.
- Rossmann, R., Maier, T., Lottspeich, F., & Böck, A. (1995). Characterisation of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation. *European Journal of Biochemistry*, 227(1-2), 545-550.

- Roseboom, W., Blokesch, M., Böck, A., & Albracht, S. P. (2005). The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different. *FEBS Letters*, 579(2), 469-472.
- Rubach, J. K., Brazzolotto, X., Gaillard, J., & Fontecave, M. (2005). Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from *Thermotoga maritima*. *FEBS Letters*, 579(22), 5055-5060.
- Shepard, E. M., McGlynn, S. E., Bueling, A. L., Grady-Smith, C. S., George, S. J., Winslow, M. A., Cramer, S. P., Peters, J. W., & Broderick, J. B. (2010a). Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10448-10453.
- Shepard, E. M., Duffus, B. R., George, S. J., McGlynn, S. E., Challand, M. R., Swanson, K. D., Roach, P. L., Cramer, S. P., Peters, J. W., & Broderick, J. B. (2010b). [FeFe]-hydrogenase maturation: HydG-catalyzed synthesis of carbon monoxide. *Journal of the American Chemical Society*, 132(27), 9247-9249.
- Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K., & Ermler, U. (2008). The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science*, 321(5888), 572-575.
- Shomura, Y., Yoon, K. S., Nishihara, H., & Higuchi, Y. (2011). Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature*, 479(7372), 253-256.
- Schut, G. J., & Adams, M. W. (2009). The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4451-4457.
- Stephenson, M., & Stickland, L. H. (1931). Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of the enzyme. *The Biochemical Journal*, 25(1), 205-214.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., & Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 1-20.
- Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R., & Böck, A. (2000). Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *European Journal of Biochemistry*, 267(7), 1995-9.
- Verhagen, M. F., O'Rourke, T., & Adams, M. W. (1999). The hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, contains an unusually complex iron-hydrogenase: amino acid sequence analyses versus biochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1412(3), 212-229.
- Vignais, P. M., Billoud, B., & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(4), 455-501.
- Vignais, P. M., & Colbeau, A. (2004). Molecular biology of microbial hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology*, 6(2), 159-188.
- Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical Reviews*, 107(10), 4206-4272.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373(6515), 580-587.

- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C. (1996). Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 118(51), 12989-12996.
- Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B. W., Roseboom, W., Albracht, S. P., Garcin, E., Rousset, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (2005). Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(3), 239-249.
- Yagi, T., Kimura, K., Daidoji, H., Sakai, F., & Tamura, S. (1976). Properties of purified hydrogenase from the particulate fraction of *Desulfovibrio vulgaris*, Miyazaki. *Journal of Biochemistry*, 79(3), 661-671.
- Yagi, T., & Higuchi, Y. (2013). Studies on hydrogenase. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 89(1), 16-33.
- Zhang, J. W., Butland, G., Greenblatt, J. F., Emili, A., & Zamble, D. B. (2005). A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4360-4366.
- Zirngibl, C., van Dongen, W., Schwörer, B., von Büнау, R., Richter, M., Klein, A., & Thauer, R. K. (1992). H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry*, 208(2), 511-20.