

# Die Entschlüsselung der Biosynthese der schnellsten natürlichen Hydrogenase\*\*

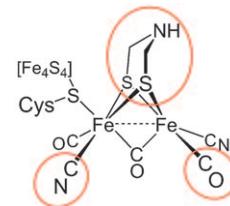
Thomas B. Rauchfuss\*

Biosynthese · Cofaktoren · Cyanide · Eisen · Hydrogenasen

Cofaktoren sind sehr spezielle Verbindungen, da sie die Bedürfnisse von Katalysatoren aufdecken, die nicht von den unzähligen Donormotiven von Proteinen befriedigt werden können. Bei Cofaktoren handelt es sich oft um die am einfachsten nachzubildende Komponente eines Biokatalysators. Natürlich sind Cofaktoren wichtig, da sie Licht in biosynthetische Vorgänge bringen, die oftmals neue Reaktionsmechanismen erkennen lassen. Einige der spektakulärsten wissenschaftlichen Leistungen, zum Beispiel die Erforschung von B<sub>12</sub>, sind das Ergebnis der Affinität von Chemikern zu Cofaktoren. Es ist faszinierend, dass Cofaktoren als Schlüsselemente in einem Zeitalter auftreten können, in dem die Energie zum zentralen Forschungsthema aufgestiegen ist: Wie schafft es die Natur, Katalysatoren zu entwerfen, die wichtige Gase wie H<sub>2</sub>, CO und CO<sub>2</sub> umsetzen?<sup>[1]</sup> Die Antworten wurden gerade gefunden, aber dies war ein hartes Stück Arbeit.

Es ist erwiesen, dass die Hydrogenasen eine besonders reichhaltige Quelle von Cofaktoren sind. Das aktive Zentrum der schnellsten Hydrogenasen, der [FeFe]-Hydrogenasen, besteht ausschließlich aus Cofaktoren: Das zweikernige Eisenzentrum koordiniert an sieben Cofaktoren, nämlich an einen 4Fe4S-Cluster, einen Amindithiolat-Cofaktor,<sup>[2]</sup> drei CO-Liganden und zwei Cyanid-Liganden (Schema 1). Die Biosynthesen dieser Liganden, abgesehen von dem 4Fe4S-Cluster, sind unbekannt. Diese Situation ändert sich jetzt rasch durch die Aufklärung des Reaktionswegs zu den Cyanidliganden.<sup>[3,4]</sup>

Cyanid wird von Anorganikern als der „starke Ligand“ schlechthin angesehen; es ist ein Bestandteil der ersten synthetischen Koordinationsverbindung, Berliner Blau. Der Ligand Cyanid steht an der Spitze vieler Listen, sei es bei den Stabilitätskonstanten seiner Komplexe oder in der spektrochemischen Reihe. Als Konsequenz hieraus handelt es sich bei Cyanid um ein starkes Gift, weil es wichtige Metalloenzyme der Atmungskette außer Kraft setzt.



**Schema 1.** Das aktive Zentrum („H-Cluster“) von [FeFe]-Hydrogenasen. Die drei verschiedenen Cofaktoren unbekannten Ursprungs wurden markiert. Roach und Mitarbeiter konnten vor kurzem zeigen, dass mindestens ein Cyanidligand aus Tyrosin entsteht und dass intermediär Dehydroglycin gebildet wird.<sup>[4]</sup>

Industrielle Cyanidsynthesen beginnen mit der Platin-katalysierten Reaktion von Gemischen aus Ammoniak, Methan und Sauerstoff. Bei der gängigsten Variante dieses Verfahrens, einer Aza-analogen Dampfreformierung, wird Sauerstoff ausgeschlossen, und außerdem wird H<sub>2</sub> gebildet. Durch diesen Prozess werden jährlich mehr als eine Milliarde Kilogramm an HCN hergestellt.<sup>[5]</sup>

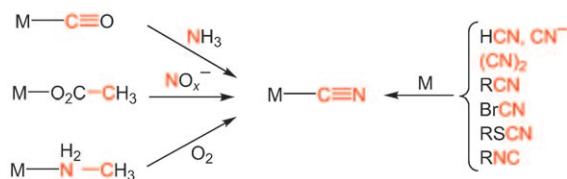
Es sind viele Wege bekannt, die zu Metallcyaniden führen,<sup>[6,7]</sup> was nicht überraschend ist, da es sich bei solchen Komplexen um äußerst stabile Verbindungen handelt. Typischerweise werden Metallcyanide ausgehend von Cyanidsalzen erhalten. Außerdem können sie aus vielen CN-haltigen Vorstufen wie Cyanwasserstoff, Dicyan, Halogencyanen und Thiocyanaten und sogar Nitriten<sup>[8]</sup> und Isonitriten<sup>[9]</sup> hervorgehen. Interessanter und weniger offensichtliche Wege zu Metallcyaniden gehen nicht von einer Vorstufe mit einer C≡N-Bindung aus. [Fe(CO)<sub>5</sub>] reagiert zum Beispiel mit Ammoniak (und seinen Äquivalenten<sup>[10]</sup>) unter Bildung von Cyanidkomplexen. Es scheint, dass solche Reaktionen über Carbamoyl-Intermediate ablaufen.<sup>[7,11]</sup> Metallkomplexe von Methylaminen neigen zur oxidativen Dehydrierung zu den entsprechenden Cyanidkomplexen (Schema 2).<sup>[12]</sup>

In Pflanzen und Gliederfüßern wird Cyanid ausgehend von mehreren Aminosäuren, aber nicht aus Glycin, produziert. Die Oxidation des Amins wird durch zwei verschiedene Enzyme der Cytochrom-P450-Familie katalysiert und führt zu α-Hydroxynitriten. Diese Verbindungen oder ihre Derivate werden von ihren Wirten als HCN-Vorstufen für die Abwehr von Fressfeinden verwendet.<sup>[13]</sup> Bakterien hingegen erzeugen Cyanid im Allgemeinen aus Glycin [Gl. (1)].



[\*] Prof. Dr. T. B. Rauchfuss  
Department of Chemistry  
University of Illinois at Urbana-Champaign  
Urbana, IL 61801 (USA)  
Fax: (+1) 217-244-3186

[\*\*] Die Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet wurden von dem NIH gesponsort. Prof. Richard S. Glass und Dr. David Schilter geben hilfreiche Ratschläge.

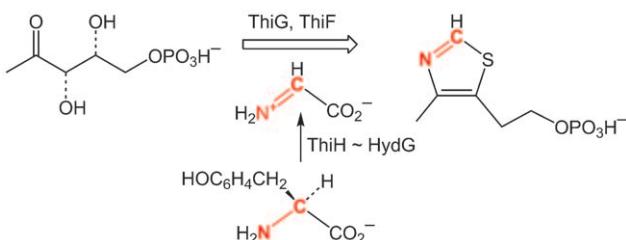


**Schema 2.** Verschiedene Wege zu Metallcyaniden.

Bei der Biosynthesevorstufe des Cyanids in der [NiFe]-Hydrogenase handelt es sich um das Stoffwechselprodukt Carbamoylphosphat ( $\text{H}_2\text{NC(O)OPO}_3\text{H}^-$ ). In dem Reaktionsweg nach Böck wird die  $\text{C(O)NH}_2$ -Einheit auf das C-terminalen Cysteinylthiol des Proteins HypE übertragen.<sup>[14]</sup> Die Dehydratisierung von Adenosintriphosphat und ergibt HypE-SCN, das eine Vorstufe zu mindestens einer, wahrscheinlich zu beiden Fe–CN-Untereinheiten dieser Hydrogenase ist. [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen sind jedoch genetisch nicht verwandt,<sup>[15]</sup> weswegen erwartet wurde, dass die Biosynthese des [FeFe]-Enzyms anders abläuft.

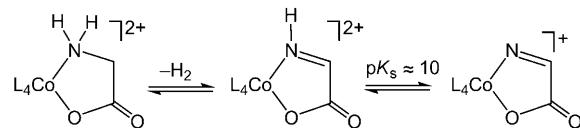
Aus der Entwicklung eines heterologen Expressionssystems für die [FeFe]-Hydrogenase von *Chlamydomonas reinhardtii* folgte, dass drei Proteine – HydE, HydF und HydG – an der Biosynthese der CO-, Cyanid- und Dithiolat-Liganden des H-Clusters beteiligt sind.<sup>[16]</sup> HydE und HydG sind Mitglieder der radikalischen S-Adenosylmethionin-Familie (SAM),<sup>[16]</sup> der Enzymklasse, die die Bildung der C-S-Bindungen in Liponsäure und Biotin bewirkt. Mithilfe eines zellfreien Ansatzes konnten Roach und Mitarbeitern zeigen, dass HydG Tyrosin in das Cyanid umwandelt, das für die Biosynthese des H-Clusters benötigt wird.<sup>[4]</sup> Eine weitere Illustration der besonderen Fähigkeiten radikalischer SAM-Enzyme bestand darin, dass Tyrosin zu *p*-Kresol und Dehydroglycin abgebaut wurde. Dabei wurde  $\text{CN}^-$  in das Medium freigesetzt, wo es nach Umwandlung in ein fluoreszierendes Derivat detektiert werden konnte. Dehydroglycin ist außerdem an der Bildung von Thiamin in einigen Bakterien beteiligt, wo es ebenfalls von radikalischen SAM-Enzymen erzeugt wird (Schema 3). Das Enzym in *Escherichia coli* wird ThiH genannt und weist eine beträchtliche Sequenzhomologie mit HydG auf.<sup>[3,17]</sup>

Die Details des Vorgangs, durch den Cyanid an das zweikernige Eisenzentrum gebunden wird, bleiben unbekannt. Als promiskuitiver Ligand muss  $\text{CN}^-$  wahrscheinlich direkt zu dem anvisierten  $\text{Fe}_2$ -Zentrum hingeführt werden und kann nicht einfach in dessen Nähe freigesetzt werden.



**Schema 3.** Die Rolle von Dehydroglycin bei der Biosynthese des Thiazol-Bausteins in Thiamin.

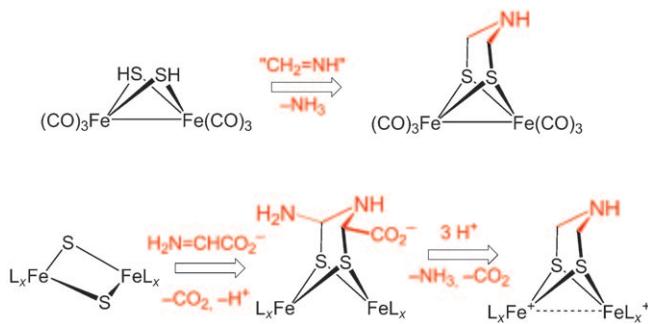
Das Fe-Zentrum, das das Cyanid binden wird, ist an einem Proteingerüst verankert,<sup>[18]</sup> was dieses Problem lösen könnte. Für Koordinationschemiker ist die Rolle von Dehydroglycin besonders faszinierend. Es sind einige Metallkomplexe von Dehydroglycin bekannt, die hauptsächlich durch eine oxidative Dehydrierung von Glycinat-Komplexen synthetisiert wurden (Schema 4).<sup>[19]</sup> Daher könnte man annehmen, dass



**Schema 4.** Die Bildung und Säure-Base-Reaktion eines Cobalt(III)-Komplexes von Dehydroglycin.

Cyanid auch hier durch die oxidative Zersetzung eines Eisen-Dehydroglycinat-Komplexes gebildet wird. Eine solche Umwandlung würde an die Biosynthese von Ethen erinnern, die über eine Eisen(II/III)-vermittelte Freisetzung von HCN aus Aminocyclopropancarbonsäuren verläuft.<sup>[20]</sup> Bei der Glyoxalsäure, die während der Hydrolyse von Dehydroglycin erhalten wird, handelt es sich um eine mögliche Quelle von CO. Anders als bei diesem (noch nicht bestätigten) biosynthetischen Szenario stammen die CO- und  $\text{CN}^-$ -Liganden der [NiFe]-Hydrogenase nicht aus derselben Vorstufe.<sup>[21]</sup>

Hinsichtlich der Biosynthese des Dithiolat-Cofaktors haben Pilet et al. vorgeschlagen, dass diese Untereinheit aus der Kondensation von zwei Äquivalenten Dehydroglycin mit einem 2Fe2S-Zentrum hervorgeht.<sup>[3]</sup> Dieser Weg erinnert an die bekannte Aminomethylierung von Eisensulfiden (Schema 5).<sup>[22]</sup>



**Schema 5.** Der metallorganische Weg zu dem Azadithiolat-Cofaktor und der von Pilet et al. vorgeschlagene Reaktionsverlauf.<sup>[3]</sup>

Die Aufklärung der Reaktionswege zu dem Dithiolat- und zu den drei CO-Liganden wird die Grundlage für weitere Untersuchungen bilden. Bei der Entdeckung neuer chemischer Prozesse haben sich Hydrogenasen bereits als besonders reichhaltige Quellen herausgestellt, und zwar nicht nur auf dem Gebiet der Katalyse, sondern auch für neue Synthesewege, die breiter anwendbar sein könnten.<sup>[23]</sup>

Eingegangen am 1. Februar 2010  
Online veröffentlicht am 20. Mai 2010

- 
- [1] J. C. Fontecilla-Camps, P. Amara, C. Cavazza, Y. Nicolet, A. Volbeda, *Nature* **2009**, *460*, 814.
- [2] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6592.
- [3] E. Pilet, Y. Nicolet, C. Mathevon, T. Douki, J. C. Fontecilla-Camps, M. Fontecave, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 506.
- [4] R. C. Driesener, M. R. Challand, S. E. McGlynn, E. M. Shepard, E. S. Boyd, J. B. Broderick, J. W. Peters, P. L. Roach, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1731; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1687.
- [5] E. Gail, S. Gos, R. Kulzer, J. Loröscher, A. Rubo, M. Sauer in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [6] W. P. Fehlhammer, M. Fritz, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1243.
- [7] R. S. Glass, A. Paschos, S. Reissmann, M. S. Singh, H. Wang, A. Böck, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2005**, *180*, 1183.
- [8] N. Hiroshi, I. Masumi, K. Kouji, U. Kensuke, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 882.
- [9] J. M. Bassett, G. K. Barker, M. Green, J. A. K. Howard, F. G. A. Stone, W. C. Wolsey, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1981**, *219*; K. Halbauer, D. Dönnecke, H. Görts, W. Imhof, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2006**, *632*, 1477.
- [10] E. J. Lyon, I. P. Georgakaki, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3268.
- [11] H. Uchida, K. Bando, *J. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, *29*, 40; H. Behrens, *Adv. Organomet. Chem.* **1980**, *18*, 1.
- [12] S. E. Diamond, G. M. Tom, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2661; W. R. McWhinnie, J. D. Miller, J. B. Watts, D. Y. Waddan, *Inorg. Chim. Acta* **1973**, *7*, 461.
- [13] M. Zagrobelny, S. Bak, B. L. Møller, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1457.
- [14] S. Reissmann, E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass, A. Böck, *Science* **2003**, *299*, 1067.
- [15] J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, C. Cavazza, Y. Nicolet, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4273.
- [16] M. C. Posewitz, P. W. King, S. L. Smolinski, L. Zhang, M. Seibert, M. L. Ghirardi, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25711.
- [17] M. Kriek, F. Martins, M. R. Challand, A. Croft, P. L. Roach, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9223; T. P. Begley, A. Chatterjee, J. W. Hanes, A. Hazra, S. E. Ealick, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 118.
- [18] S. E. McGlynn, E. M. Shepard, M. A. Winslow, A. V. Naumov, K. S. Duschene, M. C. Posewitz, W. E. Broderick, J. B. Broderick, J. W. Peters, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 2183–2187.
- [19] T. Mori, M. Yamaguchi, M. Sato, T. Yamagishi, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *267*, 329; L. Bendahl, A. Hammershøi, D. K. Jensen, S. Larsen, A. Riisager, A. M. Sargeson, H. O. Sørensen, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 3054; R. Siebenlist, H.-W. Fruehauf, K. Vrieze, H. Kooijman, W. J. J. Smeets, A. L. Spek, *Organometallics* **2000**, *19*, 3016.
- [20] Z. Lin, S. Zhong, D. Grierson, *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3311; D. L. Tierney, A. M. Rocklin, J. D. Lipscomb, L. Que, Jr., B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7005.
- [21] L. Forzi, P. Hellwig, R. K. Thauer, R. G. Sawers, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3317; O. Lenz, I. Zebger, J. Hamann, P. Hildebrandt, B. Friedrich, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3322.
- [22] H. Li, T. B. Rauchfuss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 726; J. L. Stanley, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *Organometallics* **2007**, *26*, 1907.
- [23] F. Gloaguen, T. B. Rauchfuss, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 100.
-