

Untersuchung des katalytischen Zentrums der O₂-toleranten NAD⁺-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* H16 mit In-situ-EPR- und -FTIR-Spektroskopie**

Marius Horch, Lars Lauterbach, Miguel Sagg, Peter Hildebrandt, Friedhelm Lendzian, Robert Bittl, Oliver Lenz* und Ingo Zebger*

[NiFe]-Hydrogenasen katalysieren die reversible Spaltung von Wasserstoff in je zwei Protonen und Elektronen.^[1] Dieser Prozess spielt im Metabolismus zahlreicher Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Für die meisten [NiFe]-Hydrogenasen ist der H₂-Katalyzyklus sehr sauerstoffempfindlich, da molekularer O₂ eine hohe Bindungsaffinität zum aktiven Zentrum aufweist. Einige Organismen sind jedoch in der Lage, den H₂-Zyklus sogar bei Umgebungssauerstoffkonzentrationen zu katalysieren.^[2,3] In diesem Zusammenhang ist das β-Proteobakterium *Ralstonia eutropha* H16 (*Re*) zu nennen, das drei verschiedene [NiFe]-Hydrogenasen beherbergt, die allesamt eine bemerkenswerte Sauerstofftoleranz aufweisen.^[2-4] Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Im Fall der regulatorischen *Re*-Hydrogenase (RH) wird angenommen, dass ein verengter Gaskanal den O₂-Zugang zum aktiven Zentrum verhindert.^[4] Die membrangebundene *Re*-Hydrogenase (MBH) weist in der Nähe des aktiven Zentrums einen FeS-Cluster mit ungewöhnlich hohem Redoxpotential auf^[5] – eine Eigenschaft, die möglicherweise mit der raschen Aktivierung der O₂-inhibierten MBH bei hohem Potential zusammenhängt.^[6] Bei der löslichen Hydrogenase (soluble hydrogenase, SH) von *Re* handelt es sich um ein cytoplasmatisches NAD⁺-reduzierendes Enzym, das aus sechs Untereinheiten besteht und strukturelle Ähnlichkeiten zur cyanobakteriellen bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenase aufweist.^[2,7] Für die gereinigte SH wurde auf

Basis zahlreicher biochemischer und spektroskopischer Studien ein modifiziertes katalytisches Zentrum postuliert.^[2,8,9] Im Unterschied zu „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen, in denen das Fe des aktiven Zentrums durch einen CO- und zwei CN⁻-Liganden im „Low-spin“-Eisen(II)-Zustand stabilisiert wird, ließen Fourier-Transformations-Infrarot(FTIR)-Spektroskopie und begleitende chemische Analysen für beide Metallionen des aktiven Zentrums der SH die Koordination je eines zusätzlichen Cyanids vermuten. Ferner wurde postuliert, dass insbesondere das Nickel-gebundene Cyanid die Bildung der Ni_x-A-Spezies, die den höchstoxidierten, O₂-inaktivierte Zustand in anaeroben „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen repräsentiert, verhindert.^[9]

Kontroverse Resultate wurden hinsichtlich des Auftretens paramagnetischer Nickelzustände in der SH erhalten. Der Ni_x-B-Zustand, der einem oxidierten aktiven Zentrum mit einem verbrückenden Hydroxid-Liganden zwischen Ni und Fe entspricht, konnte für das gereinigte Enzym nicht beobachtet werden. Allerdings zeigten Studien an SH-Präparationen, die mit einem Überschuss an NADH oder Dithionit behandelt wurden, EPR-Signale (EPR = elektronenparamagnetische Resonanz) und FTIR-Banden, die dem katalytischen Ni_x-C-Intermediat und dem lichtinduzierten, unphysiologischen Ni_x-L-Zustand zugeordnet werden konnten.^[10,11] Es wurde jedoch angenommen, dass diese Redoxzustände, die typischerweise in anaeroben „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen zu beobachten sind, nicht am Katalyzyklus der SH beteiligt sind.^[2,12] Stattdessen wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, in dem das Ni während der gesamten Katalyse in einem nicht EPR-aktiven Ni^{II}-Zustand verbleibt, sodass Änderungen des Redoxzustands am aktiven Zentrum lediglich anhand der Wellenzahl der CN-Streckschwingung des am Ni gebundenen Cyanids zu detektieren sind. Die vollständig reduzierten, nicht EPR-aktiven Ni^{II}-SR-Zustände, die bis zu drei Subpopulationen enthalten und normalerweise in katalytisch aktiven „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen auftreten, konnten für die SH nicht durch Reduktion mit H₂ und/oder NADH eingestellt werden.

Obgleich die SH unter aeroben Bedingungen katalytisch aktiv ist, kann sie durch Sauerstoff inaktiviert werden, sodass die gereinigte SH mit katalytischen Mengen an NADH oder NADPH reduktiv aktiviert werden muss.^[2,12] Informationen über zusätzliche Cofaktoren der SH wurden aus EPR-spektroskopischen Untersuchungen erhalten, die Signale eines reduzierten [2Fe2S]-Clusters und eines Flavinradikals (FMN-Semichinon) nach H₂-Inkubation in Gegenwart katalytischer Mengen NAD(P)H oder nach dem Zusatz eines NADH-

[*] M. Horch,^[+] Dr. M. Sagg,^[+] Prof. P. Hildebrandt, Dr. F. Lendzian, Dr. I. Zebger

Institut für Chemie, Sekr. PC14, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-3142-1122
ingo.zebger@tu-berlin.de

L. Lauterbach,^[+] Dr. O. Lenz
Institut für Biologie/Mikrobiologie, Humboldt-Universität zu Berlin
Chausseestraße 117, 10115 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-8102
E-Mail: oliver.lenz@cms.hu-berlin.de

Prof. R. Bittl
Institut für Physik, Freie Universität Berlin
Arnimallee 14, 10115 Berlin (Deutschland)

[+] Die ersten drei Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen, ihre Namen sind alphabetisch aufgeführt.

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG gefördert (SFB498 und dem Exzellenzcluster „Unicat“). Die Autoren danken Bärbel Friedrich und Siem Albracht für kritische Hinweise und hilfreiche Diskussionen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002197> zu finden.

Überschusses lieferten. Lediglich eine rigorose Reduktion mit Dithionit führte zur Detektion zusätzlicher EPR-Signale, die einem [4Fe4S]-Cluster zugeordnet werden konnten.^[2]

Bisher wurden spektroskopische Untersuchungen der SH ausschließlich an gereinigten Enzymproben durchgeführt.^[2,9] In der vorliegenden Studie haben wir die SH erstmals mit einem kombinierten EPR- und FTIR-spektroskopischen Ansatz *in situ*, d.h. als Bestandteil des Cytoplasmas in ganzen Zellen, untersucht. Alle Experimente wurden mit einem *Re*-Wildtyp-Derivat durchgeführt, das ausschließlich die lösliche Hydrogenase synthetisiert. Die Gene, welche die das aktive Zentrum enthaltenden, großen Untereinheiten der beiden anderen *Re*-Hydrogenasen kodieren, wurden durch markierungsfreie „In-frame“-Deletion inaktiviert. Somit kann eine Überlagerung der spektroskopischen Signale für die SH mit denen für RH und MBH ausgeschlossen werden.

Abbildung 1 zeigt die EPR-Spektren unterschiedlich behandelter *Re*-Zellen. Im Spektrum A der frisch geernteten Zellen bei 35 K sind im niederen Feldbereich starke Ni-Signale mit gut aufgelösten g_x - und g_y -Komponenten sichtbar. Aus Simulationen erhaltene g -Werte von 2.20, 2.14 und 2.01 mit einer Linienbreite von 1.8 mT konnten dem Ni_a-C-Redoxzustand (formal Ni^{III}) zugeordnet werden, der auch in „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen gefunden wird.^[13] Ferner

wurden auch Signale für FMN ($g = 2.00$) und einen [2Fe2S]⁺-Cluster detektiert. Diese Beobachtungen stimmen mit den reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma überein. Eine relative Spinquantifizierung über den Vergleich der doppelt-integrierten Simulation von Ni_a-C und dem quantitativ reduzierten [2Fe2S]⁺-Cluster ergab einen Ni_a-C-Gehalt von ca. 60% in frisch geernteten Zellen. In Übereinstimmung mit Beobachtungen, die auch bei „Standard“-Hydrogenasen gemacht wurden, wird der Ni_a-C-Zustand der SH durch 30-minütige Weißlichtbestrahlung bei $T = 80$ K vollständig in Ni_a-L umgewandelt.^[14] Eine 10-minütige Dunkeladaptation bei $T > 100$ K führt zu einer vollständigen Rückumwandlung zu Ni_a-C. Die Simulation des Differenzspektrums bei 35 K liefert g -Werte von 2.27, 2.10 und 2.05 mit einer Linienbreite von 1.5 mT für den Ni_a-L-Zustand (Abbildung 1B).

Nach 30-minütiger Inkubation mit H₂ verschwinden die Ni_a-C-Signale (Abbildung 1C), während die Signale für [2Fe2S]⁺-Cluster und FMN unverändert bleiben. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass das aktive Zentrum in einem Einelektronenprozess zu den auch in „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen gefundenen Ni_a-SR-Zuständen reduziert wird. Zum anderen führt die Oxidation von SH-haltigen Zellen, die nach Permeabilisierung durch Behandlung mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) und anschließender Inkubation mit einem Überschuss an NAD⁺ unter anaeroben Bedingungen erhalten wurden, zum Verschwinden sämtlicher Ni- und FeS-bezogenen EPR-Signale (Abbildung 1D). Lediglich Hintergrundsignale einer unbekannten zellulären paramagnetischen Spezies sind noch sichtbar. Signale, die den oxidierten Ni^{III}-Spezies Ni_a-B oder Ni_a-A zuzuordnen sind, konnten in unseren Experimenten nicht identifiziert werden. Ähnliche Resultate wurden auch im Rahmen der Oxidation mit O₂ erhalten (Daten nicht gezeigt).

Die zugehörigen FTIR-Daten sind in Abbildung 2 gezeigt. Da die Untersuchungen an Zellen durchgeführt wurden, sind die Intensitäten der CO- und CN-Banden in den FTIR-Spektren relativ gering und von einer stark modulierten Basislinie überlagert. Um diese Banden zuverlässiger identifizieren zu können, wurde die zweite Ableitung der Spektren zugrundegelegt, in der Absorptionsbanden durch negative Peaks repräsentiert werden. Abbildung 2 A zeigt das FTIR-Spektrum von frisch geernteten *Re*-Zellen, das von einer CO-Absorption bei 1961 cm⁻¹ dominiert wird. Die zugehörigen CN-Streckschwingungsbanden liegen bei 2080 und 2091 cm⁻¹. Diese Banden sind dem Ni_a-C-Zustand der SH zugeordnet, der in Übereinstimmung mit der EPR-Spinquantifizierung der Hauptkomponente entspricht. Die Streckschwingungsbanden, die Ni_a-C zugeordnet werden, sind im Vergleich zu früheren Tief temperatur-Untersuchungen am isolierten Enzym leicht (um 2–5 cm⁻¹) zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben.^[9] Diese Abweichungen könnten auf temperaturabhängige Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk und/oder unterschiedliche pH-Werte im Cytoplasma und im Puffer des gereinigten Enzyms zurückzuführen sein.^[15,16] Des Weiteren sind Absorptionsbanden im niederen Frequenzbereich der CO- und CN-Streckschwingungen bei 1913 und 1922 cm⁻¹ bzw. 2052 und 2068 cm⁻¹ zu beobachten. Die beiden letztgenannten Banden sind aufgrund der Überlappung mit benachbarten Absorptionen

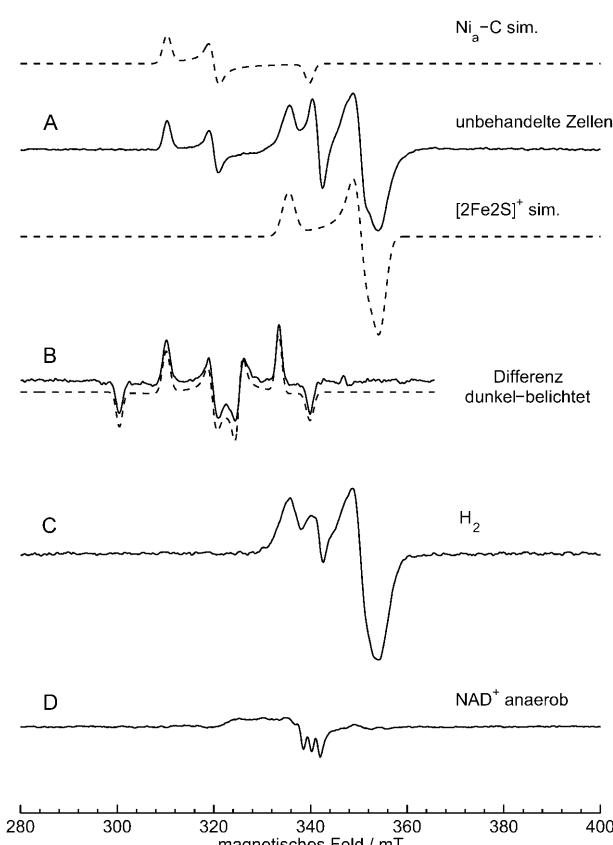


Abbildung 1. Bei 35 K *in situ* aufgenommene EPR-Spektren der *Re*-SH (durchzogene Linien) sowie dazugehörige Simulationen (gestrichelte Linien). A) Frisch geerntete Zellen; B) Differenz zwischen dunkeladaptierten und belichteten Zellen; C) frisch geerntete Zellen, die mit H₂ inkubiert wurden; D) CTAB-behandelte Zellen, anaerob mit NAD⁺ oxidiert.

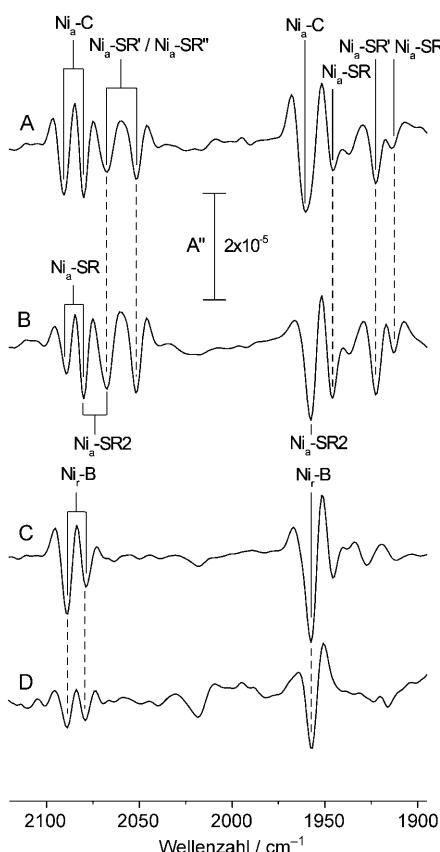


Abbildung 2. In-situ-FTIR-Spektren (zweite Ableitung) der löslichen Hydrogenase: A) frisch geerntete Zellen; B) nach 30 min Inkubation mit 1 bar H₂, C) anaerobe Oxidation mit NAD⁺ und D) aerobe Oxidation.

verbreitert. Nach Inkubation mit 1 bar H₂ verstärkt sich die Intensität dieser Banden signifikant (Spektrum B), sodass diese den reduzierten Spezies Ni₄-SR' und Ni₄-SR'' zugeordnet werden. Die Banden bei 1946, 2080 und 2090 cm⁻¹ werden dem Ni₄-SR-Zustand zugeordnet. Die Identifizierung der zugehörigen CO-Streckschwingungen wird durch zuvor ermittelte spektroelektrochemische FTIR-Daten der gereinigten SH gestützt, die unter reduktiven Bedingungen bei -391 mV (gegen die Normalwasserstoffelektrode) aufgenommen wurden.^[12] Ferner repräsentieren die Banden bei 1958, 2068 und 2080 cm⁻¹ vermutlich eine weitere reduzierte, nicht EPR-aktive Ni₄-SR2-Spezies. Die Zuordnung der einzelnen reduzierten Spezies beruht auf kürzlich durchgeföhrten FTIR-spektroskopischen Studien der bidirektionalen Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie der MBH aus *Re*^[6,7] (Tabelle 1).

Die Inkubation von CTAB-behandelten Zellen mit einem Überschuss an NAD⁺ unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 2C) oder mit Luft (Abbildung 2D) führt zu drei Banden bei 1957, 2079 und 2089 cm⁻¹. In Übereinstimmung mit Daten, die kürzlich für die bidirektionale Hydrogenase von *Synechocystis* sp. ermittelt wurden, können diese Banden einem „Ni₄-B-artigen“ Zustand zugeordnet werden, der allerdings nicht EPR-aktiv ist. Solch eine „Ni₄-B-artige“ Spezies wurde, wie auch der ungewöhnliche reduzierte Ni₄-SR2-Zu-

Tabelle 1: CO- und CN-Streckschwingungsfrequenzen (in cm⁻¹) aller Redoxzustände, die in SH-haltigen Zellen und für die isolierte SH^[12] beobachtet wurden. Werte in Klammern wurden für die bidirektionale Hydrogenase von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*) und die MBH von *Re* H16 (°) ermittelt.^[7,17,18a]

Redoxzustand	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CN})$	
Ni ₄ -B-ähnlich	1957 (1957*)	2079 (2076*)	2089 (2088*)
Ni ₄ -C	1961 (1968*)	2080 (2079*)	2091 (2093*)
	1963 bei 35 K ^[12]	2084 bei 35 K ^[12]	2096 bei 35 K ^[12]
Ni ₄ -SR	1946 (1948°)	2080 (2068°)	2090 (2087°)
	1945 (-391 mV) ^[12]	n.b.	n.b.
Ni ₄ -SR'	1922 (1926°)	2052 (2049°)	2068 (2075°)
	1921 (-391 mV) ^[12]	n.b.	n.b.
Ni ₄ -SR''	1913 (1919°)	2052 (2046°)	2068 (2071°)
	1912 (-391 mV) ^[12]	n.b.	n.b.
Ni ₄ -SR2	1958 (1955*)	2068 (2063*)	2080 (2079*)

[a] Abkürzungen nach Lit. [15]: r: „ready“; a: aktiviert; B und C entsprechen einem oxidierten bzw. einem intermediären EPR-aktiven Zustand; R, R2: reduzierte Zustände; S: nicht EPR-aktiv (EPR-„silent“); n.b.: nicht bestimmt in Lit. [12].

stand, bisher ausschließlich in [NiFe]-Hydrogenasen gefunden, die ein heterodimeres NADH-Oxidoreduktase-Modul aufweisen.^[7] Ein Überblick der verschiedenen Zustände des aktiven Zentrums ist in Schema S1 der Hintergrundinformationen zu finden.

Die in dieser Studie gewonnenen EPR-spektroskopischen Daten zeigen, dass der Hauptanteil der *Re*-SH in frisch geernteten Zellen im Ni₄-C-Zustand vorliegt. Begleitende FTIR-spektroskopische Untersuchungen von ganzen Zellen führen zur Identifizierung der katalytisch aktiven, EPR-„silent“ Ni₄-SR- und Ni₄-SR2-Zustände, die zuvor auch in anderen [NiFe]-Hydrogenasen gefunden wurden.^[5,7,15-18] Die reversiblen Übergänge Ni₄-C=Ni₄-L und Ni₄-C=Ni₄-SRx weisen auf ein intaktes katalytisches Zentrum hin (siehe Hintergrundinformationen). Anaerobe wie auch aerobe Oxidation führen zu einem vollständigen Verschwinden aller der Ni₄-C-Spezies zuzuordnenden Banden. Stattdessen wurde ein „Ni₄-B-artiger“ Zustand induziert, der durch eine CO- und zwei CN-Streckschwingungsbanden an spezifischen Positionen charakterisiert ist. Es bleibt jedoch zu klären, ob die spektralen Charakteristika einen „echten“ Ni₄-B-Zustand beschreiben, der aufgrund von Spinkopplungen mit einem weiteren paramagnetischen Zentrum nicht EPR-aktiv ist, oder ob lediglich eine „Ni₄-B-artige“ Spezies mit einem formalen Ni^{II}-Zustand vorliegt.

Zwei weitere Zellbehandlungen, unter anderem die aerobe Permeabilisierung von Zellen durch drei aufeinanderfolgende Einfrier-Auftau-Zyklen ohne Zusatz jeglicher Detergenzien, führten ebenfalls zur Bildung dieses speziellen Zustands (siehe Hintergrundinformationen). Bemerkenswerterweise war es möglich, die katalytisch aktiven Zustände durch H₂-Inkubation des oxidierten Enzyms wiederherzustellen. Ein komplett reversibles Redoxverhalten der SH infolge des Wechsels von einer Inertgas- zu einer oxidierenden Atmosphäre, und umgekehrt, konnte auch für lithoautotroph gewachsene *Re*-Zellen nachgewiesen werden (siehe die Hintergrundinformationen).

Die vorliegende In-situ-Studie belegt, dass das aktive Zentrum der *Re*-SH einen „Standardsatz“ anorganischer Liganden – ein CO und zwei CN[–] – enthält. Diese Beobachtung widerspricht früheren Untersuchungen der gereinigten SH, welche die Koordination zweier zusätzlicher Cyanide am aktiven Zentrum vermuten ließen.^[2,8,9,12] Folglich implizieren unsere Resultate, dass der Mechanismus für die Sauerstofftoleranz, der aus den Ergebnissen früherer Untersuchungen abgeleitet wurde, überdacht werden muss. Unsere Daten demonstrieren weiterhin, dass die Zusammensetzung des Cytoplasmas erwartungsgemäß einen signifikanten Einfluss auf das Redoxverhalten der SH hat. Hier sind unter anderem Reaktionen mit Reduktionsmitteln (z.B. H₂, NAD(P)H), Oxidationsmitteln (z.B. NAD(P)⁺, O₂), Protonen (d.h. pH-Wert), Salzen, Osmolyten und anderen Proteinen zu nennen. Weiterhin unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse, dass die funktionelle und strukturelle Integrität von Proteinen gegebenenfalls die Bewahrung der nativen Umgebung erfordert, womit sich neue Herausforderungen für die spektroskopische In-situ-Untersuchung von Enzymen ergeben.

Eingegangen am 14. April 2010,
veränderte Fassung am 17. Juni 2010
Online veröffentlicht am 20. September 2010

Stichwörter: Biokatalyse · EPR-Spektroskopie ·
FTIR-Spektroskopie · Hydrogenasen · Sauerstofftoleranz

-
- [1] *Hydrogen As a Fuel* (Hrsg.: R. Cammack, M. Frey, R. Robson), Taylor and Francis **2001**.
 [2] T. Burgdorf, S. Löscher, P. Liebisch, E. Van der Linden, M. Galander, F. Lendzian, W. Meyer-Klaucke, S. P. J. Albracht, B.
-

Friedrich, H. Dau, M. Haumann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 576.

- [3] K. A. Vincent, J. A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16951.
 [4] T. Bahrke, O. Lenz, N. Krauss, B. Friedrich, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23791.
 [5] M. Sagg, I. Zebger, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, P. Hildebrandt, F. Lendzian, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16264.
 [6] M. Ludwig, J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong, O. Lenz, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 465.
 [7] F. Germer, I. Zebger, M. Sagg, F. Lendzian, R. Schulz, J. Appel, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 36462.
 [8] R. P. Happe, W. Roseboom, G. Egert, C. G. Friedrich, C. Massan, B. Friedrich, S. P. J. Albracht, *FEBS Lett.* **2000**, *466*, 259.
 [9] E. Van der Linden, T. Burgdorf, M. Bernhard, B. Bleijlevens, B. Friedrich, S. P. J. Albracht, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 616.
 [10] A. Erkens, K. Schneider, A. Müller, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 99.
 [11] C. Gessner, Dissertation, TU Berlin, **1996**.
 [12] E. Van der Linden, T. Burgdorf, A. L. De Lacey, T. Bahrke, M. Scholte, V. M. Fernandez, B. Friedrich, S. P. J. Albracht, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 247.
 [13] S. Foerster, M. van Gastel, M. Brecht, W. Lubitz, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 51.
 [14] M. Brecht, M. van Gastel, T. Bahrke, B. Friedrich, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13075.
 [15] A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, R. Cammack, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4304.
 [16] C. Fichtner, C. Laurich, E. Bothe, W. Lubitz, *Biochemistry* **2006**, *45*, 9706.
 [17] S. Kurkin, S. J. George, R. N. F. Thorneley, S. P. J. Albracht, *Biochemistry* **2004**, *43*, 6820.
 [18] B. Bleijlevens, F. A. van Broekhuizen, A. L. De Lacey, W. Roseboom, V. M. Fernandez, S. P. J. Albracht, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 743.