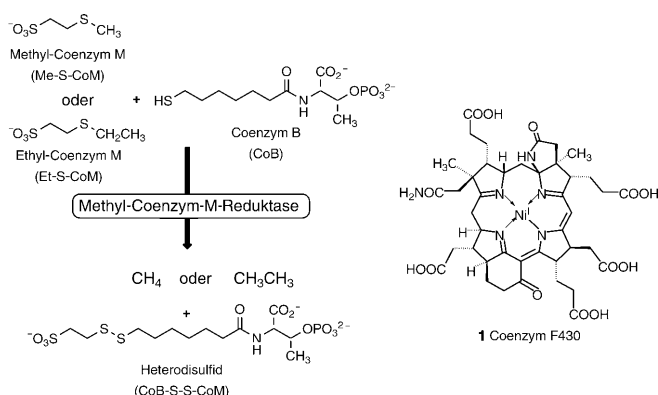


Zwischenprodukte im Katalysezyklus von Methyl-Coenzym-M-Reduktase: Das Muster des Isotopenaustauschs ist in Einklang mit der Bildung eines σ -Alkan-Nickel-Komplexes**

Silvan Scheller, Meike Goenrich, Stefan Mayr, Rudolf K. Thauer und Bernhard Jaun*

Der letzte Schritt der biologischen Methanbildung wird in allen methanogenen Archaea durch das nickelhaltige Enzym Methyl-Coenzym-M-Reduktase (MCR) katalysiert.^[1] Dabei werden die beiden Substrate Methyl-Coenzym M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$) und Coenzym B (CoB-SH) in Methan und das entsprechende Heterodisulfid (CoB-S-S-CoM) umgewandelt (Schema 1).



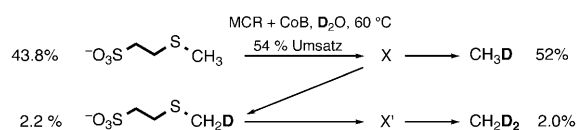
Schema 1. Die in methanogenen Archaea von der Methyl-Coenzym-M-Reduktase katalysierte Reaktion und die Struktur der prosthetischen Gruppe F430. Aus dem natürlichen Substrat Methyl-Coenzym M wird Methan, aus dem nichtnatürlichen Substrat Ethyl-Coenzym M wird Ethan gebildet.

MCR ist aus drei verschiedenen Proteinketten als C_2 -symmetrischer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Komplex aufgebaut.^[2] Jede der beiden aktiven Stellen enthält ein Molekül des Nickel-Hydrocorphinats F430 (**1**).^[3] Das Enzym ist nur dann aktiv, wenn das

zentrale Nickelion im Oxidationszustand Ni^{I} vorliegt,^[4] und es ist seit längerem bekannt, dass das vierte Wasserstoffatom im Produkt Methan ursprünglich aus dem wässrigen Medium stammt.^[5] Mit Substratanaloga und Inhibitoren konnten zwar verschiedene Enzymzustände mit Ni-H -,^[6] Ni-C -^[7] und Ni-S -Bindungen^[8] durch ESR-Spektroskopie charakterisiert werden, aber es ist bisher nie gelungen, ein Zwischenprodukt auf dem natürlichen Katalyseweg spektroskopisch zu beobachten. Der Mechanismus dieser ungewöhnlichen Reaktion ist deshalb nach wie vor unbekannt.

Wir berichten hier, dass MCR den Einbau von Deuterium aus dem Medium nicht nur in das Produkt Methan, sondern auch in das Substrat katalysiert. Untersuchungen mit stabilen Isotopen zeigen, dass (mindestens) ein Zwischenprodukt gebildet wird, in dem die C-S-Bindung gebrochen ist, und über welches die Kohlenstoff-gebundenen Wasserstoffatome der S-Alkyl-Gruppe des Substrats mit Deuterium aus dem Lösungsmittel austauschen können.

In Assays mit reinem Enzym (MCR-I), $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ und CoB-SH in deuteriertem Medium entstand gemäß $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nicht nur CH_3D (das erwartete Produkt), sondern in signifikanter Menge auch CH_2D_2 (siehe Abbildung S1.1 in den Hintergrundinformationen).^[5c,9] Um zu klären, ob die Bildung von CH_2D_2 auf den Einbau von D ins Substrat zurückzuführen ist, wurde auch das Substrat nach Teilumsatz $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass die S-Methyl-Gruppe von Methyl-Coenzym M tatsächlich partiell deuteriert wird: Nach einem Umsatz von 54 % enthielt das nicht umgesetzte Substrat 4.8 % $\text{CH}_2\text{D-S-CoM}$ (Schema 2; für Bedingungen und Spektren siehe Abschnitt 1.2 der Hintergrundinformationen).^[10]



Schema 2. Bildung von doppelt markiertem Methan und Deuteriumaustausch in die S-Methyl-Gruppe von Methyl-Coenzym M durch Inkubation mit MCR in D_2O .

Das nichtnatürliche Substrat Ethyl-Coenzym M wird von MCR in Ethan umgewandelt,^[11] allerdings etwa 200-mal langsamer als das natürliche Substrat Methyl-Coenzym M in Methan.^[11c] Wenn Ethyl-Coenzym M unter gleichen Bedingungen wie Methyl-Coenzym M mit Enzym in D_2O inkubiert wurde, fanden wir wiederum Deuteriumeinbau ins Substrat,

[*] S. Scheller, Dr. S. Mayr, Prof. B. Jaun
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 44-632-1475
E-Mail: jaun@org.chem.ethz.ch

Dr. M. Goenrich, Prof. R. K. Thauer
Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10, 35403 Marburg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (S.S., S.M. und B.J.; Gesuchs-Nr. 200020-119752) und von der Max-Planck-Gesellschaft sowie dem Fonds der Chemischen Industrie (M.G. und R.K.T.) unterstützt. Wir danken Reinhard Böcher für technische Unterstützung und Dr. Marc-Olivier Ebert für Hilfe bei speziellen NMR-Experimenten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003214> zu finden.

zu unserer Überraschung allerdings an beiden Kohlenstoffzentren der S-Ethyl-Gruppe. Nach 2 Minuten Reaktionszeit hatte sich erst ca. 1 % des Substrats in Ethan umgewandelt, während das nicht umgesetzte Ethyl-Coenzym M bereits 9.0 % $\text{CH}_3\text{CHD-S-CoM}$ und 15.2 % $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{-S-CoM}$ enthielt. Nach 32 Minuten konnte eine Mischung von 11 Isotopologen von Ethyl-Coenzym M nachgewiesen werden (z. B. 10.8 % $\text{CHD}_2\text{CD}_2\text{-S-CoM}$ und 4.9 % $\text{CD}_3\text{CHD-S-CoM}$). Abbildung 1 stellt die Molenbrüche der einzelnen Isotopologen als Funktion der Reaktionszeit dar.

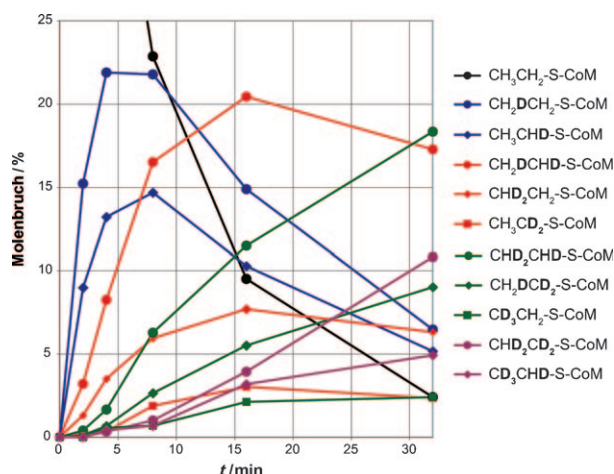


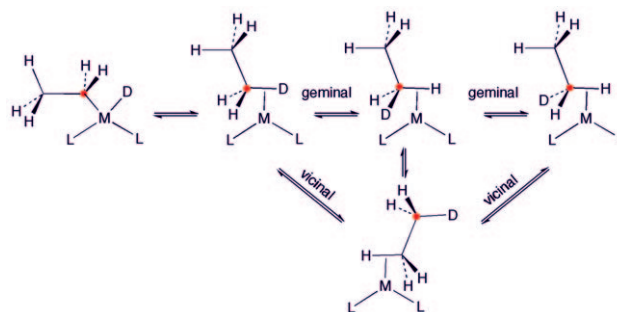
Abbildung 1. Bildung der 11 durch ^1H -NMR-Spektroskopie nachweisbaren Isotopologen von Ethyl-Coenzym M als Funktion der Inkubationszeit mit MCR-I in deuteriertem Medium bei 60°C . Die Bestimmung der Molenbrüche erfolgte über $^1\text{H}\{^2\text{H}\}$ -NMR-Spektren. $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{-S-CoM}$ ist über ^1H -NMR-Spektroskopie nicht nachweisbar (siehe die Hintergrundinformationen für experimentelle Bedingungen).

Da ein direkter Austausch von Deuterium in die Methylgruppe von Ethyl-Coenzym M mechanistisch wenig plausibel schien, untersuchten wir, ob die beiden Kohlenstoffatome innerhalb der Ethylgruppe unter MCR-Katalyse die Plätze tauschen. Wenn spezifisch ^{13}C -markiertes Substrat ($\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{-S-CoM}$) in nicht-deuteriertem Puffer mit MCR bei 60°C inkubiert wurde, zeigte sich, dass die ^{13}C -Markierung innerhalb von 32 Minuten praktisch statistisch zwischen den beiden Positionen innerhalb der Ethylgruppe verteilt worden war. Dieser Austausch folgte einer Kinetik pseudoerster Ordnung mit einer Halbwertszeit von ca. 4 Minuten (siehe Abbildung S1.3 in den Hintergrundinformationen).

Um die Beziehung zwischen Deuteriumeinbau und Kohlenstoffumlagerung abzuklären, wurden Experimente mit $\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{-S-CoM}$ in deuteriertem Puffer durchgeführt. Nach 2 Minuten Inkubation waren die monodeutierten Isotopomere in folgendem Verhältnis entstanden: $\text{CH}_3^{13}\text{CHDS-CoM}$ (8.2 %); $\text{CH}_2\text{D}^{13}\text{CH}_2\text{-S-CoM}$ (0.0 %); $^{13}\text{CH}_3\text{CHD-S-CoM}$ (0.0 %); $^{13}\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{-S-CoM}$ (12.9 %). Nach 8 Minuten wurden die dideutierten Isotopomere zu Anteilen gefunden, die nahezu den statistisch erwarteten Verhältnissen von 1:3 und 1:1 entsprechen: $\text{CH}_3^{13}\text{CD}_2\text{-S-CoM}$ (1.18 %) und $^{13}\text{CHD}_2\text{CH}_2\text{-S-CoM}$ (3.43 %) sowie $^{13}\text{CH}_2\text{DCHD-S-CoM}$ (4.71 %) und $\text{CH}_2\text{D}^{13}\text{CHD-S-CoM}$ (4.84 %) (siehe Abbildung

S1.5 in den Hintergrundinformationen). Diese Verteilung beweist, dass Deuterium jeweils an demjenigen Kohlenstoffatom eingebaut wird, das im Substrat an das Schwefelatom gebunden ist, und dass der Einbau von D in die Methylgruppe über den Positionsaustausch der Kohlenstoffatome erfolgt. (Abbildung S1.4 in den Hintergrundinformationen zeigt die Molenbrüche aller nachgewiesenen Isotopologen als Funktion der Inkubationszeit.)

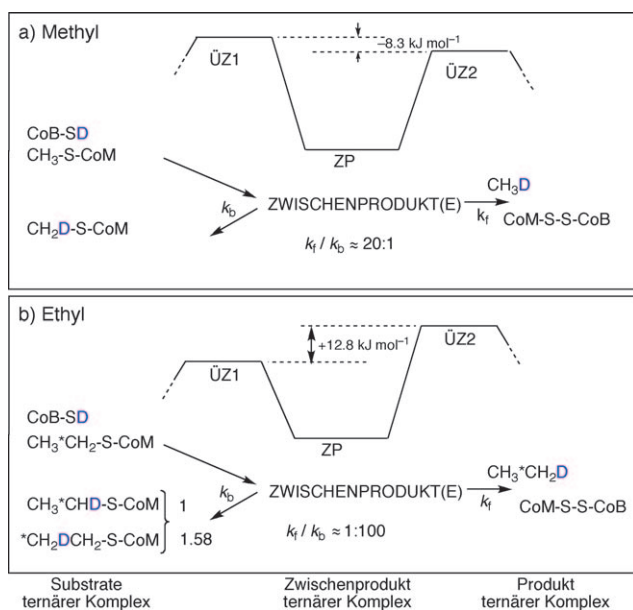
Das hier gefundene Muster für den Isotopenaustausch ist identisch zu demjenigen, das Periana und Bergman für den Hydridoethylrhodium-Komplex $[\text{Cp}^*(\text{PMe}_3)\text{Rh}(\text{Et})(\text{D})]$ beschrieben haben.^[12] Sie beobachteten, dass der Deuterido- $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{ethyl-Komplex}$ beim Erwärmen auf -80°C zum Hydrido- $[\text{1-}^{13}\text{C}, \text{1-}^2\text{H}]\text{ethyl-Komplex}$ umlagert. Ab -25°C begann ein Austausch zwischen dem ursprünglich ^{13}C -markierten α -Kohlenstoff- und dem β -Kohlenstoffatom, wobei auch hier das Deuteriumatom gemeinsam mit der ^{13}C -Markierung wanderte (Schema 3).



Schema 3. Die von Bergman^[12] für $[(\text{H})(\text{Et})\text{RhCp}^*(\text{PMe}_3)]$ vorgeschlagenen Bindungsverschiebungen über einen σ -Alkan-Komplex stimmen mit dem Muster des MCR-katalysierten Isotopenaustauschs für $\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{-S-CoM}$ in D_2O überein.

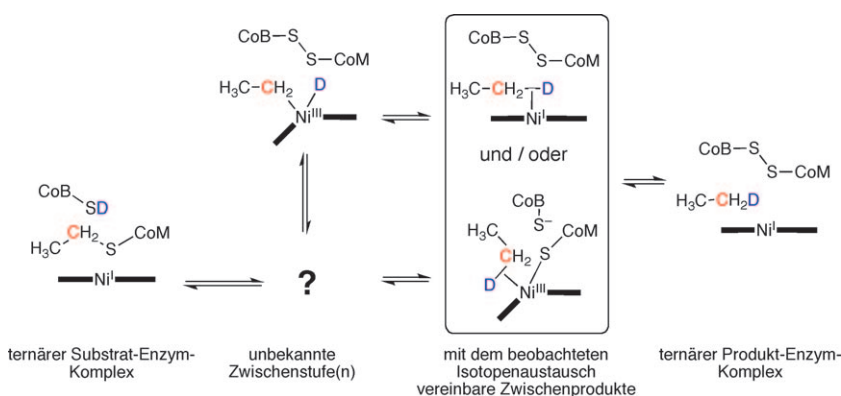
Wir haben die von MCR katalysierte Reaktion kürzlich auch in der umgekehrten Richtung beobachtet.^[13] In einem entsprechenden Konkurrenzexperiment wurden Methan mit einer Aktivität von 0.011 U mg^{-1} zu Methyl-Coenzym M und Ethan mit $0.00074 \text{ U mg}^{-1}$ zu Ethyl-Coenzym M umgesetzt (siehe die Hintergrundinformationen für Details). Beide Umkehrreaktionen sind also viel langsamer als der hier beschriebene Isotopenaustausch in die Substrate (ca. 1 U mg^{-1} für Methyl-Coenzym M und 10 U mg^{-1} für Ethyl-Coenzym M). Daraus folgt, dass die Bildung von CH_2D_2 aus Methyl-Coenzym M in D_2O fast ausschließlich über Deuteriumaustausch ins Substrat erfolgt und nicht über die Rückreaktion und doppelten Durchlauf. Der Deuteriumaustausch erfolgt auf dem Katalyseweg, bevor die Produkte gebildet werden, was zwangsweise die Existenz (mindestens) eines Intermediats erfordert. Dieses kann entweder zurück zum Substrat oder vorwärts zum Produkt reagieren. Schema 4 stellt für die beiden Substrate die minimalen Reaktionsprofile unter Berücksichtigung der beobachteten Verhältnisse zwischen Substratdeuterierung und Produktbildung dar.

Im Zwischenprodukt ist die C-S-Bindung durch eine C-D-Bindung ersetzt,^[14] womit bereits alle C-H(D)-Bindungen des Produkts gebildet sind. Während die genauen Bindungsver-



Schema 4. Minimale Reaktionsprofile für a) Methyl-Coenzym M und b) das nichtnatürliche Substrat Ethyl-Coenzym M. Die angegebenen Energieunterschiede der Übergangszustände beruhen auf den gemessenen relativen Geschwindigkeiten für Deuteriumeinbau und Produktbildung.

hältnisse offen bleiben müssen, stimmen die hier beschriebenen Resultate mit den Erwartungen für einen σ -Alkan-Komplex als Zwischenprodukt überein (Schema 5). Früher vorgeschlagene Mechanismen für die Katalyse durch MCR^[1a,15] gingen stets von der Annahme aus, dass am Nickelzentrum nur eine proximale axiale Koordinationsstelle für die Bindung der Substrate zur Verfügung steht. Ein Mechanismus über Nickel(hydrido)alkyl- und Nickel- σ -Alkan-Zwischenstufen, wie er hier diskutiert wird, würde dagegen zwei Koordinationsstellen in *cis*-Anordnung erfordern. Aus ESR-Studien mit Substratanaloga ist bekannt, dass mit der



Schema 5. Hypothetische Mechanismen der MCR-katalysierten Reaktionen. Dargestellt ist der Fall des [C1'-¹³C]-markierten (rot) nichtnatürlichen Substrats Ethyl-Coenzym M für die Reaktion in deuteriertem Medium. Der äquatoriale Makrocyclen des Hydrocorphin-Liganden ist schematisch als dicke Linie gezeichnet; in den Ni^{III}-Zwischenstufen symbolisiert der Knick den koordinativ verzerrten Makrocyclen eines Nickel-Komplexes mit zwei benachbarten Koordinationsstellen für das Substrat.

Bindung des zweiten Substrats eine deutliche Konformationsänderung des Enzyms einhergeht.^[16] MCR-Formen mit koordinativ verzerrtem Hydrocorphin sowie Hydrid und Thiolat als benachbarten Liganden am Nickelzentrum wurden ESR-spektroskopisch charakterisiert.^[6,8] Diese Befunde deuten darauf hin, dass Mechanismen, die zwei benachbarte Koordinationsstellen beanspruchen, nicht unrealistisch sind.

In der – ebenfalls von MCR katalysierten – umgekehrten Reaktion muss die sehr starke C-H-Bindung von Methan aktiviert werden. Hier ist die Annahme, dass als erstes Zwischenprodukt ein Nickel- σ -Alkan-Komplex gebildet wird, besser in Einklang mit Ergebnissen für die C-H-Aktivierung durch Übergangsmetallzentren^[17] als die stark endotherme (70 kJ mol⁻¹) Abstraktion eines H-Atoms aus Methan durch ein Thiylradikal, wie dies die Umkehr des von Siegbahn und Mitarbeitern aufgrund von DFT-Rechnungen vorgeschlagenen Mechanismus erfordern würde.^[15c,18] Es muss an dieser Stelle aber betont werden, dass das Muster des Isotopenaustauschs, das wir hier für die methanbildende Richtung beschreiben, qualitativ auch mit dem von Siegbahn vorgeschlagenen Mechanismus übereinstimmt (siehe Abbildung S1.6 in den Hintergrundinformationen). Die experimentellen relativen Geschwindigkeiten von Deuteriumeinbau und Produktbildung hingegen sind nicht mit den durch DFT berechneten Energien der Übergangszustände in Lit. [15c] vereinbar.

Unsere Resultate zeigen, dass die von der Methyl-Coenzym-M-Reduktase katalysierte Reaktion sowohl für das natürliche Substrat Methyl-Coenzym M als auch für das nichtnatürliche Ethyl-Coenzym M über mindestens ein Zwischenprodukt verläuft, in dem die C-S-Bindung gebrochen ist. Die Wasserstoffatome der S-Alkyl-Gruppe des Substrats können über dieses Zwischenprodukt mit Deuterium aus dem Medium austauschen. Da das gefundene Muster des Isotopenaustauschs mit dem für einen [(H)(Alkyl)RhCp*(L)]-Komplex beobachteten übereinstimmt, schlagen wir vor, sowohl für die Methanbildung als auch für die anaerobe Funktionalisierung von Methan Mechanismen mit (σ -Alkan)Ni-F430- und (H)(Alkyl)Ni-F430-Komplexen als Zwischenstufen in Betracht zu ziehen (Schema 5). Mit Ausnahme der von Schlangen und Schwarz^[19] beobachteten Aktivierung von CH₄ durch Ni(H)(OH)⁺ in der Gasphase ist uns allerdings kein Präzedenzfall einer C-H-Aktivierung durch späte Übergangsmetalle mit ungerader Elektronenzahl (Ni^I, d⁹) bekannt. Die biologische Bedeutung der MCR-katalysierten Reaktionen und das große Interesse an milden C-H-Aktivierungsmethoden könnten ein Ansporn sein, die katalytische Reaktivität solcher Metallzentren vermehrt zu untersuchen.

Eingegangen am 27. Mai 2010

Online veröffentlicht am 20. September 2010

Stichwörter: C-H-Aktivierung · Isotopenaustausch · Methyl-Coenzym-M-Reduktase · Nickel-Enzyme · σ -Alkan-Liganden

- [1] a) B. Jaun, R. K. Thauer, *Met. Ions Life Sci.* **2007**, 2, 323; b) R. K. Thauer, *Microbiology* **1998**, 144, 2377.
- [2] U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R. K. Thauer, *Science* **1997**, 278, 1457.
- [3] a) G. Färber, W. Keller, C. Kratky, B. Jaun, A. Pfalz, C. Spinner, A. Kobelt, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 697; b) D. A. Livingston, A. Pfaltz, J. Schreiber, A. Eschenmoser, D. Ankel-Fuchs, J. Moll, R. Jaenchen, R. K. Thauer, *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 334; c) A. Pfaltz, B. Jaun, A. Faessler, A. Eschenmoser, R. Jaenchen, H. H. Gilles, G. Diekert, R. K. Thauer, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 828.
- [4] a) S. Rospert, R. Boecher, S. P. J. Albracht, R. K. Thauer, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 371; b) M. Goubeaud, G. Schreiner, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 243, 110.
- [5] a) M. J. Pine, H. A. Barker, *J. Bacteriol.* **1956**, 71, 644; b) M. J. Pine, W. Vishniac, *J. Bacteriol.* **1957**, 73, 736; c) R. Walther, K. Fahlbusch, R. Sievert, G. Gottschalk, *J. Bacteriol.* **1981**, 148, 371.
- [6] J. Harmer, C. Finazzo, R. Piskorski, S. Ebner, E. C. Duin, M. Goenrich, R. K. Thauer, M. Reiher, A. Schweiger, D. Hinderberger, B. Jaun, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10907.
- [7] a) B. Jaun, R. K. Thauer, *Met. Ions Life Sci.* **2009**, 6, 115; b) R. Sarangi, M. Dey, S. W. Ragsdale, *Biochemistry* **2009**, 48, 3146; c) N. Yang, M. Reiher, M. Wang, J. Harmer, E. C. Duin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11028; d) D. Hinderberger, R. Piskorski, M. Goenrich, R. K. Thauer, A. Schweiger, J. Harmer, B. Jaun, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 3684; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3602.
- [8] J. Harmer, C. Finazzo, R. Piskorski, C. Bauer, B. Jaun, E. C. Duin, M. Goenrich, R. K. Thauer, S. Van Doorslaer, A. Schweiger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17744.
- [9] Über die Bildung von CH_2D_2 in der Methanogenese wurde schon früher berichtet. Da diese Studien aber mit ganzen Zellen in vivo durchgeführt wurden, konnte dies nicht auf die MCR-katalysierte Reaktion zurückgeführt werden. Siehe Lit. [5c].
- [10] Eine detaillierte Untersuchung dieses Prozesses werden wir an anderer Stelle veröffentlichen.
- [11] a) R. P. Gunsalus, J. A. Romesser, R. S. Wolfe, *Biochemistry* **1978**, 17, 2374; b) Y. H. Ahn, J. A. Krzycki, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4700; c) M. Goenrich, F. Mahler, E. C. Duin, C. Bauer, B. Jaun, R. K. Thauer, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, 9, 691.
- [12] R. A. Periana, R. G. Bergman, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7332.
- [13] S. Scheller, M. Goenrich, R. Boecher, R. K. Thauer, B. Jaun, *Nature* **2010**, 465, 606.
- [14] Ahn et al. haben berichtet, dass zellfreier Extrakt von *Methanosarcina barkeri* die Bildung von Ethan aus $[2\text{'-}^2\text{H}, 2\text{'-}^3\text{H}]$ -Ethyl-Coenzym M unter Inversion der Konfiguration katalysiert.^[11b] Ob dieses Resultat mit dem von uns beobachteten Platztausch der Kohlenstoffatome der Ethylgruppe vereinbar ist, hängt von der Größe der kinetischen ^2H - und ^3H -Isotopeneffekte bei der auf dem Weg zurück zum Substrat stattfindenden C-H-Funktionalisierung des Intermediats ab. Entsprechende Versuche sind in unseren Laboratorien im Gange.
- [15] a) E. C. Duin, M. L. McKee, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 2466; b) U. Ermler, *Dalton Trans.* **2005**, 3451; c) V. Pelmeshnikov, P. E. M. Siegbahn, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 8, 653.
- [16] S. Ebner, B. Jaun, M. Goenrich, R. K. Thauer, J. Harmer, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 567.
- [17] Kürzlich gelang es erstmals, einen σ -Methan-Komplex in Lösung NMR-spektroskopisch zu beobachten: W. H. Bernskoetter, C. K. Schauer, K. I. Goldberg, M. Brookhart, *Science* **2009**, 326, 553.
- [18] V. Pelmeshnikov, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, R. H. Crabtree, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4039.
- [19] M. Schlangen, D. Schroeder, H. Schwarz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1667; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1641.