

Modularer Aufbau von Clustern als natürliche Strategie zur Synthese des aktiven Zentrums der [FeFe]-Hydrogenase**

Ryan D. Bethel, Michael L. Singleton und Marcetta Y. Darensbourg*

Aktive Zentren · Biosynthese ·
Eisen-Schwefel-Cluster · Hydrogenasen

Einer der großen Fortschritte in der schon fast 80jährigen Geschichte der Erforschung der Enzyme, die den Wasserstoff-Metabolismus in bestimmten ursprünglichen Mikroorganismen kontrollieren, war die Erkenntnis, dass diese so genannten Hydrogenasen Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, die Elektronen in redoxaktiven Enzymen transportieren.^[1] Zu welcher vielfältigen strukturellen und physikalischen Eigenschaften diese Fe/S/SR-Kombination führen kann, wurde gemeinsam von Chemikern, Biochemikern und Biophysikern ergründet und gilt mittlerweile als gut verstanden.^[2,3] Beeindruckend ist die hohe Koinzidenz der Reaktivität von FeS-Clustern in vitro (d.h. von synthetischen Analoga) und in vivo (d.h. von Proteinen mit FeS-Cluster), die darauf schließen lässt, dass das Protein für die Existenz und Arbeitsweise des FeS-Clusters eigentlich gar nicht so wichtig ist. Daraus wurde die Vermutung abgeleitet, dass die ersten Katalysatoren auf der Erde Klümpchen von Eisenschwefelmineralien gewesen sein könnten,^[4] die, einmal in Proteine eingebaut, solche ausgeklügelte Systeme wie die anorganisch/metallorganischen Naturstoffe in Schema 1 hervorbrachten.^[2,5–8]

Die Anordnung der multiplen FeS-Cluster in den Kristallstrukturen der [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen (H₂asen) lässt sich nur so interpretieren, dass diese Cluster als Pfad für die Elektronenübertragung dienen und das aktive Zentrum mit der Elektronendonator- oder Elektronenakzeptoreinheit an der Proteinaußenseite verbinden.^[9] Ein typischer 4Fe4S-Cluster des aktiven Zentrums der [FeFe]-H₂ase (Schema 1e) ist über eine Cysteinyllücke direkt mit einer ungewöhnlichen 2Fe-Untereinheit fest verknüpft.^[6] In diesem Aufbau ähnelt der „H-Cluster“, d.h. der Wasserstoff produzierende Cluster der [FeFe]-H₂ase, den Clustern der Sulfat-Reduktase (Schema 1g) oder Acetyl-CoA-Synthase (Schema 1f); der 4Fe4S-Cluster wirkt über die Cysteinyll-Schwe-

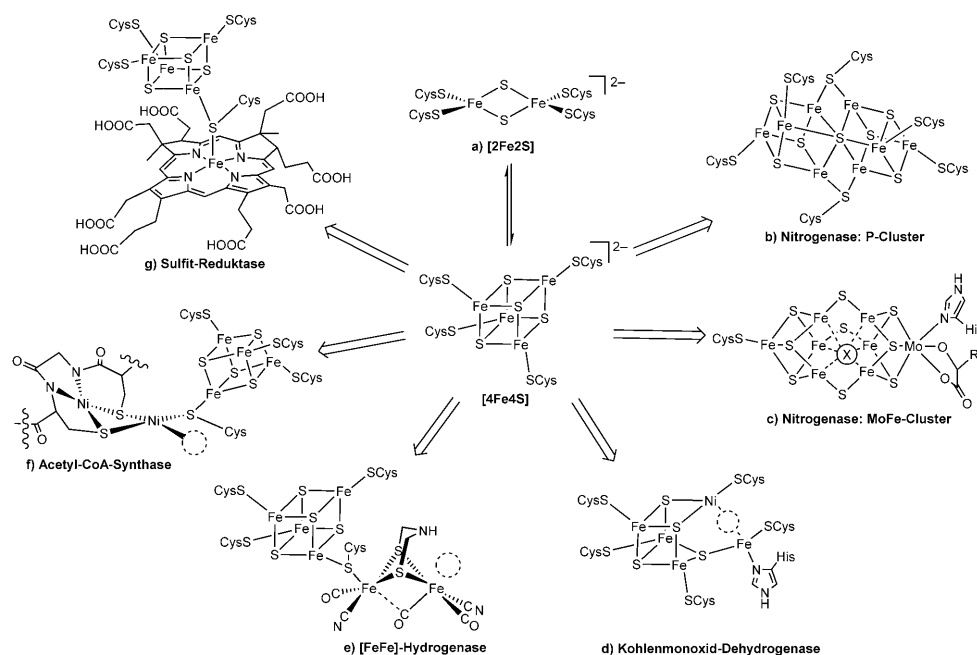
felbrücke zur 2Fe-Untereinheit als Redox-variabler Metallothiolatligand. Die Tatsache, dass der 2Fe-Anteil des H-Clusters rein metallorganisch aufgebaut ist, reichlich Kohlenmonoxid und Cyanid enthält, einen vorher in biologischen Systemen unbekannten Dithiolat-Cofaktor trägt und im Zusammenhang mit der beeindruckenden Geschwindigkeit der H₂-Produktion durch die [FeFe]-H₂ase steht – die zudem nur Elektronen milden Potentials sowie Wasser als Protonenquelle benötigt –,^[7] weckte das Interesse von Chemikern, die ein optimales synthetisches und proteinfreies Analogon des aktiven Zentrums suchten, um einen molekularen Elektrokatalysator zur Wasserstoffproduktion zu erhalten.

Bei der Aufklärung der Biosynthese ergab sich eine Reihe anspruchsvoller Fragen: Wie erzeugt und handhabt die Natur die Spezies CN[−] und CO, die bei fehlender Kontrolle ja giftig für die Metallzentren sind? Wie wird das Azadithiolat hergestellt, das die Eisenatome in der 2Fe-Untereinheit verbindet? Wie wird der H-Cluster aufgebaut? Gibt es einen 6Fe-Supercluster als Vorstufe, der die 2Fe-Untereinheit abstößt, oder werden die Einheiten modular zusammengesetzt? Seit kurzem gibt es einige Erkenntnisse in Bezug auf die ersten beiden Fragen: Es wurden Genprodukte entdeckt, die radikalische SAM-Reaktionswege (SAM: S-Adenosylmethionin) nutzen, die Tyrosin zu *p*-Cresol und den zweiatomigen Liganden CO und CN[−] abbauen, letzteres vermutlich über ein Glycylradikal.^[10–12] Anregungen für die Beantwortung der anderen beiden Fragen soll dieses Highlight geben, das sich mit einer Strukturarbeit von Mulder, Peters, Broderick et al. sowie anderen biosynthetischen und spektroskopischen Befunden zur 2Fe2S-Vorstufe auseinandersetzen wird.^[13,14]

Die korrekte, wenngleich triviale Antwort auf die Frage „Wie wird der H-Cluster zusammengesetzt?“ lautet mit Sicherheit: „Sehr sorgfältig!“ Mulder et al. gelang es, eine [FeFe]-H₂ase (auch als HydA bezeichnet) zu erhalten, ohne dass die Proteine HydE, HydF und HydG vorhanden waren, die für die Synthese der 2Fe-Untereinheit und die Reifung des Enzyms zur aktiven Form nötig sind.^[13] Dieses unreife, ohne akzessorische Proteine hergestellte Protein HydA^{ΔEFG} stammt ursprünglich aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und wurde in *E. coli* exprimiert; seine Röntgenkristallstruktur wurde bestimmt und mit jener des Holoproteins aus *C. pasteurianum* und *Desulfovibrio desulfuricans* verglichen. Bei beiden letztgenannten Strukturen ist der

[*] R. D. Bethel, M. L. Singleton, Prof. M. Y. Darensbourg
Department of Chemistry, Texas A&M University
College Station, TX 77843 (USA)
Fax: (+1) 979-845-0158
E-Mail: marcetta@chem.tamu.edu
Homepage: <http://www.chem.tamu.edu/rgroup/marcetta/>

[**] Unsere Arbeit wird von der National Science Foundation (CHE-0910679 an M.Y.D.), den NIH (Chemistry-Biology Interface Training Grant an R.D.B., T32 GM008523) und der R.A. Welch Foundation (A-0924) unterstützt.



Schema 1. Eine Auswahl von Protein-gebundenen Eisen-Schwefel-Clustern. (Die Strukturen sind kristallographischen Datenbanken oder der im Text angegebenen Literatur entnommen.)

vollständige H-Cluster mit den cysteinverbrückten Untereinheiten vorhanden, d.h. $4\text{Fe}_4\text{S}(\mu\text{-SCys})_2\text{Fe}$, wogegen $\text{HydA}^{\text{AEFG}}$ nur den $4\text{Fe}_4\text{S}$ -Cluster enthält. In $\text{HydA}^{\text{AEFG}}$ befindet sich der $4\text{Fe}_4\text{S}$ -Cluster in einer Tasche am Ende eines Kanals (8–15 Å breit und 25 Å lang; Abbildung 1). Überlagert man die Strukturen des unreifen Proteins oder Apo-proteins ohne 2Fe-Untereinheit mit jener des vollständigen oder Holo-proteins, wird deutlich, dass der Kanal im Holo-protein geschlossen ist und somit das vervollständigte aktive Zentrum einschließt.

Die Analyse der Kanalzusammensetzung von $\text{HydA}^{\text{AEFG}}$ zeigt positive Aminosäurereste (ein Argininrest und zwei Lysinreste) beiderseits des Eingangs, die wahrscheinlich den 2Fe-Subcluster mit seinen negativ geladenen Cyanidliganden anziehen; ein weiterer Lysinrest innerhalb des Kanals bildet vermutlich Wasserstoffbrücken zur 2Fe-Untereinheit, nachdem diese ihren Platz als Bestandteil des H-Clusters eingenommen hat.^[13] Ein weiterer wichtiger Hinweis auf den Mechanismus zur Einführung der 2Fe-Einheit ist ein Cysteinrest, der sich am Ende der Tasche befindet und mit seiner exponierten Schwefelseitenkette einen labilen Liganden an der 2Fe-Einheit ersetzen kann. So wird möglicherweise die Brücke zwischen der $4\text{Fe}_4\text{S}$ - und der 2Fe-Einheit gebildet.

Wie wird nun $\text{HydA}^{\text{AEFG}}$ mit dem 2Fe-Subcluster beliefert? Kürzlich wurde HydF als Gerüstprotein identifiziert, an dem der 2Fe-Subcluster oder eine Vorstufe davon zusammengesetzt wird. Die beiden anderen akzessorischen Proteine HydE und HydG synthetisieren hingegen CO, CN^- und die $\text{SCH}_2\text{NHCH}_2\text{S}$ -Brücke über den schon angesprochenen radikalischen SAM-Reaktionsweg.^[14] Nach der derzeitigen Arbeitshypothese ist HydF für die Fe-CO- und Fe-CN-Bindungsbildung verantwortlich, wahrscheinlich ausgehend von einem Cluster analog dem in Schema 1a. Auch soll HydF als Träger für die Subcluster-Insertion in den Kanal des apo-

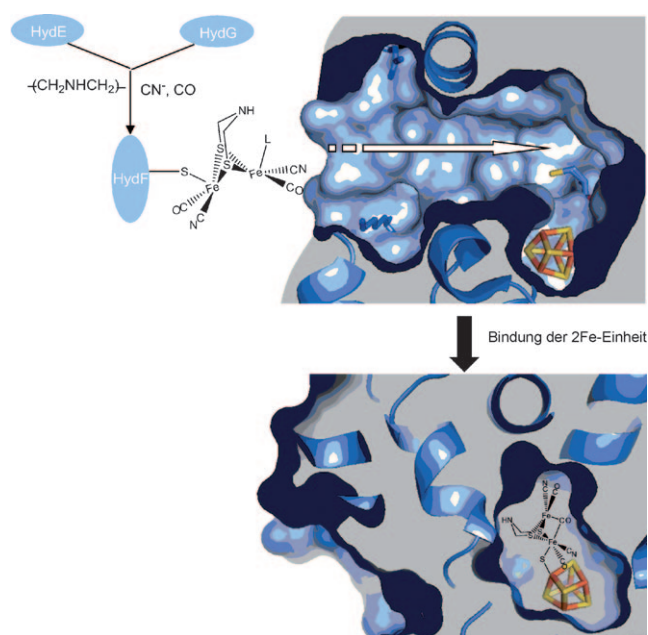


Abbildung 1. Insertion der vorab gebildeten metallorganischen $2\text{Fe}_2\text{S}$ -Einheit in das apo-HydA. Positiv geladene Reste unterstützen die Durchleitung der Vorstufe zum schon vorhandenen $4\text{Fe}_4\text{S}$. Möglicherweise hilft ein Cystein-Schwefelatome im Kanal. Sobald die 2Fe-Einheit an den $4\text{Fe}_4\text{S}$ -Cluster am Kanalende bindet, womit der H-Cluster vervollständigt ist, kollabiert die Tasche und schließt das aktive Zentrum im Protein ein. Die Oberflächen der Enzymtaschen von HydA und $\text{HydA}^{\text{AEFG}}$ mit den relevanten Aminosäureresten und Metallclustern wurden mit PyMOL visualisiert (W. L. DeLano, „The PyMOL molecular graphics system“, 2002) und die Strukturkoordinaten aus Lit. [13] und [14] entnommen. Die Abbildungen der Taschen von HydA und $\text{HydA}^{\text{AEFG}}$ (ebenfalls mit PyMOL visualisiert) wurden anschließend in Bänderdarstellung überlagert, um die Veränderungen in der Gesamt-Proteinstruktur darzustellen.

HydA fungieren. Noch wurde die Struktur von HydF nicht bestimmt. Es ist nicht bekannt, ob der an HydF gebundene 2Fe-Subcluster schon in seiner endgültigen Strukturform, wie im vollständigen H-Cluster, vorliegt (Abbildung 1). Erste spektroskopische Daten sprechen für zwei CN⁻- und zwei oder drei CO-Moleküle in einem reduzierten Komplex, denn die Positionen der ν(CO)-Banden entsprechen denen der Komplexe (μ-SRS)[Fe^I(CO)₂CN]₂²⁻ oder (μ-SRS)[Fe₂^I(CO)₃(PR₃)₃].^[15,16]

Die im Fe^{II}Fe^I-Redoxniveau vorliegende 2Fe-Untereinheit innerhalb des vollständigen und so isolierten H_{ox}-Clusters hat eine ungewöhnliche Gestalt, die als rotiert relativ zur bekannten, eckenverbrückten, quadratischen Pyramide der reduzierten zweikernigen Spezies (μ-SRS)[Fe^I(CO)₃]₂ und (μ-SRS)[Fe(CO)₂CN]₂²⁻ beschrieben wurde. Dies führt uns zur Annahme, dass die Insertion und Beherbergung des mit dem 4Fe4S-Cluster Cystein-verbrückten 2Fe-Subclusters, die auch gleichzeitig Wasserstoffbrücken zu den Cyanidliganden erfordert, oxidativ und unter Rotation abläuft. Dieser Prozess induziert dann Konformationsänderungen der Proteinschleifen, wodurch letztlich der Kanal geschlossen wird.

Dieser stufenweise Aufbau hat enorme Bedeutung für Biologen und Chemiker. Mulder et al. merkten die Ähnlichkeit der oben genannten Strukturen mit dem Nitrogenase-Protein ohne und mit FeMo-Cofaktor an (Schema 1c).^[13] Diese Ähnlichkeit könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Art, wie solche Proteine einen bereits existierenden abiotischen Katalysator einbauen, ein weit verbreitetes Motiv in der frühen Entwicklung der Metalloenzyme war.

Der Spekulation folgend, dass die ursprüngliche 2Fe-Untereinheit einmal ein eigenständiger Katalysator gewesen ist, der von Mikroorganismen als vorteilhaft für deren Wachstum und Fortbestand angesehen wurde, sollte nun weiter versucht werden, mit synthetischen Liganden die elektronische Umgebung des präbiotischen Eisensulfid-Katalysators zu reproduzieren. Es wurden bereits um die 300 dieser Dieisenmodelle beschrieben, allerdings vermochte keines davon die Reaktion $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ so zu katalysieren wie der H-Cluster. Bedeutet dies, dass das Anbringen eines 4Fe4S-Cluster unabdingbar ist? Dass ein solches Vorhaben möglich ist, wurde anhand eines eleganten synthetischen Analogons des vollständigen 6Fe-Clusters zwar nachgewiesen,^[17] allerdings ohne größeren Katalyseerfolg – also ist es doch die 2Fe-Untereinheit, die strategisch verändert werden muss. Deren natürliche Synthese beginnt mit oxidiertem Eisen in den 2Fe2S-Clustern, wogegen die synthetischen Analoga klassischerweise auf reduziertem Eisen in der (μ-SRS)[Fe^I(CO)₃]₂-Vorstufe aufbauen. Hierbei wurden in einigen Fällen stabile rotierte Formen erhalten,^[18] die durch

Reduktion wieder die unrotierte Form einnehmen. Daraus lässt sich ableiten, dass eine mehr Erfolg versprechende Synthese dahin gehen sollte, 1) alternative FeFe-Vorstufen und 2) supramolekulare Konstrukte zu erzeugen, die um das synthetische 2Fe-Analogon herum kollabieren und es durch den elektrokatalytischen Zyklus hindurch in seiner rotierten Form halten können.

Eingegangen am 19. Juni 2010

Online veröffentlicht am 15. September 2010

- [1] O. Warburg in *Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action*, Clarendon, Oxford, **1949**.
- [2] H. Beinert, R. H. Holm, E. Münck, *Science* **1997**, *277*, 653–659.
- [3] H. Beinert, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 2–15.
- [4] C. Huber, G. Wächterhäuser, *Science* **1997**, *276*, 245–247.
- [5] J.-H. Jeoung, H. Dobbek, *Science* **2007**, *318*, 1461–1464.
- [6] Y. Nicolet, B. J. Lemon, J. C. Fontecilla-Camps, J. W. Peters, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 138–143.
- [7] J. W. Peters, *Met. Ions Life Sci.* **2009**, *6*, 179–218.
- [8] V. Svetlitchnyi, H. Dobbek, W. Meyer-Klaucke, T. Meins, B. Thiele, P. Römer, R. Huber, O. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 446–451.
- [9] J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, C. Cavazza, Y. Nicolet, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4273–4303.
- [10] E. Pilet, Y. Nicolet, C. Mathevon, T. Douki, J. C. Fontecilla-Camps, M. Fontecave, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 506–511.
- [11] 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*, 1731–1734; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1687–1690.
- [12] E. M. Shepard, B. R. Duffus, S. J. George, S. E. McGlynn, M. R. Challand, K. D. Swanson, P. L. Roach, S. P. Cramer, J. W. Peters, J. B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9247–9249.
- [13] D. W. Mulder, E. S. Boyd, R. Sarma, R. K. Lange, J. A. Endrizzi, J. B. Broderick, J. W. Peters, *Nature* **2010**, *465*, 248–251.
- [14] E. M. Shepard, S. E. McGlynn, A. L. Bueling, C. S. Grady-Smith, S. J. George, M. A. Winslow, S. P. Cramer, J. W. Peters, J. B. Broderick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10448–10453.
- [15] M. Y. Darensbourg, E. J. Lyon, X. Zhao, I. P. Georgakaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3683–3688.
- [16] A. K. Justice, G. Zampella, L. De Gioia, T. B. Rauchfuss, J. I. van der Vlugt, S. R. Wilson, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 1655–1664.
- [17] C. Tard, X. Liu, S. K. Ibrahim, M. Bruschi, L. De Gioia, S. C. Davies, X. Yang, L.-S. Wang, G. Sawers, C. J. Pickett, *Nature* **2005**, *433*, 610–613.
- [18] T. Liu, M. Y. Darensbourg, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7008–7009; A. K. Justice, T. B. Rauchfuss, S. R. Wilson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6264–6266; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6152–6154; M. L. Singleton, N. Bhuvanesh, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9634–9637; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9492–9495.