

# Sauerstoffverträgliche Hydrogenasen: Eisen-Schwefel-Cluster als Ursache\*\*

Katarzyna Grubel und Patrick L. Holland\*

Hydrogenasen · Proteinkristallographie · Sauerstoff

**H**ydrogenasen wurden aus mehreren Gründen zuletzt intensiv erforscht. Erstens katalysieren sie die gegenseitige Umwandlung von Protonen und H<sub>2</sub>, das ein kohlenstofffreies Energiespeichermolekül ist. Anders als die meisten synthetischen Katalysatoren zur H<sub>2</sub>-Bildung sind Hydrogenasen aus „natürlichen“ Materialien aufgebaut, sind biologisch abbaubar und ermöglichen außerdem eine außerordentlich schnelle Katalyse.<sup>[1]</sup> Zweitens zeigen Hydrogenasen, wie natürliche Systeme eine Mehrelektronenkatalyse durchführen, ohne dass instabile Zwischenprodukte entstehen. Drittens verfügen Hydrogenasen über Metallcarbonyl-Cofaktoren, die die klassische metallorganische Chemie (die normalerweise Starkfeldliganden wie CO und CN<sup>-</sup> verwendet) mit der bioanorganischen Chemie (die durch Schwachfeldliganden dominiert wird) verknüpfen. Zwei kristallographische Studien von Fritsch, Scheerer et al. sowie Shomura et al. in *Nature* beschreiben nun eine weitere überraschende Entdeckung bei Hydrogenasen: einen neuartigen Eisen-Schwefel-Cluster.<sup>[2]</sup> Die neuen Ergebnisse haben wichtige Auswirkungen für das Verständnis der Elektronenübertragung in Enzymen und helfen, die strukturelle Grundlage der O<sub>2</sub>-Toleranz einer bestimmten Klasse von Hydrogenasen zu verstehen.

Eine Schwierigkeit beim Umgang mit Hydrogenasen ist ihre Empfindlichkeit gegen Sauerstoff. Die meisten der bekannten Hydrogenasen werden schon durch geringe Sauerstoffmengen vergiftet und in inaktive Formen umgewandelt, die sich nur in wenigen Fällen durch Reduktion mit H<sub>2</sub> reaktivieren lassen.<sup>[3]</sup> Interessanterweise tolerieren membrangebundene Hydrogenasen (MBH) in den Bakterien *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, *Hydrogenovibrio marinus* und *Aquifex aeolicus* begrenzte Mengen an Sauerstoff (werden aber durch höhere Sauerstoffmengen dennoch deaktiviert).<sup>[4]</sup> Die Frage jedoch, wie diese MBH-Enzyme es schaffen, O<sub>2</sub> zu widerstehen, war bisher schwierig zu beantworten. Alle Hydrogenasen enthalten Eisen-Schwefel-Cluster, die als „Relais“ für die Elektronenübertragung zum und vom aktiven Zentrum wirken, das bei MBH-Enzymen einen

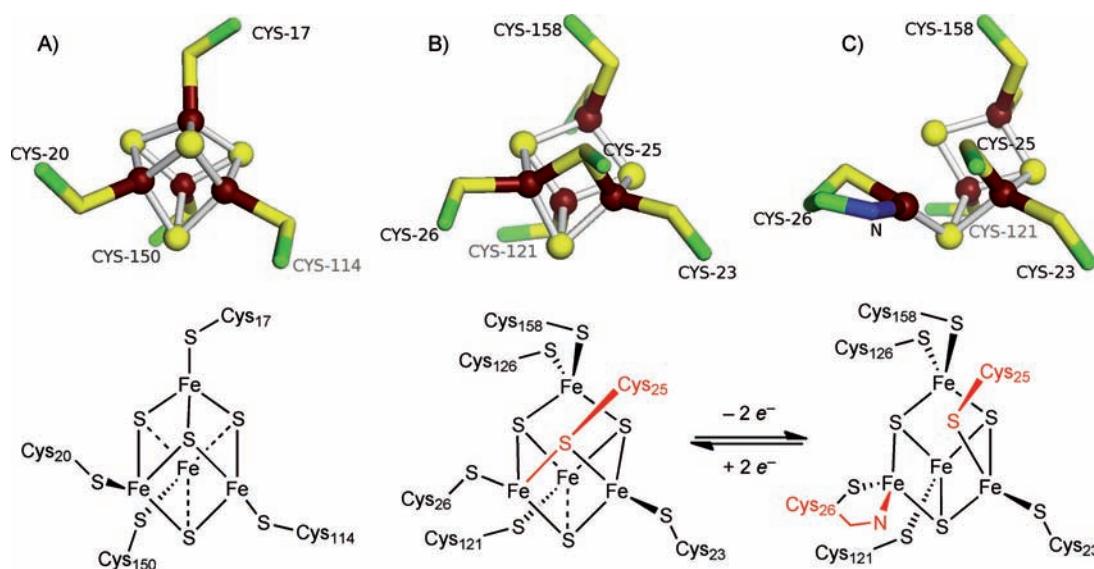
heterobimetalischen verbrückten Nickel-Eisen-Cofaktor enthält. Sowohl das Nickel-Eisen-Zentrum als auch die Eisen-Schwefel-Cluster sind inhärent O<sub>2</sub>-empfindlich, weshalb es überrascht, dass die MBH-Enzyme gegen die potentiell schädigende Wirkung von O<sub>2</sub> stabil sind. Anfängliche Erklärungsversuche konzentrierten sich auf das Eisen-Nickel-Zentrum, allerdings zeigten spektroskopische Studien ebenso wie die neu beschriebenen Kristallstrukturen, dass die Ni-Fe-Zentren der MBH-Enzyme keine wesentlichen Unterschiede zum aktiven Zentrum der O<sub>2</sub>-empfindlichen Nickel-Eisen-Hydrogenasen aufweisen.<sup>[5]</sup> Eine andere Hypothese war, dass der H<sub>2</sub>-Transportkanal in MBH-Enzymen so schmal ist, dass O<sub>2</sub> nicht hindurchgelagt, allerdings können neuere Kristallstrukturen diese Interpretation nicht stützen.<sup>[1a, 4, 5b, 6]</sup>

Vielmehr zeigte sich nun, dass die charakteristischste Eigenschaft von MBH-Enzyme in einem der Eisen-Schwefel-Cluster zu finden ist. Eisen-Schwefel-Cluster sind weitverbreitete Elektronentransferzentren in Metalloproteinen, und ihre Zusammensetzung wird üblicherweise als [nFe-mS] dargestellt, wobei n die Zahl der Eisenatome und m die der Schwefelatome angibt. Die luftempfindlichen Nickel-Eisen-Hydrogenasen enthalten eine Kette von drei Clustern, von denen der proximale (der dem Ni-Fe-Zentrum am nächsten liegt) ein normaler kubischer [4Fe-4S]-Cluster ist (Abbildung 1 A). Die neuen Kristallstrukturen des O<sub>2</sub>-toleranten MBH in seiner reduzierten Form zeigen nun allerdings, dass es sich bei dem proximalen Eisen-Schwefel-Cluster um [4Fe-3S] handelt, in dem eines des Schwefelatome durch ein verbrückendes Thiolat aus einem Cysteinrest ersetzt ist (Abbildung 1 B). Eines der Eisenatome trägt ein zusätzliches terminales Cystein, das den freien Platz des fehlenden Schwefels einnimmt. Im Ergebnis wird also ein dreifach verbrückendes Schwefelatom durch ein verbrückendes Cystein-thiolat und ein terminales Cystein-thiolat ersetzt, sodass der Cluster insgesamt sechs Cysteinseitenketten statt der üblichen vier koordiniert. Diese einzigartige Struktur erklärt die ungewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften der MBH-Enzyme.<sup>[7]</sup> Die Clusterform wurde bislang noch nie in niedermolekularen Eisen-Schwefel-Verbindungen beobachtet und stellt somit eine spannende Herausforderung für die Synthesechemie dar.

Wie trägt nun der ungewöhnliche [4Fe-3S]-Cluster zur Sauerstofftoleranz der MBH-Enzyme bei? Die Antwort gibt eine der neuen kristallographischen Studien, die eine Änderung der Clusterkoordination bei unterschiedlichen Redoxpotentialen aufzeigt.<sup>[2b]</sup> Unter oxidierenden Bedingungen

[\*] K. Grubel, Prof. P. L. Holland  
Department of Chemistry, University of Rochester  
Rochester, NY 14627 (USA)  
E-Mail: holland@chem.rochester.edu  
Homepage: <http://chem.rochester.edu/~plhgrp/>

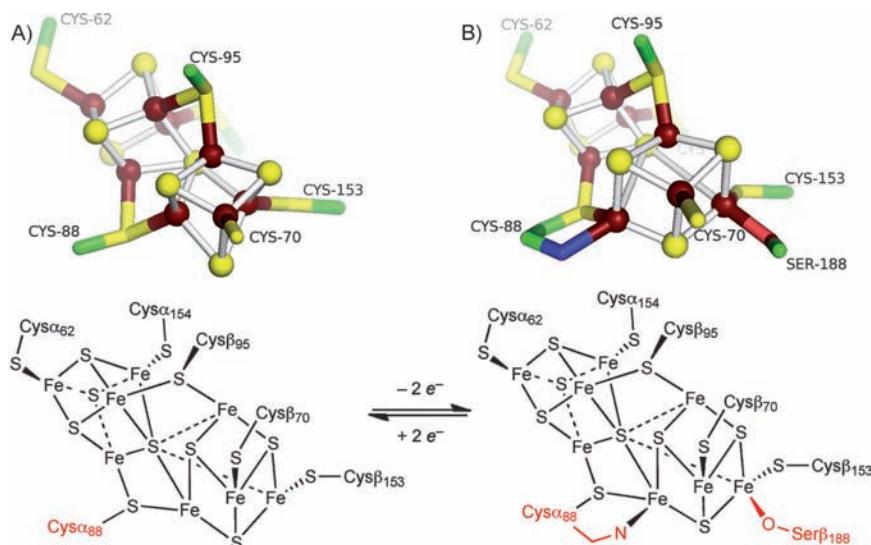
[\*\*] Wir danken den National Institutes of Health (GM065313) für die Förderung unserer Studien an Eisen-Schwefel-Clustern sowie John Peters für hilfreiche Kommentare zum Manuscript.



**Abbildung 1.** Vergleich des klassischen [4Fe-4S]-Clusters mit den neuen [4Fe-3S]-Clustern. Gezeigt sind perspektivische Ansichten der Kristallstruktur (oben) und der Bindungsverhältnisse (unten). Abweichungen sind rot hervorgehoben. A) Gewöhnlicher [4Fe-4S]-Cluster (PDB 1H2R);<sup>[1b]</sup> B) reduzierter [4Fe-3S]-Cluster der MBH (PDB 3AYX);<sup>[2b]</sup> C) oxidiertes [4Fe-3S]-Cluster der MBH (PDB 3AYZ).<sup>[2b]</sup>

geht die Struktur in eine Form über, in der das Rückgrat-Amid des Cys26 der kleineren Untereinheit deprotoniert wird und das verbrückende Cystein aus einem der Eisenatome verdrängt. Dies führt dazu, dass dieses Thiolat im klassischen terminalen Bindungsmodus angelagert wird (Abbildung 1C, rot hervorgehoben). Die zusätzliche negative Ladung des deprotonierten Amids stabilisiert die oxidierte Form (d.h. erniedrigt das Redoxpotential). Infolgedessen kann der [4Fe-3S]-Cluster zwei Elektronen in einem schmalen Potentialfenster von nur 0.2 V übertragen und ist auf drei unterschiedlichen Oxidationsstufen stabil.<sup>[7b]</sup> Es wird vorgeschlagen, dass die Fähigkeit zum mehrfachen Elektronentransport die Sauerstofftoleranz des MBH erhöht, indem das Enzym in die Lage versetzt wird, O<sub>2</sub> rasch zu harmlosem Wasser zu reduzieren bevor eine Schädigung des Proteins auftritt.<sup>[5b,8]</sup>

Das Zusammenspiel von Amidprotonierung und Clusteroxidation ist ein Beispiel für einen protonengekoppelten Elektronentransfer (PCET), bei dem Protonen und Elektronen simultan bewegt werden, um die Erhöhung der Aktivierungsenergie durch Ladungsaufbau zu verhindern. Detaillierte Studien zum protonengekoppelten Elektronentransfer mit Eisen-Schwefel-Clustern wurden bisher nicht durchgeführt, und die neuen Strukturen werden zweifelsohne Forschungen in der Proteinchemie und der Chemie niedermolekularer Verbindungen inspirieren. Darüber hinaus kann die Amidkoordination in der oxidierten Form des neuen [4Fe-3S]-Clusters als eine Art „Redoxschalter“ zwischen den beiden Reaktivitätszuständen des Enzyms – Oxidation von H<sub>2</sub> bzw. Reduktion von O<sub>2</sub> – dienen. Die Redox-abhängige Konformationsänderung im [4Fe-3S]-Cluster erinnert an die



**Abbildung 2.** P-Cluster der Eisen-Molybdän-Nitrogenase. Gezeigt sind perspektivische Ansichten der Kristallstruktur (oben) und der Bindungsverhältnisse (unten). A) Reduzierter P-Cluster der Nitrogenase (PDB 3U7Q);<sup>[9]</sup> B) oxidierteter P-Cluster der Nitrogenase (PDB 2MIN).<sup>[9]</sup>

schon bekannte Konformationsänderung im P-Cluster der Nitrogenase (Abbildung 2), bei der die Koordination des Amids im oxidierten Cluster Mehrelektronenredoxprozesse auslöst.<sup>[9]</sup> Folglich könnten die neuen Kristallstrukturen auf eine allgemeine Strategie für schnelle Elektronenübertragungskaskaden in Mehrelektronenredoxsystemen hinweisen. In diesem Sinne wird erwartet, dass weitere Studien an „formveränderlichen“ Eisen-Schwefel-Clustern helfen, ein besseres Verständnis von den Mechanismen zu entwickeln, die den Elektronenfluss in Proteinen regulieren.

Eingegangen am 12. Dezember 2011  
Online veröffentlicht am 9. Februar 2012

- [1] a) K. A. Vincent, A. Parkin, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4366–4413; b) H. Ogata, W. Lubitz, Y. Higuchi, *Dalton Trans.* **2009**, 7577–7587.
- [2] a) J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C. M. T. Spahn, *Nature* **2011**, *479*, 249–252; b) Y. Shomura, K.-S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, *Nature* **2011**, *479*, 253–256.
- [3] A. L. De Lacey, V. M. Fernández, M. Rousset, R. Cammack, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4304–4330.

- [4] M. Ludwig, J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong, O. Lenz, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 465–477.
- [5] a) M. Horch, L. Lauterbach, M. Sagg, P. Hildebrandt, F. Lendzian, R. Bitl, O. Lenz, I. Zebger, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8200–8203; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8026–8029; b) M.-E. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand, C. Léger, M.-T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6991–7004.
- [6] P.-P. Liebgott, A. L. de Lacey, B. Burlat, L. Courzac, P. Richaud, M. Brugna, V. M. Fernandez, B. Guigliarelli, M. Rousset, C. Léger, S. Dementin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 986–997.
- [7] a) J. Fritsch, S. Löscher, O. Sanganas, E. Siebert, I. Zebger, M. Stein, M. Ludwig, A. L. De Lacey, H. Dau, B. Friedrich, O. Lenz, M. Haumann, *Biochemistry* **2011**, *50*, 5858–5869; b) M.-E. Pandelia, W. Nitschke, P. Infossi, M.-T. Giudici-Orticoni, E. Bill, W. Lubitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6097–6102.
- [8] a) T. Goris, A. F. Wait, M. Sagg, J. Fritsch, N. Heidary, M. Stein, I. Zebger, F. Lendzian, F. A. Armstrong, B. Friedrich, O. Lenz, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 648–648; b) M. J. Lukey, M. M. Rossler, A. Parkin, R. M. Evans, R. A. Davies, O. Lenz, B. Friedrich, F. Sargent, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16881–16892.
- [9] J. W. Peters, M. H. Stowell, S. M. Soltis, M. G. Finnegan, M. K. Johnson, D. C. Rees, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1181–1187.