

Und der Gewinner ist ...: Azadithiolat – ein Amin-Protonenrelais in [FeFe]-Hydrogenasen

David Schilter* und Thomas B. Rauchfuss*

Cofaktoren · Enzymologie · Hydrogenasen · Eisen · Wasserstoff

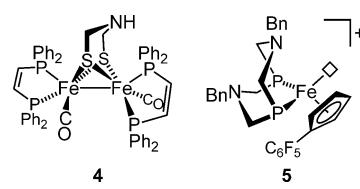
Zu einer Zeit, in der wir uns neuen Techniken der Energiegewinnung zuwenden, rückt molekularer Wasserstoff als Energieträger zunehmend in den Mittelpunkt.^[1] Während viele Menschen eine „Wasserstoff-Wirtschaft“ als Perspektive für die Zukunft sehen, reicht für manche Bakterien und Archaeen das Zeitalter ihrer „Wasserstoff-Wirtschaft“ bis in die (Ur)zeit zurück, in der die Atmosphäre der Erde noch reich an diesem leichtesten aller Gase war. Mikroorganismen metabolisieren Wasserstoff über die Expression von Hydrogenasen (H_2 -asen) – Metalloenzyme, die im obigen Zusammenhang jüngst große Aufmerksamkeit auf sich gezogen haben.^[2] Ihre aktiven Zentren enthalten drei zentrale Komponenten – Eisen, Thiolatgruppen und Kohlenmonoxid –, die auch in CO-umsetzenden Enzymen auftreten (aber überraschenderweise in keinem kommerziellen Katalysator). Je nach den Metallatomen in ihren aktiven Zentren werden die H_2 -asen in [Fe]-, [NiFe]- und [FeFe]- H_2 -asen unterteilt. Vertreter aller drei Klassen konnten kristallisiert werden, und für die beiden letztgenannten Fälle konnten die Liganden in den aktiven Zentren vollständig identifiziert werden.

Zwar sind die aktiven Zentren der H_2 -asen einander ähnlich, jedoch sticht Zentrum der [FeFe]- H_2 -asen hervor, weil es großenteils nichtpeptidische Liganden enthält (Schema 1, rechts) und nur über einen einzelnen Cysteinylrest kovalent mit dem Polypeptidgerüst des Moleküls verknüpft ist. Die röntgenkristallographische Strukturanalyse sprach dafür, dass ein $[Fe_4S_4]$ -Cluster mit der [2Fe]-Einheit über ein S^{Cys} -Atom verknüpft ist (das Gesamtensemble wird als H-Cluster bezeichnet); infolge der ähnlichen Streumerkmale von C, N und O erwies sich die kristallographische Untersuchung allerdings als weniger hilfreich bei der Unterscheidung der beiden Cofaktoren CN^- und CO, die IR-spektroskopisch nachgewiesen worden waren.^[3] Einer dieser Liganden, die sich nur selten in aktiven Enzymen finden, besetzt je eine basale Bindungsstelle an den beiden Eisenzentren; die stereochemische Struktur des Clusters wurde aus der Polarität der Taschen des Proteins und der Hydrophobie bzw. Hydrophilie der Fe-CO- und Fe-CN-Einheiten gefolgt. Ein zusätzlicher CO-Ligand,

der die Atome Fe^p („proximal“ bezüglich $[Fe_4S_4]$) und Fe^d („distal“) verbrückt, wurde durch eine Kombination aus Röntgenkristallographie und IR-Spektroskopie lokalisiert. Dieser CO-Ligand ist entscheidend für die Ausrichtung des Atoms Fe^d in der Form, dass eine apikale Bindungsstelle für die Substratbindung verfügbar ist.

Nach der Identifizierung der ersten Koordinationssphäre der Dieseneinheit wandten sich die Forscher dem Dithiolatliganden zu, dem schließlich die Formel $^-\text{SCH}_2\text{XCH}_2\text{S}^-$ zugewiesen werden konnte. Die Eigenschaften der Elemente C, N und O erwiesen sich abermals als problematisch: Die Identität von X ließ sich kristallographisch nicht bestimmen, aber immerhin auf CH_2 , NH oder O eingrenzen. In jedem Falle wäre der entsprechende Propan-, Aza- oder Oxadi-thiolatrest ($pdt^{2-}/adt^{2-}/odt^{2-}$) in der Biochemie ohne Beispiel. Viele Beteiligte, darunter Fontecilla-Camps und Mitarbeiter, favorisierten aufgrund des geringen Abstands von 3.1 Å von X zu einem benachbarten S^{Cys} -Atom (Abstand für eine H-Brücke) in Verbindung mit mechanistischen Überlegungen (siehe weiter unten) adt^{2-} .^[4] Spektroskopische Untersuchungen wie HYSCORE deuteten auf adt^{2-} hin,^[5] doch war die Beweislage nicht klar, und einige Gegenbeispiele sprachen für odt^{2-} als Liganden.

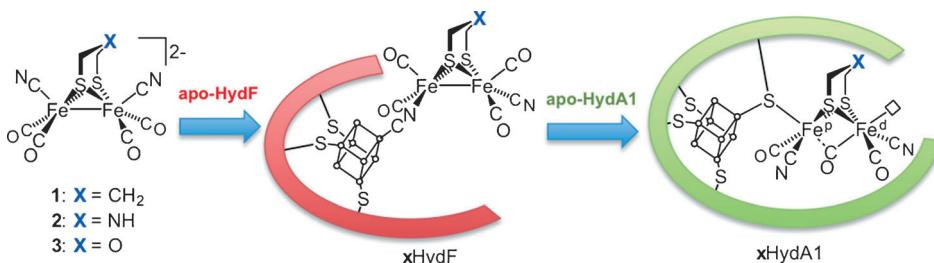
Synthetische Modellierungen wiesen – wenn auch indirekt – auf ein natives adt^{2-} -Protonenrelais hin. So ist z. B. der Katalysator von H^+ -Reduktionen, $[\text{Fe}_2(\text{adt})(\text{CO})_2(\text{dppv})_2]$ (4) 10⁴-mal aktiver als sein pdt^{2-} -Gegenstück.^[6] Wäre es möglich,



dass der Dithiolatligand die Antwort auf das Rätsel um die bemerkenswerte Aktivität der [FeFe]- H_2 -asen ist, Enzyme, die die Reaktion $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ auf Geschwindigkeiten von bis zu 28000 s⁻¹ zu beschleunigen vermögen? Die erste Koordinationssphäre war verstanden: Liganden mit starken Feldern bedingen einen ungesättigten Low-Spin-Dieisenkern. Jenseits sterischer und elektronischer Effekte blieben jedoch die zweite Koordinationssphäre und besonders das Dithiolat (derjenige Cofaktor, der im Verbund mit Fe^d die eigentliche

[*] Dr. D. Schilter, Prof. Dr. T. B. Rauchfuss

Department of Chemistry, University of Illinois
600 South Mathews Avenue, M/C 712, Urbana (USA)
E-Mail: schilter@illinois.edu
rauchfuz@illinois.edu
Homepage: <http://www.scs.illinois.edu/rauchfus/>



Schema 1. [FeFe]-H₂ase-Maturierung mit drei synthetischen Dieisen-Cofaktoren: dem biologisch aktiven Cofaktor **2** und den biologisch inaktiven Cofaktoren **1** und **3**.

H₂-Spaltung bewirkt) unverstanden. Fontecave et al. ist es gelungen, mithilfe synthetischer Mimetika sowie einer [Fe-Fe]-H₂ase und der zugehörigen Maturase, die Kontroverse um das Dithiolat beizulegen.^[7] Abermals kommt hier im Fall von [Fe₂(SCH₂XCH₂S)(CO)₄(CN)]²⁻ (**1–3**; Schema 1, links) die theoretische Modellierung zum Einsatz, da sich diese molekularen Spezies vom Dithiolat, dem infrage stehenden Cofaktor, unterscheiden.

Frühere Untersuchungen der Maturierung des Enzyms hatten gezeigt, dass sich ein einfacher [Fe₂S₂]-Cluster auf einem als HydF bezeichneten Gerüstprotein zu einer [2Fe]-Vorstufe einer Untereinheit des aktiven Zentrums umbildet; radikalische S-Adenosylmethionin-Enzyme sind für den schrittweisen Aufbau von ⁻SCH₂XCH₂S⁻ und CO/CN⁻ verantwortlich. HydF übergibt anschließend [2Fe] an apo-HydA, die H₂ase mit einem [Fe₄S₄]-Zentrum, aber noch ohne den Dieisenkern. Zur Nachbildung der zweiten Hälfte dieses Maturierungsvorgangs beluden Fontecave et al. HydF (in diesem Fall das Protein aus dem Bakterium *Thermotoga maritima*, exprimiert in *Escherichia coli*) mit einer der Verbindungen **1–3**; daraus gingen **1**HydF, **2**HydF und **3**HydF hervor (Schema 1, Mitte). Die IR-Spektren der Addukte entsprachen denen von HydF aus *Clostridium acetobutylicum*, einer Maturase, von der bekannt war, dass sie eine [Fe₄S₄]- und eine [2Fe]-Einheit enthält. Kernspin-Kohärenztransfer-Untersuchungen ergaben, dass jede Variante CN⁻-verbrückte Cluster beherbergt. Damit war diese Arbeit nicht nur eine besondere präparative Leistung, mit dem Einbau dreier exogener Spezies, sondern auch eine spektroskopische. Der Erfolg von Fontecave et al. ist signifikant, weil die Struktur der nativen [2Fe]-Einheit noch unbekannt ist – die neuen Befunde lassen aber nun darauf schließen, dass es sich höchstwahrscheinlich um einen Cluster handelt, der ähnlich, wenn nicht identisch, zu xHydF ist.

Obgleich **1–3**HydF jeweils einen [Fe₄S₄]-Redoxcofaktor und eine [2Fe]-Untergruppe enthalten, vermitteln diese Moleküle keine H₂-Bildung. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung der ersten Koordinationssphäre: **1–3**HydF verfügen nicht über den verbrückenden CO-Liganden und die freie Fe^d-Bindungsstelle für eine Katalyse, die folglich ungeachtet des Dithiolatliganden auch nicht stattfindet. Natürlich besteht die Funktion von HydF eigentlich im Aufbau und dem Transfer der [2Fe]-Baueinheit auf apo-HydA. Die Forscher gingen der Frage nach, ob die beladenen HydF-Proteine in der Lage waren, die Maturierung von apo-HydA (in diesem Fall apo-HydA1 aus der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, exprimiert in *E. coli*) zu bewirken. Die Rekonstitution erwies sich als schwierig, da die Proteine aus unterschiedlichen Organismenarten stammten und **1–3**HydF womöglich deutlich verschieden vom nativen HydF waren, dessen Zweck es ist, den HydA-H-Cluster zu installieren. Darüber hinaus mussten zahlreiche koordinationschemische Stufen ablaufen: die Dissoziation von [2Fe] von HydF, CN⁻-Bindungs(re)isomerisierung, die Bindung von S^{Cys} an Fe^p und schließlich der Verlust von CO.

Angesichts der Komplexität der [FeFe]-H₂ase-Maturierung^[8] ist es erstaunlich, dass die Umsetzung von apo-HydA1 mit **1–3**HydF die vollständigen Proteine **1–3**HydA1 ergab. Die IR-Spektren zeigten in diesen Fällen die v(CO)- und v(CN⁻)-Banden, was einen [2Fe]-Transfer bestätigte, und entsprachen darüber hinaus auch dem Spektrum von HydA1. Die Maturierung deckte die Konfiguration des Dieisenkomplexes auf, die für **1–3** und **1–3**HydF nicht ermittelt werden konnte: Das basische S^{Cys}-Atom liegt *trans* zum verbrückenden CO-Liganden, und dieser liegt wiederum *trans* zur freien Bindungsstelle an Fe^d. Die chemischen Eigenschaften von **1–3**HydA1 unterscheiden sich von denen der substitutionsinternen **1–3**, was auf eine Labilität der Dianionen als Resultat ihres Eintritts in die Bindungstasche des Enzyms ist, wenn zwischen den Fe-CN-Gruppen und in der Nähe gelegenen Lysyl- und Serylresten H-Brücken gebildet werden. Die Wechselwirkungen der zweiten Koordinationssphäre legen die Konfiguration der ersten Koordinationssphäre fest. Wie Fontecave et al. demonstrierten, sind sie auch essenziell für die H₂ase-Funktion: Die Aktivität des adt²⁻ enthaltenden Biohybrids kam der des funktionellen HydA1 nahe, während die pdt²⁻ und odt²⁻-Spezies inaktiv waren. Tatsächlich ist **2**HydA1 wahrscheinlich überhaupt kein Biohybrid, sondern in jedem Detail das native HydA1. Für den Synthesechemiker ist es befriedigend zu wissen, dass **2** bereits vor gut zehn Jahren hergestellt wurde (seine Relevanz für das Studium dieses bemerkenswerten aktiven Zentrums vorausahnend).^[9]

Der Dithiolatcofaktor, von dem nun sicher gesagt werden kann, dass er X = NH enthält, ist entscheidend für die Weitergabe von H⁺ an das aktive Zentrum zum Zweck der H₂-Produktion. Die Basizität des Amins ist wahrscheinlich so eingestellt, dass Fe-H sowohl protoniert als auch deprotoniert werden kann; die Basizität des Sauerstoffatoms in odt²⁻ reicht hierfür nicht aus, und eine Säure-/Basechemie von pdt²⁻ ist praktisch nicht vorhanden. Die Nachbildung der Dieisenligation genügt nicht, denn obwohl Säure-Base-Reaktionen oft als unverzüglich ablaufend angesehen werden, erfolgen sie

bei der Protonierung sterisch überfrachteter Metallzentren langsamer. In der Natur wird dieses Problem überwunden, indem das Amin oberhalb der Bindungsstelle platziert ist. Jenseits der zweiten Koordinationssphäre ist die Schutzwirkung durch die umgebende Proteinmasse von >50 kDa ebenfalls zu berücksichtigen (man vergleiche die hohe Aktivität des rekonstituierten **2**HydA1 mit der Instabilität von freiem **2** in saurer Lösung).

Trotz der Hürden bei der Übertragung von Strukturprinzipien aus der Natur auf synthetische Moleküle sind mehrere Kandidaten für die homogene Elektrokatalyse zur H₂-Produktion (sowie, in jüngerer Zeit, für die H₂-Oxidation) vorgestellt worden. Diese Elektrokatalysatoren reichen von biomimetischen Modellen wie **4** bis hin zu biologisch inspirierten Systemen wie **5** (Bn = Benzyl),^[10] die mit H₂asen weniger gemeinsam haben. Unabdingbar für die Funktion beider ist die Positionierung eines Aminrestes in der Nähe eines ungesättigten elektroaktiven Metallzentrums – ein reaktionsbereites, frustriertes Lewis-Paar. Zwar müssen bidirektionale Katalysatoren, die mit hohen Umsatzraten und niedrigen Überspannungen arbeiten, erst noch hergestellt werden, allerdings sind die Arbeiten von Fontecave et al. ermutigend für Chemiker, die auf dieses Ziel hinarbeiten.

Indem sie Azadithiolat unzweifelhaft eine Rolle zugewiesen haben, liefern Fontecave et al. auch Hinweise auf die chemische Natur der Maturase HydF und ihres [2Fe]-Kerns. Wie mag ihre Vorstufe im Maturierungsprozess aussehen? Und wird sich dieser artificielle Maturierungsprozess als

vereinbar mit kombinatorischen Methoden erweisen, um so effizientere und praktischere Katalysatoren für die Freisetzung und Oxidation von H₂ zu finden?

Eingegangen am 13. August 2013
Online veröffentlicht am 4. November 2013

-
- [1] R. K. Thauer, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 919–921.
 - [2] C. Tard, C. J. Pickett, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2245–2274.
 - [3] Z. Chen, B. J. Lemon, S. Huang, D. J. Swartz, J. W. Peters, K. A. Bagley, *Biochemistry* **2002**, *41*, 2036–2043.
 - [4] Y. Nicolet, A. L. de Lacey, X. Vernède, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1596–1601.
 - [5] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6592–6599.
 - [6] M. E. Carroll, B. E. Barton, T. B. Rauchfuss, P. J. Carroll, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18843–18852.
 - [7] G. Berggren, A. Adamska, C. Lambertz, T. R. Simmons, J. Esselborn, M. Atta, S. Gambarelli, J. M. Mouesa, E. Reijerse, W. Lubitz, T. Happe, V. Artero, M. Fontecave, *Nature* **2013**, *499*, 66–69; J. Esselborn, C. Lambertz, A. Adamska-Venkatesh, T. Simmons, G. Berggren, J. Noth, J. Siebel, A. Hemschemeier, V. Artero, E. Reijerse, M. Fontecave, W. Lubitz, T. Happe, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 607–609.
 - [8] J. W. Peters, J. B. Broderick, *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81*, 429–450.
 - [9] H. Li, T. B. Rauchfuss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 726–727.
 - [10] T. Liu, D. L. DuBois, R. M. Bullock, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 228–233.