

Atomare Einblicke in den Mechanismus der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase**

Markus W. Ribbe*

C-Cluster · Kohlendioxid · Kohlenmonoxid-Dehydrogenase · Kristallographie · Nickel

Die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) katalysiert die reversible Umwandlung zwischen CO und CO₂ gemäß $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.^[1] Sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion dieser reversiblen Redoxreaktion ist von biologischer Bedeutung (Abbildung 1). Die Oxidation von CO durch die Nickel-haltige CODH (Ni-CODH) ist die Energie- und Kohlenstoffquelle für das chemolithoautotrophe

Wachstum anaerober Organismen wie *Carboxydotherrus hydrogenoformans*,^[2] während die Reduktion von CO₂ durch die Ni-CODH mit der Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) und der Bildung von Acetyl-CoA in Säurebakterien wie *Moorella thermoacetica* gekoppelt ist.^[3] Darüber hinaus ist die CODH aufgrund ihrer einzigartigen katalytischen Eigenschaften ein attraktives Modell für die Entwicklung von Strategien zur CO₂-Sequestrierung (basierend auf der CO₂-Reduktion durch die CODH) und für Brennstoffzellen (basierend auf der Oxidation von CO durch die CODH). Diese Umstände beleben das Interesse an mechanistischen Details dieses wichtigen Metalloenzym.

Die Ni-CODH, entdeckt in den 1980er Jahren, wurde zunächst mit biochemischen und spektroskopischen Methoden charakterisiert, die Aufschluss über die Proteinkonformation, den Metallclustergehalt und die physiologische Rolle des Enzyms gaben.^[1] Seit 2000 wurden einige Kristallstrukturen der Ni-CODH von den Arbeitsgruppen Drennen, Dobbek und Chen gelöst, welche die einzigartigen geometrischen Merkmale des katalytischen C-Clusters und dessen Rolle in der Aktivierung der Substrate illustrieren.^[4] Besonders hervorzuheben sind die CO₂- und CO-gebundenen Strukturen, veröffentlicht von den Gruppen um Dobbek und Chen, sowie die Cyanid(CN⁻)-gebundenen Strukturen beschrieben von den Gruppen um Dobbek und Drennen.^[5] Die bahnbrechenden Arbeiten dieser Gruppen führten in Zusammenhang mit Daten von biochemischen, kinetischen, spektroskopischen und theoretischen Studien^[6] zur Entwicklung eines mechanistischen Modells der CO-CO₂-Umwandlung durch die Ni-CODH. Dieses Modell zeigt ein CO-gebundenes Ni-Atom mit einer nahezu perfekten quadratisch planaren Geometrie, dem auf einzigartige Weise ein Hydroxy-gebundenes Fe-Atom gegenübersteht. Solch eine Konformation legt einen nukleophilen Angriff der Fe-gebundenen Hydroxygruppe auf das Ni-gebundene CO nahe; dieser Mechanismus wird gestützt durch die Beobachtung, dass das gebundene CO₂ das Ni-Atom und das Fe-Atom in einer $\mu_2\text{-}\eta^2$ -Konformation verbrückt.

Andererseits ist der Mechanismus der Ni-CODH-Inhibierung durch CN⁻ und Cyanat (NCO⁻) kaum verstanden. Strukturbiologische Daten zur Bindung von NCO⁻ an die CODH sind rar. Dagegen haben Strukturanalysen der CN⁻-gebundenen CODH zu dem Vorschlag geführt, dass CN⁻ in zwei Konformationen bindet. Zunächst bindet CN⁻ lose in einer gebogenen Konformation, bevor es langsam in eine li-

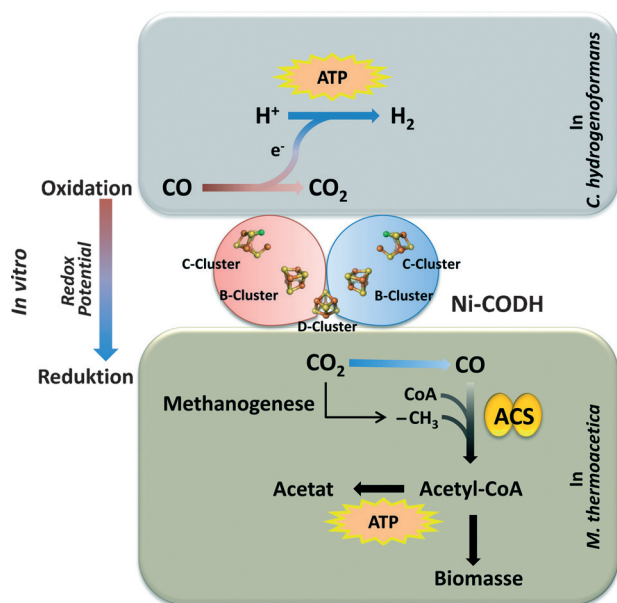


Abbildung 1. Redoxumwandlung von CO₂ und CO durch die Ni-CODH. In *C. hydrogenoformans* ist die Oxidation von CO durch die Ni-CODH eng mit der Protonenreduktion der Hydrogenase gekoppelt, um einen Protonengradienten für die ATP-Synthase zu erzeugen.^[4] In *M. thermoacetica* ist die Reduktion von CO₂ durch die Ni-CODH mit der Acetyl-CoA-Synthetase und der damit einhergehenden Synthese von Acetyl-CoA, das für die Produktion von Zellmasse oder ATP benötigt wird, gekoppelt.^[5] In vitro kann die Ni-CODH die Hin- und Rückreaktion von CO₂ zu CO in Abhängigkeit des vorherrschenden Potentials katalysieren.

[*] Prof. Dr. M. W. Ribbe
Department of Molecular Biology and Biochemistry
Department of Chemistry, University of California, Irvine
Irvine, CA 92697-3900 (USA)
E-Mail: mribbe@uci.edu

[**] Ich danke den NIH für Unterstützung (GM-67626).

neare Konformation übergeht, die die Substratreduktion kompetitiv inhibiert.^[5] Vor kurzem wurde der Mechanismus dieser Inhibitoren mit elektrochemischen Methoden untersucht; dies führte zu einem Mechanismus, der den Inhibitor-einfluss auf C_{red1} und C_{red2} , die beiden entscheidenden Oxidationszustände des C-Clusters, darstellt.^[7] In diesem Modell inhibiert CN^- die CO -Oxidation, aber nicht die Reduktion von CO_2 durch die selektive Bindung von C_{red1} , wohingegen NCO^- die Reduktion von CO_2 , aber nicht die Oxidation von CO , durch die selektive Bindung von C_{red2} inhibiert (Abbildung 2). Diese Ergebnisse stellen die Grund-

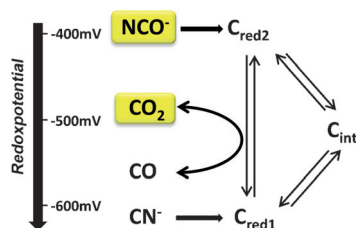


Abbildung 2. Der Redoxzustand des C-Clusters der Ni-CODH und die zugehörigen Potentiale für die Bindung von Substraten und Inhibitoren.^[7] Das Mittelpunktspotential der CO_2 - CO -Kopplung ist ca. -558 mV, und das Potential der NCO^- - und CN^- -Bindung wird auf ca. -400 mV bzw. ca. -600 mV geschätzt. In Gelb sind der NCO^- - und der CO_2 -gebundene Zustand hervorgehoben, der durch die atomar aufgelöste Struktur belegt wurde.^[8]

lage für die Redoxkatalyse der Ni-CODH dar. Dennoch verhindert das Fehlen von molekularen Details der Substrat-Inhibitor-Wechselwirkung mit der Ni-CODH für bestimmte Redoxpotentiale eine tiefgründige Untersuchung des Reaktionsmechanismus.

Weitere Bestrebungen, den Reaktionsmechanismus aufzuklären, führten kürzlich zu der Lösung von zwei Kristallstrukturen der Ni-CODH von *C. hydrogenoformans* (hCODH) mit wirklich atomarer Auflösung ($d_{min} < 1.1$ Å) durch die Arbeitsgruppe Dobbek; eine Struktur enthält das gebundene Substrat CO_2 und die andere den gebundenen Inhibitor NCO^- .^[8] Diese Studie beschreibt die molekularen Details des C-Clusters mit der bisher höchsten Auflösung; einzelne Atompositionen und die zugehörigen Elektronen sind eindeutig zugewiesen. Weit wichtiger ist allerdings, dass die atomare Auflösung einige vorher unbekannte Besonderheiten des gebundenen Substrats/Inhibitors der Ni-CODH enthüllt. Die Daten deuten darauf hin, dass das gebundene CO_2 durch zwei Elektronen reduziert wird und mehr einer Carboxygruppe als einem CO_2^- -Radikalanion gleicht. Die gebundene NCO^- -Gruppe ist gebogen und auf ähnliche Art und Weise wie CO_2 reduziert, allerdings wird das N-Atom durch zwei Elektronen zu einer Carbamoylgruppe reduziert. Diese beiden Beobachtungen deuten auf einen gemeinsamen Zwei-Elektronen-Transfer für die CO_2 -Aktivierung und die NCO^- -Inhibierung hin und vervollständigen das Bild des Reaktionsmechanismus der Ni-CODH.

Die Verbesserung der Auflösung auf das atomare Niveau hat eine Schlüsselrolle inne, da sie die Strukturanalyse ohne die Einbeziehung von geometrischen Einschränkungen er-

möglicht und folglich zu einer unvoreingenommenen Bestimmung geometrischer Parameter wie Bindungslänge und Bindungswinkel führt. Verglichen mit der bereits publizierten hochaufgelösten (1.50 Å) Struktur der CO_2 -gebundenen hCODH ^[9] ist die Ni-C-Bindung wesentlich kürzer in der atomar aufgelösten (1.03 Å) Struktur, was eine ungewöhnliche elektronische Struktur des Nickels impliziert (Abbildung 3), obwohl die Koordinationsgeometrie (quadratisch

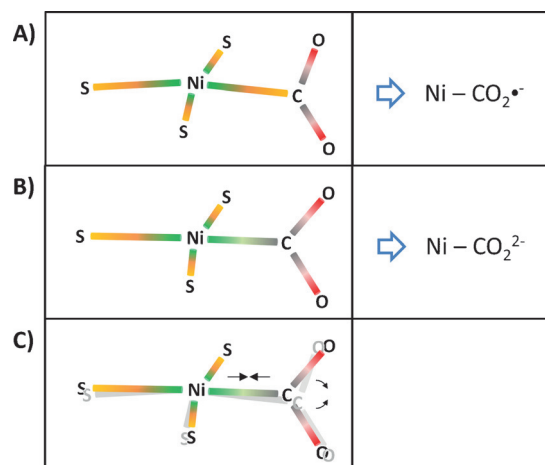


Abbildung 3. Vergleich des aktiven Zentrums in der hochaufgelösten (1.50 Å) Struktur (PDB-Code: 3B52)^[9] und der atomar aufgelösten (1.03 Å) Struktur.^[8] A) Koordinierung des Ni in der 1.50 -Å-Struktur, in der das gebundene Substrat einem CO_2^- -Radikalanion gleicht. B) Koordinierung des Ni in der 1.03 -Å-Struktur, in der das gebundene Substrat dem eines Formiats oder eines Ni-gebundenen Carboxylats gleicht. C) Überlagerung des aktiven Zentrums von A und B, in der A grau dargestellt ist. Die 1.03 -Å-Struktur zeigt eine perfekte quadratisch planare Anordnung die auf eine verkürzte Ni-C-Bindung (angedeutet durch die geraden Pfeile) und eine gebogenere O-C-O-Konformation (angedeutet durch gekrümmte Pfeile) zurückzuführen ist und auf einen reduzierteren Substrat in B als in A deutet.

planar) die gleiche bleibt. Darüber hinaus ist der CO_2 -Ligand in der atomar aufgelösten Struktur noch mehr gebogen (117°) als in der hochaufgelösten Struktur (133°). Dies deutet auf eine reduziertere Form des CO_2 -Liganden als in dem zuvor angenommenen CO_2^- -Radikalanion hin (Abbildung 3). Basierend auf der geometrischen Ähnlichkeit dieses Liganden mit dem Zwei-Elektronen-Reduktionsprodukt Formiat oder der metallgebundenen Carboxylgruppe (ca. 120°) ist auch dieser Ligand wahrscheinlich um zwei Elektronen reduziert, offensichtlich stabilisiert durch π -Rückbindung und bereit für eine Protonierung in der weiteren Folge.

Die Lösung der NCO^- -gebundenen Struktur ist eine Neuheit in der CODH-Forschung, da vorherige Studien sich auf die Struktur des oxidierten C-Clusters mit gebundenem CN^- oder gebundenem Isocyanat konzentrierten.^[4,10] Überraschenderweise ist NCO^- , das auch nach einem Zwei-Elektronen-Mechanismus reduziert wird, fast in der gleichen geometrischen Konformation gebunden wie CO_2 . Noch überraschender ist, dass die Bindungswinkel und -längen, nach der Reduktion, auf die Bildung einer Carbamoylgruppe (H_2NCO) hindeuten. Dies wird auch durch die Verlagerung

einer His-Seitenkette, die normalerweise Wasserstoffbrücken mit dem N-Atom des NCO⁻-Liganden bildet, gestützt. Diese Beobachtung ist außergewöhnlich, da man 1) basierend auf der Ähnlichkeit der Bindungsgeometrie für NCO⁻ und CO₂ bei einer Zwei-Elektronen-Reduktion von NCO⁻ die Produkte CN⁻ und H₂O erwarten würde, und da man 2) basierend auf den vorherigen Beobachtungen einer langsamen Oxidation von *n*-Butylisocyanid (CN-Bu) zu *n*-Butylisocyanat (OCN-Bu)^[10] auf eine analoge Rückreaktion, in der NCO⁻ zu Cyanid (CN⁻) reduziert wird, spekulieren könnte. Die Diskrepanz in dem Muster der Elektronenverteilung für den CO₂- und den NCO⁻-Liganden hebt den Unterschied zwischen den Substraten und Inhibitoren der Ni-CODH hervor.

Die atomar aufgelösten Strukturen der ^{Ch}CODH liefern einen eindeutigen Beweis für die Bildung eines um zwei Elektronen reduzierten Substrats im Reaktionsmechanismus der Ni-CODH. Trotzdem kann ein um ein Elektron reduziertes Zwischenprodukt nicht ausgeschlossen werden; es könnte aufgedeckt werden durch zukünftige Versuche zur Erzeugung von Zwischenprodukten, die während der einzelnen Phasen des Elektronentransfers vom Metall zum Liganden entstehen. Die Beobachtung des um zwei Elektronen reduzierten NCO⁻-Liganden wirft auch interessante Fragen über den Inhibierungsmechanismus der Ni-CODH auf. Solch ein Zwei-Elektronen-Transfer wurde in Zyklovoltammetrie-Experimenten nicht beobachtet.^[7] Darüber hinaus impliziert die Zwei-Elektronen-Reduktion des Liganden eine Sackgasse, bei der der C_{red2}-Cluster unproduktiv oxidiert wird. Die

bildet einen Widerspruch zu früheren Ergebnissen, denen zufolge der NCO⁻-Ligand den C_{red2}-Zustand zu stabilisieren scheint.^[7] Deshalb sollten die elektrochemischen und spektroskopischen Daten erneut untersucht und mit den Ergebnissen der atomar aufgelösten Struktur abgestimmt werden, um ein verbessertes Modell des Inhibierungsmechanismus der Ni-CODH zu entwickeln.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8337–8339
Angew. Chem. **2015**, *127*, 8455–8457

- [1] S. W. Ragsdale, M. Kumar, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2515–2540.
- [2] R. L. Uffen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3298–3302.
- [3] S. W. Ragsdale, E. Pierce, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2008**, *1784*, 1873–1898.
- [4] J. H. Jeoung, J. Fesseler, S. Goetzl, H. Dobbek, *Met. Ions Life Sci.* **2014**, *14*, 37–69.
- [5] Y. Kung, C. Drennan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 276–283.
- [6] M. Can, F. A. Armstrong, S. W. Ragsdale, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4149–4174.
- [7] V. C. Wang, M. Can, E. Pierce, S. W. Ragsdale, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2198–2206.
- [8] J. Fesseler, J. H. Jeoung, H. Dobbek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8560–8564; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 8680–8684.
- [9] J. H. Jeoung, H. Dobbek, *Science* **2007**, *318*, 1461–1464.
- [10] J. H. Jeoung, H. Dobbek, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 167–173.

Eingegangen am 30. April 2015
Online veröffentlicht am 1. Juni 2015