

# Atomare Einblicke in den Mechanismus der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase\*\*

Markus W. Ribbe\*

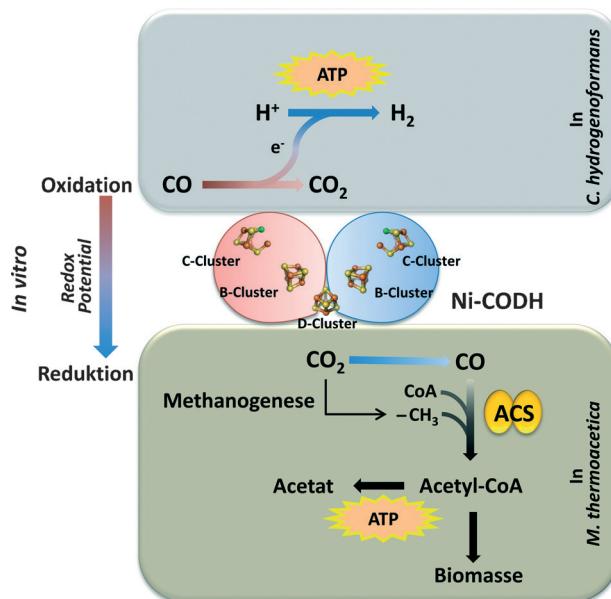
C-Cluster · Kohlendioxid · Kohlenmonoxid-Dehydrogenase · Kristallographie · Nickel

Die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) katalysiert die reversible Umwandlung zwischen CO und CO<sub>2</sub> gemäß  $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ .<sup>[1]</sup> 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 *Carboxydothermus hydrogenoformans*,<sup>[2]</sup> während die Reduktion von CO<sub>2</sub> durch die Ni-CODH mit der Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) und der Bildung von Acetyl-CoA in Säurebakterien wie *Moorella thermoacetica* gekoppelt ist.<sup>[3]</sup> Darüber hinaus ist die CODH aufgrund ihrer einzigartigen katalytischen Eigenschaften ein attraktives Modell für die Entwicklung von Strategien zur CO<sub>2</sub>-Sequestrierung (basierend auf der CO<sub>2</sub>-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 Metalloenzymes.

Die Ni-CODH, entdeckt in den 1980er Jahren, wurde zunächst mit biochemischen und spektroskopischen Methoden charakterisiert, die Aufschluss über die Proteinkonformation, den Metalclustergehalt und die physiologische Rolle des Enzyms gaben.<sup>[1]</sup> 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.<sup>[4]</sup> Besonders hervorzuheben sind die CO<sub>2</sub>- und CO-gebundenen Strukturen, veröffentlicht von den Gruppen um Dobbek und Chen, sowie die Cyanid(CN<sup>-</sup>)-gebundenen Strukturen beschrieben von den Gruppen um Dobbek und Drennen.<sup>[5]</sup> Die bahnbrechenden Arbeiten dieser Gruppen führten in Zusammenhang mit Daten von biochemischen, kinetischen, spektroskopischen und theoretischen Studien<sup>[6]</sup> zur Entwicklung eines mechanistischen Modells der CO-CO<sub>2</sub>-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 CO<sub>2</sub> das Ni-Atom und das Fe-Atom in einer  $\mu_2\text{-}\eta^2$ -Konformation verbrückt.

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

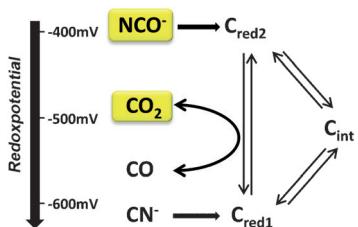


**Abbildung 1.** Redoxumwandlung von CO<sub>2</sub> und CO durch die Ni-CODH. In *C. hydrogenoformans* ist die Oxidation von CO durch die Ni-CODH eng mit der Protonenreduktion der Hydrogenase gekoppelt, um einen Protonengradienten für die ATP-Synthese zu erzeugen.<sup>[4]</sup> In *M. thermoacetica* ist die Reduktion von CO<sub>2</sub> 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.<sup>[5]</sup> In vitro kann die Ni-CODH die Hin- und Rückreaktion von CO<sub>2</sub> 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.<sup>[5]</sup> 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.<sup>[7]</sup> In diesem Modell inhibiert  $\text{NCO}^-$  die CO-Oxidation, aber nicht die Reduktion von  $\text{CO}_2$  durch die selektive Bindung von  $C_{red1}$ , wohingegen  $\text{NCO}^-$  die Reduktion von  $\text{CO}_2$ , aber nicht die Oxidation von CO, durch die selektive Bindung von  $C_{red2}$  inhibiert (Abbildung 2). Diese Ergebnisse stellen die Grund-



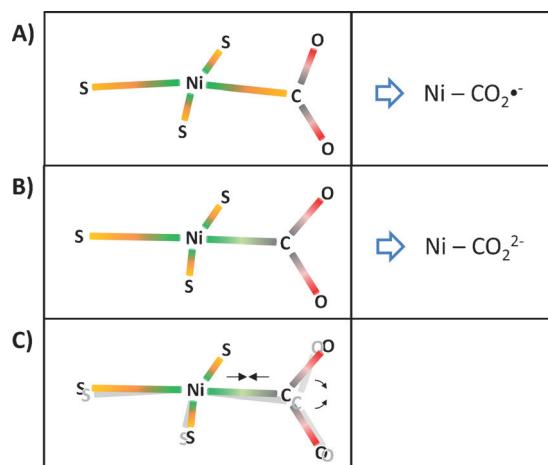
**Abbildung 2.** Der Redoxzustand des C-Clusters der Ni-CODH und die zugehörigen Potentiale für die Bindung von Substraten und Inhibitoren.<sup>[7]</sup> Das Mittelpunktpotential der  $\text{CO}_2$ -CO-Kopplung ist ca.  $-550 \text{ mV}$ , und das Potential der  $\text{NCO}^-$ - und  $\text{CN}^-$ -Bindung wird auf ca.  $-400 \text{ mV}$  bzw. ca.  $-600 \text{ mV}$  geschätzt. In Gelb sind der  $\text{NCO}^-$ - und der  $\text{CO}_2$ -gebundene Zustand hervorgehoben, der durch die atomar aufgelöste Struktur belegt wurde.<sup>[8]</sup>

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* (<sup>Ch</sup>CODH) mit wirklich atomarer Auflösung ( $d_{min} < 1.1 \text{ \AA}$ ) durch die Arbeitsgruppe Dobbek; eine Struktur enthält das gebundene Substrat  $\text{CO}_2$  und die andere den gebundenen Inhibitor  $\text{NCO}^-$ .<sup>[8]</sup> 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  $\text{CO}_2$  durch zwei Elektronen reduziert wird und mehr einer Carboxylgruppe als einem  $\text{CO}_2^-$ -Radikal anion gleicht. Die gebundene  $\text{NCO}^-$ -Gruppe ist gebogen und auf ähnliche Art und Weise wie  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$ -Aktivierung und die  $\text{NCO}^-$ -Inhibierung hin und vervollständigen des 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 hochauflösten ( $1.50 \text{ \AA}$ ) Struktur der  $\text{CO}_2$ -gebundenen <sup>Ch</sup>CODH<sup>[9]</sup> ist die Ni-C-Bindung wesentlich kürzer in der atomar aufgelösten ( $1.03 \text{ \AA}$ ) Struktur, was eine ungewöhnliche elektronische Struktur des Nickels impliziert (Abbildung 3), obwohl die Koordinationsgeometrie (quadratisch



**Abbildung 3.** Vergleich des aktiven Zentrums in der hochauflösten ( $1.50 \text{ \AA}$ ) Struktur (PDB-Code: 3B52)<sup>[9]</sup> und der atomar aufgelösten ( $1.03 \text{ \AA}$ ) Struktur.<sup>[8]</sup> A) Koordinierung des Ni in der  $1.50\text{-\AA}$ -Struktur, in der das gebundene Substrat einem  $\text{CO}_2^-$ -Radikal anion gleich. B) Koordinierung des Ni in der  $1.03\text{-\AA}$ -Struktur, in der das gebundene Substrat dem eines Formiats oder eines Ni-gebundenen Carboxylats gleich. C) Überlagerung des aktiven Zentrums von A und B, in der A grau dargestellt ist. Die  $1.03\text{-\AA}$ -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  $\text{CO}_2$ -Ligand in der atomar aufgelösten Struktur noch mehr gebogen ( $117^\circ$ ) als in der hochauflösten Struktur ( $133^\circ$ ). Dies deutet auf eine reduziertere Form des  $\text{CO}_2$ -Liganden als in dem zuvor angenommenen  $\text{CO}_2^-$ -Radikal anion hin (Abbildung 3). Basierend auf der geometrischen Ähnlichkeit dieses Liganden mit dem Zwei-Elektronen-Reduktionsprodukt Formiat oder der metallgebundenen Carboxylgruppe ( $\text{ca. } 120^\circ$ ) ist auch dieser Ligand wahrscheinlich um zwei Elektronen reduziert, offensichtlich stabilisiert durch  $\pi$ -Rückbindung und bereit für eine Protonierung in der weiteren Folge.

Die Lösung der  $\text{NCO}^-$ -gebundenen Struktur ist eine Neuheit in der CODH-Forschung, da vorherige Studien sich auf die Struktur des oxidierten C-Clusters mit gebundenem  $\text{CN}^-$  oder gebundenem Isocyanat konzentrierten.<sup>[4,10]</sup> Überraschenderweise ist  $\text{NCO}^-$ , das auch nach einem Zwei-Elektronen-Mechanismus reduziert wird, fast in der gleichen geometrischen Konformation gebunden wie  $\text{CO}_2$ . Noch überraschender ist, dass die Bindungswinkel und -längen, nach der Reduktion, auf die Bildung einer Carbamoylgruppe ( $\text{H}_2\text{NCO}$ ) hindeuten. Dies wird auch durch die Verlagerung

einer His-Seitenkette, die normalerweise Wasserstoffbrücken mit dem N-Atom des  $\text{NCO}^-$ -Liganden bildet, gestützt. Diese Beobachtung ist außergewöhnlich, da man 1) basierend auf der Ähnlichkeit der Bindungsgeometrie für  $\text{NCO}^-$  und  $\text{CO}_2$  bei einer Zwei-Elektronen-Reduktion von  $\text{NCO}^-$  die Produkte  $\text{CN}^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$  erwarten würde, und da man 2) basierend auf den vorherigen Beobachtungen einer langsamen Oxidation von *n*-Butylisocyanid ( $\text{CN-Bu}$ ) zu *n*-Butylisocyanat ( $\text{OCN-Bu}$ )<sup>[10]</sup> auf eine analoge Rückreaktion, in der  $\text{NCO}^-$  zu Cyanid ( $\text{CN}^-$ ) reduziert wird, spekulieren könnte. Die Diskrepanz in dem Muster der Elektronenverteilung für den  $\text{CO}_2$ - und den  $\text{NCO}^-$ -Liganden hebt den Unterschied zwischen den Substraten und Inhibitoren der Ni-CODH hervor.

Die atomar aufgelösten Strukturen der  $^{17}\text{O}$ 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  $\text{NCO}^-$ -Liganden wirft auch interessante Fragen über den Inhibitionsmechanismus der Ni-CODH auf. Solch ein Zwei-Elektronen-Transfer wurde in Zyklovoltammetrie-Experimenten nicht beobachtet.<sup>[7]</sup> Darüber hinaus impliziert die Zwei-Elektronen-Reduktion des Liganden eine Sackgasse, bei der der  $\text{C}_{\text{red}2}$ -Cluster unproduktiv oxidiert wird. Die

bildet einen Widerspruch zu früheren Ergebnissen, denen zufolge der  $\text{NCO}^-$ -Ligand den  $\text{C}_{\text{red}2}$ -Zustand zu stabilisieren scheint.<sup>[7]</sup> Deshalb sollten die elektrochemischen und spektroskopischen Daten erneut untersucht und mit den Ergebnissen der atomar aufgelösten Struktur abgestimmt werden, um ein verbessertes Modell des Inhibitionsmechanismus 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