

[NiFe]-HydrogenaseDeutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201508976
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201508976**Ein Netzwerk aus hydrophoben Tunneln zum Transport gasförmiger Reaktanten in einer O₂-toleranten, membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase, aufgedeckt durch Derivatisierung mit Krypton**

Jacqueline Kalms, Andrea Schmidt, Stefan Frielingsdorf, Peter van der Linden, David von Stetten, Oliver Lenz, Philippe Carpentier und Patrick Scheerer*

Abstract: [NiFe]-Hydrogenasen katalysieren die reversible heterolytische Spaltung von Wasserstoff in Protonen und Elektronen. Das tief im Protein liegende aktive Zentrum wird dabei von gasförmigen Substraten und Inhibitoren über Tunnel erreicht. Hier wird die Proteinstruktur der O₂-toleranten, membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenase von *Ralstonia eutropha* (ReMBH) anhand von Proteinkristallen beschrieben, die mit Krypton derivatisiert wurden. Die Positionen der Kryptonatome ermöglichen eine umfassende Beschreibung des Gastunnelnetzwerks. Eine detaillierte Übersicht von Größe, Länge und Route der Tunnel wurde mithilfe von Rechnungen erstellt. Vergleicht man die Tunneleigenschaften der ReMBH mit Kristallstrukturen anderer O₂-toleranter und O₂-sensitiver [NiFe]-Hydrogenasen hinsichtlich der Größe und Anzahl der hydrophoben Gastunnel, ergeben sich wesentliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Einige sind womöglich auf die bemerkenswerte Eigenschaft der Sauerstofftoleranz zurückzuführen.

Proteine, in denen die Reaktanten über Tunnel von der Proteinoberfläche zu einem innenliegenden aktiven Zentrum oder zwischen mehreren katalytischen Zentren transportiert werden, sind in allen sechs Enzymklassen vertreten.^[1,2] Ein prägnantes Beispiel für den Transport von Katalyse-Intermediaten durch lange Tunnel ist die Carbamylphosphat-Synthetase aus der Enzymklasse 6. Die drei aktiven Zentren des Enzyms sind über zwei Substrattunnel mit einer Länge von insgesamt 100 Å miteinander verbunden.^[3] Die Zugänglichkeit von tief verborgenen aktiven Zentren für ihre Substrate wurde bereits eingehend für z.B. Bakteriorhodopsin, Lipoxxygenase, Photosystem II und Hydrogenase untersucht.^[4–9] Hydrogenasen sind Metalloenzyme, welche entwe-

der den ersten oder beide Teilschritte der Reaktion $\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{H}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$ katalysieren. Sie sind in allen drei Domänen des phylogenetischen Stammbaums verbreitet und werden anhand des Vorhandenseins von Metallen im aktiven Zentrum eingeordnet. [Fe]-Hydrogenasen katalysieren einen wesentlichen Schritt der Methanogenese in Wasserstoff verwertenden Archaeen.^[10] Die [FeFe]-Hydrogenasen sind vorwiegend an der H₂-Produktion unter strikt anaeroben Bedingungen beteiligt, wohingegen [NiFe]-Hydrogenasen hauptsächlich H₂-oxidierende Enzyme sind.^[11] [NiFe]-Hydrogenasen können weiterhin in O₂-sensitive und O₂-tolerante Enzyme unterteilt werden. O₂-sensitive Hydrogenasen werden durch die Gegenwart von Sauerstoff meist irreversibel inaktiviert, vermutlich verursacht durch die Reaktion von reaktiven Sauerstoffspezies mit den Metallkofaktoren.^[12] O₂-tolerante Hydrogenasen hingegen erhalten ihre enzymatische Funktion in Gegenwart von Sauerstoff.^[13] Dies macht sie sehr interessant für biotechnologische Anwendungen.^[14] Die Sauerstofftoleranz ist verknüpft mit der Fähigkeit des Enzyms, einige der durch die H₂-Oxidation generierten Elektronen für die komplette Reduktion von O₂ zu harmlosem Wasser zu nutzen.^[13,15] Gut untersuchte Vertreter der O₂-toleranten Enzyme gehören zu der Gruppe 1 der membrangebundenen [NiFe]-Hydrogenasen (MBHs), die aus drei Untereinheiten bestehen.

In der großen Untereinheit befindet sich das aktive [NiFe]-Zentrum, an dem die Wasserstoffspaltung stattfindet. Die kleine Untereinheit enthält drei [FeS]-Cluster, die das katalytische Zentrum mit der dritten Untereinheit, einem membranständigen Cytochrom *b*₅₆₂, verbinden. Hier wird die Untersuchung der katalytisch aktiven, heterodimeren Form der ReMBH ohne Cytochrom *b*₅₆₂ vorgestellt.

In Abhängigkeit von der Natur des Gasmoleküls, das durch den hydrophoben Tunnel zum aktiven [NiFe]-Zentrum gelangt, finden verschiedene enzymatische Reaktionen statt. Im Rahmen des katalytischen Zyklus wird H₂ zu Protonen und Elektronen oxidiert. Die Protonen werden über protonierbare Aminosäuren und Wassermoleküle zur Proteinoberfläche transportiert.^[16] Die Elektronen werden über mehrere Eisen-Schwefel-Cluster (Elektronrelais) zum primären Elektronenakzeptor geleitet.^[17] Es wird angenommen, dass O₂ am aktiven Zentrum ebenfalls katalytisch umgesetzt wird. In diesem Reaktivierungsprozess wird O₂ durch Elektronen und Protonen zu H₂O reduziert, das anschließend über einen nahegelegenen Wasserkanal zur Proteinoberfläche gelangt. Das Elektronrelais liefert die hierfür benötigten Elektronen (Abbildung 1). Unter aeroben Bedingungen kann der

[*] J. Kalms, A. Schmidt, Dr. P. Scheerer
Institut für Medizinische Physik und Biophysik (CC2)
Group Protein X-ray Crystallography and Signal Transduction
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Charitéplatz 1, 10117 Berlin (Deutschland)
E-Mail: patrick.scheerer@charite.de

Dr. S. Frielingsdorf, Dr. O. Lenz
Institut für Chemie, Sekr. PC14
Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
P. van der Linden, Dr. D. von Stetten, Dr. P. Carpentier
ESRF – European Synchrotron Radiation Facility
71 Avenue des Martyrs, Grenoble Cedex 9, 38043 (Frankreich)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508976> zu finden.

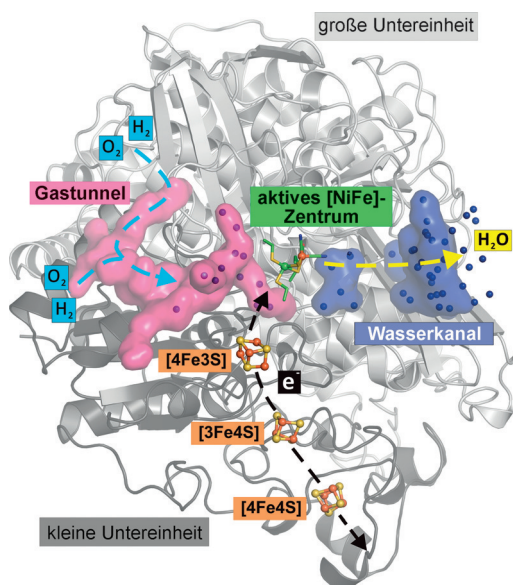


Abbildung 1. Cartoon-Darstellung der großen und kleinen Untereinheit der ReMBH (PDB-Nr.: 3RGW) mit dem aktiven [NiFe]-Zentrum und den [FeS]-Clustern (proximal: [4Fe3S], medial: [3Fe4S], distal: [4Fe4S]) gezeigt als Kugeln/Stäbe. Der Gastunnel (magenta) und der Wasserkanal (blau) sind als Oberflächenmodell dargestellt (alle Abbildungen wurden mit PyMOL generiert).^[20] Die Wassermoleküle (Kugeln) sind in den Tunneln und Kanälen zugehörigen Farben abgebildet (magenta/blau). Die Wege von H₂/O₂ und H₂O durch die Tunnel und Kanäle sind durch hellblaue bzw. gelbe Pfeile gekennzeichnet. Wege des Elektronenflusses sind als schwarzer Pfeile dargestellt.

[4Fe3S]-Cluster des Elektronenrelais zwei Redoxübergänge in einem physiologischen Potentialbereich durchlaufen und insgesamt zwei Elektronen in kurzer Zeit zum aktiven Zentrum abgeben. Die dadurch hervorgerufene Superoxidation dieses Clusters bewirkt Strukturänderungen, und ein Eisenion (Fe4) wechselt seine Bindungspartner.^[18] Alle bisher vorhandenen Kristallstrukturen der ReMBH^[17,18] zeigen klare mögliche Pfade für den Elektronentransport und die Wasserfreisetzung, wohingegen die Wege für Protonentransport und Gastransport überwiegend undefiniert blieben. Für den effizienten Gastransport von der Proteinoberfläche zum tief im Inneren liegenden aktiven Zentrum ist ein Tunnel notwendig.^[19]

1997 wurde bereits ein Gastunnel in der O₂-sensitiven [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans* (Df) anhand von mit Xenon (Xe) derivatisierten Kristallen vorgeschlagen.^[9] In der hier vorgelegten Arbeit zeigen wir hochaufgelöste Röntgenkristallographiedaten der O₂-toleranten ReMBH mit mehreren Krypton(Kr)-Einlagerungen, anhand derer ein hydrophober Gastunnel definiert wurde. Die Hydrophobie und die hohe Ordnungszahl von Edelgasen wie Kr und Xe qualifizieren sie speziell für die Untersuchung von hydrophoben Gastunneln in röntgenkristallographischen Experimenten mit Druckbegasung.^[4,6–9] Ein Vergleich der Tunnelstrukturen mehrerer Kristallstrukturen von O₂-sensitiven und O₂-toleranten [NiFe]-Hydrogenasen deckte markante Unterschiede auf, die hinsichtlich der O₂-Toleranz einiger dieser Enzyme diskutiert werden.

Wir nutzten die effiziente Methode der Edelgas-Derivatisierung von ReMBH-Kristallen, um den Verlauf der hydrophoben Gastunnel nachzuvollziehen. Es wurden verschiedene native und anomale Datensätze bei 1.47 und 2.52 Å Auflösung gemessen (Tabelle S1 der Hintergrundinformationen). Die Proteingrobstruktur der mit Krypton derivatisierten ReMBH inklusive der vier Metallkofaktoren ist strukturell mit dem nativen Enzym (wie isoliert oder auch „oxidierten Zustand 2“ genannt) identisch.^[18] Das aktive [NiFe]-Zentrum befindet sich im so genannten Ni₂-B-Zustand, der durch einen die beiden Metallionen verbindenden OH[–]-Liganden charakterisiert ist, wobei der Ni-Fe-Abstand 2.85 Å beträgt. Die Struktur des [4Fe3S]-Clusters ist allerdings heterogen, da das flexible Eisenion Fe4 in einer Doppelkonformation vorliegt, was sich in einer etwas ausgeschmierten Elektronendichte widerspiegelt (Abbildung S1). Die erhöhte Flexibilität entsteht womöglich durch die Edelgas-Derivatisierung. Zu unterstreichen ist, dass die Struktur des Clusters keine Mischung aus dem zuvor veröffentlichten H₂-reduzierten Zustand und dem „oxidierten Zustand 2“ darstellt, da sich in der aktuellen Struktur beide Positionen in der Nähe der Position des Fe4 im „oxidierten Zustand 2“ befinden.^[18] Die ReMBH-Struktur enthält 19 mögliche Kr-Positionen, die aufgrund der hohen Elektronendichte an diesen Positionen bestimmt wurden, mit unterschiedlichen Besetzungen, vorwiegend lokalisiert in Tunneln und Hohlräumen (Tabelle S2 und Abbildung S2). Von den 19 Kryptonatomen bilden 15 ein sichtbares Netzwerk aus hydrophoben Gastunneln, welche die Proteinoberfläche mit dem aktiven Zentrum verbinden (Abbildung 2). Wassermoleküle befinden sich in hydrophilen Hohlräumen und bilden einen Wasserkanal, der das katalytische Zentrum mit der Protein-

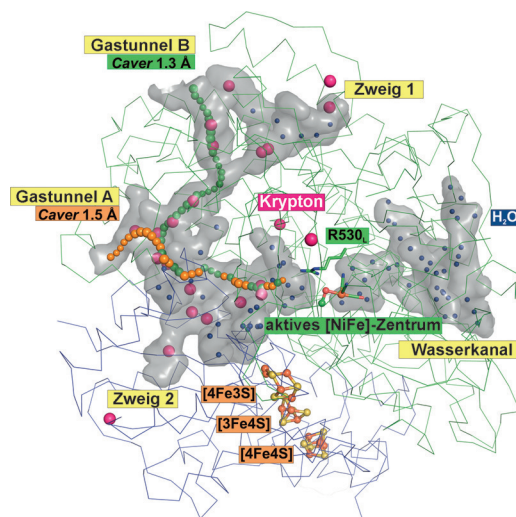


Abbildung 2. Proteinrückgrat-Darstellung der großen und kleinen Untereinheit der Krypton-derivatisierten ReMBH (PDB-Nr.: 5D51). Das aktive [NiFe]-Zentrum und die [FeS]-Cluster sind in der Kugel/Stab-Darstellung gezeigt. Der hydrophobe Gastunnel und der Wasserkanal sind als graue Oberflächen dargestellt. Kryptonatome (magenta) und Wassermoleküle (blau) sind als ungebundene Kugeln veranschaulicht. R530_L fungierte als initialer Startpunkt für die Caver-Rechnungen. Die Ergebnisse sind als grüne und orange Ketten mit einem Radius der Tunnelengstelle von 1.3 bzw. 1.5 Å gezeigt.

oberfläche verbindet (Abbildung 2). Zwei Öffnungen an der Proteinoberfläche, bezeichnet als Gastunnel A und B, ermöglichen den Gaseintritt in das Tunnelnetzwerk (Abbildung 2). Montet et al.^[9] beschrieben zuvor zwei Haupteingänge für Xe und H₂ in der *Df*-[NiFe]-Hydrogenase, die teilweise mit den Tunneleingängen der *Re*MBH übereinstimmen. Der vorgeschlagene Haupttunnelzugang der *Df*-Hydrogenase ist in der *Re*MBH verschlossen (Zweig 2 („branch 2“) in Abbildung 2), wohingegen der zweite Eingang dem Gastunneleingang A der *Re*MBH entspricht. Die zweite Gastunnelöffnung der *Re*MBH (Gastunnel B) wurde im *Df*-Enzym jedoch als funktionell unwichtiger Gasdiffusionsweg beschrieben.^[9] Die zehn Xe-Dichten, die von Montet et al. gefunden wurden, scheinen den gleichen hydrophoben Tunnel zu besetzen, den wir in unserer Studie für die *Re*MBH beschreiben.

Um die experimentellen Befunde zu bekräftigen, wurden zusätzlich Tunnel-Berechnungen mit dem Programm *Caver* durchgeführt.^[20] Der minimale Kugel-Probenradius (minimal probe radius) wurde dabei auf 1.2 Å festgelegt. Dieser entspricht dem Van-der-Waals-Radius von Wasserstoff (Tabelle S3). Die Tunnelvoraussage mit *Caver* erfolgte in 0.1-Å-Schritten bis auf 1.6 Å als größtmöglichen Wert für die Darstellung der Tunnel. Als initialer Startpunkt für die Tunnel-Berechnungen fungierte die Aminosäure R530_L (*Re*MBH-Nomenklatur: L = große und S = kleine Untereinheit).

Dieses Arginin befindet sich in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums (Abbildung 2) und ist in allen bis jetzt bekannten [NiFe]-Hydrogenasen konserviert.^[17,21] Die Rechnungen deckten zwei plausible Tunnelpfade in der *Re*MBH auf, die mit den Positionen der Kryptonatome deckungsgleich sind (Abbildung 2). Gastunnel A hat eine Länge von 30 Å, und der Radius der engsten Tunnelstelle („bottleneck radius“ Tunnel^[20]) beträgt 1.5 Å. Gastunnel B ist 50 Å lang, mit einem Radius der engsten Tunnelstelle von 1.3 Å (Abbildung 2 und Tabelle S4). Die berechneten Routen stimmen vollständig mit der Lage der Kryptonatome in der *Re*MBH-Struktur überein. Anschließend untersuchten wir mit *Caver* die Kristallstrukturen verschiedener Gruppe-1-Hydrogenasen auf Vorhandensein und Position von möglichen Gastunneln. Zu diesem Zweck wurden die O₂-toleranten Enzyme von *Ralstonia eutropha* (*Re*), *Escherichia coli* (*Ec*), *Hydrogenovibrio marinus* (*Hm*) und *Salmonella enterica* (*Se*) mit den O₂-sensitiven Hydrogenasen von *Desulfovibrio gigas* (*Dg*), *Desulfovibrio desulfuricans* (*Dd*), *Desulfovibrio vulgaris* (*Dv*), *Desulfovibrio fructosovorans* (*Df*) und *Allochrodatum vinosum* (*Av*) verglichen (Tabellen S4 und S5). Ein Vergleich der Gastunnelnetzwerke O₂-toleranter und O₂-sensitiver Hydrogenasen ist in Abbildung 3 beispielhaft für die Hydrogenasen von *Re* und *Dv* dargestellt. Obwohl große Abschnitte des Gastunnelnetzwerks konserviert sind (Abbildung 3), gibt es markante Unterschiede zwischen den Hydrogenasen bezüglich der Anzahl der zur Proteinoberfläche führenden Tunnel (Tabellen S4 und S5). O₂-tolerante Hydrogenasen enthalten im Durchschnitt zwei Gastunnel mit Ausnahme der *Hm*MBH^[22], welche im reduzierten bzw. oxidierten Zustand drei bzw. vier Tunnelöffnungen zur Oberfläche enthält. Die Radien der Tunnelengstellen variieren zwischen 1.2 und 1.5 Å. Demzufolge gibt es eine auffallende Übereinstimmung

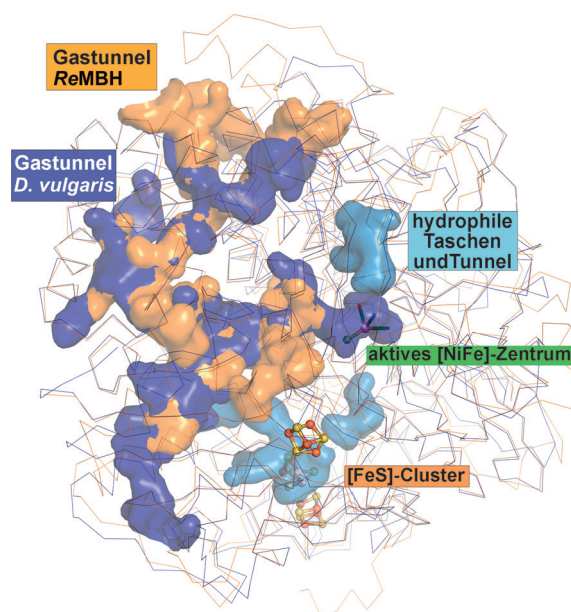


Abbildung 3. Darstellung der O₂-toleranten *Re*MBH (PDB-Nr.: 3RGW, Proteinrückgrat orange eingefärbt) und der O₂-sensitiven Hydrogenase aus *Dv*^[27] (PDB-Nr.: 1WUL, dunkelblau). Die [FeS]-Cluster und das aktive [NiFe]-Zentrum sind in der Kugel/Stab-Darstellung gezeigt. Die hydrophoben Gastunnel sind ebenfalls orange (*Re*MBH) und dunkelblau (*Dv*-Hydrogenase) eingefärbt. Hydrophile Taschen und Tunnel in der *Dv*-Hydrogenase sind hellblau gekennzeichnet.

hinsichtlich der Anzahl der hydrophoben Gastunnel (ca. 2) in O₂-toleranten [NiFe]-Hydrogenasen. Gleiches gilt für die O₂-sensitiven Enzyme, die rund fünf Gastunnel enthalten. Hier-von ausgenommen ist die *Dd*-Hydrogenase^[23] mit lediglich zwei Tunneln. Die anderen vier untersuchten Enzyme enthalten mindestens fünf Gastunnel. Die Radien der Tunnelengstellen liegen zwischen 1.2 und 1.6 Å.

Für O₂-sensitive Hydrogenasen ergibt sich daraus im Durchschnitt ein zweimal höheres Vorkommen von hydrophoben Tunneln und Öffnungen als in den O₂-toleranten Enzymen (Tabellen S4 und S5). Obwohl *Hm*MBH, *Ec*Hyd-1^[24] und die *Dd*-Hydrogenase ein ähnliches Tunnelnetzwerk wie die verwandten O₂-toleranten Enzyme aufweisen, gibt es deutliche Unterschiede in der Anzahl der Tunnelöffnungen. Die Zweige 1 und 2 („branch 1 und 2“, Abbildung 2), die in allen untersuchten, O₂-sensitiven Enzymen Öffnungen an der Oberfläche haben (Abbildung 3), sind in der *Dd*-Hydrogenase blockiert. Die O₂-tolerante *Hm*MBH hat dagegen Öffnungen an den Enden der Zweige 1 und 2. Den *Caver*-Rechnungen zufolge hat im Fall von *Ec*Hyd-1 lediglich Gastunnel A eine Öffnung zur Oberfläche (Abbildung 4). Die Tatsache, dass Gastunnel A offensichtlich in allen [NiFe]-Hydrogenasen präsent ist (Abbildung 2), lässt auf eine generelle Rolle für den Gastransport schließen. Unterschiede zwischen den Hydrogenasen zeigen sich auch in den Abmessungen der Gastunnel. Die Mehrheit der Tunnel in den O₂-toleranten und O₂-sensitiven Enzymen hat an der Tunnelengstelle einen Radius von 1.2 Å (37.5%) beziehungsweise 1.3 Å (43.5%), und sie überspannen einen Abstand von 28–76 Å zwischen aktivem Zentrum und Proteinoberfläche. Die Tunnel mit großen Tunnelengstellenradien sind im

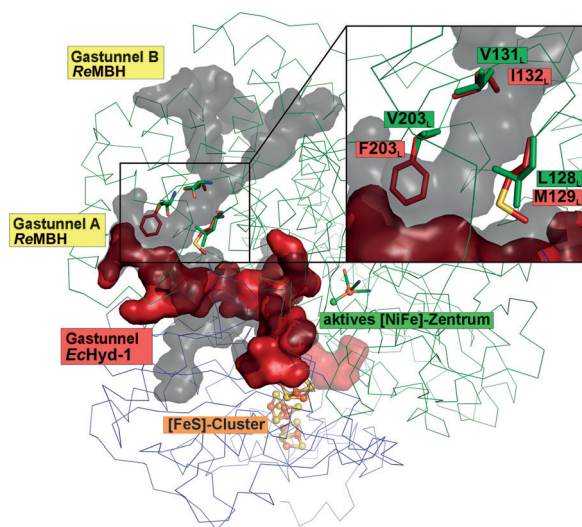


Abbildung 4. Überlagerung der hydrophoben Gastunnel der *ReMBH* (PDB-Nr.: 3RGW, grau) und der *EcHyd-1* (PDB-Nr.: 3UQY, rot). Gezeigt ist ebenfalls das Proteinrückgrat der *ReMBH* mit den vier Metallkofaktoren, dargestellt im Kugel/Stab-Modell. Die überlagerten Tunnel sind als Oberflächen gezeigt. Vergrößerung: Die drei Aminosäuren M129_L, I132_L und F203_L (als rote Stäbe dargestellt) der *EcHyd-1* blockieren den Gastunnel B. In der Überlagerung dargestellt sind die Aminosäuren L128_L, V131_L, V203_L der *ReMBH* (grüne Stäbe).

Durchschnitt am kürzesten. So hat z. B. der Gastunnel A der *ReMBH* (Abbildung 2) eine Tunnelengstelle mit einem Radius von 1.5 Å und eine Länge von 30 Å; Gastunnel B hat dagegen eine Länge von 50 Å mit einem Radius der Tunnelengstelle von nur 1.3 Å. Die Abmessungen der Gastunnel in allen anderen untersuchten Strukturen (die *Dv*-Hydrogenase ausgenommen^[25]) zeigen einen ähnlichen Zusammenhang. Wie bereits erwähnt, gibt es eine erhebliche Ähnlichkeit in der Architektur der Gastunnel in O₂-toleranten und O₂-sensitiven [NiFe]-Hydrogenasen, speziell in der Nähe des aktiven Zentrums. Entsprechend unseren Rechnungen liegt der kalkulierte Startpunkt des Tunnels 3–4 Å vom konservierten Argininrest (R530_L der *ReMBH*; Abbildung 2) entfernt. Eine Vergrößerung des Kugel-Probieradius würde zu einem größeren Abstand zwischen dem initialen und berechneten Startpunkt führen. Dies impliziert, dass in der Nähe des aktiven Zentrums der Gastunnel zunehmend enger wird. Eine derartige Auswirkung wurde bereits für die *Df*-Hydrogenase mit verschiedenen Aminosäuresubstitutionen am Tunneleingang am aktiven [NiFe]-Zentrum beobachtet (Tabelle S6).^[26] Des Weiteren zeigte eine frühere Studie, dass eine Erweiterung des potenziellen Gastunnels der regulatorischen [NiFe]-Hydrogenase von *Re* durch einen ortsspezifischen Aminosäureaustausch zu Hydrogenase-Varianten führte, die empfindlicher gegenüber der Inhibition durch O₂ waren.^[27] Substitutionen der konservierten Aminosäuren V74_L und L122_L der *Df*-Hydrogenase durch entweder M74_L/M122_L (PDB-Nr.: 3CUR) oder I74_L/F122_L (PDB-Nr.: 3CUS) führten wegen der voluminöseren Aminosäureseitenketten zu einer Verschiebung des kalkulierten Startpunkts auf eine Entfernung von 9 Å zum Rest R530_L (Abbildung S3).^[26] Wir verwendeten die zugehörigen Kristallstrukturen, um einen simulierten Gastunnel mit einem maximalen Abstand von

3 Å zum konservierten Arginin zu berechnen. Diese Rechnung ergab einen Radius der Tunnelengstelle von nur 1 Å, welche die Erreichbarkeit des aktiven Zentrums sowohl durch O₂ als auch durch H₂ erschwert. Diese Annahme spiegelte sich im Fall der V74_LI/L122_LF- ($K_m^{H_2} = 50 \mu\text{M}$) und V74_LM/L122_LM-Varianten ($K_m^{H_2} = 200 \mu\text{M}$) in einer beträchtlichen Zunahme der Michaelis-Konstante für H₂ gegenüber der nativen *Df*-Hydrogenase ($K_m^{H_2} = 10 \mu\text{M}$) wider.^[26]

Die Substitutionen einzelner Aminosäuren führten dagegen nur zu geringen Abstandsverschiebungen zwischen Arginin und Tunnelöffnung zur Proteinoberfläche (Tabelle S6). Die Kristallstrukturen der O₂-toleranten Hydrogenasen zeigen einen geringfügig größeren Abstand zwischen den Seitengruppen der Valin- und Leucinreste, die gemeinhin die Öffnung des Gaskanals am aktiven Zentrum darstellen, als bei den O₂-sensitiven Enzymen. Dies ist hauptsächlich auf Rotationsunterschiede der Seitengruppe von L125_L (*ReMBH*-Nomenklatur) zurückzuführen (Abbildung S4). Die experimentellen Daten in Zusammenhang mit den *Caver*-Rechnungen veranschaulichen, dass der Austausch der Aminosäuren an der Gaskanalöffnung am aktiven Zentrum durch voluminösere Reste den Kanaldurchmesser deutlich verringert und damit den Gastransport zum aktiven Zentrum offenbar erheblich einschränkt. Interessanterweise lässt sich bei den O₂-sensitiven Hydrogenasen eine höhere Variabilität in der Gesamtheit der tunnelbildenden Aminosäuren beobachten als bei den O₂-toleranten Hydrogenasen. Innerhalb der konservierten Tunnelstrukturen zeigen beide Gruppen allerdings eine einheitliche Aminosäure-Invarianz von 37.4 % (Abbildungen S7 und S8).

Im Rahmen unserer Untersuchungen identifizierten wir außerdem einen hydrophilen Tunnel am medialen [3Fe4S]-Cluster, der ausschließlich in den O₂-sensitiven Hydrogenasen zu beobachten ist. In O₂-toleranten Hydrogenasen ist dieser Tunnel durch ein Tryptophan blockiert, das ein Phenylalanin in den O₂-sensitiven Enzymen ersetzt (ausgenommen im Fall der *Av*-Hydrogenase;^[28] Abbildungen S5 und S6). Dieser zusätzliche Schutz des [3Fe4S]-Clusters gegen Wassermoleküle von außen beeinflusst möglicherweise das elektrochemische Potential dieses Kofaktors.^[29] Im Falle der O₂-toleranten Enzyme zeigt lediglich *EcHyd-1* wesentliche Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung des Gastunnelnetzwerks. Die großen Aminosäuren F203_L, M129_L und I132_L blockieren den Gastunnel B (Abbildung 4, Tabelle S7).^[24] Der Hauptgastunnel A hat eine Länge von 32 Å und einen Tunnelengstellenradius von 1.2 Å.

Basierend auf der Position der Kryptonatome im hydrophoben Gastunnel der *ReMBH* und den entsprechenden theoretischen Prognosen der Routen für die Gastunnel in O₂-sensitiven und O₂-toleranten [NiFe]-Hydrogenasen stellen wir die Hypothese auf, dass O₂-sensitive Enzyme ein komplexeres Tunnelnetzwerk und mehr Tunneleingänge als O₂-tolerante Hydrogenasen aufweisen. Dies führt womöglich zu erhöhten Diffusionsraten für das Substrat H₂ sowie inhibierende Gase wie O₂ und CO. Die Gastunnel der O₂-toleranten Hydrogenasen sind im Vergleich schmäler und haben weniger Öffnungen. Diese Eigenschaft limitiert vermutlich die Gasdiffusion zum aktiven Zentrum, was wiederum zur außerge-

wöhnlichen O₂-Toleranz dieser Enzyme beiträgt. Wir möchten hervorheben, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auf der Analyse von statischen Kristallstrukturen basieren. Es ist allerdings zu vermuten, dass dynamische Änderungen im Gastunnelnetzwerk den Zugang von Gasen zum aktiven Zentrum entscheidend beeinflussen. Für die Untersuchung solcher Effekte in zukünftigen Arbeiten sind Moleküldynamik-Simulationen bestens geeignet. Unsere Krypton-derivatisierten ReMBH-Kristallstrukturen bieten daher einen exzellenten Startpunkt, um die Gasdiffusionsprozesse in Abhängigkeit von dynamischen Änderungen der Gastunneldurchmesser zu untersuchen. Zusätzlich wäre eine Untersuchung von Varianten der ReMBH mit gezielten Aminosäureaustauschen im Gastunnel hilfreich, um unsere Hypothese zu untermauern.

Experimentelles

ReMBH wurde wie zuvor beschrieben produziert und gereinigt.^[17] Optimierte ReMBH-Kristalle wurden mit der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen gezüchtet^[17,18] und in einem Hochdruckkühlungssystem mit Krypton derivatisiert.^[30] Eine detaillierte Beschreibung aller Experimente befindet sich in den Hintergrundinformationen.

Danksagung

Wir danken den wissenschaftlichen Mitarbeitern der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) an den Strahlenrohren ID14-1, ID23-1, ID23-2, ID14-4 und ID29, an denen die Strukturdaten gesammelt wurden, für exzellente und fortwährende Unterstützung. Außerdem danken wir Ciara Lally für die kritische Durchsicht der englischen Version des Manuskripts. Diese Studie wurde durch Forschungsmittel der DFG (SFB740-B6 an P.S., SFB1078-B6 an P.S., Exzellenzcluster „Unifying Concepts in Catalysis“, Forschungsfeld E3-1, an J.K., A.S., S.F., O.L. und P.S.) und von der ESRF (an P.v.d.L., D.v.S. und P.C.), unterstützt.

Stichwörter: Hydrogenasen · Krypton · Metalloenzyme · Sauerstoff · Strukturbiologie

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5586–5590
Angew. Chem. **2016**, *128*, 5676–5680

- [1] L. J. Kingsley, M. A. Lill, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2015**, *83*, 599–611.
- [2] F. M. Raushel, J. B. Thoden, H. M. Holden, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 539–548.
- [3] A. Weeks, L. Lund, F. M. Raushel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 465–472.
- [4] N. Hayakawa, T. Kasahara, D. Hasegawa, K. Yoshimura, M. Murakami, T. Kouyama, *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 812–823.
- [5] J. Saam, I. Ivanov, M. Walther, H. G. Holzhütter, H. Kuhn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13319–13324.
- [6] J. W. Murray, J. Barber, *J. Struct. Biol.* **2007**, *159*, 228–237.

- [7] A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 334–342.
- [8] A. Gabdulkhakov, A. Guskov, M. Broser, J. Kern, F. Müh, W. Saenger, A. Zouni, *Structure* **2009**, *17*, 1223–1234.
- [9] Y. Montet, P. Amara, A. Volbeda, X. Vernede, E. C. Hatchikian, M. J. Field, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4*, 523–526.
- [10] C. Zirngibl, W. van Dongen, B. Schwörer, R. von Büna, M. Richter, A. Klein, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *208*, 511–520.
- [11] W. Lubitz, H. Ogata, O. Rüdiger, E. Reijerse, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4081–4148.
- [12] J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, C. Cavazza, Y. Nicolet, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4273–4303.
- [13] P. Wulff, C. C. Day, F. Sargent, F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6606–6611.
- [14] B. Friedrich, J. Fritsch, O. Lenz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 358–364.
- [15] L. Lauterbach, O. Lenz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17897–17905.
- [16] V. H. Teixeira, C. M. Soares, A. M. Baptista, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2008**, *70*, 1010–1022.
- [17] J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C. M. Spahn, *Nature* **2011**, *479*, 249–252.
- [18] S. Frielingsdorf, J. Fritsch, A. Schmidt, M. Hammer, J. Löwenstein, E. Siebert, V. Pelmeshnikov, T. Jaenicke, J. Kalms, Y. Rippers, F. Lendzian, I. Zebger, C. Teutloff, M. Kaupp, R. Bittl, P. Hildebrandt, B. Friedrich, O. Lenz, P. Scheerer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 378–385.
- [19] J. C. Fontecilla-Camps, P. Amara, C. Cavazza, Y. Nicolet, A. Volbeda, *Nature* **2009**, *460*, 814–822.
- [20] B. Kozlíková, E. Šebestová, V. Šustr, J. Brezovský, O. Strnad, L. Daniel, D. Bednář, A. Pavelka, M. Maňák, M. Bezděka, P. Beneš, M. Kotry, A. W. Gora, J. Damborský, J. Sochor, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2684–2685.
- [21] C. Greening, A. Biswas, C. R. Carere, C. J. Jackson, M. C. Taylor, M. B. Stott, G. M. Cook, S. E. Morales, *ISME J.* **2016**, *10*, 761–777.
- [22] Y. Shomura, K. S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, *Nature* **2011**, *479*, 253–256.
- [23] P. M. Matias, C. M. Soares, L. M. Saraiva, R. Coelho, J. Morais, J. Le Gall, M. A. Carrondo, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 63–81.
- [24] A. Volbeda, P. Amara, C. Darnault, J. M. Mouesca, A. Parkin, M. M. Roessler, F. A. Armstrong, J. C. Fontecilla-Camps, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5305–5310.
- [25] H. Ogata, S. Hirota, A. Nakahara, H. Komori, N. Shibata, T. Kato, K. Kano, Y. Higuchi, *Structure* **2005**, *13*, 1635–1642.
- [26] F. Leroux, S. Dementin, B. Burlat, L. Cournac, A. Volbeda, S. Champ, L. Martin, B. Guigliarelli, P. Bertrand, J. C. Fontecilla-Camps, M. Rousset, C. Léger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11188–11193.
- [27] T. Buhrke, O. Lenz, N. Krauss, B. Friedrich, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23791–23796.
- [28] H. Ogata, P. Kellers, W. Lubitz, *J. Mol. Biol.* **2010**, *402*, 428–444.
- [29] A. Dey, F. E., Jr. Jenney, M. W. Adams, E. Babini, Y. Takahashi, K. Fukuyama, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, *Science* **2007**, *318*, 1464–1468.
- [30] P. van der Linden, F. Dobias, H. Vitoux, U. Kapp, J. Jacobs, S. Mc Sweeney, C. Mueller-Dieckmann, P. Carpentier, *J. Appl. Crystallogr.* **2014**, *47*, 584–592.

Eingegangen am 24. September 2015,
veränderte Fassung am 17. Dezember 2015
Online veröffentlicht am 23. Februar 2016