

Biologische Methanbildung: Bestätigung des Reaktionsmechanismus durch spektroskopische Charakterisierung eines Schlüsselintermediats

Seigo Shima*

Enzymkatalyse · Metalloenzyme · Methanogenese ·
Methyl-Coenzym-M-Reduktase · Proteinstrukturen

Anaerobe methanogene Archaeen produzieren jedes Jahr etwa 1 Gt Methan,^[1] das als Hauptbestandteil von Erdgas sowie in Form von Methanhydrat abgelagert wird. Methan wird außerdem in Bioreaktoren hergestellt und als Energiequelle genutzt, wirkt aber auch als starkes Treibhausgas. Die steigende Methankonzentration in der Atmosphäre gibt Anlass zur Besorgnis.^[1]

Methanogene Archaeen verwenden zur Methanproduktion H_2 und CO_2 , Acetat und C_1 -Verbindungen wie Methanol, Methylamine und Methylthiole.^[1] Unabhängig vom jeweiligen Substrat wird der letzte Schritt der Methanbildung bei allen methanproduzierenden Archaeen durch Methyl-Coenzym-M-Reduktase (MCR) katalysiert. MCR katalysiert die Reduktion von Methyl-Coenzym M (methyl-S-CoM) durch Coenzym B (CoB-SH) und bringt somit Methan und das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB hervor (Abbildung 1a). MCR gibt es auch in anaeroben methanotrophen Archaeen, wo es die Umkehrreaktion katalysiert, d. h. die anaerobe Oxidation von Methan im ersten Schritt des Methanoxidaionsmetabolismus,^[2] der an eine Sulfat-^[3] oder Nitratreduktion^[4] gekoppelt ist.

In diesen Hin- und Rückreaktionen wird eine Kohlenstoff-Schwefel- bzw. eine Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung durch aufwendige chemische Reaktionen gespalten.^[3,5] Das katalytische Zentrum der MCR (Abbildung 1b,c) enthält das Nickelporphyrinoid F_{430} . MCR ist nur dann aktiv, wenn das Nickel im Ni^I -Oxidationszustand ist. Kristallstrukturen der MCR in verschiedenen inaktiven Zuständen wurden bereits beschrieben. Der erste vorgeschlagene MCR-Katalysemechanismus (Mechanismus I) basierte auf der Kristallstruktur der $MCR_{ox1-silent}$ -Form.^[6] In diesem Modell greift das Ni^I des F_{430} das Methyl-Coenzym M an, um Methyl- Ni^{III} und das CoM-Anion zu bilden (Abbildung 1b). Ein Elektron wird von CoM-SH an Methyl- Ni^{III} abgegeben, wodurch Methyl- Ni^{II} und ein CoM-Thiylradikal gebildet werden, und anschließend folgt die Methanproduktion.^[6,7] Ein weiterer Ka-

talysemechanismus (Mechanismus II) wurde später vorgeschlagen. Mechanismus II basierte ebenfalls auf der Kristallstruktur von $MCR_{ox1-silent}$, jedoch wurde hier die Dichtefunktionaltheorie (DFT) angewendet. In diesem Mechanismus greift Ni^I Methyl-S-CoM an, und es entsteht ein Methylradikal und CoM-S- Ni^{II} (Abbildung 1b).^[7,8] Daraufhin nimmt das Methylradikal ein Wasserstoffatom von CoB-SH auf und bringt so Methan und das CoB-Thiylradikal hervor. Der dritte vorgeschlagene Mechanismus ist eine Variante des zweiten, wobei Ni^I Methyl-S-CoM angreift und ein Methylanion hervorbringt, welches wiederum durch die Annahme eines Protons von CoB-SH Methan freisetzt.^[7] Letztlich kann der tatsächliche Katalysemechanismus experimentell nur durch die An- oder Abwesenheit von charakteristischen Zwischenprodukten der Katalyse ermittelt werden. Diese Zusammenhänge wurden in der jüngsten Veröffentlichung von Wongnate et al. erstmals beschrieben.^[7]

Wongnate et al.^[7] identifizierten nach einem halben Umsatz der MCR-Reaktion mittels spektroskopischer Methoden CoM-S- Ni^{II} . Die Autoren nutzten UV/Vis-, EPR- und Magnetzirkulardichroismus(MCD)-Spektroskopie, um abgefangene Zwischenprodukte in Stopped-Flow- und Rapid-Quench-Systemen zu nachzuweisen. Einer der ausschlaggebenden Faktoren für die Bestimmung der CoM-S- Ni^{II} -Zwischenstufe war die Verwendung eines CoB-SH-Analogs, das eine Hexanoylseitenkette anstelle einer Heptanoylseitenkette aufweist, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt wurde. Leider wurde die Wiederausbildung des aktiven Enzyms nach dem halben Umsatz nicht gezeigt. Die Identifizierung von CoM-S- Ni^{II} nach halbem Ablauf der Reaktion stützt das Modell des Methylradikal-abhängigen katalytischen Mechanismus (Mechanismus II; Abbildung 1b). Darüber hinaus konnten die Autoren das wichtigste Zwischenprodukt von Mechanismus I, Methyl- Ni^{III} , nicht nachweisen, obwohl die Lebensdauer dieses Zwischenprodukts relativ lang sein sollte. Der experimentelle Befund, dass die Reaktion nach Mechanismus II abläuft, wurde außerdem durch DFT-Rechnungen auf Basis der Struktur des inaktiven Enzyms untermauert (siehe unten). Diese Arbeit erbrachte einen bedeutenden Fortschritt für das Verständnis des katalytischen Mechanismus der MCR – es ist aber noch nicht das Ende der Geschichte.

Um den vollständigen Reaktionsmechanismus der MCR zu enträtseln, sind weitere Experimente nötig. Beispielsweise

[*] Dr. S. Shima
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch Straße 10, 35043 Marburg (Deutschland)
und
CREST, Japan Science and Technology Agency (JST)
Saitama (Japan)
E-Mail: shima@mpi-marburg.mpg.de

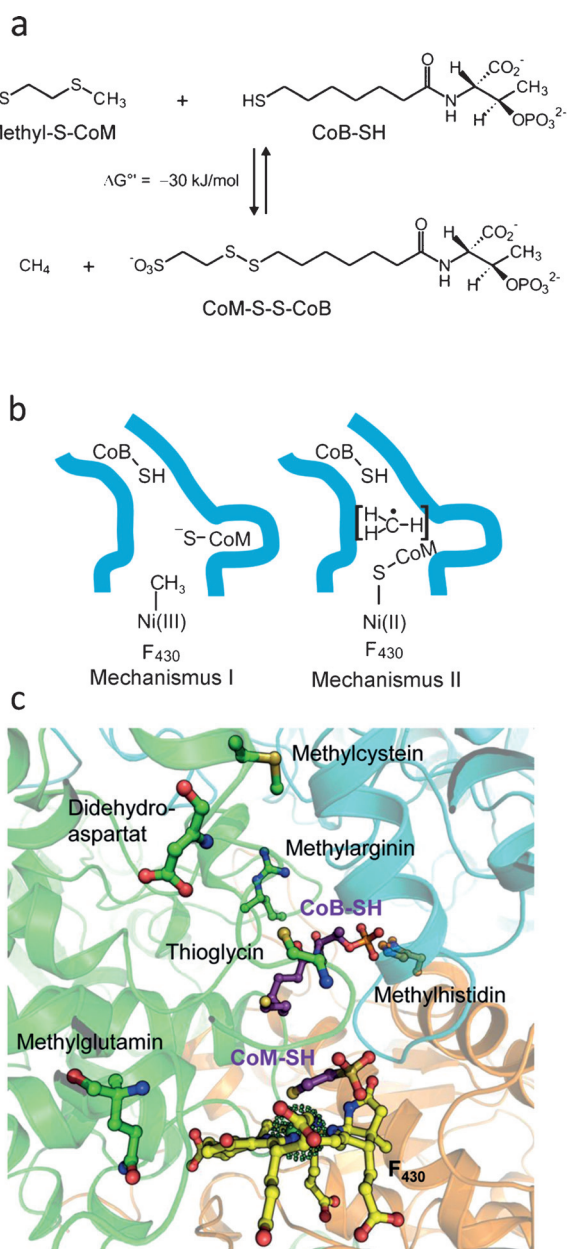


Abbildung 1. Reaktion und vorgeschlagene katalytische Mechanismen der MCR und der Struktur des aktiven Zentrums der MCR. a) Die von MCR katalysierte Reaktion. b) Wichtigste Zwischenprodukte in zwei vorgeschlagenen katalytischen MCR-Mechanismen. In Mechanismus II ist das Methylradikal in Klammern gezeigt, da es nur kurzlebig vorhanden ist. c) Struktur des aktiven Zentrums des MCR-Isoenzym I ($\text{MCR}_{\text{ox1-silent}}$ -Form) aus *Methanothermobacter marburgensis* (PDB: 5A0Y);^[6] das aktive Zentrum enthält CoM-S-Ni(F_{430}), CoB-SH, Thioglycin, vier methylierte Aminosäuren und Didehydroaspartat.

muss die Kristallstruktur der aktiven Form von MCR_{red1} beschrieben werden. Bis heute basieren alle vorgeschlagenen Mechanismen auf Kristallstrukturen inaktiver MCR-Formen. Außerdem enthält die MCR viele modifizierte Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums, nämlich vier methylierte Aminosäuren, Didehydroaspartat^[9] und Thioglycin, in dessen Hauptkette der Sauerstoff gegen Schwefel ausgetauscht ist.^[10] Der Katalysemechanismus sollte das Vorhandensein dieser Modifikationen erklären können. Beim von Wongnate et al.^[7]

vorgeschlagenen Katalysemechanismus ist das Heterodisulfid-Radikalanion CoM-S-S-CoB an das Ni des CoM-Schwefels gebunden. In der experimentell bestimmten Struktur der $\text{MCR}_{\text{silent}}$ -Form ist CoM-S-S-CoB jedoch über den CoM-Sulfonatsauerstoff an das Nickel gebunden und der Coenzym-B-Anteil ist, wie bei der $\text{MCR}_{\text{ox1-silent}}$ -Form, an den Eingang der Kavität des aktiven Zentrums gebunden.^[6] Bei einer Bindung von Heterodisulfid wäre das Thiylradikal für einen Elektronentransfer zu weit von F_{430} entfernt, wie bei der $\text{MCR}_{\text{silent}}$ -Form beobachtet wurde. Das legt nahe, dass die MCR im abschließenden Stadium des Reaktionszyklus umfangreiche Konformationsänderungen erfährt und/oder das Elektron vom Heterodisulfidradikal auf F_{430} -Nickel über eine unbekannte Elektronenkette übertragen wird, welche in Stopped-Flow-Studien nicht nachgewiesen werden kann.

Die Entschlüsselung des faszinierenden katalytischen Mechanismus der MCR ist nicht nur für sich genommen wichtig, sondern auch, weil wir damit grundlegende Informationen erhalten würden, die für den gezielten Entwurf eines Katalysators zur Spaltung der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung genutzt werden könnten. Die Verwendung eines CoM-S-Ni^{II}-Zwischenschritts in der MCR-Reaktion lässt die Interpretation zu, dass in der Rückreaktion, der anaeroben Oxidation von Methan, das Methan vom CoB-Thiylradikal angegriffen wird, um ein Methylradikal zu erhalten. Ist das der Fall, könnte diese Entdeckung den Weg zur Entwicklung eines perfekten biomimetischen Katalysators für die Oxidation von Methan ebnen.

Danksagung

Ich danke Tristan Wagner für das Erstellen von Abbildung 1 c. Diese Arbeit wurde durch Fördermittel der Max-Planck-Gesellschaft und des CREST-Programms der Japan Science and Technology Agency unterstützt.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13648–13649
Angew. Chem. **2016**, 128, 13848–13849

- [1] R. K. Thauer, A. K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel, R. Hedderich, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 579–591.
- [2] S. Shima, M. Krueger, T. Weinert, U. Demmer, J. Kahnt, R. K. Thauer, U. Ermler, *Nature* **2012**, 481, 98–101.
- [3] W. S. Reece, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 486–513.
- [4] M. F. Haroon, S. Hu, Y. Shi, M. Imelfort, J. Keller, P. Hugenoltz, Z. Yuan, G. W. Tyson, *Nature* **2013**, 500, 567–570.
- [5] J. Nishigaki, T. Matsumoto, K. Tatsumi, *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 5173–5187.
- [6] U. Ermler, W. Grabarse, S. Shima, M. Goubeaud, R. K. Thauer, *Science* **1997**, 278, 1457–1462.
- [7] T. Wongnate, D. Sliwa, B. Ginovska, D. Smith, M. W. Wolf, N. Lehnert, S. Raugei, S. W. Ragsdale, *Science* **2016**, 352, 953–958.
- [8] V. Pelmentschikov, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, R. H. Crabtree, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4039–4049.
- [9] T. Wagner, J. Kahnt, U. Ermler, S. Shima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, DOI: 10.1002/anie.201603882; *Angew. Chem.* **2016**, DOI: 10.1002/ange.201603882.
- [10] T. Selmer, J. Kahnt, M. Goubeaud, S. Shima, W. Grabarse, U. Ermler, R. K. Thauer, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3755–3760.

Eingegangen am 28. Juni 2016

Online veröffentlicht am 30. August 2016