

Wasserstoffaktivierung in Gegenwart von Sauerstoff: Eine Herausforderung für den Katalysator Hydrogenase

Friedrich, Bärbel

Veröffentlicht in:
Jahrbuch 2008 der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.120-125



J. Cramer Verlag, Braunschweig

Wasserstoffaktivierung in Gegenwart von Sauerstoff: Eine Herausforderung für den Katalysator Hydrogenase*

BÄRBEL FRIEDRICH

Humboldt-Universität Berlin
Chausseestraße 117, D-10115 Berlin

Molekularer Wasserstoff (H_2) wird in der Natur von einigen anaeroben Bakterien als Gärungsprodukt freigesetzt und von zahlreichen in den Sauerstoff freien Biotopen lebenden Mikroorganismen als attraktive Energiequelle wieder verwertet. Nur Spuren von H_2 gelangen somit in die aeroben Lebensbereiche, wo dieser Restwasserstoff von wenigen Organismen als alternative Energiequelle genutzt wird. Bekannt hierfür sind die Knallgasbakterien, die mit einem Gasgemisch aus H_2 , CO_2 und O_2 zu wachsen vermögen. Ein prominenter Vertreter dieser phylogenetisch diversen Gruppe ist das β -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* [1]. Dieses Bakterium dient unserer Arbeitsgruppe als Modell, um die molekularen Voraussetzungen zu erforschen, die der Adaptation des H_2 Metabolismus an eine oxygene Atmosphäre zugrunde liegen.

Die Wasserstoffaktivierung, d.h. sowohl die Freisetzung als auch die Aufnahme von H_2 , wird durch das Enzym Hydrogenase katalysiert. Diese Reaktion spaltet H_2 reversibel in zwei Protonen und zwei Elektronen. Es gibt drei konvergent entstandene Klassen von Hydrogenasen, die sich in ihrem Metallgehalt unterscheiden [2]. Die Mehrzahl dieser Hydrogenasen wird durch Sauerstoff inhibiert oder gar irreversibel geschädigt. In aeroben Organismen kommen ausschließlich Hydrogenasen vor, die ein bimetallisches Nickel-Eisen Zentrum enthalten. Diese [NiFe] Hydrogenasen stehen im Mittelpunkt meines Vortrages.

Die biochemischen Eigenschaften, die atomare Struktur sowie der Reaktionsmechanismus wurden eingehend an den [NiFe] Hydrogenasen aus Sulfat-reduzenten untersucht, die den Standardtypus einer [NiFe] Hydrogenase repräsentieren [3]. Eine derartige Standardhydrogenase besteht aus einer großen, das [NiFe] Zentrum tragenden Untereinheit und einer kleinen, Eisenschwefel (FeS) Cluster beherbergenden Untereinheit. Dieses Heterodimer ist gekoppelt mit einem intermediären Elektronenüberträger. Unter Einbeziehung von strukturellen und spektroskopischen Daten konnte die Zusammensetzung des [NiFe] Zen-

* Der Vortrag wurde am 16.05.2008 beim Kolloquium anlässlich der Jahresversammlung der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft gehalten.

trums detailliert entschlüsselt werden. Sie offenbart eine komplexe Architektur eines Cofaktors, in dem das Nickel über vier Thiol Liganden aus Cysteinresten mit dem Protein koordiniert ist. Zwei dieser Thiole bilden Brückenliganden zum Eisen aus, das darüber hinaus drei ungewöhnliche diatomare Liganden trägt, zwei CN^- Moleküle und einen CO Rest. Dadurch wird das Eisen wahrscheinlich in einen Ladungszustand versetzt, der eine bevorzugte Reaktion von H_2 am Nickel bewirkt. Im oxidierten Zustand, d.h. in Gegenwart von O_2 , befinden sich in der Brücke zwischen den beiden Metallen Sauerstoffderivate, die das Enzym inaktivieren. Erst durch Reduktion des Enzyms wird O_2 entfernt und damit die Position für die Bindung von H_2 frei gemacht. Dies dauert – je nach Oxidationsgrad – einige Stunden bis hin zu wenigen Minuten [4]. Unter anaeroben, O_2 freien Bedingungen, ist diese Hemmung nahezu nicht existent. Für Organismen, deren Hydrogenase auch in Gegenwart von O_2 enzymatisch funktionell sein muß, stellt sie dagegen ein katalytisches Hindernis dar. Die Frage, wie haben sich diese „aeroben“ [NiFe] Hydrogenasen an eine O_2 enthaltende Atmosphäre adaptiert, haben wir exemplarisch mit den [NiFe] Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha* (Re) untersucht.

Re besitzt drei [NiFe] Hydrogenasen, die sich hinsichtlich ihrer Anzahl an Untereinheiten und der physiologischen Funktion unterscheiden. Eine Membran-gebundene Hydrogenase (MBH) weist mit der [NiFe] Untereinheit nach außen ins Periplasma, während die (FeS) Cluster tragende Untereinheit über ein spezifisches Cytochrom *b* mit der cytoplasmatischen Membran verankert ist. Die MBH setzt bei der Oxidation von H_2 Protonen nach außen frei, die über eine ATPase für Elektronentransport abhängige Phosphorylierung genutzt werden können. Die Elektronen aus dem H_2 wandern über die Atmungskette auf O_2 als Endakzeptor, infolge dessen H_2O entsteht [5].

Die zweite, mit dem Energiestoffwechsel gekoppelte Hydrogenase befindet sich im Cytoplasma von Re. Sie ermöglicht eine direkte H_2 abhängige Reduktion von NAD^+ zu NADH. Diese lösliche, aus multiplen Untereinheiten aufgebaute Hydrogenase (SH) besteht aus einem Hydrogenase Dimer, das mit einem zweiten dimeren Polypeptid assoziiert ist, das zusätzlich zu (FeS) Clustern ein Flavin enthält und die Bindung von $\text{NAD}^+(\text{H})$ erlaubt. Dieser Rest besitzt eine Diaphorase Aktivität und zeigt eine enge Verwandtschaft zum Membran peripheren Teil der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, dem Komplex I, der Atmungskette. Kürzlich wurde in dem SH Holoenzym ein zweites Flavinmolekül entdeckt, das für den intramolekularen Elektronentransfer von Bedeutung ist. Darüber hinaus wurde ein weiteres Polypeptid identifiziert, das zusammen mit dem SH Tetramer ein natives hexamerer Holoenzym bildet [6].

Die dritte Hydrogenase (RH) von Re ist ebenfalls löslich im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Im Gegensatz zu der MBH und der SH ist diese Hydrogenase jedoch nicht am Energiestoffwechsel beteiligt, sondern sie hat eine ausschließ-

lich regulatorische Funktion. Die RH wirkt als Sensor und signalisiert die Gegenwart von H_2 über eine Histidin Protein Kinase an einen Transkriptionsaktivator, der für die Expression der MBH- und SH-Gene essentiell ist. Der H_2 Sensor besteht aus einem dimeren Hydrogenaserest, der mit der Protein Kinase einen hochmolekularen Komplex bildet [7].

Alle drei Hydrogenasen von *Re* sind in der Lage, in Gegenwart von O_2 ihre jeweilige Funktion auszuüben. Haben sie dabei ein allgemeines Prinzip der O_2 Adaptation entwickelt oder liegen dieser Eigenschaft unterschiedliche Strategien zugrunde? Diese generelle Frage zielt nicht nur auf den Mechanismus der H_2 Katalyse ab, sondern auch auf die Regulation und die komplexe posttranslationale Biogenese der [NiFe] Hydrogenasen. Unabhängige Studien an mehreren [NiFe] Hydrogenasen, insbesondere der Hydrogenase 3 von *Escherichia coli*, haben gezeigt, dass allein an der Assemblierung des [NiFe] Zentrums mindestens sechs Hilfsproteine mitwirken [8]. Wir haben erste Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass die Assemblierung der MBH in *Re* zusätzliche Hilfsproteine erfordert, um die Hydrogenase in Gegenwart von O_2 zu einem intakten, zellulär korrekt lokalisierten Enzym reifen zu lassen [9]. Dieser Beitrag konzentriert sich jedoch vornehmlich auf die Wirkung von O_2 auf den eigentlichen Katalyseprozess.

Die RH oxidiert H_2 mit Methylenblau als dem bevorzugten künstlichen Elektronenakzeptor und ist somit eine „echte“ Hydrogenase. Im Vergleich zu den Standard Hydrogenasen fällt auf, dass die in Gegenwart von O_2 aus Zellextrakten isolierte RH keine Reaktivierungsbedingte Verzögerung in der H_2 Oxidationskinetik zeigt, sondern sofort in den katalytischen Prozess eintritt. Diese sofortige Reaktion ist für die Funktion eines Sensors plausibel und bildet eine wichtige Voraussetzung für das schnelle Aufspüren von H_2 . Gleichzeitig legt diese Beobachtung nahe, dass die RH überhaupt nicht durch O_2 beeinträchtigt wird. Um weiteren Aufschluss über dieses O_2 resistente Verhalten zu gewinnen, wurden folgende Experimente durchgeführt. Ein Aminosäureabgleich zeigte, dass die RH – und verwandte H_2 Sensoren – in der Nähe des katalytischen [NiFe] Zentrums zwei Aminosäurereste (Phe und Ile) aufweisen, die an den äquivalenten Positionen in den Standardhydrogenasen durch weniger Raum ausfüllende, strikt konservierte Aminosäuren (Leu und Val) ersetzt sind. Die betreffenden Aminosäuren waren durch Xenonmarkierungen des Hydrogenasekristalls, isoliert aus anaeroben Organismen, am Ende eines hydrophoben, auf das katalytische Zentrum hin laufenden Kanals identifiziert worden [3]. Daraus wurde gefolgert, dass durch diesen Kanal möglicherweise neben H_2 auch O_2 an das tief im Innern des Proteins gelegene katalytische [NiFe] Zentrum gelangen könnte. In Modellierungen wurde die Hypothese entwickelt, dass die beiden Aminosäuren Phenylalanin und Isoleucin das größere Gasmolekül O_2 daran hindern könnten, bis zu dem katalytischen Zentrum des H_2 Sensors vorzudringen. In der Tat zeigten RH Mutanten von *Re*, in denen die betreffenden Aminosäuren durch die kleineren Moleküle Leucin und Valin ersetzt worden waren, eine verzögerte Reaktionskinetik in

Gegenwart von O_2 und wiesen weitere Eigenschaften auf, die dem Verhalten der Standardhydrogenasen ähnlich sind. Diese Ergebnisse bilden einen überzeugenden Beleg für die theoretische Voraussage [10].

Die Variation der Durchlässigkeit des putativen Gaskanals stellt somit eine Möglichkeit dar, Hydrogenasen Schutz vor O_2 Inaktivierung zu verleihen. Studien an den anderen beiden Hydrogenasen von Re zeigen, dass vielschichtige molekulare Ursachen die O_2 Adaptation bestimmen können. Infrarotspektroskopie und chemische Analysen der SH lieferten erste Hinweise für die Existenz eines modifiziertes [NiFe] Zentrums in dieser Hydrogenase. Es wurden zwei zusätzliche CN^- Moleküle identifiziert, eines davon in Koordination mit Ni. Anders als die RH, die keinerlei Verzögerung in der H_2 Oxidationsrate in Gegenwart von O_2 aufweist, benötigt die SH unter vergleichbaren Bedingungen eine Aktivierungsphase, die sich allerdings durch ihre Kürze deutlich von der lang andauernden Reaktivierungskinetik der Standard Hydrogenasen unterscheidet. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das Enzym zwar mit O_2 reagiert, aber sehr schnell in den aktiven Zustand zurückkehrt. Die SH ist demzufolge nicht O_2 resistent, wohl aber O_2 tolerant. Analysen an SH Mutantenproteinen und Daten aus einer Vielzahl spektroskopischer Messungen zeigten, dass durch die Modifikation des [NiFe] Zentrums die SH offenbar einen Schutz erhält, der verhindert, dass die hoch oxidierten, vollständig inaktivierenden O_2 Derivate in der Metallbrücke binden und H_2 somit relativ ungehindert an das katalytische Zentrum gelangt [11].

Bisher gibt es keinerlei Hinweise, dass die MBH ähnlich der SH eine modifizierte Zusammensetzung des [NiFe] Cofaktors enthält. Alle spektroskopischen Analysen sprechen für eine Standardartige Konformation des aktiven Zentrums. Trotz dieser konservierten Struktur kann auch die MBH nicht in den hoch oxidierten inaktiven Zustand versetzt werden, obgleich sie – ähnlich wie die SH – einer kurzzeitigen Reaktivierungsphase bedarf, um in den katalytischen Zyklus einzutreten. Erstmals wurde mit der MBH der direkte Beweis erbracht, dass das Enzym in Gegenwart atmosphärischer Konzentrationen von O_2 katalytisch aktiv ist. Dieser Nachweis gelang in elektrochemischen Experimenten mit solubilisierter, gereinigter MBH, die immobilisiert an eine Graphitelektrode, ohne den Einsatz von künstlichen Elektronenmediatoren H_2 oxidiert. In diesen Messungen wurde festgestellt, dass die MBH eine extrem hohe Affinität zu H_2 hat ($K_M = 6.1 \mu M$), dagegen hohe Konzentrationen an O_2 ($K_{Iapp} = 1000 \mu M$) erforderlich sind, um das Enzym zu hemmen [12, 13]. Mit Hilfe von Computer gestützten Modellierungen und Analysen an gezielt konstruierten Mutantenproteinen lässt sich die Sauerstofftoleranz der MBH durch eine – im Vergleich zu Standardhydrogenasen – veränderte Proteinstruktur in weiterer Distanz zum katalytischen Zentrum erklären. Ferner gibt es Hinweise, dass auch besondere Redox Eigenschaften der (FeS) Cluster in der kleinen Untereinheit der MBH eine Rolle bei der Ausprägung der Sauerstofftoleranz spielen.

Warum ist die Kenntnis über O₂ tolerante Hydrogenasen von grundlegendem Interesse? Hydrogenasen sind attraktive Katalysatoren für biotechnologische Prozesse. In unserer Arbeitsgruppe haben wir uns besonders dem Einsatz von Hydrogenasen bei der Gewinnung von biosolarem Wasserstoff [14] und der enzymatischen Oxidation von Wasserstoff in einer biologischen Brennstoffzelle [15] gewidmet. Die Anwendung der Hydrogenasen, insbesondere die Produktion von H₂ infolge photosynthetischer Spaltung von H₂O, setzt robuste Katalysatoren voraus, die unempfindlich sind gegenüber Sauerstoff, der als Begleitprodukt der H₂O Hydrolyse zwangsläufig entsteht. So sind die Hydrogenasen aus *Re* vorzügliche Studienobjekte, um enzymatische Katalysatoren zu optimieren und darüber hinaus Anregungen für die Synthese von chemischen Modellverbindungen zu erhalten. Beides sind Ziele, die wir uns im Rahmen eines Sonderforschungsbereiches und des Berliner DFG Exzellenzclusters „Unifying Concepts of Catalysis“ gesetzt haben. Dabei bauen wir unter anderem auf Verbundprojekten auf, die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung in der Vergangenheit gefördert wurden. Diese ermöglichten eine langjährige, überaus inspirierende Zusammenarbeit mit dem diesjährigen Preisträger der Gauss-Medaille, dem Kollegen Professor Dr. Rudolf Thauer, mit dem uns das Interesse für die Umsetzung des kleinsten Moleküls auf diesem Planeten seit langem verbindet.

Literatur

- [1] SCHWARTZ, E. & B. FRIEDRICH (2006): The H₂-Metabolizing Prokaryotes. In *The Prokaryotes* (DWORKIN, M., S. FALKOW, E. ROSENBERG, K.-H. SCHLEIFER & E. STACKEBRANDT (eds), pp. 496-563. Springer, New York.
- [2] SHIMA, S., O. PILAK, S. VOGT, M. SCHICK, M.S. STAGNI, W. MEYER-KLAUCKE, E. WARKENTIN, R.K. THAUER & U. ERMLER (2008): The crystal structure of [Fe] hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science* **321**: 5888-572-575.
- [3] FONTECILLA-CAMPS, J.C. (1996): Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 12989-12996.
- [4] CAMMACK, R., M. FREY & R. ROBSON (2001): *Hydrogen as a fuel, learning from nature*, Taylor & Francis. London.
- [5] BURGDORF, T., O. LENZ, T. BUHRKE, E. VAN DER LINDEN, A.K. JONES, S.P.J. ALBRACHT & B. FRIEDRICH (2005): [NiFe] hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 181-196.
- [6] BURGDORF, T., E. VAN DER LINDEN, M. BERNHARD, Q.Y. YIN, J.W. BACK, A.F. HARTOG, A.O. MUIJSERS, C.G. DE KOSTER, S.P. ALBRACH & B. FRIEDRICH (2005): The soluble

NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J. Bacteriol.* **187**: 3122-3132.

- [7] BUHRKE, T., O. LENZ, A. PORTHUN & B. FRIEDRICH (2004): The H₂-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol. Microbiol.* **51**: 1677-1689.
- [8] BÖCK, A., P.W. KING, M. BLOKESCH & M.C. POSEWITZ (2006): Maturation of hydrogenases. *Adv Microb. Physiol* **51**: 1-71.
- [9] SCHUBERT, T., O. LENZ, E. KRAUSE, R. VOLKMER & B. FRIEDRICH (2006): Chaperones specific for the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase interact with the Tat signal peptide of the small subunit precursor in *Ralstonia eutropha* H16. *Mol. Microbiol.* **66**: 453-467.
- [10] BUHRKE, T., O. LENZ, N. KRAUSS & B. FRIEDRICH (2005): Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J. Biol. Chem.* **280**: 23791-23796.
- [11] BURGDORF, T., S. LÖSCHER, P. LIEBISCH, E. VAN DER LINDEN, M. GALANDER, F. LENDZIAN, W. MEYER-KLAUCKE, S.P. ALBRACHT, B. FRIEDRICH, H. DAU & M. HAUMANN (2005): Structural and oxidation-state changes at its nonstandard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 576-592.
- [12] LUDWIG, M., J.A. CRACKNELL, K.A. VINCENT, F.A. ARMSTRONG & O. LENZ (2009): Oxygen-tolerant H₂ oxidation by membrane-bound [NiFe] hydrogenases of *Ralstonia* species: coping with low-level H₂ in air. *J. Biol. Chem.* **284**: 465-477.
- [13] GOLDET, G., A.F. WAIT, J.A. CRACKNELL, K.A. VINCENT, M. LUDWIG, O. LENZ, B. FRIEDRICH & F.A. ARMSTRONG (2008): Hydrogen production under aerobic conditions by membrane-bound hydrogenases from *Ralstonia eutropha*. *J. Am. Chem. Soc.* **130**: 11106-11113.
- [14] IHARA, M., H. NISHIHARA, K.-S. YOON, O. LENZ, B. FRIEDRICH, H. NAKAMOTO, K. KOJIMA, D. HONMA, T. KAMACHI & I. OKURA (2006): Light-driven hydrogen production by a hybrid complex of a [NiFe] hydrogenase and a cyanobacterial photosystem I. *Photochem. Photobiol.* **82**: 676-682.
- [15] VINCENT, K.A., J.A. CRACKNELL, O. LENZ, I. ZEBGER, B. FRIEDRICH & F.A. ARMSTRONG (2005): Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 16951-16954.