

BIOKATALYSE

Hydrogenasen vor grosser «Karriere» in der Biotechnologie

An der Humboldt-Universität zu Berlin erforschen Mikrobiologen sauerstofftolerante Hydrogenasen, cofaktorhaltige Metalloenzyme, die die Synthese und Spaltung von Wasserstoff katalysieren. Die im Rahmen des Exzellenzclusters UniCat interdisziplinär geführte Forschung zielt auf die biotechnologische Produktion von Wasserstoff und eine Anwendung in enzymatischen Brennstoffzellen.

BEATE PEISELER-SUTTER

Moderne chemische Katalysatoren zeichnen sich durch hohe Reaktions-, Chemo-, Regio- und Stereospezifitäten aus. Sie binden reversibel an Ausgangsverbindungen und Reaktionszwischenprodukte und setzen deren Aktivierungsenergie herab. Manche Reaktionen werden dadurch erst möglich, andere werden so schnell, dass sie unter milderen Bedingungen ablaufen. Urheber der Katalyse ist die Natur: In lebenden Zellen werden biochemische Reaktionen von an Effizienz nicht zu übertreffenden Biokatalysatoren, den aus Aminosäuren bestehenden Enzymen, katalysiert. Wer klima- und energierelevante Themen wie die Reduzierung von Treibhausgasen, die effiziente Nutzung von Erdgas oder die klimaverträgliche Gewinnung von Wasserstoff anpacken will, kommt um die Katalyse nicht herum. Weshalb im Rahmen der Exzellenzinitiative des Bundes und der Länder zur Förderung von Wissenschaft und Forschung an deutschen Hochschulen am Forschungsstandort Berlin 2008 der interdisziplinäre Forschungsverbund UniCat (Unifying Concepts in Catalysis) geschlossen wurde. Der Exzellenzcluster ist so erfolgreich, dass er ab Herbst 2012 noch einmal fünf Jahre gefördert wird.

250 Wissenschaftler der Technischen Universität Berlin, der Freien Universität Berlin, der Humboldt-Universität zu Berlin, der Universität Potsdam, des Fritz-Haber-Instituts und des Max-Planck-Instituts für Kolloid- und Grenzflächenforschung suchen und entwickeln hier ge-

meinsam neue Wege zur katalytischen Aktivierung von Methan, Kohlendioxid und Wasserstoff. Dass Biokatalysefachleute, Experten der chemischen Katalyse, Theoretiker und Verfahrenstechniker zusammenspannen, um voneinander zu lernen und sich gegenseitig zu inspirieren, ist der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Wissenschaftsrat ein zweites Mal über 30 Millionen Euro Fördermittel wert.

Suche nach allgemein gültigen katalytischen Prinzipien

«Ein vordergründiges Anliegen von UniCat ist es, Synergien zwischen biologischer und

chemischer Katalyse aufzuzeigen und nach allgemein gültigen katalytischen Prinzipien zu suchen», unterstreicht Dr. Oliver Lenz die Besonderheit des Exzellenzclusters. Mikrobiologe Lenz ist Gruppenleiter am Institut für Biologie und Mikrobiologie der Humboldt-Universität und zusammen mit Prof. Bärbel Friedrich als Hydrogenase-Experte bei UniCat gefragt. Hydrogenasen sind redoxaktive Metalloenzyme, die bei allen Prokaryoten (Bakterien, Archaeen) sowie bei niederen Eukaryoten (Grünalgen, Protozoen, Pilze) vorkommen, allerdings nicht bei höheren Pflanzen und Tieren. In Abwesenheit von Sauerstoff können Hydrogenasen im

Rahmen des Abbaus überschüssiger zellulärer Reduktionskraft Elektronen auf Protonen übertragen und molekularen Wasserstoff (H_2) generieren. Umgekehrt können sie in bestimmten Situationen molekularen Wasserstoff als alternative Energiequelle zugänglich machen, indem sie die Rückreaktion katalysieren, bei der H_2 in zwei Elektronen und zwei Protonen gespalten wird. Mit diesen interessanten Eigenschaften bestehen für Hydrogenasen gute Aussichten, in der Biotechnologie Karriere zu machen. Schliesslich soll Wasserstoff, dessen Herstellung derzeit noch aufwendig, teuer und nicht CO_2 -neutral ist, in Zukunft zunehmend als Energieträger genutzt werden.

Nicht alle Hydrogenasen sind allerdings gleichermaßen gut für biotechnologische Anwendungen geeignet. Von den drei bekannten Arten haben [Fe]-Hydrogenasen mit nur einem Eisen-Ion als Cofaktor den



Dr. Oliver Lenz von der Humboldt-Universität zu Berlin ist Experte für Hydrogenasen. Die Enzyme könnten u. a. in Brennstoffzellen eingesetzt werden.

Nachteil der Lichtempfindlichkeit. [FeFe]-Hydrogenasen mit zwei Eisen-Ionen im katalytischen Zentrum sind extrem sauerstoffempfindlich. Nur [NiFe]-Hydrogenasen sind leicht sauerstoffresistent; statt von Sauerstoff irreversibel vergiftet zu werden, tritt lediglich eine Hemmung ihrer Aktivität ein. [NiFe]-Hydrogenasen bestehen aus zwei Untereinheiten; die grosse Untereinheit beherbergt das katalytisch aktive Nickel-Eisen-Metallzentrum sowie hydrophobe Gaskanäle für den Transport von Wasserstoff, zur kleinen Untereinheit gehören eine Reihe interessanter elektronenleitender Eisen-Schwefel-Cluster.

Sauerstoffresistente Katalysatoren aus dem Knallgas-Bakterium

«In dem als Knallgas-Bakterium bekannten Bodenbakterium und Modellorganismus *Ralstonia eutropha* kommen sogar drei wirklich sauerstofftolerante [NiFe]-Hydrogenasen vor. Die regulatorische Hydrogenase (RH) fungiert als Wasserstoff-Sensor. Wenn in ökologischen Nischen molekularer Wasserstoff auftritt, z.B. durch mikrobielle Gärung oder den Austritt aus dem Erdinneren, veranlasst die RH die Produktion der membrangebundenen Hydrogenase MBH und der löslichen Hydrogenase SH. Die MBH sitzt in der Zellplasmamembran und dient der Energiegewinnung. Die SH befindet sich im Zellplasma und kann zur Energiegewinnung wie zur Entsorgung überschüssiger Reduktionsäquivalente herangezogen werden. Wir konzentrieren unsere Forschung auf diese sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenasen aus *R. eutropha*», nennt Lenz den Fokus seiner Forschung.

Fernziel der Berliner Mikrobiologen ist es, sauerstoffresistente [NiFe]-Hydrogenasen zur Wasserstoffproduktion einzusetzen, wobei die nötigen Elektronen aus der Aufspaltung von Wasser bezogen werden sollen, wie es der sauerstoffproduzierende Photosyntheseprozess mit seinen beiden in Reihe geschalteten Photosystemen I und II bewerkstelligen kann. Dass die Idee funktioniert, konnte bereits 2009 gezeigt werden. Lenz, Friedrich & Co hatten in *R. eutropha* ein Fusionsprotein aus MBH und der PsaE-Untereinheit des Multiproteinkomplexes Photosystem I produziert, isoliert und mit dem Rest von PS I zusammengebracht. Das resultierende Konstrukt war auf eine Goldelektrode aufgebracht worden, die im Experiment PS II ersetzt und anstelle dessen Elektronen über den chemischen Elektronentransporter Phenazinmethosulfat (PMS)

auf PS I überträgt. Bei Einstrahlung von Licht in geeigneter Wellenlänge gelangen tatsächlich Elektronen durch PS I zur Hydrogenase und durch diese auf Protonen, wodurch nachweislich molekularer Wasserstoff entsteht. «Normalerweise werden die bei der Photosynthese nötigen Protonen und Elektronen von PS II zur Verfügung gestellt, durch die lichtgetriebene Oxidation von Wasser zu Sauerstoff. Um den kompletten Photosyntheseprozess nutzen zu können, wollen wir die genetischen Baupläne für Hydrogenase und weitere in deren Reifungsprozess eingebundene Proteine nun auf ein photosynthesebefähigtes Cyanobakterium übertragen, ein risikoreiches Langzeitprojekt, das noch ganz am Anfang steht», resümiert Lenz den Stand der Dinge.

Sauerstofftolerante [NiFe]-Hydrogenasen könnten auch zur Erzeugung elektrischer Energie beitragen, als Bestandteil der Anode in enzymatischen Wasserstoff-Sauerstoff-Brennstoffzellen, wo sie die Oxidation von molekularem Wasserstoff katalysieren sollen. Auch diese Idee funktioniert, wie die Berliner Mikrobiologen in Zusammenarbeit mit Fraser Armstrong, Professor am Institut für Anorganische Chemie der Universität Oxford, zeigen konnten. Gemeinsam wurde eine Brennstoffzelle mit zwei Grafitelektroden realisiert. Die wasserstoffumspülte Anode wurde mit Hydrogenase beschichtet, welche die Oxidation von H_2 katalysiert, die sauerstoffumspülte Kathode wurde mit dem Kupferenzym Laccase beschichtet, welches Sauerstoff (O_2) reduziert. Zwischen den beiden Elektroden baut sich im Verlauf der katalytischen Umsetzung von H_2 und O_2 eine Spannung auf. Werden sie durch einen Leiter verbunden, fliesst ein elektrischer Strom. Das gelingt auch mit Platinelektroden, die allerdings sehr viel teurer sind als Grafit, welches unbegrenzt zur Verfügung steht. Allerdings gibt es Probleme mit der Langzeitstabilität der Enzyme, weshalb nun auf ganze Zellen umgestiegen werden soll, die auf den Elektroden stabile Biofilme ausbilden können.

Echten Grund zur Zuversicht gibt, dass die Berliner Grundlagenforscher dem Verständnis der Sauerstofftoleranz ihrer Ausnahme-Hydrogenasen gerade ein gutes Stück näher gekommen sind. Ende 2011 veröffentlichten sie im Fachmagazin «Nature» die Kristallstruktur der membrangebundenen Hydrogenase MBH aus *R. eutropha* und förderten in ihrer Publikation Überraschungen zutage, die nicht nur der Hydrogenase-Szene neuen Input liefern, sondern auch für die Kollegen

aus dem Bereich der chemischen Katalyse und der molekularen Elektronik interessant sind. Die grösste Überraschung bot die kleine Untereinheit des Enzyms mit ihren drei unterschiedlichen elektronenleitenden Eisen-Schwefel-Clustern. Der dem katalytischen Nickel-Eisen-Zentrum in der grossen Untereinheit am nächsten gelegene [4Fe-3S]-Cluster aus vier Eisen- und drei Schwefelatomen zeigt eine ganz aussergewöhnliche, in der Nature-Publikation zum allerersten Mal dokumentierte Struktur, deren elektronische Eigenschaften und Funktion sich massgeblich von denjenigen des [4Fe-4S]-Würfels unterscheiden, welcher sich bei Hydrogenasen normalerweise in dieser Position befindet.

Die Berliner Experten konnten nachweisen, dass der neuartige [4Fe-3S]-Cluster entscheidend zur Sauerstofftoleranz der MBH beiträgt. Seine verzerrte Konformation wird durch Koordination mit sechs Cysteinresten aus der kleinen Untereinheit stabilisiert, von denen zwei nur bei sauerstofftoleranten Hydrogenasen vorkommen.

Sauerstoffreduktion führt ohne «Zwischenlandung» zu Wasser

«Sauerstofftoleranz impliziert, dass Sauerstoff am katalytischen Zentrum komplett reaktiv eliminiert werden kann. Dazu müssen vier Elektronen und vier Protonen zur Verfügung stehen. Der neuartige Cluster scheint tatsächlich die besondere Fähigkeit zu besitzen, zwei Elektronen auf einmal transportieren zu können. Inzwischen konnten wir auch zeigen, dass die Reduktion von Sauerstoff direkt zu Wasser führt und nicht über reaktive sauerstoffhaltige und damit enzym-schädigende Zwischenverbindungen abläuft, wie dies bei sauerstoffsensiblen Hydrogenasen der Fall ist», berichtet Lenz. Passenderweise enthüllte die Kristallstruktur auch wassergefüllte Hohlräume, die das katalytische Zentrum mit der Enzymoberfläche verbinden und vermutlich der Abfuhr von Wasser dienen. Es sieht alles danach aus, als ob sauerstofftolerante Hydrogenasen einen geringen Energieverlust in Kauf nähmen und ein paar ihrer Elektronen für die Entgiftung von Sauerstoff Elektronen opfereten.

Als nächstes wollen die Berliner Hydrogenase-Experten die Biosynthese des neuartigen Clusters unter die Lupe nehmen; ausserdem stehen diejenigen Proteine auf ihrer Checkliste, die dabei helfen, den Cluster «in Form zu bringen». ■