

**X-Ray Absorption Spectroscopy
on the Ni-Fe and Fe-S Cofactors
of the Oxygen-Tolerant Hydrogenases
from *Ralstonia eutropha*:
Variations on a Common Theme**

Simone Löscher

Disputation am 13.06.2007

Im Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin
eingereichte Dissertation

Freie Universität  Berlin

Erster Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Michael Haumann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Stehlik

Vorwort

Ni-Fe-Hydrogenasen sind Metalloenzyme, welche die reversible Spaltung von molekularem Wasserstoff katalysieren. Ihr katalytisch aktives Zentrum besteht aus einem heterobimetallischen Nickel-Eisen-Komplex. Seit der Entdeckung von Hydrogenasen im Jahr 1931 in *Escherichia coli* und weiteren Bakterien wurden weltweit umfassende Untersuchungen von zahlreichen Forschungsgruppen durchgeführt, um die Struktur und den Mechanismus von Hydrogenasen zu entschlüsseln. Dafür wurden vielfältige spektroskopische, biochemische und mikrobiologische Techniken angewendet. Für eine begrenzte Anzahl von Hydrogenasen konnten strukturelle Informationen durch Röntgenbeugungsexperimente an kristallisiertem Protein gewonnen werden.

In jüngerer Zeit wurde die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) zu einer wichtigen Methode in der Hydrogenase-Forschung. Mit dieser Technik können Informationen über die atomare Struktur, nukleare Geometrie und elektronische Struktur der Metallzentren gewonnen werden. Ein herausragender Vorteil der XAS-Technik ist, dass Proteine in Lösung vermessen werden können. Ein spezifischer Spinzustand wird nicht benötigt. Dadurch ist es möglich Zwischenzustände während der H_2 -Umwandlung in Hydrogenasen gezielt einzustellen und individuell zu charakterisieren. Solche Untersuchungen sind eine Grundvoraussetzung, um den katalytischen Mechanismus von Hydrogenasen aufzuklären.

Die Mehrzahl der Hydrogenasen ist sauerstoffintolerant, was bedeutet, dass die Wasserstoffumwandlung durch O_2 vollständig gehemmt wird. Diese Eigenschaft der Hydrogenasen ist besonders für ihre biotechnologische Anwendung von Nachteil. Deshalb ist die Erforschung des H_2 -Umwandlungsmechanismus in von Natur aus O_2 -toleranten Hydrogenasen außerordentlich interessant. Im Proteobakterium von *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*) (Abb. 1, 12) wurden gleich drei verschiedene Hydrogenasen gefunden, die alle O_2 -tolerant sind.

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse von Untersuchungen der O_2 -unempfindlichen Ni-Fe-Hydrogenasen aus *R. eutropha* zusammengefasst. Es wurde ein breiter spektroskopischer Ansatz mit Fokus auf der Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) angewendet. XAS wurde zusammen mit komplementären spektroskopischen Techniken wie Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR) und Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) eingesetzt. Simulationen von XANES- und EXAFS-Spektren wurden durchgeführt, um Änderungen des Oxidationszustands und der Koordinationsumgebung des Ni- und des Fe-Atoms zu bestimmen. Diese Techniken werden auf Wildtyp-Proben der drei Enzyme und auf spezifische Mutanten in zahlreichen funktionellen Zwischenzuständen angewendet, welche durch biochemische Methoden präpariert wurden. Die gereinigten Proteinproben der Hydrogenasen aus *R. eutropha* wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Bärbel Friedrich (Mikrobiologie der Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

In **Kapitel 1** wird ein allgemeiner Überblick über den aktuellen Wissensstand von Hydrogenasen (biologischer Kontext und molekulare Struktur) gegeben. Der Fokus liegt auf den Ni-Fe-Hydrogenasen von *R. eutropha*, die der Hauptgegenstand dieser Arbeit sind. Eine kurze Einführung in die XAS-Technik wird gegeben und die Motivationen für diese Arbeit werden beschrieben.

Kapitel 2 (Burgdorf, Löscher *et al.* 2005) beschreibt eine Untersuchung an Wildtyp-Protein und ausgewählter Mutanten der löslichen NAD⁺-reduzierenden Ni-Fe-Hydrogenase (SH). Dieses Protein besitzt ein nicht-standard Ni-Fe-Zentrum, Änderungen in Struktur und Oxidationszustand während der Aktivierung wurden aufgelöst. Ein vorläufiges Reaktionsschema für die Aktivierung der SH und für den Wasserstoffumsatz am Ni-Fe-Kofaktor wird diskutiert.

Die Umkehr der Präferenz von Wasserstoffspaltung zu Wasserstoffproduktion wurde in der H16L-Mutante beobachtet, einer spezifischen Variante der SH (Löscher *et al.* 2006). Diese Mutante zeigt strukturelle Änderungen im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Die Ergebnisse dieser Studie werden in **Kapitel 3** präsentiert.

Kapitel 4 beschreibt eine Untersuchung der regulatorischen Hydrogenase (RH), welche als H₂-Sensor arbeitet. Die EPR-unsichtbare Reduzierung der Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S-Cluster) konnte durch XAS gezeigt werden. Möglicherweise sind ungewöhnliche Fe-S-Cluster an die RH gebunden (Buhrke, Löscher *et al.* 2005).

Die ersten spektroskopischen Untersuchungen der isolierten HoxC-Untereinheit der RH, welche das aktive Ni-Fe-Zentrum trägt, werden in **Kapitel 5** (Löscher *et al.* 2005) vorgestellt.

Kapitel 6 zeigt die ersten XAS-Spektren der membrangebundenen Hydrogenase (MBH). Bemerkenswerte Unterschiede wurden zwischen der MBH und der vergleichend untersuchten Standard-Ni-Fe-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* festgestellt (Löscher *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

In **Kapitel 7** werden die spektroskopischen und funktionellen Eigenschaften der drei O₂-resistenten Ni-Fe-Hydrogenase mit der Situation in Standard-Hydrogenasen verglichen. Schlussfolgerungen werden diskutiert und weitere Experimente werden vorgeschlagen.

Preface

Ni-Fe hydrogenases (Ni-Fe H₂ases) are metalloenzymes which catalyze the reversible cleavage of molecular hydrogen. Their catalytic site comprises a heterobimetallic nickel-iron complex. Since the discovery of hydrogenases in 1931 in *Escherichia coli* and other bacteria, extensive investigations, employing various spectroscopic, biochemical, and microbiological techniques, have been carried out in numerous scientific groups worldwide to unravel the structure and the mechanism of the H₂ase reaction. For a limited number of hydrogenases, structural information has been obtained by X-ray diffraction of crystallized protein.

In recent years, X-ray absorption spectroscopy (XAS) has become an important method in hydrogenase research. This technique provides information on the atomic structure, on the nuclear geometry, and on the electronic structure of metal sites. A key advantage of the XAS technique is that it can be applied to protein in solution and does not require a specific spin state. Accordingly, intermediate states of hydrogen conversion in hydrogenases can be trapped by freezing and subsequently analyzed individually, a prerequisite to unravel the catalytic mechanism.

Most hydrogenases are oxygen intolerant, meaning that H₂-conversion is completely inhibited by O₂. This feature in particular is disadvantageous for the use of H₂ases in biotechnological applications. Thus, to investigate the mechanism of H₂ conversion in H₂ases which are naturally O₂ tolerant is highly interesting. In the proteobacterium *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*), three dissimilar H₂ases are found which are oxygen insensitive.

This thesis summarizes the results of investigations on the oxygen-tolerant Ni-Fe hydrogenases from *R. eutropha* using a broad spectroscopic approach with a focus on X-ray absorption spectroscopy (XAS). XAS was employed in combination with complementary spectroscopic methods, namely electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Simulations of XANES and EXAFS spectra were carried out to unravel changes of the oxidation state and of the coordination environment of the Ni and the Fe atoms. These techniques were applied on wild-type samples of the three enzymes and specific mutants in various functional intermediate states as prepared by biochemical techniques. Purified protein of the *R. eutropha* hydrogenases was provided by the group of Prof. Bärbel Friedrich (Microbiology at Humboldt University, Berlin, Germany).

In **Chapter 1**, a general overview of the current knowledge on hydrogenases (biological context and molecular structure) is presented. The focus is on the Ni-Fe hydrogenases from *R. eutropha* which are the main subject of this work. A brief introduction to the XAS technique is provided.

Chapter 2 (Burgdorf, [Löscher et al. 2005](#)) describes an investigation on wild-type protein and selected mutants of the soluble NAD⁺-reducing Ni-Fe hydrogenase (SH). This enzyme reveals a non-standard Ni-Fe site and structural and oxidation-state changes during activation. A tentative reaction scheme for the activation of the SH and for hydrogen turnover at the Ni-Fe cofactor is presented.

A bias from H₂ cleavage to production was observed in H16L, a specific mutant of the SH ([Löscher et al. 2006](#)). This mutated protein reveals structural differences in comparison to the wild-type enzyme. The results of this study are presented in **Chapter 3**.

Chapter 4 is an investigation on the regulatory H₂ase (RH) which functions as a H₂ sensor. The EPR-invisible reduction of Fe-S clusters has been studied by XAS and unusual Fe-S clusters were discovered (Buhrke, [Löscher et al. 2005](#)).

The first spectroscopic investigation of the isolated HoxC subunit of the RH which carries the Ni-Fe site is presented in **Chapter 5** ([Löscher et al. 2005](#)). Isolated HoxC protein, for the first time, allowed for investigation of the Fe site of the Ni-Fe cofactor by XAS.

Chapter 6 shows the first XAS spectra of the membrane-bound hydrogenase (MBH). Remarkable differences between the MBH and the “standard” Ni-Fe hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*, which has been studied in comparison, are analyzed ([Löscher et al.](#), manuscript in preparation).

In **Chapter 7**, the spectroscopic and functional properties of the three O₂-resistant Ni-Fe hydrogenases are compared and related to the situation in standard H₂ases. Conclusions are presented and further experiments are proposed.

Contents

Vorwort	I
Preface	III
Abbreviations	VII
Chapter 1	1
General Introduction	3
Functional classification of hydrogenases	5
Crystal structures of Ni-Fe hydrogenases	7
Ni-Fe hydrogenases	7
Redox states of the active site detected by EPR and FTIR	13
The Ni-Fe hydrogenases of <i>Ralstonia eutropha</i>	15
The soluble hydrogenase (SH)	16
The regulatory hydrogenase (RH)	18
The membrane-bound hydrogenase (MBH)	20
X-ray absorption spectroscopy on biological samples (BioXAS)	22
Experimental setup for XAS and data processing	26
Motivation of this work	29
References	30

Chapter 2	39
Structural and oxidation-state changes at its non-standard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from <i>Ralstonia eutropha</i> detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy	
Chapter 3	91
Bias from H ₂ Cleavage to Production and Coordination Changes at the Ni-Fe Active Site in the NAD ⁺ -Reducing Hydrogenase from <i>Ralstonia eutropha</i>	
Chapter 4	111
Reduction of unusual iron-sulfur clusters in the H ₂ -sensing regulatory Ni-Fe hydrogenase from <i>Ralstonia eutropha</i> H16	
Chapter 5	135
The structure of the Ni-Fe site in the isolated HoxC subunit of the hydrogen-sensing hydrogenase from <i>Ralstonia eutropha</i>	
Chapter 6	147
Characterization of the Ni-Fe active site and the Fe-S clusters of the membrane-bound hydrogenase from <i>Ralstonia eutropha</i> by X-ray absorption spectroscopy	
Chapter 7	167
Conclusions and Outlook	168
Summary	173
Zusammenfassung	175
List of Publications	177
Danksagung	181

Abbreviations

A.	<i>Allochro matium</i>
AAS	Atomic absorption spectroscopy
ATCC	American Type Culture Collection
ADP	Adenosine-5'-diphosphat
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
C.	<i>Clostridium</i>
Cys	Cysteine
Cyt-b	Cytochrome b
D.	<i>Desulfovibrio</i>
Da	Dalton
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DFT	Density Functional Theory
<i>Dm.</i>	<i>Desulfomicrobium</i>
DTT	Dithiothreitol
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
FMN	Flavin mononucleotide molecule
FMS	Full multiple scattering
FT	Fourier transform
FTIR	Fourier Transform Infra Red (spectroscopy)
HASYLAB	Hamburger Synchrotronstrahlungslabor
His	Histidine
IR	Infrared
MBH	Membrane bound hydrogenase
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
PAS	Signaling modules found in sensory proteins
PDB	Protein data base
R.	<i>Ralstonia</i>
RH	Regulatory hydrogenase
SH	NAD-reducing soluble hydrogenase
TAT	Twin-arginine-translocation
TXRF	Total x-ray refraction spectroscopy
U	Units
UV	Ultra violet
XANES	X-ray absorption near edge spectroscopy
XAS	X-ray absorption spectroscopy

