

VAAM-Promotionspreis

Struktur und Funktion der Cytochrom c-Nitritreduktase

Oliver Einsle, Pasadena, USA

► Nitrit tritt im biogeochemischen Stickstoffkreislauf als zentrales Zwischenprodukt in verschiedenen Stoffwechselwegen auf. Während im Zuge der Denitrifikation jedoch lediglich eine Einelektronen-Reduktion zu Stickstoffmonoxid stattfindet, taucht im Rahmen der dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammoniak ein bemerkenswerter Reduktionsschritt um sechs Elektronen auf, katalysiert durch das Multihäm-Enzym Cytochrom c-Nitritreduktase (NiR). Die Elektronen stammen hierbei aus der Oxidation von Wasserstoff oder Formiat und gelangen über den Chinonpool der Cytoplasmamembran und eine zwischengeschaltete Chinol-Oxidase zur NiR.

Zur Aufklärung der Struktur des Enzyms aus den beiden γ -Proteobakterien *Sulfurospirillum deleyianum*^[1] und *Wolinella succinogenes*^[2] wurde zunächst das kodierende Gen, *nrfA* (nitrite reduction with formate), kloniert und sequenziert und die zugehörigen Proteine kristallisiert. Die Anwesenheit von Eisen in den Hämgruppen ermöglichte die Strukturbestimmung mittels *multiple-wavelength anomalous dispersion* (MAD) des Enzyms aus *S. deleyianum*. Mit dem daraus gewonnenen Strukturmodell gelang mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes auch die Strukturbestimmung für *W. succinogenes*.

Es zeigte sich in beiden Fällen, dass NiR funktional offensichtlich als Dimer vorliegt, mit fünf kovalent an die Proteinkette ge-

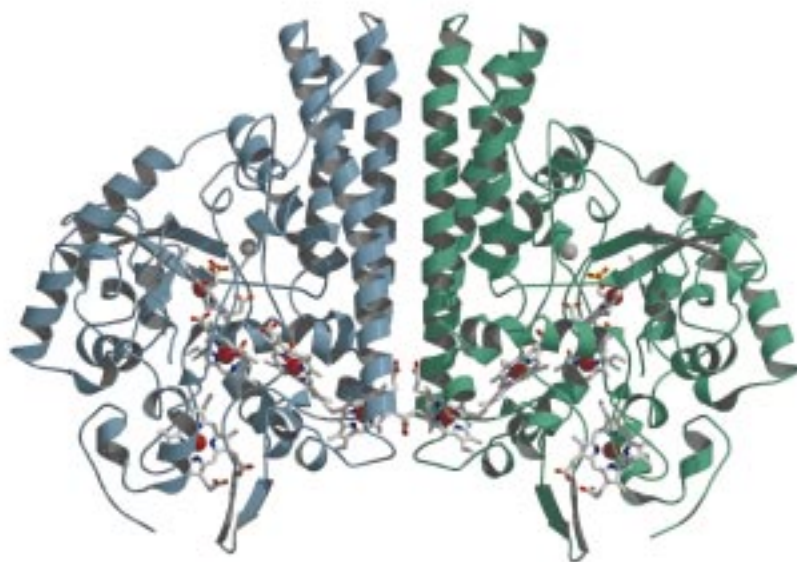


Abb. 1: Strukturmodell der Cytochrom c-Nitritreduktase. Das dimere Enzym besitzt zehn kovalent mit der Peptidkette verknüpfte Hämgruppen, von denen zwei eine freie Koordinationsstelle aufweisen, an der die Reduktion von Nitrit zu Ammoniak stattfindet.

bundenen Hämgruppen pro Monomer. Bereits aus der Aminosäuresequenz wurde deutlich, dass eine der fünf Hämgruppen ein von dem klassischen Cys-X-X-Cys-His abweichendes Bindemotiv aufweist, in dem das abschließende Histidin durch ein Lysin ersetzt ist. Wie aus der Röntgenstruktur ersichtlich, ist gerade diese Hämgruppe das aktive Zentrum der NiR: Ein fünffach koordiniertes *high spin*-Hämeisenzentrum mit einem (vorher nie beobachteten) Lysinrest als proximalem Liganden und einer freien Koordinationsstelle an der distalen axialen Position. Das Aktivzentrum ist von der Proteinoberfläche über einen Kanal mit deutlich positivem elektrostatischem Oberflächenpotential zugänglich, während ein zweiter Kanal mit im wesentlichen negativem elektrostatischem Potential auf der gegenüberliegenden Seite hin zur Proteinoberfläche führt. Da NiR das Anion Nitrit zum Kation Ammonium reduziert, gewährleistet diese Anordnung einen gerichteten Reaktionsfluss: Aufnahme von Anionen und Abgabe von Kationen sind räumlich getrennt, was Produktinhibition verhindert und somit die Effektivität des Systems steigert. Im Aktivzentrum selbst bindet Nitrit über sein Stickstoffatom an Eisen und wird sukzessive zu Ammonium reduziert, wobei die beiden Sauerstoffatome in Form von

Wasser abgespalten werden^[3]. Dabei treten NO und Hydroxylamin als enzymgebundene Zwischenstufen auf.

Über das Verständnis der komplexen Redoxchemie des Enzyms hinaus stellt NiR auch ein anspruchsvolles Modellsystem für intra- und intermolekulare Elektronentransfer dar, dessen spektroskopische und kinetische Eigenschaften bei weitem nicht vollständig verstanden sind. Ferner wird die Struktur ein wichtiger Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung eines auf dem Enzym-basierenden Biosensors sein.

Kontakt: einsle@caltech.edu

Literatur:

1. **Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. und Kroneck, P. M. H.** (1999) Structure of cytochrome c nitrite reductase, *Nature*. 400, 476-480.
2. **Einsle, O., Stach, P., Messerschmidt, A., Simon, J., Kröger, A., Huber, R. & Kroneck, P. M. H.** (2000) Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogenes*: Structure at 1.6 Å resolution, inhibitor binding and heme-packing motifs, *Journal of Biological Chemistry*. 275, 39608-39616.
3. **Einsle, O.** (2001) Cytochrome c nitrite reductase. In: **Messerschmidt, A., Huber, R., Wieghardt, K. und Poulos, T., eds.**, Handbook of Metalloproteins, John Wiley & Sons, New York.



Oliver Einsle

(Jahrgang 1970)

studierte Biologie an der Universität Konstanz. Seine Diplomarbeit fertigte er 1996 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung Struktur-

forschung, bei Prof. Robert Huber („Klonierung und Sequenzierung der Cytochrom c Nitritreduktase aus *Sulfurospirillum deleyianum*“) an. Die dort fortgesetzte Promotionsarbeit wurde an der Universität Konstanz von Prof. Peter M. H. Kroneck angenommen. **Seit Juli 2001** ist er Postdoc am California Institute of Technology in Pasadena, USA, Department of Chemistry, bei Prof. Douglas C. Rees.